

**ANÁLISIS TEÓRICO DE LAS CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES
Y QUÍMICAS PRESENTES EN COMPUESTOS CON CAPACIDAD DE
MODULAR EL CIRCUITO DEL QUÓRUM SENSING EN
*Pseudomonas aeruginosa***

MAICOL JOSE AHUMEDO MONTERROSA

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
MAGISTER EN QUIMICA**



**UNIVERSIDAD DE CARTAGENA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
GRUPO DE QUÍMICA CUÁNTICA Y TEÓRICA
PROGRAMA DE QUÍMICA
CARTAGENA, D. T. y C.
SEPTIEMBRE 2010**

**ANÁLISIS TEÓRICO DE LAS CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES
Y QUÍMICAS PRESENTES EN COMPUESTOS CON CAPACIDAD DE
MODULAR EL CIRCUITO DEL QUÓRUM SENSING EN
*Pseudomonas aeruginosa***

MAICOL JOSE AHUMEDO MONTERROSA

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
MAGISTER EN QUIMICA**

DIRECTOR: RICARDO VIVAS REYES

**UNIVERSIDAD DE CARTAGENA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
GRUPO DE QUÍMICA CUÁNTICA Y TEÓRICA
PROGRAMA DE QUÍMICA
CARTAGENA, D. T. y C.
SEPTIEMBRE 2010**

A mis padres: Nilson y Leila

Agradecimientos

Agradezco al padre creador universal por iluminarme durante este proceso.

A mis padres y hermanos por su constante apoyo.

A mi director de tesis Ricardo por confiar en mí y orientar este trabajo.

A los profesores, Benicio Sánchez, Gabriel Acevedo, por sus constantes consejos y ayuda para la realización de este proyecto.

A los evaluadores de este trabajo

A mis amigos, en especial a Jorge Anaya, Jorge Puello, Jorge Mosquera, Juan Drosos, Yiseth, Isel.

A la facultad de ciencias exactas y naturales y al departamento de postgrado e investigaciones.

A todos los integrantes del grupo de química cuántica y teórica, en especial a Carlos Güeto

Gracias a todos.

RESUMEN

En este trabajo se estudiaron las características estructurales necesarias para que un compuesto sea identificado como antagonista o agonista del *quórum sensing* en *Pseudomonas aeruginosa*.

En la primera parte de este trabajo se aplicó la metodología del *docking* molecular para simular el acoplamiento de 19 análogos de la acil homoserina lactona en el sitio activo del receptor transcripcional *LasR*, para tal propósito se empleó el programa *AutoDock 4.2*; fueron analizadas las mejores poses de cada ligando y se hizo un análisis cualitativo de las posibles interacciones formadas entre los análogos y el receptor.

Del análisis realizado a cada complejo proteína ligando se encontró que los aminoácidos, Tirosina-64 y Tirosina-47, están involucrados en interacciones importantes para determinar la actividad antagonista de los análogos en estudio, además se analizó el efecto de los sustituyentes sobre el anillo aromático de los análogos y el efecto de estos en la interacción con los aminoácidos mencionados. Se hicieron cálculos de superficie de potencial electrostático para explicar la tendencia de los valores de IC_{50} cuando el sustituyente en el anillo aromático desciende por el grupo de los halógenos. Posteriormente, para evaluar cuantitativamente las interacciones existentes entre los complejos formados, se realizó una serie de cálculos *ONIOM* para calcular las energías presentes en diferentes regiones de los complejos, además, se graficó las energías obtenidas por los métodos *ONIOM* contra el logaritmo de los valores de IC_{50} , para encontrar la posible correlación entre estas dos variables.

En la segunda parte del trabajo, se diseñaron dos modelos farmacofóricos, el primero se hizo utilizando el compuesto más activo (*TP-1*), resaltando las características químicas más importantes para el reconocimiento molecular. El segundo modelo se basó en el alineamiento de tres de los ligandos más activos (*TP-1*, *TP-3* y *TP-4*).

La finalidad del alineamiento es que todas las características químicas importantes para el reconocimiento molecular en estas moléculas queden lo mas cercanas posible. Estos modelos farmacofóricos fueron creados para utilizarlos como filtro en un cribado sobre una base de datos de conformaciones de varios compuestos con posible actividad agonista del *quórum sensing*.

La base de datos fue creada utilizando 4 compuestos activos reales, 5 compuestos con posible actividad agonista y el resto de los compuestos de la base de datos fue obtenido de *PubChem* disponible en línea. El criterio de selección de compuestos en *PubChem*, fue la búsqueda basada en la subestructura común que presentan los trifenilos, los agonistas. Después de crear la base de datos se cribó sobre una base de datos de conformaciones previamente generada. Los compuestos que fueron identificados como posibles *hits* fueron utilizados para realizar cálculos de *docking*.

En general el análisis del *docking* permitió identificar los aminoácidos presentes en el sitio activo que entablan interacciones tipo puente de halógeno con los análogos de la acil homoserina lactona, siendo estas interacciones importantes para interrumpir el circuito del *quórum sensing*.

Palabras claves: *Quórum sensing, Docking, ONIOM, farmacóforo, AHLs, Análogos, Trifenilos*

ÍNDICE

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN	1
1. QUÓRUM SENSING.....	2
1.1 Autoinductores	4
1.2 Sistemas de quórum sensing en bacterias gram negativas.....	6
1.3 Funciones de la familia de proteínas LuxI y LuxR	9
1.3.1 Función de las Proteínas tipo LuxI.	10
1.3.2 Función de las proteínas tipo LuxR.....	11
1.4 Quórum sensing en bacterias gram positivas	12
1.5 <i>Pseudomona aeruginosa</i>	14
1.5.1 Caracterización de sistemas “Quórum sensing” en <i>P. aeruginosa</i>	15
1.5.2 Modelo de regulación por sistemas quórum sensing en <i>P. aeruginosa</i>	16
1.6 Biopelículas: estructuras de interacción entre bacterias	17
1.7 Quórum sensing como Blanco para terapia antimicrobial.....	20
1.7.1 Inhibición de la generación de la señal AHL	20
1.7.2 Inhibición por diseminación de la señal AHL.....	21
1.7.3 Inhibición en la recepción de la señal AHL.....	22
1.7.4 Inhibición del quórum sensing expresado por organismos superiores.....	24
1.7.5 Inhibición del quórum sensing por furanonas halogenadas.....	24
1.8 Modulación del quórum sensing bacterial con ligandos sintéticos.....	25
1.9 Referencias	28

CAPITULO II. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	33
2. DISEÑO DE LIGANDOS ASISTIDO POR ORDENADOR	34
2.1 Cribado virtual basado en ligandos o métodos indirectos	35
2.1.1 Diseño de modelos farmacofóricos	35
2.1.1.1 Parámetros de análisis de los farmacóforos.....	38
2.1.2 QSAR y 3D-QSAR	40
2.2 Cribado virtual basado en el receptor o métodos directos	41
2.2.1 Docking	42
2.2.2 Combinación de métodos basados en el receptor y en ligandos.....	44
2.2.3 Técnicas de diseño de novo	44
2.3 Química computacional	45
2.3.1 Mecánica molecular	46
2.3.2 Mecánica cuántica y Métodos de cálculos.....	47
2.3.3 Métodos ab initio	48
2.3.4 Métodos semiempíricos	49
2.3.5 Teoría del funcional de la densidad (DFT).....	49
2.3.6 Método ONIOM	50
2.3.7 Detalles del método ONIOM.....	52
2.3.8 Conjunto de funciones de bases.....	54
2.4 Referencias	57
CAPITULO III. METODOLOGÍA	63
3. METODOLOGÍA	64
3.1 Predicción del modo y energía de unión de análogos de AHLs por cálculos de Docking y ONIOM.	65
3.1.1 Preparación del docking	66
3.1.2 Calculos ONIOM	67

3.2	Diseño de modelos farmacofóricos y docking molecular, para identificar posibles compuestos con actividad agonista del Quórum sensing	69
3.2.1	Docking	70
3.3	Referencias	71

CAPITULO IV. RESULTADOS I

4.	Predicción del modo y energía de unión de análogos de AHLs por cálculos de Docking y ONIOM.....	74
4.1	Docking entre LasR y Análogos	76
4.1.1	Docking entre PHLs y LasR	79
4.1.2	Docking entre POHLs y LasR	81
4.1.3	Docking entre PPHLs y LasR	83
4.1.4	Análisis general	88
4.2	Cálculos ONIOM	90
4.3	Referencias	96

CAPITULO V. RESULTADOS II

5.	Diseño de modelos farmacofóricos y docking molecular, para identificar posibles compuestos con actividad agonista del Quórum sensing	98
5.1	Desarrollo de modelos farmacofóricos	100
5.1.1	Base de datos	101
5.1.2	Modelo farmacofórico 1: basado en el ligando mas activo	102
5.1.3	Modelo farmacofórico 2: basado en el alineamiento	104
5.2	Docking molecular	106
5.2.1	Docking entre LasR y los posibles agonistas	111
5.3	Referencias	114

CAPITULO VI. CONCLUSIONES.....

115

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN



*“El futuro tiene muchos nombres. Para los débiles es lo inalcanzable.
Para los temerosos, lo desconocido. Para los valientes es la oportunidad”*

Victor Hugo

1. QUÓRUM SENSING

Quórum sensing (QS) es un proceso 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, las bacterias coordinan sus actividades con el fin de funcionar como una unidad multicelular [1]. Este mecanismo está basado en la producción, por la bacteria, de pequeñas moléculas señales llamadas autoinductores (AIs), las cuales son liberadas en el medio extracelular y son detectadas por otras bacterias a través de receptores específicos [2]. Cuando la población bacteriana alcanza una densidad crítica, o *Quórum*, las bacterias alteran sus niveles de expresión de genes para coordinar un amplio rango de conductas, incluyendo producción de factores de virulencia, formación de biopelículas, bioluminiscencia, esporulación, entre otros comportamientos [3, 4]. (Figura 1)

A baja densidad bacteriana, pequeñas cantidades del autoinductor son producidas por una enzima del tipo *LuxI*, el autoinductor difunde pasivamente al medio extracelular, a favor de un gradiente y son inmediatamente diluidos en los alrededores del medio. Un incremento en la densidad de población bacteriana resulta en una acumulación gradual de autoinductores en y alrededor de las células. El autoinductor activa específicamente un receptor transcripcional por unión a este. Los receptores activados luego interactúan con secuencias de ADN blanco y mejoran o bloquean la transcripción de los genes regulados por el *quórum sensing*, resultando en la activación sincronizada de ciertos fenotipos en una población bacteriana [5, 6]. (Figura 2)

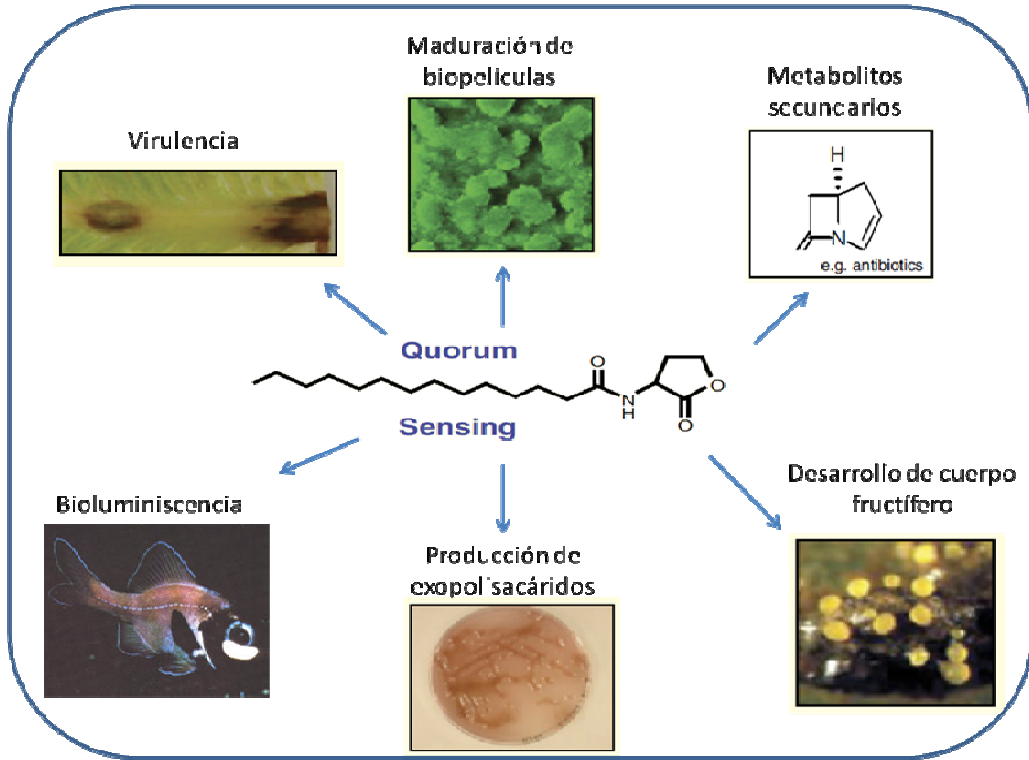


Figura 1. Algunos fenotipos regulados por el *quórum sensing* en bacterias gram negativas

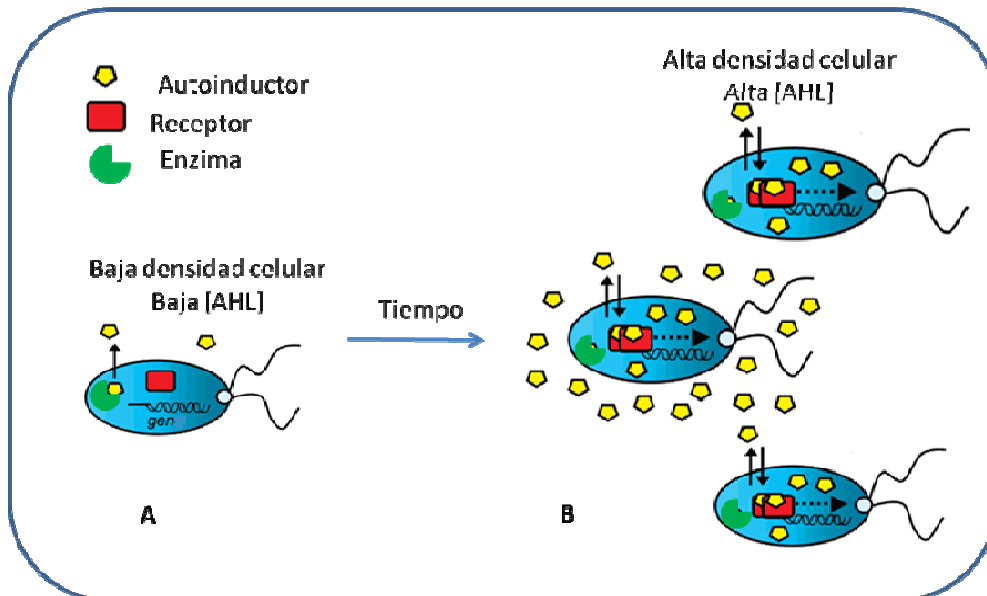


Figura 2. Esquema del *quórum sensing* en bacterias gram negativas. A) Baja densidad celular. B) Alta densidad celular. (Adaptado de Blackwell *et al.*, 2007)

Existe un sistema de *quórum sensing* 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. Este sistema de *quórum sensing* mixto utiliza como molécula señal, un diéster borato furanosil (Figura 4) 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. Generalmente estas moléculas señal son conocidas como autoinductor II (*AI-2*) [9].

Tabla 1. Estructuras de acil homoserina lactonas producidas por diferentes especies de bacterias

Nombre	Estructura	Microorganismo
N-butiril-homoserina lactona (C4-HSL)		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
N-3-oxo-dodecanoil-homoserina lactona (3-oxo-C12-HSL)		
N-hexanoil-homoserina lactona (C6-HSL)		<i>Chromobacterium Violaceum</i>
N-3-oxo-hexanoil-homoserina lactona(3-oxo-C6-HSL)		<i>Vibrio fischeri</i>
N-octanoil-homoserina lactona(C8-HSL)		<i>Burkholderia cepacia</i>
N-3-oxo-octanoil-homoserina lactona (3-oxo-C8-HSL)		<i>Agrobacterium tumefaciens</i>

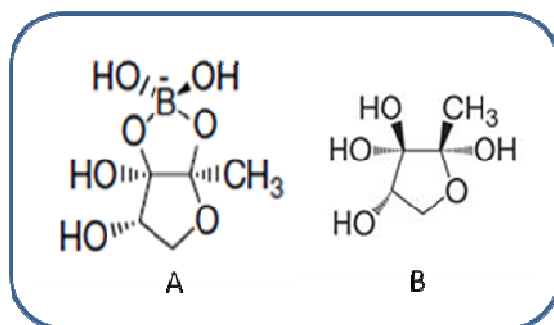


Figura 4. estructuras de AI-2. A) (2S, 4S)-2-metil-2,3,3,4-tetrahidroxitetrahydro-Furano-borato (S-THMF-borato). B) (2R, 4S)-2-metil-2,3,3,4-tetrahidroxitetrahydrofurano (R-THMF) (Tomado de González y Keshava. 2006)

El *quórum sensing* es generalmente considerado en el contexto de señalización célula a célula entre miembros de una misma especie bacteriana, más que como una respuesta de un organismo a un metabolito producido por otro. Sin embargo, los antibióticos poseen muchas de las características de las moléculas señal presentes en el *quórum sensing*, las cuales requieren: 1) La producción de la molécula señal del *quórum sensing* tome lugar durante etapas específicas del crecimiento, bajo ciertas condiciones fisiológicas; o en respuestas a cambios medio ambientales; 2) La molécula señal del *quórum sensing* se acumula en el medio extracelular y es reconocida por un receptor bacterial específico; 3) El aumento de la concentración a un umbral crítico de la señal del *quórum sensing* genera una respuesta concertada y 4) La respuesta celular se extiende más allá de los cambios fisiológicos necesarios para metabolizar o desintoxicar la molécula [10].

1.2 Sistemas de *quórum sensing* en bacterias gram negativas

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 acil variable. Basados en la longitud de los grupos acil, las *AHLs* pueden en general ser clasificadas como moléculas de cadena corta o cadena larga. Las *AHLs* de cadena corta tienen entre 4 a 8 átomos de carbono en la cadena acil, mientras las *AHLs* de cadena larga tienen de 10 a 18 carbonos.

La longitud, el nivel de saturación de la cadena acil acoplada y la presencia o ausencia de sustituciones hidroxilo u oxo en la posición C-3 de la cadena acil proporcionan diversificación y especificidad para el circuito del *quórum sensing* presente en una población bacteriana mixta. [4, 11]. En informes previos, una variedad de cepas de bacterias diferentes, pueden tener el mismo *AI*, pero este puede estar involucrado en la regulación de diferentes fenotipos en cada cepa. Por ejemplo, 3-oxo-C6-*HSL* regula el fenómeno de bioluminiscencia en *Vibrio fischeri*, pero activa la producción de exopolisacáridos en *Erwinia stewartii* [12].

Entre los ejemplos mejor caracterizados y estudiados hasta la fecha, relacionados con la comunicación entre bacterias, está el mecanismo de autoinducción presente en la bacteria marina *Vibrio fischeri*, el cual tiene como consecuencia la producción de bioluminiscencia por parte de las bacterias. El autoinductor de luminiscencia de *V. fischeri*, designado *VAI* (“*vibrio* autoinductor”) es el 3-oxo-N-(tetrahidro-2-oxo-3-furil) hexanamida o comúnmente llamado N-3- (oxohexanoil) homoserina lactona. A baja densidad celular, el *VAI* se difunde pasivamente al medio extracelular, mientras que a alta densidad celular, *VAI* se acumula en la célula bacteriana y alcanza una concentración intracelular equivalente a la concentración extracelular (Figura 5) [13].

V. fischeri puede encontrarse en forma de vida libre, o en simbiosis, habitando los órganos de luz de peces marinos y calamares. En la forma de vida libre, como es de esperar, se encuentra a muy baja densidad celular, en el orden de 10^2 células/mL y no es luminiscente. En los órganos de luz, alcanzan densidades aproximadamente de 10^{10} células/mL, por lo cual se activa el sistema de autoinducción y se expresan los genes de luminiscencia [13].

En la simbiosis, el calamar o el pez usan la luz provista por la bacteria para evitar la depredación o para atrapar presas. La bacteria por otro lado se beneficia por que el órgano de luz es rico en nutrientes multiplicándose en números inalcanzables en el mar. [14].

Este grupo de proteínas (*LuxR*) exhiben una gran homología principalmente en la región carboxi-terminal (Figura 6). En general, opera el mecanismo descrito para el sistema de *V. fischeri*, donde el homólogo de *LuxR* es el receptor transcripcional, que estimula la transcripción del gen que codifica para un autoinductor sintetasa (homólogo de *luxI*) y en consecuencia, se expresan genes requeridos a altas densidades celulares.

A través de observaciones de síntesis enzimática de moléculas autoinductoras, se ha propuesto que las proteínas tipo *LuxI* utilizan como sustratos el grupo homoserina lactona derivado de S-adenosilmetionina (intermediario en la ruta biosintética de treonina y metionina) y cadenas aciladas en complejos con proteínas transportadoras, derivadas de intermediarios en la biosíntesis de ácidos grasos [19].

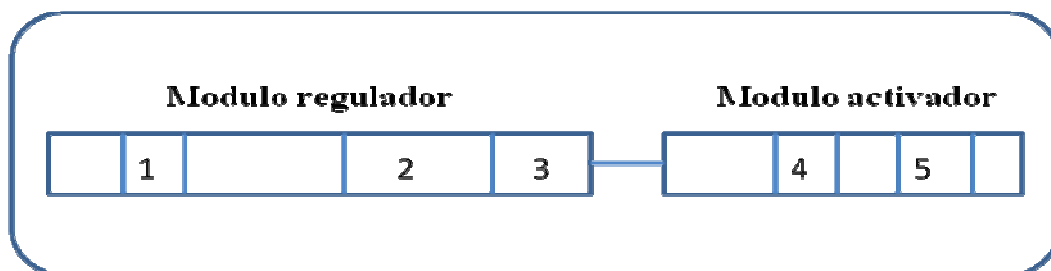


Figura 6. Diagrama esquemático de regiones de las proteínas de la súper familia *LuxR*. En el módulo regulador se distinguen: 1. Región de autorregulación de *LuxR*. 2. Región del autoinductor; 3. Región de multimerización. En el módulo activador se reconocen dos regiones. 4. Dominio HTH de unión al ADN; región c-terminal requerida para activación transcripcional

1.3 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 de las distintas proteínas tipo *LuxI* y tipo *LuxR*, son idénticas a las de *LuxI* y *LuxR* de *V. fischeri*. Dichas investigaciones han contribuido a nuestra comprensión de la biosíntesis de *AHLs*, la detección y activación transcripcional del circuito del quórum sensing.

En la Tabla 1 se muestra una lista de algunas especies de bacterias conocidas, las cuales poseen proteínas tipo *LuxI* y/o *LuxR*, la estructura de los autoinductores, y sus funciones reguladas. Debido a que en *V. fischeri* se observó por primera vez el fenómeno del *quórum sensing* y se identificaron las proteínas *LuxI/LuxR* que regulaban el proceso, a todas las demás proteínas homologas de las diferentes bacterias gram negativas que regulan el proceso del *quórum sensing* se dice que son del tipo *LuxI/LuxR*. A continuación se muestra un resumen de la información relacionada con las familias de proteínas *LuxI* y *LuxR*.

1.3.1 Función de las Proteínas tipo *LuxI*. S-adenosilmetionina (*SAM*) y las proteínas transportadoras de grupos acil (*acil-ACP*) son los sustratos para las enzimas tipo *LuxI*, cuya función es la producción del autoinductor. Las *acil-ACP* son un intermediario en la biosíntesis de ácidos grasos y también actúan sobre la enzima *LuxI* en la biosíntesis de *AHLs*. Las proteínas tipo *LuxI* unen específicamente un *acil-ACP* a *SAM* por medio de la formación de un enlace amida entre la cadena lateral acil de la *acil-ACP* y el grupo amino de la homocisteína de *SAM*. La subsecuente lactonización de los intermediarios ligados en la interacción, junto con la liberación de metiltioadenosina, resulta en la formación del autoinductor *AHLs* [20, 21]. En la figura 7 se observa un esquema para la biosíntesis de *AHL* dirigida por *LuxI*.

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. Estas enzimas incluyen *LuxI* de *V. fischeri* [20], *TraI* de *Agrobacterium tumefaciens* [20], *RhlI* de *Pseudomonas aeruginosa* [21]. En conjunto, estos resultados sugieren que la ruta biosintética *SAM/acil-ACP* está probablemente conservada en todos los homólogos de *LuxI*. Estudios bioinformáticos realizados por algunos grupos de investigación muestran que estas proteínas presentan un porcentaje de similitud bajo a nivel de secuencia de aminoácidos [22].

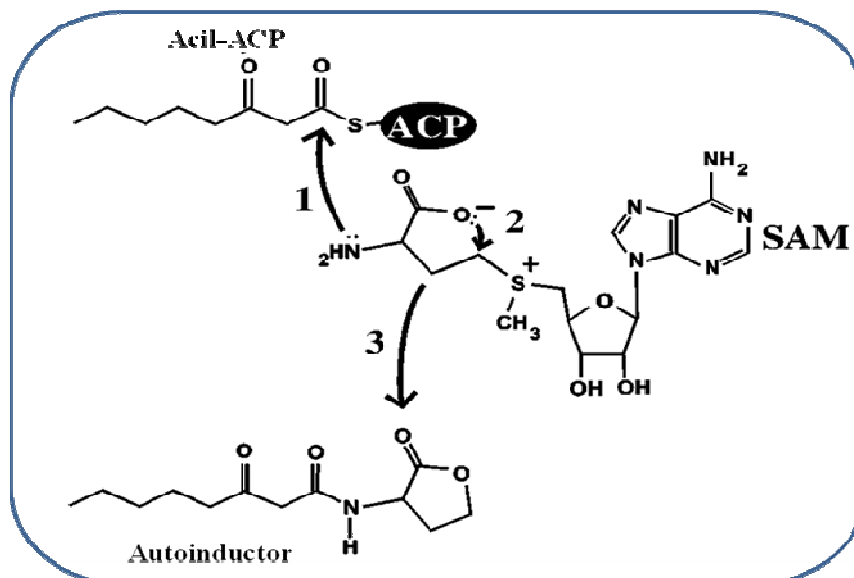


Figura 7. Biosíntesis dirigida por *LuxI* del autoinductor acil homoserina lactona. (Tomado de Blasser *et al.*, 2001)

Los autoinductores homoserina lactonas solo difieren en sus respectivas cadenas acil. Este hecho es un indicativo de que la especificidad para la interacción de una proteína tipo *LuxI* particular con la correcta *acil-ACP* es codificada en la cadenas lateral acil del *acil-ACP*. Una precisa interacción entre cierta proteína tipo *LuxI* y un grupo *acil-ACP* específico puede dirigir a cada proteína tipo *LuxI* para producir solo un autoinductor. Hay algunos casos conocidos en los cuales un proteína tipo *LuxI* sintetiza mas de un autoinductor. Sin embargo una especie de autoinductor es predominante.

1.3.2 Función de las proteínas tipo *LuxR*. Las proteínas tipo *LuxR* (receptores transcripcionales) son responsables por la unión a su autoinductor *AHL*, el complejo receptor/autoinductor, se dimeriza 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*, muestran que estas presentan dos dominios. [23, 24] El dominio amino terminal involucrado en la unión de los autoinductores *AHL*, y el dominio carboxi terminal, requerido para la unión

y activación transcripcional [25, 26]. Los residuos en el dominio carboxi terminal son también requeridos para la multimerización de la proteína *LuxR*, y los multimeros son la especie que se une a las secuencias promotoras de DNA. [27-29] Estudios realizados por nuestro grupo de investigación muestran que este tipo de proteínas presenta una alta homología en la región de unión de la homoserina lactona, lo anterior puede ser utilizado en el futuro como alternativas de control bacterial masivo [30].

Los resultados de varios estudios realizados con *TraR* de *A. tumefaciens* y *LasR* *P. aeruginosa* sugieren fuertemente que las proteína tipo *LuxR* no pueden plegarse en ausencia de su autoinductor [31, 23, 24]. Un reciente estudio muestra que la *apo-TraR* es susceptible a la degradación proteolítica, mientras *TraR*, unida con su autoinductor cognado, es resistente a la proteólisis. El autoinductor de *A. tumefaciens* confiere resistencia a la proteólisis solo a la proteína *TraR* naciente, pero no a la proteína *TraR* previamente sintetizada. Algunos reportes muestran que interacción de *TraR* con su autoinductor cognado promueve la dimerización, y estos dímeros de *TraR* se unen a promotores de DNA [32]. Estos resultados son excitantes por que ellos son el primer ejemplo de una proteína que requiere su ligando para plegarse. Aunque estudios actuales demostraron que *LasR* puede plegarse completamente en presencia de unos compuestos estructuralmente diferentes a las *AHLs*, este es un resultado que puede ser analizado mas afondo para tratar de entender la función de los autoinductores en el circuito del *quórum sensing* [33].

1.4 Quórum sensing en bacterias gram positivas

Las bacterias gram positivas también regulan una amplia variedad de procesos en respuesta al incremento en la densidad de población celular. Sin embargo, en contraste con las bacterias gram negativas, las cuales usan los autoinductores *AHL*, las bacterias gram positivas emplean péptidos u oligopéptidos modificados, los cuales son secretados como autoinductores para controlar el circuito del quórum sensing.

En general, los péptidos son secretados por medio de un transportador de la familia ABC (*ATP-Binding-Cassette*). Nuevamente a diferencia de las bacterias gram negativas que usan generalmente los receptores tipo *LuxR*, las bacterias gram positivas usan unas proteínas repuesta de dos componentes para la detección de los autoinductores. [34]

El mecanismo de señalización es una cascada de fosforilación/desfosforilación [34, 36]. Un modelo general para el *quórum sensing* en bacterias gram positivas es mostrado en la Figura 8. En resumen, el péptido autoinductor secretado incrementa su concentración como una función de la densidad de población celular. Un sensor quinasa de dos componentes, son los detectores para los péptidos señales secretados. La interacción con el péptido inicia una serie de eventos de fosforil que culminan en la fosforilación de una proteína regulador de respuesta cognado. La fosforilación del regulador de respuesta activado esto, permitiendo, su unión al ADN y alterar la transcripción de los genes blanco controlados por el *quórum sensing* [1]

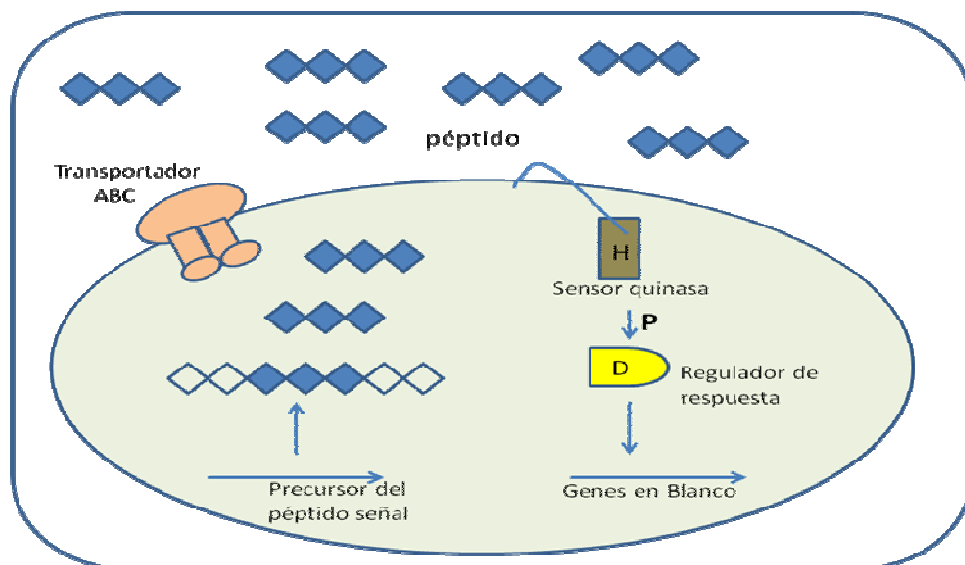


Figura 8. Un modelo general para el *quórum sensing* mediado por péptidos en bacterias gram positivas (adaptado de Blasser *et al.*, 2001)

1.5 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria gram-negativa perteneciente a la rama γ de las proteobacterias, misma a la que pertenecen las enterobacterias. [36, 37]. *P. aeruginosa* es un microorganismo que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza [38]. Debido a su omnipresencia muchas cepas han evolucionado convirtiéndose en cepas resistentes a diversos antibióticos, lo que puede aumentar su relevancia en las áreas de investigación relacionadas directamente con la salud humana.

De los muchos sistemas de *quórum sensing* conocidos, el sistema presente en *Pseudomonas aeruginosa* es el más intensamente estudiado, debido a los potenciales efectos fatales de sus infecciones, las cuales causan la muerte a varios miles de individuos inmunocomprometidos cada año [39]. *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista que causa la muerte en la mayoría de los enfermos con *fibrosis quística*, en pacientes con *SIDA*, víctimas de quemaduras, entre otros [40]. Además es la bacteria gram negativa que se encuentra con mayor frecuencia en las infecciones nosocomiales (intrahospitalarias), siendo responsable de la neumonía nosocomial e infecciones en el tracto urinario [41].

Como se menciona arriba los pacientes con *fibrosis quísticas* son generalmente un grupo muy expuesto a las infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa*. Dicha bacteria coloniza de forma muy eficiente el tracto respiratorio de estos pacientes, resultando mortal en la mayoría de los casos. La causa por la cual esta bacteria es tan mortal en estos casos se debe a que las cepas de estas bacterias no pueden ser eliminadas por el sistema inmune y, hasta la fecha no existen tratamiento efectivos contra esta cepas mucoides [42]. Esto se debe particularmente por que dicha bacteria crea y habita en superficies llamadas biopelículas, las cuales incrementan la resistencia contra antibióticos y contra las defensas del sistema inmune del hospedero [42].

1.5.1 Caracterización de sistemas “*Quórum sensing*” en *P. aeruginosa*

El patógeno oportunista humano *P. aeruginosa*, posee al menos dos circuitos del *quórum sensing* bien identificados. Estos dos pares de homólogos de *LuxI/LuxR*, *LasI/LasR* y *RhII/RhlR* están conectados jerárquicamente. En los pares de homólogos, tanto *LasI* como *RhII* son las enzimas que catalizan la formación de la molécula señal de cada circuito, *N*-(3-oxododecanoil)-homoserina lactona [43] and *N*-(butil)-homoserina lactona [44] respectivamente. Los dos circuitos regulatorios actúan en forma coordinada para controlar la expresión de un número considerable de factores de virulencia en *P. aeruginosa*.

El circuito del *quórum sensing* en *P. aeruginosa* funciona como sigue. A altas densidades celulares, *LasR* se une a su autoinductor, y ellos juntos se unen a secuencias específicas en el ADN, codificando la expresión de cierto número de factores de virulencia, u otros comportamientos. Esta determinante patogenicidad incluye, la producción elastasa, codificada por *lasB*; una proteasa codificada por *lasA*; Exotoxina A, codificada por *toxA*; y fosfatasa alcalina, la cual es codificada por *aprA* [45]. Análogo al circuito *LuxI/LuxR* en *V. fischeri*, *LasR* también activa la expresión de *lasI*, el cual establece un *feedback* positivo [46].

El complejo *LasR*/Autoinductor también activa la expresión del segundo sistema del *quórum sensing* presente en *P. aeruginosa*, induciendo específicamente la expresión del gen *rhlR*. El receptor *RhlR* se une al autoinductor producido por la enzima *RhII*; este complejo formado induce la expresión de dos genes que también están bajo el control del sistema *LasI/LasR*, *lasB* y *aprA*. Adicionalmente, el complejo *RhlR*/autoinductor activa una segunda clase de genes específicos. Estos genes *rhlAB*, codifican la rhamnosiltransferasa y están involucrados en la síntesis del biosurfactante ramnolípido; genes involucrados en la síntesis del antibiótico piocianina; el gen *leca*, el cual codifica la lectina citotóxica; y el gen *rhlI* [47, 48]

Estudios han mostrado que estos dos sistemas controlan aproximadamente el 6% del genoma de *P. aeruginosa*, destacando la importancia de la expresión genética controlada por el QS en *P. aeruginosa* [49].

Un tercer autoinductor ha sido identificado y existen evidencias experimentales, las cuales sugieren que dicho autoinductor esta involucrado en el circuito del *quórum sensing* en *P. aeruginosa* [50]. Esta señal es notable por que es estructuralmente diferente a las homoserina lactonas. Más bien, es un 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona denotado como PQS (por sus siglas en ingles *Pseudomonas quinolone signal*), recientemente se identifico el receptor de dicha molécula, el cual es conocido como PqsR [51]

Recientes estudios realizados sobre el sistema del *quórum sensing* presente en *Pseudomonas aeruginosa* han revelado que el *quórum sensing* es crucial para la formación de las biopelículas. Específicamente, en *P. aeruginosa* mutante del gen *lasI*, esta comprobado, no desarrolla una biopelícula madura. Más bien, ellas terminan la formación en un estado de microcolonias [52].

1.5.2 Modelo de regulación por sistemas *quórum sensing* en *P. aeruginosa*

En la Figura 9 se presenta un modelo que integra lo que se conocía hasta hace varios años sobre la regulación jerárquica de los dos sistemas de “*quórum sensing*” existentes en *P. aeruginosa*. En la actualidad se conocen sistemas de regulación del *quórum sensing* en *P. aeruginosa* mucho más complejos. El circuito inicia con la transcripción del gen *lasR*, inducida por un posible activador transcripcional hasta hoy desconocido, o tal vez por un mecanismo de represión de algún regulador negativo. El receptor *LasR* activa la transcripción del gen *lasI*, el cual promueve la acumulación del autoinductor PAI-1 en el medio extracelular, a alta densidad celular, PAI-1 difunde hacia el interior de las bacterias y se une a el receptor *LasR*, este complejo *LasR/PAI-1* se une a otro idéntico, formando un homodímero, este homodímero, se une a una región específica del ADN y amplifica la

respuesta activando la transcripción de *lasR* y *lasI* (autorregulación positiva) a la vez que dirige la transcripción de otros genes del regulón *Las*, entre ellos: *lasB*, *lasA*, *toxA*, *apr*, *rhlR* y *rhlI*. Una vez expresado el receptor *RhlR*, éste forma un complejo (*RhlR/PAI-2*) con la segunda molécula autoinductora *PAI-2*, sintetizado por *RhlI*. Este complejo dirige la síntesis de *rhlI*, acumulándose *PAI-2* en la célula y se hace disponible para la formación de más complejos activadores *RhlR/PAI-2* que estimulan la transcripción de *rhlAB*, *lasB*, *rpoS* y *rhlI*. La regulación post-traducciona propuesta de *PAI-1* sobre *RhlR*, sugiere que *PAI-1* inicialmente, alcanza mayor concentración que *PAI-2* y se asocia con *RhlR* evitando la formación de complejos activadores *RhlR-PAI-2*. Los complejos *RhlR/PAI-1* parecen ser inactivos [53].

A esta red regulatoria podría integrarse un tercer gen homólogo a *lasR*, encontrado en el genoma de *P. aeruginosa*, designado *qscR* ("quórum sensing control"). Este gen controla el tiempo en el cual la expresión de genes es regulada por "quórum sensing", ejerciendo su efecto presumiblemente por represión de *lasI* [54]. La represión de *lasI* por *QscR* podría garantizar que los genes controlados por "quórum sensing" no sean activados y expresados en ambientes o condiciones de vida celular donde los mismos no son requeridos.

1.6 Biopelículas: estructuras de interacción entre bacterias

Las biopelículas se consideran ahora omnipresentes en el mundo natural. La formación de las biopelículas, como estructura de organización bacteriana, es una consecuencia del quórum sensing (*QS*) [55]. Dentro de las diversas opciones de manifestar fenómenos de organización bacterianas, la asociación en biocapas de las bacterias se da como resultado de la interacción entre las moléculas señal que se denominan autoinductores, con los receptores transcripcionales que permiten o bloquean la expresión de genes involucrados en el quórum sensing *QS*. Las biopelículas están formadas por una o más comunidades de microorganismos, embebidos en un glicocálix, unidos a una superficie sólida.

La razón por la que existen las biopelículas en la naturaleza es que permiten a los microorganismos unirse y multiplicarse sobre distintas superficies. Además, las bacterias que forman parte de una biopelícula disfrutan de un gran número de ventajas en comparación con las bacterias aisladas (plantónicas) lo que permite la supervivencia, la conjugación bacteriana, la variación fenotípica de las mismas y el intercambio de información genética [55].

El proceso de formación de una biopelícula involucra una serie de eventos, el primero de ellos es el transporte o movimiento de los microorganismos hacia el sustrato donde se adherirán, al llegar allí las bacterias pueden o no adherirse dependiendo de las fuerzas de interacción con ese sustrato, esta adhesión inicial es reversible, pero en ausencia de producción de exopolímeros se vuelve menos reversible debido a la pérdida progresiva de agua. Una vez que se han adherido los colonizadores iniciales o primarios, los colonizadores secundarios se coadhieren a estas superficies, posteriormente el crecimiento celular guía a la acumulación microbiana en la biopelícula.

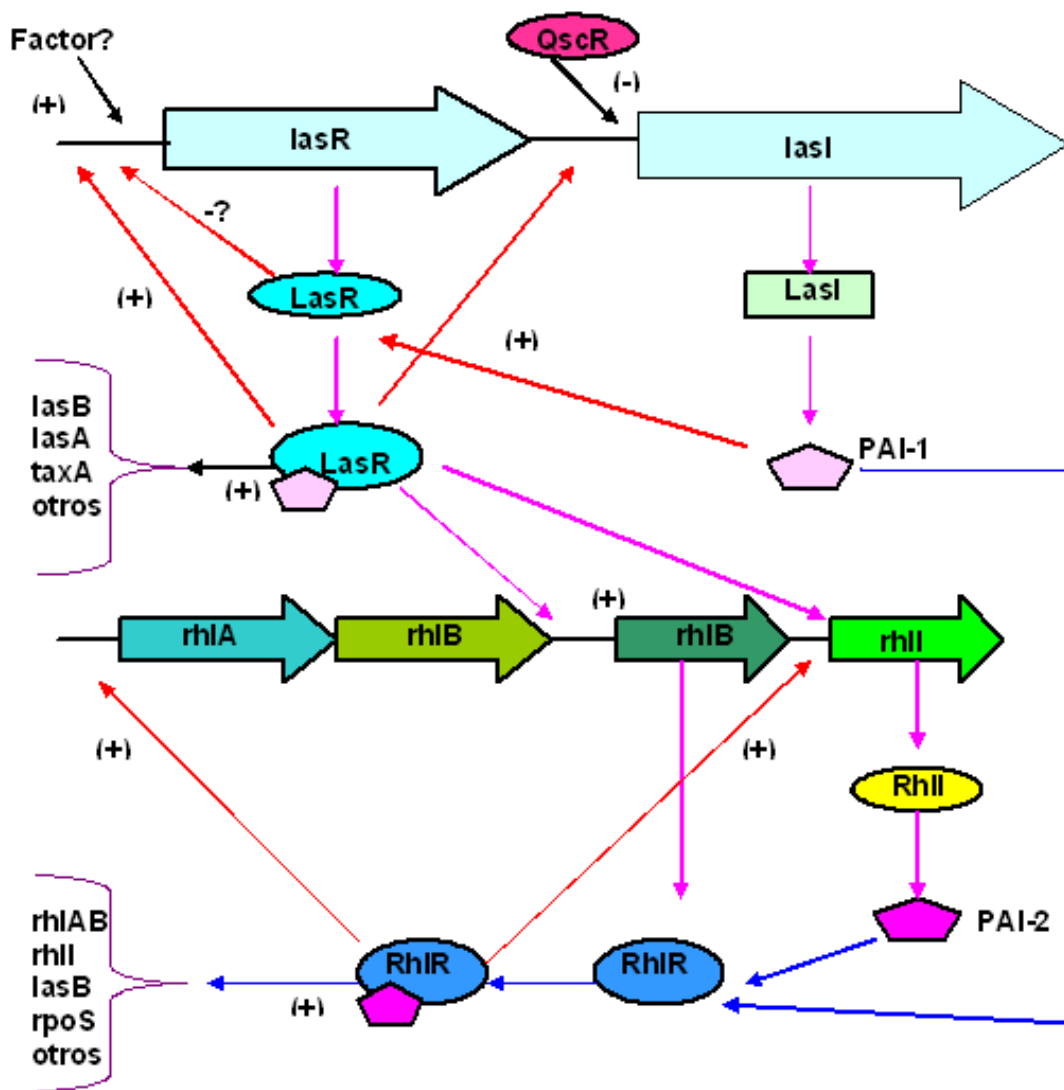


Figura 9. Modelo del circuito regulatorio de los dos sistemas "quórum sensing" descritos en *P. aeruginosa*.

1.7 Quórum sensing como Blanco para terapia anti-microbial

La búsqueda y síntesis de compuestos con capacidad de modular los circuitos del *quórum sensing* pueden constituir una nueva alternativa para la generación de agentes antimicrobiales con aplicaciones en muchos campos, incluyendo medicina (humana y veterinaria), la agricultura, y la acuicultura, y sobre todo los intereses comerciales asociados son considerables [56]. En los últimos años un número de compañías cuya meta específica es el desarrollo anti-*quórum sensing* y anti-biopelículas, han surgido. (QSI Pharma A/S, Lyngby, Denmark; Microbia, Cambridge, Massachusetts, USA; Quorex Pharmaceuticals Inc., Carlsbad, California, USA; and 4SC AG, Martinsried, Germany) [56].

Conocer el circuito del *quórum sensing* que presentan las bacterias en general le ha permitido a los investigadores de este campo generar varias estrategias destinadas a la interrupción de los circuitos del *quórum sensing* bacterial. Estas estrategias pueden ser resumidas en tres, (a) inhibición de la generación de la señal *AHL*, (b) inhibición por diseminación de la señal *AHL*, (c) inhibición en la recepción de la señal *AHL*.

1.7.1 Inhibición de la generación de la señal AHL

El conocimiento acerca del como se generan las moléculas señal, puede ser provechoso para el desarrollo de moléculas inhibitoras del *quórum sensing*, conocer que tipo de sustratos que usan las enzimas tipo *LuxR*, hace posible la búsqueda racionalizada de posibles inhibidores de la síntesis de las acil homoserina lactonas (*AHLs*). Varios análogos del S-adenosil-metionina (*SAM*), tales como S-adenosilhomocisteína, S-adenosilcisteína, y sinefugín, han demostrado ser potentes inhibidores de la síntesis de *AHL* catalizada por proteína RhII en *P. aeruginosa* [57].

La reacción química de *AHL* sintetasa con *SAM* parece ser única, aun cuando *SAM* es necesaria e intermediario común en muchas rutas procariotas y eucariotas. Esto aumenta la esperanza que análogos del *SAM* puedan ser usados como inhibidores específicos de la generación de la señal del quórum sensing, sin afectar enzimas eucarióticas que usan el *SAM* como un sustrato. Algunos informes han demostrado que ciertos antibióticos macrólidos son capaces de reprimir la síntesis de *AHL* en *Pseudomonas aeruginosa* cuando se aplican mínimas concentraciones [58, 59]. Los antibióticos macrólidos son generalmente reconocidos como inhibidores de síntesis de proteínas a nivel ribosomal. No está claro como estos antibióticos interfieren con los circuitos del quórum sensing. Por otro lado, tampoco está claro como la resistencia a estos antibióticos afecta sus propiedades moduladoras del quórum sensing

1.7.2 Inhibición por 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. Una de las alternativas hacia la disminución de la concentración de las *AHLs* puede ser, la descomposición de *AHL*, consecuencia de una reacción no enzimática; ejemplo, las señales *AHL* son sometidas a hidrólisis alcalina a altos valores de pH. [60]

Algunas bacterias han reportado degradar específicamente las señales de *AHL* [61]. Dong *et al.*, (2003), encontraron unas especies de *Bacillus* que producen una enzima, llamada *AiiA*, que cataliza la hidrólisis de moléculas de *AHL*. La expresión del gen *aiiA* en el patógeno de plantas *Erwinia carotovora* 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 [61]. Por otra parte, las plantas transgénicas que expresan *AiiA* han mostrado ser significativamente menos susceptible a la infección por *E. carotovora* [62].

En otro estudio, una *Variovorax paradoxus* es capaz de crecer usando 3-oxo-C6-n-homoserina lactona como única fuente energía y nitrógeno [63]. La importancia ecológica de las bacterias degradantes de *AHL* no esta claro, 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 quórum sensing.

1.7.3 Inhibición en la recepción de la señal *AHL*.

Bloquear la transducción de la señal de *quórum sensing* se puede lograr por una molécula antagonista capaz de competir o interferir con las señales nativas de *AHL* por la unión con el receptor 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 de el receptor tipo *LuxR*.

Diferentes reportes describen que la aplicación *in vitro* de los análogos de *AHL* han logrado la inhibición y activación de los circuitos *quórum sensing* de varias bacterias. [64] 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 quórum sensing. 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 quórum sensing. [30, 65]

A continuación se describen algunos de los estudios realizados en esta área. Algunas variaciones en la cadena lateral acil han sido realizadas de varias formas, y esto ha mostrado que la longitud es crucial para la actividad. [66, 67] en un estudio del *quórum sensing* en *E. carotovora*, fue reportado que el incremento en la longitud de la cadena lateral acil en una unidad de metileno reduce la actividad en un 50%, mientras la extensión en dos unidades reduce la actividad en un 90%.

La disminución en la longitud de la cadena en una unidad de metileno disminuye la actividad en 10% [70] Curiosamente, los análogos de *AHL* con una cadena lateral más larga que el nativo de *AHL* general parecen ser más eficaces que los inhibidores análogos de la *AHL* con una cadena lateral más corta. Esta observación puede sugerir que un mínimo en la longitud de la cadena acil determinado por la señal *AHL* nativa es requerido para la unión a los homólogos y que las cadenas acil largas pueden acomodarse en el sitio de unión de los receptores tipo *LuxR*. La flexibilidad de la cadena lateral acil también parece ser importante para la unión en las proteínas tipo *LuxR*. Por ejemplo la reducción de la rotación en la cadena por la introducción de una insaturación cercana a la unión de la amida suprime casi por completo su unión al receptor [68]

De acuerdo con esta sugerencia, *AHL* no naturales nunca han sido reportados contener un enlace 2,3 insaturado. Un estudio con el receptor *LasR* de *P. aeruginosa* sugiere que geometría de la cadena extendida completamente, es necesaria para la activación, mientras los análogos contraídos dentro de conformaciones diferentes muestran poca actividad. [69] la sustitución en la posición beta es importante para la actividad agonista de los *AHLs*, pero no hay una regla clara sobre la importancia de esta sustitución en el mantenimiento de la actividad antagonista. El anillo homoserina lactona es generalmente muy sensible a modificaciones, y la quiralidad es crucial para la actividad biológica. Las señales *AHLs* naturales son L-isómeros, mientras D-isómeros son generalmente carentes de actividad biológica. [66] la cadena lateral acil parece esencial para la actividad, por ejemplo en *E. corotovora*, en la cual el anillo homoserina lactona no sustituido falla en la activación del sistema del *quórum sensing* [66] la conversión del anillo homoserina lactona a anillo homoserina lactama resulta en una molécula sin propiedades agonista o antagonista. [63] Sorprendentemente, un cambio en la estructura homoserina lactona a homoserina tiolactona parece permisible en varios sistemas de *quórum sensing* [68]

1.7.4 Inhibición del *quórum sensing* expresado por organismos superiores. Un gran número de reportes describe la habilidad de organismos superiores para interferir con la mediación de *AHL* en el *quórum sensing*. El mejor ejemplo caracterizado es el de la microalga australiana *Delisea pulchra*. Recientemente, otros ejemplos de células eucariotas que interfieren con señales mediadoras de *AHL* fueron suministradas por Teplitski *et al.*, (2000) [70], quien mostró que diversas plantas secretan sustancias que minimizan las actividades de las señales de *AHL* bacterial y afectan la conducta regulada por el *quórum sensing* en asociación con la bacteria.

Muchas plantas y hongos han co-evolucionado y establecido cuidadosamente asociaciones simbióticas reguladas con bacterias. Interesantemente, muchas plantas asociadas con proteobacterias poseen sistemas del *quórum sensing* mediado con *AHL*. Importantemente, las plantas y los hongos no tienen los sistemas inmunes que observamos en los mamíferos, mas bien, ellos confían en el sistema de defensas químicas para protegerse de las bacterias en el medio [55].

1.7.5 Inhibición del *quórum sensing* por furanonas halogenadas. La habilidad de las bacterias para formar biopelículas es el mayor reto para la vida de organismos con riesgos de infección, tales como humanos, animales y eucariotas marinas [71]. Las plantas marinas están, en ausencia de un sistema inmune avanzado, propensas a enfermedades. La microalga australiana *D. pulchra* produce una gama de compuestos de furanona halogenada que exhiben propiedades antibiopelículas y antimicrobiales. [72]

La estructura de los compuestos de *D. pulchra* contiene un anillo con una sustitución de una cadena acil en la posición C-3 y una sustitución de bromo en la posición C-4. La sustitución C-5 puede variar en términos de la estructura de la cadena lateral (Figura 10). La furanona natural es halogenada en varias posiciones por, yodo, bromo o cloro [72]. En la actualidad muchos estudios encaminados hacia el desarrollo de compuestos con actividad anti-*quórum sensing* se basan en la estructura base de estas furanonas.

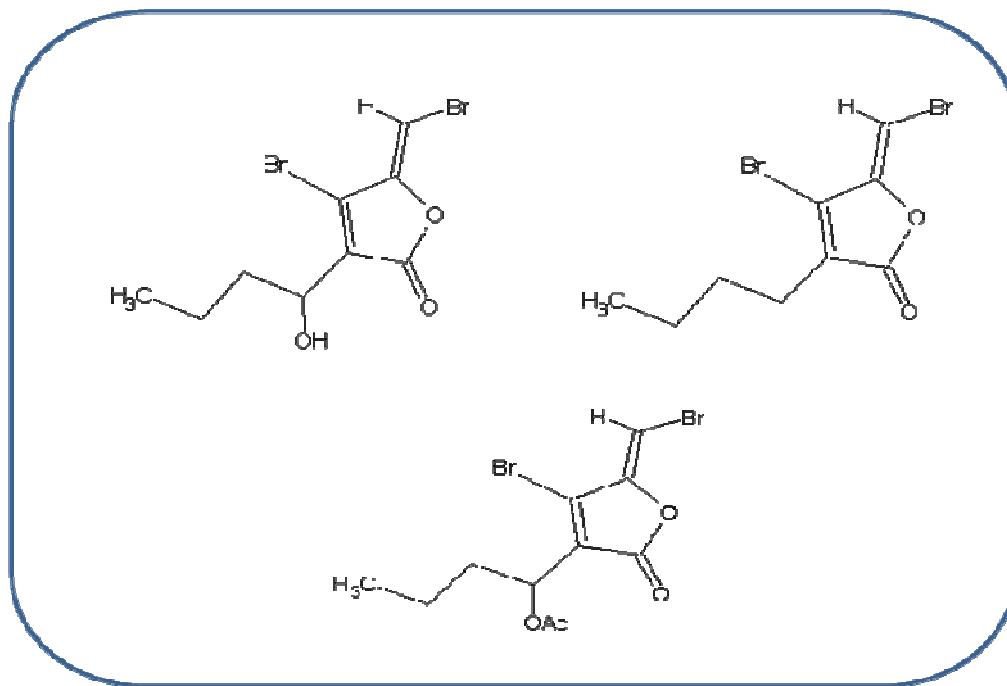


Figura 10. Estructura de las furanonas identificadas en *D. pulchra*

1.8 Modulación del *quórum sensing* bacterial con ligandos sintéticos

Considerables esfuerzos en investigación se han hecho en los últimos 20 años, los cuales se han centrado principalmente en el diseño y síntesis de ligandos que puedan modular como antagonistas o agonistas el circuito del *quórum sensing* en *Pseudomonas aeruginosa*. Sin embargo, los antagonistas y agonistas sintéticos del *quórum sensing* son escasos. Los antagonistas conocidos son principalmente análogos estructuralmente similares a los *AHL* nativos, los más activos reportados hasta el momento son mostrados en la Figura 12. Por su parte los agonistas sintéticos son aun menos que los antagonistas, recientemente una librería de 200,000 compuestos fueron ensayados contra una cepa de *P. aeruginosa*, incapaz de producir acil homoserina lactonas. En este estudio se identificaron varios activadores de *LasR* [73].

Un interesante descubrimiento de este escaneo fue la identificación de un nuevo compuesto, un trifenil (TP) que ha mostrado ser un activador potente de *LasR* a pesar de su poca o ninguna similaridad química con el autoinductor acil homoserina lactona [74], Figura 13, este compuesto (TP1) y sus derivados TP2, TP3, y TP4. Han mostrado afinidades de unión por el receptor *LasR*, que son varios ordenes de magnitud mas bajas que cualquier otra clase de inhibidores, y no muestra reactividad cruzada con los receptores de señal relacionados incluyendo *QScR*, *LuxR*, y *RhlR* [74].

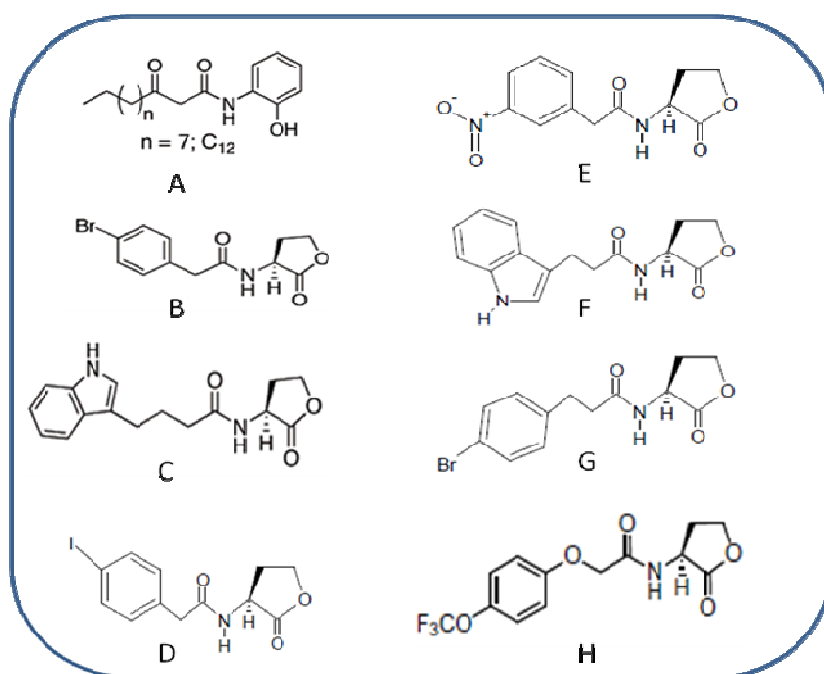


Figura 12. Antagonistas sintéticos de *LasR* reportados hasta la fecha. El compuesto A, fue reportado por Smith et al., 2003 [75]. Los compuestos B-H han sido reportados todos por Blackwell *et al.*, 2005-2007.

[63, 76, 77]

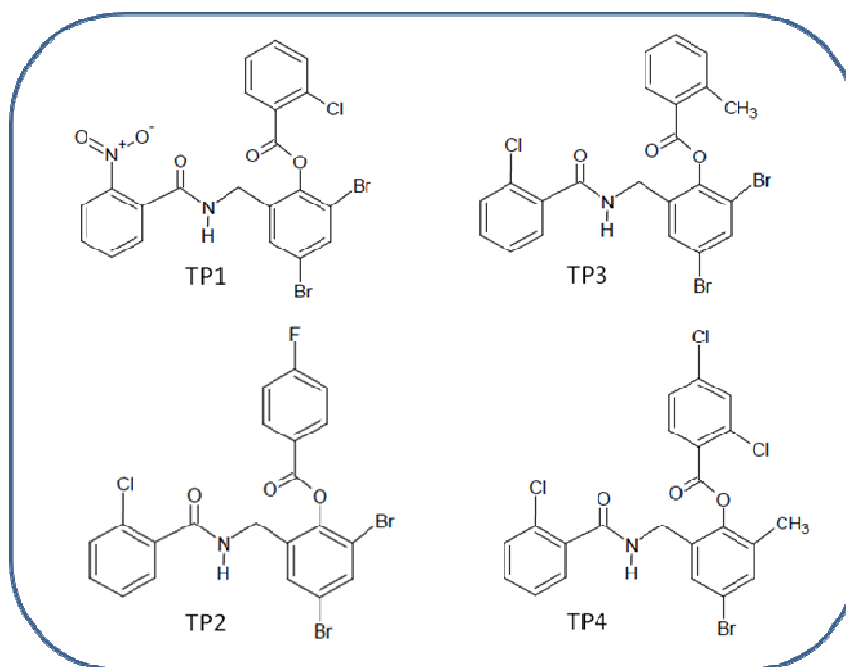


Figura 13. Estructura del súper agonista TP1 y sus análogos TP2, TP3, y TP4.

Para ayudar a fomentar el desarrollo en la síntesis y evaluación de nuevos candidatos a ser antagonistas o agonistas de *QS* es necesario conocer los mecanismos de inhibición del quórum sensing, las estructuras de las moléculas señal (autoinductores), estructura de los análogos y las estructuras de las proteínas receptores, además, nuevas alternativas para el control de infecciones ocasionadas por bacterias patógenas como la *P. aeruginosa* deben ser tenidas en cuenta para ayudar a fomentar estas ideas y el entendimiento de la interacción molecular entre análogos y reguladores del *QS*. La química computacional como herramienta nos puede brindar la forma de estudiar todas las variables antes mencionadas ya que esta tiene como objetivo fundamental explicar los fenómenos químicos observados en el laboratorio y predecir otros fenómenos que aun no han sido observados, todo ello recurriendo a técnicas modernas que permitan resolver las ecuaciones planteadas en los modelos surgidos de la aplicación de un determinado sistema de leyes físicas fundamentales a los sistemas moleculares.

1.9 REFERENCIAS

1. Miller, M.B. and Bassler, B. L. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* (2001) 5, 165-199.
2. Dessaux, Y.; Petit, A.; and Tempe, J. *Molecular signals in Plant-Microbe interactions.* (1992) 109-136.
3. Higgins, D. A.; Pomianek, M. E.; Kraml, C. M.; Taylor, R. K.; Semmelhack, M. F.; Bassler, B. L. *Nature.* (2007) 450, 883–6.
4. Marketon, M. M.; Gronquist, M. R.; Eberhard, A.; Gonzalez, J. E. *J. Bacteriol.* (2002) 184, 5686–5695.
5. Gonzalez, J. E. and Marketon, M. M. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* (2003) 67, 574–592
6. Henke, J. M. and Bassler. B. L. *Trends Cell Biol.* (2004) 14, 648–656.
7. Kleerebezen, M.; Beerthuyzen, M. M.; Vaughan, E. E.; de Vos, W. M. and Kuipers, O. P. *Environ. Microbiol.* (1997) 63, 4581-4584.
8. Williams, P.; Winzer, K.; Chan, WC.; Cámara, M. *Philos Trans R Soc London Ser B* (2007) 362, 1119-1134
9. Chen, X.; Schauder, S.; Pelczer, I.; Bassler, B. L.; Hughson, F. M.; Potier, N. and Van Dorsselaer, A. *Nature.* (2002) 415, 545-549
10. Winzer, K.; Hardie, K. R. and Williams, P. *Curr. Opin. Microbiol.* (2002) 5, 216–222.
11. Laue, B. E.; Jiang, Y.; Chhabra, S. R.; Jacob, S.; Stewart, G. S.; Hardman, A.; Downie, J. A.; O’Gara, F. and Williams, P. *Microbiology* (2000) 146, 2469–2480
12. Watson, W. T.; Minogue, T. D.; Val, D. L.; von Bodman, S. B. and Churchill. M. E. *Mol. Cell.* (2002) 9, 685–694
13. Eberhard, A.; Longin, T.; Widrig, C. A. and Stranick, S. *J. Arch. Microbiol.* (1991) 155, 294-297.

14. Visick, K. L.; Foster, J.; Doino, J.; McFall-Ngai, M.; Ruby, E. G. *J. Bacteriol.* (2000) 182, 4578–4586
15. Bainton, N. J.; Bycroft, B. W.; Chhabra, S. R.; Stead, P.; Gledhill, L.; Hill, P. J.; Rees, C. E. D.; Winson, M. K.; Salmond, G. P. C.; Stewart, G. S. A. B. and Williams, P. *Gene*, (1992) 116, 87-91.
16. Bodman, B. V.; and Farrand, S. K. *J. Bacteriol.* (1995) 177, 5000-5008.
17. Fuqua, C.; Burbea, M. and Winans, S. C. *J. Bacteriol.* (1995) 177, 1367-1373.
18. Fuqua, W. C.; Winans, S. C. and Greenberg, E. P. *J. Bacteriol.* (1994) 176, 269-275.
19. Fuqua, C.; Winans, S. C. and Greenberg, E. P. *Annu. Rev. Microbiol.* (1996) 50, 727-751.
20. Hanzelka, B. L.; Greenberg, E. P. *J. Bacteriol.* (1996) 178, 5291–94
21. Parsek, M. R.; Val, D. L.; Hanzelka, B. L.; Cronan, J. E.; Greenberg, E. P. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1999) 96, 4360–4365
22. Watson, W. T.; Minogue, T. D.; Val, D. L.; Bodman, S. Beck.; Churchill, M. A. *Molecular Cell* (2002) 9, 685-694)
23. Bottomley, M.J.; Muraglia, E.; Bazzo, R. and Carfi, A. *J. Biol. Chem.* (2007) 282, 13592–13600.
24. Vannini, A.; Volpari, C.; Gargioli, C.; Muraglia, E.; Cortese, R.; De Francesco, R.; Neddermann, P. and Marco, S.D. *EMBO J.* (2002)21, 4393–4401.
25. Choi, S. H.; Greenberg, E. P. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1991) 88,11115–11119
26. Choi, S. H.; Greenberg, E. P. *J. Bacteriol.* (1992) 174, 4064–4069.
27. Stevens, A. M.; Dolan, K. M.; Greenberg, E. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1994) 91, 12619–12623
28. Stevens, A. M.; Fujita, N.; Ishihama, A.; Greenberg, E. P. *J. Bacteriol.* (1999) 181, 4704–4707
29. Stevens, A. M.; Greenberg, E. P. *J. Bacteriol.* (1997) 179, 557–562

30. Ahumedo, M.; Diaz, A.; Vivas, R. *European Journal of Medicinal Chemistry* (2010) 45, 608–615.
31. Zhu, J.; Winans, S. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1999) 96, 4832–4837
32. Zhu, J.; Winans, S. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2001) 98, 1507–1512
33. Nair, S. K.; Zou, Y. *Chemistry & Biology* (2009) 16, 961–970.
34. Bassler, B. L. *Curr. Opin. Microbiol.* (1999) 2, 582–587
35. Kleerebezem, M.; Quadri, L. E.; Kuipers, O. P.; de Vos, W. M. *Mol. Microbiol.* (1997) 24, 895–904
36. Pace, N. R. *Science.* (1997) 276, 139-144.
37. Woese, C. R. *Microbiol. Rev.* (1987) 51, 221-271.
38. Hardalo, C. and. Edberg S. C. *Crit. Rev. Microbiol.* (1997) 23, 47-75.
39. Costerton, J. W. *Trends Microbiol.* (2001) 9, 50–52).
40. Lyczak, J. B.; Cannon, C. L. and Pier, G. B. *Microbes Infect.* (2000) 2, 1051–1060
41. Van Delden, C. and Iglewski, B. H. *Emerg. Infect. Dis.* (1998) 4, 551–560).
42. Anwar, H.; Dasgupta, M. K. and Costerton, J. W. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1990) 34, 2043–2046
43. Pearson, J. P.; Gray, K. M.; Passador, L.; Tucker, K. D.; Eberhard, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1994) 91, 197–201
44. Pearson, J. P.; Passador, L.; Iglewski, B. H.; Greenberg, E. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92, 1490–1494
45. de Kievit, T. R.; Iglewski, B. H. *Infect. Immun.* (2000) 68, 4839–4849.
46. Seed, P. C.; Passador, L.; Iglewski, B. H. *J. Bacteriol.* (1995) 177, 654–659.
47. Whiteley, M.; Parsek, M. R.; Greenberg, E. P. *J. Bacteriol.* (2000) 182, 4356–4360.
48. Ochsner, U. A.; Koch, A. K.; Fiechter, A.; Reiser, J. *J. Bacteriol.* (1994) 176, 2044–2054.

49. Schuster, M.; Lostroh, C. P.; Ogi, T.; Greenberg, E. P. *J. Bacteriol.* (2003) 185, 2066–79.
50. Pesci, E. C.; Milbank, J. B.; Pearson, J. P.; Mc Knight, S.; Kende, A. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1999) 96, 11229–11234
51. Rasko, D. A.; Sperandio, V. *Nat. Rev. Drug Discovery* (2010) 117–128.
52. Davies, D.G.; Parsek, M. R.; Pearson, J. P.; Iglewski, B. H.; Costerton, J. W.; Greenberg, E. P. *Science* (1998) 280, 295–298.
53. Chugani, S. A.; Whiteley, M.; Lee, K.; D’argenio, D.; Manoil, C. and Greenberg, E. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (2001) 98, 2752-2757.
54. Flemming, H.C. and Schaule, G. *Biofouling.* (1996) 39-54.
55. Bradshaw, D. J.; Marsh, P. D.; Watson, G. K. and Allison, C. *Infect. Immun.* (1998) 66, 4729-4732.
56. Hentzer, M.; Givskov, M. *J Clin Invest.* (2003) 112(9), 1300-1307.
57. Tateda, K.; Comte, R.; Pechere, J. C.; Kohler, T.; Yamaguchi, K. and Van Delden, C. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2001) 45, 1930–1933.
58. Pechere, J.C. *Jpn. J. Antibiot.* (2001) 54:87–89.
59. Yates, E. A.; Philipp, B. C.; Buckley, S.; Atkinson, S. R.; Chhabra, R.; Sockett, E.; Goldner, M. *Infect. Immun.* (2002) 70, 5635–5646.
60. Dong, Y.H.; Xu, J.L.; Li, X. Z. and Zhang, L.H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2000) 97:3526–3531.
61. Dong, Y. H.; Wang, L.H.; Xu, J.L.; Zhang, H.B.; Zhang, X.F. and Zhang, L.H. *Nature.* (2001) 411:813–817.
62. Leadbetter, J.R. and Greenberg, E. P. *J. Bacteriol.* (2000) 182, 6921–6926.
63. Geske, G. D.; O’Neill, J. C.; Miller, D. M.; Mattmann, M. E.; Blackwell, H. E. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 13613-13625
64. Soulere, L.; Frezza, M.; Queneau, Y.; Doutheau, A. *J. Mol. Graphics Modell.* (2007) 26, 581.
65. McClean, K. H.; Winson, M. K.; Fish, L.; Taylor, A.; Chhabra, S. R. *J. Antibiot. (Tokyo.)* (1993) 46, 441–454.

66. McClean, K. H.; Winson, M. K.; Fish, L.; Taylor, A.; Chhabra, S. R. *Microbiology*. (1997) 143, 3703–3711
67. Schaefer, A. L.; Hanzelka, B. L.; Eberhard, A. and Greenberg, E.P. *J. Bacteriol.* (1996) 178, 2897–2901.
68. Kline, T., Bowman, J.; Iglewski, B. H.; de Kievit, T.; Kakai, Y. and Passador, L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (1999) 9, 3447–3452.
69. Teplitski, M.; Robinson, J.B. and Bauer, W.D. *Mol. Plant Microbe Interact.* (2000) 13:637–648.
70. Kushmaro, A.; Loya, Y.; Fine, E. and Rosenberg, E. *Nature*. (1996) 380:396.
71. de Nys, R.; Wright, A.D.; König, G.M. and Sticher, O. *Tetrahedron*. (1993) 49:11213–11220.
72. Muh, U.; Schuster, M.; Heim, R.; Singh, A.; Olson, E.R. and Greenberg, E.P. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2006) 50, 3674– 3679.
73. Muh, U.; Hare, B.J.; Duerkop, B.A.; Schuster, M.; Hanzelka, B.L.; Heim, R.; Olson, E.R. and Greenberg, E.P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2006) 103, 16948–16952.
74. Smith, K. M.; Bu, Y.; Suga, H. *Chem. Biol.* (2003) 10, 563-571.
75. Geske, G. D.; Wezeman, R. J.; Siegel, A. P.; Blackwell, H. E. *J. Am. Chem. Soc.* (2005) 127, 12762-12763.
76. Geske, G. D.; O’Neill, J. C.; Blackwell, H. E. *ACS Chem. Biol.* 2007, 2, 315-320.

CAPITULO II

FUNDAMENTOS TEÓRICOS



“Todo lo que imaginamos es susceptible de convertirse en realidad porque el pensamiento también es energía”

Jorge Anaya Gil

2. DISEÑO DE LIGANDOS ASISTIDO POR ORDENADOR

La aplicación de métodos computacionales en el diseño u optimización de ligandos para modular una determinada diana terapéutica se denomina comúnmente diseño de fármacos asistido por computadora. El gran desarrollo de la bioinformática, como una herramienta auxiliar de la genómica y la proteómica, ha facilitado el manejo de una gran cantidad de información biológica, permitiendo el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas y por ende contribuyendo cada vez más al descubrimiento de fármacos [1]. Muchas estructuras tridimensionales de algunas dianas terapéuticas han sido resueltas mediante diversas técnicas, como cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear (RMN). A pesar de que estas estructuras sean conocidas, el diseño de fármacos candidatos a modular estas dianas, no es una tarea trivial, de hecho este es uno campos de estudio de la química farmacéutica o química médica [2]. Por lo anterior, se ha establecido, al cribado de quimiotecas virtuales (*virtual screening*) como un método sólido para la selección e identificación de nuevos *leads* o cabezas de serie.

Gracias al desarrollo de las metodologías aplicadas en química teórica y al reciente *boom* de las computadoras, cada día mas poderosas. La aplicación del cribado virtual se ha transformado en una tarea cada vez mas sencilla de entender y mas rápida de realizar. De hecho, resultan ser mucho más económicas y permiten racionalizar la síntesis de nuevos cabezas de serie o *leads* que las técnicas de *High-throughput screening* (HTS), tradicionales [3]. Estas nuevas metodologías se pueden considerar un buen complemento para las técnicas de *High-throughput screening* (HTS), ayudan a comprender mejor el comportamiento de sistemas de interacción (proteína/sustrato), permiten establecer comparaciones entre teoría y datos experimentales, e incluso permiten realizar predicciones cuantitativas, por lo que constituyen herramientas muy poderosas para diseñar nuevas moléculas con afinidad por un determinado receptor [3].

Generalmente se realiza el cribado virtual basándose en dos aproximaciones. Cribado directo, 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, cuando el análisis esta basado en la comparación de características tridimensionales, estereoquímicas y fisicoquímicas de los ligandos, se incluyen aquí, las técnicas de *QSAR*, modelos farmacofóricos, entre otras. Estas dos aproximaciones, en general pretenden conducir al diseño de racional de fármacos.

Diseño racional. Un procedimiento convencional en el diseño racional consiste en cribar una base de datos mediante acoplamiento (cribado directo). Otra estrategia más novedosa consiste en aplicar herramientas de optimización de fármacos (cribado indirecto) seguida de cribado virtual *ADMET* (Absorción, Distribución, Metabolismo, Eliminación y Toxicidad). La distinción entre los conceptos de optimización de fármacos y diseño *de novo* es importante. La exactitud de la predicción de como una estructura interaccionará dentro de un receptor diana es más precaria en la generación de ligandos *de novo* ya que se está creando una estructura entera a partir de cero. En cambio en la optimización se comienza con un compuesto líder cuyo enlace dentro del receptor ha sido caracterizado, probablemente a través de una cristalografía. Seguidamente se ejecutan modificaciones sutiles para generar compuestos derivados del compuesto líder para mejorar la afinidad de enlace. Estos derivados posteriormente sufren pruebas para determinar cuales modificaciones mejoran el enlace. Este proceso de refinamiento continúa iterativamente hasta que se produzcan ligandos óptimamente enlazados [4].

El proceso de optimización estructural en el cribado virtual da origen a millares de estructuras químicas en forma análoga a los prolíficos resultados de la química combinatoria. Para evaluar la utilidad farmacéutica real se debe recurrir a filtros sucesivos, lo cual generalmente deriva a final en unos pocos o ningún candidato óptimo.

2.1 Cribado virtual basado en ligandos o métodos indirectos

El cribado directo o cribado virtual basado en ligandos se fundamenta en que moléculas estructuralmente relacionadas deberían mostrar actividades biológicas similares [5]. 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 [6, 7]. 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. A continuación se comentan brevemente dichos métodos.

2.1.1 Diseño de modelos farmacofóricos

A principios del s. XX, Ehrlich introduce el concepto de farmacóforo como las características de una molécula (*phoros*) que son esenciales para su actividad biológica (*pharmacon*). [8] 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”. Aunque este término es utilizado de forma incorrecta en muchas áreas de la salud. [9]

Esta muy claro que cuando no se conoce la estructura de cierto receptor implicado en algún proceso fisiológico importante. Una de las alternativas más tentadoras para modular dicho proceso es el diseño de modelos farmacofóricos. El diseño de modelos farmacofóricos es una técnica muy útil y rápida cuando se dispone de una serie de compuestos activos. Se basa en la identificación del ordenamiento tridimensional común presente en cierto grupo de ligandos, cerca de los sitios de interacción claves con un receptor, a partir de, un conjunto accesible de conformaciones de este grupo de ligandos activos [10].

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 (componentes esenciales para el reconocimiento molecular, es decir, los grupos funcionales o características que hacen a la molécula activa). Ello da lugar a lo que se denomina *query* o hipótesis farmacofórica con la que se “interrogará” la quimioteca (Figura 1).

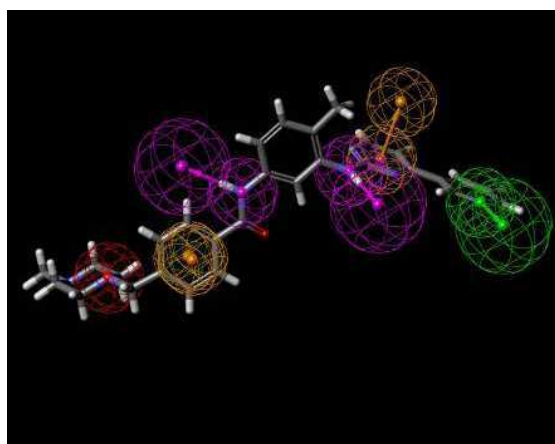


Figura 1. Modelo farmacofórico (figura de www.accelrys.com/products/discoverystudio/pharmacophores).

Los grupos farmacofóricos usados cuando se generan modelos farmacofóricos dependen de los intereses del investigador, comúnmente son utilizados átomos con cargas negativa y positiva, aceptores y dadores de puente de hidrógeno y átomos con carácter hidrofóbico. Una vez se ha obtenido el modelo, se puede utilizar para cribar en bases de datos de moléculas previamente alineadas.

A la hora de diseñar modelos farmacofóricos, hay que tener en cuenta la aproximación a usar, se pueden crear modelos farmacofóricos basados en un solo ligando y modelos farmacofóricos basados en un alineamiento de varios ligandos, así como el número de características farmacofóricas que ha de estar presente en todas o en parte de las moléculas alineadas.

Se han desarrollado varios paquetes de programas para el desarrollo de modelos farmacofóricos, entre los mas utilizados se encuentran DISCO (*Distance Comparisons*),[11] Catalyst,[12] GASP (*Genetic Algorithm Superimposition Program*),[13] ALLADIN[14] y MOE.[15]

2.1.1.1 Parámetros de análisis de los farmacóforos.

Los parámetros que se utilizan para comparar los resultados de los diferentes modelos farmacofóricos se presentan a continuación, en la figura 2 se muestran cada una de las variables utilizadas: [16,17]

- D , número de compuestos presentes en la base de datos. Generalmente son compuestos, que han presentado alguna actividad en estudios relacionados
- A , número de compuestos activos de la base de datos. son compuestos cuyas actividades han sido comprobada varias veces
- H_t , número de compuestos en el *hit list* obtenido al cribar una base de datos con el modelo farmacofórico en estudio.
- H_a , número de compuestos activos en el *hit list* al cribar una base de datos con el modelo farmacofórico en estudio.

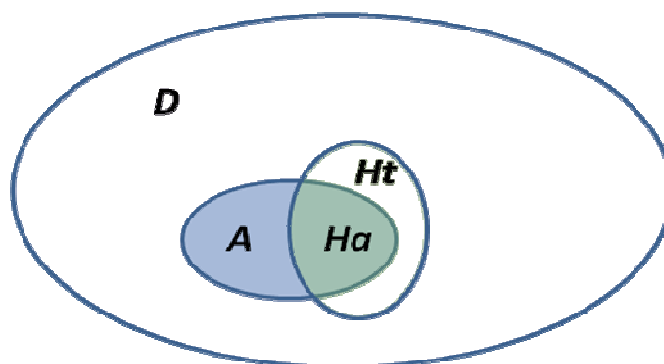


Figura 2. Representación del conjunto de compuestos de la base de datos, *D*, los activos, *A*, el *hit list* obtenido con el farmacóforo, *Ht*, y los compuestos activos del *hit list*, *Ha*.

- Falsos negativos, definidos según la Ecuación 4.1.

$$falsos^- = A - Ha \quad [2.1]$$

- Falsos positivos, definidos según la Ecuación 4.2.

$$falsos^+ = Ht - Ha \quad [2.2]$$

Una lista de *hit* optima se obtiene cuando se da una superposición perfecta entre la lista *hit* y los activos reales presentes en la base de datos, esto ocurre cuando se satisfacen las condiciones $Ha=Ht$ y $Ha=A$.

- $\%Y$, rendimiento de activos, representa la relación entre el número de compuestos activos del *hit list* obtenido al cribar una base de datos con un farmacóforo y el número de compuestos totales en dicho *hit list*, y se define mediante la Ecuación 4.3. Cuanto mayor es su valor más selectivo es el farmacóforo sobre el dominio de la base de datos.

$$\%Y = \frac{H_a}{H_t} \cdot 100 \quad [2.3]$$

- $%A$, ratio de activos, se expresa como la relación entre el número de compuestos activos presentes en el *hit list* obtenido al cribar una base de datos con el farmacóforo y el número de activos reales de dicha base de datos, y se puede expresar mediante la Ecuación 4.4.

$$%A = \frac{H_a}{A} \cdot 100$$

[2.4]

Los parámetros $%Y$ y $%A$ no son totalmente independientes entre ellos, y generalmente, al intentar maximizar uno de ellos se compromete el otro. Sin embargo, para obtener un buen modelo farmacofórico se deben maximizar ambos parámetros simultáneamente.

2.1.2 QSAR y 3D-QSAR

Las relaciones estructura-actividad permiten relacionar cuantitativamente los cambios estructurales de una serie de compuestos con los cambios presentes en la actividad. 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 de neuronas
- *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, [18] 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. El análisis CoMSIA (*comparative molecular similarity indices analysis*), desarrollado por Klebe, [19] es análogo al anterior pero considera cinco campos moleculares: estérico, electrostático, dador y aceptor de hidrógeno, e hidrofóbico (ejemplo en la Figura 3).

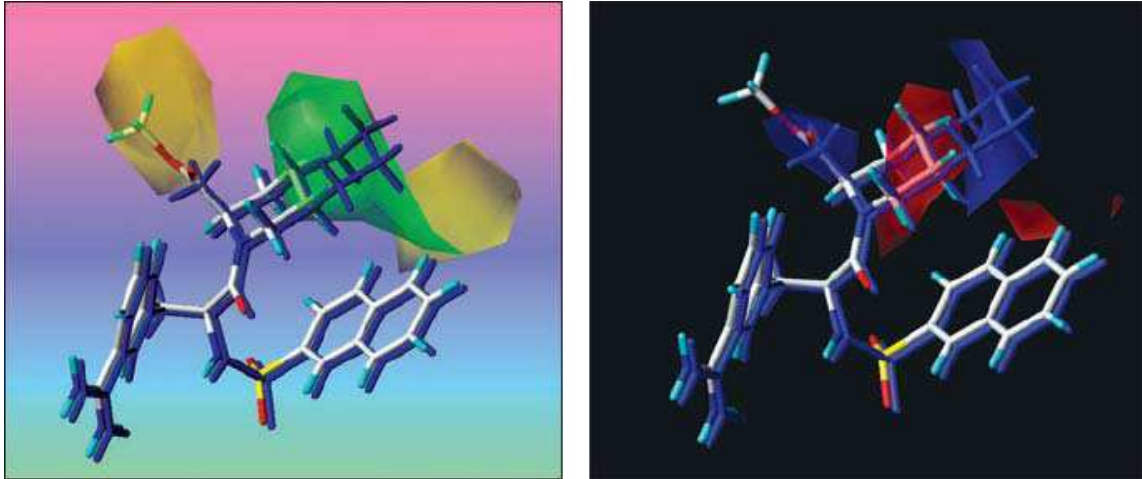


Figura 3. Izquierda: modelo CoMFA donde se indican las interacciones estéricas favorables en verde y desfavorables en amarillo. Derecha: modelo CoMSIA donde se indican las interacciones hidrofóbicas favorables en azul y desfavorables en verde (figura de www.optive.com/data/SYBYL).

2.2 Cribado virtual basado en el receptor o métodos directos

El punto de partida para diseñar ligandos basándose en la estructura tridimensional de su diana terapéutica (receptor), como es lógico, aparece con la resolución de las primeras estructuras de proteínas, la hemoglobina y la mioglobina, [20, 21] por Max Perutz y John Kendrew, por dicho trabajo recibieron el premio nobel de química de 1962. En 1977 se creó la base de datos de Brookhaven conocida como PDB (Protein Data Bank), la cual es una base de datos a nivel mundial que contiene estructuras tridimensionales de biomoléculas determinadas por cristalografía o resonancia magnética nuclear. (<http://www.rcsb.org/pdb/>), en realidad el número exacto de macromoléculas de estructura conocida es menor, ya que una proteína puede tener más de una entrada (ID) en el PDB. Para un número importante de macromoléculas se conoce la estructura co-cristalizada con un ligando, de forma que el sitio y modo de unión de este sirven como un excelente punto de partida para diseñar nuevos ligandos.

Existen también bases de datos que analizan específicamente las entradas correspondientes a estos complejos, generalmente cuando los ligandos no son péptidos, como PDBsum (<http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/pdbsum>). En los casos restantes, se acude a los experimentos de biología molecular y simulación computacional para definir el sitio de unión del ligando.

2.2.1 Docking

Los programas de simulación del reconocimiento molecular entre macromoléculas diana y ligandos de bajo peso molecular o *docking* (anglicismo que suele traducirse por acoplamiento) realizan una exploración de las posiciones relativas entre la diana y el ligando (poses), evaluando las interacciones intermoleculares presentes en cada pose explorada [22]. 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.

Después de realizar y analizar los resultados del *docking*, aquellos ligandos con los mejores puntajes de evaluación son candidatos a síntesis o pueden comprarse. Este tipo de aproximación es bastante frecuente cuando se dispone de la estructura resuelta de la proteína o bien de un modelo confiable del receptor resuelto por homología. Así, se han identificado ligandos para más de 50 receptores, tanto de estructura conocida [23-27] como a partir de modelos teóricos [28-29]. Otra ventaja que ofrece el uso de los protocolos del *docking* es la identificación del modo de unión, es decir, la orientación y conformación que el ligando adopta en la cavidad de la proteína, y, menos frecuentemente, se utiliza para identificar el sitio de unión, *docking* ciego [30].

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 [31], EUDOCK [32], LIGANDFIT [33], FLEXX [34], HAMMERHEAD [35]), (PRO_LEADS [36], SFDOCK [37], GOLD [38], AUTODOCK3.0 [39], GAMBLER [40], (AUTODOCK3.0), (AUTODOCK2.4 [41], GLIDE [42]), MCDOCK [43], QXP [44], ICM-DOCK [45], DOCKIT [46], DOCKIT [47]).)

La búsqueda conformacional es la parte del proceso 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 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 [48]:

- 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*) [40], como la que presenta 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.

2.2.2 Combinación de métodos basados en el receptor y en ligandos

Algunos métodos se han caracterizado por combinar la información obtenida del receptor y de los ligandos, de esta forma combinan las fortalezas de cada método, para reducir las fallas de cada uno por separado, por ejemplo, la introducir en el *docking*, el modo de unión del ligando al receptor, obtenido de complejos co-cristalizados con otros ligandos. Esto se conoce como *docking* dirigido directamente (*direct guided-docking*) [49]. Cabe tener en cuenta que normalmente se acepta que el modo de unión se conserva entre distintos ligandos, aunque no siempre esta afirmación se cumple, debido que en ocasiones, una simple modificación en la estructura del ligando puede alterar su modo de unión. Otra aproximación es la construcción de modelos farmacofóricos teniendo en cuenta tanto las características de ligandos activos como las características estructurales presentes en el sitio activo del receptor, especialmente si se dispone de complejos ligando-proteína cocrystalizados, el programa *Moe* [50], ofrece estas ventajas, donde combinan las características farmacofóricas extraídas del alineamiento de ligandos activos conocidos con las extraídas de la generación de un mapa de interacciones del sitio activo del receptor (dadores de puente de hidrógeno, aceptores de puente de hidrógeno y regiones hidrofóbicas).

2.2.3 Técnicas de diseño de novo

Las técnicas de diseño *de novo* permiten diseñar nuevas moléculas a partir del conocimiento del sitio activo del receptor biológico de interés o del conocimiento del farmacóforo tridimensional [51]. Se distinguen principalmente los métodos basados en energía y los basados en bases de datos de conocimiento. Los primeros se basan en acomodar fragmentos de moléculas en el sitio activo del receptor y permitir una exploración de ésta por minimización de energía o técnicas de simulación, la confiabilidad de los compuestos generados en esta etapa, en la actualidad se considera muy baja, ya que se está creando una estructura entera a partir de cero.

Los métodos basados en base de datos de conocimiento emplean la información geométrica e interacciones existentes, obtenidas mediante el análisis de bases de datos cristalográficas (por ejemplo, *PDB*, *PDBsum*). Identifican las regiones en sitio activo donde es favorable la unión de fragmentos mediante interacciones como la formación de puentes de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas, y posteriormente posicionan los fragmentos con las características adecuadas y la disposición geométrica más aceptable químicamente. Tras la colocación de los fragmentos en el sitio de unión por cualquier tipo de método, es necesaria su interconexión. Para ello se suelen emplear bases de datos de conectores predefinidos (*building blocks*) y algoritmos de tipo heurístico.

2.3 Química computacional

El modelado molecular (también llamado química computacional) está compuesto de dos grandes ramas. Por una parte, tenemos los métodos de mecánica molecular basados en la mecánica clásica, aquí se consideran los átomos como partículas puntuales (dotadas de masa y carga) que interactúan unos con otros mediante enlaces. Además, tenemos los métodos de estructura electrónica, que se basan en la aplicación de la mecánica cuántica a los sistemas atómicos y moleculares.

Todos los métodos, independientemente de su fundamento teórico, pretenden abordar el siguiente 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 (disposición geométrica de los núcleos considerados que brinde la energía más baja con el método de cálculo empleado) y otras propiedades moleculares como pueden ser, por ejemplo las frecuencias vibracionales, el momento dipolar, polarizabilidad, hiperpolarizabilidades, etc.

2.3.1 Mecánica molecular

La mecánica molecular considera los átomos como esferas unidas por resortes (representando los enlaces entre átomos) según los criterios de la física clásica. Por lo tanto, en dicha simplificación, se consideran solo los núcleos de los átomos, sin tener en cuenta explícitamente los electrones.

A través de la mecánica molecular 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 en el tipo de ecuaciones que definen como varía la energía potencial 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.

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 (MM2 [52], MM3

[53], MM4 [54], TRIPOS [55], MMFF94 [56], UFF [57], GAFF [58]) a los dirigidos a macromoléculas (AMBER [59], CHARMM [60], GROMOS [61], OPLS [62]).

2.3.2 Mecánica cuántica y Métodos de cálculos.

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

$$|\Psi|^2 = \Psi \Psi^*$$

Que se interpreta como la densidad de probabilidad de la posición de la macropartícula 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: $H\Psi = E\Psi$. 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.

La ecuación de Schrödinger sólo puede resolverse exactamente para sistemas de dos partículas, 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 muy grande comparada con la masa de los electrones y se mueven, por tanto, mucho más lentamente. 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.

La ecuación de Schrödinger electrónica, 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. 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 [63].

2.3.3 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. [64]

2.3.4 Métodos semiempíricos

Los métodos semiempíricos hacen uso de una parametrización empírica, obtenida a partir de muchos datos experimentales con el fin de simplificar el cálculo. Son métodos relativamente baratos (en tiempo de cálculo) y muy prácticos, se pueden aplicar a moléculas muy grandes. 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 mecánico-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 semiempírico está bien parametrizado y bien calibrado[64].

2.3.5 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*) [65], desarrollada por Hohenberg y Kohn en 1964 [66]. 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. [63].

2.3.6 Método *ONIOM*

El objetivo de los métodos *ONIOM* es realizar cálculos computacionales en sistemas de muchos átomos, dividiendo el sistema en varias regiones. Permitiendo que diferentes niveles de teoría sean aplicados a diferentes partes del sistema y combinados produzcan una expresión de la energía consistente, y que los resultados obtenidos de estos nos permitan realizar buenas predicciones químicas. Como es bien sabido de hace tiempo, se persigue obtener métodos ab-initio que tengan un escalamiento lineal (ver Fig. 4). Es así que es necesario obtener un balance entre la “precisión” y el costo computacional en los cálculos.

Cuando se realizan cálculos en sistemas moleculares de muchos átomos el tiempo de cálculo aumenta de manera notoria en alguna potencia de N , especialmente si se trata de métodos de alta correlación como CCSD (T), por ejemplo, que escala a la quinta o sexta potencia. En la actualidad hay métodos que escalan mejor que el ejemplo dado anteriormente como por ejemplo los métodos de escalamiento lineal usando *DFT* [67]. Otra alternativa para mitigar el problema del costo computacional es el de utilizar la metodología de cálculo conocida como métodos híbridos, en los cuales diferentes partes del sistema, son tratadas a niveles de cálculos diferentes y tal vez los más difundidos son los del tipo QM/MM (Quantum Mechanics/ Molecular Mechanics) que tienen en cuenta los efectos de solvente, es así que en tales métodos se hace una partición del sistema en soluto(QM) y solvente(MM) y tal partición se tiene en cuenta en el Hamiltoniano del sistema:

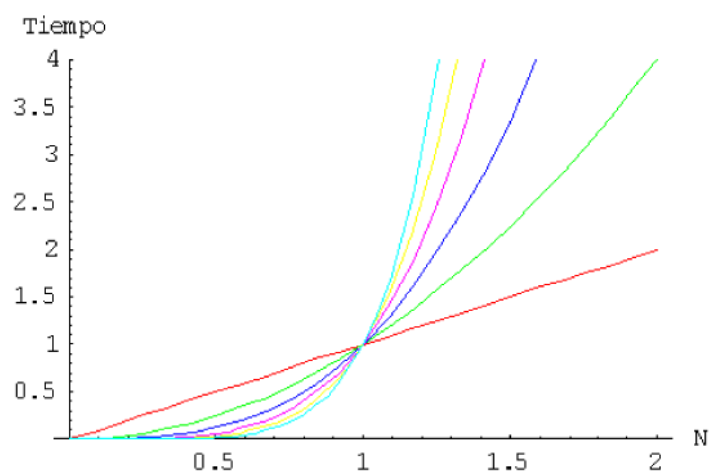


Figura 4. Gráfica cualitativa del escalamiento de métodos químico-computacionales. La función que se grafica es: $Tiempo(N) = Nx$ donde las potencias de la función corresponden a: $x = 1, 2, 3, 4, 5, 6$ para las curvas roja, verde, azul, rosada, amarilla y cian, respectivamente, y N se refiere al número de átomos en el sistema multiplicado por 100, y la escala de tiempo es en horas multiplicadas por 10. (Esguerra, M. 2002)

$$\hat{H}_{eff} = \hat{H}_X^o + \hat{H}_{Xs} + \hat{H}_{ss}$$

\hat{H}_X^o es el Hamiltoniano del soluto, H_{Xs} es el Hamiltoniano que describe la energía de interacción QM/MM entre soluto y solvente y H_{ss} es la energía de interacción entre las moléculas de soluto en la partición MM.

Se puede decir que el método *ONIOM* se ha desarrollado en tres etapas, así:

- *IMOMM* [68]: Integrated Molecular Orbital + Molecular Mechanics
- *IMOMO* [69]: Integrated Molecular Orbital + Molecular Orbital
- *ONIOM* [70]: Our Own N-Layered Integrated Molecular Orbital + Molecular Mechanics Method

El método *ONIOM* incluye a sus antecesores y es el que se encuentra implementado hoy día en las versiones de G98, G03 y G09. Los métodos anteriores se implementaron en G92 y G94 respectivamente.

2.3.7 Detalles del método *ONIOM*

El método *ONIOM* está implementado en las tres últimas versiones de Gaussian, fue desarrollado por Morokuma y colaboradores [71-73]. Permite que diferentes niveles de teoría sean aplicados a diferentes partes de una molécula o sistema. El objetivo es ejecutar cálculos de alto nivel a una parte pequeña del sistema e incluir los efectos del resto en niveles inferiores de teoría, siendo el resultado final de una precisión similar a un cálculo de alto nivel sobre el sistema completo. En los sistemas híbridos existen dos problemas fundamentales, primero: “Como considerar los átomos de enlace entre un método y otro” y segundo: ¿Como se tiene en cuenta la interacción entre la parte “interna” y “externa” del sistema?”

Hay dos formas de tratar la energía de interacción en los métodos *ONIOM*, el esquema de conexión donde la energía total del sistema $E(X - Y)$ (X , región interna y Y externa) se define como:

$$E(X - Y) = E_{alta}(X) + E_{baja}(Y) + E_{intercapa}(X, Y) \quad [2.7]$$

Y el otro se conoce como esquema de extrapolación donde la $E(X - Y)$ se define:

$$E(X - Y) = E_{bajo}(X - Y) - E_{bajo}(X) + E_{alta}(X) \quad [2.8]$$

Es importante resaltar que en el caso anterior no se necesita de un Hamiltoniano especial para considerar la interacción ya que como es evidente de la formulación la interacción se trata completamente en el nivel bajo de teoría.

De las ecuaciones (2.7) y (2.8) es claro que:

$$E_{baja}(Y) + E_{intercapa}(X - Y) = E_{bajo}(X - Y) - E_{bajo}(X) \quad [2.9]$$

Es evidente también que las dos formas de considerar el problema son equivalentes si $E_{intercapa} (X - Y)$ corresponde a la energía de interacción “exacta” en el nivel de teoría bajo. Para ver más claramente lo anterior es útil guiarse por la Figura 5, donde se grafica el nivel de teoría contra el tamaño del sistema.

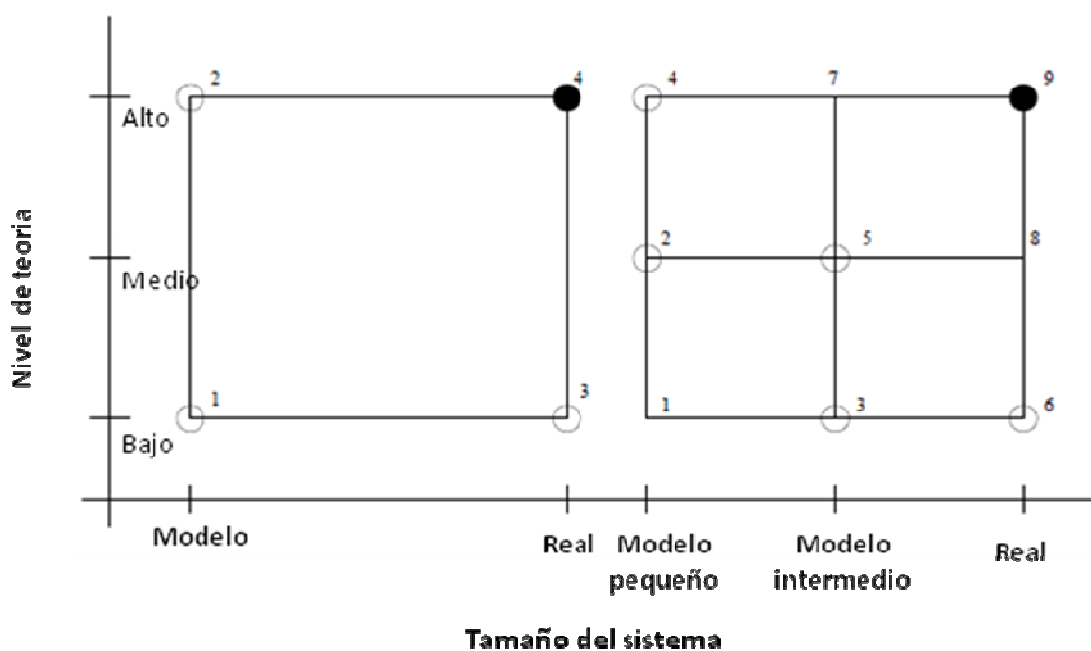


Figura 5. Esquema de extrapolación del método ONIOM

De la Figura 5 entonces podemos ver que la expresión para el método *ONIOM* de dos capas (*ONIOM2*) será:

$$E_{ONIOM2} = E3 - E1 + E2$$

Donde E_{ONIOM2} es una aproximación a la energía ideal:

$$E4 = E_{ONIOM2} + D$$

Donde D sería el error del método de extrapolación, que en caso de resultar constante para dos estructuras diferentes (ejemplo, Reactivos y Estado de Transición) al hacer una diferencia de energía ΔE_4 entre puntos de la *PES*, este valor se anularía y por lo tanto, se podría realizar predicciones correctas para energías de activación, por mencionar un ejemplo.

Para un sistema de tres capas la expresión para la energía total E_{ONIOM3} está dada por:

$$ONIOM3 = E6 - E3 + E5 - E2 + E4$$

Lo anterior también resulta claro de la Figura 5. Por otro lado también resulta claro que si se calcula E_{ONIOM2} usando los puntos 1, 4 y 6, y la diferencia entre E_{ONIOM2} y E_{ONIOM3} es constante, entonces se podría omitir la capa intermedia del cálculo de tres capas.

2.3.8 Conjunto de funciones de bases.

La mayor parte de los métodos mecano-cuánticos moleculares comienzan el cálculo con la elección de las funciones de base, los orbitales moleculares se expresan como una combinación lineal de dichas funciones, por lo que su elección resulta fundamental. A la hora de elegir las funciones deben tenerse en cuenta dos aspectos: el tipo de funciones escogidas y su número. Dos son los principales tipos de funciones de base empleadas:

a) Funciones de Slater (STO, orbitales de tipo Slater). Estas funciones presentan un gran inconveniente: son muy poco manejables, dado que no permiten una resolución analítica y rápida de las integrales. [74]

b) Funciones Gaussianas (GTO, orbitales de tipo gaussiana). La diferencia básica entre la función de Slater y la función gaussiana está en un término exponencial que, en la función gaussiana, se encuentra elevado al cuadrado. Esta pequeña diferencia introduce una importante ventaja a favor de las funciones gaussianas. Se introdujeron con el fin de

solventar el problema de la resolución analítica de las integrales de energía. La ventaja es que la multiplicación de dos gaussianas es otra gaussianas centrada entre las dos anteriores y que sus integrales también resultan ser gaussianas. [75] La desventaja es que representan los orbitales peor que las funciones de Slater. Ello conlleva que, para obtener una misma descripción, se requiera un número mayor de funciones en el caso de las funciones gaussianas. Una solución de compromiso la constituye la utilización de gaussianas contraídas, construidas como combinación lineal de las GTO originales (gaussianas primitivas) de forma que se aproxime, por ejemplo, a una STO. Una de las bases más utilizadas es la STO-3G, en la que se utilizan tres funciones gaussianas para representar un orbital de tipo Slater.

La segunda cuestión que es necesario decidir es el número de funciones de base que deben emplearse en el cálculo. Atendiendo a la complejidad del conjunto de funciones que describen los orbitales atómicos, se puede realizar la siguiente clasificación:

Un conjunto de funciones de base mínimo contiene el mínimo número de funciones de base necesarias para cada átomo, es decir, una función para cada orbital atómico que pertenezca a las capas ocupadas en el estado fundamental del átomo correspondiente.

Ej. STO-3G. Los resultados que se obtienen empleando bases mínimas son muy poco satisfactorios. Una estrategia para solucionar este problema consiste en utilizar bases con un número mayor de funciones. Existen dos posibilidades fundamentales para construir bases mayores. Por un lado, se puede aumentar el número de funciones que se utilizan para representar los orbitales de las capas ocupadas (conjuntos de base DZ, TZ..., y "split-valence"). Por otro lado, el conjunto de funciones de base se puede incrementar haciendo uso de funciones con un número cuántico " l " superior al de los orbitales de valencia del átomo (conjuntos de base que incluyen funciones polarizadas).

- En los conjuntos de base Doble Zeta (DZ), Triple Zeta (TZ),..., Ntuple Z, se aumenta el tamaño de la base reemplazando cada función del conjunto mínimo por N funciones.
- En los conjuntos de base de valencia desdoblada (Split- valence), cada orbital atómico de valencia está descrito por N funciones de base (DZ, TZ,...) y cada

orbital interno por una única función de base. Ej. 6-31G: cada orbital interno está descrito por una función gaussiana contraída que es combinación lineal de 6 gaussianas primitivas, y cada orbital atómico de valencia está formado por dos gaussianas contraídas de 3 primitivas y 1 primitiva, respectivamente.

- Los conjuntos con funciones de base polarizadas contienen funciones con un momento angular mayor del requerido para la descripción de cada átomo, permitiendo así cambiar la forma del orbital. Ej. 6-31G***: añade funciones de tipo d sobre los átomos pesados (Li-Cl), y de tipo p sobre el hidrógeno.
- Hay conjuntos de base que incluyen funciones difusas. Estas son funciones de tipo s y p cuya extensión espacial es mucho mayor que las que participan en mayor medida en la descripción de los orbitales de valencia. Permiten a los electrones ocupar una región del espacio más grande. Son importantes en sistemas en los que los electrones se encuentran lejos del núcleo, como moléculas con pares solitarios, aniones, estados excitados. Ej. 6-31+G***: añade funciones difusas sobre los átomos pesados. Un segundo + indica la adición de funciones difusas también sobre los átomos de hidrógeno.

2.4 REFERENCIAS

1. World Health Organisation AIDS Update 2006, <http://www.who.int/hiv/en/> (accessed Dec. 23, 2007).
2. De Clercq, E. *Expert Opin. Emerg. Drugs.* (2005) *10*, 241-274.
3. De Clercq, E. *Med. Chem. Res.* (2004) *13*, 439-478.
4. Van de Waterbeemd, H. *Curr. Opin. Drug Disc. Dev.* (2002) *5*: 33-43.
5. Vaidehi, N.; Floriano, W. B.; Trabanino, R.; Hall, S. E.; Freddolino, P.; Choi, E. J.; Zamanakos, G.; A. Goddard, W., *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* (2002) *99*, 12622-12627.
6. Pierson, T. C.; Doms, R. W. *Immunol. Lett.* (2003) *85*, 113-118.
7. Kazmiersky, W.; Bifulco, N.; Yang, H.; Boone, L.; DeAnda, F.; Watson, C.; Kenakin, T. *Bioorg. Med. Chem.* (2003) *11*, 2663-2676.
8. P. Ehrlich; Über den jetzigen Stand der Chemotherapie. *Dtsch. Chem. Ges.* 1909, *42*, 17. Quoted in: E.J. Ariens; *Prog. Drug. Res.* 1966, *10*, 429.
9. Wermuth, C. G.; Ganellin, C. R.; Lindberg, P.; Mitscher, L. *Pure Appl. Chem.* (1998) *70*, 1129-1143.
10. Jones, D. T.; Taylor, R.; Thornton, J. M. *Biochemistry.* (1994) *33*, 3038-3049
11. Martin, Y. C.; Bures, M. G.; Danaher, E. A.; DeLazzer, J.; Lico, I.; Pavlik, P. A.; *J. Comput. Aided Mol. Des.* (1993) *7*, 83-102.
12. Barnum, D.; Greene, J.; Smellie, A.; Sprague, P.; *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* (1996) *36*, 563-571.
13. Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.; *J. Comput. Aided Mol. Des.* (1995) *9*, 532-549.
14. Van Drie, J. H.; Weininger, D.; Martin Y. C.; *J. Comput. Aided Mol. Des.* (1989) *3*, 225-251.
15. *MOE (Molecular Operating Environment) 2006.08 Release*; Chemical Computing Group, Inc.: Montreal, Canada, 2004.

16. O. F. Güner, R. Hoffman, H. Li in *Report by Wndy A. Warr; 217th ASC National Meeting and Exposition, Anaheim, California, March 12-15, 1999*, Wendy Warr & Associates, London, 1999, 50-53.
17. Güner, O. F. *International University Line: La Jolla*, (2000) 195-212.
18. Cramer, R. D.; Patterson, D. E.; Bunce J. D.; *J. Am. Chem. Soc.* (1988) *110*, 5959-5967.
19. G. Klebe, U. Abraham, T. Mietzner; *J. Med. Chem.* (1994) *37*, 4130-4146.
20. Perutz, M.F. *Brookhaven Symp Biol* (1960) *13*, 165-83.
21. Kendrew, J.C; Bodo, G.; Dintzis, H.M.; Parrish, R.G; Wyckoff, H.; Phillips, D.C. *Nature* (1958) *181*,662-666.
22. Kapetanovic, I. *Chem. Biol. Interact.* (2008) *171* (2): 165-176.
23. Brenk, R.; Naerum, L.; Gradler, U.; Gerber, H. D.; Garcia, G. A.; Reuter, K.; Stubbs, M. T.; Klebe, G. *J. Med. Chem.* (2003) *46*, 1133-1143.
24. Gruneberg, S.; Stubbs, M. T.; Klebe, G. *J. Med. Chem.* (2002) *45*(17), 3588-3602.
25. Kraemer, O.; Hazemann, I.; Podjarny, A. D.; Klebe, G. *Proteins.* (2004) *55*(4), 814-823.
26. Powers, R. A.; Morandi, F.; Shoichet, B. K. *Structure.* (2002) *10*(7), 1013-1023.
27. Soelaiman, S.; Wei, B. Q.; Bergson, P.; Lee, Y. S.; Shen, Y.; Mrksich, M.; Shoichet, B. K.; Tang, W. J. *J. Biol. Chem.* (2003) *278*(28), 25990-25997.
28. Vangrevelinghe, E.; Zimmermann, K.; Schoepfer, J.; Portmann, R.; Fabbro, D.; Furet, P.. *J. Med. Chem.* (2003) *46*(13), 2656-2662.
29. Evers, A.; Klebe, G. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* (2004) *43*(2), 248– 251.
30. Hetényi, C.; Van der Spoel, D. *Protein Science.* (2002) *11*, 1729-1737.
31. Kuntz, I. D.; Blaney, J. M.; Oatley, S. J.; Langridge, R.; Ferrin, T. E. *J. Mol. Biol.* (1982) *161*(2), 269-288.
32. Perola, E.; Xu, K.; Kollmeyer, T. M.; Kaufmann, S. H.; Prendergast, F. G.; Pang, Y. P. *J. Med. Chem.* (2000) *43*(3), 401-408.
33. Venkatachalam, C. M.; Jiang, X.; Oldfield, T.; Waldman, M. *J. Mol. Graph. Model.* (2003) *21*(4), 289-307.

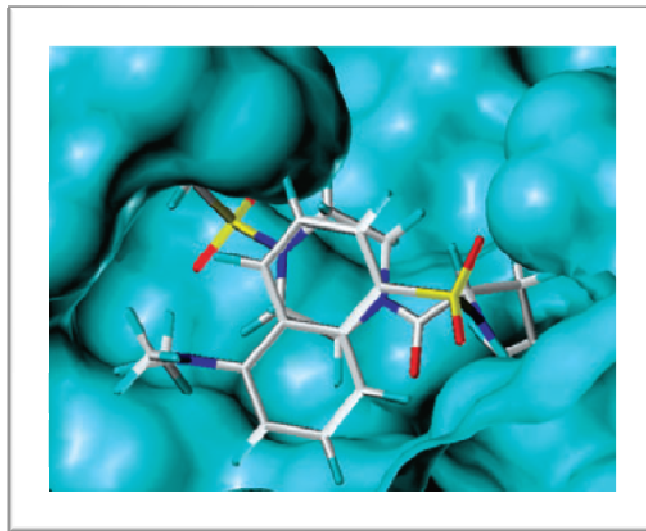
34. Rarey, M.; Kramer, B.; Lengauer, T.; Klebe, G.. *J. Mol. Biol.* (1996) 261(3), 470-89.
35. Welch, W.; Ruppert, J.; Jain, A. N. *Chem. Biol.* (1996) 3(6), 449-462.
36. Baxter, C. A.; Murray, C. W.; Clark, D. E.; Westhead, D. R.; Eldridge, M. D. *Proteins.* (1998) 33, 367-382.
37. Hou, T.; Wang, J.; Chen, L.; Xu, X. *Protein. Eng.* (1999) 12(8), 639-647.
38. Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R. *J. Mol. Biol.* (1997) 267(3), 727-748.
39. Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R.; Huey, R.; Hart, W.E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. *J. Comput. Chem.* (1998) 19(14), 1639-1662.
40. Charifson, P. S.; Corkery, J. J.; Murcko, M. A.; Walters, W. P. *J. Med. Chem.* (1999) 42(25), 5100-5109.
41. Gehlhaar, D. K.; Verkhivker, G. M.; Rejto, P. A.; Sherman, C. J.; Fogel, D. B.; Fogel, L. J.; Freer, S. T. *Chem. Biol.* (1995) 2, 317-324.
42. Goodsell, D. S.; Olson, A. J. *Proteins.* (1990) 8, 195-202.
43. Glide, Schrödinger Inc., New York, 2003.
44. Liu, M.; Wang, S. *J. Comput Aided Mol. Des.* (1999) 13(5), 435-451.
45. McMartin, C.; Bohacek, R. S. *J. Comput Aided Mol. Des.* (1997) 11(4), 333-344.
46. Abagyan, R.; Totrov, M.; Kuznetsov, D. *J. Comput. Chem.* (1994) 15, 488-506.
47. Metaphorics LLC, Piemont, CA 94611.
48. Lipkowitz, K. B.; Boyd, D. B. *Reviews in Computational Chemistry.* (2002) 18, 41-87.
49. Sali, A.; Blundell, T. L. *J. Mol. Biol.* (1993) 234, 779-815.
50. MOE (*Molecular Operating Environment*), 2006.08 Release; Chemical Computing Group, Inc.: Montreal, Canada, 2004.
51. Im, D.S. *Jpn. J. Pharmacol.* 2002, 90, 101-106.

52. Allinger, N. L. *J. Am. Chem. Soc.* (1977) *99*: 8127-8134.
53. Allinger, N. L.; Yuh, Y. H.; Lii, J-H. Molecular Mechanics. *J. Am. Chem. Soc.* (1989) *111*, 8551-8565.
54. Allinger, N. L.; Chen, K.; Lii, J. H. *J. Comp. Chem.* (1996) *17*, 642-668.
55. Clark, M.; Cramer, R. D.; Van Opdenbosch, N. *J. Comp. Chem.* (1989) *10*, 982-1012.
56. Halgren, T. A. *J. Comp. Chem.* (1996) *17*, 490-519.
57. Rappe, A. K.; Casewit, C. J.; Colwell, K. S.; Goddard III, W. A.; Skiff, W. M. *J. Am. Chem. Soc.* (1992) *114*, 10024-10035.
58. Wang, J.; Wolf, R. M.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; Case, D. *J. Comput. Chem.* (2004) *25*, 1157-1174.
59. Cornell, W. D.; Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Gould, I. R.; Merz, K. M.; Ferguson, Jr.; Spellmeyer, D. C.; Fox, T.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.. *J. Am. Chem. Soc.* (1995) *117*, 5179-5197.
60. Brooks, B. R.; Bruccoleri, R. E.; Olafson, B. D.; States, D. J. Swaminathan, S.; *et al.* *J. Comp. Chem.* 1983, *4*, 187-217.
61. Hermans, J.; Berendsen, H. J.; Van Gunsteren, W. F.; Postma, J. P. (1984) *23*(8), 1513-1518.
62. Damm, W.; Frontera, A.; Tirado-Rives, J.; Jorgensen, W.L. *J. Comp. Chem.* (1997) *18*, 1955-1970
63. Medina B. (2004). Análogos tiofénicos del tcnq: estudio teórico de las propiedades estructurales y electrónicas. Departamento de química – física (instituto de ciencia molecular) begoña milián medina universitat de valencia. *Servei de Publicacions*
64. Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods, J.B. Foresman and A. Frisch, Gaussian Inc., 1993.
65. Koch, W.; Holthausen, M.C.A. (2001) chemist's guide to density functional theory, 2^{da} ed, Wiley VCH: Weinheim; New York.

66. Hohenberg, P.; Kohn, W. *Phys. Rev.* (1964) 136, 864.
67. Scuseria, G. *J. Phys. Chem.* (1999) 103, 4782.
68. Maseras, F. and K., M. *J. Comp. Chem.* (1995). 16, 1170
69. Humbel, S.; Sieber, S., and K., Morokuma. *J. Chem. Phys.* (1996). 105, 1959
70. Svensson, M.; Humbel, S.; Froese, R. D.; Matsubara, T.; Sieber, S. and Morokuma K. *J. Phys. Chem.* (1996) 100, 19357.
71. Svensson, M.; Humbel, S.; Froese, R. D.J.; Matsubara, T.; Sieber, S.; Morokuma, K. *J. Phys. Chem.* (1996) 100 (50), 19357–19363.
72. Dapprich, S.; Komaromi, I.; Byun, K. S.; Morokuma, K.; Frisch, M. J. *J. Mol. Struc.: Theochem* (1999) 462, 1–21.
73. Froese, R. D. J.; Morokuma, K. *Encyclopedia of Computational Chemistry.* (1998) 2, 1244-1257.
74. Slater, J. C. *Phys. Rev.* (1930). 36, 57-64
75. Davidson, E. R. and Feller, D. *Chem. Rev.* (1986) 86, 681-690

CAPITULO 3

METODOLOGÍA



“En principio la investigación necesita más cabezas que medio”

Severo Ochoa

3. METODOLOGÍA

La metodología de este trabajo se divide en dos etapas, realizadas todas en las instalaciones del Grupo de Química Cuántica y Teórica de la Universidad de Cartagena.

Etapas 1. Predicción del modo y energía de unión de análogos de *AHLs* por cálculos de *Docking* y *ONIOM*.

Se realizó un estudio computacional en el cual se combinaron dos estrategias computacionales: *docking* y *ONIOM* (Our own N-layered Integrated molecular Orbital and Molecular Mechanics) [1-3], con el objetivo de establecer la posible relación actividad estructura (*SAR*) útil, para los análogos de las *AHLs*. El software *AutoDock* 4.2 [4] fue usado para obtener la mejor pose para cada estructura de los análogos en el sitio de unión de *LasR*, la mejor pose de los análogos fue seleccionada basados en la energía libre del *docking* y su posición dentro del sitio de unión. Una vez la mejor pose fue seleccionada, el método *ONIOM* fue aplicado para derivar descriptores químico-cuánticos.

Etapas 2. Diseño de modelos farmacofóricos y *docking* molecular, para identificar posibles compuestos con actividad agonista del *Quorum sensing*.

En esta tesis se han derivado modelos farmacofóricos utilizando el módulo *Pharmacophore Query de Moe*. El modelo farmacofórico creado, se utilizará como filtro para seleccionar los compuestos de manera aún más focalizada según unas características estructurales y tridimensionales concretas. Una vez se ha focalizado suficiente la quimioteca se procede con la fase de optimización de *hits*. Para ello se aplican técnicas de *docking*. Se utiliza información de la estructura de la proteína diana para muestrear el complejo ligando-receptor y una función de evaluación o *scoring* para evaluar la interacción ligando-macromolécula.

A continuación se describe cada una de las etapas de una manera mas detallada

3.1 Predicción del modo y energía de unión de análogos de AHLs por cálculos de *Docking* y *ONIOM*.

La estructura del receptor se obtuvo del *Protein Data Bank* (PDB) [5], la cual es una base de datos a nivel mundial que contiene estructuras tridimensionales de biomoléculas determinadas por cristalografía o resonancia magnética nuclear. Cada estructura posee un *ID* asignado para identificarlas fácilmente. En la base de datos PDB se encontró que la proteína *LasR* posee cinco entradas, cuyos *ID* son *2UV0*, *3IX3*, *3IX4*, *3IX8* y *3JPU*, de las cuales, las dos primeras se encuentran cocrystalizadas con su ligando nativo y las otras tres con compuestos con actividad agonista. En la etapa 2 se hará énfasis en dichas estructuras. Las estructuras con *ID 2UV0* [6] y *3IX3* [7] tienen una resolución de 1.8 Å y 1.4 Å respectivamente, este último criterio fue utilizado para elegir cual de las dos entradas utilizar para nuestros cálculos posteriores. Los 19 ligandos análogos a AHLs utilizados para el estudio, así como su actividad biológica *in vitro* reportadas como valores IC_{50} y sus respectivas estructuras bidimensionales fueron tomadas de la publicación de blackwell *et al.*, 2008. [8] La estructura de los análogos se muestra en el anexo 1.

Al disponer de la estructura bidimensional de los ligandos, se pudo iniciar la construcción tridimensional de dichas moléculas por medio del programa Sybyl 7.3. [9] se tomó la decisión de construir los análogos de AHLs a partir de la estructura que tiene el ligando nativo cocrystalizado para aprovechar su conformación. Este procedimiento posee dos ventajas: uno es que se aprovecha la conformación determinada en el complejo cocrystalizado que ya ha sido comprobada, y dos que las modificaciones de los ligandos pueden someterse a cambios de orientación manual que teóricamente son favorecidos por interacciones con el receptor. Como los análogos poseen una subestructura común con AHL nativo, la construcción de los análogos consistió en agregar aquellas modificaciones que posee cada análogo.

3.1.1 Preparación del *docking*

El primer paso en nuestro estudio fue la validación de la metodología de *docking* en el sistema modelado. La estructura 3D del ligando nativo *AHLs* fue extraída del complejo cocristalizado con código PDB *3IX3* [7] utilizando el programa Sybyl 7.3 [9] y fue sometida a optimización geométrica usando el método semiempírico *PM3* [10, 11] implementado en *Gaussian 03* [12]. La estructura de la proteína fue visualizada y modificada (remoción de todas moléculas de agua). Utilizando el programa Sybyl 7.3. Para realizar la validación y los otros cálculos de *docking* se utilizó el programa *AutoDock 4.2* [4].

El ligando nativo fue preparado con *AutoDocktools* [13], donde se revisaron los hidrógenos polares, se adicionaron las cargas de *Gasteiger* [14], para ello se requiere que los ligandos posean todos los hidrógenos, polares y no polares. Se especificaron los enlaces rotables. Solo los enlaces simples pueden rotarse. Los enlaces dobles, aromáticos o amino se consideraron no rotables.

Para la proteína, únicamente se añadieron los hidrógenos polares y se asignan las cargas *Gasteiger*. Posterior a esto, sigue la preparación del *grid*, que representa las coordenadas donde se establecen los primeros parámetros en los que el ligando puede moverse. El parámetro *grid* requiere que a cada elemento de los ligandos y la proteína se les asigne un mapa, el cual establece el tipo de mapas que se va a computar, la localización y extensión de esos mapas especifica los parámetros de energía potencial de los mismos. La caja del *grid* se tomó centrada en el sitio de unión ligando nativo con un tamaño $50 \times 50 \times 50$ con espaciado entre los puntos de 0.375 \AA . El *grid* marca una region limite en donde los cálculos de *docking* deben realizarse y no debe salirse de ella. Para la búsqueda conformacional fue seleccionado el algoritmo genético *lamarckian* [15], se calcularon 100 corridas que son el número de conformaciones que se van a registrar. Los demás parámetros fueron seleccionados por defecto.

Una vez el protocolo de *docking* descrito arriba fue validado, de tal forma que la posición y orientación tomada por el ligando nativo en la estructura de rayos-X *3IX3*, fue reproducida con cierta exactitud por *AutoDock* 4.2 [4], los demás compuestos análogos de las *AHLs* fueron optimizados y acoplados siguiendo el mismo protocolo. La mejor pose de cada ligando fue seleccionada teniendo en cuenta energía libre del *docking* y su posición dentro del sitio de unión.

Debido a que el número de átomos presentes en el receptor es muy grande, realizar cálculos mecánico-cuánticos resultaría muy costoso desde el punto de vista computacional, por lo tanto, se redujo su número creando una cavidad, la cual se generó, tomando 5 Å alrededor del ligando nativo, esta cavidad se utilizó para crear los 20 complejos cavidad-ligandos.

3.1.2 Cálculos *ONIOM*.

Los 20 complejos cavidad-ligando formados en el paso anterior incluyendo el del ligando nativo, fueron sometidos a cálculos de energía (single point) con el método *ONIOM* [1-3] de tres capas, de ahora en adelante llamado *ONIOM3*, a no ser que se especifique otra cosa.

Para iniciar los cálculos con el método *ONIOM3* se empezó tomando el complejo formado entre la cavidad y el ligando nativo, como patrón, en dicho complejo se hizo la siguiente división: por un lado, los átomos o región del complejo que fueron tratados a un nivel de cálculo alto, en este caso *x3lyp/dgdzvp* [16,17] (capa alta, región I), estos átomos pertenecen al ligando y a los aminoácidos Tyr-56, Trp 60, Asp-73, y Ser-129 en la cavidad, ya que datos experimentales, muestran que estos residuos están implicados en la formación de puentes de hidrógeno con el ligando nativo. Los átomos de los residuos Tyr-47 y Tyr-64 fueron tratados a un nivel de cálculo medio, *hf/3-21G* [18] (capa media, región II) El resto de átomos de la cavidad fueron tratados con un método de cálculo más bajo *PM3* [10, 11] (capa baja, región III).

Uno de los objetivos de este trabajo al utilizar el método *ONIOM* es calcular la energía de unión cavidad-ligando, de un numero de atomos grande, invirtiendo poco tiempo de cálculo, ademas de esto utilizando el método *ONIOM3* podemos calcular las interacciones tipo puente de hidrógeno entre la región conservada de los analogos de las *AHLs* y residuos Tyr-56, Trp 60, Asp-73, y Ser-129 presentes en el sitio activo del receptor transcripcional *LasR*.

Para obtener la energía de interacción para un complejo (en este caso cavidad-ligando), se utiliza la aproximación de supermolécula, que esta dada por: $\Delta E = E (AB) - (E(A) + E (B))$. Por lo tanto para calcular la energía de unión a partir de un cálculo *ONIOM* calculamos las energías para el sistema en interacción ($E (AB)$) y luego separamos varios Angstroms el sistema en interacción, para poder calcular la energía de este ($E (A-----B)$) y restarla de la energía inicial.

Es mas adecuado separar los sistemas varios angstrom que realizar los cálculos de la partes por separado ($E (B)$ y $E(A)$). Esto es útil en el sentido que ayudar a minimizar el error por superposición de bases (*BBSE*).

Para calcular las contribuciones energéticas se realizaron simples restas y sumas algebraicas, teniendo cuidado de restar cada contribución energética (capa alta, media y baja) del sistema no interactuante ($A-----B$) de la del sistema interactuante (AB), de esta manera se obtuvo los deltas de energía para cada capa *ONIOM3*, la suma de los deltas genera la energía de unión del complejo cavidad-ligando.

$$\Delta E^{ONIOM3} = \Delta E [Alta, I] + \Delta E [Media, II] + \Delta E [Baja, III] - \Delta E [Media, I] - \Delta E [Baja, II]$$

$$\Delta E^{ONIOM3} = \Delta E [Alta, I] + \Delta \Delta E [Media, II - I] + \Delta \Delta E [Baja, III - II]$$

O de acuerdo con el archivo de salida de *Gaussian 03*.

$$E^{ONIOM3} = E_4 + E_5 + E_6 - E_2 - E_3$$

La energía de interacción de puentes de hidrogeno esta definida simplemente como la resta entre la capa alta del sistema en interacción menos la capa alta del sistema no interactuante.

$$\Delta E (Alta) = E (\text{región de interacción, capa Alta}) - E (\text{región no interactuante, capa Alta})$$

Finalmente, los diferentes valores de energía obtenidos fueron comparados con la actividad biológica medida como valores de IC_{50}

3.2 Diseño de modelos farmacofóricos y *docking* molecular, para identificar posibles compuestos con actividad agonista del *Quórum sensing*

El modelo farmacofórico utilizado en este trabajo fue creado manualmente a partir de la conformación bioactiva del agonista TP1, ajustando interactivamente las posiciones, radios, así como otras características de la hipótesis o *query*. Para ello utilizamos la herramienta *pharmacophore Query editor*, disponible en el programa Moe [19], la cual nos permitió crear una hipótesis consistente en un conjunto de restricciones referentes a la ubicación y tipo de características farmacofóricas del agonista TP1.

Para crear nuestra base de datos, realizamos una búsqueda de compuestos en la base de datos *PubChem* [20] disponible en línea. Se utilizó la subestructura común presente en los cuatro agonistas reportados por Muh *et al.*, 2006 [21]. Como restricción para la búsqueda de compuestos con posible actividad agonista. Una vez creada nuestra base de datos, a partir de ésta, se generó una base de datos multiconformacional utilizando el programa Moe [19].

Una vez formulado el modelo farmacofórico, la búsqueda se realiza sobre una base de datos multiconformacional previamente calculada, ya que no se generan conformaciones

durante la búsqueda, sino que cada una de las entradas de la base de datos se superpone de forma rígida sobre la hipótesis o query (herramienta *Pharmacophore Search*). Se genera una lista con los posibles hits presentes en la base de datos cribada.

Para evaluar las listas de *hits* y la bondad de los métodos aplicados en cribado virtual se utilizan las métricas mostradas en las ecuaciones [2.1]-[2.5], típicamente aplicadas en búsquedas con modelos farmacofóricos. En todos los casos, D corresponde al número de compuestos en la base de datos, A es el número de activos en la base de datos, Ht es el número de compuestos en la lista de *hits* (verdaderos positivos + falsos positivos) y Ha es el número de activos en la lista de *hits*. Estos valores pueden calcularse sobre el total de la base de datos, aunque normalmente se calculan para ciertos porcentajes de base de datos escaneada (típicamente para el 5-10% de la base de datos).

Una vez se ha focalizado suficiente la base de datos se procede con la fase técnica del *docking*. Se utiliza información de la estructura de la proteína diana para muestrear el complejo ligando-receptor y una función de evaluación o *scoring* para evaluar la interacción ligando-macromolécula.

3.2.1 Docking

El primer paso en nuestro estudio fue la validación de la metodología de *docking* en el sistema modelado. La estructura 3D del ligando TP1 fue extraída del complejo cocrystalizado con código PDB *3IX3* utilizando el programa Sybyl 7.3. Para realizar la validación y el *docking* de los ligandos presentes en la lista de *hits*, se realiza el mismo procedimiento que en el *docking* de la etapa 1.

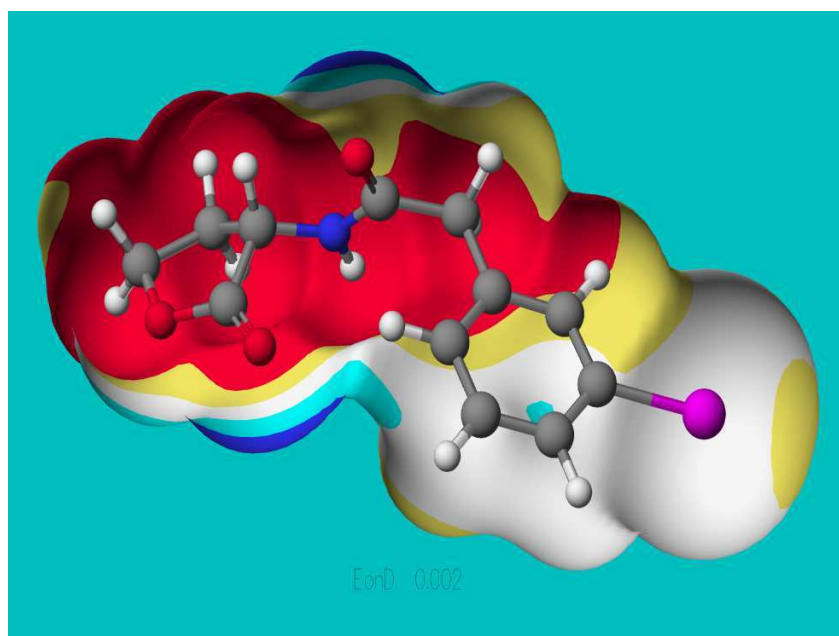
3.3 REFERENCIAS

1. Svensson, M.; Humbel, S.; Froese, R. D.J.; Matsubara, T.; Sieber, S.; Morokuma, K. *J. Phys. Chem.* (1996) 100 (50), 19357–19363.
2. Dapprich, S.; Komaromi, I.; Byun, K. S.; Morokuma, K.; Frisch, M. J. *J. Mol. Struct.: Theochem* (1999) 462, 1–21.
3. Froese, R. D. J.; Morokuma, K. *Encyclopedia of Computational Chemistry*. (1998) 2, 1244-1257.
4. Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S. and Olson, A. J. *J. Comput. Chem.* (2009) 30, 2785–2791
5. Bernstein, F. C.; Koetzle, T. F.; Williams, G. J.; Meyer E. F. Jr.; Brice, M. D.; Rodgers, J. R.; Kennard, O.; Shimanouchi, T.; Tasumi, M. *J. Mol. Biol.* (1977) 112(3), 535-542.
6. Bottomley, M.J.; Muraglia, E.; Bazzo, R. and Carfi, A. *J. Biol. Chem.* (2007) 282, 13592–13600.
7. Nair, S. K.; Zou, Y. *Chemistry & Biology* (2009) 16, 961–970.
8. Geske, G. D.; Mattmann, M. E.; Blacwell. H. E. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 18 (2008) 5978–5981.
9. SYBYL, Tripos Inc., 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA.
10. Stewart, J. J. P. *J. Comput. Chem.* (1989) 10 (2), 221–264.
11. Stewart, J. J. P. *J. Comput. Chem.* (1989) 10 (2), 209–220.
12. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Zakrzewski, V. G.; Montgomery, J. A., Jr.; Stratmann, R. E.; Burant, J. C.; Dapprich, S.; Millam, J. M.; Daniels, A. D.; Kudin, K. N.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Tomasi, J.; Barone, V.; Cossi, M.; Cammi, R.; Mennucci, B.; Pomelli, C.; Adamo, C.; Clifford, S.; Ochterski, J.; Petersson, G. A.; Ayala, P. Y.; Cui, Q.; Morokuma, K.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Cioslowski, J.; Ortiz, J. V.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Gomperts, R.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Gonzalez, C.; Challacombe, M.;

- Gill, P. M. W.; Johnson, B. G.; Chen, W.; Wong, M. W.; Andres, J. L.; Head-Gordon, M.; Replogle, E. S.; Pople, J. A. *Gaussian 03*; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2003.
13. Sanner, M. F. *J. Mol. Graphics Modell.* (1999) 17 (1), 57–61.
 14. Gasteiger, J.; Marsili, M.. *Tetrahedron.* (1980) 36, 3219-3288.
 15. Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. *J. Comput. Chem.* (1998) 19, 1639–1662
 16. Xu, X.; Goddard, W. A., III. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2004) 101, 2673–2677.
 17. N. Godbout, D.R.; Salahub, J.; Andzelm, E.; Wimmer, Can. *J. Chem.* (1992) 70, 560.
 18. K. D. Dobbs and W. J. Hehre, *J. Comp. Chem.* (1987) 8, 880-93
 19. *MOE (Molecular Operating Environment)* 2006.08 Release; Chemical Computing Group, Inc.: Montreal, Canada, 2004.
 20. Bolton, E.E; Wang, Y.; Thiessen, P.A.; Bryant, S. H. *Annu. Rep. Comput. Chem.* (2008) 4, 217–241.
 21. Muh, U.; Hare, B.J.; Duerkop, B.A.; Schuster, M.; Hanzelka, B.L.; Heim, R.; Olson, E.R., and Greenberg, E.P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2006)103, 16948–16952.

CAPITULO IV

RESULTADOS I



“Para las personas creyentes, Dios esta al principio. Para los científicos está al final de todas sus reflexiones”

Max Planck

RESULTADOS I

4. Predicción del modo y energía de unión de análogos de AHLs por cálculos de *Docking* y *ONIOM*.

Con el objetivo de validar la metodología del *docking* aplicada en este trabajo se compararon la estructura cocrystalizada del ligando nativo *Vs* su estructura acoplada en el sitio activo del receptor *LasR*, utilizando, además del criterio visual, el criterio de desviación estándar cuadrática media (*RMSD*). En la Figura 1 se muestra el alineamiento entre la conformación del ligando nativo correspondiente al complejo cocrystalizado en color azul y la conformación resultado del *docking* es mostrada en color rojo. Como se puede observar en la Figura 1, la estructura acoplada se ubica en el sitio de unión de *LasR* tomando una conformación casi idéntica a la que presenta el ligando nativo en su estructura cristalizada, ubicando la cadena lateral acil, a pesar de su muy alta flexibilidad de un modo adecuado en el bolsillo hidrofóbico. El anillo lactona, por su parte, es localizado de forma correcta, para establecer las interacciones tipo puente de hidrógeno presentes en el complejo cocrystalizado, estas interacciones se puede apreciar en la Figura 2.

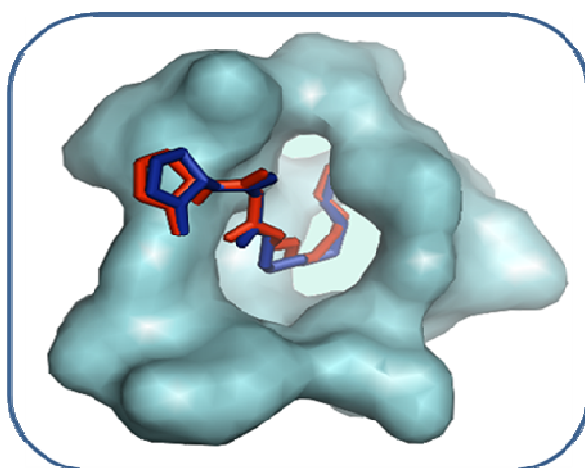


Figura 1. Alineamiento entre el ligando presente en el complejo cocrystalizado (en azul) y el ligando dockeado (en rojo), utilizando el programa AutoDock 4.2.

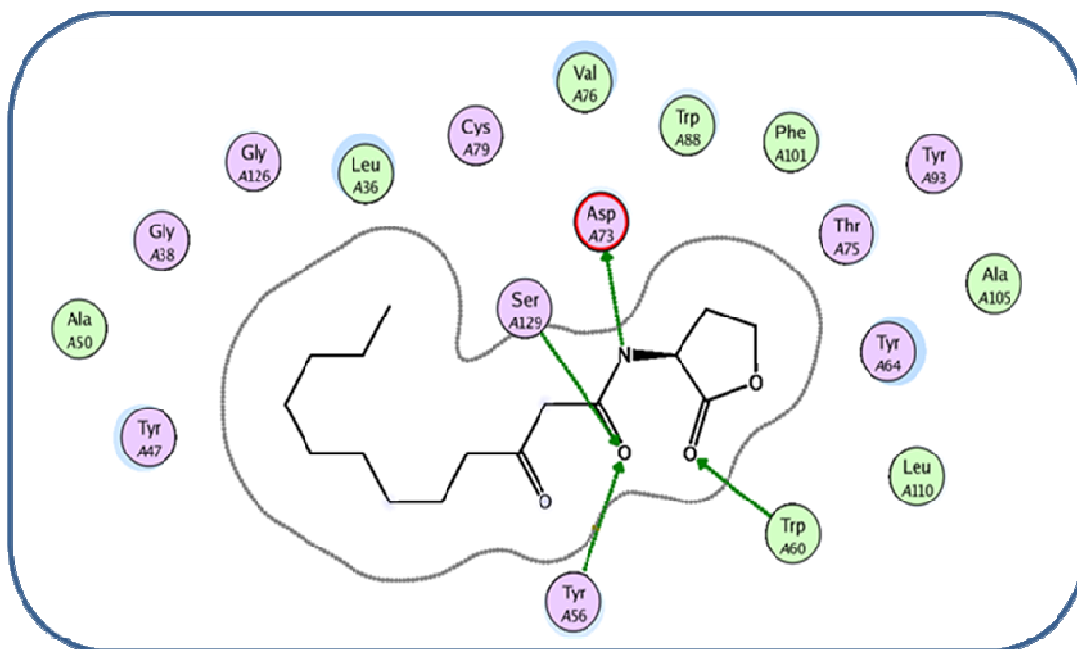


Figura 2. Interacciones tipo puente de hidrógeno presentes en el complejo proteína-ligando, formado entre el ligando nativo dockeado y el sitio activo del receptor *LasR*

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 cocrystalizado, para tal cálculo se obtuvo un valor de de 0.59 Å. Recientes estudios comparan varios programas de *docking* y sus algoritmos para analizar este tipo de problemas en particular [1-3]. Estos estudios se enfocaron en el valor del *RMSD* como una medida de la exactitud que tienen los programas de *docking* para predecir una pose óptima en un proceso de validación [1-3]. Una pose computada es considerada correcta, si su valor de *RMSD* es menor de 2 Å. Teniendo esto en cuenta, podemos afirmar que *AutoDock* 4.2 [4], reproduce correctamente la forma de unión y las interacciones presentes entre el receptor *LasR* y su ligando nativo. Por lo tanto podemos tener cierta certeza acerca de las predicciones que dicho programa realice sobre nuestro conjunto de compuestos en estudio, debido a que estos son estructuralmente similares a las acil homoserina lactonas.

Las interacciones tipo puente de hidrógeno mostradas en la Figura 2, entre los grupos polares de la acil homoserina lactona (*AHL*) y los residuos Tyr-56, Trp-60, Asp-73 y Ser 129 del receptor *LasR*, son muy importantes para el correcto plegamiento de la familia de proteínas tipo *LuxR* [5]. Estudios realizados por nuestro grupo de investigación [6], reportaron que los aminoácidos Tyr-56, Trp-60, Asp 73 y Ser 129, están estrictamente conservados en una amplia gama de receptores transcripcionales de bacterias gram negativas, reflejando el hecho que estos residuos son importantes en cada receptor para reconocer la región polar de su *AHLs*. Por el otro extremo del ligando, la cadena lateral acil, presenta interacciones tipo Van der Waals con los residuos Leu-36, Leu-40, Ile-52, Tyr-47, Val-76, y Leu-125 que pertenecen al bolsillo hidrofóbico de *LasR*, esta interacciones son importantes por que son las que estabilizan al complejo *LasR-AHLs* [5].

4.1 Docking entre *LasR* y Análogos

Los resultados obtenidos a partir del proceso de *docking* entre el receptor transcripcional *LasR* y los 19 análogos de las *AHLs*, fueron muy satisfactorios debido a que todos los análogos presentaron una forma de unión muy parecida a la que presenta el ligando nativo del receptor *LasR*, esto no es sorprendente pues las estructuras moleculares son muy similares a las del ligando nativo de *LasR*. En la Figura 3 se muestra la mejor pose tomada por cada análogo en el sitio activo de *LasR*. Como se puede observar en la Figura 3, el grupo carbonilo perteneciente al anillo lactona, y el grupo amida de la cadena acil, están orientados de forma correcta hacia los aminoácidos con los cuales forman las interacciones tipo puente de hidrógeno. Estas interacciones se reproducen en cada uno de los análogos, lo cual indica que su diferencia en cuanto actividad antagonista se debe a la ubicación y orientación de sus cadenas laterales dentro del bolsillo hidrofóbico que posee *LasR* en su sitio activo, por lo anterior, para comprender mejor las interacciones existentes entre *LasR* y cada uno los análogos de las *AHLs*, estos últimos fueron divididos en tres grupos como los reportan recientes estudios, donde sintetizaron varios de estos análogos y los clasificaron en tres grupos [7]. Ver Tabla 1.

A demás esto, nosotros dividimos a los análogos en dos regiones como se muestra en la Figura 4, la región A, que es la parte conservada, la cual esta formada, por el anillo lactona, y la función amida y la región B, que son las cadenas lateral variables entre un grupo y otro. Esto nos permitirá realizar un mejor análisis de las relaciones estructura actividad, existentes entre estos análogos y el receptor *LasR*.

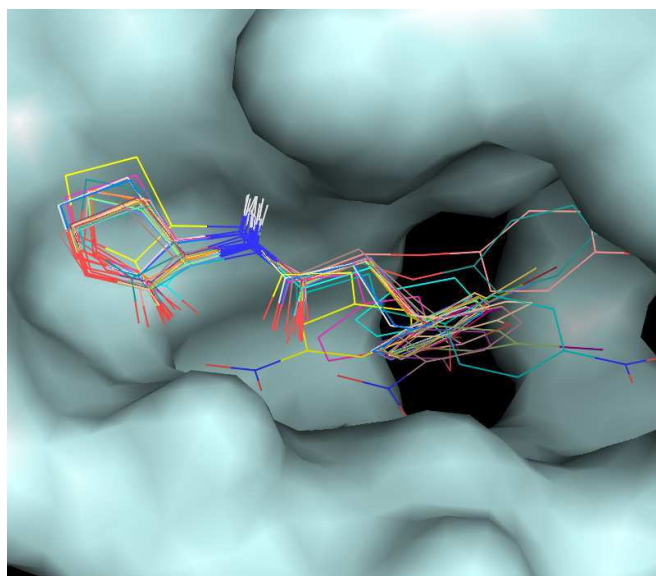


Figura 3. Alineamiento de las mejores poses de todos los compuestos dockeados dentro del sitio de unión de *LasR*

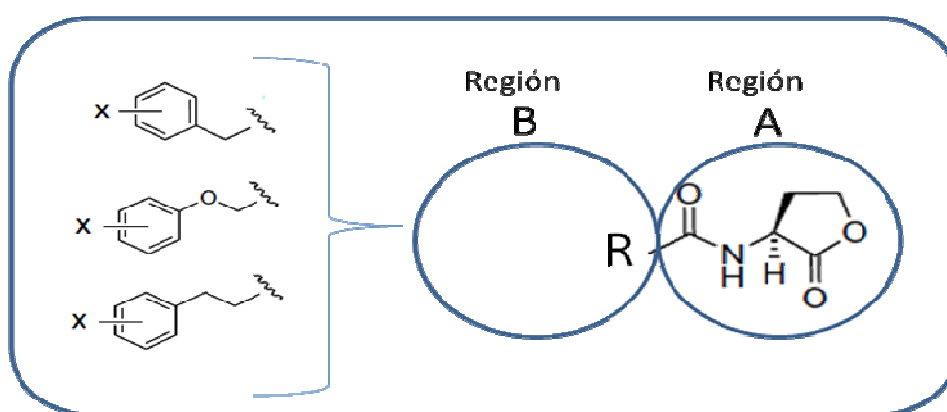
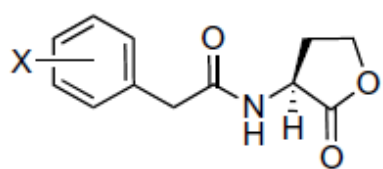
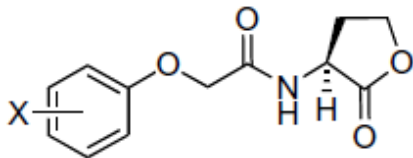
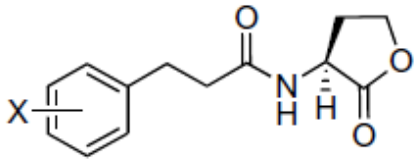
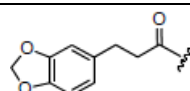


Figura 4. División de los análogos en dos regiones. La región A, que es la parte conservada, la cual esta formada, por el anillo lactona, y la función amida y la región B, que son las cadenas lateral variables entre un grupo y otro.

Tabla 1. Clasificación de los Análogos de las AHLs con actividad *anti-quórum sensing*, en negrita se marcan los valores de IC_{50} de los ligandos más activos

Grupo	Estructura base	Compuesto	Sustituyente (X)	$IC_{50}(\mu M)$
PHL	 Fenilacetil homoserina lactonas	1	4-I	1.72
		2	3-I	4.63
		4	3-NO ₂	0.61
POHL	 Fenoxiacetil homoserina lactonas	6	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
PPHL	 Fenilpropionil homoserina lactona	8	4-Br	0.34
		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

4.1.1 Docking entre PHLs y LasR

El análisis de los resultados del *docking* de los ligandos pertenecientes al grupo PHLs, sugiere que, los grupos polares de la región A, excepto el oxígeno del anillo lactona, forman interacciones tipo puente de hidrógeno con los residuos Tyr-56, Trp-60, Asp 73 y Ser 129, por tal motivo, como se menciona arriba, las diferencias en cuando a su capacidad antagonista frente al receptor *LasR*, debe estar relacionada con región B de dichos ligandos. Los ligandos 1, 2, y 4, se diferencian solo en el sustituyente que cada uno posee sobre el anillo fenil y la posición que estos ocupan sobre el anillo, ver Tabla 1.

La mejor pose tomada por el ligando 4 en el sitio de unión de *LasR*, además de formar la interacciones típicas, presentes en la región A, es posible, que dicha pose facilite en la región B, la formación de otras interacciones, debido a la posición del sustituyente nitro en el anillo, 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, además de esto, pueden estar presentes interacciones π - π entre el anillo aromático del ligando y el anillo aromático de la Tyr-64, lo anterior puede ser una explicación de la gran actividad antagonista de este ligando con respecto a los otros miembros de su grupo.

Los diferentes valores de actividad antagonista existentes entre los ligandos 1 y 2, como es evidente, se deben a la posición que ocupa el átomo de yodo sobre el anillo fenilo en cada ligando. Por tal motivo, pensamos que la conformación que toma el ligando 1, le permite formar una interacción entre el yodo y el oxígeno del grupo carbonilo del aminoácido Tyr-47, tal interacción no se presenta o en el mejor de los casos es muy débil entre el ligando 2 y Tyr-47, este tipo de puentes 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 como por ejemplo, carbonilo, hidroxilo, carboxilato cargado, o grupos fosfatos [8].

Además la distancia y dirección existentes entre los átomos implicados solo es satisfactoria en el caso el ligando 1, 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 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 [8], como se muestra en la Figura 5.

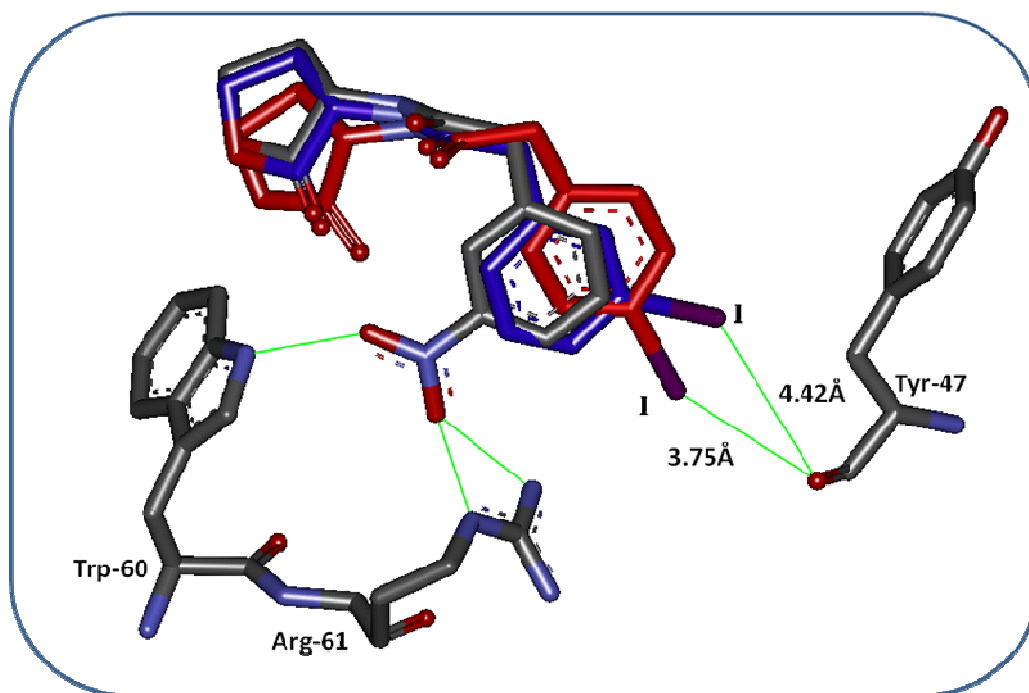


Figura 5. Interacciones existentes entre la región B de los ligandos (1 en rojo, 2 en azul y 4 en gris) PHLs y los residuos, Tyr-47, Trp-60 y Arg-61

4.1.2 Docking entre POHLs y LasR

Los ligandos del grupo POHLs presentan un modo de unión entre ellos muy similar, por lo tanto es muy evidente que la actividad antagonista al igual que el grupo de los PHLs dependa del sustituyente y de su localización en el anillo, a pesar de esto su actividad antagonista es moderada comparada con la mostrada por los ligandos pertenecientes al

los grupos PHLs y PPHLs, lo anterior se puede explicar por la presencia del átomo de oxígeno en la región B de estos 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 de los ligandos de este grupo y el anillo aromático de la Tyr-64, sumado a esto en comparación con el grupo metileno presente en los otros grupos, la rotación alrededor de los enlaces del oxígeno es más restringida por los pares libres que presenta dicho átomo.

Analizando los valores de IC_{50} y los sustituyentes presentes en el anillo aromático de los ligandos E20, E21 y E22, podemos apreciar una correlación entre el valor de actividad inhibitoria y el tamaño del átomo del sustituyente halógeno.

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 1. Una posible explicación de este fenómeno puede ser las diferencias en los radios de Van der Waals de los átomos de halógeno presente en cada ligando, esto 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, en este caso en particular, el radio de Van der Waals para estos átomos tiene la tendencia $I > Br > Cl$, cuyos valores son 1.98 Å, 1.85 Å, y 1.75 Å, respectivamente.

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 aun 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 [8].

Comparando estas distancia $X\cdots O$, con las presentes en nuestros complejos podemos suponer que las interacciones son posibles y por lo tanto son importantes en la estabilidad de nuestros complejos, ver grafica 6. Siendo mas energéticas las interacciones entre el yodo del ligando y el oxígeno del carbonilo de Tyr-47, a demás de los radios de Van der Waals hay que considerar otras propiedades de los halógenos y la influencia que el anillo aromático tiene sobre dichas propiedades, para poder dar una explicación razonable a la relación actividad estructura presente en dichos ligandos. En los anexos se muestran unos gráficos, resultados de los cálculos de superficie de potencial electrostático (*SEP*) basados en la densidad electrónica y los radios de Van der Waals de los ligandos E20, E21 y E22. En la siguiente sección explicare con mas detalles la relación existentes entre los valores de IC_{50} encontrados y los gráficos *SEP*.

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 enlace de halógeno presentes en otros ligandos. El ligando 6, 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 flúor, quizás ayude a entablar alguna interacción con Tyr-47.

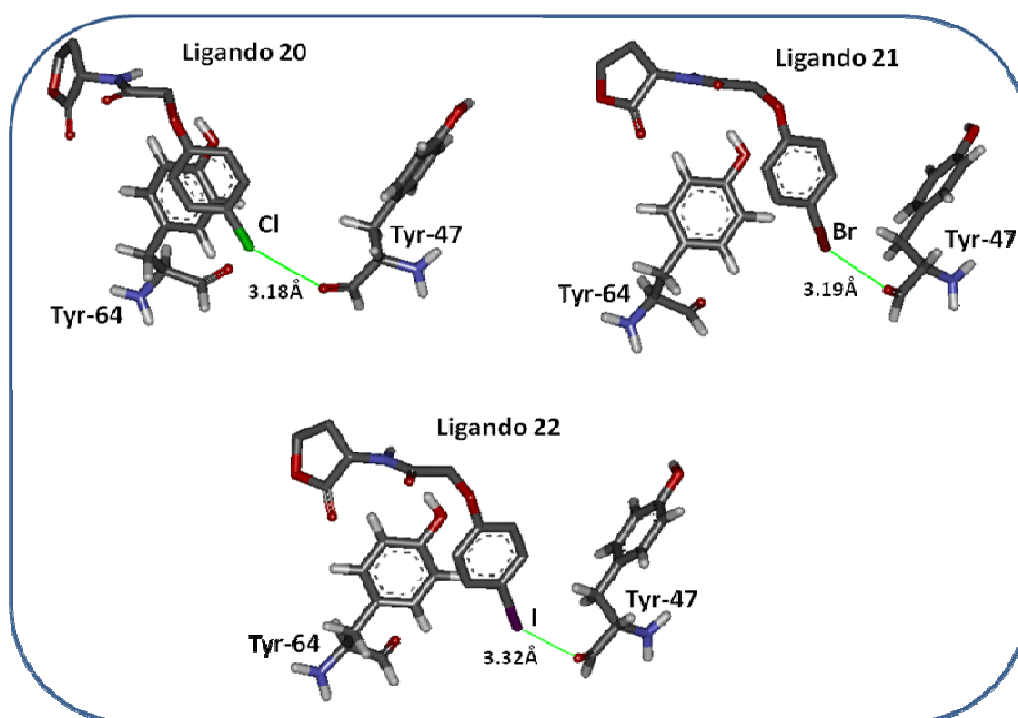


Figura 6. Puentes de halógenos presentes en los ligandos E20, E21 y E22. En todos los casos la suma de los radios de Van der Waals, de los átomos involucrados en puentes de halógeno, excede la distancia mostrada en el gráfico.

4.1.3 Docking entre PPHLs y LasR

Los ligandos que pertenecen al grupo *PPHLs* son varios, por tal motivo, solo describiremos las relaciones estructura actividad más importante existente entre algunos de ellos. En el conjunto de los 19 análogos hemos observado que los ligandos que poseen el mismo sustituyente pero en diferente ubicación sobre el anillo aromático, poseen una marcada diferencia en su actividad antagonista.

Los ligandos que poseen el sustituyente en la posición 4 del anillo 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} . Para tratar de explicar esta tendencia, hemos analizado la estructura química de los ligandos 8 y E31, se observa que solo se diferencian en la ubicación del sustituyente halógeno sobre el anillo aromático.

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 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 8, la distancia entre dichos átomos es aceptable como se muestra en la Figura 7.

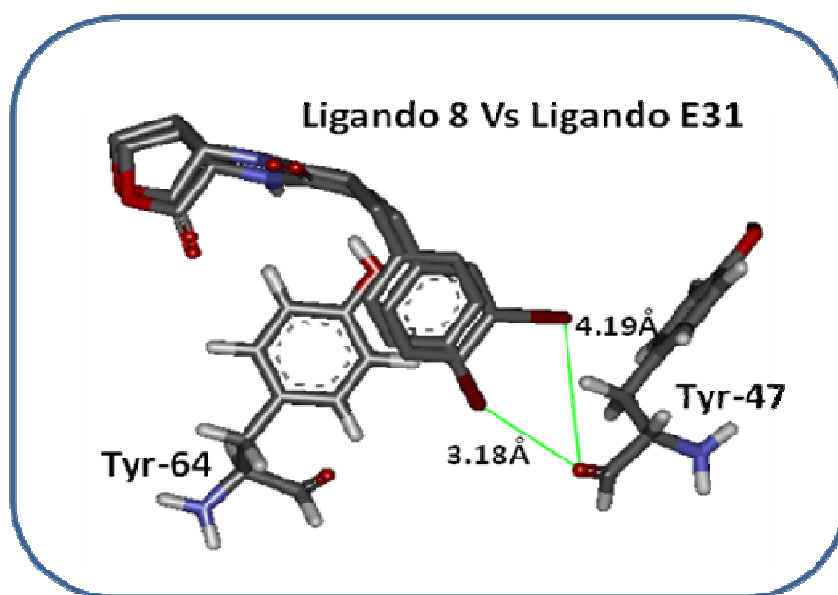


Figura 7. Las distancias existentes entre el átomo de bromo y el átomo de oxígeno del residuo Tyr-47, es mayor, cuando el sustituyente se encuentra en la posición 3 del anillo, por tal motivo no puede existir una interacción muy fuerte entre estos átomos.

Hasta ahora hemos explicado la relación existente entre la actividad presentada por los ligandos y su estructura, describiendo las características estructurales de los ligandos, sin analizar el efecto que pueden causar los aminoácidos a su alrededor, a las propiedades químicas de los átomos de los ligandos y la consecuencia que este efecto causaría en las tendencias encontradas normalmente. Si observamos los valores de IC_{50} de los ligandos E29, E30 y 8, nos percatamos que existe la misma tendencia, que se presentaba en 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} .

La única diferencia existente entre los ligandos E29, E30 y 8, es el átomo de halógeno que posee cada ligando en la posición 4 del anillo aromático, Flúor, Cloro y Bromo respectivamente. Si analizamos el comportamiento de los halógenos, notamos que el flúor es un átomo muy electronegativo por tal motivo se espera que sea poco polarizable por influencia del anillo aromático, por el contrario debido a su gran electronegatividad tiene la capacidad de atraer los electrones del anillo aromático, pero esta atracción es menor a la que se presenta cuando esta unido a cadenas alquílicas.

Debido a la capacidad que tiene el flúor para atraer los electrones puede 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 por 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 graficas de superficie 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, como se puede apreciar en la Figura 8.

En esta Figura 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 mas grandes o a la polarizabilidad del halógeno, mostrando un ligero carácter electropositivo, de color blanco a amarillo, lo cual sugiere que el átomo de yodo puede formar puentes de halógenos mas 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 mas polarizables (acido Lewis).

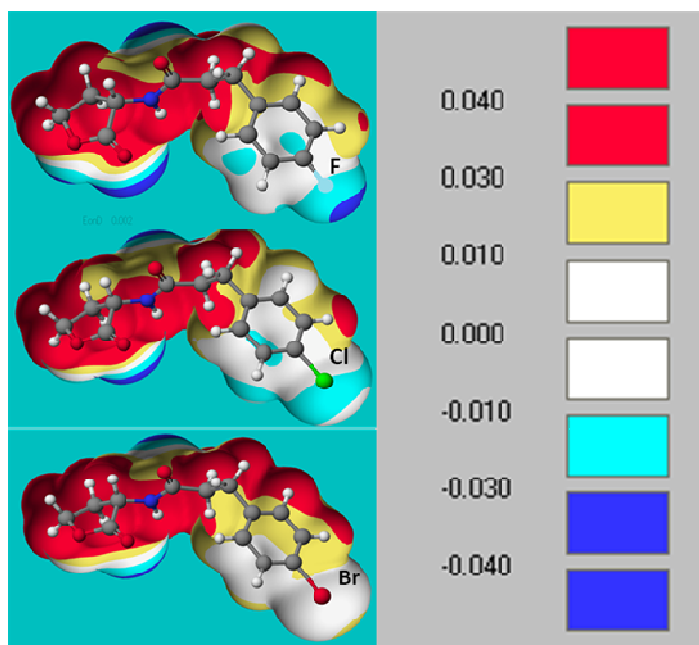


Figura 8. Superficie de potencial electrostático, basados en la densidad electrónica y los radios de Van der Waals.

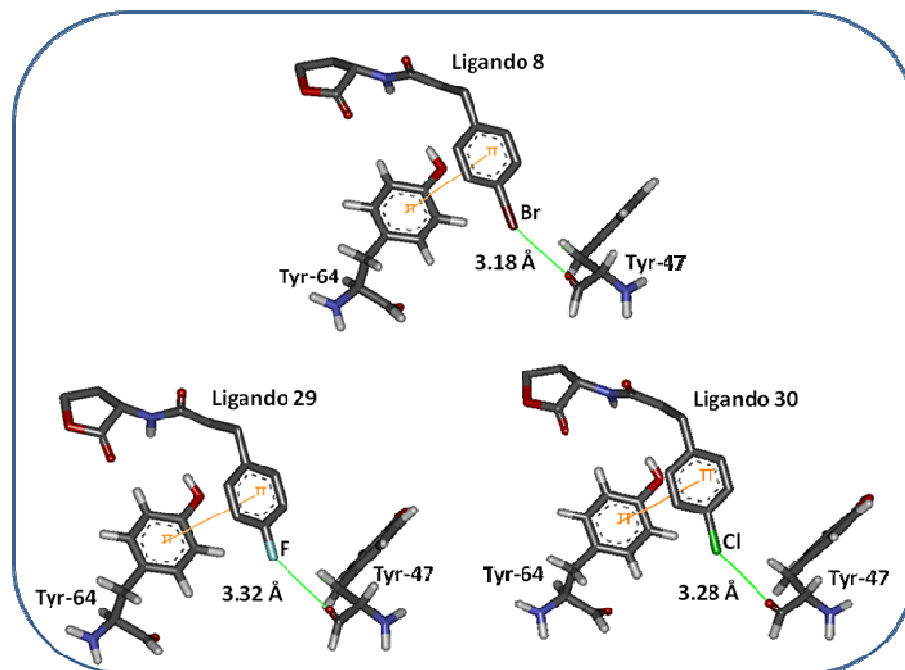


Figura 9. Puentes de halógenos presentes en los ligandos E20, E21 y E22. En todos los casos la suma de los radios de Van der Waals, de los átomos involucrados en puentes de halógeno, excede la distancia mostrada en el grafico

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 9. Además por ser el bromo menos electronegativo que el flúor no afecta mucho la aromaticidad del anillo, lo cual favorece la interacción con el anillo de Tyr-64. El ligando que tiene como sustituyente el átomo de cloro tiene un comportamiento muy parecido al del bromo pero como sabemos el cloro es mas electronegativo que el bromo. Estos comportamientos tomados por los halógenos en presencia del anillo aromático puede ser la causa de la tendencia encontrada en su actividad antagonista. Para los ligandos E29, E30 y 8.

Estos contactos cortos, originalmente llamados enlaces de transferencia de carga, fueron atribuidos a la transferencia de carga negativa de un oxígeno, nitrógeno, o azufre (una base Lewis) a un halógeno polarizable (ácido Lewis). [9-10] Ellos son ahora conocidos como enlaces de halógenos por analogía a los enlaces de hidrógeno clásicos con los cuales comparten ellos muchas propiedades.

4.1.4 Análisis general

Para explicar porque los 19 análogos de las acil homoserina lactonas tienen actividad antagonista debemos analizar las conformaciones e interacciones formadas por los agonistas en el sitio activo de *LasR* y comparar con las conformaciones y las interacciones presentes en un antagonista. Un alineamiento en el sitio de unión de *LasR* entre el ligando nativo de *LasR*, TP-1 (un agonista) y el ligando 8 un antagonista, nos permite visualizar los requerimientos estructurales de cada compuesto para ser agonista o antagonista.

En la Figura 10 podemos apreciar las conformaciones tomadas por el ligando nativo en color violeta, el agonista TP-1 en color blanco y el antagonista 8 de color azul, dentro del sitio activo de *LasR*, una inspección visual nos permite concluir que las regiones polares de los tres ligandos están localizadas en una región en común del receptor. Si analizamos la cadena hidrocarbonada del ligando nativo y la comparamos con el ligando TP-1, nos percatamos que la orientación tomada por esta cadena hidrocarbonada, es imitada de alguna forma por las conformaciones tomadas por los anillos del ligando TP-1.

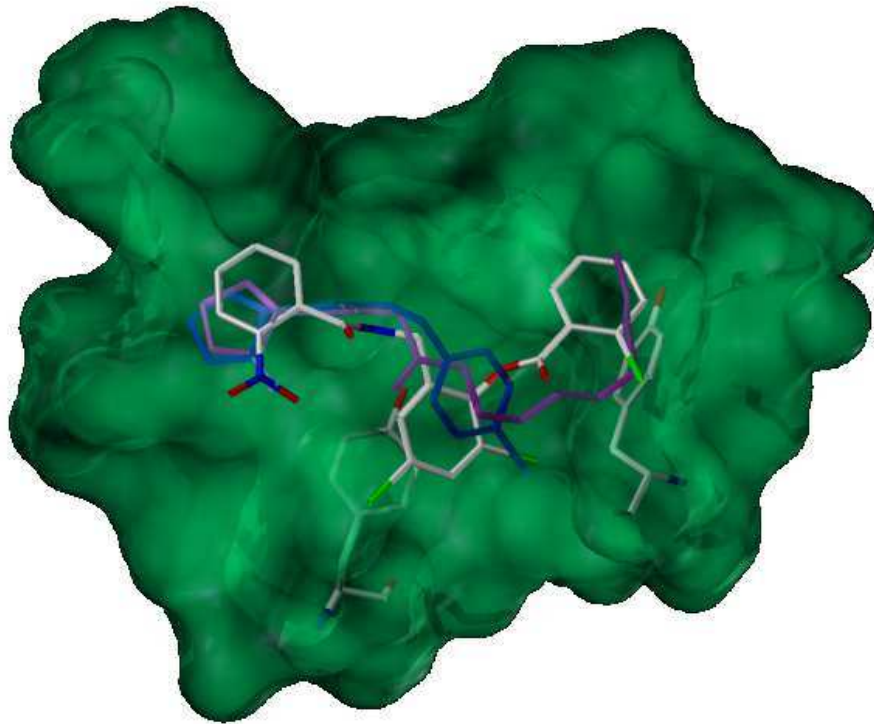


Figura 10. Alineamiento de los ligandos agonistas (El autoinductor nativo en violeta y TP-1 en blanco) y el antagonista (ligando 8, en azul) en el sitio activo de *LasR*.

Si comparamos el ligando nativo con TP-1 de color blanco, vemos que las interacciones tipo puente de hidrógeno formadas por el ligando nativo, también son formadas por TP-1 [11]. Más adelante se describirán de forma detallada las interacciones existentes entre TP-1 y *LasR*. Por último comparemos la pose tomada por el ligando 8 de color azul y las poses de los agonistas anteriores, el ligando 8 presenta las interacciones típicas del reconocimiento molecular, los puentes de hidrógeno formados entre la región A y los residuos Tyr-56, Trp-60, Asp-73 y Ser-129, además tiene un anillo fenil que se orienta de forma similar a uno de los anillos del ligando TP-1, formando también algunas de las interacciones que están presentes en TP-1, pero como se puede observar en la Figura 9, el ligando 8 no puede establecer las interacciones hidrofóbicas con los residuos del bolsillo, debido a sus limitaciones estructurales, no puede ocupar el volumen existente en el bolsillo hidrofóbico presente en el sitio activo de *LasR*, por tal motivo no puede estabilizar el plegamiento del receptor *LasR*, por lo anterior podemos decir que la

actividad antagonista de estos 19 análogos se debe a la incapacidad estructural que ellos poseen para establecer interacciones que estabilicen el plegamiento del receptor.

4.2 Cálculos *ONIOM*

En general, los inhibidores dockeados se acomodaron en la posición correcta dentro el sitio de unión de *LasR*, y ellos establecieron todas las interacciones reportadas previamente [6]. Con el fin de comparar el rendimiento entre las energías *ONIOM* y las energías de las funciones de evaluación dadas por *AutoDock*, graficamos las energías libre de *AutoDock* contra el logaritmo de los valores de IC_{50} , en un intento por encontrar un modelo de correlación. De igual manera graficamos las energías obtenidas por el método *ONIOM* contra el logaritmo de los valores de IC_{50} reportados para este grupo de compuestos.

Para el primer caso, se encontró una correlación muy pobre entre estas dos variables, obteniéndose un coeficiente de correlación $r = -0.577$ ($r^2=0.333$). En la Tabla 2 se muestran los valores de IC_{50} y las energías libres de *AutoDock* para los 19 ligandos, estos valores fueron graficados como se muestra en la Figura 11. El coeficiente de correlación cuadrado encontrado, solo es capaz de explicar el 33.3 % de la varianza para estas dos variables, esto es un indicativo que la función de evaluación no explica de manera muy satisfactoria la relación existente entre el valor del IC_{50} y las energías libre de unión, calculadas para este tipo de compuestos. Además los valores de energía de los estudios de *docking* no hacen una clara distinción entre los compuestos mas activo de aquellos de mediana potencia, por lo tanto es necesario que esta importante característica sea explicada por cualquier función de evaluación.

Tabla 2. Compuestos con actividad anti-quórum sensing.

Sus valores de IC_{50} y la energía libre del *docking*

Compuestos	IC_{50}	Energía de Autodock
1	1.72	-9.1
2	4.63	-9.44
4	0.61	-9.53
6	4.67	-8.02
8	0.34	-9.0
E16	7.8	-8.16
E20	4.7	-8.6
E21	2.1	-8.48
E22	2.0	-9.06
E26	4.3	-8.8
E27	8.9	-8.71
E28	6.8	-8.55
E29	12	-8.19
E30	2.2	-9.12
E31	3.3	-8.91
E33	1.8	-9.49
E37	3.0	-8.2
E38	3.4	-8.49
E39	3.4	-8.72

Para resolver el problema planteado anteriormente, procedimos a aplicar el método *ONIOM* a cada una de las estructuras acopladas obtenidas con el protocolo de *docking*, para tratar de encontrar una correlación entre los valores de IC_{50} determinados experimentalmente y la energía de unión calculada por el método *ONIOM*. En la Tabla 2 es presentada la energía total ΔE_{ONIOM3} y sus componentes.

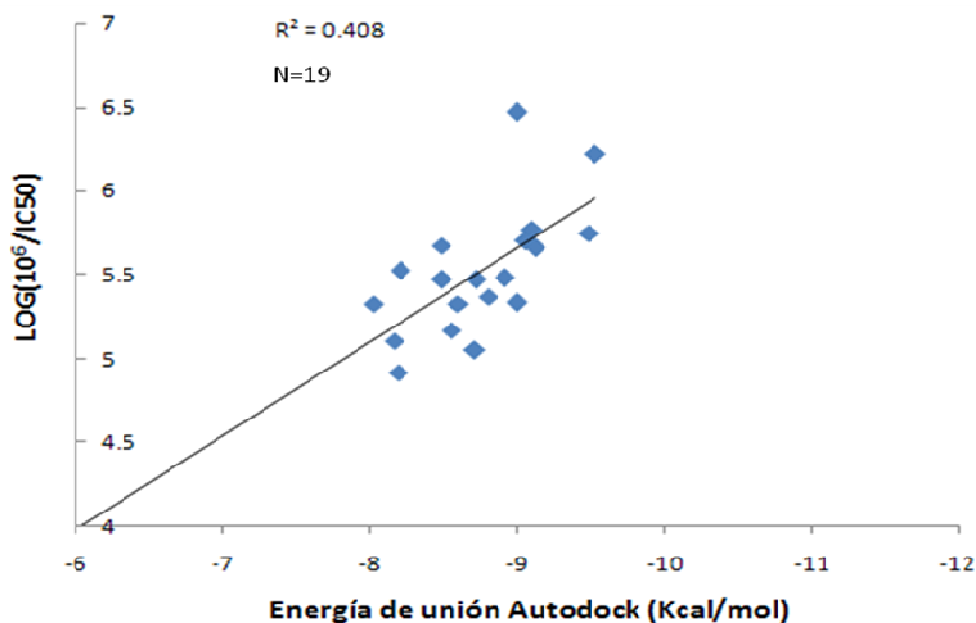


Figura11. Energía libre de unión de *AutoDock* contra la actividad biológica representada como $\log(10^6/IC50)$

Con el fin de analizar la importancia de los subsistemas previamente definidos sobre la energía de unión de *ONIOM* total. Esta fue dividida en tres diferentes contribuciones como sigue:

$$\Delta E^{ONIOM3} = \Delta E [\text{Nivel Alto, I}] + \Delta E [\text{Nivel Medio, II}] + \Delta E [\text{Nivel Bajo, III}] - \Delta E [\text{Nivel Medio, I}] - \Delta E [\text{Nivel Bajo, II}]$$

$$\Delta E^{ONIOM3} = \Delta E [\text{Nivel Alto, I}] + \Delta \Delta E [\text{Nivel Medio, II - I}] + \Delta \Delta E [\text{Nivel Bajo, III - II}]$$

Aquí ΔE [N. Alto, I] es la energía de interacción de puentes de hidrógeno evaluada a un nivel de cálculo alto, $\Delta \Delta E$ (N. Medio, II-I) es la energía de interacción entre las regiones I y II evaluada a un nivel de cálculo medio; y $\Delta \Delta E$ (N. bajo, III-II) es la interacción entre las regiones II y III evaluadas a un nivel de teoría bajo. Estas regiones son descritas en la metodología.

Para el ligando mas activo, el ligando 8, el calculo de la energía ONIOM3 (UX3LYP/DGDZVP: HF/3-21G: PM3) es ΔE [N. Alto, I] = -48.7394117, $\Delta\Delta E$ [N. Medio, II - I] = 8.56061597 y $\Delta\Delta E$ [N. Bajo, III - II]= 3.29970217. De esta manera observamos que: el cálculo realizado a un nivel de teoría alto es muy favorable, mientras los cálculos realizados a un nivel de cálculo medio y bajo son desfavorables energéticamente hablando. Como se puede observar en la Tabla 3

Tabla 3. Valores de IC50 y componentes de energía ONIOM para los compuestos estudiados

Compuesto	IC50 (μM)	Componentes de la energía en el método ONIOM (Kcal/mol)			
		ΔE^{ONIOM}	ΔE^{ONIOM} (Nivel alto, I)	ΔE^{ONIOM} (Nivel medio, II-I)	ΔE^{ONIOM} (Nivel Bajo, III-II)
1	1.72	-30.5026235	-49.6247207	8.82015645	10.3019407
2	4.63	-28.3536144	-39.2609412	9.67293824	1.23438858
4	0.61	-39.3914487	-52.694195	6.58719614	6.71555009
6	4.67	-20.1239282	-46.1937483	11.6549292	14.4148909
8	0.34	-36.8790936	-48.7394117	8.56061597	3.29970217
E16	7.8	-28.9572228	-41.6015332	10.2835427	2.3607677
E20	4.7	-28.703044	-41.2585362	9.85726417	2.69822731
E21	2.1	-31.5377224	-43.561321	10.3451661	1.67843321
E22	2.0	-28.9449725	-53.445014	10.2943955	14.2056466
E26	4.3	-23.6129142	-31.408547	8.52421978	-0.72858697
E27	8.9	-24.0415654	-33.35446	10.2641364	-0.95124181
E28	6.8	-27.0149091	-35.6951654	10.5155506	-1.83529367
E29	12	-21.937948	-32.0133195	10.2724107	-0.19703927
E30	2.2	-31.6258921	-43.6838243	8.90237088	3.1555607
E31	3.3	-22.9752201	-34.1458506	9.49196887	1.67866099
E33	1.8	-32.7493399	-43.5456847	6.7481624	4.04818183
E37	3	-29.4244391	-41.2626589	7.31908319	4.51913657
E38	3.4	-26.4244391	-38.2626589	7.31908319	4.51913657
E39	3.4	-27.955128	-29.3525775	6.37639119	-4.97894173

Al analizar los ligandos 8, E29 y E30, encontramos que la energía ΔE^{ONIOM} (Nivel medio, II-I) para cada uno de estos ligandos, explica la tendencia encontrada en ellos en lo relacionado con la polarizabilidad del halógeno presente. Los valores de ΔE^{ONIOM} (Nivel medio, II-I), para los ligandos E29, E30 y 8, son 10.2724107 Kcal/mol, 8.90237088Kcal/mol y 8.56061597 Kcal/mol, respectivamente. Como fue explicado anteriormente, la gran electronegatividad del flúor y su tamaño atómico, son responsables de su capacidad para mantener y sustraer densidad electrónica, dicha densidad electrónica entraría en repulsión con la densidad electrónica presente en el oxígeno del carbonilo presente en Tyr-47, esta repulsión se ve reflejada en el valor de energía reportado por la región ΔE^{ONIOM} (Nivel medio, II-I). Por su parte el ligando por poseer el átomo de bromo como sustituyente en su anillo aromático, presenta una energía menor, lo cual se explica por la tendencia del átomo a ser polarizable.

Por otro lado los valores presentados por la energía de *ONIOM3*, también explican dicha tendencia encontrada en estos tres ligandos siendo la energía del ligando 8 < ligando E30 < ligando E29. En la Figura 12 se muestra el gráfico de regresión para el log de los valores de IC50 experimentales versus la energía calculada ΔE^{ONIOM3} , indicando que los modos de unión predichos y las energías de *ONIOM* estimadas son fiables, el valor del coeficiente de correlación, $r = -0.81$ ($r^2 = 0.663$), indica que este método puede explicar el 66.6% de la varianza de todos los datos presentes.

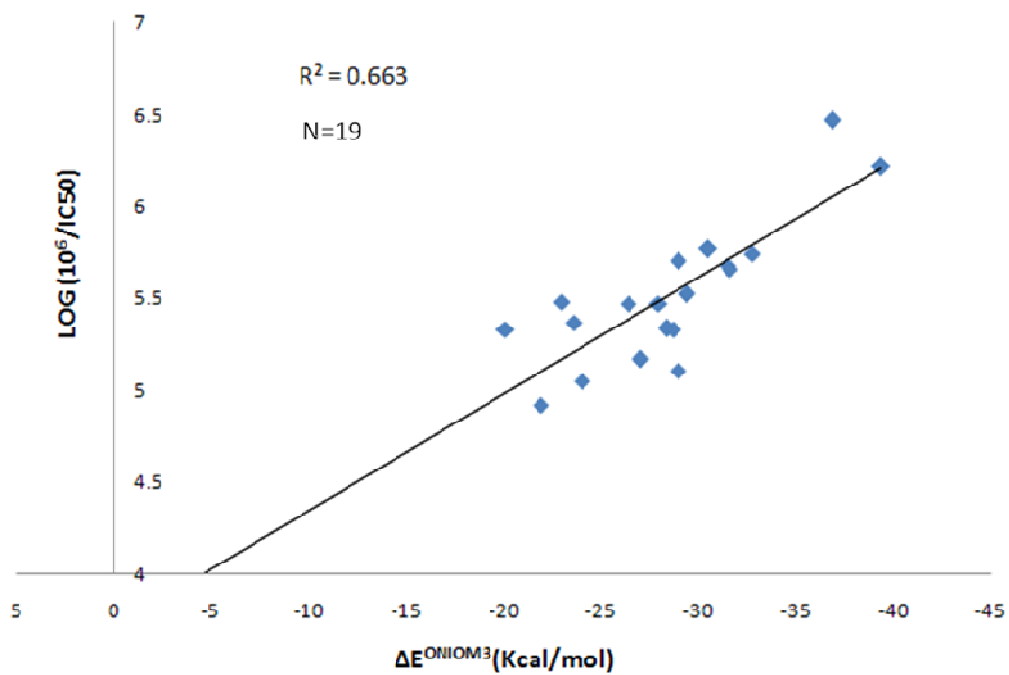


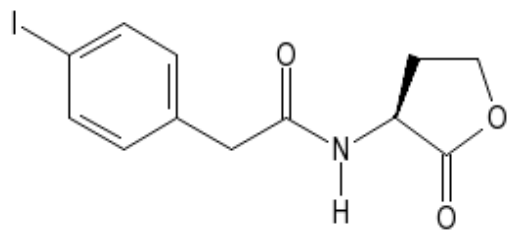
Figura12. Energía de *ONIOM3* contra la actividad biológica representada como $\log(10^6/\text{IC50})$

4.3 REFERENCIAS

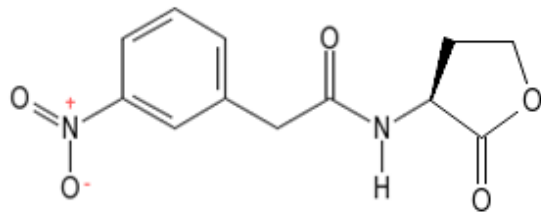
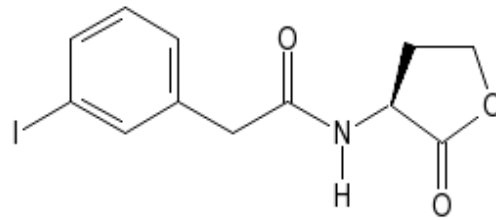
1. Namasivayam, V.; Gunther, R. *Chem. Biol. Drug Des.* (2007) 70 (6), 475–484.
2. Kellenberger, E.; Rodrigo, J.; Muller, P.; Rognan, D. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* (2004) 57 (2), 225–242.
3. Warren, G. L.; Andrews, C. W.; Capelli, A. M.; Clarke, B.; LaLonde, J.; Lambert, M. H.; Lindvall, M.; Nevins, N.; Semus, S. F.; Senger, S.; Tedesco, G.; Wall, I. D.; Woolven, J. M.; Peishoff, C. E.; Head, M. S. *J. Med. Chem.* (2006) 49, 5912–5931
4. Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S. and Olson, A. J. *J. Comput. Chem.* (2009) 30, 2785–2791
5. Bottomley, M.J.; Muraglia, E.; Bazzo, R., and Carfi, A. *J. Biol. Chem.* (2007) 282, 13592–13600.
6. Ahumado, M.; Diaz, A.; Vivas, R. *European Journal of Medicinal Chemistry* (2010) 45, 608–615.
7. Geske, G. D.; O’Neill, J. C.; Miller, D. M.; Mattmann, M. E.; Blackwell, H. E. *J. Am. Chem. Soc.* (2007) 129, 13613–13625.
8. Auffinger, P.; Hays, F.A.; Westhof, E.; and Ho, P.S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2004) 101, 16789–16794.
9. Foster, R. (1969) *Organic Charge-Transfer Complexes* (Academic, London).
10. Metrangolo, P. and Resnati, G. *Chem. Eur. J.* (2001)7, 2511–2519.
11. Nair, S. K.; Zou, Y. *Chemistry & Biology* (2009)16, 961–970.

ANEXOS

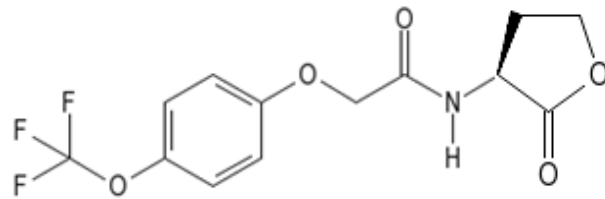
Anexo 1. Estructura de los analogos de las acil homosina lactonas



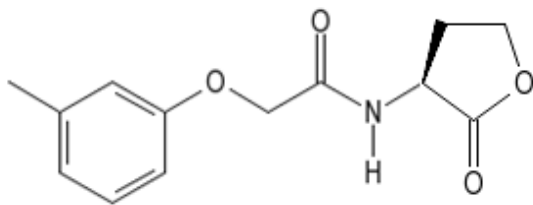
1 2



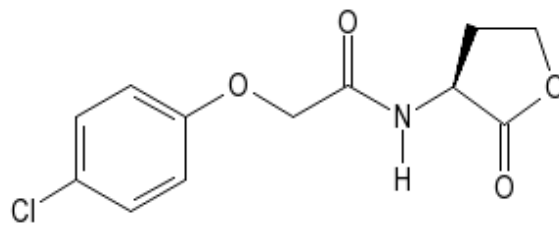
4



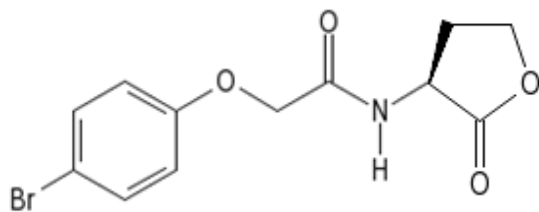
6



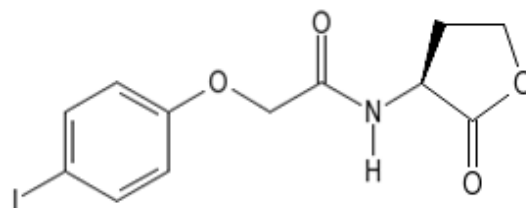
E16



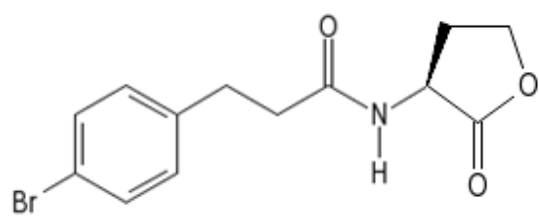
E20



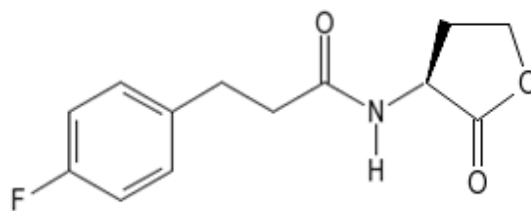
E21



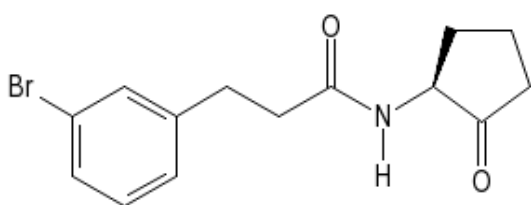
E22



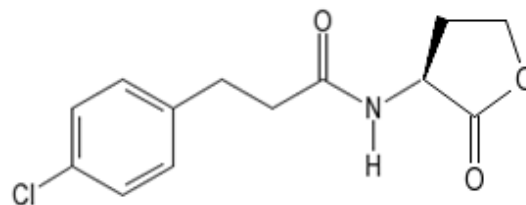
8



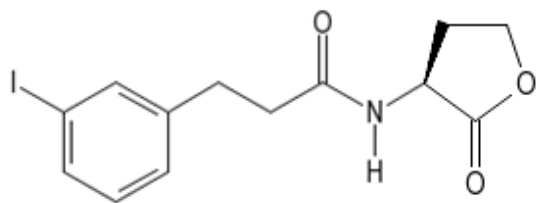
E29



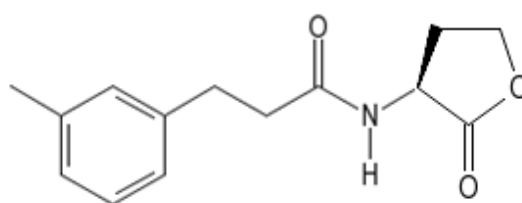
E30



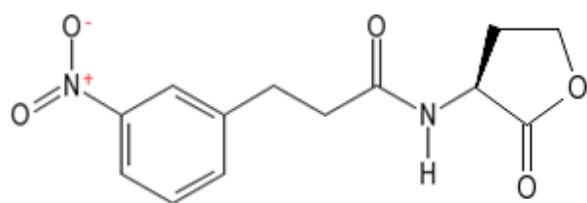
E31



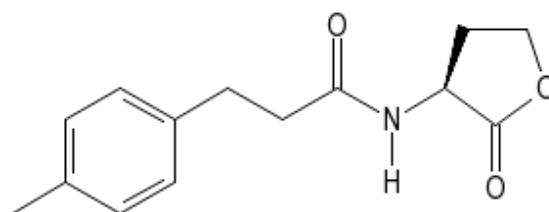
E33



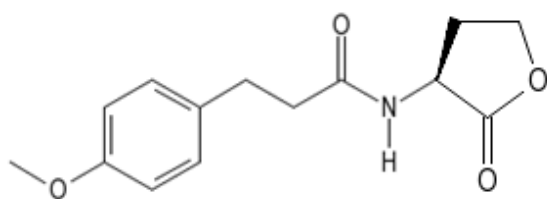
E27



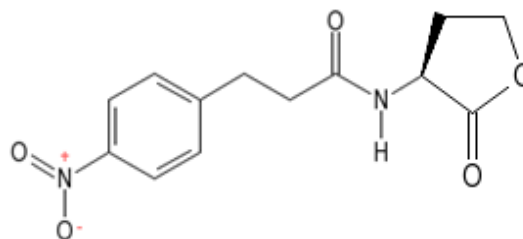
E38



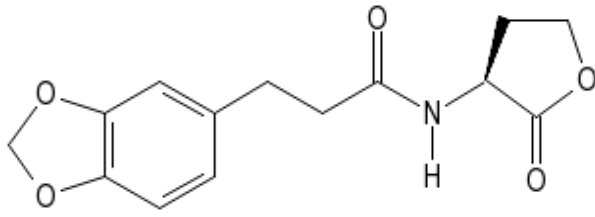
E26



E28

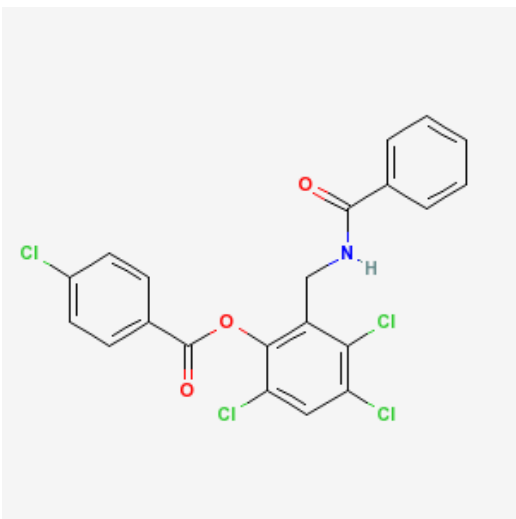
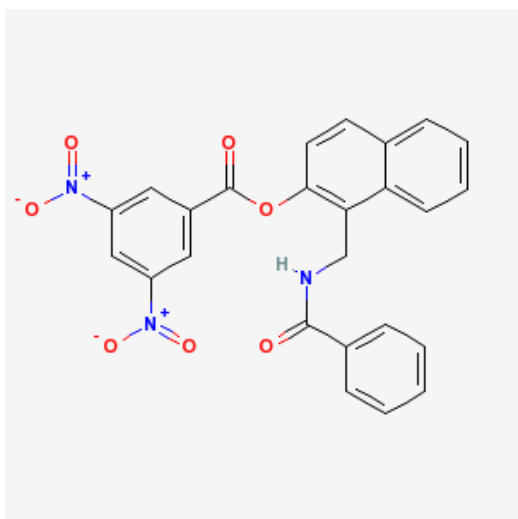
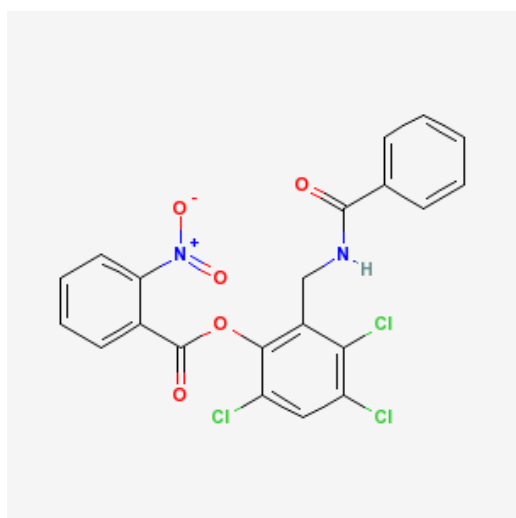
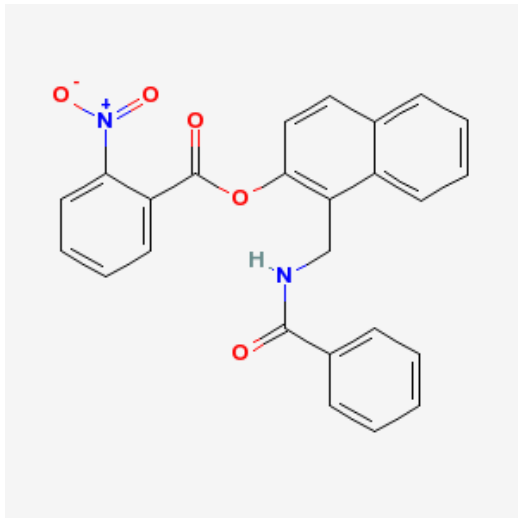
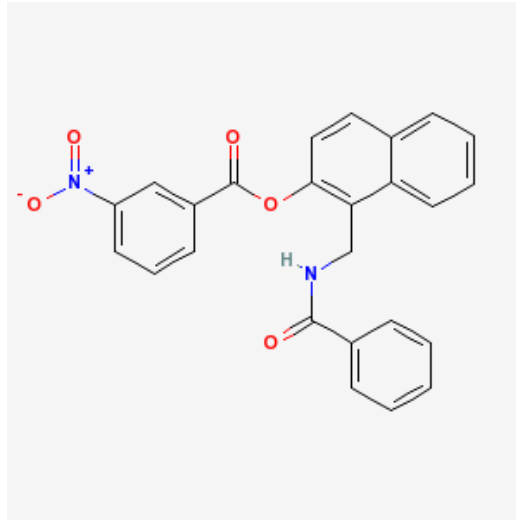
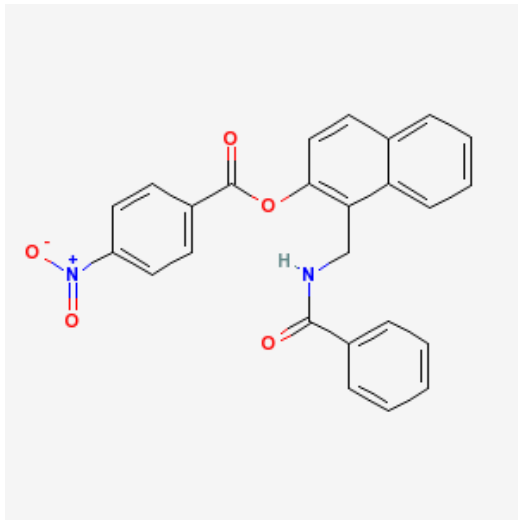


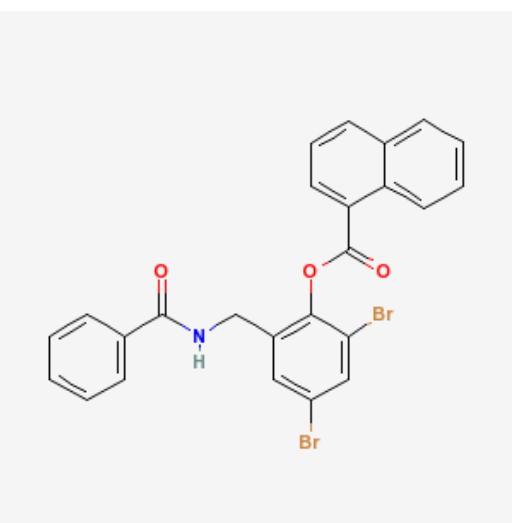
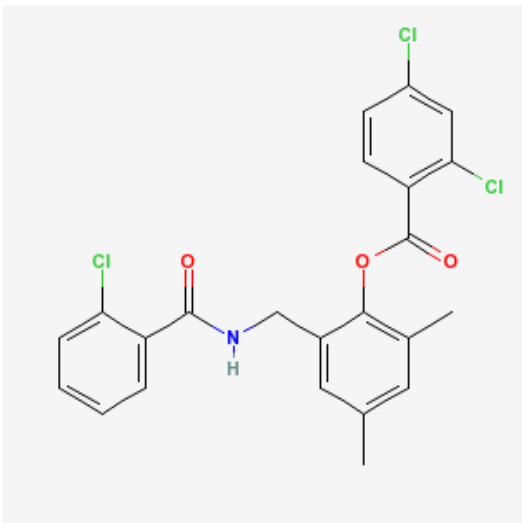
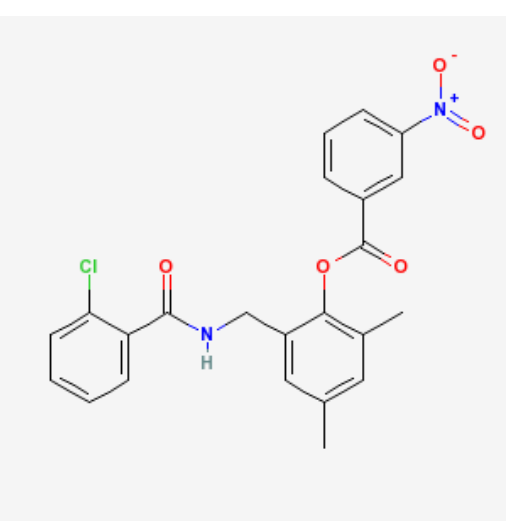
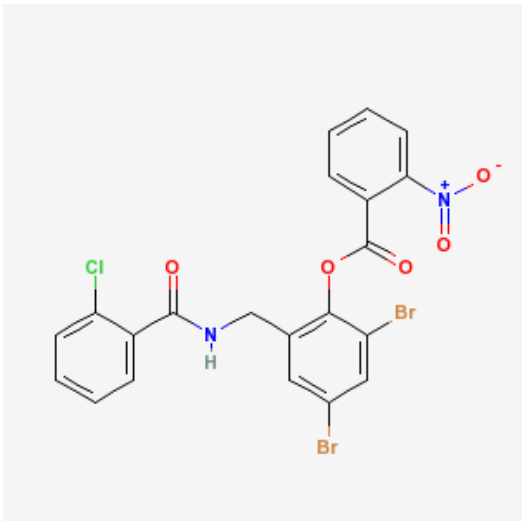
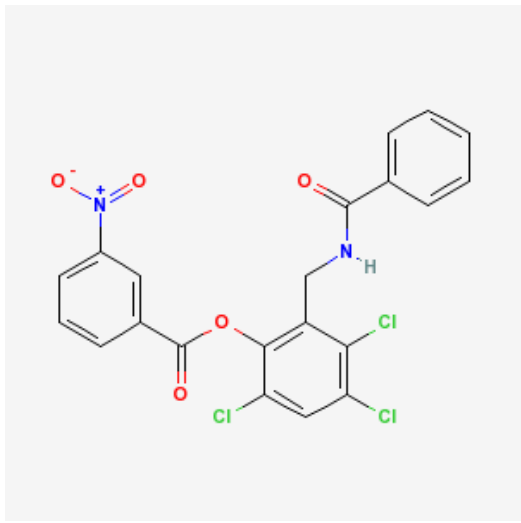
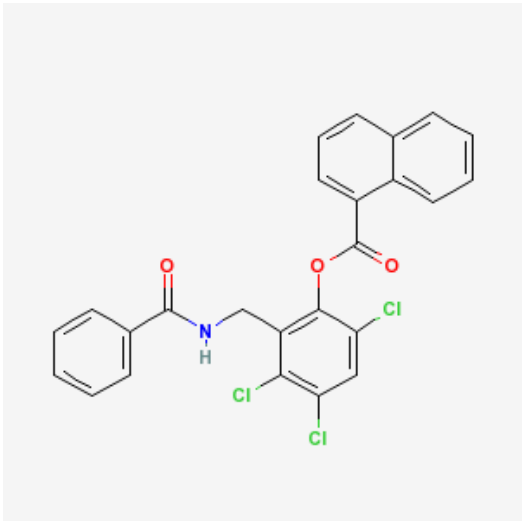
E37

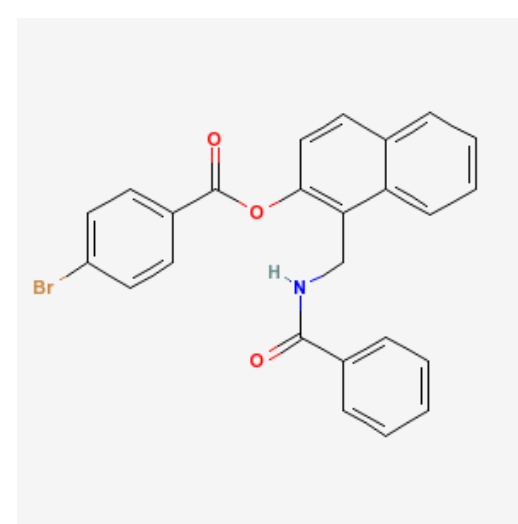
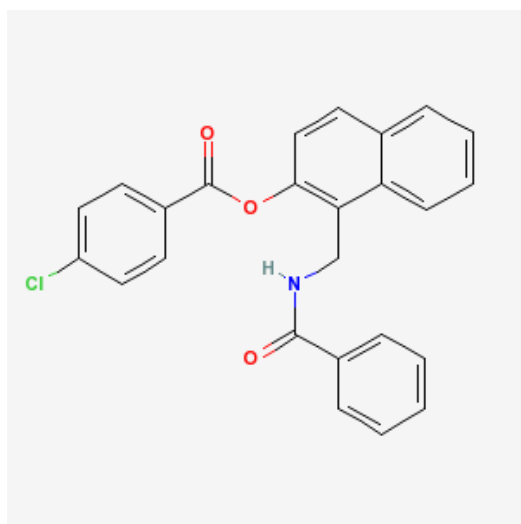
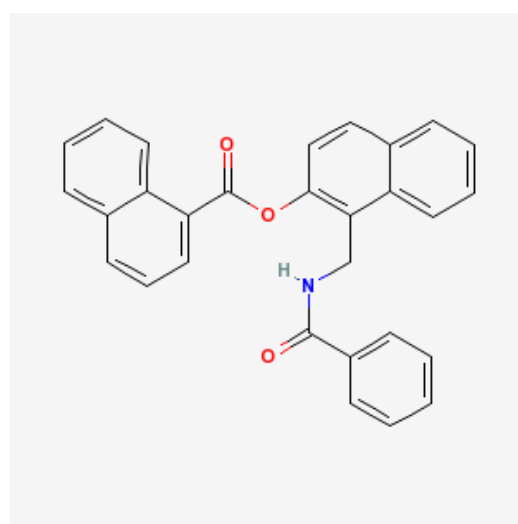
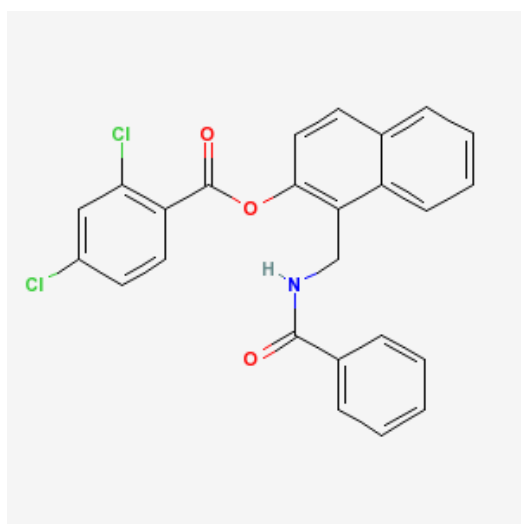


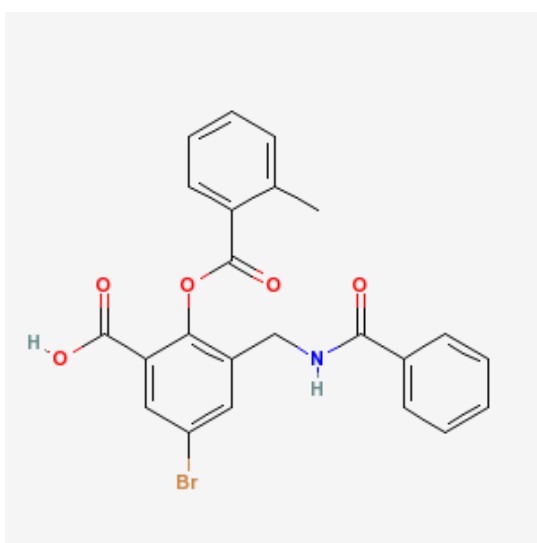
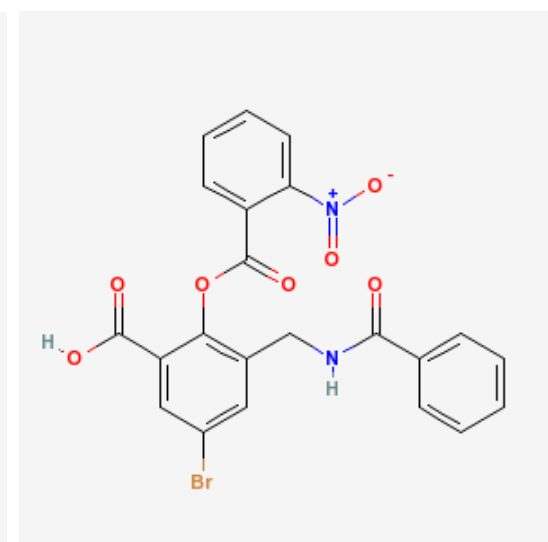
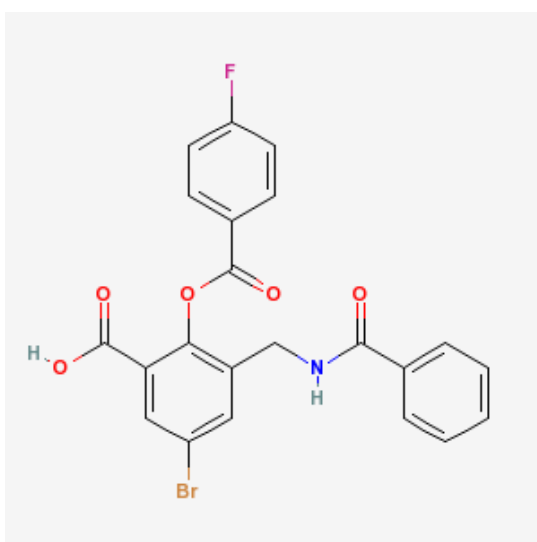
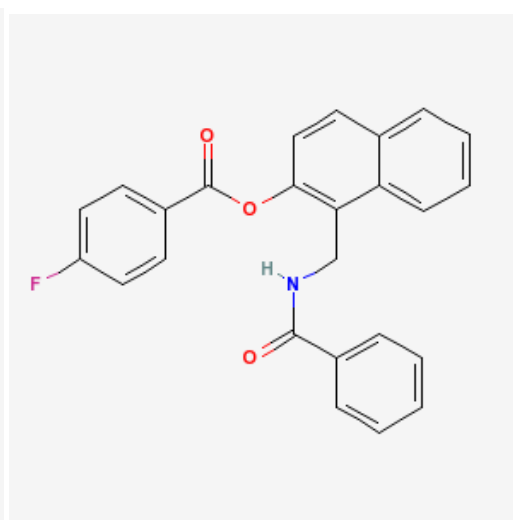
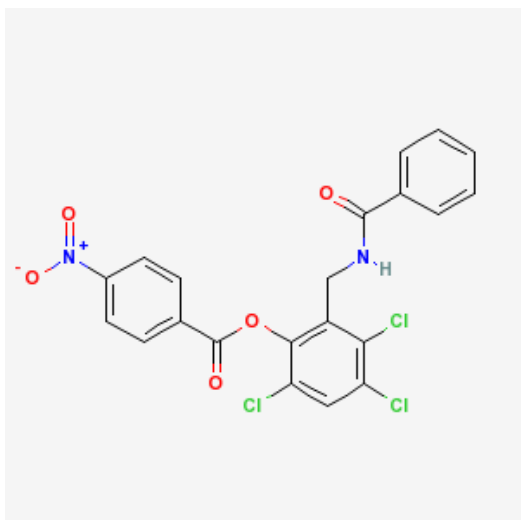
E39

Anexo 2. Estructura de los hits identificados por el modelo farmacofórico numero dos

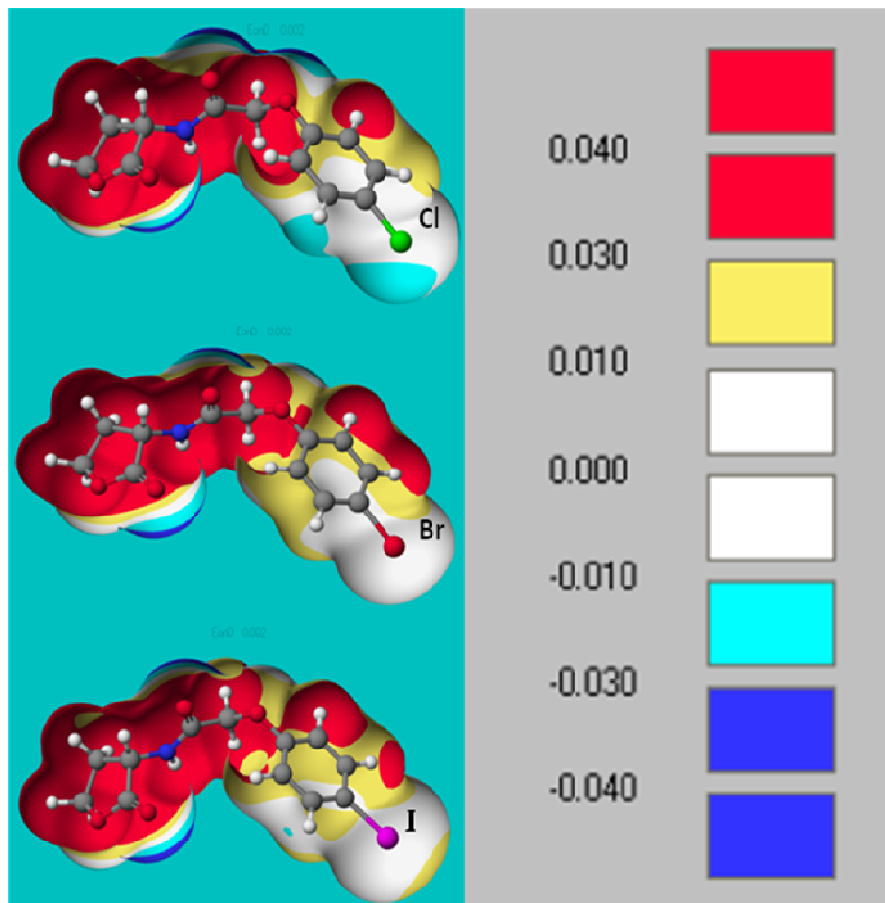






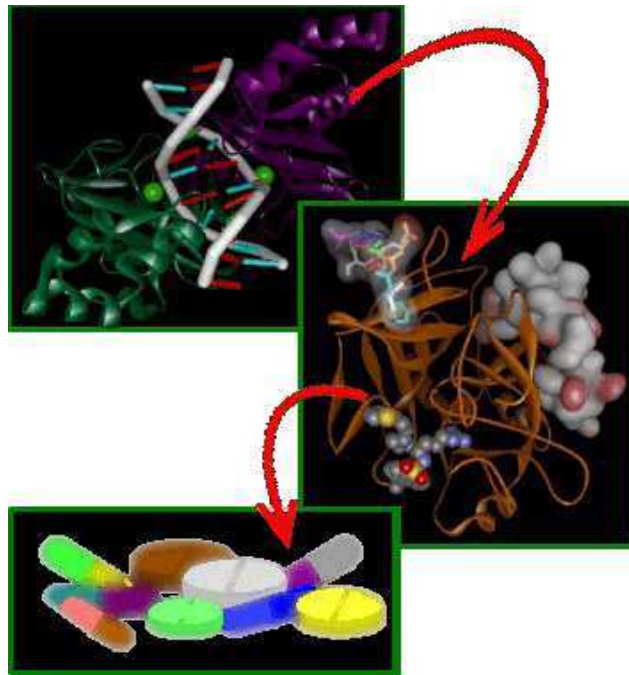


Anexo3. Superficie de potencial electrostático, basados en la densidad electrónica y los radios de Van der Waals.



CAPITULO VI

CONCLUSIONES



“De cuando en cuando los sabios cometen errores, a partir de estos se perfeccionan, avanzando cada vez más en su sabiduría. Esto a su vez es utilizado como pasto por los intelectualoides quienes a partir de esos errores se convierten en detractores más acérrimos, perfeccionándose y avanzando más en su ignorancia”

Juan Carlos Drosos

6. CONCLUSIONES

El fenómeno del *quórum sensing*, generalmente responsable de la vida en comunidad en las bacterias, y de una gran parte de sus comportamientos, es el objetivo número uno en la actualidad, para el desarrollo de terapias antimicrobiana. El propósito de la investigación en este campo ha sido demostrar que existen alternativas para la generación de nuevas ideas, que permitan fortalecer o cambiar el modo tradicional de combatir las infecciones bacterianas. El conocimiento de los mecanismos moleculares, la bioquímica y la química supramolecular, que subyacen a estos sistemas de señalización son la base para la generación de estrategias racionales hacia el diseño nuevos compuestos con capacidad de modular el fenómeno del *quórum sensing* en bacterias gram negativas.

La aplicación de la química computacional a este problema en particular, es de vital importancia debido a la variedad de estrategias que ella posee para analizar el mismo problema desde distintos ángulos. En nuestro caso en particular, estudiamos las interacciones proteína-ligando y las características necesarias para que un ligando sea considerado posible agonista del *quórum sensing*.

Encontramos que los 19 análogos de las 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 cocrystalizado. Como resultado los 19 análogos forman las interacciones tipo puentes de hidrógenos presentes en el ligando nativo. Por otro lado la región B, toma orientaciones muy similares en todos los ligandos, pero muy diferente a la tomada por la región B del ligando nativo. El análisis de la región B de los 19 análogos permitió emitir las siguientes conclusiones:

1. Se encontró que el ligando 4, posee una interacciones extras con los aminoácidos Triptófano-60 y Arginina-61, además la conformación tomada por dicho ligando le permite la posible formación de una interacción π - π , con Tirosina 64, siendo esto la posible explicación de su capacidad antagonista. En los ligandos 1 y 2, isómeros de posición, se encontró que la sustitución de un mismo sustituyente, en la posición 4 del anillo, aumenta considerablemente su actividad. La mejor orientación y distancia existente entre el yodo en la posición 4 del anillo genera una mejor interacción entre el yodo y el oxígeno del grupo carbonilo de tirosina 47. Siendo esto la razón de su mejor IC_{50} . Esta tendencia se encontró en todos los isómeros de posición presentes en los 19 análogos.
2. La conformación tomada por los análogos 8, E29 y E30, le permiten formar a su halógeno (F, Cl o Br) una interacción con el oxígeno del grupo carbonilo de Tirosina-47, dicha interacción depende de dos factores, la dirección y la distancia. En todas las conformaciones estos factores son muy parecidos, por tal motivo, los diferentes valores de IC_{50} están relacionados con las distintas propiedades de los halógenos. Los estudios de superficie de potencial electrostático efectuados en estos tres ligandos muestran la poca polarizabilidad del flúor, esto se debe a su gran electronegatividad y su tamaño atómico, mientras en el caso del bromo es menos electronegativo y su radio atómico es mas grande, lo cual se refleja es su tendencia a ser polarizable, esta característica le permite formar interacciones con Tirosina-47, mas fuertes a las formadas por el cloro y mucho mas fuertes a las formadas por el flúor. Por lo anterior se considera la interacción con Tirosina-47 un objetivo para estudios posteriores.
3. Los estudios de superficie de potencial electrostático efectuados en estos tres ligandos muestran que la presencia del oxígeno en la región B de los análogos que pertenecen al grupo POHL, compromete la aromaticidad del anillo de estos ligandos, por lo tanto la interacción π - π con tirosina 64 es muy débil, esto

posiblemente sea la explicación de los bajos valores de IC50 comparados con los compuestos 8 y E30 del grupo PPHL.

4. La capacidad inhibitoria de los análogos de las acil homoserina lactonas se debe principalmente a dos aspectos en su estructura química, uno, los grupos presentes en la región A, la homoserina lactona, los cuales les permiten sean reconocidos por el receptor para comenzar su plegamiento y dos, la incapacidad que posee la región B de estos análogos para suplir los requerimientos estructurales y las interacciones necesarias para el correcto plegamiento de LasR.
5. La energía de interacción obtenida del protocolo ONIOM, distingue en una forma correcta los compuestos más activos de los menos activos y permite entender las contribuciones energéticas más importantes en las interacciones proteína-ligando. Por lo tanto el método ONIOM puede ser aplicado a este tipo de complejos a niveles de cálculos más altos para predecir otras propiedades relacionadas con estos compuestos y su actividad.
6. En general el protocolo de docking utilizado es adecuado, debido a que al validar la pose del ligando cocrystalizado, el programa reproduce la pose de forma adecuada. Lo anterior es una razón válida para utilizar AutoDock 4.2, como programa para trabajar los acoplamientos existentes entre este tipo de ligandos y los receptores transcripcionales que pertenecen a la familia de proteínas tipo LuxR.

En la segunda etapa de este trabajo diseñamos dos modelos farmacofóricos con la meta de utilizarlos como filtro en una base de datos conformacional, creada y ajustada a nuestras necesidades. El modelo farmacofórico basado en el alineamiento de los compuestos más activos fue mejor debido a su capacidad para descartar a los compuestos que no poseían las características estructurales y químicas necesarias para ser considerado un posible *hit*. Este modelo nos permitió identificar 22 posibles *hits*, fueron

utilizados en posteriores cálculos de docking. Por lo tanto puede ser utilizado en trabajos posteriores para realizar un análisis prospectivo e identificar nuevos compuestos con posible actividad agonista.

Los resultados del docking nos permiten afirmar que los compuestos identificados como *hits* por el modelo farmacofórico 2, pueden ser considerados posibles candidatos para análisis computacionales mas costosos y además se puede evaluar la posibilidad de rutas de síntesis, teniendo en cuenta la similaridad estructural que presentan estos compuestos con los trifenilos, siendo esto una alternativa para encontrar nuevos compuestos con actividad agonista.

Perspectivas futuras

El objetivo de toda investigación es generar un conocimiento que ayude a generar ideas para solucionar problemas comunes para todos.

Dado el gran número de bacterias que emplean los sistemas de comunicación del quórum sensing, y que generalmente todas utilizan las acil homoserina lactonas como molécula señal, seguir realizando investigaciones en esta área en particular de las ciencias, con restricciones cada vez mayores nos permitirán en algún momento dado realizar prueba con algunos receptores y posteriormente inferir sobre los demás receptores de esta familia de proteínas. Cada antagonista tiene un espectro estrecho, y, por lo tanto, los antagonistas específicos tienen que ser desarrollados para cada organismo. Esto podría, sin embargo, resultar ventajoso en algunos escenarios. Por ejemplo, en teoría, sería posible atenuar un único organismo patógeno que vive en una población mixta de la flora bacteriana habitual por un inhibidor específico, cuando el resto de la población bacteriana no resulte afectada.