

Mtra. María Elena Contreras Garfias
Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud
PRESENTE

Por este medio le informo del término del Servicio Social, cuyos datos son los siguientes :

Fecha de Recepción	Día	Mes	Año	Fecha de Aprobación	Día	Mes	Año
--------------------	-----	-----	-----	---------------------	-----	-----	-----

Datos del Alumno

Nombre : David Flores Vázquez	
Matrícula : 2163024951	Licenciatura : Química Farmacéutica Biológica
Domicilio : Tlacomulco # 12 Tepepan, Xochimilco. Ciudad de México. C.P. 16020	
Teléfono : 5559168852	Celular : 5520776286
Correo Electrónico : 2163024951@alumnos.xoc.uam.mx	CURP : FOVD960521HDFLZV08

Datos del Proyecto

Nombre del Proyecto :	Búsqueda de compuestos con potencial efecto antimicrobiano empleando acoplamiento moléculas sobre ADN girasa.						
Lugar donde se realizó el Servicio Social :	UAM-Xochimilco, Edificio N (UIDIS), Laboratorio De Síntesis y Aislamiento De Sustancias Bioactivas						
Dependencia :	Universidad Autónoma Metropolitana						
Entidad Federativa :	Distrito Federal						
Municipio :	Coyoacán			Localidad :	Villa Quietud		
Fecha de Inicio	Día	Mes	Año	Fecha de Término	Día	Mes	Año
	1	4	2021		30	9	2021

PARA SER LLENADO POR LOS ASESORES

Sector:	1.- Educativo	Tipo:	2.- Interno
Orientación:	8.- Salud, Alimentación Y Nutrición		

FIRMAS

Dr. Jaime Pérez Villanueva, 35386

Asesor Interno
Nombre, firma y No. Económico

Dra. Karen Rodríguez Villar, 40478

Asesor Externo
Nombre, firma y No. Económico



David F.V.

David Flores Vázquez

Alumno
Nombre, firma

Vo. Bo. de la Comisión
Nombre y firma de la persona que autoriza



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco

Ciudad de México, 30 de enero de 2023

DR. LUIS A. AYALA PÉREZ
DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Presente

Por este medio me permito informarle que después de revisar el documento titulado "*Búsqueda de compuestos con potencial efecto antimicrobiano empleando acoplamiento molecular sobre ADN girasa*", desarrollado por el alumno **David Flores Vázquez** con número de matrícula **2163024951** como proyecto de Servicio Social en modalidad remota, bajo la dirección del Dra. Karen Rodríguez Villar y su servidor, del **01/04/2021** al **30/09/2021**, consideramos que reúne los requisitos para ser presentado como informe final.

Por lo anterior le solicito atentamente que se inicien los trámites para acreditar el cumplimiento del Servicio Social.

Sin más por el momento, agradecemos su atención y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente

Dr. Jaime Pérez Villanueva
Número económico **35386**
Departamento de Sistemas Biológicos

Dra. Karen Rodríguez Villar
Número económico **40478**
Departamento de Sistemas Biológicos



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS
LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

INFORME DE ACTIVIDADES DEL SERVICIO SOCIAL

“Búsqueda de compuestos con potencial efecto antimicrobiano empleando
acoplamiento molecular sobre ADN girasa”

Proyecto Genérico

Obtención de materias primas, principios activos, medicamentos y productos biológicos

Alumno: David Flores Vázquez

Matrícula: 2163024951

Asesor interno: Dr. Jaime Pérez Villanueva

Escriba el texto aquí

Asesor externo: Dra. Karen Rodríguez Villar

Lugar de realización: Vía remota vinculado al Laboratorio de Síntesis y Aislamiento de
Sustancias Bioactivas (N015) del Departamento de Sistemas Biológicos

Enero 2023

RESUMEN

La resistencia bacteriana es un problema creciente caracterizado por la rapidez de los microorganismos para adaptarse a un fármaco antimicrobiano al que eran susceptibles, dificultando el tratamiento e incrementando el riesgo de propagación de enfermedades. Durante los últimos años se han buscado antimicrobianos que posean un amplio espectro de efecto rápido y prolongado con baja o nula toxicidad, por lo que se han explorado diferentes dianas terapéuticas. Se sabe que las fluoroquinolonas son capaces de causar la inhibición de la ADN girasa, así como de la topoisomerasa IV que son un complejo de enzimas relacionadas con la síntesis y la reparación de ADN bacteriano. Hoy en día no se tiene reporte de resistencia para estas dianas, por ello son consideradas blancos terapéuticos prometedores para el desarrollo de nuevos antimicrobianos.

El presente trabajo pretende encontrar inhibidores de topoisomerasas bacterianas a través del cribado virtual por acoplamiento molecular de 208 compuestos de la quimioteca N015 y 10 nuevas moléculas diseñadas por combinación de grupos funcionales, con la ayuda de tres programas distintos de acoplamiento molecular: Autodock vina, Autodock 4.2 y GOLD. De acuerdo con los resultados se encontraron 20 compuestos de la quimioteca N015 con potencial actividad para la inhibición de topoisomerasa, además las moléculas propuestas obtuvieron mejores resultados en comparación con el ligando reportado (1YM), destacado el compuesto MP5.

Palabras clave: *resistencia bacteriana, antimicrobianos, ADN girasa, acoplamiento moléculas, cribado virtual.*

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Guillermina Vázquez y Fernando Flores por todo el amor y apoyo brindado durante toda mi vida, por toda la confianza que me dieron, por estar conmigo en mis momentos más felices y estar aún más presentes en los más difíciles. Por el ánimo dado durante este trabajo y durante toda mi vida, nada de esto sería posible sin ellos.

A la doctora Karen Rodríguez Villar y al doctor Jaime Pérez Villanueva por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de investigación, por los conocimientos, por el tiempo y el apoyo brindados para el desarrollo de este proyecto.

A la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco por albergar profesores excelentes que más que hacer de la universidad una escuela la convirtieron en un hogar.

A las personas que me prestaron equipos de cómputo, en especial a Vanesa M. Miranda por el apoyo tanto emocional como dejarme hacer uso de su pc para terminar este proyecto.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	6
2. ANTECEDENTES	7
2.1. Resistencia bacteriana	7
2.2. Impacto de la resistencia microbiana	8
2.3. ADN girasa como blanco farmacológico	9
2.4. Búsqueda de nuevos antimicrobianos usando métodos computacionales	10
2.4.1. Cribado virtual	11
2.4.2. Acoplamiento molecular	12
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
4. OBJETIVOS.....	14
4.1. Objetivo general	14
4.2. Objetivo general	14
5. MATERIAL Y METODOS	15
5.1. Revisión bibliográfica de blancos terapéuticos antibacterianos	15
5.2. Preparación de la proteína y ligandos para acoplamiento molecular	15
5.2.1. Selección y preparación de la proteína	15
5.2.2. Preparación de ligandos.....	15
5.3. Estudios de acoplamiento molecular	15
5.4. Selección de ligandos con potencial efecto sobre ADN girasa	16
5.5. Análisis en PASSonline	17
5.6. Análisis de propiedades fisicoquímicas en SwissADME.....	17
5.7. Diseño de nuevas moléculas con potencial efecto sobre ADN girasa	17
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
6.1. Selección del blanco terapéutico	18
6.2. Preparación de la proteína y ligandos para acoplamiento molecular	19
6.3. Validación del método para estudios de acoplamiento molecular	19
6.4. Cribado virtual de la quimioteca N015.....	20
6.5. Análisis de las interacciones ligando-receptor	22
6.6. Análisis de propiedades fisicoquímicas de los compuestos seleccionados por cribado virtual	23
6.7. Diseño de nuevos inhibidores de ADN girasa.....	26
6.7.1. Estudio de acoplamiento molecular de nuevos inhibidores de ADN girasa.....	27
6.8. Perfil farmacocinético de las moléculas propuestas	28
7. CONCLUSIONES.....	30
8. REFERENCIAS.....	31
9. Anexo I.....	33

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la ADN girasa que consta de dos subunidades, GyrB y GyrA.	9
Figura 2. Objetivos centrales del DiFAC.	11
Figura 3. Metodología general de un cribado virtual.	11
Figura 4. Ligante 1YM cristalizado (verde) dentro de la subunidad B de la ADN girasa.	18
Figura 5. Gráficos de Ramachangran.	19
Figura 6. Moléculas seleccionadas del cribado virtual de la quimioteca N015	22
Figura 7. Diagrama de interacción ligando-proteína para el ligando cristalizado y V5027.	23
Figura 8. Diagrama de huevo hervido para las 20 moléculas seleccionadas de la quimioteca N015.	24
Figura 9. Moléculas diseñadas como inhibidores de ADN girasa.	26
Figura 10. Diagrama de interacciones en 2D del ligando cristalizado 1YM y MP5	28
Figura 11. Diagrama del huevo hervido para las moléculas propuestas.	29

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Situación global de resistencia microbiana de distintos antimicrobianos	8
Tabla 2. Valores de RMSD y energía de unión observados a diferentes niveles de búsqueda .	20
Tabla 3. Perfiles ADME para los 20 compuestos seleccionados	25
Tabla 4. Resultados del acoplamiento molecular de moléculas MP1–10	27
Tabla 5. Perfil farmacocinético de los compuestos propuestos MP1–10	30

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones atribuibles a organismos resistentes a los antimicrobianos son un grave problema de salud pública por su alta tasa de morbilidad y mortalidad. Tan solo en 2014 se estima que estas infecciones causaron 700 000 muertes a nivel mundial y se espera esta cifra incremente a 10 millones por año para el 2050, dejando pérdidas económicas millonarias.¹

Hoy en día, existen distintos grupos de antimicrobianos con mecanismos de acción igualmente diversos, que pueden inhibir el crecimiento microbiano o provocar la muerte de estos, dependiendo del blanco terapéutico y la dosis.¹ Sin embargo, pocos blancos estudiados no cuentan con reportes de resistencia, tal es el caso de la enzima ADN girasa, el cual representa una oportunidad para continuar desarrollando nuevos fármacos con núcleos diversos, que actúen sobre el mismo sitio de acción.²

Actualmente, la búsqueda de nuevos antibacterianos es un proceso complejo y tardado que involucra múltiples etapas que van desde el descubrimiento hasta la comercialización de un fármaco, por lo que el uso de herramientas computacionales es de gran ayuda para reducir tiempos y costos. El diseño de fármacos asistido por computadora (DIFAC) tiene como propósito ayudarnos a entender la relación entre la estructura química y la actividad biológica, así como las posibles interacciones entre un compuesto y el blanco terapéutico. Además, el DIFAC involucra estrategias que permiten analizar un gran número de moléculas para encontrar candidatos que puedan llevarse a ensayos biológicos.^{3,4}

2. ANTECEDENTES

2.1. Resistencia bacteriana

Los antibióticos son moléculas utilizadas para la prevención y el tratamiento de infecciones causadas por bacterias al inhibir su propagación, o bien provocar su muerte. Estos constituyen un diverso grupo de moléculas con acción específica sobre alguna estructura o función del microorganismo, suelen tener elevada potencia biológica a bajas concentraciones y presentan diferente comportamiento farmacocinético y farmacodinámico asociado a cada grupo.⁵

Por su parte, la resistencia bacteriana o resistencia a los antibióticos es la capacidad de un microorganismo para resistir los efectos de un antibiótico, empleando diversos mecanismos que pueden producirse de manera natural (intrínseca) o adquirida. La resistencia natural es propia de cada familia, especie o grupo bacteriano, por ejemplo, todas las bacterias gram negativas son resistentes a la vancomicina y esta situación no es variable. La resistencia adquirida puede ser obtenida por una cepa de una especie bacteriana particular, siendo una condición aleatoria.⁶ Si bien, la causa original de la resistencia es intrínseca a la evolución bacteriana, es un hecho que el uso indiscriminado incrementa y acelera este proceso.⁷

Los mecanismos de los microorganismos para evitar ser destruidos evolucionan constantemente, adaptándose y modificándose para sobrevivir ante los antibióticos típicos.² Sumado a la capacidad de transmitir esta información a sus descendientes, la resistencia microbiana representa un problema de salud pública, no solo por el elevado número de mecanismos de resistencia generados, sino por el corto tiempo en que surgen.⁸ Hoy en día se reconocen cuatro principales mecanismos para la resistencia a los antimicrobianos:⁹

- a) Alteración de la permeabilidad celular
- b) Modificación de blancos
- c) Modificación enzimática de los antimicrobianos (inactivación) y
- d) Sobreexpresión de bombas de eflujo para su expulsión

En la Tabla 1 se resume la situación global de la resistencia de los diferentes grupos de antimicrobianos más importantes.² Donde destacan algunos blancos que no cuentan con reportes de resistencia, como son los asociados a la síntesis de ácido fólico y síntesis de ADN. Estos blancos representan una oportunidad para continuar desarrollando nuevos fármacos con núcleos diversos que permitan ampliar la disponibilidad de tratamientos.

Tabla 1. Situación global de resistencia microbiana de distintos antimicrobianos

Blanco / Clase estructural	Antimicrobianos	Resistencia	Años hasta aparición de resistencia
Pared celular β-lactámicos	Penicilinas Cefalosporinas Carbapenems Monobactámicos	β-lactamasas	3
Desorganizadores de membrana Polipéptidos	Polimixina Vancomicina	Sustitución de aminoácidos D-Ala-D-Lac o D-Ala-D-Ser	36
Síntesis de proteínas Aminoglucósidos	Estreptomicina Kanamicina	Modificaciones del antimicrobiano	16 12
Rifampicina	Rifampicina		
Nitroimidazole	Metronidazol		
Oxazolidinonas	Linezolid	Desconocido	2
Tetraciclina	Tetraciclina	Eflujo	5
Cloranfenicol	Cloranfenicol		16
Macrólidos	Eritromicina	Metilación RNAr y bomba de eflujo	36
Inhibidores competitivos de la síntesis de ác. fólico Sulfamidas	Cotrimoxazol	Otros	
Síntesis de ADN Fluoroquinolonas	Levofloxacino	Mutaciones en la DNA girasa	

2.2. Impacto de la resistencia microbiana

En respuesta al creciente número de microorganismos resistentes a los antimicrobianos, los distintos organismos internacionales de la salud han implementado estrategias y programas de salud a nivel local, nacional y mundial que buscan establecer y vigilar el uso adecuado y racional de antimicrobianos, así como la evolución de las cepas resistentes.¹⁰ En México, actualmente el 70 % de las bacterias causantes de infecciones nosocomiales son resistentes al menos a uno de los antimicrobianos de primera línea.¹¹

Las infecciones bacterianas tienen diversas consecuencias que pueden ser clínicas como la baja respuesta al tratamiento, contagio de nuevas infecciones, complicaciones y/o muerte, así como consecuencias económicas debido al alto costo de la atención y estadías hospitalarias más largas.

En los Estados Unidos se estima que anualmente la resistencia microbiana cuesta alrededor de 55 mil millones de dólares. Sin embargo, la magnitud de estos efectos puede incrementarse según la gravedad de la enfermedad, la virulencia de la cepa, así como la vulnerabilidad del huésped.¹² Por otro lado, algunas estimaciones sugieren que para el año 2050, morirán cerca de 10 millones de personas por infecciones que no pudieron ser tratadas con los medicamentos convencionales. Por ello, es necesario el descubrimiento de nuevos fármacos antimicrobianos potentes que sustituyan a los que están perdiendo su efectividad y disminuyan la propagación de bacterias multirresistentes.³

2.3. ADN girasa como blanco farmacológico

La ADN girasa bacteriana es parte de las proteínas llamadas topoisomerasas, que actúan en los procesos de transcripción, replicación del ADN y segregación cromosómica. Esta proteína tiene la función de reducir la tensión causada por el súper enrollamiento del ADN al cortar una o ambas hebras.^{13,14} La ADN girasa está compuesta por dos pares de subunidades GyrA y GyrB que forman una estructura tetramérica con múltiples potenciales sitios de unión (Figura 1), convirtiéndola en un blanco terapéutico deseable y viable para el desarrollo de nuevos agentes antibacterianos, principalmente para bacterias gram negativas.

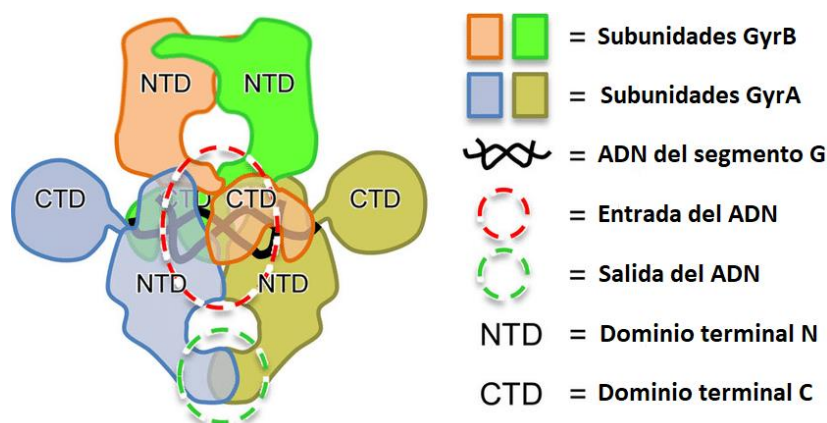


Figura 1. Estructura de la ADN girasa que consta de dos subunidades, GyrB y GyrA.

Los inhibidores de la ADN girasa tienen como objetivo evitar la síntesis del ADN bacteriano y conducir a su muerte celular mediante la fragmentación cromosómica, tal es el caso de las quinolonas, las cuales, pese a ser efectivas presentan importantes efectos secundarios.^{13,15} En la última década, informes sobre nuevos inhibidores de la ADN girasa con potente actividad han sido reportados; sin embargo, el modo de acción aún requiere exploración. Por ello se ha impulsado el estudio de esta proteína como un novedoso blanco terapéutico.¹⁶

2.4. Búsqueda de nuevos antimicrobianos usando métodos computacionales

La búsqueda de nuevos antibacterianos es un proceso complejo y tardado que involucra varias etapas desde el descubrimiento hasta la comercialización de un fármaco. Para este proceso de búsqueda se emplean diversas estrategias, de las cuales tres han sido fundamentales: *a)* el desarrollo de nuevas técnicas de búsqueda y cultivo de microorganismos productores de antibacterianos; *b)* la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas, y *c)* el desarrollo de nuevos antibacterianos.³

Dentro de las técnicas más novedosas para la búsqueda de antimicrobianos ha destacado el diseño de fármacos asistido por computadora (DIFAC), el cual tiene como principio entender la relación entre la estructura y la actividad biológica de los compuestos, empleando múltiples disciplinas como la quimiinformática, química teórica y química computacional.

Los objetivos del DIFAC pueden dividirse en tres: Diseño e identificación de nuevos compuestos, selección de candidatos y optimización de compuestos líderes (Figura 2). No obstante, el DIFAC plantea el uso y combinación de metodologías y/o estrategias para conseguir sus objetivos como son el cribado virtual y el acoplamiento molecular.⁴

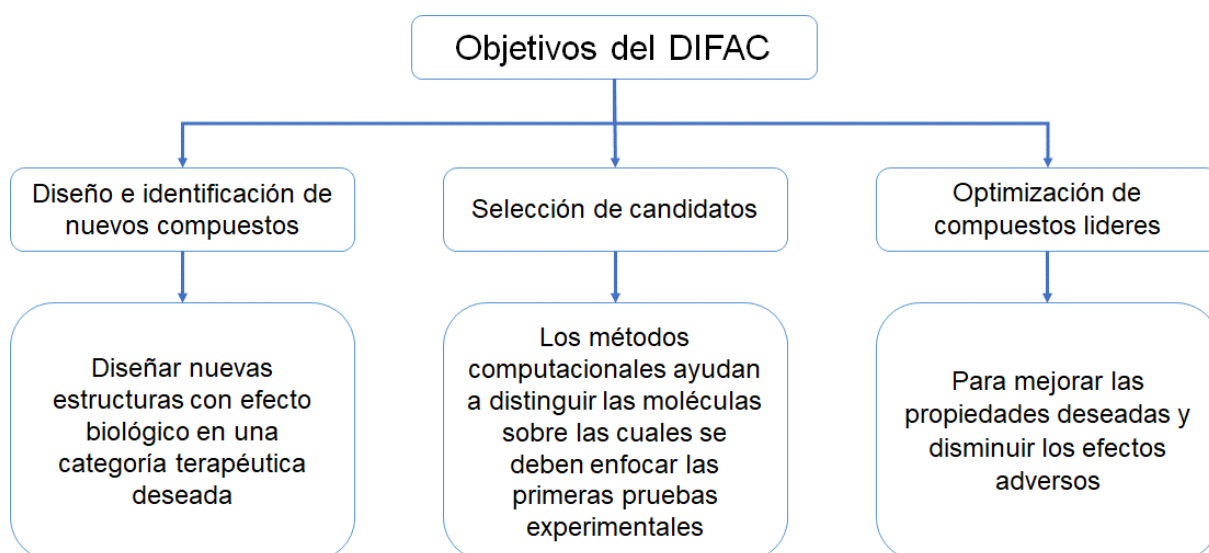


Figura 2. Objetivos centrales del DiFAC.

2.4.1. Cribado virtual

El cribado virtual es un filtrado *in silico* de una base de datos de moléculas diversas, que son agrupadas y evaluadas para posteriormente seleccionar un grupo de candidatos con mayor probabilidad de presentar una actividad biológica y puedan pasar a pruebas *in vivo* y/o *in vitro*. De esta manera, un cribado virtual reduce de manera drástica el número de ensayos biológicos que se realizarían, permitiendo optimizar recursos y reducir el tiempo de investigación. En la Figura 3 se describe de manera general el proceso de cribado virtual por acoplamiento molecular (*docking*) para la selección de candidatos.^{17,18}

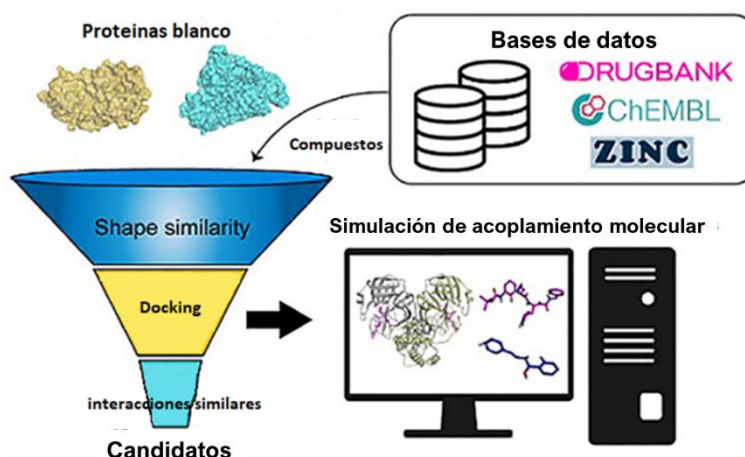


Figura 3. Metodología general de un cribado virtual.

Además, el cribado virtual se puede realizar sobre fármacos aprobados para el reposicionamiento de estos, es decir, encontrar una nueva aplicación terapéutica a un fármaco que fue diseñado y será probado en una enfermedad distinta, con la finalidad de acortar el tiempo de desarrollo.^{17,18}

2.4.2. Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular o *docking* es un método que permite predecir y calcular computacionalmente la conformación y la orientación más favorable de interacción entre un ligando y una diana molecular. El ligando es generalmente una molécula orgánica de bajo peso molecular, mientras que la diana molecular puede ser una proteína, enzima, receptor o canal iónico. Los resultados obtenidos para el complejo ligando-proteína depende de varios factores como son la flexibilidad de las moléculas (enlaces rotables) y el tamaño y posición del sitio de unión, entre otros. Por ello, hay dos principales consideraciones para evaluar estos resultados: el análisis de las conformaciones y orientaciones del ligando, o bien, la función de evaluación o *score* que nos da un valor numérico que indica la afinidad de la unión del ligando con la proteína (ΔG expresado en kcal/mol).^{4,19}

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Desde la aparición de los antimicrobianos los reportes de resistencia a dichos compuestos comenzaron rápidamente a surgir como consecuencia del uso indiscriminado para tratar cualquier clase de infección.^{5,20} Los mecanismos de resistencia a los antibióticos son variados. Sin embargo, se han identificado algunos blancos que no cuentan con reportes de resistencia, como son los involucrados en la síntesis de ácido fólico y síntesis de ADN. De manera particular, la ADN girasa es una enzima vital para los procesos de replicación del ADN con una estructura altamente conservada y representa una oportunidad para desarrollar nuevos fármacos que actúen sobre el mismo sitio de acción.¹³

Por otro lado, el acoplamiento molecular es un método utilizado en el descubrimiento de fármacos para la identificación de compuestos novedosos de interés terapéutico, prediciendo interacciones ligando-receptor.²¹ Este método permite filtrar extensas bases de datos de moléculas, con el objetivo de seleccionar a los mejores candidatos para su evaluación biológica.¹⁷ Por ello, se planteó encontrar nuevos inhibidores de la enzima ADN girasa, a partir la evaluación de una base de datos de compuestos desarrollados en el laboratorio N015 (Quimioteca N015), empleando acoplamiento molecular para seleccionar potenciales compuestos activos.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Identificar compuestos potencialmente activos sobre ADN girasa, a partir de la base de datos del laboratorio N015, empleando cribado virtual.

4.2. Objetivo general

- Realizar una revisión bibliográfica sobre los principales compuestos bioactivos y sitios de unión en la proteína ADN girasa.
- Preparar la proteína y los ligantes para los estudios de acoplamiento molecular, empleando diversos programas.
- Realizar estudios de acoplamiento molecular sobre la proteína usando los programas *Autodock vina*, *Autodock 4.2* y *GOLD*.
- Proponer una serie de estructuras novedosas potencialmente activas en ADN girasa basada en los núcleos de la quimioteca N015.
- Analizar los potenciales blancos moleculares y propiedades ADMET usando las plataformas *online PASSonline* y *SwissADME*.

5. MATERIAL Y METODOS

5.1. Revisión bibliográfica de blancos terapéuticos antibacterianos

La revisión bibliográfica sobre los principales blancos terapéuticos y sus antimicrobianos se llevó a cabo en la base de datos ChEMBL, donde se analizaron los fármacos más empleados y reportes de resistencia. Se seleccionó el blanco molecular con menos reportes y se amplió la búsqueda para identificar los principales ligandos y su sitio de unión en la base de datos *Protein Data Bank*.

5.2. Preparación de la proteína y ligandos para acoplamiento molecular

5.2.1. Selección y preparación de la proteína

La estructura cristalizada de la ADN girasa (PDB: 4LP0) se obtuvo de la base de datos de *Protein Data Bank* en formato *pdb. La estructura se eligió de acuerdo con la resolución, la cual en nuestro caso se no debe de ser mayor a 3 Å. Las moléculas de agua, iones, el ligante cocrystalizado y otros residuos fueron eliminados de la proteína.

Posteriormente, la estructura fue minimizada usando el programa *Chimera* y en la plataforma de YASARA. Las estructuras minimizadas y la estructura original de la proteína fueron comparadas entre sí, utilizando el gráfico de *Ramachandra*, para verificar que los residuos de las proteínas procesadas se encontraran en zonas favorables. Se seleccionó la estructura cuyo gráfico contuvo el menor número de aminoácidos en zonas poco favorables.

5.2.2. Preparación de ligandos

Los ligandos (moléculas de la quimioteca N015) se construyeron a partir de los códigos SMILES en el programa *ChemSketch* y se guardaron como archivos *mol. Enseguida las estructuras 3D fueron modeladas y minimizados en el programa de *Avogadro*, usando el campo de fuerza MMFF94s y el algoritmo fue *Steepest Descent*, el archivo se guardó en formato *pdb. Finalmente, se utilizó el programa *PyRx* v0.8 para convertir los archivos de los ligandos y la proteína de *pdb a formato *pdbqt, dicho formato contiene cargas atómicas e información de los enlaces rotables.²¹

5.3. Estudios de acoplamiento molecular

Se llevó a cabo el cribado virtual de la quimioteca N015 sobre la ADN girasa, usando los programas *Autodock vina*, *Autodock* 4.2. a través de la interfaz del programa *PyRx*.

Adicionalmente se realizó el estudio de acoplamiento molecular utilizando el programa *GOLD*, para ello se convirtieron los archivos *.pdb de los ligandos a un archivo *.sdf. Para los tres programas se utilizó el sitio de unión del ligante cocrystalizado con coordenadas X: 14.8360, Y: 29.0438, Z:5.6842 y tamaño de caja (grid box) de 50 Å.

Para *vina* y *autodock* 4.2 se utilizaron las condiciones estándar de análisis del programa *PyRx*: algoritmo de gradientes conjugados y el campo de fuerza MMFF94, además se fijó el valor de búsquedas exhaustivas en 50. Para el programa *GOLD* las condiciones de análisis fueron: algoritmo genético, campo de fuerza MMFF94 y número de búsquedas igual a 100. La visualización de los resultados, análisis de conformaciones e interacciones ligando-proteína se realizó en los programas *Pymol*, *AutoDock Tools* y *Discovery Studio*.

La validación de los métodos se hizo por reacoplamiento del ligante cristalizado (1YM) bajo las condiciones descritas anteriormente, donde se verificó la unión al sitio activo, el modo de unión y se determinó el valor de RMSD ($\text{RMSD} < 2 \text{ \AA}$) usando el programa *AutoDock Tools* v1.5.7rc1. El RMSD (*root-mean-square deviation*) es el resultado de un alineamiento estructural de dos estructuras superpuestas (ligando cristalizado vs ligando reacoplado), donde valores cercanos a cero indican menores diferencias.

5.4. Selección de ligandos con potencial efecto sobre ADN girasa

Se analizaron los resultados obtenidos para los 208 compuestos de la quimioteca N015 en los tres programas. Para el caso de *vina* y *autodock* 4.2 se utilizó la energía de unión expresada como ΔG (kcal/mol), mientras que para *GOLD* se usó el parámetro GOLD PLP. En todos los casos se realizó una normalización de los datos para facilitar su comparación y consenso, limitando los valores entre 0 y 1, donde valores cercanos a 1 implican mayor afinidad. La normalización de los datos se realizó en el programa Excel empleando la siguiente ecuación:

$$Valor_{normalizado} = \frac{(Valor - Valor_{minimo})}{Valor_{maximo} - Valor_{minimo}}$$

Los valores normalizados para cada molécula en los tres programas se guardaron en un archivo con formato *.csv, para posteriormente ser analizados y representados en un gráfico 3D en el programa *DataWarrior*, donde cada eje representa los valores normalizados de cada programa.

Se identificaron las moléculas con mejores puntuaciones en los tres programas (≥ 0.75) y fueron analizadas en el programa *Discovery Studio*, con el fin de identificar las interacciones entre el ligando y los aminoácidos de la proteína en el sitio de unión. El ligando cristalizado se utilizó como referencia para delimitar las interacciones ligando-receptor.

5.5. Análisis en PASSonline

Las moléculas seleccionadas fueron cargadas en la plataforma *PASSonline* para conocer su potencial actividad o nula actividad sobre blancos de interés clínico, usando sus códigos SMILES. Se analizaron los resultados de probabilidad de actividad (P_a) con valores mayores a 0.7 y valores mínimos de probabilidad de inactividad (P_i). Los potenciales blancos identificados se analizaron en busca de alguna relación con la inhibición de ADN girasa.

5.6. Análisis de propiedades fisicoquímicas en SwissADME

Los códigos SMILES de las moléculas seleccionadas se cargaron en la plataforma *SwissADME* para calcular descriptores de interés farmacéutico como: propiedades fisicoquímicas, lipófila, solubilidad en agua, farmacocinética y semejanzas a fármacos, entre otros. Se generó el diagrama de huevo hervido, que indica la probabilidad de absorción gastrointestinal y permeabilidad de la barrera hematoencefálica.²² Adicionalmente, se analizaron las potenciales alertas estructurales, que identifican fragmentos potencialmente inestables, reactivos o tóxicos.²³

5.7. Diseño de nuevas moléculas con potencial efecto sobre ADN girasa

Se diseñaron diez nuevas moléculas a partir de los resultados de cribado virtual de la quimioteca. Para esto, se generaron los *scaffolds* en el programa *DataWarrior* y se identificaron aquellos con mejores valores en los tres programas. A partir de los núcleos más frecuentes y el ligante cristalizado (1YM) se diseñaron nuevas estructuras por hibridación.

Finalmente, las moléculas propuestas fueron evaluados por acoplamiento molecular sobre ADN girasa, bajo las condiciones descritas en la sección 5.3 usando *vina* y *autodock 4.2*.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Selección del blanco terapéutico

Se llevó a cabo una revisión bibliográfica sobre los principales blancos terapéuticos para antimicrobianos y sus reportes de resistencia bacteriana, en la cual se observó que la ADN girasa es una proteína esencial para la síntesis del ADN bacteriano y no tiene reportes de resistencia, a diferencia de otros blancos terapéuticos que ya tenían años de haber reportados cepas resistentes a los principales fármacos usados en la terapéutica. Además, la ADN girasa posee una estructura altamente conservada entre distintas especies de bacterias.¹³

Posteriormente, se buscaron compuestos activos sobre ADN girasa, empleando la base de datos ChEMBL, encontrando al grupo de las fluoroquinolonas como los principales inhibidores. También se identificaron dos sitios activos dentro de la proteína, uno en cada subunidad GyrA y GyrB, siendo estos equivalentes, por lo tanto, el sitio activo es el mismo para todo el grupo de fluoroquinolonas.

Una vez seleccionado el blanco, se analizaron distintas estructuras 3D de la ADN girasa en la base de datos *Protein Data Bank*, evaluando la especie de origen, resolución (menor a 3 Å), técnica de obtención y ligantes cocrystalizados. Se eligió el complejo ADN girasa-1YM con código PDB: 4LP0, el cual contiene un inhibidor derivado de piridina (1YM). De manera particular, se seleccionó la subunidad B de la proteína (designada como GyrB), ya que el grupo de las fluoroquinolonas se unen a dicha subunidad y es el sitio de unión más relevante para este estudio. Por lo anterior, se utilizó el sitio de unión del ligante cristalizado y sus coordenadas para los análisis posteriores (Figura 4).

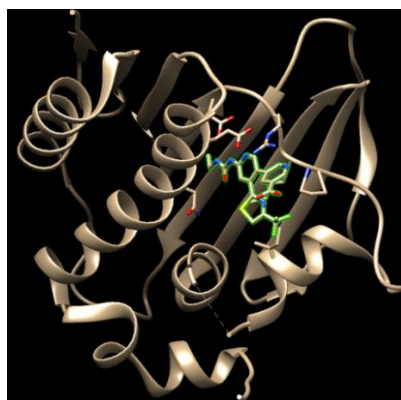


Figura 4. Ligante 1YM cristalizado (verde) dentro de la subunidad B de la ADN girasa.

6.2. Preparación de la proteína y ligandos para acoplamiento molecular

La proteína limpia se optimizó usando los programas *Chimera* y YASARA. Enseguida, se realizó una comparación de ambas proteínas y la proteína cruda (original) usando gráficos de Ramachandra. En la Figura 5 se muestran los gráficos de Ramachandra para cada una de las proteínas (original, YASARA y *Chimera*).

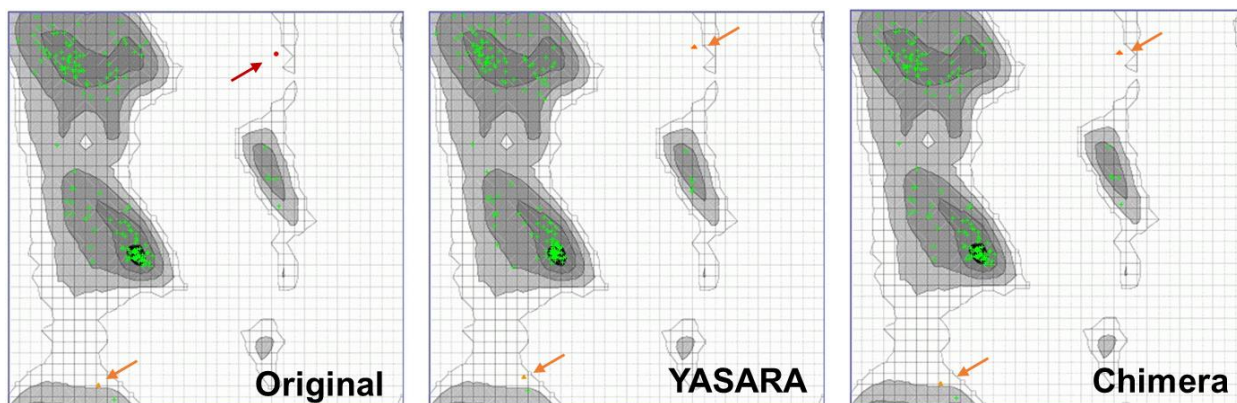


Figura 5. Gráficos de Ramachandran. Residuos de aminoácidos en sitios permitidos (verde), sitios medianamente permitidos (naranja) y en sitios no permitido (rojo).

Para ambas estructuras minimizadas se encontraron los mismos resultados, debido a que no existía alguna diferencia entre ambas proteínas, las dos se emplearon para la validación del método. Finalmente, se seleccionó la proteína minimizada con *Chimera* para los posteriores estudios de acoplamiento molecular, ya que obtuvo mejores resultados durante la validación.

6.3. Validación del método para estudios de acoplamiento molecular

La validación del método es un proceso fundamental para dar la certeza de que las condiciones utilizadas son óptimas para replicar las características observadas en la proteína cristalizada. En este caso la desviación de la raíz cuadrada media (RMSD) permitió cuantificar la diferencia entre la estructura reacomplada y la cristalizada.²³

Para determinar las condiciones del estudio, se llevó a cabo una evaluación a distintos niveles de búsqueda (8, 25, 50, 100, 250 y 500 ciclos) utilizando las coordenadas de búsqueda X: 14.8360, Y: 29.0438, Z:5.6842 (sitio de unión de 1YM) en el programa *autodock vina*.

Los archivos de salida fueron analizados en *AutoDockTools*, donde se identificaron los modos de unión con mejor *score* en cada corrida y la conformación más cercana al ligando cocrystalizado para después hacer el cálculo de RMSD, Tabla 2.

Tabla 2. Valores de RMSD y energía de unión observados a diferentes niveles de búsqueda

Exhaustivos	RMSD	Energía de Unión (ΔG Kcal/mol)
8	2.565	-6.6
25	1.932	-6.8
50	1.585	-6.9
100	1.554	-6.9
250	1.498	-6.8
500	1.431	-6.8

De acuerdo con los datos anteriores, se observó que a partir de 50 y hasta 500 ciclos el valor de RMSD no presenta una variación importante, además de mantener valores menores a los 2.0 Å. Así mismo, la energía de unión se mantuvo constante durante todos los análisis. Por ello, se determinó que el número óptimo de ciclos para el posterior cribado sería 50, implicando un tiempo de cálculo aceptable.

Para los programas *autodock* 4.2 (50 ciclos) y GOLD (100 ciclos) se usaron el número de ciclos preestablecido obteniendo un valor de RMSD de 1.789 Å y 1.613 Å, respectivamente. Ambas determinaciones de RMSD fueron realizadas con el modo de unión de mejor puntuación, obteniendo valores por debajo de los 2.0 Å, lo cual indica que ambas metodologías pueden dar resultados confiables.

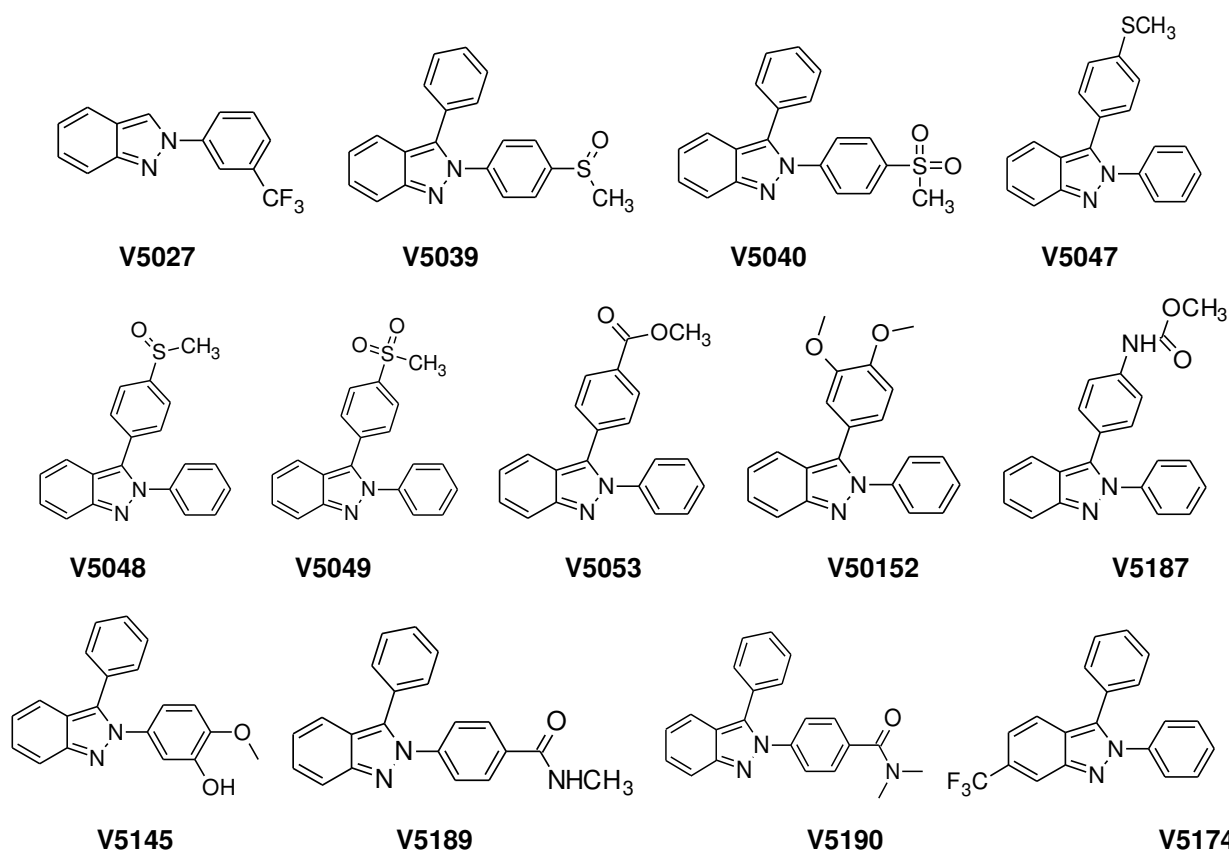
6.4. Cribado virtual de la quimioteca N015

Se realizó el acoplamiento molecular de las moléculas de la quimioteca N015 en los tres programas antes descritos. Los resultados obtenidos para cada molécula fueron analizados para seleccionar solo los modos de unión mejor calificados en cada programa.

De manera general, las puntuaciones encontradas por los programas en la gran mayoría de los casos fueron menores que las obtenidas para el ligando de referencia y solo unos pocos casos obtuvieron valores iguales o superiores. Lo anterior era de esperarse, ya que el objetivo es identificar a los mejores candidatos que podrían llevarse a evaluación biológica.

Dado que los resultados de GOLD se calificaron con el PLPscore (escala del 1 al 100, donde 100 es máxima afinidad) y el resto se evaluó con la energía de unión (ΔG), los datos fueron normalizados entre 0 y 1, donde 1 representa la mejor puntuación. Los valores normalizados para cada molécula en los tres programas fueron utilizados en la construcción de un gráfico en 3D, donde cada uno de los ejes representó a cada programa.

Con el propósito de identificar a las moléculas con mejores puntuaciones, se aplicó un valor de cohorte de 0.75 en los tres ejes. Con ello, se lograron identificar 20 moléculas (aproximadamente el 10% de la quimioteca) como potenciales inhibidores de ADN girasa. Las estructuras de los compuestos identificados se muestran en la Figura 6. donde se puede observar que la mayoría de los compuestos contienen el núcleo indazol, el cual se encuentra en 16 compuestos de los 20 seleccionados. En cuanto a los grupos funcionales destacan los grupos carboxamida y azufrados sobre el fenilo de la posición 2 y 3 del núcleo de indazol.



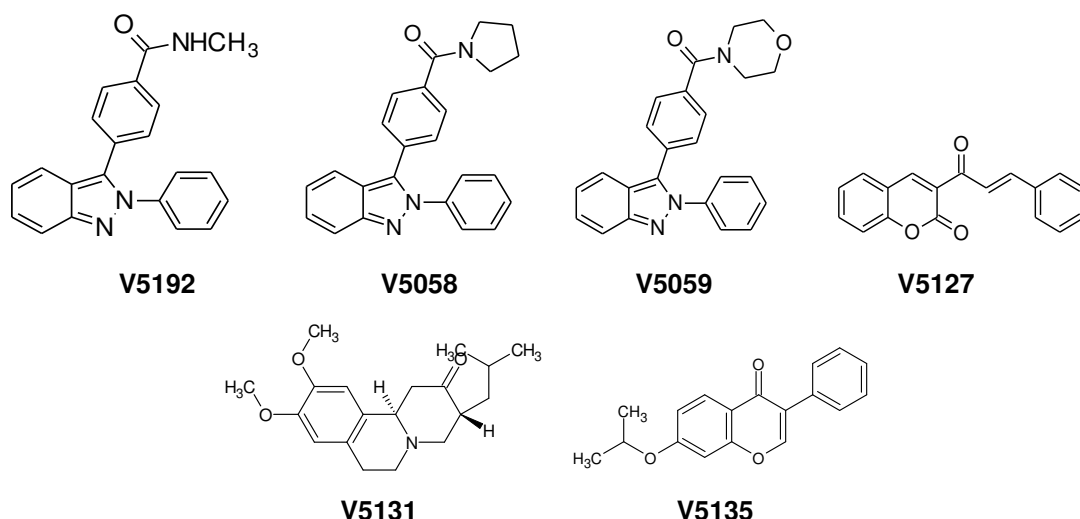


Figura 6. Moléculas seleccionadas del cribado virtual de la quimioteca N015

6.5. Análisis de las interacciones ligando-receptor

Las proteínas son cadenas largas de aminoácidos, las cuales pueden ser divididas en diferentes dominios dependiendo de su función, en estos dominios es donde se llevan a cabo las interacciones proteína-ligando. Es importante mencionar que no todos los aminoácidos dentro de este dominio van a ser necesarios para la unión y cumplir con su función, pero algunas de estas interacciones van a determinar la afinidad y/o especificidad.²⁴

Los compuestos identificados por cribado virtual (Figura 6) y el ligando cristalizado fueron visualizados en el programa *Discovery Studio* junto con la proteína para generar el diagrama de interacciones. El número y tipo de interacciones para cada ligando fueron analizadas y comparadas con las observadas para el ligando cristalizado. Se observó que las interacciones con mayor frecuencia fueron las π - π , π -alquilo y puentes de hidrógeno como interacciones fuertes y como interacciones débiles las π -sulfuro y Van der Waals. Cabe mencionar que el compuesto más destacado fue el **V5027**, ya que presentó 13 de las 16 interacciones, lo que representa un 81.25% de coincidencia con el ligando cristalizado.

En la Figura 7 se muestra el diagrama de interacciones para el ligando cristalizado y el compuesto **V5027**, donde se puede observar que ambas moléculas tienen un número considerable de interacciones dentro del sitio activo. Es importante mencionar que la naturaleza de interacción difiere entre ambos compuestos, dada las diferencias

estructurales como son el tamaño de la molécula y el modo de unión, pero estas tuvieron un 80% de coincidencias en el número de interacciones, lo cual indica que esta molécula podría actuar como un inhibidor de la ADN girasa. En la Tabla I, Anexo I se detallan las interacciones observadas para las 20 moléculas seleccionadas, usando como referencia al ligante cristalizado.

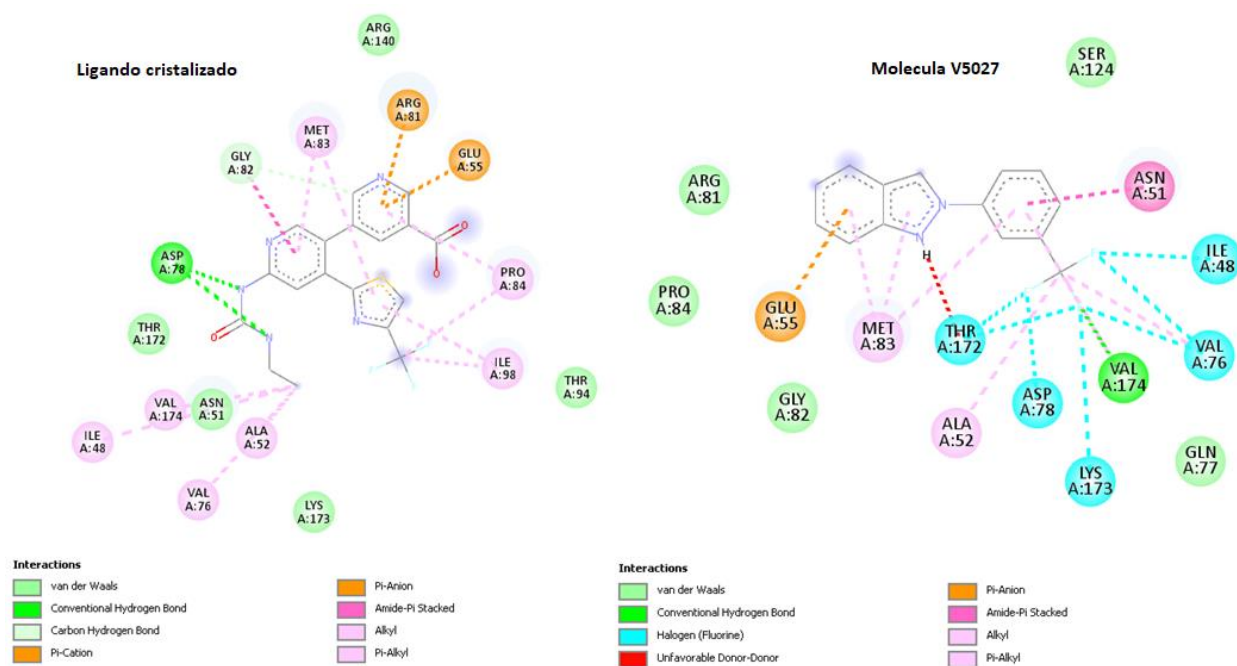


Figura 7. Diagrama de interacción ligando-proteína para el ligando cristalizado y V5027.

Los procesos celulares y bioquímicos estarán controlados por estas interacciones, por lo que este tipo de diagramas resultan atractivos para comprender y proponer modos de unión, así como proponer nuevas moléculas que favorezcan las interacciones en el sitio de interés. Las interacciones más comunes son las interacciones electrostáticas y las de Van der Waals.²⁵

6.6. Análisis de propiedades fisicoquímicas de los compuestos seleccionados por cribado virtual

Durante el descubrimiento de fármacos se requiere gran cantidad de tiempo y recursos para evaluar un gran número de compuestos, que no necesariamente llegarán a casos de éxito, dado que las moléculas deben mostrar una alta actividad biológica y una baja toxicidad. Por ello, se ha demostrado que la estimación temprana en la fase de descubrimiento de parámetros de absorción, distribución, metabolismo y excreción

reduce drásticamente la probabilidad de fracaso en relación con factores farmacocinéticos.

La absorción gastrointestinal y la penetración a la barrera hematoencefálica son dos características farmacocinéticas de vital importancia durante el descubrimiento de fármacos. Existen una gran variedad de métodos *in silico* para predecir estos parámetros, como son las reglas de Lipinski, que correlacionan con la alta probabilidad de ser un fármaco administrado por vía oral. Así mismo, un modelo gráfico como el diagrama de huevo hervido que relaciona la lipofilia y la polaridad de las moléculas junto con otros parámetros para estimar donde pudieran tener mayor distribución: absorción gastrointestinal (clara, zona blanca), o bien, cruzar la barrera hematoencefálica (yema, zona amarilla).²⁶

En la Figura 8 se muestra el gráfico de huevo hervido para las 20 moléculas seleccionadas, donde destaca la molécula **V5174**, al ser la única que no cumple con los criterios farmacocinéticos evaluados. El resto de los compuestos presentan alta probabilidad de cruzar la barrera hematoencefálica (zona amarilla). No obstante, se esperaba que las moléculas permanecieran en la zona blanca, debido a que se requieren biodisponibles en el sistema para tener su acción sobre la ADN girasa bacteriana.

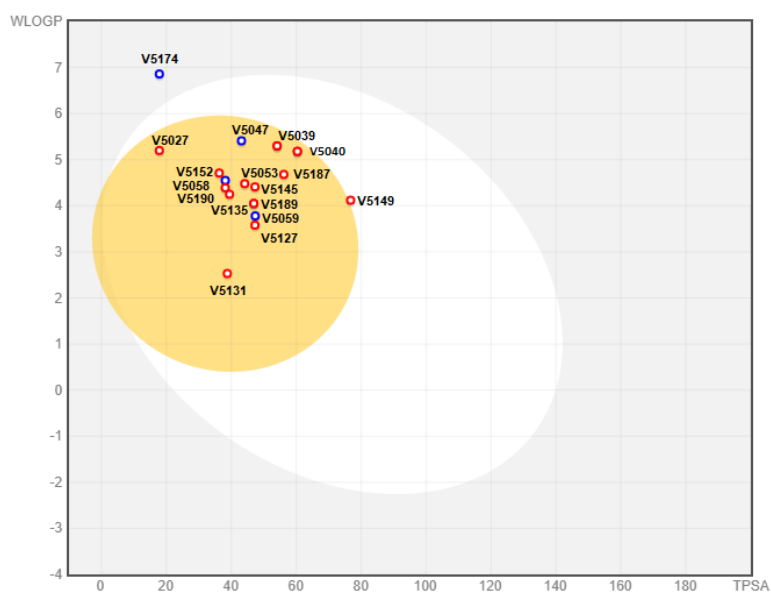


Figura 8. Diagrama de huevo hervido para las 20 moléculas seleccionadas de la quimioteca N015.

Es importante mencionar, que el perfil fisicoquímico de estos 20 compuestos se generó en la plataforma *swissADME*. En esta se calcularon distintos parámetros relacionados con la biodisponibilidad, así como algunos criterios farmacéuticos. Siendo las reglas de Lipinski una de las más utilizadas. Estas establecen que la mala absorción o permeabilidad de un compuesto se observa cuando hay más de 5 átomos donadores de hidrógeno, masa molecular mayor a 500 Da, un log P superior a 5 y la suma de átomos de nitrógeno y oxígeno en una molécula es mayor de 10.²⁵ Adicionalmente, se evalúan alertas estructurales como son los PAINS y alertas de Brenk.

La Tabla 3 muestra los parámetros determinados para las 20 moléculas identificadas por cribado virtual. De manera general, se puede observar que los compuestos tienen valores de Log S negativo, lo que significa que serán solubles en agua. Además, pocas moléculas tienen violaciones a los criterios farmacéuticos, es decir la mayoría de los compuestos tienen perfiles ADME aceptables. Adicionalmente, se observó que las moléculas podrían tener actividad sobre los citocromos P450 (CYP450), los cuales son el mecanismo más importante del metabolismo de fármacos; estas enzimas catalizan reacciones de biotransformación, generalmente introduciendo o exponiendo un grupo funcional hidrofílico para su posterior absorción.

Tabla 3. Perfiles ADME para los 20 compuestos seleccionados

Molécula	Log P (Lipófila)	Log S (Solubilidad)	P. BBB	S. P.gp	CYP 1A2	CYP 2C19	CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4	Log Kp	Lipinsky	Ghose	Veber	Egan	Muegge	A. PAINS	A. Brenk	Abs. GI
V5027	3.87	-4.51	+	-	+	+	-	-	-	-4.98	+	+	+	+	+	0	0	+
V5039	3.9	-4.88	+	-	+	+	+	+	+	-5.48	+	+	+	+	+	0	0	+
V5040	3.82	-5.03	+	-	+	+	+	-	+	-5.49	++	+	+	+	+	0	0	+
V5047	4.71	-5.68	+	+	+	+	+	+	+	-4.4	1	+	+	+	1	0	0	+
V5048	3.89	-4.88	+	-	+	+	+	+	+	-5.48	+	+	+	+	+	0	0	+
V5049	3.82	-5.03	+	-	+	+	+	-	+	-5.49	+	+	+	+	+	0	0	+
V5053	4.11	-5.22	+	-	+	+	+	-	-	-4.94	+	+	+	+	+	0	0	+
V5058	4.25	-5.46	+	+	+	+	+	-	+	-5.11	1	+	+	+	+	0	0	+
V5059	3.66	-5	+	+	+	+	+	+	+	-5.81	+	+	+	+	+	0	0	+
V5127	3.41	-4.37	+	-	+	+	+	-	-	-5.22	+	+	+	+	+	0	2	+
V5131	2.94	-3.6	+	-	-	-	-	+	-	-6.14	+	+	+	+	+	0	0	+
V5135	3.69	-4.43	+	-	+	+	+	+	+	-5.21	+	+	+	+	+	0	0	+
V5145	3.8	-5.09	+	-	+	+	+	+	+	-5.03	+	+	+	+	+	0	0	+

V5149	3.4	-4.99	+	-	+	+	+	+	+	-5.59	+	+	+	+	+	0	0	+
V5152	4.12	-5.29	+	-	+	+	+	+	+	-4.89	+	+	+	+	+	0	0	+
V5174	5.22	-6	-	+	+	+	-	-	-	-4.26	1	1	+	1	1	0	0	-
V5187	3.84	-5.05	+	-	+	+	+	+	-	-5.22	+	+	+	+	+	0	0	+
V5189	3.7	-4.85	+	-	+	+	+	+	+	-5.34	+	+	+	+	+	0	0	+
V5190	3.92	-5.03	+	-	+	+	+	+	+	-5.29	+	+	+	+	+	0	0	+
V5192	3.68	-4.85	+	-	+	+	+	+	+	-5.34	+	+	+	+	+	0	0	+

6.7. Diseño de nuevos inhibidores de ADN girasa

Las estructuras de los compuestos seleccionados por cribado virtual y el ligante 1YM se utilizaron como base para diseñar diez nuevas moléculas, las cuales fueron evaluadas sobre la proteína ADN girasa (4LP0) por acoplamiento molecular, bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Para el diseño se consideraron varios aspectos entre los que se encuentran el núcleo base y los sustituyentes (grupos funcionales) para poder combinarlos. En la Figura 9 se presentan las estructuras de las moléculas propuestas **MP1–10**.

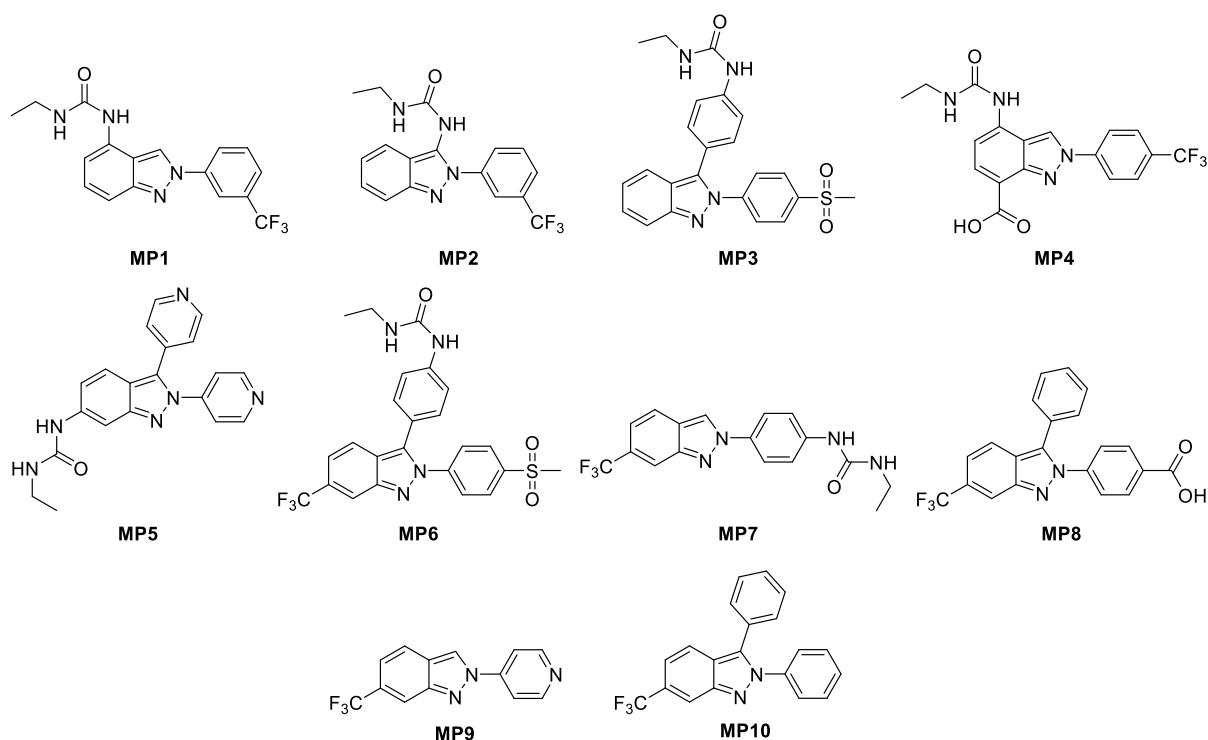


Figura 9. Moléculas diseñadas como inhibidores de ADN girasa.

6.7.1. Estudio de acoplamiento molecular de nuevos inhibidores de ADN girasa

Los estudios de acoplamiento molecular se realizaron con los programas *autodock vina*, *autodock 4.2* y GOLD. En la Tabla 5 se muestran las puntuaciones para cada una de las moléculas propuestas (**MP1–10**), donde se observó una ligera mejora (-8.2 a -6.6 kcal/mol) respecto a las moléculas seleccionadas de la quimioteca N015 (-7.4 a -6.0 kcal/mol) usando *autodock vina*. Mientras que los resultados con *Autodock 4.2* se mantuvieron casi iguales respecto a los compuestos predecesores. Por otra parte, en GOLD se obtuvieron resultados similares, teniendo coincidencias con los otros dos programas, con excepción en el compuesto **MP3** que obtuvo una puntuación más alta respecto a lo encontrado en los otros programas.

Realizando un consenso entre los tres programas, los compuestos **MP1**, **MP2** y **MP5** son los mejores candidatos para obtenerlos por síntesis química y posteriormente llevarlos a evaluación biológica.

Tabla 4. Resultados del acoplamiento molecular de moléculas **MP1–10**

Molécula	Autodock vina	Autodock 4.2	GOLD PLP score
MP1	-7.7	-7.38	85.8953
MP2	-8.2	-7.95	76.8576
MP3	-7.0	-6.89	91.7456
MP4	-7.0	-6.84	82.2488
MP5	-7.9	-7.84	87.8213
MP6	-6.9	-6.59	82.3781
MP7	-6.7	-6.74	79.4873
MP8	-6.9	-6.62	75.2879
MP9	-6.8	-6.72	72.9737
MP10	-6.6	-6.35	73.2385

En la Figura 10 se muestra el diagrama de interacciones para 1YM y la **MP5**, en el cual se observaron similitudes entre el compuesto y el ligando de referencia, teniendo un 75 % de coincidencias en el número y tipo de interacciones dentro del sitio de unión.

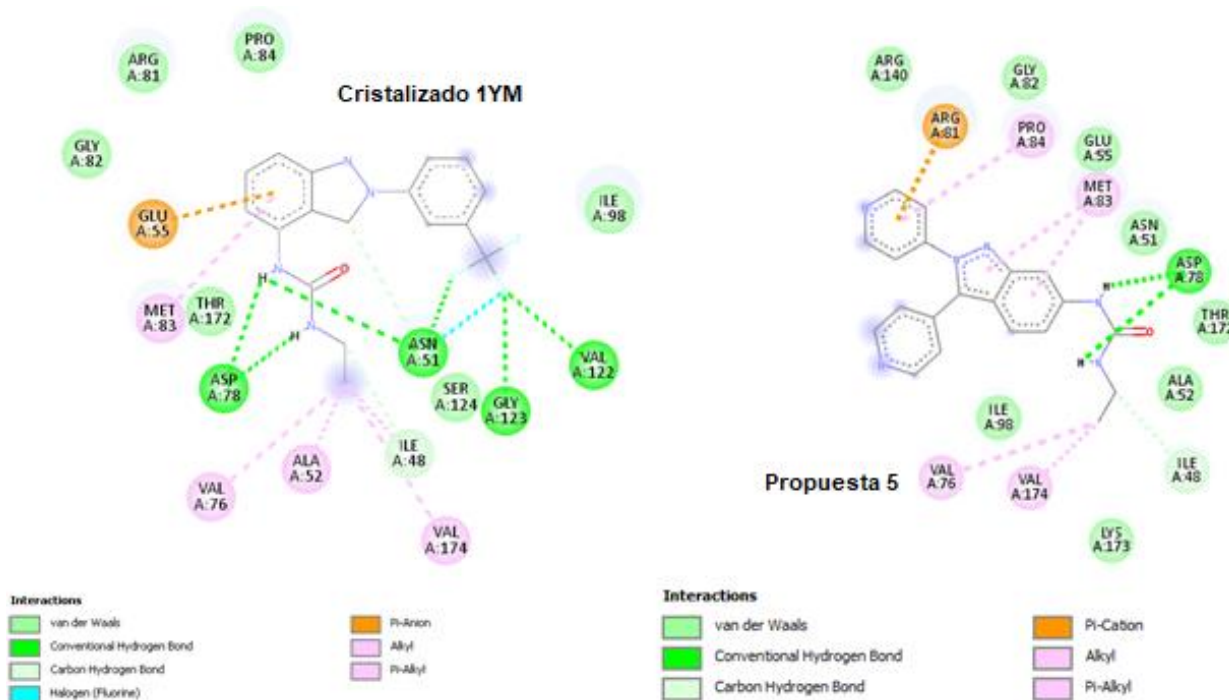


Figura 10. Diagrama de interacciones en 2D del ligando cristalizado 1YM y **MP5**.

Adicionalmente, la molécula **MP5** tiene un mayor número de interacciones dentro del sitio activo, respecto al ligando cristalizado (1YM). Algunas de las coincidencias son VAL174, VAL76 con una interacción π -alquilo, ILE48 y THR172 con interacciones de tipo Van de Waals, GLY82 con una interacción por puente de hidrógeno y ASN51 aparece en ambos casos, pero con interacciones distintas. Lo anterior sugiere que esta molécula podría tener actividad inhibitoria sobre ADN girasa similar al ligando de referencia. En la Tabla II, Anexo I se detallan las interacciones las moléculas con mejores puntuaciones.

6.8. Perfil farmacocinético de las moléculas propuestas

Los parámetros farmacocinéticos de las moléculas propuestas se determinaron en la plataforma *SwissADME*. Esta evaluación permitió determinar si las modificaciones realizadas mejoraron los perfiles ADME, o si se mantienen. En la Figura 11 se muestra el diagrama del huevo hervido para las moléculas **MP1–10**, donde se observó que la distribución fue más dispersa en comparación con los compuestos seleccionados por cribado virtual y se localizan en las tres zonas. La mitad de las moléculas se sitúan sobre la zona blanca, es decir, que tienen alta probabilidad de cruzar la barrera gastrointestinal, siendo la zona de interés. Mientras que **MP1**, **MP7** y **MP9** se sitúan en la zona amarilla indicando el posible paso de la barrera hematoencefálica, un perfil similar a sus

predecesores, y dos de las moléculas propuestas (**MP6** y **MP10**) quedaron fuera del diagrama indicando que podrían presentar mala biodisponibilidad.

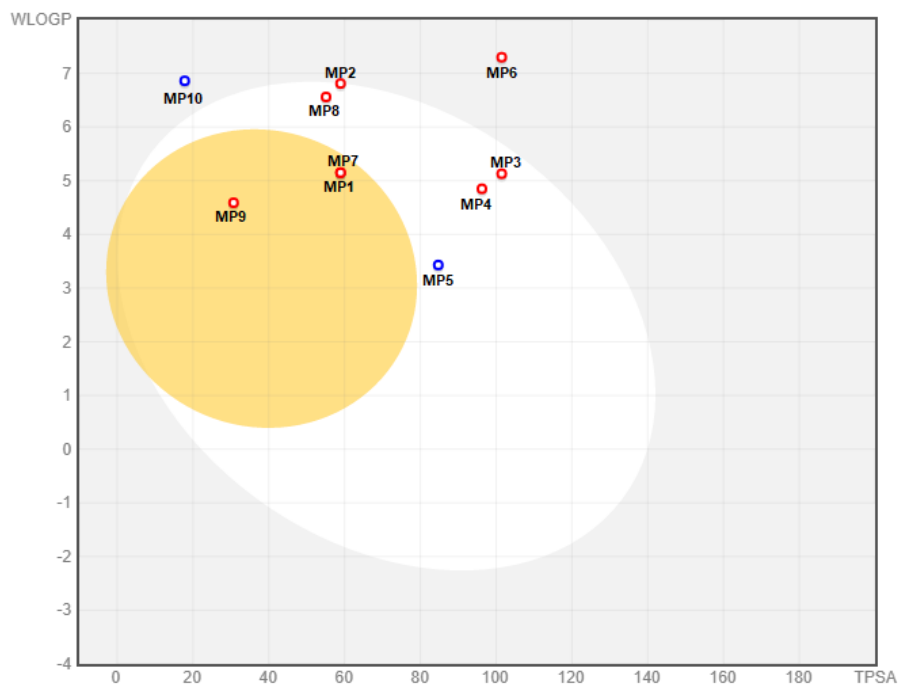


Figura 11. Diagrama del huevo hervido para las moléculas propuestas.

Los parámetros farmacocinéticos y fisicoquímicos calculados de las moléculas propuestas **MP1–10** se resumen en la Tabla 5. De manera general, las moléculas propuestas cumplen con las reglas de Lipinsky, Ghose, Veber y Egan, pese a tener una violación, solo la molécula **MP6** no cumple con estas reglas y se ve reflejado en su perfil ADME (Figura 11). En cuanto a las alertas PAINS las moléculas **MP4** y **MP5** tienen criterios en positivo, lo cual podría ser un indicativo que estructura debe analizarse para evitar estructuras o grupos indeseables.

Por otro lado, todos los compuestos presentaron una complejidad de síntesis entre 2 y 3, lo cual indica que es posible obtenerlos por síntesis química con las metodologías descritas en la literatura. Además, la mayoría de ellos serían inhibidores de las isoformas del CYP450 como es el caso de la **MP5** que actuaría sobre todas las isoformas, mientras **MP4** solo actúa sobre una isoforma.

Tabla 5. Perfil farmacocinético de los compuestos propuestos **MP1–10**

Molécula	Log P (Lipófila)	Log S (Solubilidad)	P. BBB	S. P. gp	CYP 1A2	CYP 2C19	CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4	Log Kp	Lipinsky	Ghose	Veber	Egan	Muegge	A. PAINS	A. Brenk	Abs. GI	Complejidad de síntesis
MP1	3.51	-4.25	+	-	+	+	+	-	-	-5.95	+	+	+	+	+	0	0	+	2.45
MP2	4.81	-5.76	-	-	+	+	+	+	+	-5.23	1	1	+	1	1	0	2	+	2.92
MP3	3.45	-4.78	-	-	-	+	+	-	+	-6.47	+	+	+	+	+	0	1	+	3.01
MP4	2.97	-4.10	-	-	+	-	-	-	-	-6.56	+	+	+	+	+	+	1	+	2.58
MP5	2.31	-3.58	-	+	+	+	+	+	+	-6.98	+	+	+	+	+	+	1	+	2.73
MP6	4.49	-5.64	-	-	+	+	+	-	+	-6.52	1	2	+	1	0	0	3	-	3.2
MP7	3.48	-4.25	+	-	+	+	+	-	-	-5.95	+	+	+	+	0	0	+	+	2.27
MP8	4.69	-5.84	-	-	+	+	-	-	-	-4.87	1	1	+	1	0	0	1	+	2.53
MP9	3.14	-3.84	+	-	+	+	-	-	-	-5.75	+	+	+	+	0	0	+	+	1.83
MP10	5.22	-6.00	-	+	+	+	-	-	-	-4.26	+	+	+	+	0	0	+	-	2.42

7. CONCLUSIONES

Se encontró que al menos 20 moléculas de las 208 de la quimioteca del laboratorio N015 tienen una afinidad sobre la proteína ADN girasa. Esto con base en los resultados del estudio de acoplamiento molecular que se realizó usando tres programas, lo anterior indica que un 9.13% del total de la quimioteca son potenciales inhibidores de esta enzima y podrían tener actividad antibacteriana.

Se diseñaron y evaluaron *in silico* diez nuevas moléculas con núcleo 2*H*-indazol, encontrando que **MP1**, **MP2** y **MP5** son los mejores candidatos para obtenerse por síntesis química y posteriormente evaluarse *in vitro* como antimicrobianos, al obtener los mejores resultados en el estudio de acoplamiento molecular sobre la proteína ADN girasa.

8. REFERENCIAS

- (1). Allcock, S., Young, E. H., Holmes, M., Gurdasani, D., Dougan, G., Sandhu, M. S., & Török, M. E. (2017). Antimicrobial resistance in human populations: challenges and opportunities. *Global health, epidemiology and genomics*, e4.
- (2). De León-Rosales, S. P., Arredondo-Hernández, R., & López-Vidal, Y. (2015). La resistencia a los antibióticos: Un grave problema global. *Gaceta médica de México*, 151(5), 681-689.
- (3). Saldívar-González, F., Prieto-Martínez, F. D., & Medina-Franco, J. L. (2017). Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional. *Educación química*, 28(1), 51-58.
- (4). Bado, I., Cordeiro, N., García, V., Robino, L., Seija, V., & Vignoli, R. (2006). Principales grupos de antibióticos. *Bacteriología y Virología Médica*, 34, 631-6.
- (5). Vignoli, R., & Seija, V. (2006). Principales mecanismos de resistencia antibiótica. Temas de bacteriología y virología. *Instituto de Higiene*, 649-662.
- (6). García-Rubí, E., Sierra-Madero, J. G., & De León Rosales, S. P. (1991). Uso de antibióticos en la consulta externa del Instituto Nacional de la Nutrición «Salvador Zubirán». *Revista de investigación clínica*, 43(2), 113-118.
- (7). Livermore, D. M. (2003). Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clinical infectious diseases*, 36(1), S11-S23.
- (8). Sharma, A., Gupta, V. K., & Pathania, R. (2019). Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. *The Indian journal of medical research*, 149(2), 129.
- (9). Bush, K., Courvalin, P., Dantas, G., Davies, J., Eisenstein, B., Huovinen, P., ... & Zgurskaya, H. I. (2011). Tackling antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 9(12), 894-896.
- (10). Benavides-Plascencia, L., Leonardo Aldama-Ojeda, A., & Javier Vázquez, H. (2005). Vigilancia de los niveles de uso de antibióticos y perfiles de resistencia bacteriana en hospitales de tercer nivel de la Ciudad de México. *Salud pública de México*, 47, 219-226.
- (11). Watkins, R. R., & Bonomo, R. A. (2016). Overview: global and local impact of antibiotic resistance. *Infectious Disease Clinics*, 30(2), 313-322.
- (12). Drlica, K. (1999). Mechanism of fluoroquinolone action. *Current opinion in microbiology*, 2(5), 504-508.
- (13). Reece, R. J., & Maxwell, A. (1991). DNA gyrase: structure and function. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 26(3-4), 335-375.
- (14). Álvarez-Hernández, D. A., Garza-Mayén, G. S., & Vázquez-López, R. (2015). Quinolonas: Perspectivas actuales y mecanismos de resistencia. *Revista chilena de infectología*, 32(5), 499-504.
- (15). Khan, T., Sankhe, K., Suvarna, V., Sherje, A., Patel, K. y Dravyakar, B. (2018). Inhibidores de la ADN girasa: Progreso y síntesis de compuestos potentes como agentes antibacterianos. *Biomedicina y farmacoterapia*, 103, 923-938.

- (16). Cuanalo-Contreras, L.K., Merino-Contreras, S. A., & Scior, T. (2011). ¿Qué sabe Ud. acerca de Cribado Virtual?. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 42(2), 54-55.
- (17). Pinzi, L., & Rastelli, G. (2019). Molecular docking: Shifting paradigms in drug discovery. *International journal of molecular sciences*, 20(18), 4331.
- (18). Kitchen DB, Decornez H, Furr JR, Bajorath J. (2004) Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature Reviews Drug Discovery*. 3(11), 935-949.
- (19). Fariña, N. (2016). Bacterial resistance: A global public health problem with difficult solution. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 14(1), 06-07.
- (20). Seeliger, D., de Groot, B.L. (2010) Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 24(5), 417-422
- (21). Verdonk ML, Chessari G, Cole JC, Hartshorn MJ, Murray CW, Nissink JW, Taylor RD, Taylor R. (2005) Modeling water molecules in protein-ligand docking using GOLD. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(20), 6504-6515.
- (22). Tripathi, P., Ghosh, S., & Talapatra, S. N. (2019). Bioavailability prediction of phytochemicals present in *Calotropis procera* (Aiton) R. Br. by using Swiss-ADME tool. *World Scientific News*, 131, 147-163.
- (23). Enrique, J. (2010). Tesis doctoral: Evaluación *in silico* de interacciones proteína ligando: profilina/poli-L-prolina como modelo de estudio. Universidad Nacional Autónoma de México.
- (24). Ranjith, D., & Ravikumar, C. (2019). SwissADME predictions of pharmacokinetics and drug-likeness properties of small molecules present in *Ipomoea mauritiana* Jacq. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(5), 2063-2073.
- (25). Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. (2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1-3), 3-26.
- (26). Silva, J. D. de S., Leite, S. da C., Silva, M. T. S. da, Meirelles, L. M. A., & Andrade, A. W. L. (2020). In silico evaluation of the inhibitory effect of antiretrovirals Atazanavir and Darunavir on the main protease of SARS-CoV-2: docking studies and molecular dynamics. *Research, Society and Development*, 9(8), e826986562.

9. ANEXO I

Tabla I. Interacciones ligando-receptor de las 20 moléculas seleccionadas por cribado virtual.

Molécula	Aminoácidos en interacción																		
	PRO 84	ILE 98	MET 83	ILE 48	VAL174	VAL 76	ALA 52	ARG 81	GLU 55	ASP 78	THR 172	ASN 51	LYS 17						
1YM R																			
V5027	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#				
V5039	+	*	#	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#			
V5040	+	*	#	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#			
V5047	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	
V5048	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	
V5049	+	*	#	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#
V5053	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	
V5058	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	
V5059	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	
V5127	+	*	#	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#
V5131	+	*	#	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#
V5135	+	*	#	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#
V5145	+	*	#	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#
V5149	+	*	#	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#
V5152	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	
V5174	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	
V5187	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	
V5189	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	
V5190	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	
V5192	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	

Tabla II. Interacciones ligando-receptor de las mejores cuatro moléculas propuestas.

Molécula	Aminoácidos en interacción																	
	PRO 84	ILE 98	MET 83	ILE 48	VAL174	VAL 76	ALA 52	ARG 81	GLU 55	ASP 78	THR 172	ASN 51	LYS 17					
1YM R																		
MP1	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#			
MP5	+	*	#	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#		
MP7	+	*	#	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#		
MP9	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#	+	*	#

+	Vina	Pi alquilo	Enlace de H convencional	Halogen (flour)
*	Autodock	Amida pi apilado	Enlace de H-C	Pi sigma
#	Gold	Pi anion/cation	Van der Waals	Pi sulfuro
				ceptor desfavorable