



Universidad Nacional  
Autónoma de México

---

Facultad de Estudios  
Superiores Cuautitlán

Estudios *in silico* para la evaluación de compuestos derivados del ácido  
carbámico como agentes ixodicidas

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADO EN QUÍMICA INDUSTRIAL

P R E S E N T A

Hernández Serda Manuel Alejandro

ASESOR: M. en C. Víctor Hugo Vázquez Valadez  
COASESOR: Dr. Enrique Ángeles Anguiano

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U.N.A.M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN  
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Estudios *in silico* para la evaluación de compuestos derivados del ácido carbámico como agentes ixodíctidas.

Que presenta el pasante: Manuel Alejandro Hernández Serda  
Con número de cuenta: 311115365 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Química Industrial

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 29 de mayo de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

|               | NOMBRE                           | FIRMA |
|---------------|----------------------------------|-------|
| PRESIDENTE    | Dr. José Luis Arias Tellez       |       |
| VOCAL         | Dr. Rodolfo Gómez Balderas       |       |
| SECRETARIO    | M.C. Víctor Hugo Vázquez Valadez |       |
| 1er. SUPLENTE | Dra. Sandy María Pacheco Ortín   |       |
| 2do. SUPLENTE | Dr. Fernando Ortega Jimenez      |       |

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga\*

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Química Medicinal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, gracias a los proyectos **PAPIIT IT200817**, **PAPIIT No. 202015**, **Cátedra PIAPI1607: Diseño de moléculas bioactivas.**

## AGRADECIMIENTOS

La culminación del presente trabajo fue un arduo proceso que involucró un gran aprendizaje académico pero sobre todo significó un gran aprendizaje personal y profesional. En este camino existió una gran influencia de seres queridos porque sin ellos no lo hubiese logrado.

A mi madre, Rosa María, por todo el amor incondicional. Por apoyarme en cada decisión que tomara y alentarme a ser mejor persona. Gracias por todo el sacrificio y dedicación que me hicieron llegar a este punto. Eres mi guía y mi orgullo.

A mis hermanos, Daniel, Agustín y Jesús, por todo el apoyo, el afecto, y la confianza que depositaron en mi cada quien a su propia manera. Cada uno es un ejemplo de profesionales distinguidos en sus respectivas disciplinas lo cual siempre admiraré.

A mi padre, J. Jesús, por la vida. Por demostrar que nunca hay que perder la esperanza y que con fé todo es posible.

Al Dr Enrique Ángeles y a la Dra. Ana María Velázquez, por su gran sabiduría y sabios consejos, es y siempre será un honor ser su alumno. Admiro mucho su trabajo institucional en FES Cuautitlán, científico y administrativo. Ustedes ponen el ejemplo de que el correcto y único camino es el de obrar justamente.

A Víctor Valadez por expandir los límites de la relación asesor-alumno y que la enseñanza, además de académica, se convirtiera en personal y de vida; con cada experiencia, en cada viaje, congresos, en cada reporte codo a codo. Un gran amigo y mentor.

A todos con los que crucé camino en el Laboratorio de Química Medicinal:

A Pablo Martínez, por todo tu conocimiento y disposición a ayudar al prójimo. Eres un ejemplo a seguir como químico farmacéutico y como individuo de buenos principios. Eres un pilar para el LQM.

A Elizabeth Rul, por tu compañía en todo momento de ésta travesía, en especial aquellos donde la pesadumbre llegaba a agobiarme y siempre estabas ahí aligerando mi carga e impulsándome a seguir adelante y no rendirme. Por eso y mucho más, eternamente agradecido de que nuestros caminos se encontraran.

A Yoshio Alarcón, Eric Pereyra, Maritza Aide, Pablo Aguirre por esas tardes creativas de café, debate y ajedrez. A Carolina Loa, Juan Santos, Antonio Rios, Tlotzin Martínez, Daniela Najera, tomo lo mejor de ustedes y agradezco cada momento.

## ABREVIATURAS

|         |   |
|---------|---|
| ACh     | Acetilcolina                                  |
| AChE    | Acetilcolinesterasa                           |
| CAS     | Catalytic Acylation Site                      |
| CSD     | The Cambridge Crystallograp Data Center       |
| PAS     | Peripheral Anionic Site                       |
| Da      | Dalton  |
| LQM     | Laboratorio de Química Medicinal              |
| MMFF94x | Merck Molecular Force Field 94x               |
| MOE     | Molecular Operating Environment               |
| NAMD    | Not just Another Molecular Dynamics program   |
| NCBI    | National Center for Biotechnology Information |
| BLAST   | Basic Local Alignment Search Tool             |
| PDB     | Protein Data Bank                             |
| PDBe    | Protein Data Bank in Europe                   |
| PLIF    | Protein Ligand Interaction Fingerprint        |
| RMSD    | Root Mean Square Deviation                    |
| VMD     | Visual Molecular Dynamics                     |

## Índice de figuras

|    |   |    |
|----|---|----|
| 1  | Vista dorsal de la garrapata <i>R. microplus</i> . . . . .                                      | 3  |
| 2  | Zonas de control de garrapata en el territorio Mexicano . . . . .                               | 3  |
| 3  | Esquema del ciclo biológico de la garrapata <i>R. microplus</i> . . . . .                       | 4  |
| 4  | Compuestos de la serie LQM 900 . . . . .  | 7  |
| 5  | Ecuación general para la hidrólisis enzimática de ACh por AChE . . . . .                        | 8  |
| 6  | Vista transversal y frontal del cerebro artrópodo . . . . .                                     | 8  |
| 7  | Esquema de la estructura secundaria conservada en colinesterasas . . . . .                      | 9  |
| 8  | Mecanismo de reacción para la hidrólisis de grupos ester . . . . .                              | 10 |
| 9  | Esquema de aminoácidos que constituyen la hendidura . . . . .                                   | 11 |
| 10 | Estructura general de carbamatos . . . . .  | 13 |
| 11 | Representación de gráfica de la función potencial . . . . .                                     | 15 |
| 12 | Alineamiento de secuencias de AChE para <i>R. microplus</i> y <i>A. gambiae</i> . . . . .       | 25 |
| 13 | Matriz de puntuación para el alineamiento de secuencias . . . . .                               | 25 |
| 14 | Superposición estructural Modelo MMFF94x (verde) y 5X61_B (rojo) . . . . .                      | 26 |
| 15 | Gráfico de Ramachandran para el modelo optimizado con MMFF94x . . . . .                         | 27 |
| 16 | Superposición de los resultados de acoplamiento para ACh, Propoxur, LQM 919 y LQM 996 . . . . . | 31 |
| 17 | Estructuras generales para diferentes moléculas carbamato . . . . .                             | 32 |
| 18 | Superposición modos de unión para los compuestos <i>O</i> -LQM 006, 181, 667 y 903 . . . . .    | 33 |
| 19 | Superposición modos de unión para los compuestos <i>O</i> -LQM 904, 906, 914 y 917 . . . . .    | 34 |
| 20 | Superposición modos de unión para los compuestos <i>O</i> -LQM 919, 932, 934 y 935 . . . . .    | 35 |
| 21 | Superposición modos de unión para los compuestos <i>O</i> -LQM 938, 939, 996 y 997 . . . . .    | 36 |
| 22 | Perfil de energía potencial durante la trayectoria de la proteína en su forma libre . . . . .   | 39 |
| 23 | RMSD para la trayectoria de la proteína en su forma libre . . . . .                             | 39 |
| 24 | RMSD para la simulación de 4 sistemas Enzima-Ligando . . . . .                                  | 40 |
| 25 | Perfil de interacciones AChE-ACh . . . . .  | 41 |

## Índice de tablas

|    |   |    |
|----|---|----|
| 1  | Ectoparasiticidas con actividad neurotóxica . . . . .   | 6  |
| 2  | Compuestos reguladores del crecimiento en insectos . . . . .  | 6  |
| 3  | Aminoácidos involucrados en el sitio activo . . . . .   | 11 |
| 4  | Compuestos utilizados como inhibidores de AChE y su aplicación en diferentes enfermedades . . . . .           | 12 |
| 5  | Estructuras de los compuestos estudiados . . . . .  | 22 |
| 6  | Resultados de alineamiento para posibles estructuras plantilla . . . . .                                      | 24 |
| 7  | Modelos de homología para AChE . . . . .  | 26 |
| 8  | Resultados para la superposición de los conformeros de menor energía de Propoxur, LQM 919 y LQM 996 . . . . . | 28 |
| 9  | Resultados de acoplamiento molecular con AChE . . . . .   | 30 |
| 10 | Comparación $\Delta G_{unión}$ e inhibición enzimática de 4 ligandos . . . . .                                | 30 |
| 11 | Resultados de acoplamiento molecular para los compuestos <i>O</i> -LQM 006, 181, 667 y 903 . . . . .          | 33 |
| 12 | Resultados de acoplamiento molecular para los compuestos <i>O</i> -LQM 904, 906, 914 y 917 . . . . .          | 34 |
| 13 | Resultados de acoplamiento molecular para los compuestos <i>O</i> -LQM 919, 932, 934 y 935 . . . . .          | 35 |
| 14 | Resultados de acoplamiento molecular para los compuestos <i>O</i> -LQM 938, 939, 996 y 997 . . . . .          | 36 |
| 15 | Resultados de acoplamiento molecular AChE . . . . .   | 37 |
| 16 | Protocolo de dinámica molecular . . . . .   | 38 |
| 17 | Residuos de AChE involucrados en la estabilización de los sistemas . . . . .                                  | 41 |

## Índice general

|   |     |
|---|-----|
| <i>Agradecimientos</i> . . . . .                                  | III |
| <i>Abreviaturas</i> . . . . .                                     | IV  |
| 1. <i>Introducción</i> . . . . .                                  | 1   |
| 2. <i>Antecedentes</i> . . . . .                                  | 2   |
| 2.1 Garrapatas . . . . .  | 2   |
| 2.2 Métodos de control . . . . .                                  | 5   |
| 2.3 Acetilcolinesterasa . . . . .                                 | 8   |
| 2.4 Carbamatos . . . . .  | 13  |
| 2.5 Diseño de fármacos asistido por computadora (DiFAC) . . . . . | 14  |
| 2.6 Química computacional . . . . .                               | 14  |
| 2.7 Mecánica Molecular . . . . .                                  | 15  |
| 2.8 Modelado por homología . . . . .                              | 16  |
| 3. <i>Hipótesis</i> . . . . .                                     | 18  |
| 4. <i>Objetivos</i> . . . . .                                     | 19  |
| 4.1 Objetivo General . . . . .                                    | 19  |
| 4.2 Objetivos Particulares . . . . .                              | 19  |
| 5. <i>Metodología</i> . . . . .                                   | 20  |
| 5.1 Preparación de estructuras . . . . .                          | 20  |
| 5.2 Acoplamiento molecular . . . . .                              | 21  |
| 5.3 Dinámica Molecular . . . . .                                  | 21  |
| 6. <i>Resultados y Discusión</i> . . . . .                        | 24  |
| 6.1 Modelado por homología . . . . .                              | 24  |
| 6.2 Optimización de ligandos . . . . .                            | 28  |
| 6.3 Acoplamiento molecular . . . . .                              | 28  |
| 6.4 Dinámica Molecular . . . . .                                  | 38  |
| 7. <i>Conclusiones</i> . . . . .                                  | 42  |

## 1. INTRODUCCIÓN

La química medicinal es por naturaleza una rama altamente interdisciplinaria y de vital importancia para la industria farmacéutica. Una definición dada por la IUPAC es la siguiente: "La química medicinal concierne el descubrimiento, el desarrollo, la identificación y la interpretación del modo de acción de compuestos biológicamente activos a un nivel molecular. Se hace énfasis en los fármacos, sin embargo, los intereses no se detienen ahí y aplican a compuestos bioactivos en general."

El interés central en la química medicinal es el descubrimiento de fármacos y la resolución de problemas al diseñar nuevas moléculas para optimizar sus propiedades biológicas, para ello, es necesario involucrar conocimientos sobre síntesis orgánica, bioquímica, farmacología, inmunología, biología molecular, bioinformática, espectroscopía, análisis estadístico y simulación computacional.

Un aspecto importante de la química medicinal es participar en el entendimiento de las enfermedades para colaborar en la producción de entidades químicas con propósitos medicinales y así contribuir a una vida más sana.

El desarrollo de fármacos es un procedimiento amplio y costoso, así que, para agilizar este proceso se involucran técnicas de simulación computacional, lo cual se ha vuelto una parte imprescindible, ya que permite identificar y optimizar compuestos como posibles candidatos a fármacos antes de ser sintetizados.

Así pues, mediante el enfoque de la química computacional, en el presente trabajo se busca colaborar en la resolución de un problema global, económico y de salud como es la infestación por garrapatas en el ganado.

La necesidad de nuevos compuestos para controlar esta plaga se precisa debido a dos razones: utilizar productos con baja toxicidad tanto en humanos como animales y hacer frente a la resistencia que presentan las garrapatas a los productos convencionales.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Garrapatas

Las garrapatas (*Ixodoidea*) son artrópodos acarinos que se distinguen por ser ectoparásitos hematófagos. Se clasifican en 3 tipos de familias de acuerdo con su morfología: *Ixodidae* (garrapatas duras) *Argasidae* (garrapatas blandas) y *Nuttalliellidae* (especie única: *N. namaqua*).<sup>1</sup>

Estos organismos son parásitos de un gran número de reptiles, aves y mamíferos tanto silvestres como domésticos. En cuanto a mamíferos, parasitan principalmente al ganado bovino pero también se pueden encontrar en caballos, mulas, ovejas, cabras, venados, cerdos, liebres, perros e incluso existen hallazgos de casos con humanos como hospederos. La infestación por garrapatas es considerado un problema de importancia global debido a que este parásito es gran reservorio de agentes patógenos. Se considera el segundo grupo de vectores de enfermedades que afectan a humanos, después del mosquito, y el más importante vector de enfermedades que afectan a los animales salvajes y domésticos.<sup>2,3</sup>

Una vez que se adhieren al hospedero, a través de su mordida y distintos fluidos, son capaces de transmitir microorganismos como protozoarios: (*Babesia spp* y *Theileria spp*), bacterias: (*Rickettsia spp*, *Ehrlichia spp* y *Anaplasma spp*) virus: (*Nairovirus*, *Flavivirus* y *Asfavirus*) y nemátodos: (*Acanthocheilonema*).<sup>4</sup>

Las pérdidas en producción se deben a efectos directos e indirectos de estos parásitos sobre el ganado: mordeduras en la piel, pérdida considerable de sangre, anemia, disminución de peso, disminución de la producción láctea en vacas lecheras, bajas en la fertilidad, además, las enfermedades que transmiten dificultan la comercialización e importación de razas para incrementar la calidad genética en áreas infestadas.<sup>4</sup>

Debido a su gran capacidad de adaptación, las garrapatas se han propagado a diversos hábitats terrestres. Pueden encontrarse desde el nivel del mar hasta los 2600 metros sobre el nivel del mar y con fluctuaciones de lluvia de 400 a 2800 mm anuales.<sup>4</sup> Dentro del género *Rhipicephalus* de garrapatas duras, se clasifican 5 especies de las cuales *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* es la especie más relevante para la ganadería bovina.<sup>1</sup>

*Rhipicephalus microplus* (Figura 1) es una plaga endémica de las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Se extiende en gran parte de Asia, noroeste de Australia, sureste de África y en América: México y varios países de Centroamérica, Sudamérica y el Caribe.<sup>5</sup>



Fig. 1: Vista dorsal de *R. microplus*. A: Hembra B: Macho (Tomado de Faccioli<sup>3</sup>)

En México, se han registrado 82 especies de garrapata, equivalente a un 11.3% de la diversidad mundial, siendo *R. microplus* la de mayor importancia por su gran impacto negativo tanto económico como sanitario.<sup>6</sup> La pérdida económica total estimada, relacionada con la infestación de *R. microplus* en la ganadería mexicana, alcanza aproximadamente los 574 millones de dólares (USD) al año.<sup>7</sup>

La garrapata *R. microplus*, en México (Figura 2), presenta un área de distribución de 1,292,407.02 Km<sup>2</sup>, abarcando zonas tropicales templadas y áridas que cubren 65.96% del territorio mexicano.<sup>2</sup>



Fig. 2: Situación de control en la República Mexicana

### Ciclo biológico

A pesar de que *R. microplus* es capaz de vivir en diferentes huéspedes, casi exclusivamente se encuentra en el ganado. El ciclo biológico de la garrapata (Figura 3) puede dividirse en dos fases generales: cuando se encuentra en el huésped (fase parasitaria) y cuando se encuentra a la intemperie (fase libre).<sup>8</sup>

La fase libre comienza con el desprendimiento natural de la garrapata hembra fecundada para buscar un lugar, con condiciones favorables de humedad y temperatura, donde realizar la puesta de huevos. En esta fase se pueden identificar varias etapas: ovoposición, incubación, eclosión y búsqueda de un nuevo huésped.

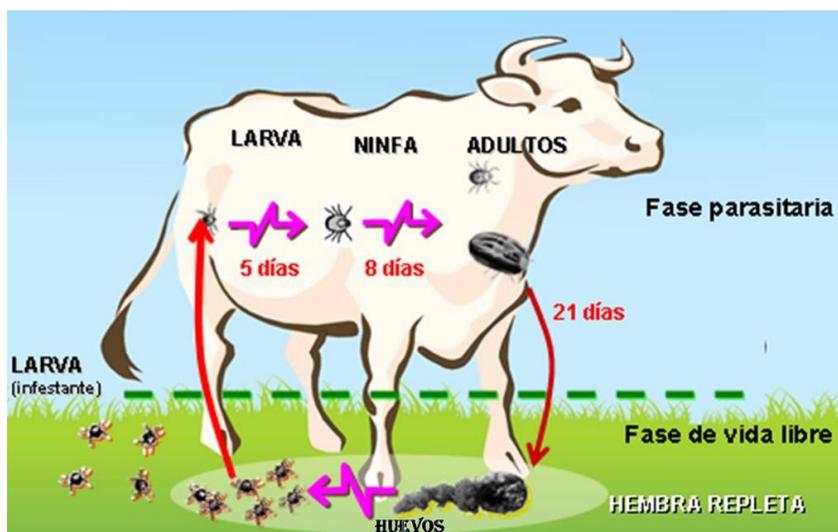


Fig. 3: Esquema del ciclo biológico de la garrapata

Los huevos de garrapata, protegidos del sol, con una temperatura mayor de 15 °C y humedad alrededor del 95 % llegan a eclosionar de 14 hasta 100 días después de ser depositados. Una vez que nacen las larvas trepan en la vegetación y se mantienen latentes hasta encontrar un huésped, la supervivencia de las larvas varía de 20 a 240 días dependiendo de las condiciones climáticas.

La fase parasitaria comienza una vez que el artrópodo se adhiere al hospedero, a partir de este punto se alimenta a expensas de éste y pasa por tres etapas de desarrollo: larva, ninfa y adulto, cada una dura 7 días aproximadamente. Para la garrapata ésta fase es independiente a las inclemencias del clima.

La fase libre llega a durar 300 días mientras que la fase parasitaria, relativamente más corta, dura entre 18 y 22 días. Sin embargo, dadas las condiciones, el promedio de duración de un ciclo completo de la garrapata es de 50 a 70 días.

## 2.2 Métodos de control

El problema de las garrapatas es una amenaza económica muy importante para la ganadería mexicana. En la actualidad existen varias metodologías utilizadas para el control de los ectoparásitos.<sup>6</sup>

**Control químico** Uso de extractos de plantas con efecto ixodicida y uso de compuestos orgánicos sintéticos para romper el ciclo de vida de las garrapatas.

**Control no químico** Selección de ganado resistente a garrapatas, introducción de depredadores naturales como algunos tipos de pájaros y hormigas, rotación y quema de praderas, uso de agentes biológicos que afecten los estadios de vida libre de las garrapatas, modificación en el tipo de vegetación afectando la evolución de huevos y larvas y aplicación de vacunas.

**Control integrado** Consiste en la combinación de al menos dos métodos que sean compatibles para evitar la formación de individuos resistentes, mantener niveles bajos de plaga y procurar un adecuado nivel de producción del ganado.

En México, la principal estrategia para el control de *R. microplus* en el ganado es el empleo de agentes ixodicidas o bien, ectoparasiticidas.<sup>6</sup> La mayoría de los ectoparasiticidas (Tabla 1) actúan como neurotoxinas en las sinapsis del sistema nervioso central, los axones o las uniones neuromusculares de las garrapatas, lo que conduce a una parálisis espástica o flácida.<sup>9</sup>

Tabla 1: Ectoparasiticidas con actividad neurotóxica

| Tipo de compuesto        | Mecanismo de acción   | Ejemplos                                    |
|--------------------------|---|---|
| Organoclorados           | Inhibición en la conductancia de canales de sodio.<br>Inhibición de receptores GABA (ácido aminobutírico) | DDT, Dieldrina, Toxafeno, Lindano           |
| Organofosforados         | Inhibidores de Colinesterasas   | Diazinon, Malation, Chlorpirifos, Citioato  |
| Carbamatos               | Inhibidores de Colinesterasas   | Carbaryl<br>Bendiocab<br>Propoxur           |
| Formamidinas             | Antagonista de octopamina   | Amitraz                                     |
| Fenilpirazoles           | Inhibición de receptores GABA (ácido -aminobutírico)  | Fipronil                                    |
| Lactonas macrocíclicas*  | Inhibición de receptores GABA (ácido -aminobutírico) y receptores glutamato.                              | Avermectina<br>Moxidectina<br>Doramectina   |
| Piretroides y Piretrinas | Bloqueo de canales de sodio   | Cipermetrina<br>Deltametrina<br>Fenvalerato |
| Nitroguanidinas          | Inhibidor de receptores nicotínicos   | Imidacloprid                                |

El constante uso de estos químicos ha dado como resultado el desarrollo de poblaciones resistentes. La resistencia a los acaricidas convencionales se ha identificado como el problema más común al que se ve enfrentado la ganadería mexicana.<sup>7</sup>

Otro tipo de ectoparasiticidas, son los reguladores del crecimiento de insectos (IGR), (Tabla 2), los cuales interfieren principalmente en el desarrollo embrionario, larvario y ninfal, alterando la metamorfosis y la reproducción de los artrópodos. Como resultado, los IGR no suelen matar directamente a las plagas objetivo y, por lo tanto, requieren más tiempo para reducir las poblaciones de ectoparásitos que los insecticidas convencionales. El hecho de que actúen sobre fenómenos específicos de insectos proporciona a los IGR un alto grado de selectividad entre insectos y vertebrados.<sup>10,11</sup>

Tabla 2: Compuestos reguladores del crecimiento en insectos

| Reguladores                        | Efecto en parásitos   | Ejemplos   |
|------------------------------------|---|--|
| Análogos de hormonas juveniles     | Prevenir la metamorfosis de la larva. Acelerar el proceso de muda                 | Metopreno, Fenoxycarb, Piriproxifen, Tebufenocida                        |
| Inhibidores de síntesis de quitina | Inhibir el desarrollo del exoesqueleto. Inducir la producción de huevos estériles | Benzofenilureas: Diflubenzuron, Triflumuron, Buprofezina                 |
| Inhibidores de quitina             | Alterar la deposición de quitina. Prevenir la muda de larvas                      | Derivados de triazina: Ciromazina<br>Derivados de pirimidina: Diciclanil |

Prado Ochoa y colaboradores de la FES - Cuautitlán,<sup>12</sup> han reportado el desarrollo de nuevos compuestos garrapaticidas del grupo de los carbamatos. Dos compuestos con código de identificación LQM 919 y LQM 996, presentados en la figura 4, sobresalen por su elevada eficacia 99.97 % y 98.30 % respectivamente; sobre una cepa de *R. microplus* triple resistente a compuestos organofosforados, piretroides y amidinas.

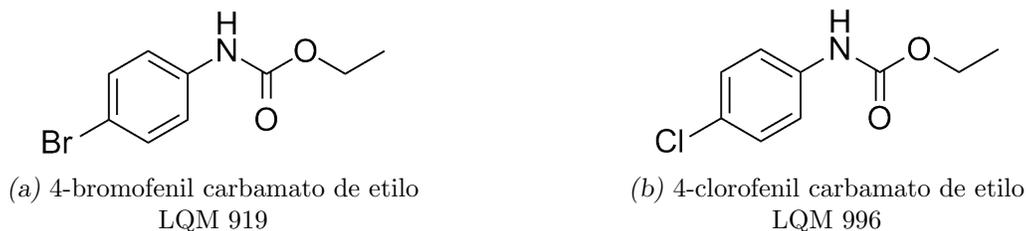


Fig. 4: Compuestos de la serie LQM 900

Contrario al efecto neurotóxico conocido de los carbamatos sobre la garrapata, se ha demostrado que la actividad ixodicida de estos nuevos compuestos no se limita a la inhibición de colinesterasas. Ensayos enzimáticos indican que los compuestos LQM 919 y 996 tienen una baja afinidad por la enzima acetilcolinesterasa, al reducir su actividad en poco menos de un 40 %, comparado con el carbamato comercial Propoxur el cual inhibe la actividad enzimática hasta en un 99 %.<sup>13</sup>

La eficacia de estos compuestos se debe al conjunto de parámetros biológicos que se ven afectados negativamente en la garrapata que son: reducción de hembras repletas por daño al sistema reproductor, disminución en oviposición y baja eclosión, que resulta en un mínimo número de larvas disponibles para la siguiente generación.<sup>14</sup> Esto abre la posibilidad de estudiar nuevos mecanismos de acción de los carbamatos, así también, proporciona información para llevar a cabo el diseño de nuevos compuestos con actividad sobre las enzimas colinesterasas.

### 2.3 Acetilcolinesterasa

La familia de enzimas conocidas como colinesterasas pueden definirse como un grupo de esterasas capaces de hidrolizar ésteres de colina, tales como la Acetilcolina (Figura 5). La acetilcolinesterasa (AChE) es de las principales enzimas que ejercen su acción en el sistema nervioso central (SNC). Principalmente se encuentra en las uniones neuromusculares y en las sinapsis colinérgicas del cerebro donde termina el efecto del neurotransmisor Acetilcolina por su rápida hidrólisis en acetato y colina.<sup>15</sup>

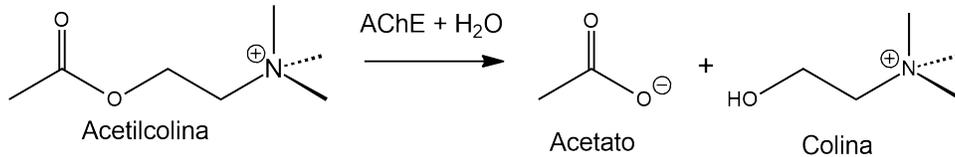


Fig. 5: Ecuación general para la hidrólisis enzimática de ACh por AChE

En los artrópodos se encuentra principalmente en la región denominada neurópilo localizada en el ganglio supraesofágico o cerebro artrópodo. La principal función del cerebro artrópodo es asimilar información sensorial, procesarla y seleccionar un comportamiento adecuado. Éste se encuentra dorsalmente en la cabeza y consta de tres pares de ganglios: el *protocerebrum* (que inerva estructuras que controlan la visión); *deutocerebrum* (que inerva estructuras encargadas de la quimiosensación y la sensación táctil); y el *tritocerebrum* (que integra información sensorial del *protocerebrum* y el *deutocerebrum*).

Todos los ganglios constan de tres partes representados en la figura 6: Tractos o fibras nerviosas que conectan cada ganglio con su vecino. Fibras comisurales que consisten en un haz de axones que conectan bilateralmente los ganglios de un lado a otro. Neurópilo: Es la región central donde ocurre la sinapsis neuronal.<sup>16,17</sup>

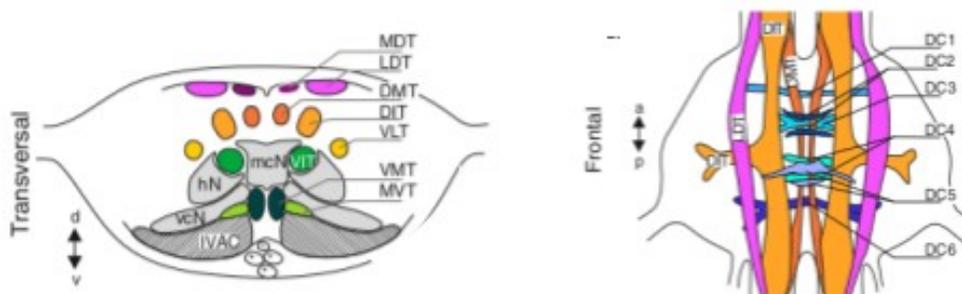


Fig. 6: Vista transversal y frontal del cerebro artrópodo

El incremento de estructuras tridimensionales resueltas cristalográficamente ha ayudado a describir con precisión las características estructurales generales de enzimas así como de sus sitios activos en complejos con sustratos e inhibidores.

Actualmente existen 223 archivos de estructuras referentes a acetilcolinesterasa en la base de datos PDB (Protein Data Bank), predominando los organismos de raya eléctrica, ratón y humano: *Tetronarce californica* 44.8%, *Mus musculus* 37.1% y *Homo sapiens* 9.1% respectivamente.<sup>18</sup>

Con la resolución de la primera estructura tridimensional de la enzima AChE de *Tetronarce californica* en 1991<sup>19</sup> se demostró que pertenece al grupo de enzimas  $\alpha/\beta$  hidrolasas. Entre los miembros de esta familia de enzimas se conserva una plataforma de hoja plegada- $\beta$  de 8 hebras y 6 hélices- $\alpha$  unidos a través de giros variables (loops) que cargan con la maquinaria catalítica (Figura 7). El plegamiento de esta proteína localiza al sitio catalítico en el fondo de una hendidura estrecha de aproximadamente 20 Å a lo largo de la enzima.<sup>20,21</sup>

Sorpresivamente la AChE realiza una catálisis muy eficiente, tal que las reacciones con sustratos e inhibidores dependen fundamentalmente de procesos de difusión a pesar de que el sitio catalítico de AChE se encuentre enterrado en el fondo de la hendidura.

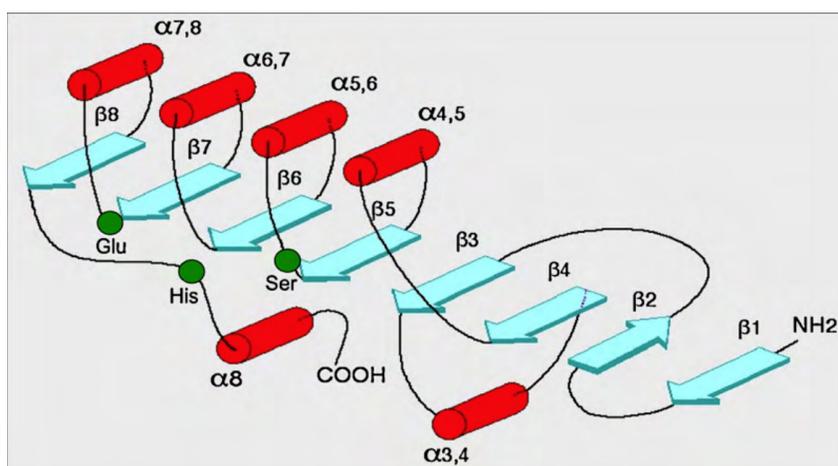


Fig. 7: Esquema de la estructura secundaria conservada en colinesterasas

La triada catalítica de estas enzimas es variable, la más común es la respectiva a serina hidrolasa, conformada por los aminoácidos Ácido Glutámico, Histidina y Serina, residuos ácido-básico-nucleófilo respectivamente, estos residuos están alineados de tal manera que intercambian electrones y el residuo serina se vuelve reactivo. Por estudios de mutagénesis dirigida se ha determinado que la AChE pertenece a este tipo de enzimas con triada Ser - Glu - His.<sup>22</sup>

El proceso catalítico del sustrato ACh (Figura 8) involucra la acilación y desacilación del residuo Ser del centro activo de la enzima por hidrólisis del enlace éster. El mecanismo de hidrólisis del sustrato natural, ocurre en tres etapas.<sup>23</sup>

1. Interacción inicial del sitio activo de la proteína con el grupo éster del ligando y formación del complejo activado.
2. Hidrólisis del enlace éster con formación de un enlace covalente entre el sustrato y el oxígeno serínico de la enzima.
3. Restitución de la actividad enzimática en la que participan moléculas de agua en el entorno del hidroxilo serínico.

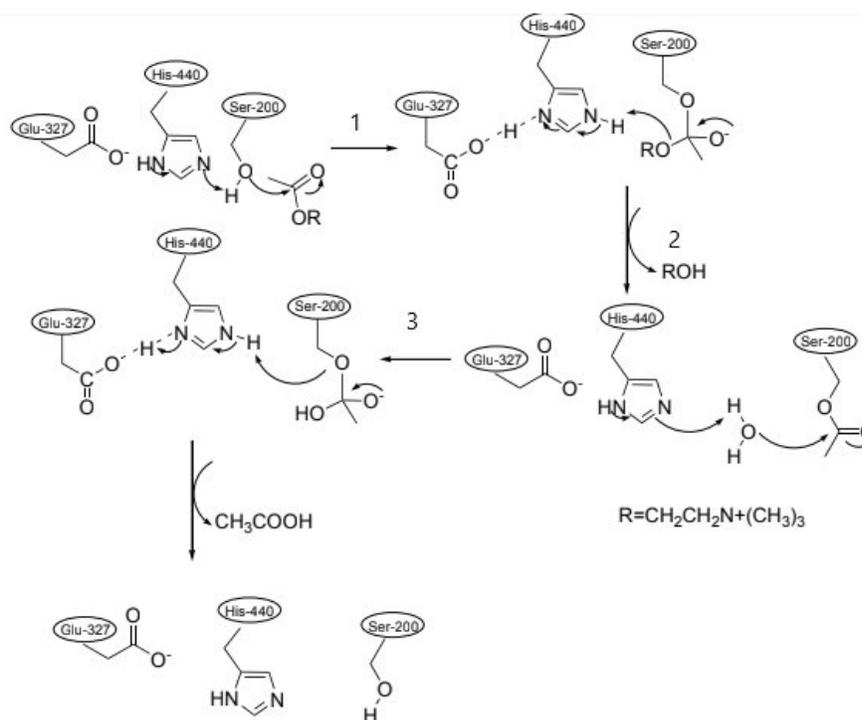


Fig. 8: Mecanismo de reacción para la hidrólisis de grupos éster

La hendidura del sitio activo de AChE involucra un gran número de residuos, estudios cinéticos indican que se divide en 2 principales regiones representadas en la figura 9: el sitio de acilación catalítica (CAS) que contiene la triada catalítica y un sitio periférico formado por residuos en su mayoría aromáticos (PAS).<sup>24</sup> En la tabla 3 se listan los residuos que conforman la cavidad del sitio de AChE para dos organismos *T. californica* y *R. microplus*.

El sitio catalítico (CAS) a su vez tiene dos subdivisiones que interactúan en el proceso catalítico de ACh un bolsillo acilo y un agujero oxianiónico.

El bolsillo acilo está formado de residuos aromáticos cuyas interacciones con el sustrato dan lugar al complejo activado. En la adición de Serina al carbonilo del grupo acetilo se reduce el

doble enlace y se forma un oxianión el cual se estabiliza por interacción con amidas de la cadena principal de los residuos que conforman el agujero oxianiónico.<sup>25</sup>

El sitio periférico suele también dividirse entre los residuos expuestos en la entrada de la cavidad y los que están al fondo, estos últimos se clasifican como el sitio aniónico o de unión a amonio cuaternario ya que aquí se efectúa el reconocimiento de AChE con inhibidores reversibles, además de que algunos residuos interactúan directamente con el grupo amonio de ACh.<sup>26</sup>

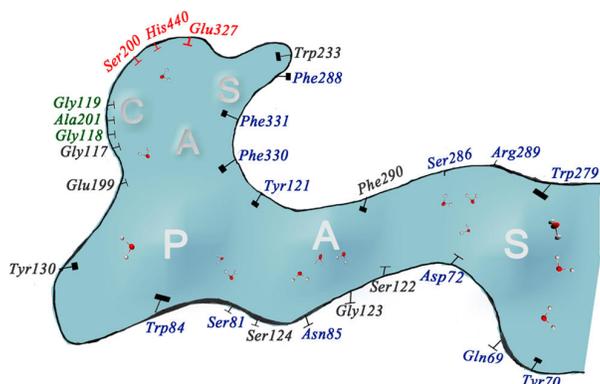


Fig. 9: Esquema de aminoácidos que constituyen la hendidura, valores de residuos correspondientes al organismo *T. californica*

Tabla 3: Aminoácidos involucrados en el sitio activo

| Sitio de interacción            | <i>T. californica</i>   | <i>R. microplus</i>  |
|---------------------------------|---|--|
| Triada catalítica<br>CAS        | Ser 200<br>Glu 327<br>His 440                                 | Ser 256<br>Glu 381<br>His 494                                  |
| Bolsillo Acilo<br>CAS           | Trp 233<br>Phe 288<br>Phe 290                                 | Trp 289<br>Val 341<br>Phe 343                                  |
| Agujero oxianiónico<br>CAS      | Gly 119<br>Ala 201<br>Gly 118<br>Gly 117                      | Gly 176<br>Ala 257<br>Gly 175<br>Gly 174                       |
| Unión amonio cuaternario<br>PAS | Trp 84<br>Tyr 130<br>Glu 199<br>Phe 330<br>Phe 331<br>Tyr 442 | Trp 137<br>Tyr 187<br>Glu 255<br>Trp 384<br>Phe 385<br>Glu 496 |
| Periférico<br>PAS               | Tyr 70<br>Asp 72<br>Tyr 121<br>Glu 278<br>Trp 279<br>Tyr 334  | Val 123<br>Asp 125<br>Tyr 178<br>Glu 334<br>Thr 335<br>Tyr 388 |

### *Inhibidores de Acetilcolinesterasa*

Existe una gran variedad de compuestos, con actividad farmacológica, que su mecanismo de acción radica en la inhibición enzimática de AChE. Estos realizan una inactivación de la enzima disminuyendo su capacidad catalítica lo que causa el incremento de la concentración del neurotransmisor ACh. De acuerdo al modo de inactivación (Tabla 4), estos compuestos pueden dividirse en dos principales grupos: reversibles e irreversibles.

Los inhibidores reversibles de AChE se caracterizan por formar interacciones no enlazantes o de larga distancia en el sitio aniónico periférico y en su mayoría son utilizados en aplicaciones terapéuticas. Por el contrario, los inhibidores irreversibles son asociados a efectos tóxicos y son aquellos que forman enlaces covalentes estables con el aminoácido serina de la región catalítica en el sitio activo.<sup>27</sup>

*Tabla 4:* Compuestos utilizados como inhibidores de AChE y su aplicación en diferentes enfermedades

| Modo de inhibición | Tipo de compuesto                                 | Aplicación  |
|--------------------|---|---|
| Irreversible       | Metopreno, Fenoxycarb, Piriproxifen, Tebufenocida | Prevenir la metamorfosis de la larva, acelerar el proceso de muda                           |
| Reversibles        | Alcaloides  | Alzheimer   |
|                    | Derivados de Piperidina                           | Alzheimer, Autismo  |
|                    | Derivados de Piridina                             | Alzheimer   |
| Pseudoreversibles  | Carbamatos  | Insecticidas, Herbicidas, Miastemia grave, Demencia (Cuerpos de Lewy), Alzheimer, Parkinson |

### 2.4 Carbamatos

Los carbamatos son compuestos orgánicos derivados del ácido carbámico  $\text{NH}_2\text{COOH}$ . La estructura general de los carbamatos se muestra en la figura 10

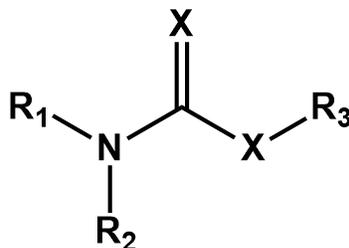


Fig. 10: Estructura general de carbamatos

Donde la X puede ser Oxígeno (carbamato) o Azufre (tiocarbamato),  $\text{R}_1$  y  $\text{R}_2$  suelen ser sustituyentes orgánicos, alquilo o hidrógeno, comúnmente  $\text{R}_3$  es algún sustituyente orgánico.

Los carbamatos han sido utilizados como drogas terapéuticas en la medicina humana, como pesticidas para el control de hierbas, bacterias y en la medicina veterinaria como parasiticidas.<sup>27</sup>

Los carbamatos, al igual que los compuestos organofosforados, son capaces de unirse covalentemente al aminoácido Serina del sitio catalítico de AChE por medio de la reacción de carbamitación o fosforilación respectivamente.

Sin embargo, el complejo Enzima-Inhibidor que se forma, mediante la reacción de carbamitación tiene baja estabilidad lo cual resulta en una hidrólisis espontánea del residuo Ser. Mientras que la alta estabilidad del complejo AChE-Organofosfato resulta en una unión irreversible.<sup>27</sup>

### 2.5 Diseño de fármacos asistido por computadora (DiFAC)

Durante muchos años el descubrimiento de fármacos fue un proceso de “ensayo y error” en donde la eficacia de ciertos compuestos era probada meramente en ensayos biológicos, lo cual limitaba la diversidad de estructuras químicas a explorar. Esto se vio beneficiado con el desarrollo e implementación de la química computacional en este proceso.

El diseño de fármacos es un proceso iterativo que involucra múltiples métodos y técnicas con la finalidad de relacionar la estructura molecular de un compuesto con su actividad biológica. El ideal del desarrollo de moléculas activas es encontrar nuevas maneras de regular la función de ciertos receptores biológicos, así como una inhibición total en organismos patógenos.<sup>28</sup>

Los enfoques implementados en el desarrollo de fármacos se dividen en tres grandes ramas bien puntualizadas por las frases acuñadas del latín: *in vivo*, *in vitro* e *in silico*.<sup>29</sup>

Los estudios *in vivo* se realizan dentro de un organismo y a menudo se realiza análisis partiendo de una observación de efectos finales en el sujeto de estudio. En este tipo de estrategia se suele determinar la biodisponibilidad o toxicidad de algún fármaco, así también las propiedades de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME). De igual manera la farmacodinámica y la farmacocinética son ampliamente estudiadas.

En cuando a los estudios denominados *in vitro*, la experimentación se realiza como ensayo clínico fuera del los organismos de

Los métodos *in silico* involucrados en el DiFAC abarcan el análisis estructural de ligandos y receptores para predecir la naturaleza y magnitud de su interacción. Los métodos modernos para el DiFAC caen en dos grandes categorías: los métodos basados en la estructura del ligando y los basados en la estructura del receptor.

En el DiFAC, uno de los enfoques para determinar la relación estructura-actividad de fármacos se basa en el conocimiento preciso de la estructura tridimensional del blanco biológico, designado como receptor, así también de las estructuras de fármacos. Lo ideal para la determinación estructural es mediante técnicas como: cristalografía de rayos X, microscopía electrónica o resonancia magnética nuclear.

### 2.6 Química computacional

A finales de los años setenta apareció la química computacional como nueva disciplina, impulsada por las principales compañías farmacéuticas del mundo interesadas en la química medicinal para el diseño de moléculas.<sup>30</sup>

Con los avances tecnológicos en cómputo, dispositivos más rápido y más baratos; así como en el desarrollo de modelos y métodos numéricos más eficientes para describir sistemas químicos, la química computacional se ha vuelto una herramienta complementaria casi imprescindible a las técnicas experimentales tradicionales.<sup>30</sup>

Química computacional se utiliza para describir aquellas técnicas computacionales que son utilizadas para comprender la estructura y las propiedades de moléculas y materiales. Involucra

el uso de algoritmos matemáticos, estadística, creación de modelos, simulación computacional y manejo de largas bases de datos.

### 2.7 Mecánica Molecular

En el estudio de sistemas químicos el éxito recae en la calidad del modelo utilizado, desde un enfoque computacional es necesario un modelo matemático eficaz para calcular la energía del sistema como función de su estructura.

La química cuántica es apropiada para estudiar sistemas químicos con limitaciones en tamaño de aproximadamente 100 átomos o menos. Por otra parte, estudios de interés bioquímico en donde se involucran macromoléculas que contienen 1000 - 5000 átomos, más modelado del ambiente fisiológico no pueden ser abordados con la química cuántica por el gran tiempo de cálculo necesario, principalmente por las limitaciones de procesamiento computacional.

La mecánica molecular utiliza modelos en los cuales los átomos son las partículas más pequeñas del sistema en lugar de considerar electrones y núcleos como lo hace la química cuántica. Esto permite realizar el cálculo de energía de sistemas bioquímicos y su ambiente con el uso de modelos matemáticos y su apropiada optimización de parámetros para lograr la exactitud química deseada.<sup>31</sup> El uso de funciones empíricas para calcular la energía de sistemas bioquímicos logra cumplir con las demandas requeridas. Las ecuaciones matemáticas reproducen las interacciones físicas y electrostáticas que dictan la estructura y propiedades de las moléculas. En la figura 11 se muestra la representación gráfica de las relaciones entre átomos que se consideran: distancia de enlace "b", ángulos de enlace " $\theta$ ", ángulos diedros " $\chi$ " e interacciones a larga distancia entre dos pares de átomos " $r_{ij}$ ".

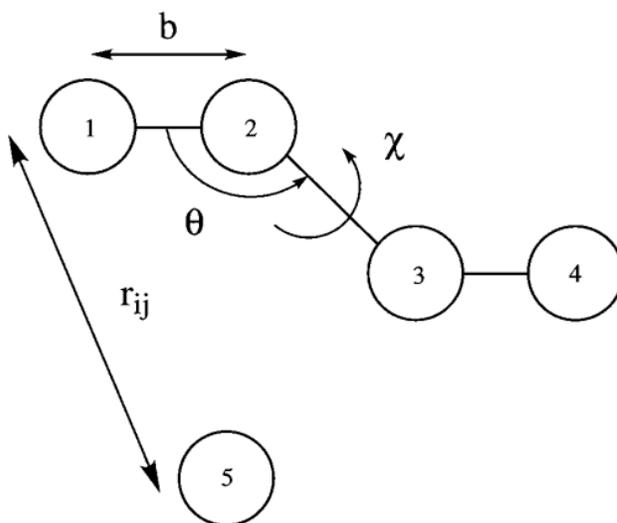


Fig. 11: Representación gráfica de la función potencial

Las funciones potencial son las ecuaciones que permiten calcular la energía potencial "U" de un sistema químico como función de su estructura tridimensional "R". La energía total puede

separarse en los términos intramoleculares e intermoleculares.  $U_{R\ total} = U_{R\ intra} + U_{R\ inter}$

Las funciones matemáticas para definir las interacciones intramoleculares involucran tres términos correspondientes a las variaciones de enlace, ángulos de tres enlaces y ángulos diedros.

$$U_{R\ intra} = \sum_{\text{enlace}} K_b(b - b_0)^2 + \sum_{\text{ángulo}} K_\theta(\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{diedro}} K_\chi[1 + \cos(n\chi - \sigma)]$$

Donde: los términos "b", "θ" y "χ" se obtienen de la estructura tridimensional del sistema, las constantes  $K_b$ ,  $K_\theta$  y  $K_\chi$  representan las constantes de fuerza asociadas, las cuales se determinan experimentalmente o con el empleo de cálculos más precisos de química cuántica. Los parámetros de "b<sub>0</sub>", "θ<sub>0</sub>" y "χ<sub>0</sub>" corresponden a los valores de equilibrio en Ångströms para cada uno de los términos.

En cuanto a las funciones potencial para reproducir las interacciones a larga distancia, se involucran dos términos correspondientes a las interacciones de tipo van der Waals y de tipo electrostático.

$$U_{R\ inter} = \sum_{\text{pares de átomos}} \left( \epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{R_{min,ij}}{r_{ij}} \right)^2 - \left( \frac{R_{min,ij}}{r_{ij}} \right)^2 \right] + \frac{q_i q_j}{\epsilon_D r_{ij}} \right)$$

## 2.8 Modelado por homología

Actualmente, existe una gran brecha entre el número de reportes para la secuenciación de proteínas que el número de resultados para la resolución de estructuras tridimensionales. Esta diferencia se debe a la dificultad que conllevan las técnicas experimentales para la determinación estructural de compuestos en comparación con las técnicas de secuenciación.

Ante este escenario la predicción estructural de proteínas se ha vuelto un campo activo de investigación. Una de las técnicas para modelado por homología<sup>32</sup> se efectúa considerando las siguientes premisas:

- La estructura tridimensional de una proteína está únicamente determinada por su secuencia de aminoácidos. En teoría, conociendo la secuencia es posible obtener la estructura respectiva.
- Secuencias parecidas adoptarán plegamientos similares. Las proteínas que estén relacionadas evolutivamente presentarán residuos conservados entre ellas, con lo cual la topología de sus sitios también se conserva.

Así pues, un modelo de homología se crea a partir de una estructura tridimensional bien conocida y de una similitud aceptada.

La metodología general para el modelado por homología es:

### 1. Reconocimiento de proteína plantilla y alineamiento inicial

Se determina la familia a la cual pertenece la proteína problema (homólogos). Ante bases de datos de estructuras resueltas se determina la similitud lineal. Un equilibrio entre varios parámetros garantiza que ciertas proteínas adoptarán la misma estructura.

## 2. Corrección de alineamiento

Identificada una o más posibles plantillas se realiza un segundo alineamiento teniendo en consideración las regiones conservadas (estructuras secundarias) y las regiones variables (loops). Para determinar la plantilla definitiva se calcula el porcentaje de similitud proteica. La cual se define como el número de aminoácidos conservados por longitud de la secuencia.

## 3. Generación de cadena principal (backbone)

## 4. Modelado de lazos proteicos (loops)

## 5. Modelado de la cadena lateral

Los pasos 3, 4, y 5 se tratan de la creación iterativa de coordenadas atómicas para la secuencia modelo y su correspondiente refinamiento.

Varias consideraciones se llevan a cabo:

- En la generación de la cadena principal se conservan los ángulos diedros para cada residuo.
- Los "loops" se crean de copias conocidas ya reportadas. O es posible modelarse de acuerdo a funciones de energía, donde la predicción de su conformación se basa en cálculos *ab initio*.
- En los residuos conservados las coordenadas atómicas de la cadena lateral se copian de la plantilla.

## 6. Optimización del modelo

La precisión de un modelo dependerá de la conformación ideal de los residuos y la energía respecto a su plegamiento. Para ello se buscan las parametrizaciones que definan correctamente el sistema.

## 7. Validación del modelo

Una manera de validar un modelo de homología es evaluar los impedimentos conformacionales debidos a rotaciones de enlaces y a la diferencia global de coordenadas atómicas respecto a la proteína plantilla. Esto se realiza por medio de el gráfico Ramachandran calculo de RMSD respectivamente.

### 3. HIPÓTESIS

Si experimentalmente se conoce que diferentes compuestos derivados del ácido carbámico poseen la capacidad de reducir la actividad de la enzima Acetilcolinesterasa es posible mediante técnicas computacionales estudiar la información estructural de ambas partes en un complejo enzima-inhibidor para identificar las interacciones necesarias que explique la capacidad inhibitoria de los ligandos.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 *Objetivo General*

Evaluar por medio de técnicas de simulación computacional la afinidad de los compuestos propoxur, LQM 919 y LQM 996 con actividad conocida *in vitro* e *in vivo*, por la enzima acetilcolinesterasa (AChE) de *Rhipicephalus microplus* para proponer una nueva familia de compuestos con actividad ixodicida favorable.

### 4.2 *Objetivos Particulares*

- Recopilar y analizar información existente en bases de datos sobre la enzima acetilcolinesterasa: secuencias de aminoácidos, estructuras tridimensionales y posibles sitios receptores, para generar un modelo de interacción enzima-ligando.
- Elaborar y validar modelos de la estructura terciaria del blanco biológico AChE correspondiente a *R. microplus*, mediante el modelado comparativo (homología), para estudiar sus propiedades químicas en relación a su estructura tridimensional.
- Generar sistemas enzima-ligando empleando como receptor el modelo producido de AChE y como ligandos los compuestos: acetilcolina (ACh), propoxur, LQM 919 y LQM 996, utilizando técnicas de acoplamiento molecular (Docking); para estudiar la afinidad de cada uno en relación a su estructura
- Desarrollar un protocolo de acoplamiento molecular efectivo que correlacione la actividad biológica experimental con la afinidad teórica de los ligandos por la enzima AChE de *R. microplus* y emplearlo para predecir la afinidad de una nueva serie de moléculas del tipo carbamato.
- Estudiar el comportamiento dinámico de complejos tridimensionales enzima-ligando generados, bajo simulaciones dependientes del tiempo utilizando la mecánica molecular para determinar los aminoácidos de importancia en la estabilidad de los complejos.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Preparación de estructuras

Para generar modelos tridimensionales de AChE, primero se seleccionó la secuencia de aminoácidos representativa del organismo *R. microplus* entre los registros existentes en la base de datos UniProt.<sup>33</sup>

Utilizando esta cadena de aminoácidos como punto de búsqueda se realizó un alineamiento de secuencias empleando la herramienta *Blastp* del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI)<sup>34</sup> para identificar posibles proteínas plantillas a utilizar, de acuerdo a la identidad proteica con la secuencia problema.

Posteriormente con el software computacional MOE 2018.01 se llevaron a cabo los cálculos para generar los modelos tridimensionales a partir del alineamiento y de las coordenadas atómicas de la plantilla. Se realizaron optimizaciones estructurales para cada modelo generado.

La mejor estructura se seleccionó de acuerdo a parámetros de validación estructural. Los métodos empleados fueron el gráfico de Ramachandran y el cálculo de desviación media cuadrática (RMSD) de las coordenadas atómicas.

El gráfico de Ramachandran permitió reconocer la calidad estructural de los modelos referente a las combinaciones de los ángulos rotables  $\phi$  (phi) y  $\psi$  (psi) de los aminoácidos que constituyen la proteína.

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \delta_i^2}$$

Desviación de la raíz cuadrada media (RMSD) donde  $N$  es la cantidad total de átomos y  $\delta_i$  es la distancia entre átomos usualmente expresada en Ångström (Å).

El valor de RMSD indica la divergencia global de coordenadas atómicas, resultante de una superposición estructural del modelo y la proteína plantilla, un menor valor significa que el plegamiento de la estructura se conserva mejor entre el modelo y la plantilla.

Las moléculas listadas en la tabla 5 se modelaron con la paquetería computacional MOE 2018.01. Se realizó una optimización estructural mediante una búsqueda conformacional utilizando un método de bajos modos vibracionales "LowModeMD". Para la validación del mismo se compararon datos experimentales de difracción de rayos X con las estructuras generadas de

los compuestos Propoxur, LQM 919 y LQM 996; por medio de una superposición y cálculo de RMSD.

### 5.2 Acoplamiento molecular

Establecido el modelo para la estructura molecular de AChE se procedió a determinar el modo de interacción receptor-ligando, de las moléculas mencionadas en la tabla 5 dentro del sitio activo de la enzima.

Partiendo del mejor modelo de homología generado se realizó un acoplamiento flexible utilizando las conformaciones generadas para cada ligando. Se definió una búsqueda con origen en el oxígeno del residuo Ser 256. Se empleó el método de emparejamiento triangular (Triangle Matcher) y un posterior ajuste inducido (Induced fit).

De los grupos de resultados obtenidos para cada ligando se eligieron aquellos con una correcta orientación dentro del sitio activo, y se realizó el análisis.

### 5.3 Dinámica Molecular

Para el estudio de dinámica molecular se utilizó como sistema los complejos generados previamente por acoplamiento, así también la estructura de AChE sin ligando. Cada sistema se neutralizó agregando iones de sodio  $\text{Na}^+$  para mantener una carga neutra global y se realizó una solvatación con moléculas de agua a condiciones periódicas, generando una caja cúbica continua de 70 Å. Después se realizó una minimización de energía utilizando el campo de fuerza MMFF94x para relajar las moléculas de disolvente en conjunto con las cadenas de la proteína. Posterior a la minimización se realizaron los protocolos de dinámica molecular. Las simulaciones fueron realizadas a condiciones constantes de presión 1 atm y temperatura 300 K.

Este proceso se validó con un modelado por reemplazo de residuos para corroborar la importancia de ciertos aminoácidos en la estabilización del sistema. Se realizaron mutaciones de los residuos involucrados en las interacciones receptor-ligando para cada sistema y se llevó a cabo el mismo protocolo de dinámica molecular.

Tabla 5: Estructuras de los compuestos estudiados

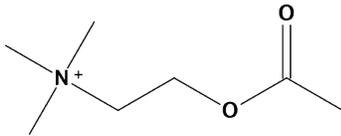
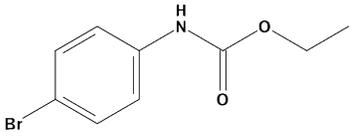
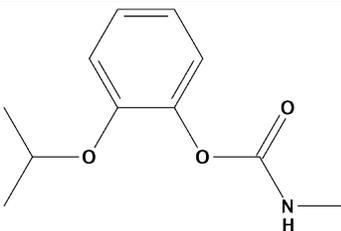
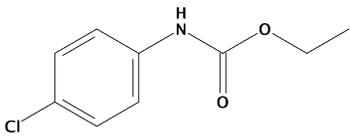
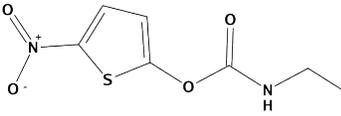
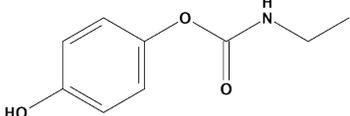
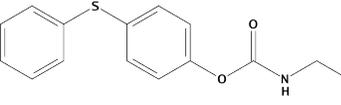
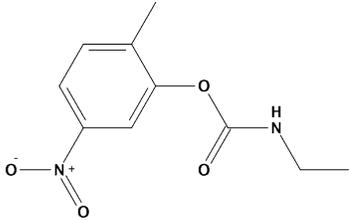
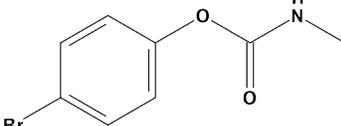
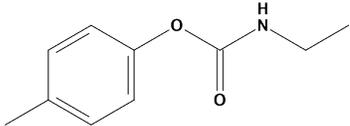
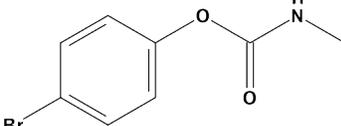
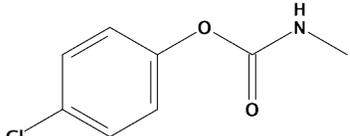
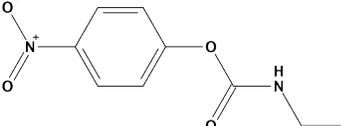
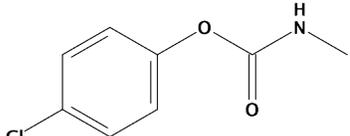
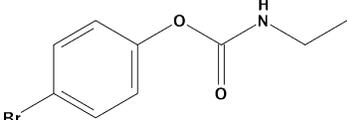
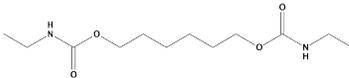
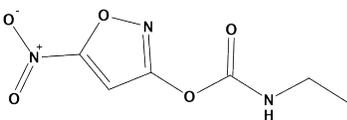
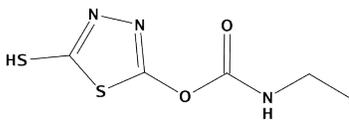
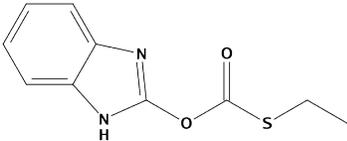
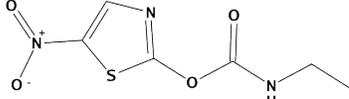
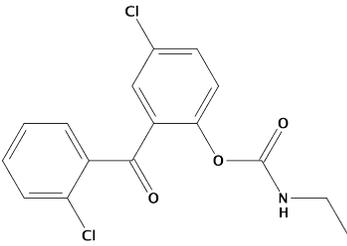
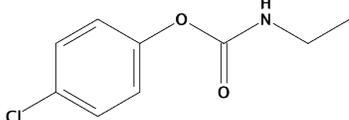
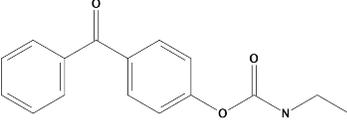
|   |  |
|---|--|
| <p style="text-align: center;">ACh</p>                 | <p style="text-align: center;">LQM 919</p>             |
| <p style="text-align: center;">Propoxur</p>            | <p style="text-align: center;">LQM 996</p>             |
| <p style="text-align: center;"><i>O</i>-LQM 006</p>   | <p style="text-align: center;"><i>O</i>-LQM 181</p>   |
| <p style="text-align: center;"><i>O</i>-LQM 667</p>  | <p style="text-align: center;"><i>O</i>-LQM 903</p>  |
| <p style="text-align: center;"><i>O</i>-LQM 904</p>  | <p style="text-align: center;"><i>O</i>-LQM 906</p>  |
| <p style="text-align: center;"><i>O</i>-LQM 914</p>  | <p style="text-align: center;"><i>O</i>-LQM 917</p>  |
| <p style="text-align: center;"><i>O</i>-LQM 914</p>  | <p style="text-align: center;"><i>O</i>-LQM 917</p>  |

Tabla 5 (Continuación): Estructuras de los compuestos estudiados

|   |  |
|---|--|
| <i>O</i> -LQM 919   | <i>O</i> -LQM 932  |
|    |    |
| <i>O</i> -LQM 934   | <i>O</i> -LQM 935  |
|    |    |
| <i>O</i> -LQM 936   | <i>O</i> -LQM 938  |
|   |   |
| <i>O</i> -LQM 939   | <i>O</i> -LQM 996  |
|  |  |
| <i>O</i> -LQM 997   |  |
|  |  |

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Modelado por homología

Se seleccionó la secuencia con clave A0A0F6P2D6\_RHIMP en la base de datos UniProt, la cual corresponde a la secuenciación del gen AChE1 correspondiente a una cepa de *R. microplus* resistente a compuestos organofosforados.<sup>35</sup> Tiene un status de secuenciación completa, está conformada por 595 aminoácidos con una masa de 65.710 Da.

Utilizando la secuencia antes indicada, se realizó un alineamiento de secuencias con el servidor de NCBI. La búsqueda se realizó con referencia en la base de datos cristalográficos PDB. En la Tabla 6 se listan los resultados para las posibles plantillas. Solo se muestran aquellas con una identidad proteica mayor a 45 %.

Tabla 6: Resultados de alineamiento para posibles estructuras plantilla

| Clave PDB | Cobertura de secuencia (%) | Identidad proteica (%) | Resolución (Å) | Valor $E$            | Organismo                |
|-----------|----------------------------|------------------------|----------------|----------------------|--------------------------|
| 5X61.B    | 88                         | 49.43                  | 3.40           | $1 \times 10^{-171}$ | <i>Anopheles gambiae</i> |
| 5YDH.A    | 88                         | 49.43                  | 3.21           | $3 \times 10^{-171}$ | <i>Anopheles gambiae</i> |
| 5YDJ.A    | 91                         | 48.53                  | 3.04           | $6 \times 10^{-170}$ | <i>Anopheles gambiae</i> |
| 5HQ3.B    | 89                         | 46.04                  | 2.60           | $2 \times 10^{-144}$ | <i>Homo sapiens</i>      |
| 1B41.A    | 88                         | 45.05                  | 2.76           | $3 \times 10^{-144}$ | <i>Homo sapiens</i>      |

Aunque la similaridad proteica que tienen las plantillas es poco menor a un 50 % es suficiente para crear un modelo de homología de AChE de calidad. Algunos autores marcan un limite mínimo de 40 % para identidad proteica entre las secuencias.<sup>36</sup>

La resolución de la estructura plantilla, influirá directamente en la calidad del modelo de homología, aunque, las estructuras de humano tienen mejor resolución que las de mosquito, se prefiere utilizar éstas últimas como plantilla ya que tiene una relación de filogenia más estrecha. Proteínas de organismos con mayor relación evolutiva tendrán mayor número de dominios y plegado protéico más conservados entre ellas.

El valor esperado  $E$  (Expect value) nos permite filtrar los alineamientos de acuerdo a su significancia estadística. Es una puntuación que estima el número de falsos positivos uno puede esperar si el alineamiento se realizara al azar. Mientras menor sea el valor  $E$  mayor significancia tiene la secuencia.

Se eligió la estructura 5X61\_B como plantilla. Utilizando el software MOE se realizó el alineamiento local y posterior cálculo de identidad proteica (Figura 13) entre la secuencia problema de la garrapata y la respectiva 5X61\_B, utilizando 530 aminoácidos del rango Val 57 - Glu 582, en la figura 12 se muestran las cadenas de aminoácidos, los asteriscos representan los residuos conservados.

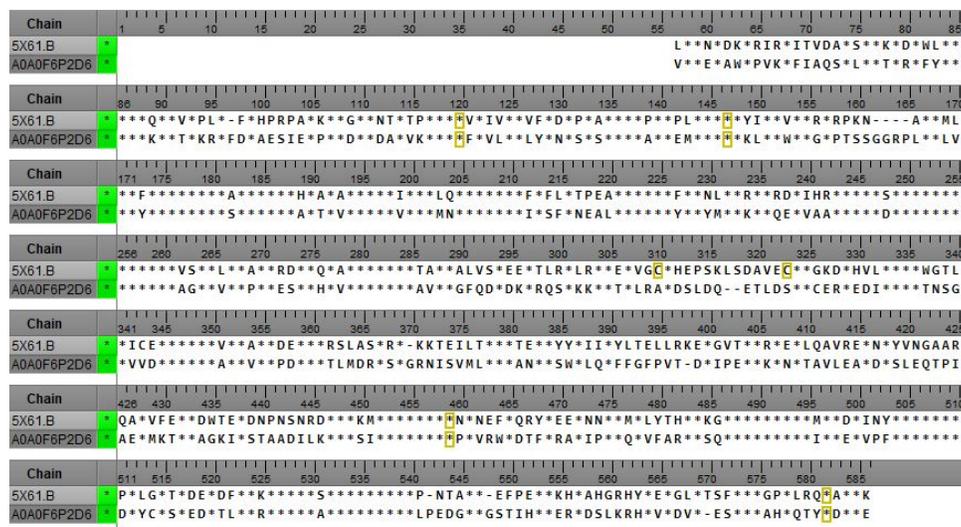


Fig. 12: Alineamiento de secuencias de AChE para *R. microplus* y *A. gambiae*

Utilizando este alineamiento se procedió a crear la estructura tridimensional de la enzima AChE. Para obtener un modelo confiable es necesario crear varios y evaluarlos. Utilizando la herramienta "Homology Model" del software MOE se crearon 10 modelos con la estructura 5X61\_B como plantilla. Para las regiones variables de la proteína, es decir, los residuos que no tienen similitud con la plantilla se utilizó la herramienta de modelado comparativo de cadenas cortas o "loops".

|               | 1    | 2    |
|---------------|------|------|
| 1: A0A0F6P2D6 | 50.4 |      |
| 2: 5X61.B     |      | 50.0 |

Fig. 13: Matriz de puntuación para el alineamiento de secuencias

Los modelos generados se refinaron y evaluaron con una función GB/VI, después se protonó el sistema bajo las condiciones de pH = 7 y 300 K de temperatura. Posteriormente se realizó una optimización estructural de cada modelo con diferentes campos de fuerza y se eligió el mejor de acuerdo a los parámetros de validación. Los resultados se listan en la tabla 7, para cada modelo se obtuvo el respectivo gráfico de Ramachandran

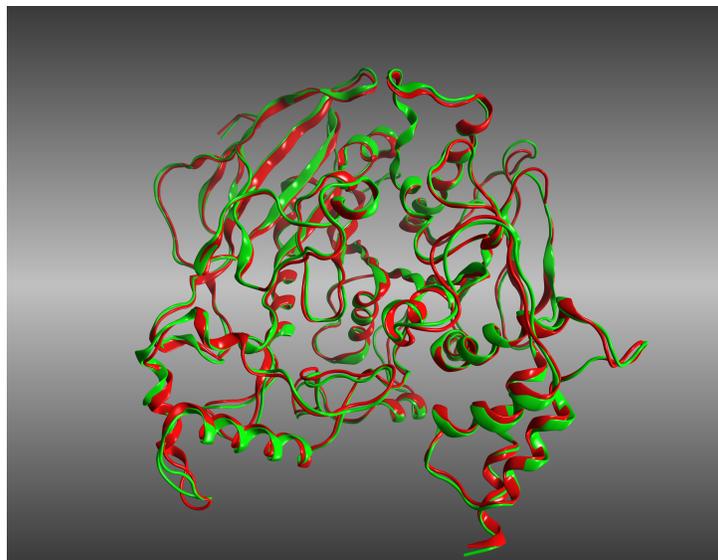


Fig. 14: Superposición estructural Modelo MMFF94x (verde) y 5X61.B (rojo)

El gráfico de Ramachandran es una visualización gráfica de las combinaciones de ángulos diedros de la cadena principal de una proteína. Los ángulos  $\psi$  (psi) y  $\phi$  (phi) para cada residuo se grafican para evaluar las conformaciones permitidas y no permitidas en determinada estructura tridimensional.

Las combinaciones de ángulos y su localización en el gráfico definirán del tipo de estructura secundaria que conforme. De acuerdo con el análisis del gráfico de Ramachandran (Figura 15), para el modelo optimizado con el campo de fuerza MMFF94x observamos que la mayor parte de los valores se encuentran dentro de las regiones permitidas a excepción de 6 aminoácidos, los cuales son: Phe 97, Asp 315, Thr 318, Glu 540, Ser 546 y Lys 558. Sin embargo, esto no presenta un problema para el presente estudio ya que dichos residuos se encuentran en la periferia de la estructura tridimensional, son parte de giros variables y no forman parte de la hendidura del sitio activo de la proteína. Por lo cual, la conformación de estos residuos no es de importancia para el plegamiento de la estructura tridimensional y no interviene en el proceso de catálisis.

Tabla 7: Modelos de homología para AChE

| Campo de fuerza | RMSD / Å | Conformaciones prohibidas |
|-----------------|----------|---------------------------|
| 5X61            | 0.00     | 4                         |
| Amber10:EHT     | 1.11     | 5                         |
| MMFF94x         | 0.72     | 6                         |
| PFROSST         | 1.16     | 8                         |
| OPLS-AA         | 1.27     | 22                        |
| CHARMM27        | 1.24     | 7                         |

Se realizó la superposición de las estructuras protéicas de los modelos generados con lo cual se calculó el valor de RMSD comparativo a la estructura de plantilla. Mientras menor sea el valor de ésta desviación de coordenadas atómicas, mejor es la similitud estructural. Bajo estos parámetros se determinó el modelo de homología optimizado con MMFF94x como la estructura inicial en el estudio de acoplamiento molecular.

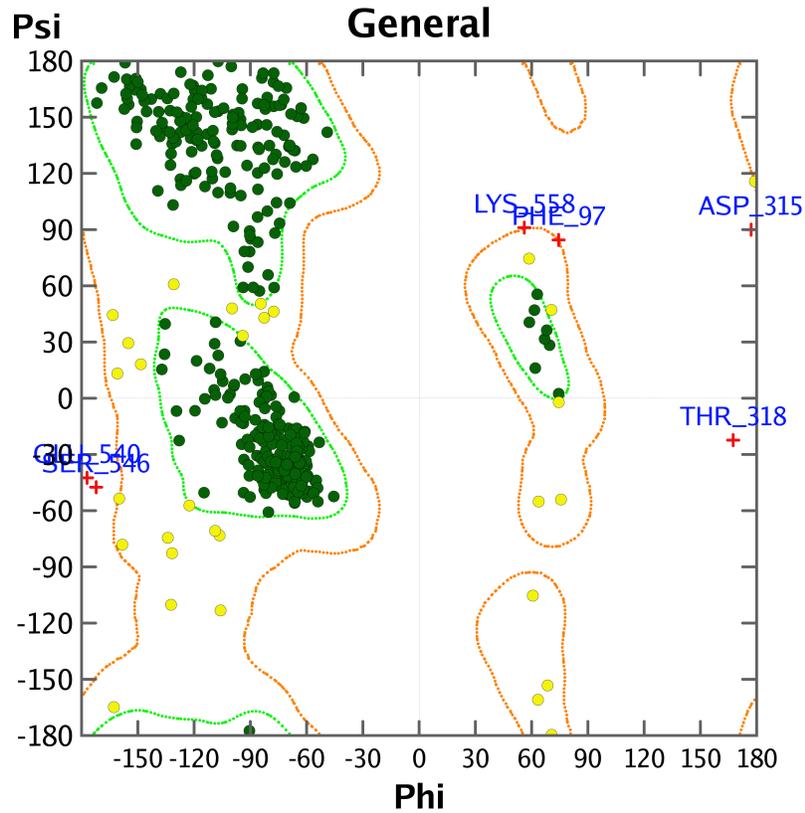


Fig. 15: Gráfico de Ramachandran para el modelo optimizado con MMFF94x

## 6.2 Optimización de ligandos

Se modelaron las estructuras presentes en la Tabla 5 y se realizó una búsqueda conformacional para obtener estructuras tridimensionales óptimas y llevar a cabo el acoplamiento con la proteína AChE.

Se empleo el método de búsqueda "LowModeMD", el cual consiste en una simulación corta de dinámica molecular (1 picosegundo) a temperatura constante, 300 K; se utilizan como velocidades iniciales, la energía cinética de los diferentes modos normales de vibración de cada molécula. La búsqueda se restringió a 10,000 iteraciones y límite de 100 estructuras rechazadas. Seguido de esto se hace una optimización estructural con el campo de fuerza MMFF94x, para el cual se indica un gradiente RMS de 0.005 Å, y un máximo de 500 pasos. Los resultados se filtran respecto a un valor de RMSD de 0.25 Å, es decir, dos conformaciones se consideran iguales si su valor de superposición RMSD es igual o menor que el indicado.

Las conformaciones generadas se guardaron en una base de datos para después emplearlas como estructuras tridimensionales iniciales para el estudio de acoplamiento molecular.

Para validar el método de búsqueda "LowModeMD", se llevó a cabo la superposición de los conformeros generados con respecto a la estructura tridimensional obtenida por cristalografía de rayos X. La comparación se realizó utilizando los ligandos Propoxur (con entrada en la base de datos CSD: HOLJEY), LQM 919 y LQM 996. Para los 3 compuestos los valores de superposición fueron menores a 2 Å, lo cual indica que el protocolo empleado es capaz de producir estructuras tridimensionales confiables. En la tabla 8 se muestra el valor de superposición en Å para los 5 conformeros de menor energía.

Tabla 8: Resultados para la superposición de los conformeros de menor energía de Propoxur, LQM 919 y LQM 996

| Conformeros | Valor de superposición RMSD (Å) |         |         |
|-------------|---------------------------------|---------|---------|
|             | Propoxur                        | LQM 919 | LQM 996 |
| Rayos X     | 0.0000                          | 0.0000  | 0.0000  |
| 1           | 0.1896                          | 0.0944  | 0.2512  |
| 2           | 1.1621                          | 0.4971  | 0.5415  |
| 3           | 1.1179                          | 0.4766  | 0.5899  |
| 4           | 0.6156                          | 1.3352  | 1.4413  |
| 5           | 1.1619                          | 1.2131  | 1.3132  |

## 6.3 Acoplamiento molecular

Esta herramienta nos permite obtener información independiente del tiempo sobre los complejos Enzima-Ligando. Se estudiaron los posibles modos de unión: posición y orientación del ligando relativo a la proteína, así como su conformación al acoplarse dentro del sitio activo. Esto

a razón de reconocer las principales características estructurales que derivan en las distintas afinidades de las moléculas por AChE.

El sitio activo en AChE para la hidrólisis de ACh se resalta muy bien en la literatura, por lo cual en este estudio no fue necesario realizar una búsqueda de regiones de reconocimiento en la proteína.

Con el software MOE, utilizando la herramienta de "Docking" se realizó un acoplamiento flexible, a fin de permitir cierta tolerancia de movimiento a las cadenas de la proteína sin provocar cambios conformacionales.

Las condiciones para el protocolo de acoplamiento fueron: posicionamiento del ligando bajo el método "Triangle Matcher", evaluando 1000 posiciones iniciales con una función "London dG" y reteniendo 50 de menor energía. Después éstas estructuras se refinan mediante una optimización estructural con MMFF94x, se evalúan con la función "Affinity dG" y se conservan 20 de acuerdo al menor valor de energía libre de unión,  $\Delta G_{unión}$ .

Las funciones empleadas London dG y Affinity dG son llamadas de puntuación (scoring functions) debido a que estiman la energía libre de un determinado modo de unión, por medio de la contribución lineal de varios términos, las funciones lineales son las correspondientes:

$$Affinity\ dG\ \Delta G = C_{hb}f_{hb} + C_{ion}f_{ion} + C_{mlig}f_{mlig} + C_{hh}f_{hh} + C_{hp}f_{hp} + C_{aa}f_{aa}$$

Donde: "C" corresponde a un coeficiente específico de ponderación para cada tipo de interacción y "f" se refiere la fracción de contacto entre dos átomos (cercanía). Cada término evalúa un tipo de interacción: "hb" puente de hidrógeno, "ion" interacciones tipo Coulomb, "mlig" interacciones que involucren nitrógeno, azufre o algún metal, "hh" interacciones hidrofobias y polares, "aa" interacciones entre cualquier par de átomos.

La función London dG estima la energía libre por evaluación de las imperfecciones geométricas (flexibilidad del ligando, puentes de hidrógeno y desolvatación)

$$London\ dG\ \Delta G = c + E_{flex} + \sum_{PueneteH} c_{HB}f_{HB} + \sum_{Metal} c_M f_M + \sum_{Atomo\ i} \Delta D_i$$

Donde: "c" representa la pérdida o ganancia de entropía debida a movimiento rotacional y traslacional, "E<sub>flex</sub>" es la pérdida de entropía debido a la flexibilidad conformacional del ligando, "c<sub>HB</sub>" y "c<sub>M</sub>" representan la energía ideal de un puente de Hidrógeno y una interacción con metal respectivamente y "D<sub>i</sub>" representa la energía de desolvatación para cada átomo. Este modelo matemático no involucra efectos iónicos.

De los resultados obtenidos se seleccionaron aquellos con el correcto modo de unión del ligando, el cual es aquel donde el carbonilo, del grupo acetil (para ACh) y del grupo carbamato, se encuentre orientado frente a la triada catalítica. De esa manera es probable que ocurra la reacción de carbamitación con AChE. Se consideró una distancia límite entre el carbonilo del ligando y el oxígeno del residuo Ser 256 de 5 Å. Se descartaron los acoplamientos que se encontraran fuera de este rango. En la figura 16 se muestra la superposición de los resultados para los ligandos ACh,

Propoxur, LQM 919 y LQM 996. Para cada uno de clusters se determinó la  $\Delta G_{unión}$  promedio. En la tabla 9 se listan los resultados de energía libre de unión para los acomplamientos de ACh, Propoxur, LQM 919 y LQM 996.

Tabla 9: Resultados de acomplamiento molecular con AChE

| $\Delta G_{unión}$ (kcal/mol)          |          |         |         |
|--|----------|---------|---------|
| ACh                                    | Propoxur | LQM 919 | LQM 996 |
| -9.78                                  | -13.87   | -10.03  | -9.70   |
| -9.25                                  | -12.36   | -9.91   |         |
| -9.07                                  | -10.91   |         |         |
| Promedio $\Delta G_{unión}$ (kcal/mol) |          |         |         |
| -9.36                                  | -12.38   | -9.96   | -9.70   |

La energía libre de unión se determina bajo el esquema:  $\Delta G_{unión} = \Delta G_{complejo} - (\Delta G_{proteina} + \Delta G_{ligando})$ , esta se relaciona directamente con la formación de interacciones electrostáticas débiles entre el ligando y la proteína. Así pues, la energía de interacción necesaria para mantener el complejo se maximiza cuando existe una buena complementariedad enzima ligando.

Con la formación del complejo activado, la energía de activación disminuye lo cuál da pie a que ocurra la reacción enzimática al facilitar la formación de un estado intermediario.

Así pues, a menor energía libre de unión mayor afinidad tendrán las moléculas por el sitio activo de la enzima. Comparando los resultados para los cuatro principales ligandos podemos observar que Propoxur, LQM 919 y LQM 996 tienen un menor valor de  $\Delta G_{unión}$  esto indica una mayor afinidad por AChE que el ligando natural ACh. Comparando estos datos con los valores experimentales<sup>13</sup> de reducción de actividad de AChE (Tabla 10), podemos hacer notar una relación: a valores menores de  $\Delta G_{unión}$  resultantes del protocolo impuesto de acomplamiento molecular, mayor es la afinidad enzima-ligando y asimismo mayor es el porcentaje de reducción de actividad de AChE.

Ahora bien, suponiendo esta relación, entonces: compuestos de esta misma naturaleza (carbamatos) que tengan un menor valor de  $\Delta G_{unión}$  respecto al neurotransmisor ACh podrán, en cierto grado, reducir la actividad de AChE. Por el contrario compuestos con mayor valor de  $\Delta G_{unión}$  respecto a ACh causarían mínima o nula reducción de actividad.

Tabla 10: Comparación  $\Delta G_{unión}$  e inhibición enzimática de 4 ligandos

| Compuesto | Porcentaje de de reducción de actividad AChE | $\Delta G_{unión}$ |
|-----------|--|--------------------|
| ACh       | -  | -9.36              |
| LQM 919   | <40 %  | -9.96              |
| LQM 996   | <40 %  | -9.70              |
| Propoxur  | 99 %   | -12.38             |

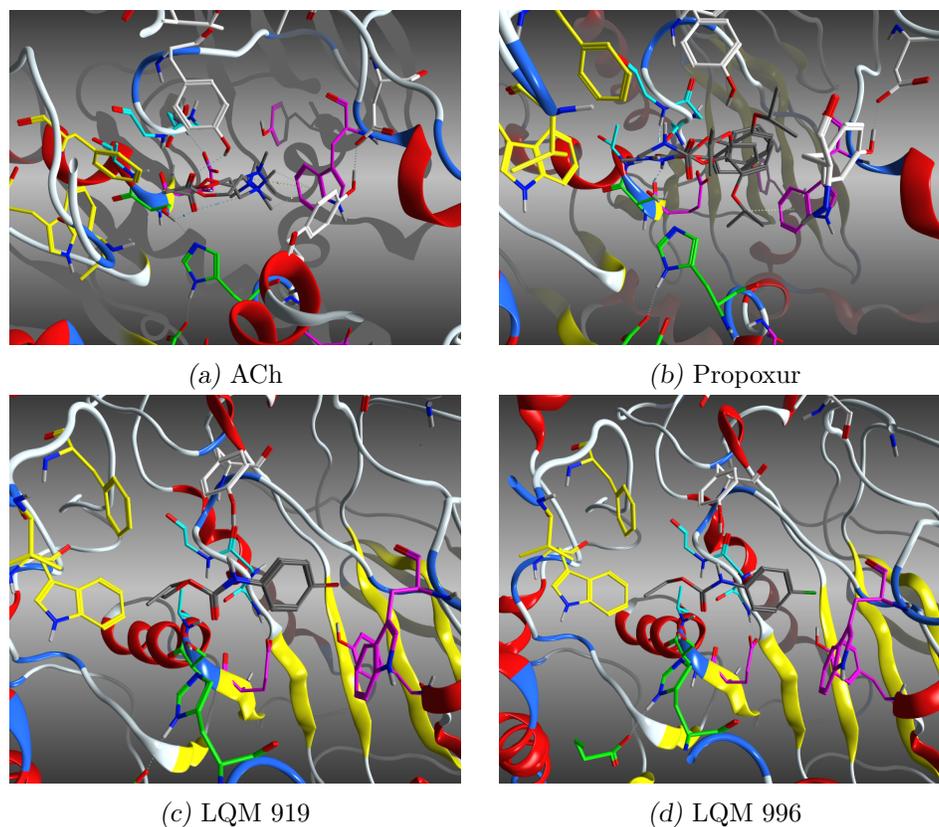


Fig. 16: Superposición de conformaciones para ACh (a), Propoxur(b), LQM 919(c) y LQM 996(d)

Los antecedentes indican que los compuestos de tipo carbamato utilizados comercialmente como garrapaticidas, con modo de acción en AChE, comparten cierta conectividad. Estos compuestos son del tipo *O*-Carbamato lo que quiere decir que el oxígeno del grupo funcional carbamato, se encuentra unido covalentemente a un anillo aromático.

Partiendo de los resultados para estos cuatro compuestos y empleando el mismo protocolo de acoplamiento molecular se procedió a analizar una nueva serie de moléculas de tipo *O*-Carbamato que nombraremos la serie de compuestos *O*-LQM presentes en la tabla 5.

La propuesta de estas moléculas nace de estudios previos en los cuales se evalúa la capacidad ixodocida de compuestos tipo *N*-Carbamato sobre *R. microplus*.<sup>12</sup> Retomando estos compuestos, se realizó la respectiva modificación en conectividad (Figura 17) para crear y analizar la serie de moléculas *O*-LQM, que se emplea en el presente trabajo.



Fig. 17: Estructuras generales para diferentes moléculas carbamato.  
Donde:  $R_2$  es metil o etil

En las figuras 18 a 21 se muestran los resultados de acoplamiento molecular de la serie *O*-LQM como clusters de la superposición de los modos de unión. En las tablas 11 a 14 se encuentran los resultados de  $\Delta G_{unión}$  para cada uno de estos clusters.

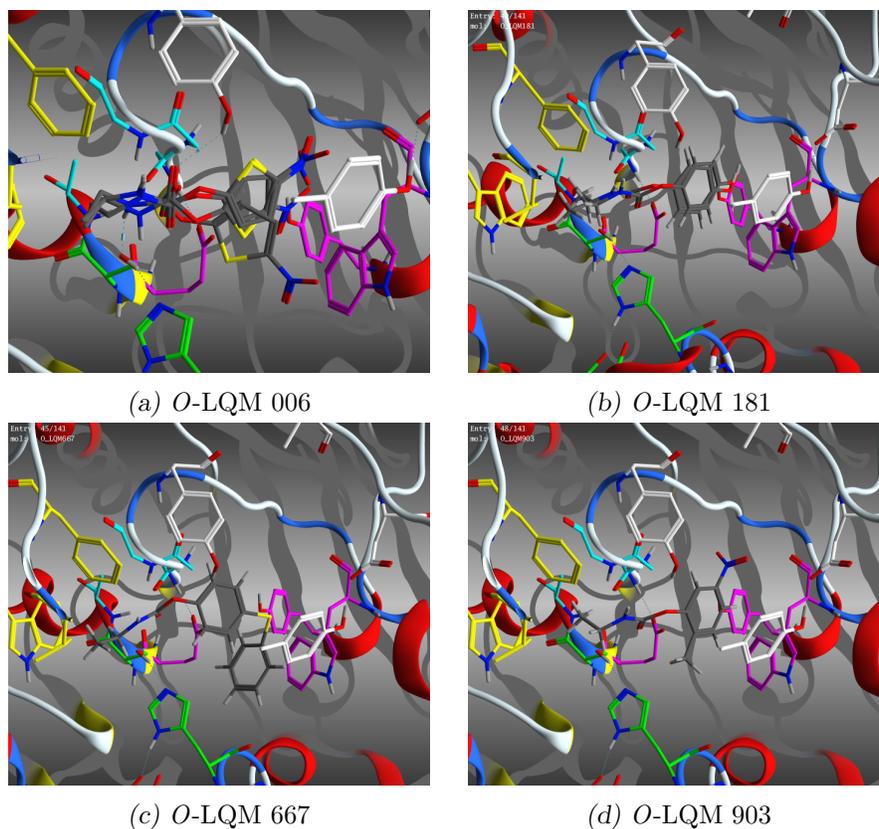


Fig. 18: Superposición modos de unión para los compuestos *O*-LQM 006, 181, 667 y 903

Tabla 11: Resultados de acoplamiento molecular para los compuestos *O*-LQM 006, 181, 667 y 903

| $\Delta G_{unión}$ (kcal/mol)          |                   |                   |                   |
|--|-------------------|-------------------|-------------------|
| <i>O</i> -LQM 006                      | <i>O</i> -LQM 181 | <i>O</i> -LQM 667 | <i>O</i> -LQM 903 |
| -10.91                                 | -11.87            | -13.75            | -11.13            |
| -10.77                                 | -11.04            |                   |                   |
| -10.66                                 |                   |                   |                   |
| -10.21                                 |                   |                   |                   |
| Promedio $\Delta G_{unión}$ (kcal/mol) |                   |                   |                   |
| -10.64                                 | -11.45            | -13.75            | -11.13            |

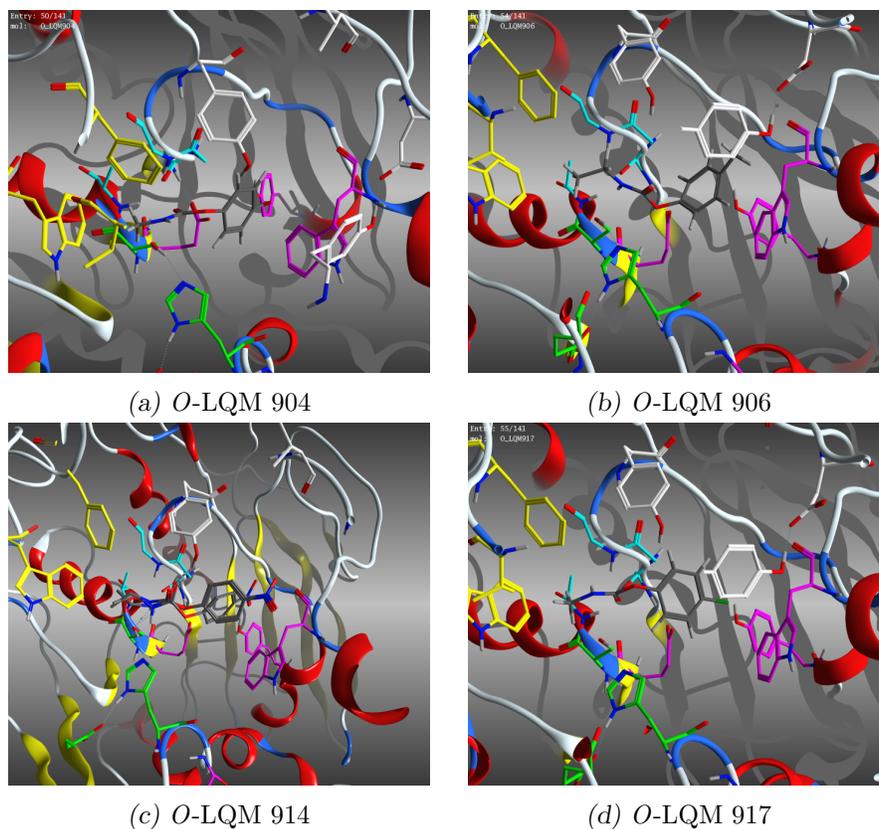


Fig. 19: Superposición modos de unión para los compuestos *O*-LQM 904, 906, 914 y 917

Tabla 12: Resultados de acoplamiento molecular para los compuestos *O*-LQM 904, 906, 914 y 917

| $\Delta G_{unión}$ (kcal/mol)          |                   |                   |                   |
|--|-------------------|-------------------|-------------------|
| <i>O</i> -LQM 904                      | <i>O</i> -LQM 906 | <i>O</i> -LQM 914 | <i>O</i> -LQM 917 |
| -10.02                                 | -9.27             | -9.75             | -9.83             |
|  |                   | -9.62             |                   |
|  |                   | -9.22             |                   |
| Promedio $\Delta G_{unión}$ (kcal/mol) |                   |                   |                   |
| -10.02                                 | -9.27             | 9.53              | -9.38             |

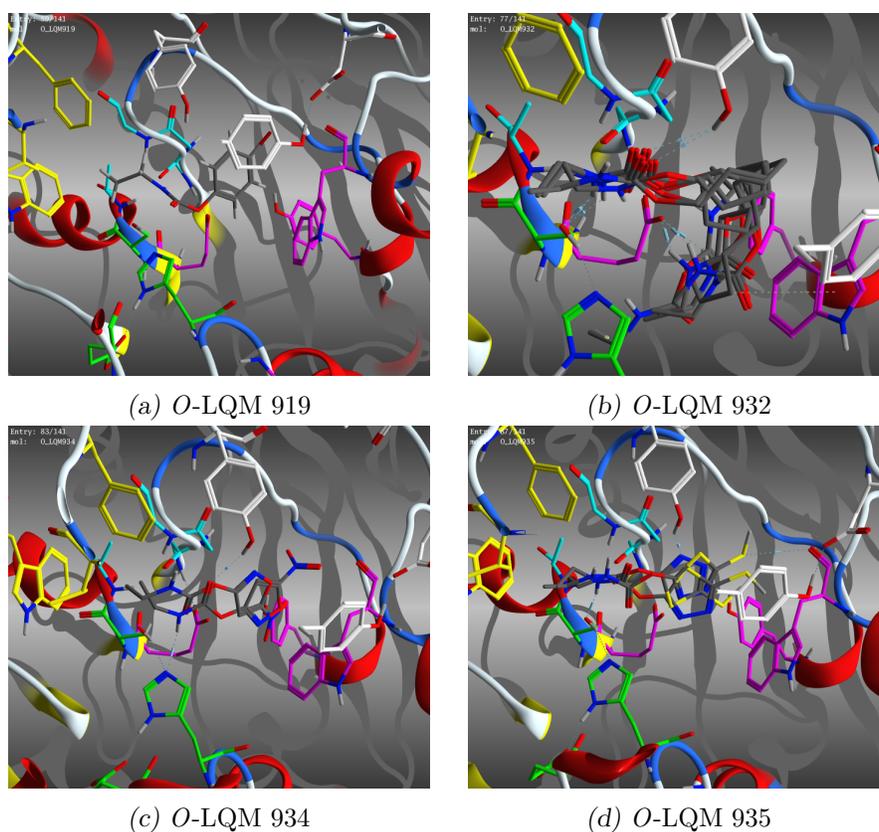


Fig. 20: Superposición modos de unión para los compuestos *O*-LQM 919, 932, 934 y 935

Tabla 13: Resultados de acoplamiento molecular para los compuestos *O*-LQM 919, 932, 934 y 935

| $\Delta G_{unión}$ (kcal/mol)          |                   |                   |                   |
|--|-------------------|-------------------|-------------------|
| <i>O</i> -LQM 919                      | <i>O</i> -LQM 932 | <i>O</i> -LQM 934 | <i>O</i> -LQM 935 |
| -9.48                                  | -13.35            | -10.45            | -10.70            |
|  | -12.78            | -9.77             | -9.86             |
|  | -12.68            |                   | -9.61             |
|  | -12.60            |                   |                   |
|  | -12.30            |                   |                   |
| Promedio $\Delta G_{unión}$ (kcal/mol) |                   |                   |                   |
| -9.48                                  | -12.74            | 10.11             | 10.06             |

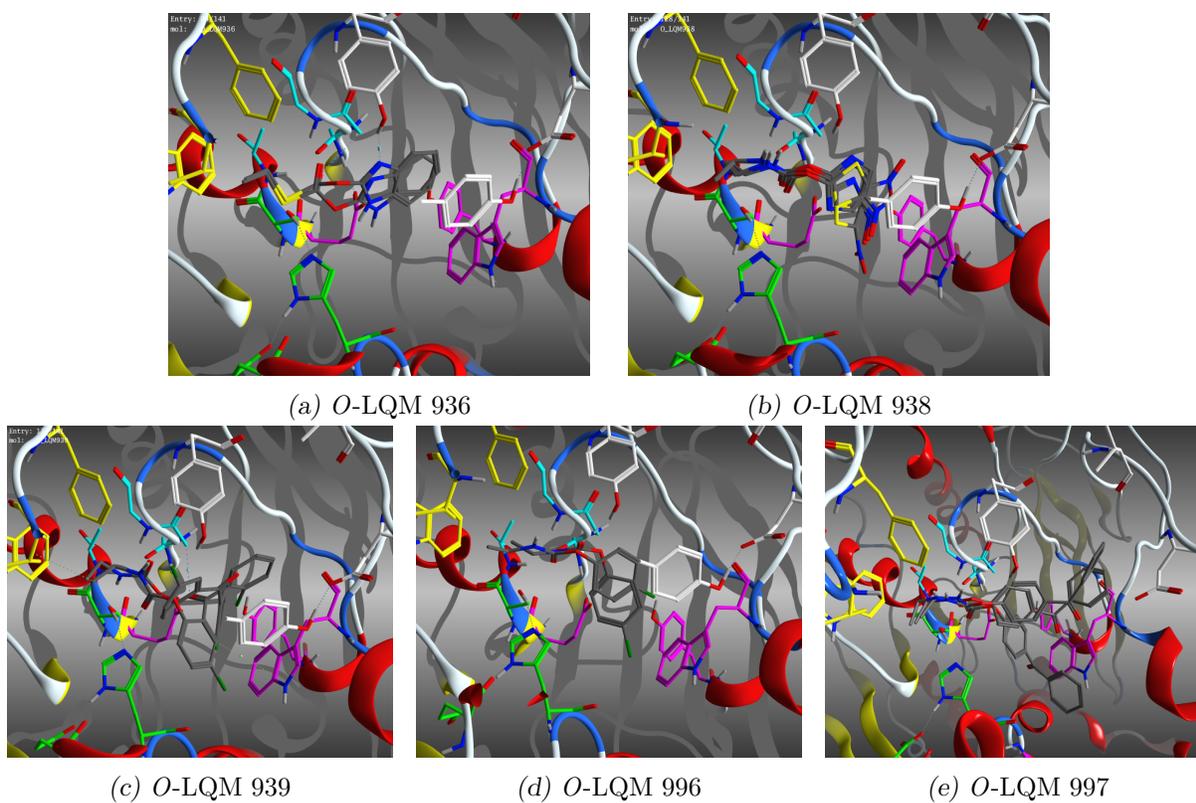


Fig. 21: Superposición modos de unión para los compuestos *O*-LQM 938, 939, 996 y 997

Tabla 14: Resultados de acoplamiento molecular para los compuestos *O*-LQM 938, 939, 996 y 997

| $\Delta G_{unión}$ (kcal/mol)          |                   |                   |                   |                   |
|--|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| <i>O</i> -LQM 936                      | <i>O</i> -LQM 938 | <i>O</i> -LQM 939 | <i>O</i> -LQM 996 | <i>O</i> -LQM 997 |
| -11.47                                 | -10.95            | -13.99            | -10.83            | -12.85            |
| -11.09                                 | -10.58            | -12.62            | -10.56            | -12.70            |
|  | -10.47            |                   |                   | -12.53            |
|  | -10.38            |                   |                   |                   |
|  | -10.05            |                   |                   |                   |
| Promedio $\Delta G_{unión}$ (kcal/mol) |                   |                   |                   |                   |
| -11.28                                 | -10.49            | -13.31            | -10.70            | -12.69            |

Tabla 15: Resultados de acoplamiento molecular AChE

| Ligando           | $\Delta G_{unión}$ | Ligando           | $\Delta G_{unión}$ | Ligando           | $\Delta G_{unión}$ |
|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| <i>O</i> -LQM 667 | -13.75             | <i>O</i> -LQM 903 | -11.13             | LQM 919           | -9.97              |
| <i>O</i> -LQM 939 | -13.31             | <i>O</i> -LQM 996 | -10.70             | LQM 996           | -9.70              |
| <i>O</i> -LQM 932 | -12.74             | <i>O</i> -LQM 006 | -10.64             | <i>O</i> -LQM 914 | -9.53              |
| <i>O</i> -LQM 997 | -12.69             | <i>O</i> -LQM 938 | -10.49             | <i>O</i> -LQM 919 | -9.48              |
| Propoxur          | -12.38             | <i>O</i> -LQM 934 | -10.11             | <i>O</i> -LQM 917 | -9.38              |
| <i>O</i> -LQM 181 | -11.45             | <i>O</i> -LQM 935 | -10.06             | ACh               | -9.36              |
| <i>O</i> -LQM 936 | -11.28             | <i>O</i> -LQM 904 | -10.02             | <i>O</i> -LQM 906 | -9.27              |

En la tabla 15 se muestran los resultados de acoplamiento molecular de los compuestos estudiados en orden creciente respecto a su energía libre de unión.

Se observa que el ligando natural ACh posee el menor valor de  $\Delta G_{unión}$  esto indica que todos los compuestos aquí evaluados tienen mayor afinidad teórica por AChE, lo cual sugiere que, en cierta medida, son capaces de realizar una reducción de la actividad. En otras palabras, existirá una inhibición competitiva de las moléculas de carbamato por la enzima, al acoplarse en el mismo sitio que el ligando natural.

En este sentido, comparando las afinidades de los compuestos respecto a propoxur, observamos que las moléculas *O*-LQM: 667, 939, 932 y 997 muestran una mejor complementariedad en el complejo con AChE, sin embargo este no es un resultado definitivo para determinar moléculas candidato a ixodicidas. Se realizaron simulaciones de dinámica molecular para estudiar la estabilidad dinámica de los modos de unión obtenidos por docking.

### 6.4 Dinámica Molecular

Esta técnica permitió estudiar el comportamiento y estabilidad dinámica de los diferentes sistemas de generados para AChE, en su forma "apo" (estructura proteica sin ligando) y en su forma "holo" (estructura proteica en complejo con algún ligando).

Para lograr la estabilización de los sistemas se desarrollo un protocolo de 3 etapas presentado en la tabla 16.

Tabla 16: Protocolo de dinámica molecular

| Etapa         | Tiempo (ps) | Condiciones T(K), P(kPa) |
|---------------|-------------|--------------------------|
| Calentamiento | 100         | T=(0,300)                |
| Equilibrio    | 300         | T=300                    |
| Producción    | 2000        | T=300 P=101              |

Se realizaron las simulaciones de dinámica molecular partiendo de los sistemas generados en el paso de acoplamiento molecular, los cuales se prepararon de acuerdo a la metodología indicada (5.3) y se corrieron utilizando el software NAMD.

Debido a que partimos de un sistema minimizado y que proviene de una estructura definida por cristalografía de rayos X se decidió iniciar el protocolo con una etapa de calentamiento progresivo de 0 K hasta 300 K, temperatura ambiente aproximadamente. A continuación se realizó una etapa de equilibrio imponiendo T=300 K, esto con la finalidad de estabilizar las velocidades de los átomos y asegurar una temperatura constante. Por último, se impuso una presión de 1 atm en la cual se estabilizó el volumen de la celda periódica.

Una vez que el sistema se encuentra en equilibrio se procede a calcular propiedades de interacción Enzima-ligando.

Para determinar que las condiciones empleadas fueron las óptimas, se determinó perfil de energía potencial de todos los sistemas y se calculó el valor de RMSD a lo largo de la trayectoria empleando el software VMD. En la figuras 22 y 23 se muestran los gráficos resultantes para la trayectoria de dinámica molecular del modelo de AChE libre.

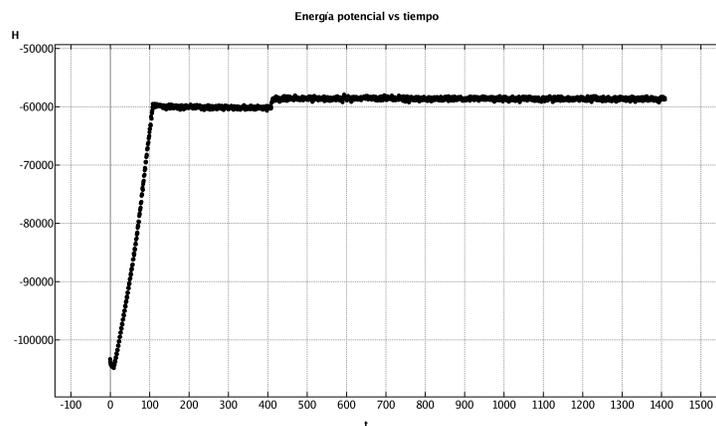


Fig. 22: Perfil de energía potencial durante la trayectoria de la proteína en su forma libre

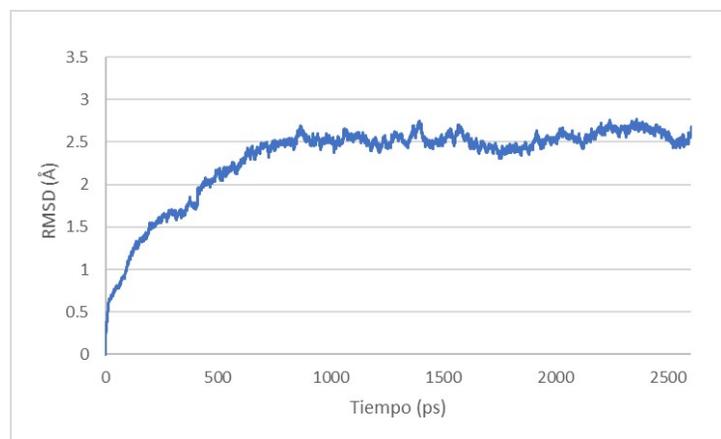


Fig. 23: RMSD para la trayectoria de la proteína en su forma libre

Los perfiles de energía potencial (Figura 22) indican el equilibrio energético de los sistemas. Para el caso de los complejos enzima-ligando el modo de interacción se realiza de manera constante.

Se emplea el cálculo de desviación cuadrática (RMSD) para la trayectoria de dinámica molecular, como parámetro de estabilidad estructural. Los valores se obtienen al comparar la estructura inicial de la simulación ( $t = 0$ ) con cada tiempo obtenido durante la trayectoria.

La tendencia definida en la figura 23 alrededor de 2.5 Å indica que, a partir de ese punto las fluctuaciones del movimiento en las cadenas proteicas disminuyen. Esta variación estructural de la proteína se debe a el movimiento de cadenas variables "loops" y regiones terminales así como la introducción de moléculas de agua a la hendidura de AChE.

En la figura 24 se evalúa el comportamiento estructural de los complejos obtenidos por acoplamiento molecular. El complejo con ligando natural ACh, mostró el menor valor de RMSD lo cual quiere decir que se logró la estabilización del complejo en un tiempo más corto de simulación. En contraste el complejo con ligando propoxur requirió más tiempo para estabilizarse, lo cual quiere decir que es necesario un re-arreglo de las cadenas de aminoácidos para que exista una buena interacción dentro del sitio AChE.

Para el caso del compuesto LQM 919 la fluctuación de los valores de RMSD disminuyó alrededor de 1500 ps durante la etapa de producción así mismo para el compuesto LQM 996 la estabilización estructural se produjo en ese lapso. No obstante los valores para RMSD de este último fueron menores indicando una menor desviación estructural de la proteína.

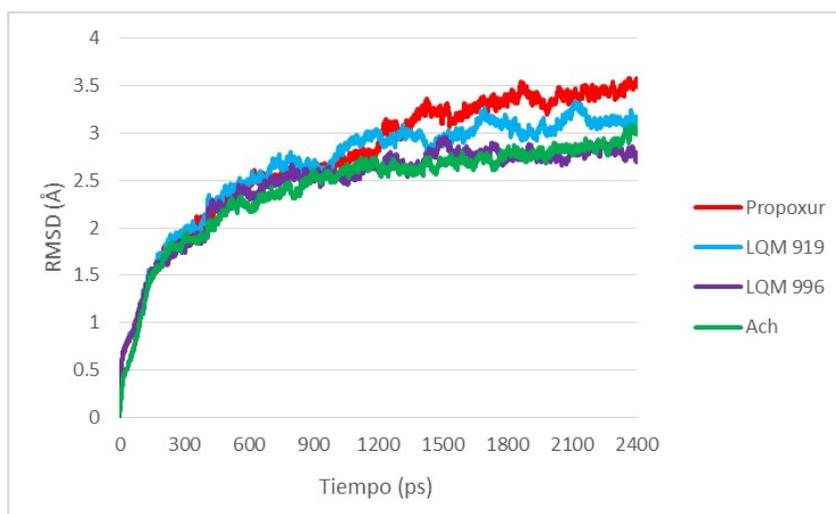


Fig. 24: RMSD para la simulación de 4 sistemas Enzima-Ligando

Con el software MOE se realizó el perfil de interacción de los complejos enzima-ligando PLIF (Protein ligand interaction fingerprint), el cual nos permite identificar que aminoácidos interactúan directamente con el ligando durante la estabilización del sistema. Esto nos da una pauta para identificar las diferencias en los sistemas en el reconocimiento enzima-ligando.

En la figura 25 observamos el conjunto de interacciones a larga distancia entre el ligando ACh y la enzima AChE. Cada 0.5 ps de la trayectoria de dinámica molecular se analizó la existencia de puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas o hidrofílicas; las cuales se representan como una línea horizontal negra en la figura. De esa manera observamos cuales aminoácidos interactúan directamente con el ligando, en la tabla 17 se muestran estos resultados para 4 ligandos.

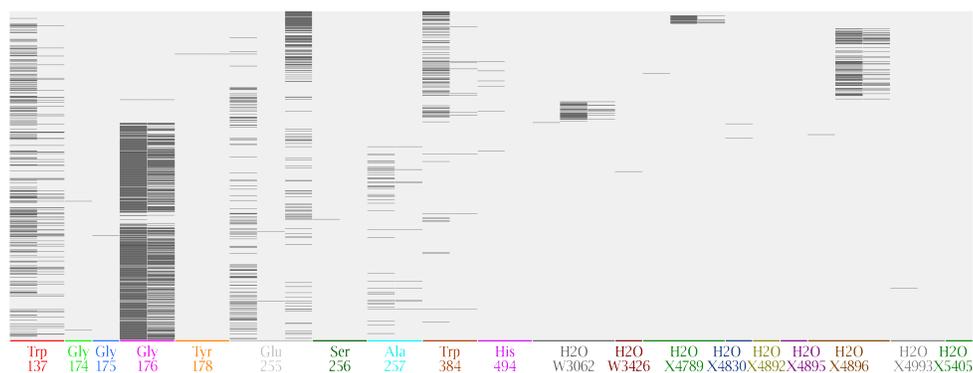


Fig. 25: Perfil de interacciones AChE-ACh

Tabla 17: Residuos de AChE involucrados en la estabilización de los sistemas

| Ligando  | Aminoácidos de importancia |         |         |         |         |
|----------|----------------------------|---------|---------|---------|---------|
|          | ACh                        | Trp 137 | Gly 176 |         | Glu 255 |
| Propoxur | Trp 137                    | Gly 176 |         |         | Trp 384 |
| LQM 919  |                            |         | Tyr 178 | Glu 255 |         |
| LQM 996  |                            |         | Tyr 178 | Glu 255 |         |

Tomando esto en cuenta, los compuestos cuya interacción con AChE se asemejen a Propoxur deberán tener semejante actividad de inhibición.

## 7. CONCLUSIONES

- Se aplicó un modelo teórico para el estudio de sistemas receptor-ligando que permitió establecer la relación de actividad inhibitoria - estructura de compuestos tipo carbamato de etilo frente a la enzima AChE, en concordancia con los reportes experimentales.
- Mediante la técnica de modelado por homología se construyó un modelo proteico, para la enzima AChE del organismo *R. microplus*. con un porcentaje de identidad del 50 % de utilidad para analizar su estructura tridimensional.
- Se evaluó la calidad estructural del modelo de homología por medio de la superposición con la plantilla utilizada logrando un valor de 0.72 Å, con el mismo motivo se determinaron las combinaciones angulares en la representación de Ramachandran obteniendo sólo 6 residuos con conformaciones no permitidas.
- Utilizando el modelo creado para AChE se realizó la técnica de reconocimiento molecular (Docking) para generar sistemas enzima-ligando.
- Se aplicó y validó un protocolo de acoplamiento molecular para determinar las interacciones enzima-ligando en función de la estructura para emplear los ligandos: acetilcolina (ACh), propoxur, LQM 919 y LQM 996. Los valores determinados concuerdan con los datos experimentales.
- Empleando el protocolo de acoplamiento molecular se valoraron las afinidades de una nueva serie de moléculas propuesta, resultando 4 compuestos con una mayor afinidad teórica por AChE respecto al propoxur. Las claves de los compuestos son *O*-LQM: 667, 939, 932 y 997.
- Se creó un protocolo bajo las condiciones de temperatura 300 K y presión 1 atm, para realizar simulaciones al equilibrio de dinámica molecular y determinar las interacciones enzima-ligando de importancia en la estabilización de los complejos.
- Se evaluó el protocolo de dinámica molecular mediante el cálculo de propiedades al equilibrio: Perfil de energía potencial y cálculo de RMSD de trayectoria.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Horak, I. G.; Camicas, J. L.; Keirans, J. E. *Exp. Appl. Acarol.* **2002**, *28*, 27–54.
- [2] SENASICA, Situación actual del control de la garrapata boophilus spp. 2016; <https://www.gob.mx/senasica/documentos/situacion-actual-del-control-de-la-garrapata-boophilus-spp>.
- [3] Faccioli, V. Garrapatas (Acari: Ixodidae Y Argasidae) de la colección de invertebrados del museo provincial de ciencias naturales Florentino Ameghino. 2011.
- [4] Rosario Cruz, R.; Domínguez García, D. I.; Rojas Ramírez, E.; Ortiz Estrada, M.; Martínez Ibañez, F. *Estrategia para el control de la garrapata Boophilus microplus y la mitigación de la resistencia a los pesticidas*; 2009; p 18.
- [5] Spickler, A. R. Rhipicephalus (Boophilus) microplus. 2007; <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets.php>.
- [6] Rodríguez Vivas, R. I.; Rosado Aguilar, J. A.; Ojeda Chi, M. M.; Pérez Cogollo, L. C.; Trinidad Martínez, I.; Bolio González, M. E. *Ecosistemas y Recur. Agropecu.* **2014**, *1*, 295–308.
- [7] Rodríguez-Vivas, R. I.; Grisi, L.; De León, A. A. P.; Villela, H. S.; De Jesús Torres-Acosta, J. F.; Sánchez, H. F.; Salas, D. R.; Cruz, R. R.; Saldierna, F.; Carrasco, D. G. *Rev. Mex. Ciencias Pecu.* **2017**, *8*, 61–74.
- [8] Desquesnes, M. *The cattle tick: Boophilus microplus*; CIRAD/EMVT, 1995; p 24.
- [9] Taylor, M. A. *Vet. J.* **2001**, *161*, 253–268.
- [10] Fulton, M.; Key, P.; DeLorenzo, M. In *Org. Chem. Toxicol. Fishes*; Tierney, K. B., Farrell, A. P., Brauner, C. J., Eds.; 2013; Vol. 33; pp 309–368.
- [11] Wall, R.; Shearer, D. *Veterinary Entomology: Arthropod Ectoparasites of Veterinary Importance*, 1st ed.; Springer Netherlands, 1997; p 456.
- [12] Prado-Ochoa, M. G.; Muñoz-Guzmán, M. A.; Abrego-Reyes, V. H.; Velázquez-Sánchez, A. M.; Lara-Rocha, M.; Cuenca-Verde, C.; Angeles, E.; Alba-Hurtado, F. *Vet. Parasitol.* **2013**, *194*, 49–57.
- [13] Prado-Ochoa, M. G.; Ramírez-Noguera, P.; Díaz-Torres, R.; Garrido-Fariña, G. I.; Vázquez-Valadez, V. H.; Velázquez-Sánchez, A. M.; Muñoz-Guzmán, M. A.; Angeles, E.; Alba-Hurtado, F. *Vet. Parasitol.* **2014**, *199*, 215–224.
- [14] Iturbe Requena, S. L. Evaluación de la eficacia in vivo de dos carbamatos de nueva síntesis sobre Rhipicephalus microplus. Ph.D. thesis, UNAM, 2014.

- [15] Sánchez Chávez, G.; Salceda, R. *Rev. Educ. Bioquímica* **2008**, *27*, 44–51.
- [16] Booth, G. M.; Lee, A. H. *Bull. World Health Organ.* **1971**, *44*, 91–98.
- [17] Smarandache Wellmann, C. R. *Curr. Biol.* **2016**, *26*, R960–R965.
- [18] Berman, H. M.; Westbrook, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235–242.
- [19] Sussman, J. L.; Harel, M.; Frolow, F.; Oener, C.; Goldman, A.; Toker, L.; Silman, I. *Science (80-. )*. **1991**, *253*, 872–879.
- [20] Silman, I.; Sussman, J. L. *Chem. Biol. Interact.* **2008**, *175*, 3–10.
- [21] Ollis, D. L.; Carr, P. D. *Protein Pept. Lett.* **2009**, *16*, 1137–1148.
- [22] Shafferman, A.; Kronman, C.; Flashner, Y.; Leitner, M.; Grosfeld, H.; Ordentlich, A.; Gozes, Y.; Cohen, S.; Ariel, N.; Barak, D.; Harel, M.; Silman, I.; Sussman, J. L.; Velan, B. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 17640–17648.
- [23] Garrido Mastrantonio, G. E. Estudio conformacional de compuestos organofosforados y sus mecanismos de acción tóxica. Ph.D. thesis, Universidad Nacional de La Plata, 2003.
- [24] Dvir, H.; Silman, I.; Harel, M.; Rosenberry, T. L.; Sussman, J. L. *Chem. Biol. Interact.* **2010**, *187*, 10–22.
- [25] PDBe, Acetylcholinesterase: A gorge-ous enzyme. 2013; <http://www.ebi.ac.uk/pdbe/quips?story=AChE>.
- [26] Nascimento, É. C.; Oliva, M.; Świderek, K.; Martins, J. B.; Andrés, J. *J. Chem. Inf. Model.* **2017**, *57*, 958–976.
- [27] Colovic, M. B.; Krstic, D. Z.; Lazarevic-Pasti, T. D.; Bondzic, A. M.; Vasic, V. M. *Curr. Neuropharmacol.* **2013**, *11*, 315–335.
- [28] Anderson, A. C. *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 787–797.
- [29] Kumar, A.; Jha, A. *Anticandidal Agents*; Elsevier, 2017; pp 63–71.
- [30] Cuevas, Gabriel; Cortés, F. *Prof. Psychol.*, 1st ed.; Fondo de Cultura Económica: México, 2003; p 172.
- [31] MacKerell Jr, A. In *Comput. Biochem. Biophys.*; Becker, O. M., MacKerell, A. D. J., Roux, B., Watanabe, M., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 2010; pp 7–38.
- [32] Krieger, E.; Nabuurs, S. B.; Vriend, G. *Struct. Bioinforma.*; 2005.
- [33] Magrane, M.; Consortium, U. P. *Database* **2011**,
- [34] Johnson, M.; Zaretskaya, I.; Raytselis, Y.; Merezuk, Y.; McGinnis, S.; Madden, T. L. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, W5–W9.
- [35] Bendele, K. G.; Guerrero, F. D.; Miller, R. J.; Li, A. Y.; Barrero, R. A.; Moolhuijzen, P. M.; Black, M.; McCooke, J. K.; Meyer, J.; Hill, C. A.; Bellgard, M. I. *Parasitol. Res.* **2015**, *114*, 3027–3040.

- 
- [36] Orry, A. J.; Abagyan, R. In *Homology Modeling*; Orry, A. J. W., Abagyan, R., Eds.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, 2012; Vol. 857.