



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO  
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y  
BIOTECNOLOGÍA  
INGENIERÍA BIOQUÍMICA**



---

**Mecanismo, estructura e inhibición de la enzima Acetohidroxiácido Sintasa**

---

Trabajo de Titulación, modalidad proyecto de investigación, presentado como requisito previo a la obtención del Título de Ingeniera Bioquímica otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

**Autor:** Arianna Gabriela Albán Ruiz

**Tutor:** Ph.D. Mario Daniel García Solís

**Ambato - Ecuador**

**Marzo - 2021**

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

Ph.D. Mario Daniel García Solís

### **CERTIFICA**

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación bajo la modalidad de Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería de Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 20 de enero del 2021.

-----  
Ph.D. Mario Daniel García Solís

**C.I.** 110360547-1

**TUTOR**

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Arianna Gabriela Albán Ruiz, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Bioquímica, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



---

Arianna Gabriela Albán Ruiz

C.I. 025000761- 4

**AUTORA**

## **APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO**

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad proyecto de investigación el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman

-----

Presidente del tribunal

Dra. Lorena De los Ángeles Núñez Villacis

**C.I.** 180425690-5

Dr. Irvin Ricardo Tubón Usca

**C.I.** 060425035-7

Ambato, 10 de marzo del 2021

## **DERECHOS DE AUTOR**

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que considere el presente Trabajo de Titulación o parte de él, como documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



-----  
Arianna Gabriela Albán Ruiz

**C.I. 025000761- 4**

**AUTORA**

## **DEDICATORIA**

A mis padres Danilo y Ana, por su apoyo incondicional y enseñarme que las metas o sueños se cumplen paso a paso. A mi hermano Daniel por compartir esta experiencia universitaria a mi hermana Belén por ser como una amiga y confidente. A mi abuelito Telmo por su fortaleza e inspirarme a que sin importar la situación que estés atravesando siempre se puede dar una sonrisa.

A la memoria de mis dos ángeles, mi abuelito Luis por siempre estar pendiente de mis logros y enseñarme que la perfección puede estar en un detalle. A mi abuelita Ibelia quien me impulsó a seguir mis sueños, me compartió sus pensamientos y consejos que me han inspirado a que con humildad se puede ser una excelente persona y profesional en cada ámbito de mi vida

Especialmente a la memoria del Dr. Carlos Rodríguez un gran mentor, tutor, amigo, quien me brindo su confianza, paciencia, no compartió sus conocimientos y me permitió formar parte de su equipo, sin lugar a duda un ejemplo a seguir por la pasión que dedicó a las ciencias microbiológicas. Un ser humano que nos enseñó que primero hay que ser persona para ser un gran profesional.

Con mucho cariño Arianna

## **AGRADECIMIENTO**

Nadie ha logrado el éxito sin la ayuda de otros. Por lo que siempre se debe reconocer esa ayuda con gratitud. Agradezco infinitamente a Dios por ser mi fe, mi fuerza y mi guía, gracias por ponerme en este camino universitario, ayudarme a vencer mis temores y por los momentos felices juntos a maravillosas personas.

A mis padres que sin lugar a duda supieron como guiarme y motivarme, gracias por su apoyo emocional y económico esto no sería posible sin ustedes. Gracias a mis hermanos por ser mi pilar de apoyo en los momentos más difíciles. Gracias a todos en mi familia por estar siempre presentes y preocupados por mi bienestar. Gracias a Fabri, que en los últimos años siempre estuvo dispuesto a ayudarme y alentarme cuando lo necesite.

A mi tutor el Dr. Mario García por estar dispuesto a brindarme su ayuda, por su paciencia, su tiempo, colaboración, guía académica y profesional en el desarrollo de este trabajo de titulación. Eternamente agradecida.

A todos los profesores que formaron parte de mi formación académica y me supieron brindar los mejores consejos, a mis compañeros con quienes compartí momentos únicos durante esta travesía. Especialmente agradecer a Jessi por su confianza, por compartir grandes experiencias aprendizajes y sobre todo gracias por esas vivencias únicas en el laboratorio. A Jeny una persona y amiga que siempre ha estado dispuesta a brindarme su ayuda. A Ale Fuentes por su constante aliento de ánimo y su amistad incondicional. Alexita por ser una gran amiga y brindarme su confianza, A Cata aunque ya no se encuentre entre nosotros gracias por siempre estar pendiente de mi bienestar, por permitirme compartir esas vivencias y siempre tener el consejo perfecto. A mis amigos Jhoni y Jefferson, gracias por compartir sus divertidas anécdotas, su compañía académica y sobre todo por ofrecer su amistad.

En fin, a todos quienes me apoyaron y fueron parte esencial para mi formación profesional y personal

De todo corazón gracias

Arianna

## ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS .....	x
ÍNDICE DE FIGURAS .....	x
ÍNDICE DE GRÁFICOS .....	xi
RESÚMEN .....	xii
ABSTRACT .....	xiii
CAPITULO I .....	1
MARCO TEÓRICO .....	1
1.1 Antecedentes Investigativos .....	1
1.1.1 Definición y generalidades de las enzimas .....	1
1.1.2 Estructura de las enzimas .....	2
1.1.3 Biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs) .....	3
1.1.4 Acetohidroxiácido Sintasa AHAS .....	6
1.1.4.1 Actividad enzimática y propiedades cinéticas .....	7
1.1.5 Regulación de la actividad enzimática .....	10
1.1.6 Estructura de la enzima .....	11
1.1.7 Inhibición de la actividad enzimática .....	12
1.2 Objetivos .....	15
1.2.1 Objetivo general .....	15
1.2.2 Objetivos específicos .....	15
CAPÍTULO II .....	16
METODOLOGÍA .....	16
2.1 Métodos .....	16
2.2.1 Primera etapa .....	16
2.2.1.1 Pregunta de investigación .....	16
2.2.2 Segunda Etapa .....	17
2.2.2.1 Bases de datos digitales .....	17
2.2.2.2 Criterios para la elegibilidad .....	17
2.2.2.3 Criterios para inclusión .....	18
2.2.2.4 Criterios para exclusión .....	18
2.2.3 Tercera Etapa .....	18
2.2.3.1 Búsqueda de información .....	18

2.2.3.2 Estructura de la estrategia de búsqueda científica .....	18
CAPÍTULO III .....	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	22
ANÁLISIS DE LA LITERATURA .....	22
3.1 Mecanismo catalítico y actividades secundarias de AHAS .....	22
3.1.1 Actividad sintasa .....	26
3.1.1.1 La fase <i>lag</i> y sus implicaciones en la determinación de las propiedades cinéticas de la enzima. ....	26
3.1.1.2 El rol del oxígeno en el ciclo catalítico.....	27
3.1.2 Actividad redox .....	28
3.1.3 Actividad POX .....	28
3.1.4 Regulación de la actividad enzimática. ....	29
3.1.4.1 Regulación por la subunidad regulatoria. ....	30
3.1.4.2 El rol del FAD y moléculas quinonas en la regulación del ciclo catalítico. ....	31
3.2 Estructura de la AHAS.....	33
3.2.1 Estructura de la subunidad catalítica .....	34
3.2.2 Estructura de la subunidad regulatoria .....	35
3.2.3 Estructura de la holoenzima .....	37
3.2.3.1 Arquitectura del complejo AHAS.....	37
3.2.3.2 Elementos estructurales que participan en la regulación enzimática.....	39
3.2.3.3 Sitio de unión de BCAAs.....	40
3.2.3.4 Sitio de unión de ATP.....	40
3.2.4 Estructuras en complejo con herbicidas comerciales.....	40
3.2.4.1 Modos de unión de los herbicidas comerciales.....	41
3.2.4.2 Cambios estructurales inducidos por herbicidas comerciales.....	43
3.3 Inhibición de la actividad enzimática.....	44
3.3.1 Modo de inhibición: Inhibición regular vs. inhibición acumulativa .....	47
3.3.2 El rol de la actividad POX en la inhibición por herbicidas comerciales .....	48
3.3.3 Metodología para la determinación de constantes de inhibición.....	49
3.3.4 Constantes de inhibición de herbicidas modernos.....	50
3.3.5 Inhibidores de AHAS como potentes compuestos antimicrobianos .....	52
COMPARACIÓN DE RESULTADOS.....	54

DISCUSIÓN .....	58
CAPÍTULO IV .....	61
CONCLUSIONES Y RECOMEDACIONES .....	61
5.1 Conclusiones .....	61
5.2 Recomendaciones.....	62
BIBLIOGRAFÍA .....	63

### ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Propiedades Cinéticas de AHAS bacteriano .....	9
Tabla 2: Constante de inhibición y la constante aparente de inactivación de algunos herbicidas comerciales.....	13
Tabla 3: Variables seleccionadas para la formulación de la pregunta.....	17
Tabla 4: Ecuaciones de búsqueda par estructura de la enzima acetohidroxiácido sintasa ...	19
Tabla 5: Ecuaciones de búsqueda para mecanismo de la acetohidroxiácido sintasa.....	20
Tabla 6: Ecuaciones de búsqueda para inhibición de la acetohidroxiácido sintasa.....	21
Tabla 7: Ejemplo de la estructura química de los herbicidas inhibidores de AHAS.....	46
Tabla 8: Constantes $K_i$ , $K_{iapp}$ y $K_3$ de los diferentes herbicidas inhibidores de AHAS en <i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>A thaliana</i> .....	50
Tabla 9: Contante de inhibición para <i>C.auris</i> .....	51
Tabla 10: Constantes de inhibición $K_i$ en AHAS por Bispyribac (BS) .....	54
Tabla 11: Constantes de inhibición $K_i$ en AHAS por propoxycarbazona (PC) .....	55
Tabla 12: Constantes de inhibición $K_i$ en AHAS por thiencarbazona metil (TCM).....	56
Tabla 13: Constantes de inhibición $K_i$ en AHAS por chlorimuron ethyl (CE).....	57

### ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Biosíntesis de los aminoácidos de cadena ramificada BCAAs.....	5
Figura 2: Actividad funcional de la AHAS en la BCAAs.....	8
Figura 3: La estructura de los complejos de ScAHAS ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) y AtAHAS ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ).....	12
Figura 4: Ciclo catalítico de AHAS.....	24
Figura 5: Ciclo catalítico de Acetohidroxiácido sintasa y reacción secundaria redox de AHAS. ....	25
Figura 6: Seguimiento de la reducción de los FAD durante la catálisis del MtAHAS por UV-VIS.....	26
Figura 7: Redes de interacción en los centros catalíticos de ScAHAS con $O_2$ .....	27
Figura 8: Activación de redox y ciclo catalítico del AHAS y la actividad secundaria POX29	
Figura 9: Regulación por valina en las vías metabólicas de desde el piruvato a la valina ...	31
Figura 10: Regulación de la actividad catalítica de ScAHAS .....	32
Figura 11: La inhibición del MtAHAS por menadiona.....	33

Figura 12: Vistas estereoscópicas de la estructura del homodímero Sc AHAS y las diferentes conformaciones en los centros catalíticos, CC_1 y CC_2.....	35
Figura 13: Estructura cristalina de IlvN- subunidad RSU.....	36
Figura 14: Estructuras cristalinas de la holoenzima AHAS .....	37
Figura 15: Estructura del complejo y la ScRSU influye en la conformación de la ScCSU .	38
Figura 16: Efectos de la unión de l-valina sobre el complejo AtAHAS.....	39
Figura 17: Vista de los sitios de unión de PYB y SCT en AtAHAS.....	42
Figura 18: Vista de los cambios conformacionales en el sitio de unión del herbicida At AHAS .....	44
Figura 19: Esquematación de los pasos de la inhibición acumulativa por herbicidas dependiente del tiempo.....	48
Figura 20: Procesos y químicos involucrados en la inhibición de AHAS.....	49
Figura 21: Interacción de la clorflavonina con el IlvB1 de AHAS .....	53

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Comparación de las constantes de inhibición en AHAS por BS .....	54
Gráfico 2: Comparación de las constantes de inhibición en AHAS por PC .....	55
Gráfico 3: Comparación de las constantes de inhibición en AHAS por TCM .....	56
Gráfico 4: Comparación de las constantes de inhibición en AHAS por CE.....	57

## RESÚMEN

La acetohidroxiácido sintasa (AHAS, E.C. 2.2.1.6) o acetolactato sintasa (ALS), es una enzima dependiente de difosfato de tiamina (ThDP), está presente en plantas y microorganismo. Participa en la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada BCAAs, en presencia de ThDP, FAD y un ion metálico divalente, condensa dos moléculas de piruvato en 2-acetolactato o una molécula de piruvato y una de 2-cetobutirato en 2-aceto-2-hidroxi-butirato para la formación de valina, leucina e isoleucina.

Estructuralmente, Cuatro subunidades catalíticas (CSUs) interactúan con cuatro (planta) u ocho (levadura) subunidades regulatorias RSUs formando el complejo enzimático AHAS. CSU posee el sitio activo, mientras que, RSU aumenta la actividad de CSU y otorgar la sensibilidad enzimática a la inhibición por retroalimentación. Su inhibición tiene un efecto biocida, la cual ocurre mediante diferentes reacciones e interacciones moleculares, donde la más conocida se produce por moléculas con actividad herbicida, convirtiendo a la enzima en un importante target para el desarrollo de más de 58 herbicidas. En los últimos años, las investigaciones se centran en utilizar herbicidas inhibidores de AHAS como antimicrobianos, tomando ventaja de la ausencia de la enzima en seres humanos. Además, se estudia mutaciones y nuevos inhibidores con resultados prometedores.

Por lo expuesto, el presente trabajo consolida el cuerpo de literatura disponible, sobre la estructura, función e inhibición de AHAS y aportar a proyectos futuros mediante la definición de las necesidades de investigación en esta área del conocimiento y las perspectivas del uso de la enzima o de sus inhibidores en aplicaciones médicas, biotecnológicas, bioinformáticas etc.

**Palabras clave:** Acetohidroxiácido sintasa, investigación bibliográfica, complejo enzimático, biocida, actividad antimicrobiana, inhibidores enzimáticos, herbicidas, sintasa

## ABSTRACT

The Acetohydroxy acid ctase (AHAS, E.C. 2.2.1.6) or acetolactate withouttase (ALS), is an enzyme dependent on thiamine diphosphate (ThDP) which is present in plants and microorganism. It participates in branched-chain amino acid biosynthesis BCAAs. In the presence of ThDP, FAD and a divalent metallic, it comprises the condensation of two pyruvate molecules into 2-acetolatate or a pyruvate molecule or one of 2-cetobutirate into 2-acete-2-hydroxybutyrate to form the valine, leucine and isoleucine.

Structurally, four catalytic subunits (CSUs) interact with four (plant) or eight (yeast) regulatory subunits RSUs forming the enzyme complex AHAS. CSU owns the active site, while RSU increases the CSU activity and provides enzymatic sensitivity to feedback inhibition. Its inhibition has a biocidal effect, which occurs through different reactions and molecular interactions, where the best known is produced by molecules with herbicidal activity, making the enzyme an important target for the development of more than 58 herbicides. In recent years, research has focused on using AHAS inhibitor herbicides as antimicrobials, taking advantage of the absence of the enzyme in humans. Also, mutations and new inhibitors are being studied with promising results.

Therefore, this study proposes to consolidate the available literature about the structure, function, and inhibition of AHAS to contribute to future projects by defining research needs in this area and the prospects for the use of the enzyme or its inhibitors in medical, biotechnological, bioinformatics, other applications.

**Keywords:** Acetohydroxyacid synthase, literature research, enzyme complex, biocide, antimicrobial activity, enzyme inhibitors, herbicides, synthase

## CAPITULO I

### MARCO TEÓRICO

#### 1.1 Antecedentes Investigativos

Gracias a los esfuerzos de diferentes investigadores, en los últimos 50 años se han abordado grandes problemas sobre el funcionamiento de células procariotas y eucariotas. Estos esfuerzos han desembocado en la publicación un amplio número de manuscritos que describen el funcionamiento de un sinnúmero de biomoléculas, como las enzimas, y sus potenciales aplicaciones biotecnológicas. Las enzimas son catalizadores biológicos que intervienen en la mayoría de los cambios dentro de los seres vivos (**Macías Alvia et al., 2018**). Los Bioquímicos han estudiado e investigado estos biocatalizadores alrededor de 130 años, apreciando inconscientemente la importancia de estas moléculas. Es así como se ha ido determinado gradualmente las estructuras y propiedades de las enzimas con ayuda de la tecnología concebida por biólogos y bioquímicos, demostrando así que casi en todas las reacciones químicas de los seres vivos son catalizadas por enzimas (**McKee & McKee, 2014; Macías Alvia et al., 2018**).

##### 1.1.1 Definición y generalidades de las enzimas

La mayoría de las reacciones químicas de la naturaleza, requieren la ayuda de catalizadores para aumentar su velocidad. En 1877, Kunhe acuñó por primera vez la palabra enzima que se refiere a un biocatalizador y proviene del vocablo griego ενζυμη (en- dentro y zýme-levadura) (**Punekar, 2018; Castañeda, 2019**). Estas moléculas orgánicas poseen una alta especificidad y un elevado peso molecular. En los organismos vivos estas actúan en reacciones metabólicas con la finalidad de aumentar la velocidad de reacción y disminuir la energía de activación. Además, las enzimas tienen la capacidad de regenerarse y no afectan las propiedades termodinámicas de la reacción química que catalizan (**Teijón, R. & Blanco, G, 2017; Castañeda, 2019**).

Para clasificar de mejor manera las enzimas que catalizan las diferentes reacciones químicas, fue necesaria la implementación de un sistema con reglas definidas por la

Comisión de Enzimas, (E.C. por sus siglas en inglés Enzyme Commission) el cual es utilizado hasta la actualidad. Este sistema de nomenclatura fue desarrollado en 1955 por la Unión Internacional de Bioquímica (IUB) y la Unión internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) (**Castañeda, 2019**) instituciones que definieron que el nombre de una enzima es asignado con base al sustrato, seguido por el nombre de la coenzima y por último la función que realiza seguido de la terminación – asa (**Teijón, R. & Blanco, G, 2017**).

### **1.1.2 Estructura de las enzimas**

Las enzimas son de naturaleza proteica, por lo cual presentan la estructura básica de las proteínas. Estas se encuentran constituidas por su estructura primaria, la cual hace referencia a la secuencia de aminoácidos los cuales están unidos por enlaces peptídicos entre el grupo carboxilo de un aminoácido junto con el grupo amino del aminoácido siguiente. La disposición de los ángulos de torsión de cada residuo da origen a la estructura secundaria de la enzima, clasificada por laminas  $\beta$ , hélices  $\alpha$  y bucles flexibles sin estructura determinada. Las interacciones que se originan entre elementos de estructura secundaria a su vez dan lugar a la estructura terciaria. En algunos casos, las enzimas pueden tener una estructura simple, mientras que otras pueden presentar una estructura globular más compleja. En varias enzimas el centro catalítico está ubicado en la interfaz que se forma entre dos cadenas polipeptídicas idénticas o diferentes, lo que da origen a la estructura cuaternaria (**Castañeda, 2019**). El sitio activo o centro catalítico, es el espacio en el cual se unen la molécula de enzima y el sustrato (reactante) y tiene lugar la reacción enzimática. El sustrato, por lo general, se une a la enzima mediante interacciones no covalentes altamente específicas que ocurren con los restos de aminoácidos y/o moléculas accesorias que conforman el sitio activo (**Teijón, R. & Blanco, G, 2017**). Esta unión cumple con una especificidad estereoquímica y espacial la cual se debe a la inherente quiralidad de las enzimas.

Algunas enzimas son capaces de catalizar la reacción empleando únicamente los aminoácidos que conforman el sitio activo. Es decir, no necesitan ningún factor adicional para transformar el sustrato en el producto de la reacción, como es el caso de la enzima ureasa (**Macías et al., 2018; Castañeda, 2019**). Por otro lado, existen moléculas enzimáticas complejas, las cuales no solo necesitan de su parte proteica para su acción, sino que requieren de la ayuda de moléculas orgánicas o inorgánicas, conocidas como cofactores. Un ejemplo

de este tipo de enzimas es la enzima hexoquinasa y su cofactor ATP (**Macías et al., 2018**). Entre los cofactores orgánicos más comunes podemos nombrar a varias moléculas que aportan energía, como el ATP, y a moléculas que aceptan o ceden electrones, como el NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup> o el FAD. En cuanto a los cofactores inorgánicos más comunes podemos citar a varios iones metálicos divalentes, como el Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> y Ca<sup>2+</sup> (**Teijón, R. & Blanco, G, 2017**).

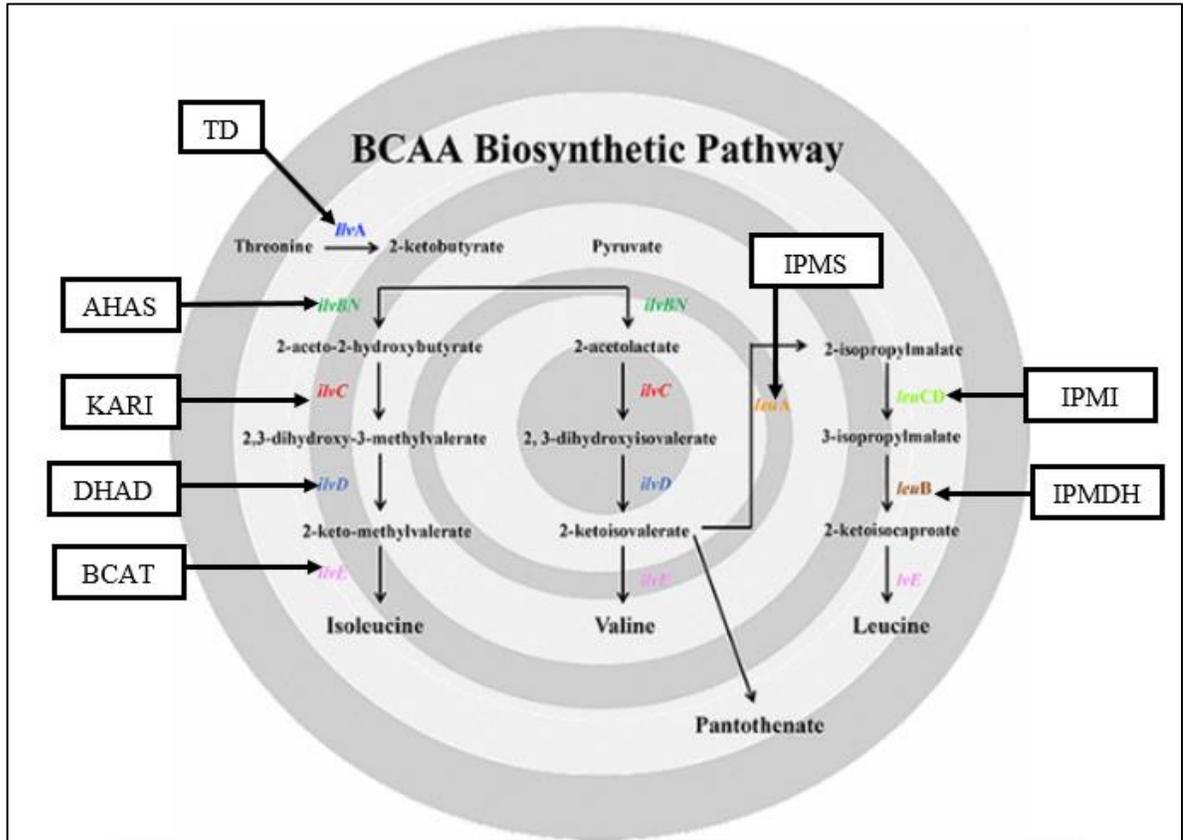
### **1.1.3 Biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs)**

L-isoleucina, L-leucina y L-valina, o también llamados aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs, por sus siglas en inglés), son aminoácidos esenciales que cumplen funciones estrictas en el metabolismo de los seres vivos. Además presentan valor sintético para la producción de algunos fármacos (**Yamamoto et al., 2016**). Para su biosíntesis intervienen ocho enzimas (Figura 1), las cuales están presentes únicamente en plantas y microorganismos (**Shaner, 2000, Liu et al., 2016**). Es decir, los animales y humanos adquieren BCAAs a través de la dieta (**Duggleby & Pang, 2000; Amorim Franco & Blanchard, 2017**). En el primer paso interviene la enzima deshidratasa/deaminasa (EC:4.3.1.19;TD), la cual está involucrada únicamente en la biosíntesis de la L-isoleucina (**Amorim Franco & Blanchard, 2017**). En segundo lugar, actúa la enzima acetohidroxiácido sintasa (EC 2.2.1.6; AHAS), la cual realiza el primer paso universal en la síntesis de los tres aminoácidos ramificados. AHAS es capaz de catalizar dos reacciones que dan lugar a 2-acetolactato y 2-aceto-2-hidroxi-butirato, respectivamente. La primera reacción involucra la condensación de dos moléculas de piruvato y tiene como productos finales L-valina y L-leucina. La segunda reacción cataliza la condensación de una molécula de piruvato 2-cetobutirato que alimentan la ruta de biosíntesis de la L-isoleucina. Esta actividad catalítica depende de ThDP (difosfato de tiamina), FAD (dinucleótido de adenina-flavina) y un ion metálico (**Cole, 2015; Amorim Franco & Blanchard, 2017**).

Continuando con la vía biosintética, en el siguiente paso cataliza la cetol-ácido reductoisomerasa (EC 1.1.1.86; KARI) la cual necesita del cofactor NADPH (fosfato dinucleótido de nicotinamida adenina reducido) y Mg<sup>2+</sup> para su actividad. KARI convierte los productos de AHAS, 2-acetolactato o 2-aceto-2-hidroxi-butirato, en sus respectivos productos 2,3- dihidroxiisovalerato (L-valina y L-leucina) y el 2-aceto-2-hidroxi-butirato en

2,3-dihidroxi-3-metilvalerato (L-isoleucina) (**Amorim Franco & Blanchard, 2017**). Posteriormente, interviene la enzima dihidroxi-ácido deshidratasa (EC 4.2.1.9; DHAD), la cual es responsable de la producción de 2-cetoisovalerato a partir de del 2,3-dihidroxiisovalerato, en la ruta de biosíntesis de L-valina y L-leucina. Por otra parte, DHAD también es capaz de convertir 2,3-dihidroxi-3-metilvalerato en 2-ceto-3-metilvalerato que alimenta la ruta de biosíntesis de L-isoleucina (**Amorim Franco & Blanchard, 2017; Dezfulian et al., 2017**). Seguidamente, actúa la transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada (BCAT), último actor para la síntesis de isoleucina y valina. Esta enzima transfiere el grupo amina del L-glutamato a 2-cetoisovalerato y 2-ceto-3-metilvalerato para la producción de L-valina y L-isoleucina (**Yamamoto et al., 2016; Ananieva & Wilkinson, 2018**).

La enzima que conduce a la biosíntesis de la L-leucina es la isopropilmalato sintasa (EC 2.3.3.13, IPMS). Esta enzima cataliza la conversión del 2-cetoisovalerato, producto de reacción de la DHAD, y el acetil-CoA en 2-isopropilmalato y CoA. Luego, la enzima isopropilmalato isomerasa (EC 4.2.1.33; IPMI) produce la isomerización de 2-isopropilmalato a 3-isopropilmalato. Finalmente, la isopropilmalato deshidrogenasa (EC 1.1.1.85; IPMDH), dependiente de  $\text{NAD}^+$  y un metal divalente, cataliza la conversión del 3-isopropilmalato en 2-cetoisocaproato por la oxidación del segundo alcohol y su descarboxilación (**Amorim Franco & Blanchard, 2017**).



**Figura 1: Biosíntesis de los aminoácidos de cadena ramificada BCAAs**

Enzimas involucradas en la ruta biosintética de L-valina, L-leucina y L-isoleucina, con los respectivos productos de reacción, deshidratasa/deaminasa (TD), acetohidroxiácido sintasa (AHAS), cetol-ácido reductoisomerasa (KARI), dihidroxiácido deshidratasa (DHAD), transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada (BCAT), isopropilmalato sintasa (IPMS), isopropilmalato isomerasa (IPMI) y la isopropilmalato deshidrogenasa (IPMDH) que participan en esta vía sintética. Aquí, la isoleucina, comenzando con 2-cetobutirato y piruvato, se forma en cuatro pasos que son catalizados por diferentes enzimas. La valina se forma por una vía paralela que emplea una segunda molécula de piruvato, la cual reemplaza al 2-cetobutirato. La leucina se forma de la extensión del cuarto paso para la síntesis de la valina que combina 2-cetoisovalerato con acetil-CoA.

Modificado de: (Amorim Franco & Blanchard, 2017)

#### 1.1.4 Acetohidroxiácido Sintasa AHAS

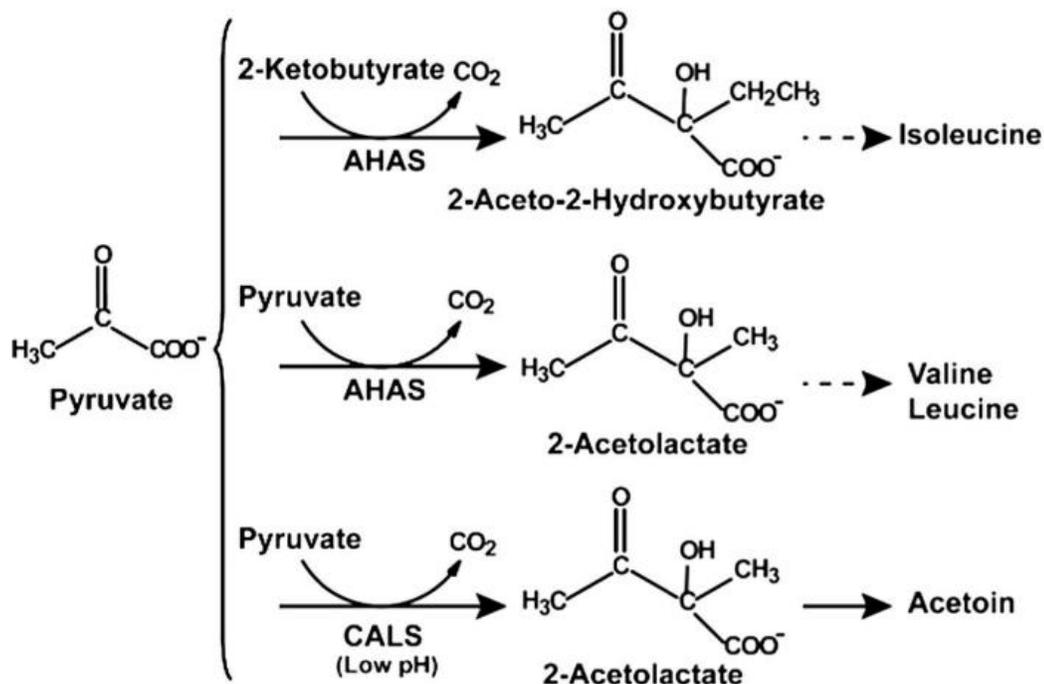
Una de las biomoléculas con significativo valor para la investigación y el desarrollo de nuevos productos es la enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS), también conocida como acetolactato sintasa (ALS). Como se expuso anteriormente, la AHAS es una enzima fundamental para el correcto funcionamiento y desarrollo celular, ya que realiza el primer paso en la biosíntesis de BCAAs. La AHAS es una enzima que forma parte de la súper familia de enzimas dependientes de difosfato de tiamina (ThDP) capaces de catalizar la descarboxilación de 2-cetoácidos, actividad que es realizada en asociación con los cofactores FAD y un ion magnesio ( $Mg^{2+}$ ) (Liu et al., 2016; McCourt & Duggleby, 2006). Una de las primeras investigaciones sobre la AHAS fue realizada a finales de los 70s, en la cual se evaluó la regulación de la síntesis de AHAS por leucina en *Escherichia coli* K-12. Este estudio demostró que la leucina reprime la biosíntesis de AHAS, ya que *E. coli* no fue capaz de crecer en un medio enriquecido con este aminoácido. Además, se observó que la isoleucina y valina no tienen un efecto regulador de la biosíntesis de esta enzima. Con esta indagación surgió la necesidad de investigar a profundidad la enzima AHAS y el efecto que esta enzima puede tener para el desarrollo de los organismos que la poseen (DeFelice & Levinthal, 1977). Años más tarde, a finales de los 80s se empezó a estudiar el sitio de acción de diferentes clases de herbicidas comerciales (sulfonilurea, imidazolinona y triazolopirimidina) y se identificó que AHAS era su objetivo. Una de las primeras investigaciones evaluó el modo de inhibición del herbicida imazaquin (una imidazolinona) donde se comprobó que este actúa mediante un mecanismo competitivo, lo cual sugiere que se une a un sitio cercano al sitio catalítico de AHAS (Schloss et al., 1988). Con base en estos descubrimientos, la enzima AHAS se convirtió en un histórico objetivo para el desarrollo de al menos cinco clases de herbicidas comerciales. Así mismo, dado que esta enzima está presente en microorganismos y es ausente en los seres humanos, ofrece grandes posibilidades para el desarrollo de moléculas con actividad antimicrobiana (Liu et al., 2016; McCourt & Duggleby, 2006).

Un gran número de investigaciones confunden erróneamente a AHAS con la enzima acetolactato sintasa (ALS). Esta última es expresada por cientos de microorganismos donde participa en la biosíntesis de butanodiol y otros compuestos similares mediante una ruta

fermentativa. Para marcar una diferencia entre los dos procesos metabólicos, muchas investigaciones asignan a ALS como la enzima encargada del proceso fermentativo, es decir la ruta catabólica, mientras que para el proceso de la biosíntesis se asigna a AHAS como enzima anabólica. Cabe mencionar que las enzimas ALS y AHAS no solo difieren en la función celular que desempeñan, sino que también difieren significativamente desde el punto de vista estructural, ya que la enzima ALS no requiere del cofactor FAD para realizar la reacción y no posee un sitio de unión para esta molécula. En su lugar, ALS reemplaza el sitio de unión de FAD con varios restos de aminoácidos que ocupan el espacio disponible para el FAD en la AHAS (Shaner, 2000).

#### **1.1.4.1 Actividad enzimática y propiedades cinéticas**

El producto de la reacción anabólica en la que interviene la AHAS (síntesis de los BCAA), consiste en convertir dos moléculas de piruvato en 2-acetolactato o una molécula de piruvato y una de 2-cetobutirato en 2-aceto-2-hidroxiacetato (Zhang et al. 2020; Pue et al. 2014). Este proceso, que requiere la coordinación entre los sitios activos, consiste en la unión del sustrato (piruvato) con una molécula de ThDP ionizada en el C4. Posteriormente el intermediario 2-lactil-ThDP (LThDP) se descarboxila dando como producto hidroxietil-ThDP (HE-ThDP) y dióxido de carbono (Gedi & Yoon, 2012; Lonhienne et al. 2017). A continuación, la enzima cataliza la condensación de la segunda molécula de sustrato (piruvato o 2-cetobutirato) al intermediario HE-ThDP. Finalmente, se produce la liberación del ThDP del producto final, acetolactato para continuar con la vía de leucina y valina o acetohidroxiacetato para continuar con la biosíntesis de isoleucina. Cabe recalcar que en esta reacción no existe un mecanismo redox neto; sin embargo, la enzima necesita de FAD para su activación. Esto se debe a que, durante el proceso de activación, la enzima convierte el FAD de estado oxidado a reducido mediante una reacción alterna de óxido-reducción que convierte una molécula de piruvato en acetato (McCourt et al. 2006).



*Figura 2: Actividad funcional de la AHAS en la BCAAs.*

Representa los productos finales de la catálisis de la enzima acetohidroxiácido sintasa que posteriormente continuaran con la biosíntesis de los aminoácidos de cadena ramificada valina, leucina e isoleucina.

Fuente: (Liu et al., 2016)

La enzima AHAS posee además una actividad piruvato oxidasa remanente de su ancestro, la enzima piruvato oxidasa (POX). Esta característica es intrigante, ya que aparentemente AHAS no requiere de esta actividad para el curso normal de la reacción que cataliza. Sin embargo, esta característica no ha sido eliminada durante su proceso de evolución y selección natural. Interesantemente, la estructura tridimensional de alta resolución de la CSU de *ScAHAS* sugiere la presencia de dos moléculas de O<sub>2</sub> cercanas al sitio activo, además de un canal de acceso para O<sub>2</sub> que es diferente al canal de acceso del sustrato, piruvato (Lonhienne et al. 2017).

Por otra parte, estudios cinéticos en AHAS de tabaco revelaron que, este catalizador actuó con un pKa de 6,5 y 8,2 en el mecanismo de la enzima (Kim et al., 2004). También, en pruebas con enzima de levadura se determinó la tasa neta de formación para LThDP, en la

cual el primer paso es determinante en la tasa para la catálisis, en los siguientes pasos la tasa es similar pero mucho mayor. Se demostró que en el ciclo que FAD es reducido, la tasa de flujo depende si se utiliza piruvato o una tasa 2- cetobutirato, aunque no se ha visto un papel crucial en la catálisis de FAD, esta se reduce en curso de la catálisis con velocidad dos órdenes de magnitud más lenta. Desde el punto de vista cinético, la tasa lenta aparente es el resultado de la competencia directa en la transferencia de electrones y la carbonización rápida ( $k_0 > 1000$ ) (Chipman et al., 2005). En las bacterias AHAS I, II y III exhiben propiedades cinéticas diferentes, especificidad del sustrato y regulación por retroalimentación (Tabla 1). La preferencia del sustrato ya sea piruvato o del 2-cetobutirato como segundo sustrato, se define por la constante de especificidad R, la isoenzima AHAS II y III tienen preferencia por el 2-ketobutirato, mientras que la AHAS I no tiene preferencia (Engel et al., 2004; Gedi & Yoon, 2012; Gokhale & Tilak, 2015).

**Tabla 1:** *Propiedades Cinéticas de AHAS bacteriano*

	MW (kDa)				Kc (μM)		Inhibición	
	Sub catalítica	Sub regulatoria	Actividad específica (U.mg <sup>-1</sup> )	(Km) Piruvato (mM)	Th DP	Mg2 +	%	K <sub>i</sub> (μM)
<i>Bacillus anthracis</i>	62	19	1.5	4.8	280	1160	40	ND
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	62.3	18.6	9.21	8.8	5.5	20	40	4
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	66.8	15.4	0.157	8.3	ND	ND	50	900
<i>Escherichia coli I</i> •	60.3	110	40	1.5	1.2	60	10	100
<i>E. coli II</i>	59	9.5	52.7	2.6	1.1	3.8	-	-
<i>E. coli III</i> <sup>s</sup>	62.8	17.9	30	11.5	18	3300	87	12.7
<i>Haemophilus influenza</i>	63	-	1.5	92	13.5	ND	ND	ND
<i>Methanococcus aeolicus</i>	65	19	-	6.8	1.6	300	-	300

<i>Mycobacterium avium</i>	65.9	18.1	4	2	7.5	-	50	56
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	65.9	18.1	4.61	1.56	1.04	-	40	16.3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	60	15	25.6	-	-	-	28	4.4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	74.8	34.1	49	18	-	-	78	142
<i>Shigella sonnei</i>	65	-	0.117	8.01	0.01	180	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	0.12	14.2	0.6	0.56		
<i>H. influenza</i>	-	-	1.5	95	13.5		-	-

\*Recopilación de propiedades cinéticas de diferentes microorganismos bacterianos. ND: no detectable

Fuente: (Gedi & Yoon, 2012; Liu et al., 2016a)

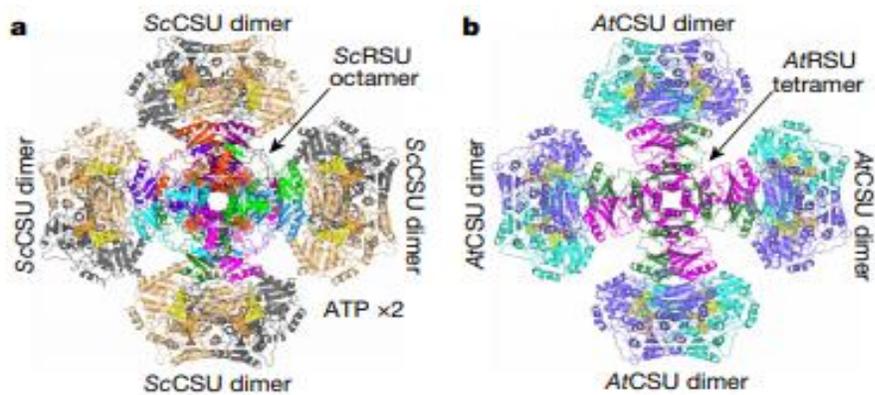
### 1.1.5 Regulación de la actividad enzimática

La biosíntesis de aminoácidos BCAAs puede ser bloqueada por la inhibición de la AHAS y a su vez influir en el desarrollo y el crecimiento de la especie (Cai et al., 2020). Naturalmente, la actividad AHAS es regulada, entre otros mecanismos, por la cantidad de BCAAs disponibles en la célula. Es así como en muchos de los organismos, como por ejemplo bacterias y levaduras, el aminoácido valina inhibe la actividad de AHAS mediante un mecanismo de inhibición por retroalimentación. Se conoce que en las plantas la AHAS también puede ser regulada por el leucina y la inhibición por valina y leucina en conjunto tiene un efecto sinérgico (Takpho et al., 2018). Recientemente, estudios estructurales han elucidado que el mecanismo por el cual tanto valina como leucina inhiben a AHAS. Este mecanismo está mediado por cambios conformacionales que afectan el dominio ACT de la RSU y la región Q de la CSU. Estos cambios disminuyen la capacidad de la enzima para interaccionar con el piruvato y, por consiguiente, disminuyen su capacidad de catalizar la reacción (Lonhienne et al., 2020). Por otra parte, la actividad de AHAS puede ser regulada por moléculas quinonas, las cuales se unen a AHAS en la proximidad del sitio activo y oxidan reversiblemente el cofactor FAD, inactivando la enzima. El cofactor FAD también puede ser oxidado por un mecanismo dependiente de O<sub>2</sub>, a través de la actividad secundaria (Lonhienne et al., 2016).

### 1.1.6 Estructura de la enzima

La enzima AHAS es un complejo enzimático, compuesto por dos subunidades, la subunidad catalítica (CSU, o subunidad grande), la cual alberga el sitio activo, que como dice su nombre desempeña un rol catalítico; y la subunidad regulatoria (RSU, o subunidad pequeña), que aumenta notoriamente la actividad catalítica de la CSU y también concede la sensibilidad a la inhibición por retroalimentación por acumulación de los aminoácidos valina y leucina (Figura 3) (Xie et al., 2018; Liu et al., 2016). Interesantemente, Xie y colaboradores (2018) demostraron que la CSU puede ser activada por RSUs de diferentes especies, ya que los dominios ACT la RSU, encargados de ordenar restos de aminoácidos cruciales para facilitar el ciclo catalítico (Lonhienne et al., 2020), se encuentran ampliamente conservados entre especies.

Estudios de homología de la estructura primaria de la enzima han revelado que, en promedio la CSU tiene una identidad de secuencia del 40%. En contraste, la RSU difiere mucho en composición y longitud entre especies, con el dominio ACT como principal elemento altamente conservado. La CSU está conformada por tres dominios estructurales,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , mientras que la RSU cuenta con un dominio N-terminal y otro C-terminal (Barak & Chipman, 2012). La CSU es un homodímero, con sus centros catalíticos dispuestos en la interfaz entre las dos subunidades. Como se mencionó anteriormente, esta enzima es dependiente de los cofactores ThDP, FAD y ión magnesio, los cuales están unidos a la CSU. La RSU en la estructura de *Saccharomyces cerevisiae* AHAS (ScAHAS) es un octámero, mientras que en la AHAS de *Arabidopsis thaliana* (AtAHAS) esta forma un tetrámero. En ambos casos, la estructura tridimensional de la RSU se parece a la cruz maltesa. La CSU y la RSU se unen mediante el dominio ACT, formando el complejo enzimático AHAS sensible a inhibición por retroalimentación por BCAAs (Figura 3) (Lonhienne et al., 2020).



**Figura 3: La estructura de los complejos de ScAHAS (*Saccharomyces cerevisiae*) y AtAHAS (*Arabidopsis thaliana*)**

a) representa el complejo de ScAHAS, presenta ocho RSU (subunidad reguladora), las cuales contienen un solo dominio ACT y forma un núcleo que se une a cuatro CSU (subunidad catalítica), los dímeros RSU también se encuentran unidos a cuatro pares de ATP a. b) representa el complejo de AtAHAS contienen cuatro RSU, cada una con repeticiones del dominio ACT los cuales forman el núcleo central.

Fuente : (Lonhienne et al., 2020).

### 1.1.7 Inhibición de la actividad enzimática

Adicionalmente, la AHAS puede ser inhibida por diferentes compuestos sintéticos. En efecto, desde los años 1980s, estos compuestos han sido ampliamente empleados como herbicidas comerciales a nivel mundial. En su gran mayoría, este tipo de inhibidores ejercen su acción mediante el bloqueo del canal de acceso al sitio activo, impidiendo de esta forma que el sustrato interaccione con enzima (Garcia, Nouwens, et al., 2017). La inhibición de AHAS por herbicidas comerciales sigue un modelo de inhibición acumulativa reversible, de la cual se pueden determinar constantes de inactivación de la enzima (Tabla 2). En este proceso, la enzima AHAS sufre la inhibición regular que inducen los herbicidas comerciales sumada a la inactivación de la enzima por oxidación del FAD, la cual es inducida por el atrapamiento de moléculas de peracetato en el sitio activo (Garcia, Chua, Low, Lee, Agnew-francis, et al., 2018). Por otra parte, los herbicidas pueden ser capaces de desviar el ThDP hacia otra reacción para la modificación o degradación del cofactor en ThAthDP y ThThDP dejando inactiva la AHAS (Lonhienne et al., 2018).

Los herbicidas comerciales más utilizados en la agricultura a nivel mundial son: sulfonilureas (SU), imidazolinona (IMI), triazolopirimidina-sulfonamida (TP), pirimidinil - tiobenzosatos (PTB) y sulfonilaminocarboniltriazolinonas (SCT) (Yu & Powles, 2014; Zhang et al., 2017; Heap, I, 2020). Estas moléculas son inhibidores extremadamente potentes y presentan constantes de inhibición en el nivel nM y  $\mu\text{M}$  (Tabla 2).

*Tabla 2: Constante de inhibición y la constante aparente de inactivación de algunos herbicidas comerciales*

<b>Inhibidor AHAS</b>	<b>K<sub>i</sub>, nM</b>	<b>k<sub>iapp</sub>, min<sup>-1</sup></b>
<b>Bispyribac (BS)</b>	40.9 ± 6.1	0.32 ± 0.03
<b>Clorimurón Etil (CE)</b>	74.7 ± 6.1	1.22 ± 0.07
<b>Imazaquin (IQ)</b>	18.5 ± 2 × 10 <sup>3</sup>	0.87 ± 0.03
<b>Pyrithiobac (PB)</b>	179 ± 11.6	0.81 ± 0.02
<b>Propoxycarbazona (PC)</b>	434.8 ± 33.8	0.90 ± 0.02
<b>Thiencarbazona Metil (TCM)</b>	670.8 ± 64.0	0.43 ± 0.04

\*La tabla muestra los valores de K<sub>i</sub> y K<sub>iapp</sub> de seis herbicidas comerciales que representan cuatro familias de herbicidas (BS, CE, IQ, PB, PC, TCM). Mientras que TB muestra el valor de la constante K<sub>iapp</sub> a un herbicida comercial de la familia sulfonilureas. Fuente: **(Garcia, Nouwens, et al., 2017)**.

El uso intensivo de estos productos ha ocasionado que, actualmente a nivel mundial, 165 especies de malezas muestren algún grado de resistencia a herbicidas inhibidores de AHAS **(Heap, I, 2020)**. Es un proceso constante y preocupante, por lo que se ha realizado varios de estudios enfocados al mecanismo de resistencia basado en mutaciones de la enzima AHAS, sobreexpresión de la enzima target, mutaciones en enzimas que permiten la detoxificación y mutaciones en enzimas que favorecen la inmovilización del herbicida. Estos cambios, en ciertas ocasiones, están relacionados a mutaciones en uno o varios genes. La resistencia puede clasificarse como dominante completa, semi completa y recesivo para el mecanismo de sobreexpresión como para la mutación de la enzima target **(Ghanizadeh et al., 2019)**.

Para entender el comportamiento del mecanismo resistivo a los herbicidas ocasionado por mutaciones en AHAS, se realizan continuamente investigaciones que tienen como

objetivo estudiar las bases moleculares que dan origen a resistencias en diferentes especies vegetales. Como ejemplos; Yang & colaboradores (2018) estudiaron mutaciones en la AHAS de *Descurainia sophia* L, maleza que afecta los campos de trigo, y lograron determinar el efecto de diferentes mutaciones en las posiciones Pro197, Asp376 y Trp574. El efecto global de estas mutaciones es la disminución de la afinidad del herbicida por su sitio de unión y el aumento de la afinidad de unión del piruvato. Otra investigación realizada con *Raphanus sativus* L, un rábano salvaje proveniente de Argentina, probó que esta especie es resistente a todos los grupos de herbicidas que son inhibidores de AHAS, la cual es adquirida por la mutación Trp574Leu en el gen AHAS (**Pandolf, C. et al, 2016**). Por ultimo un trabajo que consistió en secuenciar el gen AHAS de *Beckmannia syzigachne*, un césped Americano de dos poblaciones (R1 y R2), demostró que la población R1 no presento mutaciones en el gen AHAS, mientras que la población R2 presenta la mutación Pro197Ser que frecuentemente da lugar a resistencia a los herbicidas (**WANG et al., 2018**).

Como se mencionó anteriormente la enzima AHAS también se encuentra presente en microorganismos, por lo tanto, en base a la funcionalidad de los herbicidas inhibidores de AHAS se ha realizado estudios en busca de antibióticos, fungicidas y fármacos. Uno de estos trabajos probó 6800 compuestos como potenciales inhibidores de AHAS de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*AHAS), con miras a desarrollar compuestos con actividad antituberculosis. De los resultados presentados se pudo 15 moléculas activas potencial inhibidor para *Mtb*AHAS (**Jung et al., 2016**). Por otra parte, también se ha demostrado que el inhibidor clorimuron etil (CE), perteneciente a la familia de herbicidas sulfonilurea, es un potente antifúngico capaz de tratar ratones infectados *C. albicans* (**Garcia, Chua, Low, Lee, Agnew-francis, et al., 2018**).

## **1.2 Objetivos**

### **1.2.1 Objetivo general**

Analizar el mecanismo, estructura e inhibición de la enzima Acetohidroxiácido Sintasa.

### **1.2.2. Objetivos específicos**

-Recopilar información acerca de la enzima, mediante libros electrónicos y base de datos de investigación científica

-Seleccionar los estudios más relevantes de la enzima, realizados en plantas y microorganismos que están plasmados en revistas científicas.

-Comparar mediante tablas y gráficos estadísticos las investigaciones seleccionadas, por medio de la interpretación de sus resultados.

## CAPÍTULO II

### METODOLOGÍA

#### 2.1 Métodos

Esta investigación bibliográfica consta en el análisis cualitativo en la cual se contrastó las diferentes investigaciones realizadas en últimos años sobre la temática, para ello se tomó como guía la metodología de una revisión sistemática de literatura científica que trata de un método investigativo consignado a obtener fundamentación, consolidación y evidencia de publicaciones como artículos científicos realizados en distintos campos de estudio, los cuales se encuentran almacenados en distintos repositorios digitales. Tiene como propósito fundamental analizar la investigación con más relevancia, identificar la información, las metodologías empleadas y distinguir los vacíos investigativos en diferentes áreas de interés que ayuden a responder preguntas relacionada con la temática **(Baker, 2016; Tebes et al., 2019)**.

Para el desarrollo de la metodología en la presente investigación sobre “MECANISMO, ESTRUCTURA E INHIBICIÓN DE LA ENZIMA ACETOHIDROXIACIDO SINTASA” se tomó en cuenta las indicaciones y recomendaciones que se encuentran en el Manual de Cochrane para una revisión sistemática **(Sobre et al., 2011; Hutton et al., 2016)**, el método PRISMA (elementos para revisiones sistemáticas de literatura ) **(PRISMA, 2015; Moher et al., 2016; Page et al., 2018)**, propuesta para revisiones sistemáticas de la profesora Barbara Kitchenham **(Kitchenham, 2004)** y metodologías de diferentes trabajos finales de grado **(Altamirano. M, 2018; Meneses. T, 2018; Flores. J, 2020)**.

#### 2.2.1 Primera etapa

##### 2.2.1.1 Pregunta de investigación

En la primera fase se formuló la pregunta para la investigación o revisión sistemática de literatura (RLS), el planteamiento se lo realizó siguiendo el protocolo establecido en el Manual Cochrane **(Sobre et al., 2011)** el cual sugiere guiarse utilizar las siglas PICO (terminología en inglés) que ayuda a identificar y definir los componentes (participantes, intervención, comparaciones y resultados) claves para el desarrollo de la pregunta y posteriormente de la RLS.

*Tabla 3: Variables seleccionadas para la formulación de la pregunta*

<b>Terminología PICO</b>	<b>Componentes del Tema</b>
<b>Participantes o población</b>	Enzima acetohidroxiácido sintasa
<b>Intervención</b>	Metodologías de investigación, revisiones o libros
<b>Comparación</b>	Análisis entre las diferencias entre la estructura, mecanismo, inhibición e inhibidores
<b>Resultado o desenlace</b>	Tipos de mecanismo, estructura e inhibición

\*La tabla muestra las variables que se tomaron en cuenta para la formulación de la pregunta

- **Pregunta de investigación para la revisión sistemática de literatura**

¿Cuál es la estructura, mecanismo funcional, proceso y posibles inhibidores de la enzima Acetohidroxiácido sintasa, según el avance investigativo de los nuevos estudios y publicaciones?

## **2.2.2 Segunda Etapa**

### **2.2.2.1 Bases de datos digitales**

Las bases de almacenamiento científico digitales que se utilizaron para la investigación son

- Google académico
- Scopus
- Springer Link
- PubMed
- Web of Science

### **2.2.2.2 Criterios para la elegibilidad**

La selección exitosa de los estudios pertenecientes al tema, se debe estimar previamente los criterios de elegibilidad como una manera de filtrar la información, ya que, ayudan a incluir o excluir investigaciones en la etapa de búsqueda y selección de la información adecuada. Para este apartado se tomó en consideración los siguientes criterios:

### **2.2.2.3 Criterios para inclusión**

Para realizar esta revisión de literatura se consideró únicamente estudios en artículos científicos que fueron publicados desde el 2015 a la actualidad en un 80%, en cualquier idioma priorizando el inglés y español, para lo cual se considera los siguientes criterios tomando como prioridad la información presente en el título y resumen, por último, se analizara el texto completo.

- Artículos científicos, Revisiones o libros, los cuales presenten información sobre todo lo relacionado a la estructura de la AHAS, estructura de sus subunidades, posibles sitios de unión y cambio de estructura en presencia de un inhibidor, la información puede basarse en investigaciones con fuentes de microorganismos o vegetal.
- Artículos científicos, Revisiones o libros, los cuales presenten información sobre todo lo relacionado al mecanismo de la AHAS, la información puede basarse en investigaciones con fuentes de microorganismos o vegetal.
- Artículos científicos, Revisiones o libros, los cuales presenten información sobre todo lo relacionado a la inhibición de la AHAS, constantes de inhibición, herbicidas inhibidores de AHAS e inhibidores de AHAS para compuestos antimicrobianos, la información puede basarse en investigaciones con fuentes de microorganismos o vegetal.

### **2.2.2.4 Criterios para exclusión**

La exclusión de los artículos se lo realizó tomando en consideración los estudios que no cumplan con los criterios de inclusión, también no se tomó en cuenta tesis de grado relacionadas con el tema.

## **2.2.3 Tercera Etapa**

### **2.2.3.1 Búsqueda de información**

Se realizó la búsqueda de información siguiendo los criterios seleccionados e implementando una estrategia de búsqueda para facilitar el proceso.

### **2.2.3.2 Estructura de la estrategia de búsqueda científica**

En las diferentes bibliotecas informáticas para la identificación, filtración y selección de la información, se utilizó términos de sintaxis de búsqueda (operadores boléanos, de campo,

proximidad y truncamiento) o búsqueda booleana que ayuda a optimizar los resultados e identificar los artículos más relevantes, siguiendo los criterios antes mencionados para incluir en la revisión de literatura (Gutiérrez Gómez, 2017; Bramer et al., 2018).

Para la búsqueda de estudios sobre “MECANISMO, ESTRUCTURA E INHIBICIÓN DE LA ENZIMA ACETOHIDROXIACIDO SINTASA” se separa en las variables Mecanismos, estructura e inhibición por separados con la finalidad de generar los códigos o palabras claves para la búsqueda en las diferentes bases de datos (Google academismo, Scopus, Springer, PubMed & Web of Science).

**Tabla 4:** Ecuaciones de búsqueda par estructura de la enzima acetohidroxiácido sintasa

	ECUACIÓN DE BUSQUEDA
BUSQUEDA CON SINÓNIMOS, OPERADORES LÓGICOS Y BOOLEANOS PARA Google académico, Scopus, Springer, & Web of Science	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ “Structure” +“Acetohydroxyacid Synthase”</li> <li>❖ “Subunits” +“Acetohydroxyacid Synthase”</li> <li>❖ “Structure” +“Acetohydroxyacid Synthase” +“AHAS”+“microorganism” +“plant” +“inhibitor”</li> <li>❖ “Structure” +“holoenzyme” +“Acetohydroxyacid Synthase”</li> </ul>
BUSQUEDA CON SINÓNIMOS, OPERADORES LÓGICOS Y BOOLEANOS PARA PubMed	<p>Structure[All Fields] AND "Acetohydroxyacid Synthase"[All Fields] AND ("2015/11/8"[PDat] : "2020/11/8"[PDat]) AND medline[sb]</p> <p>Subunits[All Fields] AND "Acetohydroxyacid Synthase"[All</p>

---

Fields] AND "inhibition" AND  
 ("2015/11/8"[PDat] : "2020/11/8"[PDat])

---

**Tabla 5:** Ecuaciones de búsqueda para mecanismo de la acetohidroxiácido sintasa

	ECUACIÓN DE BUSQUEDA
BUSQUEDA CON SINÓNIMOS, OPERADORES LÓGICOS Y BOOLEANOS PARA Google académico, Scopus, Springer, & Web of Science	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ “Mechanism” + “enzyme Acetohydroxyacid Synthase”</li> <li>❖ “catabolism” + “enzyme Acetohydroxyacid Synthase”</li> <li>❖ “catalytic mechanism” + “enzyme Acetohydroxyacid Synthase” + “inhibition” + “microorganism” + “plant”</li> </ul>
BUSQUEDA CON SINÓNIMOS, OPERADORES LÓGICOS Y BOOLEANOS PARA PubMed	<p><b>catalytic mechanism</b>  <b>AND "Acetohydroxyacid Synthase"</b>  <b>AND ("last 5 years"[PDat])</b></p>

---

**Tabla 6:** Ecuaciones de búsqueda para inhibición de la acetohidroxiácido sintasa

	ECUACIÓN DE BUSQUEDA
BUSQUEDA CON SINÓNIMOS, OPERADORES LÓGICOS Y BOOLEANOS PARA Google academismo, Scopus, Springer, & Web of Science	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ “Inhibition” +“ inhibitors” +“enzyme Acetohydroxyacid Synthase”</li> <li>❖ “Inhibition” +“Acetohydroxyacid Synthase” +“inhibitor” +“plants” +“microorganism” +“herbicial” +“antibiotic”</li> <li>❖ “Inhibition” + “herbicide” +“Acetohydroxyacid Synthase” +“inhibitor” + “plants” +“microorganism” +“herbicial” +“antibiotic” + “fungal”</li> <li>❖ intitle:"inhibition" +“Acetohydroxyacid Synthase” +“inhibitor”</li> </ul>
BUSQUEDA CON SINÓNIMOS, OPERADORES LÓGICOS Y BOOLEANOS PARA PubMed	<p><b>Inhibition[All Fields] AND "enzyme Acetohydroxyacid Synthase"[All Fields] AND ("2015/11/10"[PDat] : "2020/11/10"[PDat])</b></p> <p><b>Inhibition[All Fields] AND Herbicide AND "enzyme Acetohydroxyacid Synthase"[All Fields] AND ("2015/11/10"[PDat] : "2020/11/10"[PDat])</b></p>

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### ANÁLISIS DE LA LITERATURA

La Acetohidroxiácido sintasa (AHAS, E.C. 2.2.1.6) una descarboxilasa ligasa, conocida también como también como acetolactato sintasa (ALS). Es una enzima mitocondrial dependiente de difosfato de tiamina (ThDP) (**Gokhale & Tilak, 2015; Microbiol et al., 2016; Jan et al., 2020**), cataliza la primera reacción en la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada BCAAS por sus siglas en inglés, valina, leucina e isoleucina, de tal manera que forma parte de su grupo enzimático (AHAS, KARI, DHAA, BCAT, IPMS & IPMI) (**Amorim Franco & Blanchard, 2017**). AHAS está presente en muchos microorganismos (incluida la flora intestinal) y plantas, pero no en animales ni humanos, por lo tanto, se convierte en un foco importante de investigación para el desarrollo de agentes biocidas como; herbicidas comerciales (más de 50) y antimicrobianos (**Garcia, Nouwens, et al., 2017; Xie et al., 2019**). Por otro lado, estos aminoácidos son esenciales para los mamíferos que no pueden sintetizar, requiriendo su ingesta por fuentes externas (**Li et al., 2017**) y gracias a su reducido potencial de toxicidad, también se ha posicionándose como un atractivo objetivo de estudio farmacológico, ya que puede dirigirse a la inhibición de esta vía por medio de la AHAS (**Xie et al., 2019**).

#### 3.1 Mecanismo catalítico y actividades secundarias de AHAS

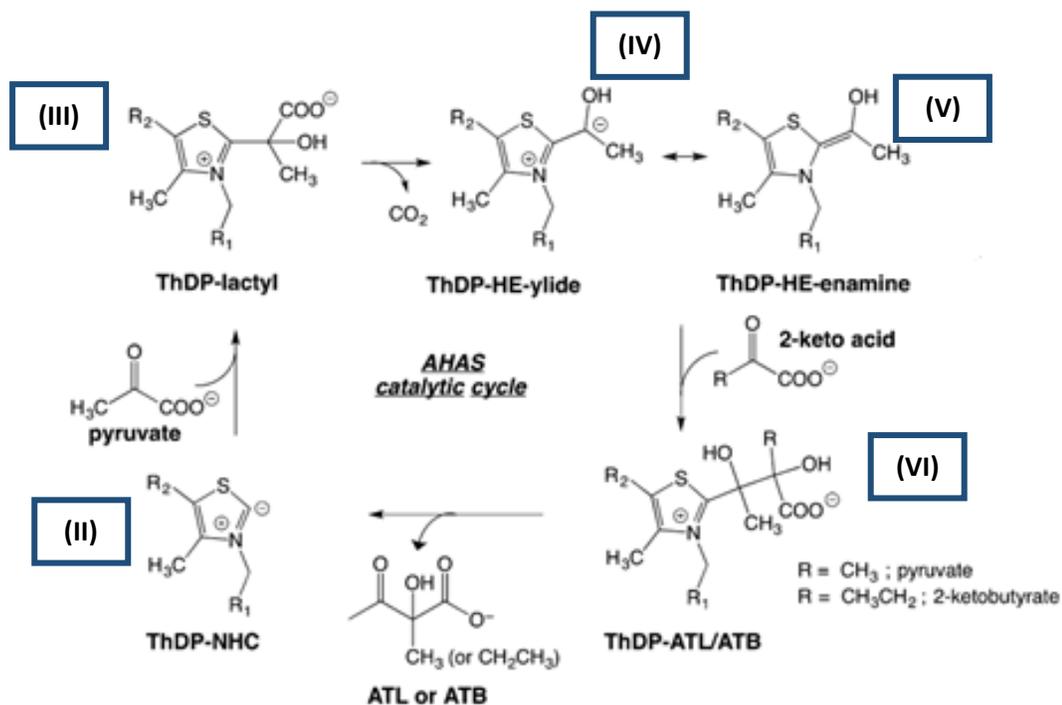
El primer paso de la biosíntesis de BCAAs es catalizado por la acetohidroxiácido sintasa en la mayoría de los organismos donde se encuentra presente, su mecanismo ha ido aclarándose gracias a la cristalografía de proteínas, análisis cinético y mutagénesis diseñada (**Chipman et al., 2005; Zhang et al., 2020**). Requiere de difosfato de tiamina (ThDP), dinucleótido de flavina adenina (FAD) y un ión metálico divalente ( $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  ", etc.) cofactores fundamentales para su mecanismo (**Gokhale & Tilak, 2015; Lonhienne et al. 2017**). El inicio del ciclo catalítica es la unión del sustrato (piruvato) al sitio activo de la enzima y la ionización del anillo de ThDP, para convertir dos moléculas de piruvato en 2-acetolactato o una molécula de piruvato y una de 2-cetobutirato en 2-aceto-2-hidroxiacetato (Figura 5). El 2-acetolactato y 2-aceto-2-hidroxiacetato sirven como precursores para

sintetizar leucina y valina, sin embargo 2-aceto-2-hidroxiacetato solo participa en la síntesis de isoleucina (**Pue et al. 2014; Liu et al., 2016; Liu et al., 2019**).

La principal función del ciclo catalítico de AHAS es la descarboxilación del piruvato que da como resultado un acetaldehído, luego se une a la enzima y se condensa en segundo piruvato o con la molécula 2-cetobutirato, el cofactor necesario para este proceso es el ThDP (difosfato de tiamina) junto al catión bivalente, el cual ancla el ThDP a la fracción catalítica de la enzima (**Gokhale & Tilak, 2015; Gedi & Yoon, 2012**). El primer paso, el ThDP se encuentra con una conformación V que es adoptada por un carboxilato de cadena lateral de glutamato (Glu en AHAS) al nitrógeno del anillo, de tal manera que su anillo es ionizado y comienza la unión del piruvato al sitio activo de AHAS, En la segunda etapa esta forma protonada del cofactor se ioniza para formar un iluro-ThDP altamente reactivo, luego ocurre la adición de carbonilo al carbanión C2 de ThDP para producir el intermediario 2-lactil-ThDP (LThDP) (**Liu et al., 2016**). Posteriormente ocurre la descarboxilación de LThDP para liberar CO<sub>2</sub> generando un intermediario carbanión/enamina hidroxietilo-ThDP (E-HETHDP) (Figura 5). A continuación, en intermediario (E-HETHDP) puede atacar el segundo sustrato aceptor (piruvato o 2-cetobutirato) carbonilo y formar el complejo 2-acetolactotiaminadifosfato (AL-ThDP) cuando reacciona con una molécula de piruvato o el intermediario 2-acetohidroxiacetato- tiaminadifosfato (AHB-ThDP) cuando reacciona con una molécula de 2-cetbutirato. Finalmente, el producto se disocia del ThDP y se regenera, 2-acetolactato o 2-aceto-Hidroxiacetato (**Chipman et al., 2005; Lonhienne et al., 2016; Amorim Franco & Blanchard, 2017**). La producción depende de las cantidades de los sustratos aceptores, es decir la competencia entre los segundos sustratos por el HE-THDP determina la cantidad de formación de producto, por otro lado, estudios han demostrado que las mutaciones Met250, Phe109 y Arg276 hacen que determine la velocidad en la reacción de HETHDP con el segundo sustrato y la liberación del producto (**Chipman et al., 2005; Gokhale & Tilak, 2015**).

Toda enzima dependiente de ThDP requiere la presencia de un ión metálico que puede ser Mn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> ", etc., el cual ayuda a la unión del oxígeno fosfato de ThDP y dos aminoácidos de la enzima, manteniendo el cofactor en su lugar. Uno de los mecanismos catalíticos más estudiados ha sido *E. coli*, donde se ha evidenciado que el ion metálico está

en la unión central con las cadenas laterales Asp428, Asn455 y Arg457 de la enzima AHAS junto a una molécula de agua y los dos oxígenos de ThDP (**Duggleby & Pang, 2000; Gokhale & Tilak, 2015**).



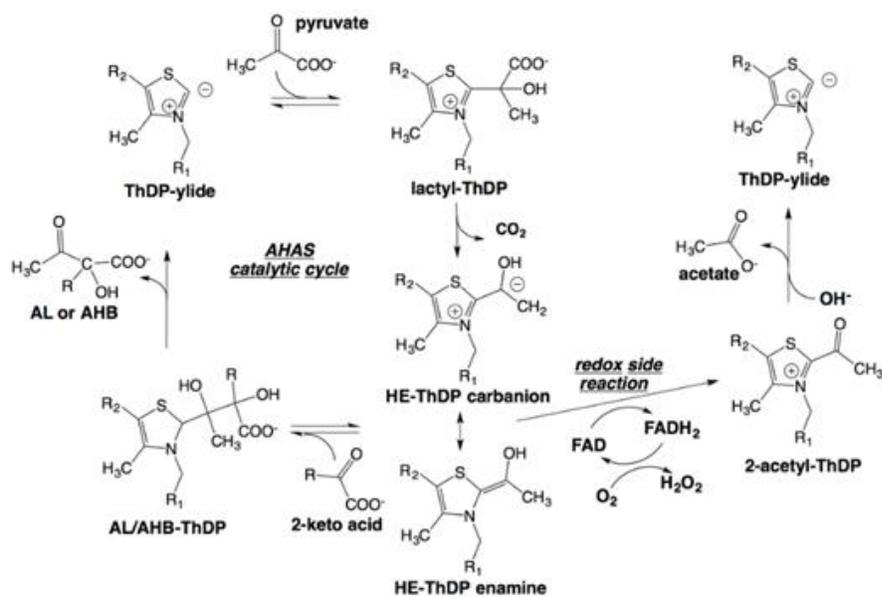
**Figura 4: Ciclo catalítico de AHAS**

Se produce la condensación de dos moléculas de piruvato en 2-acetolactato o una molécula de piruvato y una de 2-cetobutirato en 2-aceto-2-hidroxitbutirato.

Modificado de: (**Lonhienne et al., 2016**)

El cofactor FAD (Flavina) no participa en la reacción de la enzima AHAS, Tittmann et al, (2004) mencionan que es fundamental para la actividad enzimática y su integridad. El cofactor FAD unido a la enzima se reduce en una reacción secundaria, el intermediario 2- (hidroxi)etil-ThDP (HE-ThDP) transfiere 2 electrones a FAD que produce 2-acetil-ThDP y FADH<sub>2</sub>, posteriormente FADH<sub>2</sub> es reoxidado por el Oxígeno dando como resultado peróxido de hidrógeno y FAD, finalmente el 2-acetil-ThDP se separa en ThDP y libera fosfato de acetilo. Con esta información se evidencia que el intermediario (HE-ThDP) en la forma carbaniónica / enamina también este sujeto a la transferencia de electrones.

Además de la reacción principal de AHAS, se ha detectado reacciones secundarias. El 2-cetobutirato es un segundo sustrato preferido por AHAS, este se une y se convierte de forma débil en primer sustrato, también AHAS puede reaccionar con 2-cetoácidos homólogos. La isoenzima de *E.coli* AHAS III puede combinarse con 2-cetovalerato un sustituyente propilo en lugar de etilo, para formar 2-aceto-2-hidroxisvalerato (Tittmann et al., 2005). Acetohidroxiácido sintasa tiene una reacción de oxigenasa secundaria, ocupando el 1% de velocidad de la actividad sintasa. Se trata de una reacción de consumo de oxígeno, resulta de la unión del intermediario HE-ThDP 2- (hidroxietil) -ThDP a la molécula de oxígeno se da un ataque electrofílico para producir acetato (Tittmann et al., 2004). También podría catalizar una reacción secundaria piruvato oxidasa (POX) de AHAS de transferencia de electrones, en donde el HE-ThDP carbanión / enamina a FAD y producir 2-acetil-ThDP y FAD reducido como se presenta en la Figura 6 (Tittmann et al., 2004; Liu et al., 2016).



**Figura 5: Ciclo catalítico de Acetohidroxiácido sintasa y reacción secundaria redox de AHAS.**

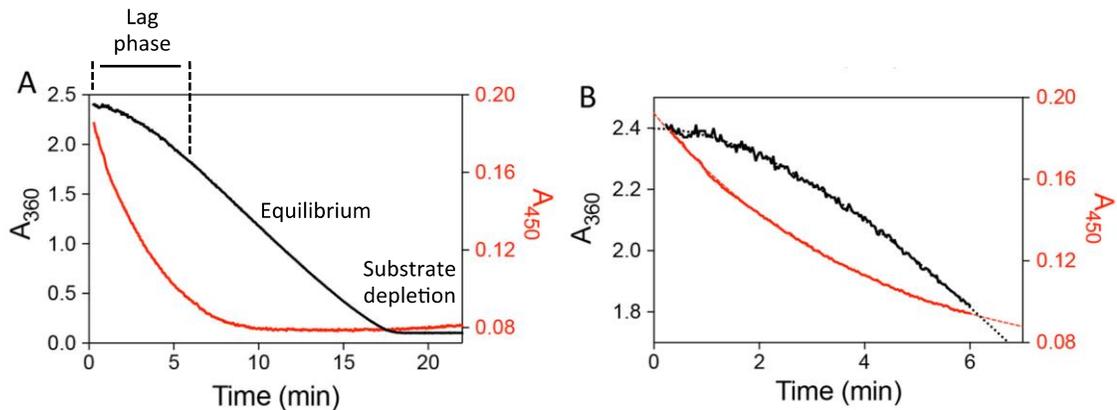
\*ThDP=difosfato de tiamina, HE=hidroxietil, AL=acetolactato, AHB=acetohidroxiacetato

Fuente: (Lonhienne, Garcia, Fraser, et al., 2017)

### 3.1.1 Actividad sintasa

#### 3.1.1.1 La fase *lag* y sus implicaciones en la determinación de las propiedades cinéticas de la enzima.

La actividad catalítica de HAS se observa mediante una curva que evalúa el consumo del sustrato durante el proceso de reacción, en esta curva se visualiza la fase lag que depende de la temperatura que requiere la incubación con el sustrato antes de su actividad máxima (Hwang et al., 2003; Lonhienne, Garcia, & Guddat, 2017). Primeros estudios en AHAS de *Arabidopsis thaliana* presenta su cinética negativa con respecto a la concentración del piruvato donde se produce tiempo lag antes de alcanzar por completo la actividad enzimática. Hwang et al, (2003) encontraron la dependencia del tiempo lag con la concentración del piruvato y los cofactores, a concentraciones más bajas el tiempo lag es más largo y a concentraciones más altas el tiempo lag disminuye. La fase lag puede variar dependiendo de la fuente de estudios con *R. eutropha* de tipo silvestre se evidencio un retraso en el crecimiento en el cual la fase lag tuvo un tipo de duración más de 24 horas (Lu et al., 2015). Por otro lado, durante las primeras etapas de la reacción la fase lag de AHAS está relacionada al proceso lecto de la activación de FAD por la actividad redox, lo que quiere decir que la reducción de FAD y la tasa de activación enzimática son idénticas (Lonhienne, Garcia, & Guddat, 2017).



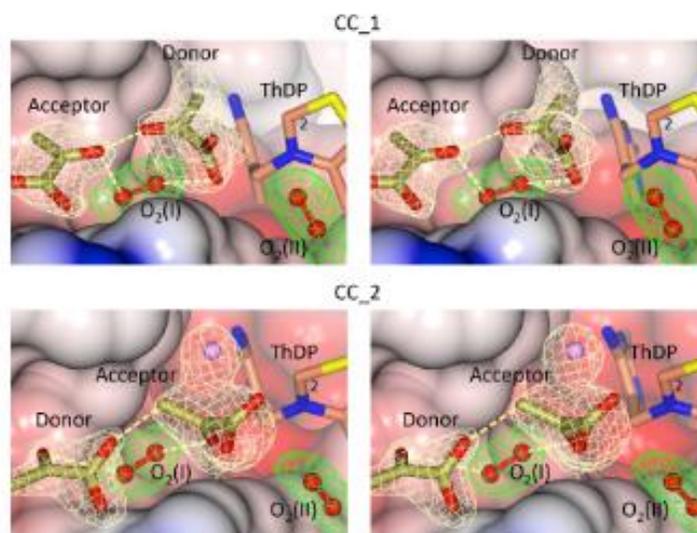
**Figura 6: Seguimiento de la reducción de los FAD durante la catálisis del MtAHAS por UV-VIS**

A. La curva negra representa la reacción de MtAHAS con piruvato, mientras que la roja muestra la absorción de FAD. B. Muestra el ajuste de las curvas que corresponden a la fase de retardo en la reacción presentada en A, en la curva negra se observa la activación de la enzima y la roja presenta la reducción de FAD.

Fuente: (Lonhienne, Garcia, & Guddat, 2017).

### 3.1.1.2 El rol del oxígeno en el ciclo catalítico.

Lonhienne y colaboradores (2017) mencionan que el  $O_2$  juega el papel de cofactor, está unido a la enzima en un sitio cercano a ThDP para la densidad electrónica de su C2. En cada centro activo de la enzima están presentes dos moléculas de  $O_2$  ( $O_2$  (I) y  $O_2$  (II)). Es así como  $O_2$  (I) se ajusta en un bolsillo revestido por los residuos G116 y A117 del bucle 1, T162 y S163 del bucle 2 y Q202 en contacto con el átomo de carbono C7' del anillo de pirimidina de ThDP, mientras que  $O_2$  (II) encaja en el sitio activo, colocándose sobre el anillo de tiazol de ThDP. En conclusión,  $O_2$  (I) y  $O_2$  (II) son cofactores involucrados en la actividad de la enzima,  $O_2$  (I) forma una red de interacción adyacente al ThDP, siendo un socio redox indirecto de FAD, con una posición ideal para recibir un electrón del grupo carboxilo del piruvato donante como FAD está en posición para la transferencia de un electrón al grupo aldehído del piruvato, por lo tanto, los dos sirven de transportadores de electrones. Sin embargo,  $O_2$  (II) genera una carga negativa en el carboxilato del piruvato para empujar el electrón deslocalizado con dirección del  $O_2$  (I) (Lonhienne, Garcia, Noble, et al., 2017).



**Figura 7: Redes de interacción en los centros catalíticos de ScAHAS con  $O_2$**

Se observa los centros catalíticos de ScAHAS CC\_1 y CC\_2 en donde se encuentra un complejo ternario donante: aceptador:  $O_2$ , la molécula de agua  $H_2O$  es simbolizada de color rosa, el piruvato de color dorado y las moléculas de oxígeno de color rojo.

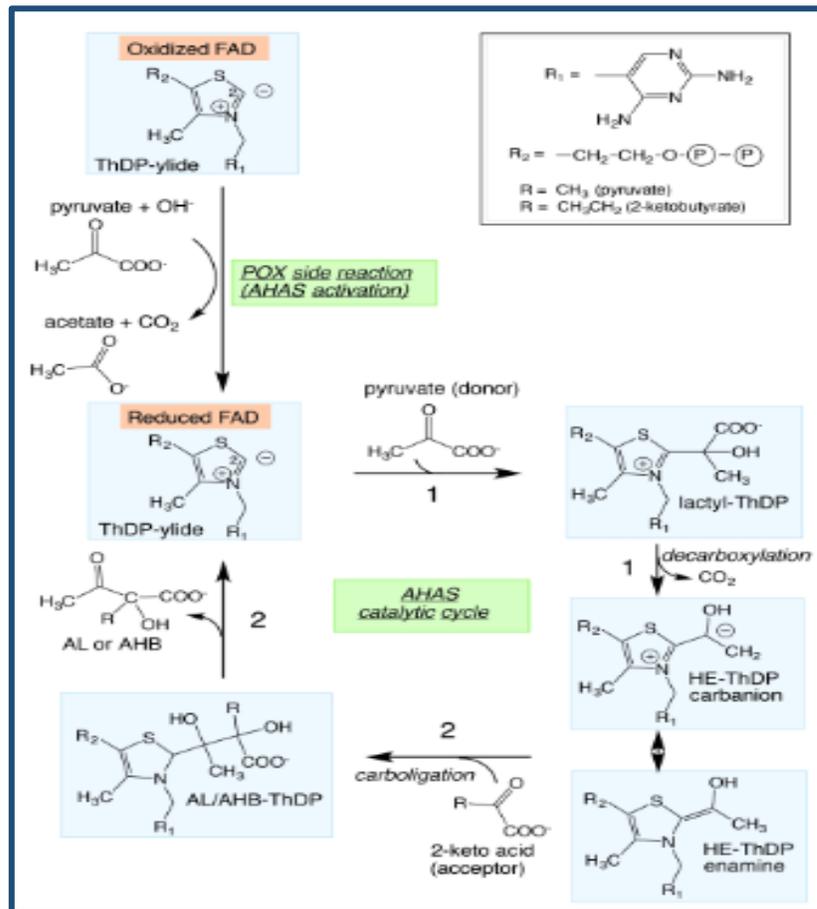
Fuente: (Lonhienne, Garcia, Noble, et al., 2017)

### 3.1.2 Actividad redox

La enzima AHAS para su actividad anabólica requiere de FAD para la oxidación y reducción cíclica (Gokhale & Tilak, 2015), jugando un papel redox (Pang et al., 2002; Liu et al., 2016). Es decir que la presencia de FAD en la acetohidroxiácido sintasa es un cofactor redox versátil, de tal manera que la reducción de FAD es imperativa para la activación de AHAS, la relación entre la actividad enzimática y estado redox de FAD, se da por la adición de piruvato a la cubeta de reacción al finalizar la primera reacción cuando FAD se reduce por completo (Lonhienne, Garcia, & Guddat, 2017). También se ha demostrado que FAD puede adquirir diferentes conformaciones en los centros catalíticos (CC\_1 y CC\_2) con la posibilidad que pueden estar involucrados en la reacción redox (Lonhienne, Garcia, Fraser, et al., 2017). En CC\_1 el anillo de isoaloxazina de FAD se dobla  $21^\circ$  aumentando su potencial redox y estabilizando su forma a reducida, mientras que en el CC\_2 conformación tomada por FADox o FAD radical, el anillo aromático F201 se encuentra cerca del metilo C7 de FAD a  $3.71 \text{ \AA}$  (Lonhienne, Garcia, Noble, et al., 2017).

### 3.1.3 Actividad POX

La enzima AHAS posee además una actividad piruvato oxidasa remanente de su ancestro, la enzima piruvato oxidasa (POX) (Figura 8). Esta característica es intrigante, ya que aparentemente AHAS no requiere de esta actividad para el curso normal de la reacción que cataliza. Sin embargo, esta característica no ha sido eliminada durante su proceso de evolución y selección natural. (Lonhienne et al. 2017).



**Figura 8: Activación de redox y ciclo catalítico del AHAS y la actividad secundaria POX**

La primera etapa corresponde a la reacción de descarboxilación del donante para la formación de HE-ThDP como intermediario. El segundo paso consiste en la carbolinización del HETHDP al aceptador y la liberación del producto.

Fuente: (Lonhienne, Garcia, Noble, et al., 2017)

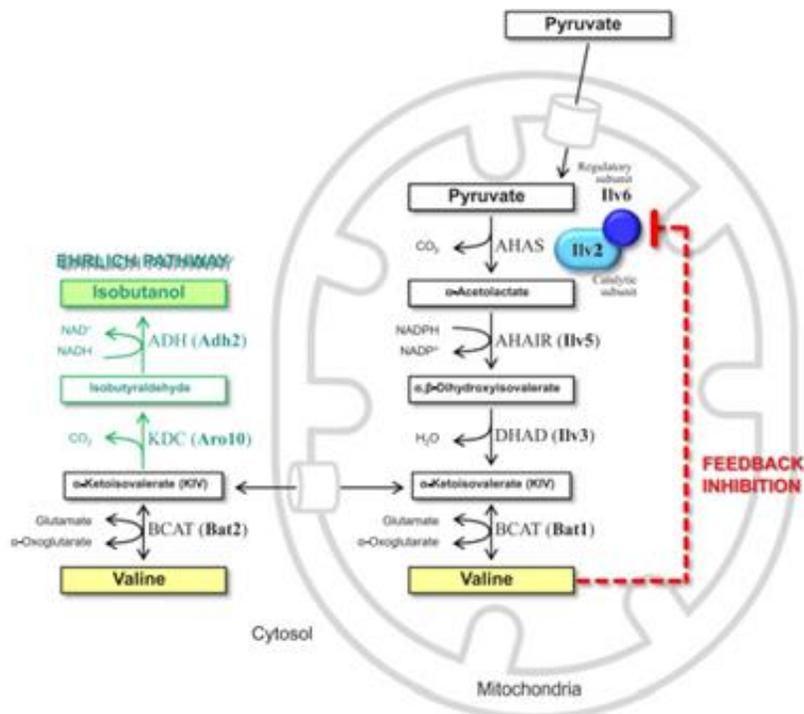
### 3.1.4 Regulación de la actividad enzimática.

Dependiendo del tipo de organismo diferentes mecanismos están involucrados en la regulación de la actividad o expresión enzimática como; la regulación por retroalimentación del producto final y la compartimentación de la biosíntesis. La regulación por retroalimentación de las AHAS se da por cualquiera de los productos finales de la BCAAs leucina, valina e isoleucina lo que ayuda a un suministro equilibrado de producto (Duggleby & Pang, 2000; Gokhale & Tilak, 2015). Con excepción para AHAS de *E. coli* y *S.*

*typhimurium* en las AHAS de otros organismos la actividad es regulada por al menos uno de los aminoácidos. En muchos estudios se ha demostrado que el inhibidor más poderoso es la valina mientras que el menos potente es la leucina (**Yanfeng Guo et al., 2015; Gokhale & Tilak, 2015**). Por ejemplo, Takpho, Watanabe & Takagi (2018) menciona que en *S. cerevisiae*, la biosíntesis de valina es regulada por la misma valina mediante la inhibición por retroalimentación en la acetohidroxiácido sintasa (AHAS).

#### **3.1.4.1 Regulación por la subunidad regulatoria.**

Las subunidades reguladoras (RSU) de las AHAS ayudan a la actividad catalítica de la enzima y la regulación del producto mediante la inhibición por retroalimentación (**Pue & Guddat, 2014**), la actividad de *S. cerevisiae* (ScAHAS- subunidad catalítica) es estimulada por la subunidad reguladora, de tal manera que la interacción entre estas dos subunidades otorga la regulación por retroalimentación por valina como se muestra en la figura 9 inhibición revertida por ATP. Otros derivados de valina no tuvieron efecto en la actividad de ScAHAS , lo que indica que la valina se une de manera específica a la unidad reguladora (Figura 10) (**Takpho et al., 2018; Yanfeng Guo et al., 2015**). Esta subunidad inhibe el punto final de la actividad catalítica de la enzima interactuando con el dominio ACT (**Dezfulian et al., 2017**). En procariontes el inhibidor es valina y leucina e isoleucina en menor medida. En las enterobacterias para AHAS I la valina es un fuerte inhibidor por retroalimentación, AHAS III se inhibe por valina a una concentración de 60-80% saturada, mientras que AHAS II resiste a valina (**J. A. McCourt & Duggleby, 2006; Bansal et al., 2019**).



**Figura 9: Regulación por valina en las vías metabólicas de desde el piruvato a la valina**

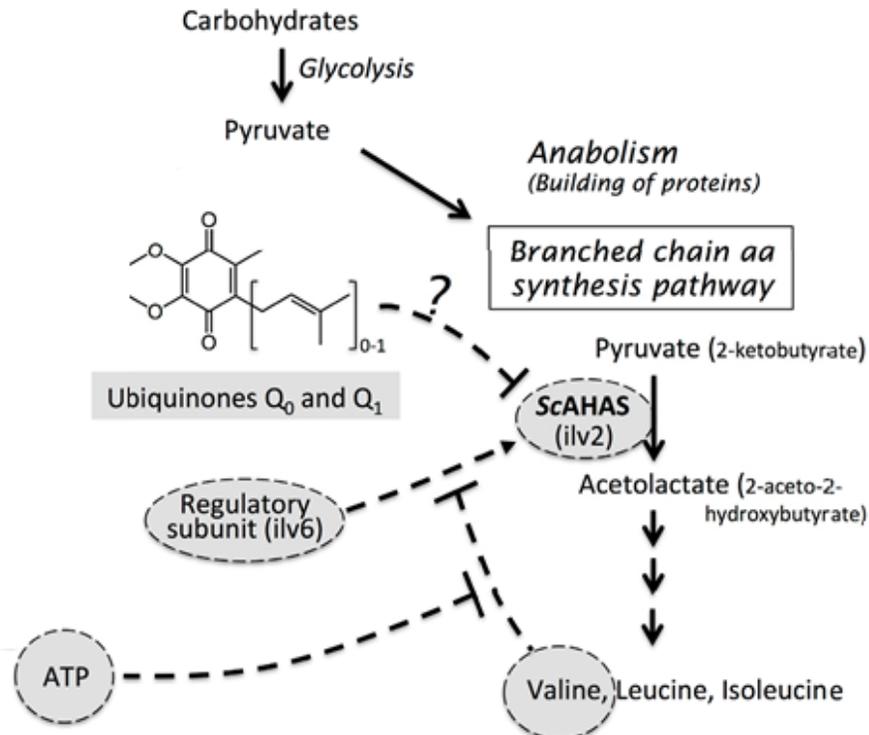
Ilv2, subunidad catalítica de la acetohidroxiácido sintasa (AHAS); Ilv6, subunidad reguladora de la acetohidroxiácido sintasa (AHAS).

Fuente: (Takpho et al., 2018)

### 3.1.4.2 El rol del FAD y moléculas quinonas en la regulación del ciclo catalítico.

En la activación de AHAS es necesaria la reducción del cofactor FAD (Flavín adenín dinucleótido) que contribuye con la regulación de la biosíntesis de BCAAs (Lonhienne, Garcia, & Guddat, 2017), se ha demostrado que este proceso regulatorio puede ocurrir por la presencia de quinonas como ubiquinonas (Figura 11) ( $Q_0$  y  $Q_1$  inhiben AHASs de bacterias) ya que, AHAS tiene un sitio de unión a la quinona derivado de su antepasado piruvato oxidasa y su exigencia de FAD (Muller & Schulz, 1993; Cornacchione et al., 2019). Se ha demostrado que la ubiquinona  $Q_0$  oxida a FAD cuando está ligada a la enzima. En la inhibición por  $Q_1$  se asocia a una reacción redox entre  $Q_1$  y FAD, este mecanismo será más potente a bajas concentraciones de piruvato debido a la disminución de la activación de AHAS por la concentración del sustrato, esta característica indica la regulación de AHAS

por redox. Por otro lado, la recuperación de la actividad enzimática es lenta y está relacionada con la reducción del FAD. (Lonhienne, Garcia, & Guddat, 2017)

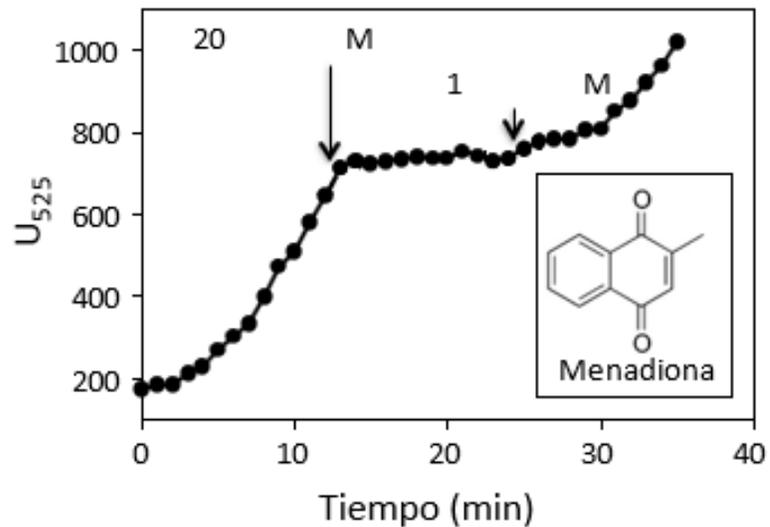


**Figura 10: Regulación de la actividad catalítica de ScAHAS**

Representa las diferentes rutas de la regulación enzimática de AHAS

Modificado de: (Lonhienne, Garcia, & Guddat, 2017)

Otras moléculas derivadas de la quinona pueden inhibir las enzimas AHAS a parte las ubiquinonas ( $Q_0$  y  $Q_1$ ), una de ellas es la menadiona que inhibe *MtAHAS* (*Mycobacterium tuberculosis*) de forma idéntica a  $Q_0$  y  $Q_1$ , de tal manera que puede servir diferentes moléculas de señal redox para la regulación catalítica con quinonas es genérica para las enzimas AHAS específica de los organismos (Lonhienne, Garcia, & Guddat, 2017). Finalmente, se ha determinado que existe una similitud en la inhibición por quinonas y herbicidas comerciales, aunque difieren en que las quinonas oxidan de manera diferente al FAD y los herbicidas en su último paso la especie reactiva del oxígeno que oxida el FAD (Lonhienne et al., 2016).



**Figura 11: La inhibición del MtAHAS por menadiona**

Curva de progreso de la inhibición MtAHAS por menadiona, realizada en un estudio mediante ensayo clorimétrico, muestra que luego de 113 minutos de reacción a una temperatura de 30°C alcanza su velocidad máxima, a la cual se le añadió menadiona resultando una inhibición completa de la actividad de MtAHAS.

Modificado de: (Lonhienne, Garcia, & Guddat, 2017)

### 3.2 Estructura de la AHAS

La acetohidroxiácido sintasa es un polipéptido complejo, estructuralmente formada por la subunidad catalítica (CSU, o subunidad grande), la cual alberga el sitio activo, que como dice su nombre desempeña un rol catalítico; y la subunidad regulatoria (RSU, o subunidad pequeña) (Xie et al., 2018). AHAS es codificada por el gen *ilv*, dependiendo del organismo la proteína AHAS presenta homología, en la base UniProtKB, hay 21.576 especies 91% en bacterias, 6% en eucariotas y 3% en arqueas (Liu et al., 2017). Según Yaqoob et al, (2016) al analizar el modelo filogenético y estructural de AHAS en *Oryza sativa* (arroz) en comparación con *Arabidopsis thaliana*, la secuencia de la proteína es de 644 residuos de aminoácidos y menciona que existe un 76% de identidad en la secuencia con *A. thaliana*, en cuanto a la estructura para *O. sativa* AHAS está compuesta de 31,52% de hélices  $\alpha$ , 22,52% y 9,94% de  $\beta$ -vuelta mientras que *A. thaliana* AHAS posee 33,22%  $\alpha$ -hélices, 23,63% hebras

extendidas y 9,76%  $\beta$ -vuelta. Por otra parte, *A. thaliana* los tres dominios de cada subunidad tiene,  $\alpha$  (residuos 86-280),  $\beta$  (281- 451), y  $\gamma$  (463-639) y un C-terminal (646-668) formando un bucle en el sitio activo (**Jennifer A. McCourt et al., 2006**). Por otra parte, Lonhienne y colaboradores (2020) demostraron que *AtAHAS* (*A. thaliana*) tiene una analogía estructura con respecto a *ScAHAS* (*Saccharomyces cerevisiae*) siguiendo su estructura cristalina y la microscopia electrónica, se demostró que *ScAHAS* tienen ocho CSU (subunidad catalítica) y ocho RSU (subunidad regulatoria), en los que cuatro dímeros de CSU están unidos en las extremidades y los RSU forman un núcleo central enlazados con ATP, con excepción de que *AtAHAS* (*A. thaliana*) posee solo cuatro RSU en vez de ocho y no se observa la presencia de ATP.

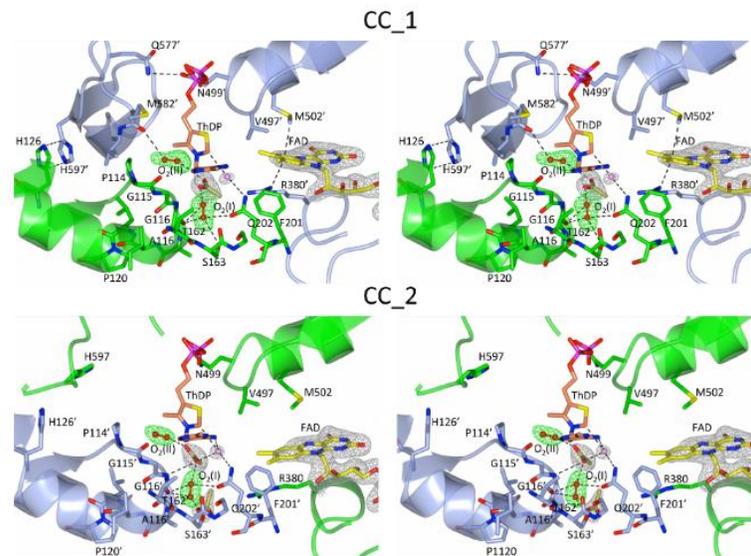
En cuanto a, las AHAS bacterianas muchas gran-positivas expresan un solo AHAS, pero algunas bacterias como *E. coli* poseen tres isoenzimas de AHAS (AHAS I, II y III) con diferentes propiedades. Están compuestas de subunidades grandes de (AHAS-L o CSU) y subunidades pequeñas (AHAS-S o RSU), la estructura de las AHAS-L tienen tamaños similares en diferentes bacterias, mientras que las AHAS-S varían su tamaño entre 9 a 17 KDa (**Barak & Chipman, 2012; Bansal et al., 2019**). Además, en *E. coli* se demostró que AHAS I y AHAS II tienen una similitud de 47%, mientras que AHAS II y AHAS III homológamente tienen un 39% de identidad a comparación de AHAS I Y III con un 44% (**Gedi & Yoon, 2012**).

### **3.2.1 Estructura de la subunidad catalítica**

La subunidad catalítica (CSU) forma un dímero con tres dominios denominados  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  y un centro catalítico, sus secuencias son altamente conservadas en todas las AHAS con una masa molecular de 60 kDa y los tres cofactores indispensables (FAD, ThDP y un ion metálico) están unidos a la CSU al igual que la presencia de 2 moléculas de  $O_2$  en sus centros catalíticos (**Zhao et al., 2013; Lonhienne, Garcia, Fraser, et al., 2017**). En una estructura cristalina de 2,0 Å de alta resolución de AHAS en *S. cerevisiae* desarrollada por Lonhienne et al (2017) mencionan que el dímero tiene una estructura asimétrica, es decir, que sus centros catalíticos presentan configuraciones diferentes. Uno de los centros catalíticos (CC\_1) el FAD adquiere una conformación que aumenta su potencial redox, mientras que el otro centro catalítico (CC\_2) FAD presenta una conformación oxidado o semi- reducido, por

lo tanto, los dos sitios representan dos etapas diferentes del ciclo catalítico. (Lonhienne, Garcia, Fraser, et al., 2017).

Además, se indica que, en las diferentes conformaciones de los centros catalíticos, CC\_1 antes de la primera etapa de reacción (descarboxilación del piruvato y formación de HE-ThDP) el primer piruvato en CC\_1 representa una posición de donante cuando ingresa al sitio de AHAS activo y así efectuar la primera reacción. Mientras que en el CC\_2 el primer piruvato toma la conformación de aceptador antes de condensarse con el intermedio HE-ThDP (Figura 13) (Lonhienne, Garcia, Noble, et al., 2017).



*Figura 12: Vistas estereoscópicas de la estructura del homodímero Sc AHAS y las diferentes conformaciones en los centros catalíticos, CC\_1 y CC\_2*

Fuente: (Lonhienne, Garcia, Fraser, et al., 2017)

### 3.2.2 Estructura de la subunidad regulatoria

La subunidad regulatoria (RSU) representa un dímero en bacterias y levaduras, pero en plantas un monómero que posee un dominio N (dominio ACT) y C-terminal, se encuentran plegados en topología de  $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ , es decir los dominios C-terminal se combinan y su hoja beta se coloca aproximadamente una tras otra de forma perpendicular a la hoja beta del dominio ACT esencial en el metabolismo de los aminoácidos. Se ha determinado que la subunidad RSU de las AHAS en especies fúngica tiene residuos de 140-150 aminoácidos (Barak & Chipman, 2012; Bansal et al., 2019).

Además, el dominio ACT de 60-70 residuos se encuentra ensamblado por dos dominios N-terminal, en el que conduce a cuatro cadenas hojas de forma antiparalela con dos hélices también antiparalelas en una cara. Posteriormente, RSU cumple un doble papel, la actividad en la subunidad CSU e interviene en regulación enzimática (Lang et al., 2014).



**Figura 13:** Estructura cristalina de *IlvN*- subunidad RSU.

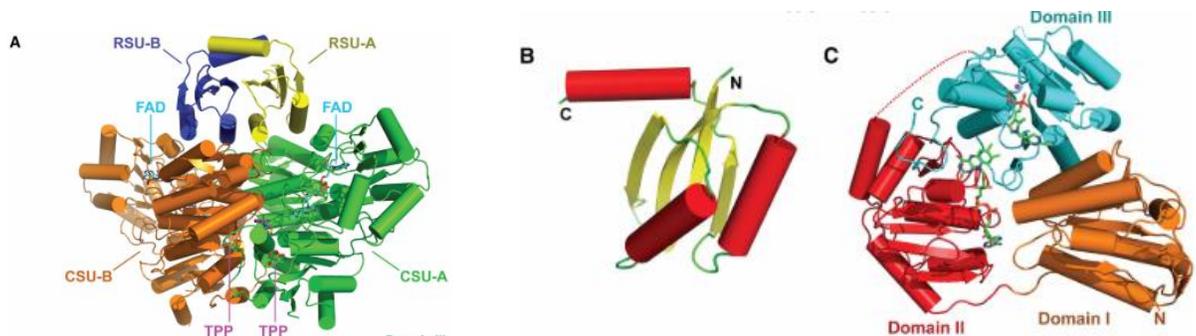
Subunidad pequeña de la acetohidroxiácido sintasas (subunidad RSU)-organismo *Escherichia coli* K-12

**Fuente:** (<http://www.rcsb.org/3d-view/5YPY>)

En la estructura cristalina de SCAHAS (*Saccharomyces cerevisiae*) se identificó que RSU tiene cuatro regiones diferentes, una extensión y un dominio N-terminal (formado por dos  $\alpha$ -hélices y cuatro  $\beta$ -hélices), y una extensión y un dominio C-terminal que tienen topologías similares según los homodímeros bacterianos (Petkowski et al., 2007; Lonhienne et al., 2020). Para la formación de un ACT se ensamblan 2 N- terminales y la conformación de este dominio poseen similitud estructural con el AHAS bacteriano, aunque esta tiene una secuencia insertada en Sc-RSU que forma un bucle, el cual interactúa con el enlazador  $\alpha$ - $\beta$  de la CSU y con el N- terminal de las otras RSU. Además, en la RSU el N y los terminales C adoptan estructuras análogas a tentáculos que establecen interacciones con las subunidades vecinas ya que su estación pasa a la región central. Finalmente, en AHAS de *Arabidopsis thaliana* la estructura de RSU es similar a SCAHAS, excepto que no forman un bucle de contacto (Lonhienne et al., 2020).

### 3.2.3 Estructura de la holoenzima

La Holoenzima AHAS es un complejo que consta de una subunidad catalítica (CSU-subunidad grande) y una subunidad regulatoria (RSU) (subunidad pequeña y grande) (Xie et al., 2019). Consta de cuatro hélices en el dígito de RSU y contiene un bucle de activación en el dígito CSU. Este bucle es una parte de la interfaz de integración, el cual proporciona la base para que RSU regule la actividad de CSU en la holoenzima. Por otro lado, en la interfaz del dímero RSU se encuentra la bolsa de unión a valina o isoleucina (Figura 15) (Bansal et al., 2019; Zhang et al., 2020).



**Figura 14: Estructuras cristalinas de la holoenzima AHAS**

A. Representa la estructura general de la holoenzima de *E. coli* con sus subunidades (RSU y CSU) y la presencia de TPP y FAD. B es una representación de RSU C. Representación estructural de CSU unidos a TPP y FAD.

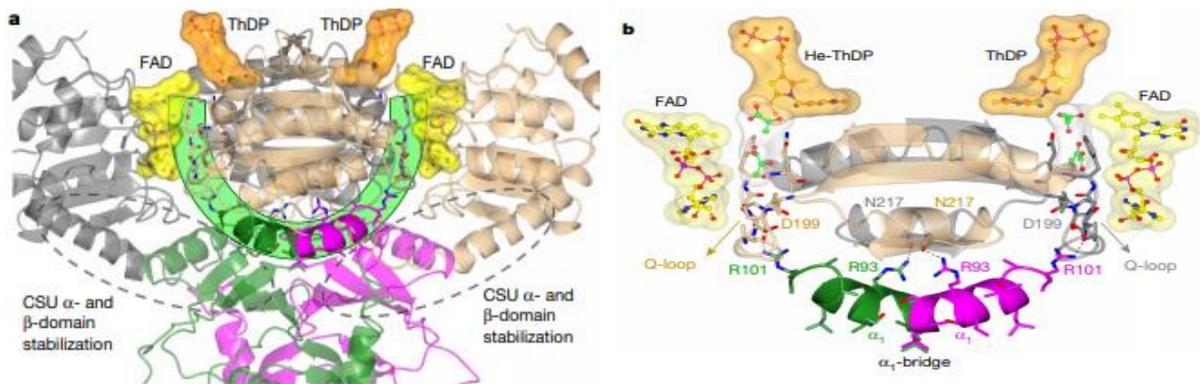
Fuente: (Zhang et al., 2020)

#### 3.2.3.1 Arquitectura del complejo AHAS

En el complejo enzimático de AHAS estudiado en *Saccharomyces cerevisiae* se ha determinado que el N-terminal y el C-terminal de la subunidad RSU poseen estructuras parecidas a tentáculos que sobresalen el centro de las RSU y establecer las conexiones con las RSU vecinas (Cada RSU con 6 vecinas), en presencia de ATP presentan una configuración octamétrica. Además, se forma un puente salino R11 y R343 con D204, el cual es esencial para la estabilidad del complejo. Por otra parte, en *Arabidopsis thaliana* la disposición general de RSU y CSU es análogo al complejo de ScaHAS, sin embargo, no existe un bucle de contacto en AtAHAS y el dígito CSU se contrae cuando se une RSU como una manera de estabilización (Lonhienne et al., 2020). Particularmente, la subunidad RSU

mejora la capacidad catalítica y aporta sensibilidad al complejo AHAS, además RSU en la estructura cristalina muestra que la hélice  $\alpha$  de los dominios ACT se relaciona con CSU (Vyazmensky et al., 2009; Zhang et al., 2020).

Las estructuras cristalinas informadas de RSU muestran claramente que las láminas  $\beta$  de los ACT están totalmente enterradas entre las hélices  $\alpha$  de los dominios ACT y los dominios C-terminales, lo que determina que las hélices  $\alpha$  de los dominios ACT interactúan con CSU (Zhang et al., 2020). Hay una posible interpretación para la actividad cruzada, ya que también se observó una carga negativa en CSU que coincide con la carga positiva de la superficie de ACT en RSU (Xie et al., 2018). Además, se observó que posee dos conformaciones diferentes, lo que puede representar estados intermedios del bucle de activación en la catálisis (Figura 16b). Las cadenas del dinero RSU forman la ruta entre el bucle catalítico del dinero CSU, las demás regiones de los dominios ACT ayudan a la estabilidad de los dominios  $\alpha$  y  $\beta$  del dímero CSU (Figura 16a). Dicho de otra manera, se dedujo que la interfaz de interacción ocurre entre los dominios  $\alpha$  y  $\beta$  de los CSU, ya que forman un espacio hacia dentro, ajustándose a la hélice  $\alpha$  de los dominios ACT de RSU (Lonhienne et al., 2020).



**Figura 15: Estructura del complejo y la ScRSU influye en la conformación de la ScCSU**

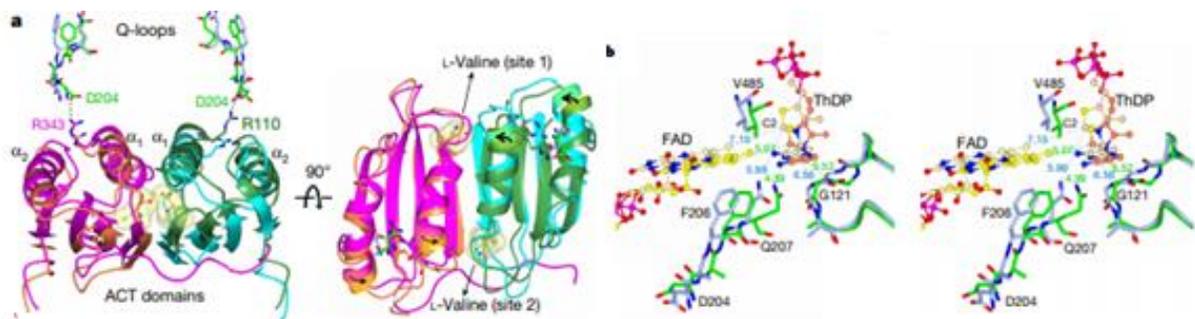
a. Representa la interacción entre el dominio ACT de RSU que establece una ruta entre el bucle catalítico de CSU. b. presenta la simetría de los entre los centros catalíticos con una conformación diferente cada uno para participar en el ciclo catalítico.

Fuente: (Lonhienne et al., 2020)

### 3.2.3.2 Elementos estructurales que participan en la regulación enzimática

Como se mencionó antes, AHAS es regulada por los BCAAs en especial valina y la ayuda de RSU (subunidad reguladora) un factor importante para la regulación de la enzima, estructuralmente la conformación de los factores que llevan a la regulación de acetohidroxiácido sintasa (AHAS)(**Takpho et al., 2018**), determinadas a partir de estructuras cristalinas de alta resolución. Donde la unión del dominio ACT a los aminoácidos, según la cinética de inhibición de la actividad enzimática se establece que la afinidad del dominio ACT por los aminoácidos disminuye según el orden; Val, Ile y Leu (**Bansal et al., 2019**).

Estudiando y analizando el complejo de AtAHAS junto a Valina se ha determinado que presenta dos densidades en los dominios de ACT en forma adyacente donde valina se puede ajustar y provocar distanciamiento entre R110 y D204, de tal manera que el puente que une los dímeros en el complejo AHAS se interrumpa. Por otra parte, el dominio  $\beta$  y el dominio ACT se distancian y se produce la expansión del dinero CSU que lo desestabiliza por la disminución del área de interfaz entre CSU y RSU, además se expanden los sitios activos que se involucran para la unión del sustrato (figura 16), la desestabilización de CSU (CSU se disocia del complejo) y la disminución de la tasa catalítica. En cuanto se refiere a ScAHAS la ubicación de la valina es similar a la del complejo AtAHAS. Los estudios cinéticos de ScAHAS demuestran que el complejo se activa en presencia de ATP y es inhibido por valina (**Lonhienne et al., 2020**).



**Figura 16: Efectos de la unión de l-valina sobre el complejo AtAHAS**

a. Representa la superposición de ACT del complejo AtAHAS con y sin l-valina. b. Los residuos d presentes en la estructura grafica implicados en la unión del sustrato (verde y azul). Muestra que el sitio activo es expandido después de la unión con valina.

Fuente: (**Lonhienne et al., 2020**)

### 3.2.3.3 Sitio de unión de BCAAs

Para AHAS, la interfaz de los dominios ACT en la subunidad RSU facilitan el sitio de unión de BCAA (Valina, leucina, isoleucina). En *E coli* la regulación de AHAS por los productos finales de BCAAs, se produce mediante una bolsa de unión a valina e isoleucina a la subunidad reguladora, sin embargo, ya que se ha determinado que muestra baja afinidad por la isoleucina. Los sitios de unión a valina se ubican interinamente en dos posiciones simétricas relacionadas a la interfaz entre el dominio N-terminal (**Kaplun et al, 2006; Bansal et al., 2019**). La estructura de los bolsillos se torna idénticos tanto para valina como isoleucina, validando la posición del ligando los cuales se mantienen firmes por medio de interacciones hidrófobas y enlaces de hidrógeno, aquí el grupo carboxilo está involucrado en cinco interacciones de enlace de hidrogeno y tres con los nitrógenos de la cadena principal de valina. Por lo tanto, la selección conformacional puede determinar la selección de los aminoácido, ya que, el bolsillo de unión para el ligando es espaciosos por lo que podría acomodarse especialmente valina e isoleucina (**Bansal et al., 2019**).

### 3.2.3.4 Sitio de unión de ATP

La BCAAs es una reacción anabólica que necesita energía, de tal manera que es necesario saber la interacción de la AHAS con la molécula que proporciona energía para efectuar su ciclo metabólico. ScAHAS estructuralmente está formada por CSU y RSU como se mencionó anteriormente, estas subunidades se colocan en forma de cruz, los cuatro dímeros de CSU se unen a los extremos, mientras que las ocho RSU se reúnen en una conformación octamétrica forma un núcleo central en donde se unen los pares de ATP (cuatro pares de ATP). Además, se forma una red de interacción con los ATP unidos a un ión  $Mg^{2+}$  y la asociación de adenina y ribosil con las RSU, en lo que intervienen cinco residuos, de los cuales tres varían (R159, F232 y R280) y uno no es muy conservado (R254). En comparación con AtAHAS existe diferencia se muestra visualmente que hay un espacio para la interacción con ATP aunque no se observa las moléculas (**Lonhienne et al., 2020**).

### 3.2.4 Estructuras en complejo con herbicidas comerciales.

La estructura de AtAHAS en complejo con sulfonilureas disustituidas clásica donde el intermediario hidroxiletilo se rompe. A diferencia de sulfunilureas monosustituidas (el anillo heterocíclico unido al nitrógeno del puente de sulfunilurea), monosulfuron y éster de

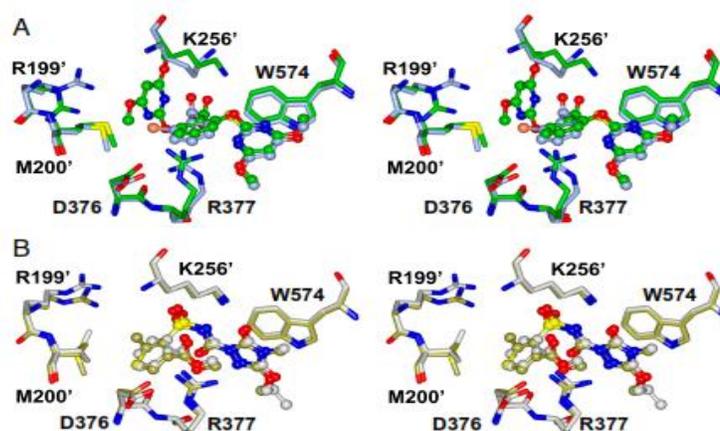
monosulfuron, estas moléculas se unen al túnel que transporta al sitio activo, es así como el único sustituyente está atrapado profundamente dirigido hacia el ThDP (**J. G. Wang et al., 2009**). Según Lonhienne et al, (2018), datos cristalográficos de ScAHAS (*Saccharomyces cerevisiae*) y AtAHAS (*Arabidopsis thaliana*) en complejo con Penoxsulam (PS) (familia de las triazolopirimidinas sulfonamidas), primero se muestra la liberación de dos moléculas de oxígeno unidas al sitio activo, expulsandolas para sustrato de la reacción secundaria de la enzima. También muestra que PS atrapa dentro del sitio activo una molécula de par acetato en presencia de ThDP degradado, es decir cuando se une PS, este cofactor se modifica eliminando el C2 (ThAthDP) o también se produce su forma oxidada (ThAthDP) que son incapaces de mantener la catálisis de AHAS. En el complejo ScHAS/PS PS compite con la molécula de piruvato en el canal para el sustrato dependiendo de los centros catalíticos presentes. Además, se muestra que no interfiere directamente con el sustrato la región de recubrimiento, pero es responsable de bloquear PS a la superficie.

Por otro lado, la unión de AtAHAS en complejo con dos PYB, pyrithiobac (PB) y bispyribac (BS), y dos SCT, propoxicarbazona (PC) y tienicarbazona metil (TCM). La estructura muestra que hay un monómero en la unidad asimétrica el tetrámero *At* AHAS, que alteran el anillo de tiazol de ThDP de diferentes formas, esta tiene un pliegue general similar al informado para AtAHAS no inhibido. En los cuatro complejos la densidad del anillo de pirimidina, la fracción difosfato ThDP y el ion que mantiene ThDP está definido. Mientras que, la densidad del anillo de tiazolio cambia cuando se compara las estructuras separadas. No hay densidad en C2 para PB y BS indicando que el anillo se ha dividido para formar ThAthDP. La estructura con los SCT el anillo de tiazolio tienen una densidad intacta pero la densidad se extiende más allá del C2, además se forma un puente entre el nitrógeno N2 expuesto, el R377 y el C7 del anillo de flavina (**Garcia, Nouwens, et al., 2017**).

#### **3.2.4.1 Modos de unión de los herbicidas comerciales**

Al evaluar los diferentes modos de unión de AHAS con dos PYB, pyrithiobac (PB) y bispyribac (BS), y dos SCT, propoxicarbazona (PC) y tienicarbazona metil (TCM), se encontró que la clave es las diferentes modificaciones e interacciones producidas en ThDP. En esta interacción los residuos R199, M200, K256, R377 y W574 son comunes para la conformación de *At* AHAS en unión a PYB y SCT, posteriormente se observó que estos

cuatro herbicidas se ajustan mediante mecanismos diferentes. Estos complejos tienen un andamio similar, aunque se diferencia en que BS tiene un grupo dimetoxipirimidina adicional en vez de cloro, PB y Bs se relacionan con 11 y 18 residuos de AtAHAS (Figura 18). PC y TCM interactúan con 10 y 15 residuos de AtAHAS (Figura 18), las PYB poseen tres anillos que adopta una conformación en forma de S cuando se une a AHAS de *A. thaliana* con el grupo pirimidinilo insertado profundamente en el sitio de unión con los herbicidas. En cambio, los SCT el anillo de triazolinona se inserta más profundo en el sitio de activación (Garcia, Nouwens, et al., 2017).



**Figura 17: Vista de los sitios de unión de PYB y SCT en AtAHAS**

(A) Se visualiza BS y PB (B) se visualiza PC y TCM. Los herbicidas están en forma de bola y basto, los residuos de AtAHAS para la unión de herbicidas solo están en forma de bastón.

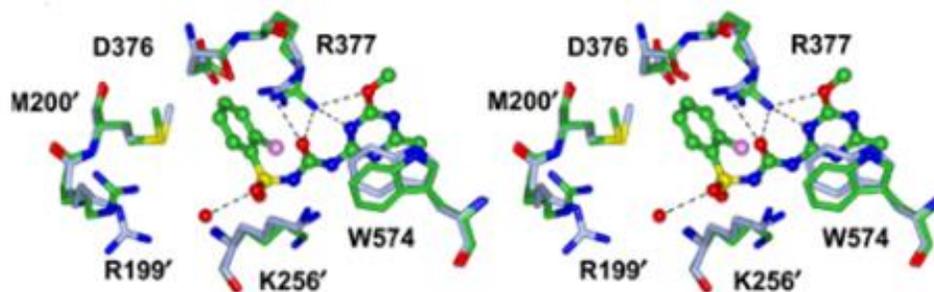
Fuente: (Garcia, Nouwens, et al., 2017)

Por otra parte, el modo de unión de AtAHAS y ScAHAS con Penoxsulam (PS), se forma el grupo peracetato de ThDP-peracetato, en el cual, el grupo metilo del peracetato interactúa con el grupo pirimidinilo de PS, M582 y el C7 de FAD. De igual manera forma el oxígeno del hidroxilo del peracetato forma puente de hidrogeno con la mina del esqueleto G116 y una interacción donante- $\pi$  con el grupo pirimidinilo de PS. Además, las moléculas de oxígeno (O2 (I) y O2 (II)) son desplazada por PS, el bolsillo de unión de O2 (I) muestra la presencia de ThDP-peracetato que excluye O2 (I) del sitio de unión y la reemplaza por una molécula de agua. En síntesis, PS modifica el ThDP pero esta puede variar dependiendo de la química de cada familia de inhibidores (Lonhienne et al., 2018).

En cambio, los herbicidas en CaAHAS, se ubican en el bolsillo (formado por 12 residuos y FAD) de unión, situado en sitio activo, por lo tanto, impiden que el piruvato interactúe con ThDP. La clave de esta interacción es el contacto que se forma por los residuos P188, F187, K247, M350, R376, M578 y W582, de los cuales, se ubican en la parte inferior del sitio de unión excepto P188. De estas la interacción más importante es la que sucede entre el anillo heterocíclico del herbicida y W582, al igual que la interacción de carbono- $\pi$  con P188, aquellas que ayudan al anclamiento del herbicida en el sitio de unión (**Garcia, et al., 2018**). En comparación con CauAHAS (*Candida auris*) en interacción con CE, muestra que se interaccionan con los residuos Lys247 y Met350 y los residuos Ser111, Ser116 y Gly572 no se relaciona con CE (**Agnew-francis et al., 2020**).

#### **3.2.4.2 Cambios estructurales inducidos por herbicidas comerciales**

La unión de AtAHAS con los herbicidas producen cambios drásticos en su estructura. Por ejemplo, al unirse con sulfonilurea induce cambios en los ángulos diedros de R199, M200, R377 y W574 en la cadena lateral (Figura 19), lo que facilita el espacio para que CS (2-clorofenilo) se integre en la ubicación y se una el anillo heterocíclico, con el fin de ayudar al aumento del contacto del herbicida con la enzima (**McCourt et al., 2006;Garcia, Lonhienne, et al., 2017**). Además, se efectúa la rotación de W574, la cual es importante porque une el herbicida por el ampliamente  $\pi$  entre el anillo heterocíclico y el aromático de W574. Po el contrario, el cambio inducido a R199 depende del tipo de la sulfonilurea que se una a *At* AHAS, ya que depende de los contactos polares con las sulfonilureas y la interacción entre residuos. Al unirse a R377 la cadena lateral gira hacia el oxígeno del puente de la urea y el anillo, para formar hasta cinco interacciones polares heterocíclico. De hecho, las sulfonilureas y las imidazolinonas, aparte de inducir el cambio en la cadena lateral también influye en la posición de otros residuos que dan forma al sitio de unión. En cuanto a imidazolinona (IQ), los cambios conformacionales más significativos se producen a M200, D376 y R377, diferente a la interacción de las sulfonilureas(**García, Lonhienne, et al., 2017**).



**Figura 18: Vista de los cambios conformacionales en el sitio de unión del herbicida At AHAS**

Representa los cambios que adoptan los residuos para la unión de herbicidas, posiciones diferentes dependiendo de la unión de CS con la enzima. Los residuos son representados como barras mientras que CS en forma de bola y barra.

Fuente: (Garcia, Lonhienne, et al., 2017)

Por el contrario, en CaAHAS (*Candida albicans*) al unirse con herbicidas en la cadena lateral la conformación de R376 y W582 cambian para el contacto con los herbicidas. El ajuste de W582 es importante, ya que permite que no se bloquee el paso a la bolsa de unión. En comparación con At AHAS el sitio de unión de CaAHAS es inducido a cambios menores, se torna más rígido y se torna listo para la unión a los inhibidores (Agnew-Francis, et al., 2018).

### 3.3 Inhibición de la actividad enzimática

En la década de los 1970s y 1980s se empezó a descubrir diferentes tipos compuestos sintéticos que inhibían las AHAS y causaban la muerte de plantas, provocando la atención a investigaciones con la enzima (LaRossa & Schloss, 1984; Shaner et al., 1984; Gedi & Yoon, 2012), lo que llevo a realizar estudios más detallados sobre la acetohidroxiácido sintasa y se ha convertido en un potente target de investigación para más de 50 herbicidas comerciales a nivel mundial con un gran éxito durante 30 años (Garcia, Nouwens, et al., 2017), por su selectividad en plantas. Por otra parte, según los primeros detalles estructurales de AHAS en bacterias como en *E. coli* y de *M. tuberculosis* se estudia los potentes inhibidores de su actividad bactericida (Gokhale & Tilak, 2015). Los potentes herbicidas inhibidores también se han popularizado en el campo investigativo para el desarrollo de medicamentos fúngicos, gracias a su baja toxicidad en células humanas (Garcia, Chua, Low, Lee, Agnew-francis, et al., 2018) y por la similitud entre los focos de unión de las AHAS de diferentes

especies, se cree que los inhibidores para AHAS vegetales también sirven como antimicrobianos(**Gokhale & Tilak, 2015**).

A nivel mundial las familias de herbicidas más utilizados son: sulfonilureas (SU), imidazolinona (IMI), triazolopirimidina-sulfonamida (TP), pirimidinil -tiobenzoatos (PTB) y sulfonilaminocarboniltriazolinonas (SCT) (Tabla 7) (**Yu & Powles, 2014; Zhang et al., 2017; Heap, I, 2020**). En cuanto a las sulfonilureas es una de las clases de herbicidas de suma importancia para su aplicación, por su extremadamente baja toxicidad en mamíferos y se han convertido en los más utilizados en el mundo, además puede ser superior a los herbicidas comerciales por su rápida degradación en el suelo (**Saidi & Mirzaei, 2016; Yue Guo et al., 2020**). En su estructura están formadas por un grupo fenilo y un anillo de pirimidina o triazina, es decir la mayoría de los compuestos activos poseen un anillo aromático unido al grupo herbicida y un anillo heterocíclico (pirimidina o triazina). La hidrofobicidad de estos compuestos es esencial para la interacción hidrófoba y los enlaces de Van der Waals, implica residuos de Gly45, Ala47, Leu49, Phe130 y Lys180 en AHAS, además se forman puentes de hidrogeno de la molécula en el complejo AHAS con el oxígeno de la sulfonirea Gln131(**Gokhale & Tilak, 2015; Saidi & Mirzaei, 2016**). Por otra parte, el anillo aromático del compuesto y el puente de sulfonilurea se pueden separar por rotación y el grupo ester se coloca en paralelo con el puente (**Mccourt et al., 2005**), es así como la mayoría de herbicidas de sulfonilurea son caracterizados por el puente de urea sulfonilada que conecta el ciclo que contienen el hidrogeno con el anillo.

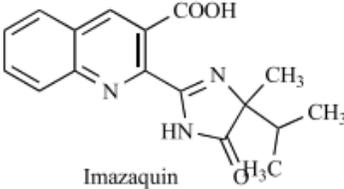
El siguiente grupo se refiere a las imidazolinona (IMI). En primer lugar, es un compuesto que también inhibe AHAS, aunque fue descubierto antes de que las AHAS sean identificadas como su lugar de acción, estos se forman con sales aminadas. los herbicidas comerciales son mezcla de isómeros quirales donde se colocan los sustitutos del metilo y el isopropilo. Además, tienen un núcleo de 4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-ilo en la posición 2 a un sistema de anillos aromáticos (**Gokhale & Tilak, 2015; Duggleby & Pang, 2000; Gutteridge et al., 2019**).

Otra de las familias de herbicidas importantes es el triazolopirimidina-sulfonamida (TP), una clase de inhibidor para AHAS de plantas, en sus inicios la actividad de inhibición, todos

los triazolopirimidina han registrado potente actividad en cebada. Un compuesto más activo de las triazolopirimidinas sulfanílidas se da por los sustitutos que retienen electrones NO<sub>2</sub>, CF<sub>3</sub>, F o Cl, en las posiciones R1 y R2. Por lo tanto, se observa un nivel más alto de inhibición de AHAS como por ejemplo: metil o metoxi que puede dar 50 inhibidores de las AHAS(Namgoong et al., 1999).

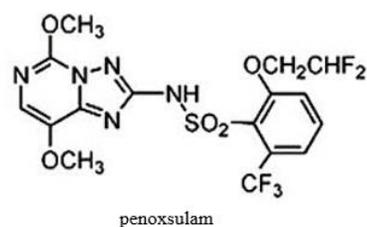
Los pirimidinil -tiobenzoatos (PTB) es otro grupo de los potentes herbicidas descubierto a finales de los noventa, son activos para grandes grupos de plantas, en especial para aquellas que son resistentes a los demás grupos de inhibidores, convirtiéndose en una ventaja para potentes investigaciones por su resistencia a las mutaciones como: aquellas que tienen prolina de sustitución de histidina, leucina o serina en la posición 197 tienen resistencia a las sulfonilureas y triazolopirimidinas (Laplante et al., 2009; Heap, I, 2020). En cambio, sulfonilaminocarboniltriaolinonas (SCT) se descubrieron a finales de los 80s, estos comprenden flucarbazona (FC), propoxicarbazona-sodio (PC) y tiencarbazona-metil (TCM). Aun falta de conocimientos de este grupo de inhibidores con respecto a las AHAS, sin embargo, se supone que se une a la enzima de manera homologa como lo hace las sulfonilureas (Duggleby & Pang, 2000).

**Tabla 7:** Ejemplo de la estructura química de los herbicidas inhibidores de AHAS

Familia	Estructura
<b>sulfonilureas (SU)</b>	 <p>CE (Chlorimuron ethyl)</p>
<b>imidazolinona (IMI)</b>	 <p>Imazaquin</p>

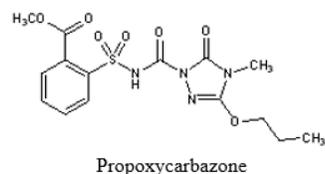
---

### triazolopirimidina-sulfonamida (TP)



---

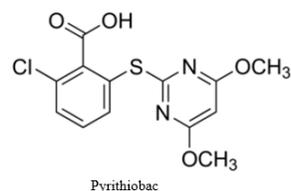
### pirimidinil -tiobenzoatos (PTB)



---

### sulfonilaminocarboniltriazolinonas

(SCT)



---

\*Se muestra la estructura de algunos de los herbicidas pertenecientes a cada familia

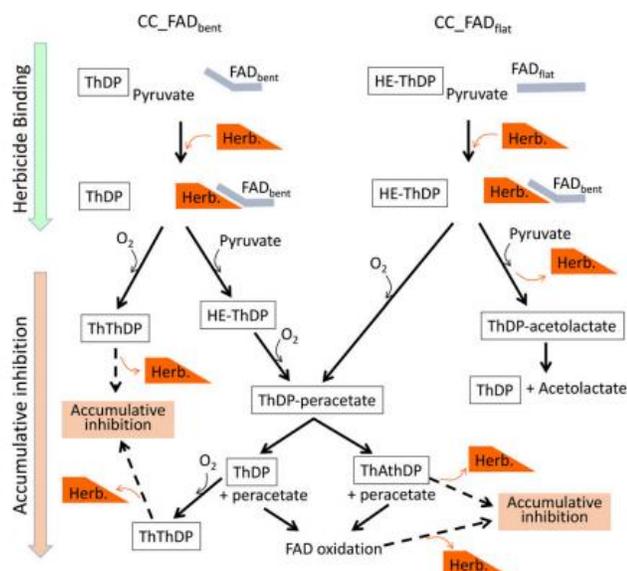
Fuente: (Gokhale & Tilak, 2015; Garcia, Nouwens, et al., 2017; Agnew-francis et al., 2020)

#### 3.3.1 Modo de inhibición: Inhibición regular vs. inhibición acumulativa

En su gran mayoría, este tipo de inhibidores ejercen su acción mediante el bloqueo del canal de acceso al sitio activo, impidiendo de esta forma que el sustrato interactúe con la enzima (Garcia, Nouwen, et al., 2017). En este proceso, la enzima AHAS sufre la inhibición regular que inducen los herbicidas comerciales sumada a la inactivación de la enzima por oxidación del FAD, la cual es inducida por el atrapamiento de moléculas de peracetato en el sitio activo (Garcia, et al., 2018). Asimismo, los herbicidas pueden ser capaces de desviar el ThDP hacia otra reacción que induce la modificación o degradación del cofactor en ThAthDP y ThThDP dejando inactiva la AHAS (Stetter, 1994; Lonhienne et al., 2018).

Por otra parte, se ha demostrado que la inhibición de AHAS por herbicidas sigue un modelo de inhibición acumulativa reversible, gracias a los nuevos datos cinéticos que muestra la

unión de estos compuestos, de la cual se pueden determinar constantes de inactivación de la enzima. Según Lonhienne y sus colaboradores (2016) en este mecanismo el inhibidor se une a la enzima para promover su inactivación. Es decir, al referirse de acumulación enzimática se trata del tiempo que requiere en este proceso lento, mientras que la reversibilidad de la inhibición acumulativa es la capacidad para recuperar la activación de la enzima, este es un proceso dependiente de tiempo, ya que la acumulación aumenta con respecto al tiempo (García, Nouwens, et al., 2017; Lonhienne et al., 2018). Todos los parámetros que definen el mecanismo son variables, con la diferencia de la estructura específica de los inhibidores y la enzima. Por consiguiente, cuando las especies reactivas de oxígeno queden atrapadas en el sitio activo de AHAS, la inhibición acumulativa puede desencadenar reacciones de oxidación, lo que altera el estado de FADredox (Liu et al., 2016a; Lonhienne et al., 2016).



**Figura 19: Esquematzación de los pasos de la inhibición acumulativa por herbicidas dependiente del tiempo**

Fuente: (Lonhienne et al., 2018)

### 3.3.2 El rol de la actividad POX en la inhibición por herbicidas comerciales

Mediante nuevos datos cinéticos también muestran que el oxígeno molecular promueve la inhibición acumulada, es decir la potencia de los herbicidas es aumentada por la reacción oxigenasa, de tal manera que los inhibidores pueden utilizar los productos de la oxigenasa de AHAS para realizar reacciones oxidativas que afectan a FAD. Las especies reactivas del

oxígeno son atrapadas por el sitio activo y desencadenan una reacción de oxidación que conduce al estado redox de FAD (flavin adenine dinucleotido), por lo tanto, este cofactor también puede ser inactivado reversiblemente por un mecanismo dependiente de  $O_2$ , a través de la actividad secundaria POX de la AHAS. Aquí, el FAD pasa de su estado reducido a oxidado gracias al ataque de una molécula de peracetato, la cual es una especie reactiva de oxígeno generada por la actividad oxigenasa de AHAS (Lonhienne et al., 2016).

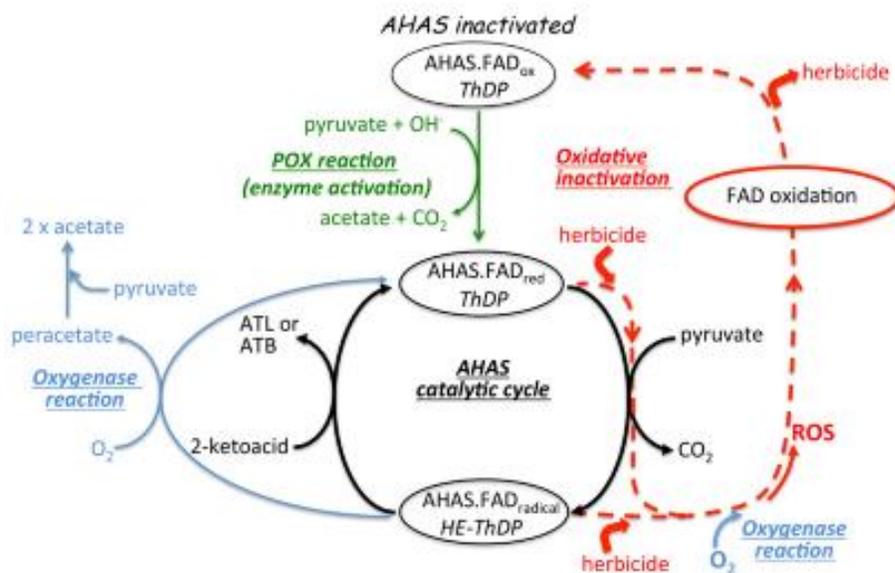


Figura 20: Procesos y químicos involucrados en la inhibición de AHAS.

Fuente: (Lonhienne et al., 2018)

### 3.3.3 Metodología para la determinación de constantes de inhibición

En la metodología que se utiliza para la determinación de la constante de inhibición ( $K_i$ ) para cada herbicida inhibidor de AHAS, hay que tener en cuenta la inhibición acumulativa (Lonhienne et al., 2016) producida en el ensayo, otro de los factores importantes a considerar es la fase lag (Hwang et al., 2003). En el método clásico empleado en la determinación de  $K_i$  se añade los inhibidores antes de que la enzima alcance su actividad máxima y periodo largo en presencia de oxígeno, para tener el máximo efecto de la inhibición acumulativa. Siguiendo técnicas, para la determinación precisa de los valores de  $K_i$ , como el diseño metodológico de un estudio para calcular la constante de inhibición de seis herbicidas, se añadieron 12 minutos después de que la enzima este en su actividad máxima, en la inhibición acumulativa inducida por los herbicidas se observó durante 40 min. El ensayo se realizó en

condiciones anaeróbicas y la medición de  $K_i$  se realizó en intervalos de 10 a 12 concentraciones de inhibidor, posteriormente utilizaron regresión no lineal, teniendo en cuenta los 6 minutos luego de añadir el herbicida (Garcia, Nouwens, et al., 2017).

### 3.3.4 Constantes de inhibición de herbicidas modernos

A continuación, se presentan dos tablas con diferentes herbicidas comerciales y sus contrastantes de inhibición en el nivel nM y  $\mu$ M, en AHAS dependiendo de cada especie, datos que fueron recopilados de diferentes estudios.

**Tabla 8:** Constantes  $K_i$ ,  $K_{iapp}$  y  $K_3$  de los diferentes herbicidas inhibidores de AHAS en *C. albicans*, *C. neoformans*, *A. thaliana*

inhibidor	$K_i$ , nM	$K_{iapp}$ min <sup>-1</sup>	$K_3$ , min <sup>-1</sup>
<i>C. albicans</i>			
SU			
IE	6.3 ± 0.7	0.33 ± 0.05	3.3 × 10 <sup>-11</sup>
IM	12.7 ± 1.1	1.10 ± 0.15	0.020
CE	24.3 ± 2.5	1.00 ± 0.32	0.045
BSM	29.9 ± 2.7	1.82 ± 0.25	0.064
ES	69.3 ± 6.9	1.69 ± 0.20	0.082
CS	570 ± 59	NP	NP
SM	630 ± 51	0.67 ± 0.14	0.081
TP			
MT	0.8 ± 0.1	3.39 ± 0.69	0.023
DS	1.7 ± 0.8	2.31 ± 0.20	0.071
PS	2.4 ± 0.3	15.26 ± 3.42	0.074
CSM	4.6 ± 1.2	3.86 ± 0.54	0.052
FS	10.1 ± 1.7	5.97 ± 0.40	0.068
PYS	212 ± 18	2.26 ± 0.10	0.067
FT	773 ± 62	3.78 ± 0.27	0.068
SCT			
PC	484 ± 37	1.83 ± 0.28	0.080
TCM	28 ± 6 × 10 <sup>3</sup>	21.3 ± 4.4	0.109
PB			
BS	2.6 ± 0.3 × 10 <sup>3</sup>	NP	NP
PTB	403 ± 37 × 10 <sup>3</sup>	NP	NP
IMI			
IQ	716 ± 61 × 10 <sup>3</sup>	NP	NP
IT	4.3 ± 0.7 × 10 <sup>6</sup>	NP	NP
inhibidor	$K_i$ , nM	$K_{iapp}$ min <sup>-1</sup>	$K_3$ , min <sup>-1</sup>
<i>C. neoformans</i>			
SU			
IE	110.5 ± 10.8	0.17 ± 0.02	0.023
IM	472.7 ± 25.5	0.17 ± 0.03	0.056
CE	119.7 ± 4.2	0.73 ± 0.03	0.022

<b>BSM</b>	NI	—	—
<b>ES</b>	NI	—	—
<b>CS</b>	$769 \pm 89 \times 10^3$	NP	NP
<b>SM</b>	NI	—	—
<b>TP</b>			
<b>MT</b>	$65.4 \pm 4.9$	$1.14 \pm 0.06$	0.029
<b>DS</b>	$901.0 \pm 72.9$	$0.13 \pm 0.02$	0.007
<b>PS</b>	$331.1 \pm 20.0$	$2.18 \pm 0.11$	0.037
<b>CSM</b>	$35.3 \pm 3.7$	$0.94 \pm 0.06$	0.018
<b>FS</b>	$590 \pm 41.0$	$0.67 \pm 0.03$	0.025
<b>PYS</b>	$320 \pm 29 \times 10^3$	$3.99 \pm 0.60$	$5.3 \times 10^{-10}$
<b>FT</b>	$137 \pm 9 \times 10^3$	$2.00 \pm 0.59$	$1.5 \times 10^{-10}$
<b>SCT</b>			
<b>PC</b>	$9.4 \pm 1.6 \times 10^3$	$0.19 \pm 0.04$	$3.7 \times 10^{-11}$
<b>TCM</b>	$1.2 \pm 0.2 \times 10^6$	NP	NP
<b>PB</b>			
<b>BS</b>	$5.8 \pm 0.6 \times 10^6$	NP	NP
<b>PTB</b>	$765 \pm 65 \times 10^3$	NP	NP
<b>IMI</b>			
<b>IQ</b>	NI	—	—
<b>IT</b>	NI	—	—
<b>inhibidor</b>	$K_i$ , nM	$K_{iapp}$ min <sup>-1</sup>	$K_3$ , min <sup>-1</sup>

*A.thaliana*

<b>BS</b>	$40.9 \pm 6.1$	$0.32 \pm 0.03$	0.022
<b>CE</b>	$74.7 \pm 6.1$	$1.22 \pm 0.07$	0.012
<b>PB</b>	$179 \pm 11.6$	$0.81 \pm 0.02$	0.037
<b>PC</b>	$434.8 \pm 33.8$	$0.90 \pm 0.02$	0.037
<b>TCM</b>	$670.8 \pm 64.0$	$0.43 \pm 0.04$	0.015
<b>IQ</b>	$18.5 \pm 2 \times 10^3$	$0.87 \pm 0.03$	$1.3 \times 10^{-12}$

BS (bispiribac); CS (clorsulfuron); CSM (cloransulam metil); DS (diclosulam); FS (florasulam); IQ (imazaquin); IT (imazethapyr); PS (penoxsulam); PTB (piritiobac); TCM, (tiencarbazona metil); CE (clorimuron etilo); PC (propoxicarbazona); TCM (tiencarbazona metil).

Fuente: (Garcia, Nouwens, et al., 2017; Garcia, Chua, Low, Lee, Agnew-Francis, et al., 2018)

**Tabla 9:** Contante de inhibición para *C.auris*

<b>Herbicida</b>	<b><math>K_i</math> (nM)</b>	<b>Máxima inhibición (%)</b>
<i>Candida auris</i>		
<b>CE</b>	$130 \pm 40$	96
<b>PM</b>	$50 \pm 5$	100
<b>BSM</b>	$270 \pm 40$	93
<b>MM</b>	$55 \pm 6$	70
<b>AS</b>	NI	NI
<b>ES</b>	$520 \pm 60$	84
<b>SM</b>	$390 \pm 60$	74
<b>CS</b>	$1100 \pm 200$	72
<b>TBM</b>	$4800 \pm 700$	63
<b>CSM</b>	<32	69

<b>PS</b>	<32	90
<b>DS</b>	<32	75
<b>PYS</b>	<32	80
<b>MT</b>	<32	85

CE (Clorimurón etilo); Sulfuro benzoico de metilo (BSM); metsulfuron metil (MM), amidosulfuron (AS), etoxisulfuron (ES), sulfometuron metil (SM), clorsulfuron (CS), cloransulam metil (CSM), penoxsulam (PS), diclosulam (DS), pyrozosulam (PYS) y metosulam (MT).

Fuente: (Agnew-francis et al., 2020)

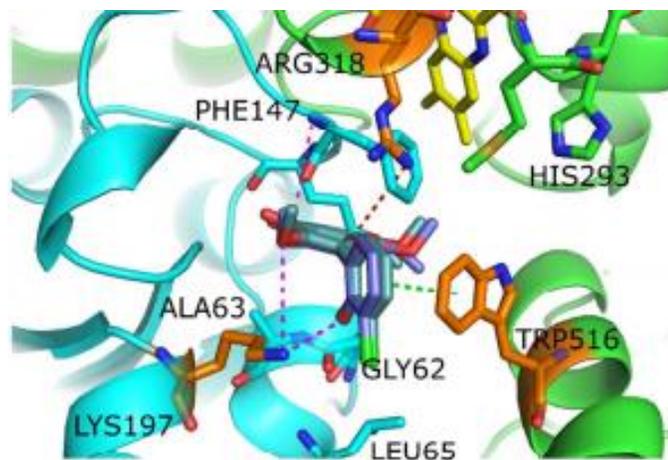
### 3.3.5 Inhibidores de AHAS como potentes compuestos antimicrobianos

Como se mencionó antes, la acetohidroxiácido sintasa está presente tanto en microorganismo como en plantas, sin embargo, la mayoría de los estudios se ha centrado en inhibición de AHAS en plantas con el fin de sacar herbicidas comerciales para combatir maleza en cultivos. Aunque, se ha demostrado que estos compuestos sintéticos tienen similitud en la unión a AHAS de diferentes organismo (Gokhale & Tilak, 2015), es por esto se han popularizado para el desarrollo de antimicrobianos, para fines investigativos o terapéuticos, gracias a su baja toxicidad en mamíferos (Garcia, et al., 2018).

Se ha demostrado que la familia de los herbicidas sulfonilurea también pueden desencadenar un papel antifúngico. Estudios revelaron que, algunos compuestos pertenecientes a la familia de las sulfonilureas poseen actividad antifúngica contra algunos hongos de plantas (Wei et al., 2016). Por el contrario, se ha determinado que la actividad de la AHAS en la BCAAs en *Candida albicans* es muy importante para su desarrollo (Kingsbury & McCusker, 2010). Lee et al (2013) demostró que varias sulfonilureas como: el clorimurón El etilo (CE) y el etoxisulfurón (ES) son potentes inhibidores de la enzima AHAS y poseen actividad antifúngica especialmente en *Candida albicans*. Por otra parte, una investigación más recientes, determinaron que el clorimurón etílico (CE), miembro de los herbicidas de sulfonilurea, tiene actividad antifúngica contra especies de *Cryptococcus neoformans* y *Candida*, para este último, CE fue eficaz eliminando la carga de hongo en hígado, bazo y pulmones en ratones infectos (Garcia, et al., 2018). Otro del compuesto perteneciente al grupo de los herbicidas de sulfonilureas el etoxisulfurón (ES), el cual fue uno de los 5 que demostró más potencial nicótico e inhibidor para la AHAS de *C. Albicans* evaluado en ratones (Wu et al., 2019). Por otra parte, también se ha determinado que los

herbicidas SU y TP son buenos inhibidores del crecimiento de *Candida auris* (Agnew-francis et al., 2020).

Otra perspectiva, aborda la disponibilidad de nuevos fármacos para combatir la tuberculosis (TB). A pesar de la búsqueda de nuevas vacunas y nuevos tratamientos para esta enfermedad TB a causa de la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, sigue siendo un problema de preocupación debido a la resistencia que adquiere a los medicamentos que está empeorando constantemente desde los últimos 20 años. Por esta razón que, se ha buscado un nuevo camino para erradicar esta enfermedad, encontrando como objeto de investigación a la AHAS, encontrando que la sulfonilureas Mono sustituidas son un potente inhibidor antituberculoso, entre los cuales se encuentran los compuestos con metilo en el anillo de pirimidina con más potencia inhibidora (D. Wang et al., 2012). Jung et al (2016) identificaron 15 compuestos como inhibidores potenciales para MTB-AHAS (*M. tuberculosis*) con una inhibición de > 80-90% de la actividad, de los cuales cinco de ellos pertenecientes a triazolopirimidina mostro mayor inhibición. Por último, una investigación en el 2018 descubre un nuevo inhibidor para MTB-AHAS en *M. tuberculosis* el denominado clorflavonina que inhibe específicamente la subunidad catalítica de acetohidroxiácido sintasa (Figura 22), es decir puede restringir el crecimiento de *M. tuberculosis* y probablemente pueda inhibir todas las isoformas de AHAS por compartir el mismo mecanismo catalítico (Rehberg et al., 2018).



**Figura 21: Interacción de la clorflavonina con el IlvB1 de AHAS**

Representa un modelo computacional del modo de unión de la clorflavonina utilizando AHAS de *Saccharomyces cerevisiae* y *Arabidopsis thaliana*

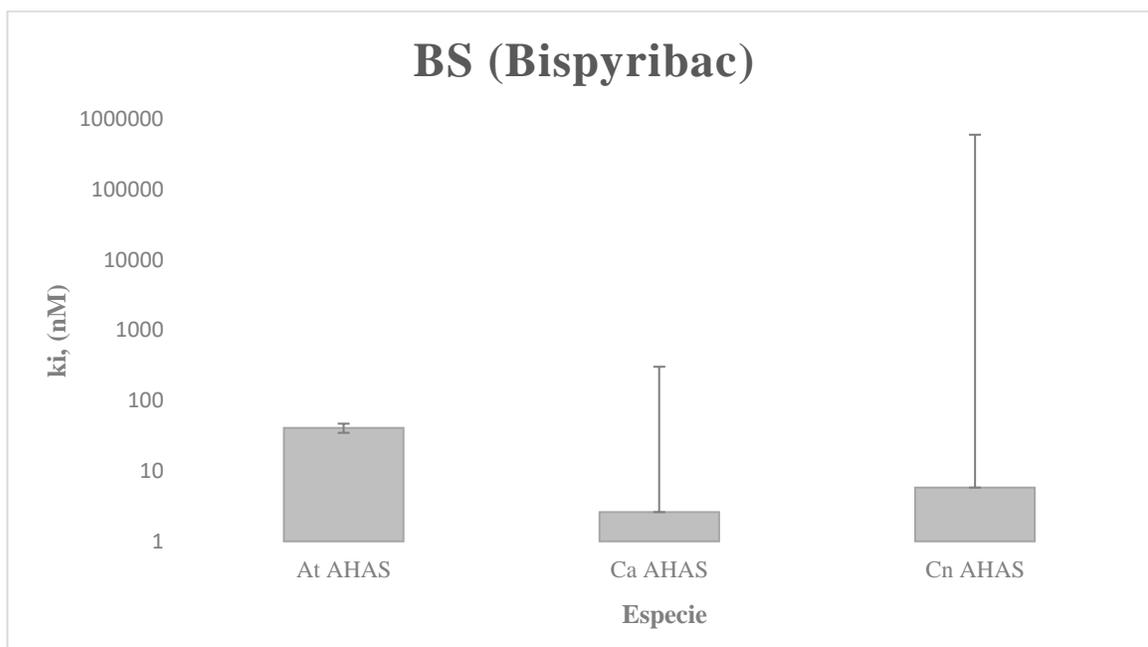
Fuente: (Rehberg et al., 2018)

## COMPARACIÓN DE RESULTADOS

Según los artículos analizados, se tomó las constantes de inhibición acorde con el tipo de herbicida y la AHAS de las especies *C. albicans*, *C. neoformans*, *Candida auris*, *A Thaliana* y *S.cerevisiae* presentados en las tablas 8 y 9 para analizar el potencial de inhibición enzimática de AHAS mediante de los herbicidas que se repiten en cada estudio.

**Tabla 10:** Constantes de inhibición  $K_i$  en AHAS por Bispyribac (BS)

Especie	$K_i$ , nM
<i>A Thaliana</i> (At AHAS)	$40,9 \pm 6,1$
<i>C. albicans</i> (Ca AHAS)	$2,6 \pm 0,3 \times 10^3$
<i>C. neoformans</i> (Cn AHAS)	$5,8 \pm 0,6 \times 10^6$

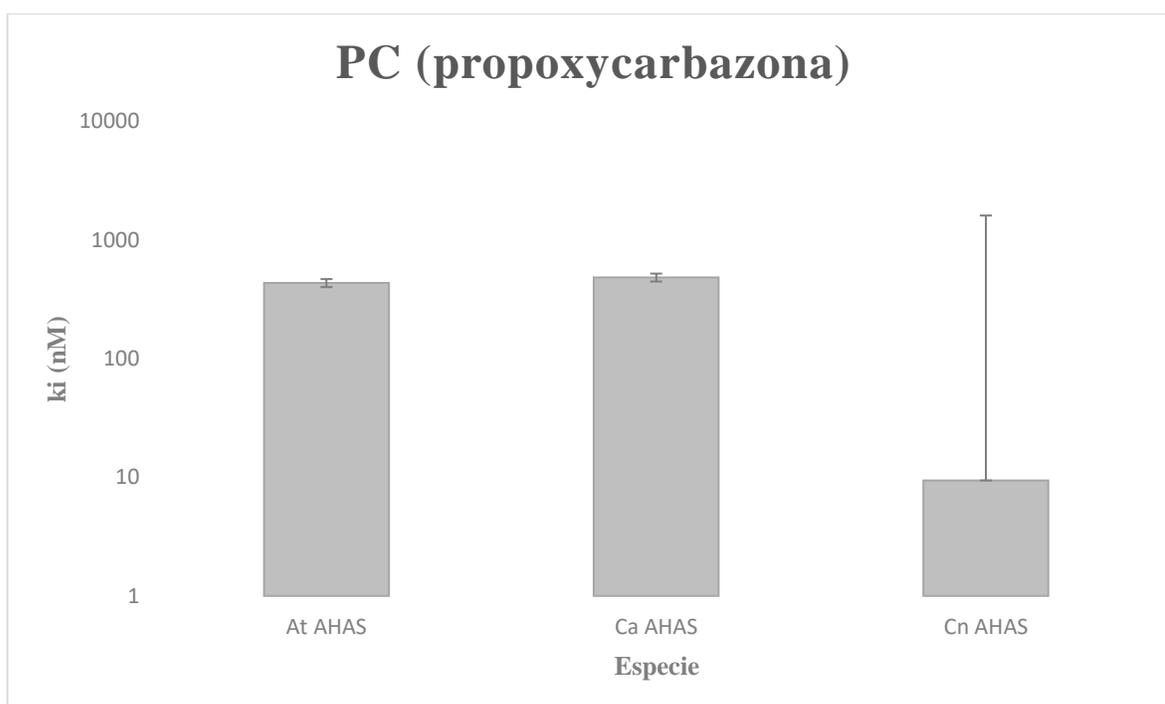


**Gráfico 1:** Comparación de las constantes de inhibición en AHAS por BS

El gráfico se encuentra en una escala logarítmica con base 10. Presenta en que especie tiene un potencial más inhibitorio BS según las constantes de inhibición estudiadas. Se puede observar que en *At* AHAS es un inhibidor más potente con una  $k_i$  de  $40,9 \pm 6,1$  menor que en *Ca* AHAS y *Cn* AHAS.

**Tabla 11: Constantes de inhibición  $K_i$  en AHAS por propoxycarbazona (PC)**

<b>Organismo</b>	<b><math>K_i</math>, nM</b>
<i>A Thaliana</i> (At AHAS)	$434,8 \pm 33,8$
<i>C. albicans</i> (Ca AHAS)	$484 \pm 37$
<i>C. neoformans</i> (Cn AHAS)	$9,4 \pm 1,6 \times 10^3$

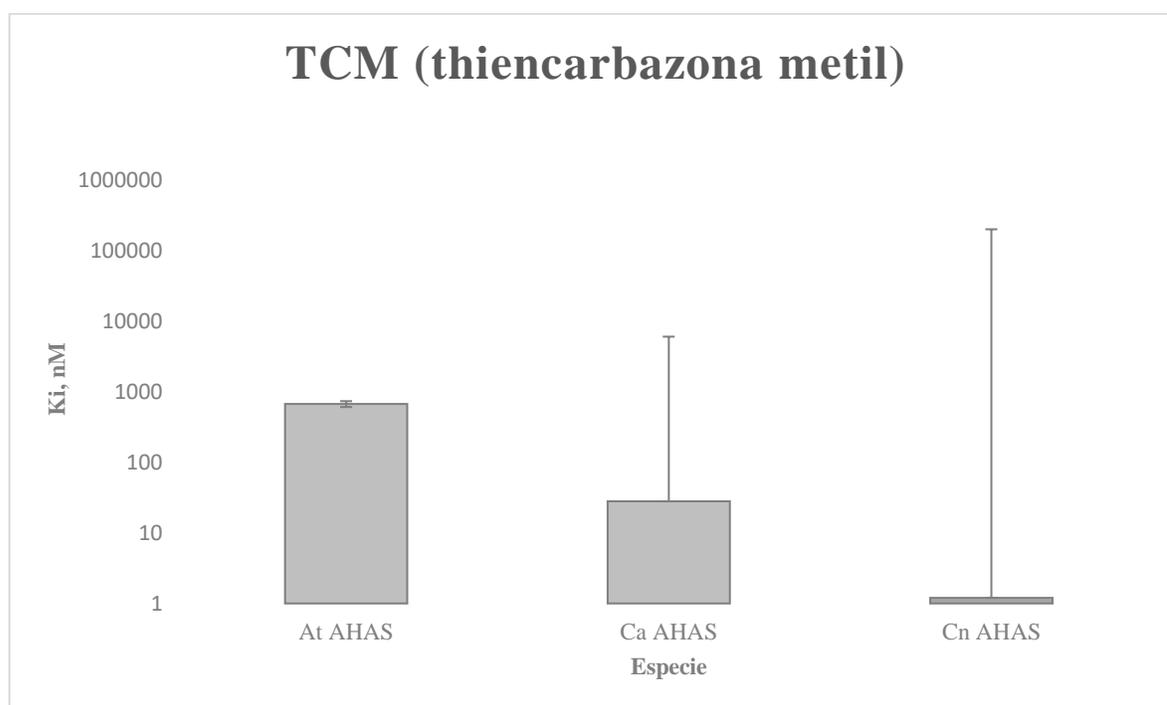


**Gráfico 2: Comparación de las constantes de inhibición en AHAS por PC**

El gráfico se realizó con una escala logarítmica en base 10. Presenta en que especie PC presenta una capacidad inhibidora más alta según las  $K_i$  estudiadas para las especies *A Thaliana* (At AHAS), *C. albicans* (Ca AHAS) y *C. neoformans* (Cn AHAS). Se puede observar que en At AHAS y Ca AHAS es un potente herbicida inhibidor.

**Tabla 12:** Constantes de inhibición  $K_i$  en AHAS por tiencarbazona metil (TCM)

Organismo	$K_i$ , nM
<i>A Thaliana</i> (At AHAS)	$670.8 \pm 64.0$
<i>C. albicans</i> (Ca AHAS)	$28 \pm 6 \times 10^3$
<i>C. neoformans</i> (Cn AHAS)	$1,2 \pm 0,2 \times 10^6$

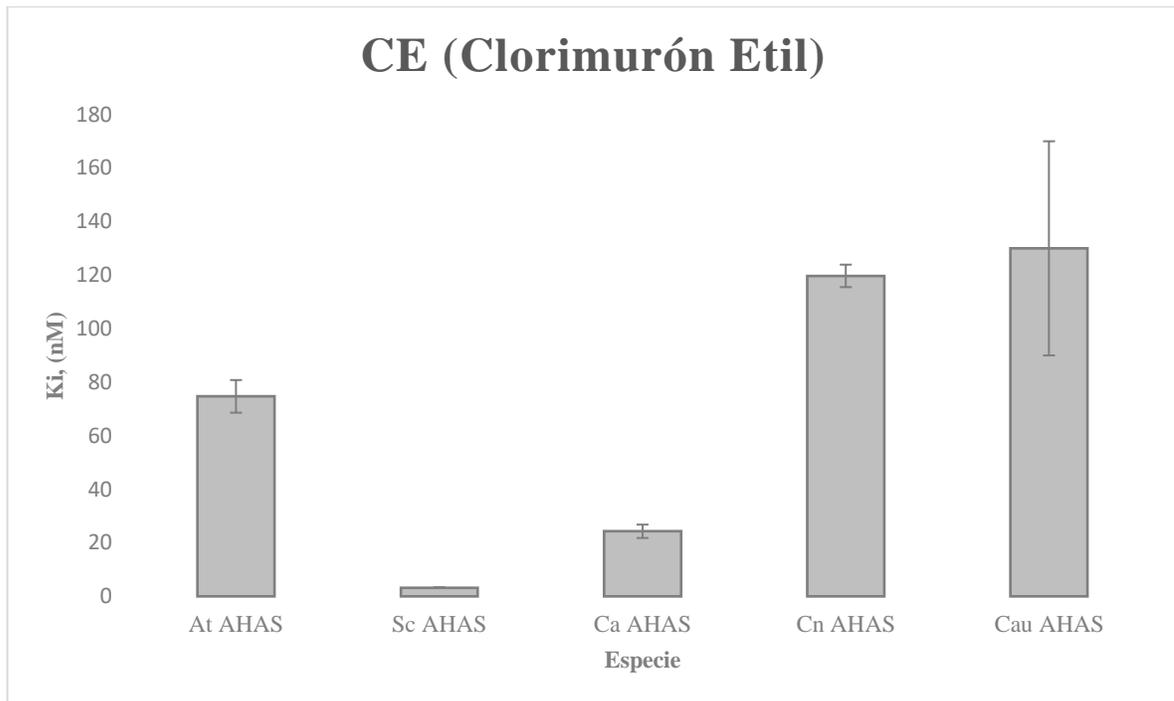


**Gráfico 3:** Comparación de las constantes de inhibición en AHAS por TCM

El gráfico se realizó en una escala logarítmica con base 10. Presenta en que especie TCM es un inhibidor potencial según las  $k_i$  para las especies estudiadas. *A Thaliana* (At AHAS), *C. albicans* (Ca AHAS) y *C. neoformans* (Cn AHAS). En el cual se puede visualizar que TCM es un potente inhibidor para At AHAS en comparación con Ca AHAS y Cn AHAS.

**Tabla 13: Constantes de inhibición  $K_i$  en AHAS por clorimurón etil (CE)**

<b>Especie</b>	<b><math>K_i</math> (nM)</b>
<i>A Thaliana</i> (At AHAS)	74,7 ± 6,1
<i>S.cerevisiae</i> (Sc AHAS)	3,25
<i>C. albicans</i> (Ca AHAS)	24,3 ± 2,5
<i>C. neoformans</i> (Cn AHAS)	119, 7 ± 4,2
<i>Candida auris</i> (CauAHAS)	130 ± 40



**Gráfico 4: Comparación de las constantes de inhibición en AHAS por CE**

Presenta en que especie tiene un potencial más inhibitorio TCM según las especies estudiadas. *A Thaliana* (At AHAS), *S.cerevisiae* (Sc AHAS), *Candida auris* (CauAHAS), *C. albicans* (Ca AHAS) y *C. neoformans* (Cn AHAS). Se puede observar que CE presenta una máxima inhibición para todas las especies ya que su constante de inhibición es menor, aunque presenta una mayor inhibición para At AHAS y Sc AHAS.

## DISCUSIÓN

La actualidad aún enfrenta problemáticas, en las que día a día se requiere encontrar dichas soluciones. Algunas de estas necesidades radican en combatir la mala hierba que acecha a los cultivos, causando pérdidas económicas invalorable a nivel mundial, otra situación radica en las infecciones o enfermedades causadas por microorganismos patógenos, para las cuales la eficacia de la medicina tradicional está en decadencia. Lo expuesto, lleva a la necesidad de estudiar a fondo la cantidad de literatura que explora las características moleculares y funcionales de la enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS), ya que se posiciona como un potencial objetivo para erradicar estas problemáticas y se puede aplicar a nivel agrícola o biomedicinal por las propiedades que ofrece esta valiosa enzima.

Es por esto, que la importancia de este estudio radicó en analizar la cantidad de literatura expuesta en las diferentes bases de datos sobre “El mecanismo, estructura e inhibición de la acetohidroxiácido sintasa (AHAS)”. Gracias al mecanismo de su inhibición es potencial como target para el desarrollo de herbicidas y el descubriendo de potentes fármacos antimicrobianos (**Lonhienne, Garcia, & Guddat, 2017**). Según este análisis bibliográfico se puede decir que el estudio de AHAS empieza desde los años 70s, sin embargo, la mayoría de los estudios son enfocados en el desarrollo o búsqueda de herbicidas para combatir la maleza en los sembríos. Aunque en los últimos años se ha ampliado el conocimiento, como las nuevas implicaciones de la función de O<sub>2</sub> como cofactor y la estructura del túnel donde se aloja durante la catálisis de AHAS (**Lonhienne, et al., 2017**). También el importante papel que tiene FAD en la integridad y regulación de la enzima, al igual que la transportación de electrones facilitando la descarboxilación y la carboligación junto con el O<sub>2</sub> (**Lonhienne, Garcia, & Guddat, 2017**).

En cuanto a la estructura hay valiosos avances, uno de los más relevantes demuestra cómo está formado estructuralmente el complejo enzimático conformado por las dos subunidades catalítica (CSU) y regulatoria (RSU) y como es la interacción entre ellas en especial la función de RSU para la activación de CSU y la regulación de AHAS, además del sitio de unión de BCAAs para la regulación como el de ATP necesario para el ciclo catalítico (**Lonhienne et al., 2020**). De igual manera se ha evidenciado las estructuras cristalinas de la interacción de la enzima con diferentes herbicidas, lo que implica el sitio, modo de

interacción y los cambios, conformaciones o giros inducidos por los inhibidores en los residuos de AHAS de diferentes especies (**Garcia, Nouwens, et al., 2017; Garcia, Lonhienne, et al., 201; Agnew-francis et al., 2020**).

Por otra parte, se ha identificado que la enzima al interactuar con los herbicidas desarrolla un mecanismo de inhibición acumulativa dependiente del tiempo, la cual consiste en la recuperación de la activación enzimática después de que el herbicida libera a AHAS, también se habla de la inhibición que puede ser ocasionada por la segunda reacción de la enzima (POX). En cuanto al potencial de inhibición medido por  $K_i$  producido por las diversas familias de herbicidas inhibidores, se realizó una comparación con resultados de esta constante de inhibición obtenidos en diferentes investigaciones y especies (*C. albicans*, *C. neoformans*, *Candida auris*, *S.cerevisiae* y *A Thaliana*) (**Garcia, Nouwens, et al., 2017; Garcia, Chua, Low, Lee, Agnew-francis, et al., 2018; Agnew-francis et al., 2020**), en la cual se escogió los datos con herbicidas que se repetían en dichos estudios, determinando que BS, PC, TCM y CE presentan un carácter inhibitor más potente para *A Thaliana*, sin embargo, CE (clorimurón etil) por presentar un  $k_i$ (nM) más baja se posiciona como un potencial herbicida inhibitor para las especies analizadas lo que se le atribuye a su estructura química y su gran afinidad por AHAS, posicionándose como un buen componente para el desarrollo de productos biocidas. Con este análisis se determinó que no todos los herbicidas presentan la misma afinidad por AHAS lo que puede ser consecuencia de mutaciones individuales de AHAS en el sitio de unión al herbicida, para algunas especies los herbicidas al unirse a la enzima forma una unión (**Garcia, Lonhienne, et al., 2017**).

Como se mencionó anteriormente la mayoría de los estudios se ha enfocado en herbicidas empleados en malas hierbas, pero hay estudios que demuestran que estos inhibidores comerciales pueden funcionar como potentes fármacos para tratar enfermedades ocasionadas por un hongo patógeno, por ejemplo especies de *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* o *Candida auris* para los cuales CE, SU y TP fueron potentes inhibidores del crecimiento (**Garcia, Chua, Low, Lee, Agnew-francis, et al., 2018; Agnew-francis et al., 2020**). Por otra parte, AHAS se ha convertido en un importante objetivo para desarrollar fármacos contra la Tuberculosis utilizando estos herbicidas comerciales como las sulfonilureas e imidazolinonas. También llevo al descubrimiento de un nuevo inhibitor de

AHAS la clorflavonina, la cual fue estudiada para *M. tuberculosis* dando resultados prometedores.

Aunque aún falta investigaciones y desarrollos de fármacos basados en el mecanismo de inhibición de AHAS, ya que se ha determinado que puede ser un importante objetivo de estudio para el desarrollo farmacológico. Por otra parte, gracias a los recientes descubrimientos de la estructura del complejo enzimático y las interacciones entre sus subunidades podría servir como base para el descubrimiento de nuevos inhibidores y ser pioneros para nuevos estudios.

## CAPÍTULO IV

### CONCLUSIONES Y RECOMEDACIONES

#### 5.1 Conclusiones

-Mediante el análisis bibliográfico del mecanismo, estructura e inhibición de la enzima Acetohidroxiácido Sintasa, se determinó los avances relacionados con la temática y los procesos investigativos que aún faltan por estudiar, siendo uno de ellos el descubrimiento de nuevos inhibidores de AHAS, el establecimiento de una nueva generación de herbicidas o el desarrollo de fármacos para tratar enfermedades patógenas siguiendo el mecanismo de inhibición de la enzima.

-La estrategia de búsqueda basada en la metodología de PRISMA y Chocrane ayudo a definir la sintaxis y las ecuaciones de búsqueda, eliminar duplicados y desvincular información que no tiene relación con el mecanismo, estructura e inhibición la enzima AHAS.

-Mediante los criterios de inclusión y exclusión de la información se determinó la documentación e investigaciones más relevantes, entre las cuales está el estudio reciente de la estructura del complejo enzimático, el rol del FAD y el O<sub>2</sub> en el ciclo catalítico, la regulación, estructuras en unión a herbicidas comerciales, la inhibición acumulativa, la clorflavonina como nuevo inhibidor y el estudio en el desarrollo de nuevos fármacos basados en el mecanismo de inhibición de AHAS.

-Se realizó comparaciones mediante tablas y grafico de barras de las constantes de inhibición (K<sub>i</sub>) en el nivel nM, datos encontrados en diferentes investigaciones de las especies *C. albicans*, *C. neoformans*, *Candida auris*, *S.cerevisiae* y *A Thaliana* resultados obtenidos en unión con los herbicidas BS, PC, TCM y CE, determinando que CE tiene una alta inhibición de para AHAS de las diferentes especies convirtiéndose en un componente activo para el desarrollo de herbicidas o productos antimicrobianos.

## **5.2 Recomendaciones**

-Según el análisis de literatura realizado, es necesario investigar nuevos inhibidores de la enzima AHAS y estudiar el mecanismo de inhibición de AHAS en microorganismo patógenos en diferentes patógenos de interés para así desarrollar nuevas opciones terapéuticas.

- Con el descubrimiento de la estructura de la holoenzima AHAS se puede formular un nuevo tipo de inhibidores que ataque las interacciones entre las subunidades CSU y RSU o que se una al sitio de inhibición alostérica, que ocupan valina y leucina, localizado en la RSU.

## BIBLIOGRAFÍA

- Agnew-francis, K. A., Tang, Y., Lin, X., Low, Y., Wun, S. J., Kuo, A., Elias, M. A. S. I., Lonhienne, T. G., Condon, N., Natalia, B., Vergani, C., Smith, M. T., Fraser, J. A., Williams, C. M., & Guddat, L. W. (2020). *Herbicides that target acetohydroxyacid synthase are potent inhibitors of the growth of drug resistant Candida auris*. *Herbicides that target acetohydroxyacid synthase are potent inhibitors of the growth of drug resistant Candida auris*. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00229>
- Amorim Franco, T. M., & Blanchard, J. S. (2017). Bacterial Branched-Chain Amino Acid Biosynthesis: Structures, Mechanisms, and Drugability. *Biochemistry*, *56*(44), 5849–5865. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00849>
- Ananieva, E. A., & Wilkinson, A. C. (2018). Branched-chain amino acid metabolism in cancer. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, *21*(1), 64–70. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000430>
- Baker, J. D. (2016). The Purpose, Process, and Methods of Writing a Literature Review. *AORN Journal*, *103*(3), 265–269. <https://doi.org/10.1016/j.aorn.2016.01.016>
- Bansal, A., Karanth, N. M., Demeler, B., Schindelin, H., & Sarma, S. P. (2019). Crystallographic Structures of IlvN·Val/Ile Complexes: Conformational Selectivity for Feedback Inhibition of Aceto Hydroxy Acid Synthases. *Biochemistry*, *58*(15), 1992–2008. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00050>
- Barak, Z., & Chipman, D. M. (2012). *Allosteric regulation in Acetohydroxyacid Synthases (AHASs) – Different structures and kinetic behavior in isozymes in the same organisms*. *519*, 167–174. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2011.11.025>
- Bramer, W. M., de Jonge, G. B., Rethlefsen, M. L., Mast, F., & Kleijnen, J. (2018). A systematic approach to searching: An efficient and complete method to develop literature searches. *Journal of the Medical Library Association*, *106*(4), 531–541. <https://doi.org/10.5195/jmla.2018.283>
- Cai, D., Zhu, J., Li, Y., Li, L., Zhang, M., Wang, Z., Yang, H., Li, J., Yang, Z., & Chen, S. (2020). Systematic engineering of branch chain amino acid supply modules for the enhanced production of bacitracin from *Bacillus licheniformis*. *Metabolic Engineering Communications*, *11*(June), e00136. <https://doi.org/10.1016/j.mec.2020.e00136>
- Chipman, D. M., Duggleby, R. G., & Tittmann, K. (2005). Mechanisms of acetohydroxyacid synthases. *Current Opinion in Chemical Biology*, *9*(5), 475–481. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.07.002>
- Cole, J. T. (2015). *Metabolism of BCAAs. Branched Chain Amino Acids in Clinical Nutrition*. *1*, 13–24. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1923-9>
- Cornacchione, L. P., Klein, B. A., Duncan, M. J., & Hu, L. T. (2019). Interspecies inhibition of *Porphyromonas gingivalis* by yogurt-derived *Lactobacillus delbrueckii* requires active pyruvate oxidase. *Applied and Environmental Microbiology*, *85*(18).

<https://doi.org/10.1128/AEM.01271-19>

- DeFelice, M. aurilio, & Levinthal, M. (1977). *The acetohydroxyacid synthase III isoenzyme of Escherichia coli K-12*. 79(1), 82–87.
- Dezfulian, M. H., Foreman, C., Jalili, E., Pal, M., Dhaliwal, R. K., Roberto, D. K. A., Imre, K. M., Kohalmi, S. E., & Crosby, W. L. (2017). *Acetolactate synthase regulatory subunits play divergent and overlapping roles in branched-chain amino acid synthesis and Arabidopsis development*. 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1022-6>
- Duggleby, R. G., & Pang, S. S. (2000). Acetohydroxyacid Synthase. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 33(1), 1–36.
- Engel, S., Vyazmensky, M., Vinogradov, M., Berkovich, D., Bar-Ilan, A., Qimron, U., Rosiansky, Y., Barak, Z., & Chipman, D. M. (2004). Role of a conserved arginine in the mechanism of acetohydroxyacid synthase. Catalysis of condensation with a specific ketoacid substrate. *Journal of Biological Chemistry*, 279(23), 24803–24812. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401667200>
- Flores, J. (2020). SITUACIÓN ACTUAL DE LOS SISTEMAS DE CONTROL DE INVENTARIOS EN LAS EMPRESAS DEL ECUADOR ; REVISIÓN LITERARIA MEDIANTE METODOLOGÍA SISTEMÁTICA. *UDLA*, 32-48. <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/12466/1/UDLA-EC-TIPI-2020-20.pdf>
- Garcia, M. D., Chua, S. M. H., Low, Y., Lee, Y., Agnew-francis, K., & Wang, J. (2018). *Commercial AHAS-inhibiting herbicides are promising drug leads for the treatment of human fungal pathogenic infections*. 115(41). <https://doi.org/10.1073/pnas.1809422115>
- Garcia, M. D., Chua, S. M. H., Low, Y. S., Lee, Y. T., Agnew-Francis, K., Wang, J. G., Nouwens, A., Lonhienne, T., Williams, C. M., Fraser, J. A., & Guddat, L. W. (2018). Commercial AHAS-inhibiting herbicides are promising drug leads for the treatment of human fungal pathogenic infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(41), E9649–E9658. <https://doi.org/10.1073/pnas.1809422115>
- Garcia, M. D., Lonhienne, T., Guddat, L. W., & Wang, J. G. (2017). Crystal structure of plant acetohydroxyacid synthase, the target for several commercial herbicides. *The FEBS Journal*, 284(1), 2037–2051. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>
- Garcia, M. D., Nouwens, A., Lonhienne, T. G., & Guddat, L. W. (2017). Comprehensive understanding of acetohydroxyacid synthase inhibition by different herbicide families. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(7), E1091–E1100. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616142114>
- Gedi, V., & Yoon, M. Y. (2012). Bacterial acetohydroxyacid synthase and its inhibitors - A summary of their structure, biological activity and current status. *FEBS Journal*, 279(6), 946–963. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08505.x>
- Ghanizadeh, H., Buddenhagen, C. E., Harrington, K. C., & James, T. K. (2019). The Genetic Inheritance of Herbicide Resistance in Weeds. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 38(4),

- 295–312. <https://doi.org/10.1080/07352689.2019.1665769>
- Gokhale, K., & Tilak, B. (2015). (KUNAL~1.PDF. *Bentham Science Publishers-Current Drug Targets, Volume 16*.
- Guo, Yanfeng, Han, M., Xu, J., & Zhang, W. (2015). Analysis of acetohydroxyacid synthase variants from branched-chain amino acids-producing strains and their effects on the synthesis of branched-chain amino acids in *Corynebacterium glutamicum*. *PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION*, *109*, 106–112. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.02.006>
- Guo, Yue, Cheng, L., Long, W., Gao, J., Zhang, J., Chen, S., Pu, H., & Hu, M. (2020). Synergistic mutations of two rapeseed AHAS genes confer high resistance to sulfonylurea herbicides for weed control. *Theoretical and Applied Genetics*, *0123456789*. <https://doi.org/10.1007/s00122-020-03633-w>
- Gutiérrez Gómez, J. A. (2017). Técnicas para el proceso de búsqueda, acceso y selección de información digital: los operadores. *Publicaciones Didácticas*, 393–396. <http://eds.a.ebscohost.com/eds/detail/detail?vid=0&sid=31ddffc9-c94b-4d62-821c-d347c2403e4e%40sessionmgr4007&bdata=Jmxhbm9ZXMmc2l0ZT1lZHMtG1ZSZZY29wZT1zaXRl#AN=edsbas.3FBB2870&db=edsbas>
- Gutteridge, S., Thompson, M. E., & Andreassi, J. L. (2019). *Acetohydroxyacid Synthase Inhibitors ( AHAS / ALS ) Biochemistry of the Target and Resistance*.
- Heap, I. (2020) The International Survey of Herbicide Resistant weeds, <http://www.weedscience.org>
- Hutton, B., Catalá-López, F., & Moher, D. (2016). The PRISMA statement extension for systematic reviews incorporating network meta-analysis: PRISMA-NMA. *Medicina Clínica (English Edition)*, *147*(6), 262-266. <https://doi.org/10.1016/j.medcle.2016.10.003>
- Hwang, J., Kim, J., Kim, Y., Choi, J., & Yoon, M. (2003). Lag Time of the Recombinant Acetohydroxy Acid Synthase from Tobacco. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, *24*(12), 1856–1858. <https://doi.org/https://doi.org/10.5012/bkcs.2003.24.12.1856>
- Jan, G. A., Mendoza, F., & Medina, F. E. (2020). *Catalytic Role of Gln202 in the Carbonylation Reaction Mechanism of Yeast AHAS: A QM/MM Study*. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00863>
- Jung, I. P., Ha, N. R., Lee, S. C., Ryoo, S. W., & Yoon, M. Y. (2016). Development of potent chemical antituberculosis agents targeting *Mycobacterium tuberculosis* acetohydroxyacid synthase. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *48*(3), 247–258. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.04.031>
- Kim, J., Beak, D. G., Kim, Y. T., Choi, J. Do, & Yoon, M. Y. (2004). Effects of deletions at the C-terminus of tobacco acetohydroxyacid synthase on the enzyme activity and cofactor binding. *Biochemical Journal*, *384*(1), 59–68. <https://doi.org/10.1042/BJ20040427>

- Kingsbury, J. M., & McCusker, J. H. (2010). Cytocidal amino acid starvation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* acetolactate synthase (*ilv2Δ*) mutants is influenced by the carbon source and rapamycin. *Microbiology*, *156*(3), 929–939. <https://doi.org/10.1099/mic.0.034348-0>
- Kitchenham, B. (2004). *Procedures for Performing Systematic Reviews*.
- Lang, E. J. M., Cross, P. J., Mittelstädt, G., Jameson, G. B., & Parker, E. J. (2014). Allosteric ACTion: The varied ACT domains regulating enzymes of amino-acid metabolism. *Current Opinion in Structural Biology*, *29*, 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2014.10.007>
- Laplante, J., Rajcan, Æ. I., & Tardif, J. (2009). *Multiple allelic forms of acetohydroxyacid synthase are responsible for herbicide resistance in Setaria viridis*. 577–585. <https://doi.org/10.1007/s00122-009-1067-5>
- LaRossa, R. A., & Schloss, J. V. (1984). The sulfonyleurea herbicide sulfometuron methyl is an extremely potent and selective inhibitor of acetolactate synthase in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Biological Chemistry*, *259*(14), 8753–8757.
- Lee, Y., Cui, C., Chow, E. W. L., Pue, N., Lonhienne, T., Wang, J., Fraser, J. A., & Guddat, L. W. (2013). *Sulfonyleureas Have Antifungal Activity and Are Potent Inhibitors of Candida albicans Acetohydroxyacid Synthase*.
- Li, K., Yu, Y., Dong, H., Zhang, W., Ma, J., & Wang, H. (2017). *Biological Functions of ilvC in Branched-Chain Fatty Acid Synthesis and Diffusible Signal Factor Family Production in Xanthomonas campestris*. 8(December), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02486>
- Liu, Y., Li, Y., & Wang, X. (2016). Acetohydroxyacid synthases: evolution, structure, and function. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(20), 8633–8649. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7809-9>
- Liu, Y., Li, Y., & Wang, X. (2017). Molecular evolution of acetohydroxyacid synthase in bacteria. *MicrobiologyOpen*, *6*(6), 1–14. <https://doi.org/10.1002/mbo3.524>
- Liu, Y., Wang, X., Zhan, J., & Hu, J. (2019). The 138th residue of acetohydroxyacid synthase in *Corynebacterium glutamicum* is important for the substrate binding specificity. *Enzyme and Microbial Technology*, *129*(January), 109357. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.06.001>
- Lonhienne, T., Garcia, M. D., Fraser, J. A., Williams, C. M., & Guddat, W. (2017). *The 2.0 Å X-ray structure for yeast acetohydroxyacid synthase provides new insights into its cofactor and quaternary structure requirements*. Fig 1, 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171443>
- Lonhienne, T., Garcia, M. D., & Guddat, L. W. (2017). The Role of a FAD Cofactor in the Regulation of Acetohydroxyacid Synthase by Redox Signaling Molecules. *Biological Chemistry*, *3*, 292(12). <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.773242>
- Lonhienne, T., Garcia, M. D., Noble, C., Harmer, J., & Fraser, J. A. (2017). High Resolution

Crystal Structures of the Acetohydroxyacid Synthase-Pyruvate Complex Provide New Insights into Its Catalytic Mechanism. *ChemistrySelect*, 11981–11988. <https://doi.org/10.1002/slct.201702128>

- Lonhienne, T., Garcia, M. D., Pierens, G., Mobli, M., Nouwens, A., & Guddat, L. W. (2018). Structural insights into the mechanism of inhibition of AHAS by herbicides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(9), E1945–E1954. <https://doi.org/10.1073/pnas.1714392115>
- Lonhienne, T., Low, Y. S., Garcia, M. D., Croll, T., Gao, Y., Wang, Q., Brillault, L., Williams, C. M., Fraser, J. A., McGeary, R. P., West, N. P., Landsberg, M. J., Rao, Z., Schenk, G., & Guddat, L. W. (2020). Structures of fungal and plant acetohydroxyacid synthases. *Nature*, September 2019. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2514-3>
- Lonhienne, T., Nouwens, A., Williams, C. M., Fraser, J. A., Lee, Y. T., West, N. P., & Guddat, L. W. (2016). Commercial Herbicides Can Trigger the Oxidative Inactivation of Acetohydroxyacid Synthase. *Angewandte Chemie - International Edition*, 55(13), 4247–4251. <https://doi.org/10.1002/anie.201511985>
- Lu, J., Brigham, C. J., Plassmeier, J. K., & Sinskey, A. J. (2015). *Characterization and modification of enzymes in the 2-ketoisovalerate biosynthesis pathway of Ralstonia eutropha H16*. 761–774. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5965-3>
- Macías Alvia, A., Hurtado Astudillo, J. R., Cedeño Holguín, D. M., Vite Solórzano, F. A., Scott Álava, M. M., Vallejo Valdivieso, P. A., Macías Alvia, M. J., Santana Sornoza, J. W., Espinoza Macías, M. J., Ubillús Saltos, S. P., Arteaga Espinoza, S. X., Torres Macías, O. E., Pigüave Reyes, J. M., Mera Villamar, L. A., Chavarría Cedeño, D. I., & Intriago Sánchez, K. J. (2018). Introducción Al Estudio De La Bioquímica. In *Introducción Al Estudio De La Bioquímica*. <https://doi.org/10.17993/ccyll.2018.28>
- María, D. I., & Castañeda, T. (2019). *Enzimas de interés biotecnológico*. <http://www.latextemplates.com>
- McCourt, J. A., & Duggleby, R. G. (2006). Acetohydroxyacid synthase and its role in the biosynthetic pathway for branched-chain amino acids. *Amino Acids*, 31(2), 173–210. <https://doi.org/10.1007/s00726-005-0297-3>
- Mccourt, J. A., Pang, S. S., Guddat, L. W., & Duggleby, R. G. (2005). *Elucidating the Specificity of Binding of Sulfonylurea Herbicides to*. 2330–2338.
- McCourt, Jennifer A., Pang, S. S., King-Scott, J., Guddat, L. W., & Duggleby, R. G. (2006). Herbicide-binding sites revealed in the structure of plant acetohydroxyacid synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(3), 569–573. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508701103>
- McKee, J., & McKee, T. (2014). *BIOQUÍMICA. LAS BASES MOLECULARES DE LA VIDA 5ED*. ISBN: 9786071511270 : Cap-6 McGraw-Hill.
- Meneses, T. (2018). LESIONES ENDOPERIODOTALES, TRATAMIENTOS Y PRONOSTICOS: REVISIÓN DE LITERATURA. *UDLA*, 68-70.

<http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/8541/1/UDLA-EC-TOD-2018-90.pdf>

- Microbiol, A., Doostmohammadi, M., Asadollahi, M. A., & Nahvi, I. (2016). *L-phenylacetylcarbinol production by yeast petite mutants*. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1190-2>
- Moher, D., Shamseer, L., Clarke, M., Ghersi, D., Liberati, A., Petticrew, M., Stewart, L. A., & Group, P. (2016). Ítems de referencia para publicar Protocolos de Revisiones Sistemáticas y Metaanálisis: Declaración PRISMA-P 2015. *Nutrición Humana y Dietética d F*, 20(2), 148–160. <https://doi.org/10.1186/2046-4053-4-1>
- Muller, Y. A., & Schulz, G. E. (1993). Structure of the thiamine- and flavin-dependent enzyme pyruvate oxidase. *Science*, 259(5097), 965–967. <https://doi.org/10.1126/science.8438155>
- Namgoong, S. K., Lee, H. J., Kim, Y. S., Shin, J., Che, J., Jang, D. Y., Kim, G. S., Yoo, J. W., Kang, M., Kil, M., Choi, J., & Chang, S. (1999). *Synthesis of the Quinoline-Linked Triazolopyrimidine Analogues and Their Interactions with the Recombinant Tobacco Acetolactate Synthase*. 801, 797–801.
- Page, M., McKenzie, J., Bossuyt, P., Boutron, I., Hoffmann, T., Mulrow, C., Shamseer, L., & Moher, D. (2018). *Updating the PRISMA reporting guideline for systematic reviews and meta-analyses: study protocol*. 1–21.
- Pang, S. S., Duggleby, R. G., & Guddat, L. W. (2002). Crystal structure of yeast acetohydroxyacid synthase: A target for herbicidal inhibitors. *Journal of Molecular Biology*, 317(2), 249–262. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5419>
- Petkowski, J. J., Chruszcz, M., Zimmerman, M. D., Zheng, H., Skarina, T., Onopriyenko, O., Cymborowski, M. T., Koclega, K. D., Savchenko, A., Edwards, A., & Minor, W. (2007). Crystal structures of TM0549 and NE1324-two orthologs of E. coli AHAS isozyme III small regulatory subunit . *Protein Science*, 16(7), 1360–1367. <https://doi.org/10.1110/ps.072793807>
- Punekar, N. S. (2018). *Enzymes: Catalysis, Kinestics and Mechanisms*.
- Rehberg, N., Akone, H. S., Ioerger, T. R., Erlenkamp, G., Daletos, G., Gohlke, H., Proksch, P., & Kalscheuer, R. (2018). Chlorflavonin Targets Acetohydroxyacid Synthase Catalytic Subunit IlvB1 for Synergistic Killing of Mycobacterium tuberculosis. *ACS Infectious Diseases*, 4(2), 123–134. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.7b00055>
- Saidi, A., & Mirzaei, M. (2016). Prediction of AHAS inhibition by sulfonylurea herbicides using genetic algorithm and artificial neural network. *Indian Journal of Chemical Technology*, 23(2), 121–130.
- Schloss, J., Ciskanik, L. M., & Van DyK, D. E. (1988). © 198 8 Nature Publishing Group.
- Shaner, D. L. (2000). Acetohydroxyacid synthase inhibitors. *Reviews in Toxicology*, 1(3–4), 69–110.
- Shaner, D. L., Anderson, P. C., & Stidham, M. A. (1984). Imidazolinones: Potent inhibitors

- of acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiology*, 76(2), 545–546. <https://doi.org/10.1104/pp.76.2.545>
- Sobre, I., Manual, E. L., & Manual, S. (2011). *Manual Cochrane de revisiones sistemáticas de intervenciones*. March, 1–639.
- Stetter, J. (1994). *Chemistry of Plant Protection Herbicides Inhibiting Branched-Chain Amino Acid Biosynthesis - Recent Developments* Springer-Verlag.
- Takpho, N., Watanabe, D., & Takagi, H. (2018). High-level production of valine by expression of the feedback inhibition-insensitive acetohydroxyacid synthase in *Saccharomyces cerevisiae*: Metabolic Engineering journal. *Metabolic Engineering*, 46(November 2017), 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.02.011>
- Tebes, G., Peppino, D., Becker, P., & Olsina, L. (2019). Especificación del modelo de proceso para una revisión sistemática de literatura. *XXII Ibero-American Conference on Software Engineering, CibSE 2019, April*, 391–404.
- Teijón, R. J. M., & Blanco, G. M. D. (2017). *Fundamentos de bioquímica estructural (3a. ed.)*. ProQuest E-book Central <https://ebookcentral.proquest.com>
- Tittmann, K., Schro, K., Golbik, R., Mccourt, J., Kaplun, A., Duggleby, R. G., Barak, Z., Chipman, D. M., & Hu, G. (2004). *Electron Transfer in Acetohydroxy Acid Synthase as a Side Reaction of Catalysis . Implications for the Reactivity and Partitioning of the Carbanion / Enamine Form of ( R -Hydroxyethyl ) thiamin Diphosphate in a “ Nonredox ” Flavoenzyme †*. 8652–8661.
- Tittmann, K., Vyazmensky, M., Hubner, G., Barak, Z., & Chipman, D. M. (2005). *The carbonylation reaction of acetohydroxyacid synthase II: Steady-state intermediate distributions in wild type and mutants by NMR*. 102(3), 553–558.
- Vyazmensky, M., Zherdev, Y., Slutzker, A., Belenky, I., Kryukov, O., Barak, Z., & Chipman, D. M. (2009). *Interactions between Large and Small Subunits of Different Acetohydroxyacid Synthase Isozymes of Escherichia coli †*. 8731–8737. <https://doi.org/10.1021/bi9009488>
- Wang, D., Pan, L., Cao, G., Lei, H., Meng, X., He, J., Dong, M., Li, Z., & Liu, Z. (2012). Evaluation of the in vitro and intracellular efficacy of new monosubstituted sulfonylureas against extensively drug-resistant tuberculosis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 40(5), 463–466. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.06.012>
- Wang, J. G., Lee, P. K. M., Dong, Y. H., Pang, S. S., Duggleby, R. G., Li, Z. M., & Guddat, L. W. (2009). Crystal structures of two novel sulfonylurea herbicides in complex with *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase. *FEBS Journal*, 276(5), 1282–1290. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.06863.x>
- WANG, J. jing, LI, X. ju, LI, D., HAN, Y. jiao, LI, Z., YU, H. lin, & CUI, H. lan. (2018). Non-target-site and target-site resistance to AHAS inhibitors in American sloughgrass (*Beckmannia syzigachne*). *Journal of Integrative Agriculture*, 17(12), 2714–2723.

[https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(18\)62021-0](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(18)62021-0)

- Wei, W., Cheng, D., Liu, J., Li, Y., Ma, Y., Li, Y., Yu, S., Zhang, X., & Li, Z. (2016). Design, synthesis and SAR study of novel sulfonylureas containing an alkenyl moiety. *Organic and Biomolecular Chemistry*, *14*(35), 8356–8366. <https://doi.org/10.1039/c6ob01555g>
- Wu, R. J., Ren, T., Gao, J. Y., Wang, L., Yu, Q., Yao, Z., Song, G. Q., Ruan, W. Bin, Niu, C. W., Song, F. H., Zhang, L. X., Li, M., & Wang, J. G. (2019). Chemical preparation, biological evaluation and 3D-QSAR of ethoxysulfuron derivatives as novel antifungal agents targeting acetohydroxyacid synthase. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *162*, 348–363. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.11.005>
- Xie, Y., Wen, X., Zhao, D., Niu, C., Zhao, Y., Qi, H., & Xi, Z. (2018). Interactions between the ACT Domains and Catalytic Subunits of AHASs from Different Species. *CHEMBIOCHEM*. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800367>
- Xie, Y., Zhang, C., Wang, Z., Wei, C., Liao, N., Wen, X., Niu, C., Yi, L., Wang, Z., & Xi, Z. (2019). *Fluorogenic Assay for Acetohydroxyacid Synthase: Design and Applications*. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02739>
- Yamamoto, K., Tsuchisaka, A., & Yukawa, H. (2016). *Branched-Chain Amino Acids Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/10>
- Yang, Q., Deng, W., Wang, S., Liu, H., Li, X., & Zheng, M. (2018). Effects of resistance mutations of Pro197, Asp376 and Trp574 on the characteristics of acetohydroxyacid synthase (AHAS) isozymes. *Pest management science*, *74*(8), 1870–1879. <https://doi.org/10.1002/ps.4889>
- Zhang, Y., Li, Y., Liu, X., Sun, J., Li, X., Lin, J., Yang, X., Xi, Z., & Shen, Y. (2020). Molecular architecture of the acetohydroxyacid synthase holoenzyme. *Biochemical Journal*, *477*(13), 2439–2449. <https://doi.org/10.1042/BCJ20200292>
- Zhao, Y., Niu, C., Wen, X., & Xi, Z. (2013). *The Minimum Activation Peptide from ilvH Can Activate the Catalytic Subunit of AHAS from Different Species*. 746–752. <https://doi.org/10.1002/cbic.201200680>