



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA
CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA



Tema: Estudios informáticos de la enzima de *Trypanosoma brucei* hipoxantina-guanina-xantina fosforribosiltransferasa para el uso como target de desarrollo de medicamentos.

Trabajo de Titulación, modalidad proyecto de investigación, previa a la obtención del Título de Ingeniero Bioquímico, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Jhonny Stalyn Hernández Orozco

Tutor: David Andrés Terán Mera, PhD.

Ambato – Ecuador

Diciembre 2019

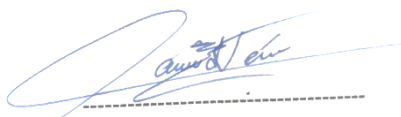
APROBACIÓN DEL TUTOR

David Andrés Terán Mera, PhD.

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, de la Universidad Técnica de Ambato.

Ambato, 17 de octubre de 2019



David Andrés Terán Mera PhD.

C.I. 1716569726

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Hernández Orozco Jhonny Stalyn , manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Bioquímico, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Jhonny Stalyn Hernández Orozco

C.I. 060545811-6

AUTOR

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. Mirari Arancibia



Lic. MSc. Danae Fernández Rivero

C.I. 17571812-0



Ing. Mg. Liliana Alexandra Cerda Mejía

C.I. 180414808-6

Ambato, 28 de noviembre del 2019

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este proyecto de investigación o parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los derechos en líneas patrimoniales de mi Proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este Proyecto 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.



Jhonny Stalyn Hernández Orozco

C.I. 060545811-6

AUTOR

DEDICATORIA

Dedicada a mi Madre la Sra. Mariana Orozco,

y a mi padre el Sr. Luis Hernández.

A mis hermanas Jessica y Yesenia,

Y a la memoria de mi abuelo Luis Orozco.

AGRADECIMIENTOS

Para alcanzar una meta no basta con el esfuerzo de una sola persona; aunque no lo parezca siempre necesitaremos el apoyo de otros. Por lo que quiero agradecer en primer lugar a mi madre que a pesar de no ser una mujer fácil de tratar siempre estuvo allí cuando la necesite y siempre estará para cuidarme. Ella es mujer que me inculco a que la vida siempre es mejor cuando eres amable con los demás y que vale la pena luchar por aquello que quieres, pero siempre cuidando de los demás.

También a mis hermanas que son parte importante de mi vida que me han enseñado a que, aunque la vida no sea fácil siempre debemos dar lo mejor de nosotros, de ellas aprendí a que en la vida no existe ningún obstáculo que no se pueda superar, que vale la pena intentar ser feliz.

A mi querido abuelo que me enseñó a siempre debemos tratar de ser buenas personas, además a esforzarme y trabajara para alcanzar mis metas. Le agradezco en especial por enseñarme que nuestras acciones tienen consecuencia que debemos afrontar.

Debo agradecer a aquellas personas que son parte de mi vida desde hace cinco años y que me apoyan en todas las locuras que a veces suelo cometer. Williams que sería de mi si no te hubiese conocido y que sería de ti si no me hubieses conocido, pues creo que nos hubiésemos aburrido. Me alegra poder decirte amiga y considerarme un amigo para ti no sé si el mejor pero ahí voy. Ale, aunque no estés cerca siempre contare contigo y sé que te preocuparás por mí y te lo agradezco. Creo que debo agradecer a Jessy, Jazz y Lizano (4F) siempre estarán ahí para una copa y hablar de la vida.

Finalmente, a todos aquellos docentes que me enseñaron y de los cuales aprendí no solo en lo eferente a lo académico si no también en valores.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ÍNDICE DE TABLAS	X
INDICE DE ECUACIONES.....	XI
INDICE DE ANEXOS.....	XI
RESUMEN	XII
ABSTRACT.....	XIII
CAPITULO I	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Antecedentes Investigativos	1
1.1.1 Enfermedad del Sueño.....	1
1.1.2 Ciclo de vida del parásito <i>T. brucei</i>	1
1.1.3 Fármacos usados para el tratamiento de HAT	3
1.1.4 Biología de <i>Trypanosoma brucei</i>	3
1.1.5 Salvataje de purinas de <i>T. brucei</i>	5
1.1.6 Enzimas involucradas en el salvataje de purinas	8
1.1.7 Diseño de fármacos contra HAT	9
1.1.8 Filogenética de las enzimas 6-oxopurina PRTasas	10
1.2. Objetivos	12
1.3.1. Objetivo general	12
1.3.2. Objetivos específicos.....	12
1.3. Hipótesis.....	12
1.3.1. Hipótesis nula	12
1.3.2. Hipótesis alternativa	12
1.4. Señalamiento de las variables de la hipótesis	12
1.4.1. Variables dependientes	12
1.4.2. Variables independientes	12
CAPÍTULO II	13
METODOLOGÍA	13
2.1. Materiales, equipos y reactivos.....	13
2.1.1 Materiales	13
2.1.1 Equipos.....	14
2.2 Métodos.....	14
2.2.1.1 Tratamiento del archivo pbd (6AR9).....	14
2.2.1.2 Tratamiento del archivo mtz	14
2.2.1.3 Reemplazo molecular	15
2.2.1.4 Primer refinamiento.....	16

2.2.1.5	Adición del ligando al proceso de refinamiento.....	16
2.2.1.6	Adición de moléculas de agua, iones metálicos y otras moléculas al proceso de refinamiento	17
2.2.3.1	Elaboración de la biblioteca de ligandos.....	19
2.2.3.2	Preparación de la enzima HGXPRT de <i>T. brucei</i>	20
2.2.3.3	Proceso del Docking en PyRx	22
2.2.3.4	Cálculo del K_{iapp} corregido	25
CAPÍTULO III.....		27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		27
3.1.	Análisis y discusión de resultados	27
3.1.1.	Refinamiento de las estructuras	27
3.1.2	Resultados del modelamiento molecular (docking)	32
3.1.3.	Análisis filogenético.....	41
3.1.3.1	Alineamiento de las secuencias proteicas de las PRTasas	41
3.1.3.2	Árboles filogenéticos.....	44
	55
3.2.	Verificación de la hipótesis	56
CAPITULO IV.....		57
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		57
4.1.	Conclusiones	57
4.2.	Recomendaciones.....	58
BIBLIOGRAFÍA		59
ANEXOS		69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1. Ciclo de vida de <i>T. brucei</i> (Centers for Disease Control and Prevention, 2019).	2
Figura N.º 2 A) Reacción para la formación de PPRP. B) Formación de AMP. C) Formación de GMP y D) Formación de XMP. (Romero, Chiacchio, Corsaro, & Merino, 2010).....	6
Figura N° 3. (a) Importar el archivo pdb de la macromolécula (6AR9) . (b) Tratamiento de la macromolécula (6AR9), eliminación de ligandos, iones metálicos y moléculas de agua.	20
Figura N° 4. (a) Proceso de adición de hidrógenos a la macromolécula (6AR9). (b) Adición de cargas a la subunidad seleccionada.....	21
Figura N° 5. Creación del archivo pdbqt de la subunidad seleccionada y tratada.....	21
Figura N° 6. (a) Proceso de importar la librería en formato sdf. (b) Minimización de la energía de los ligandos.....	22
Figura N°7 (a) Transformación de los ligandos a formato pdbqt. (b) Adición de la macromolécula.....	23
Figura N° 8. (a) Conversión de la macromolécula. (b) Archivos generados	23
Figura 9. (a) Preparación del docking. (b) Elaboración del Autogrid	24
Figura N° 10. Modificación de parámetros GA para el docking	24
Figura N° 11. Interacciones entre los residuos del sitio activo de la enzima HGXPRT de <i>T. brucei</i> y los ligandos MIC-614 (a) y MIC-654 (b). La coloración roja en las imágenes representa los átomos de oxígeno, el color azul los átomos de nitrógeno y el color cian representa las moléculas de agua.....	27
Figura N° 12. Ubicación de los tres bolsillos existentes en el sitio activo de la enzima <i>Tbr</i> HGXPR. El color amarillo representa el bolsillo de unión de la base púrica, el color rojo el bolsillo de unión del 5-fosfato y el color cian representa el bolsillo de unión del PPI.	38
Figura N° 13. Mapa de superficie de los mejores 20 ligandos y como encajan en el sitio activo.	40
Figura N° 14 . Alineamiento de las secuencias proteicas de las enzimas de la familia de las PRTasas.. ..	42
Figura N° 15. Árbol filogenético general de las enzimas 6-oxopurina PRTasas	45
Figura N° 16. Árbol filogenético circular de las enzimas 6-oxopurinas PRTasas	46
Figura N° 17. Árbol de relaciones basado en el residuo del sitio activo de las 6-oxopurinas PRTasas	47
Figura N° 18. Árbol de relación del residuo de interés del sitio activo y el residuo de alado.	48
Figura N° 19. Árbol de relación de los residuos que forman el bolsillo de purina de las PRTasas.	48
Figura N° 20 Árbol de relación los residuos más conservados y de importancia en <i>T. brucei</i> (85V/86L)	49
Figura N° 21. Árbol de relación de residuos altamente conservados y de importancia <i>T. brucei</i> (147E/148E).....	50
Figura 22. Árbol de estructuras basado en el número de subunidades que presenta cada una de las PRTS.....	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1. Valores obtenidos en el refinamiento de <i>Tbr</i> HGXPR-T-MIC-614 y <i>Tbr</i> HGXPR-T-MIC-614.....	30
Tabla N° 2. Valores de K_{iapp} corregido de los mejores 20 compuestos	34
Tabla N° 3. RMSD de los organismos analizados tomando como referencia <i>T. brucei</i> (HGXPRT).....	44

Tabla N° 4. Resumen de los residuos de interés y sus posiciones.	53
--	----

INDICE DE ECUACIONES

Ecuación N° 1. Variación de energía de Gibbs.....	25
--	----

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Valor de RMSD usando como organismo guía a cada uno de los organismos analizados.....	69
--	----

RESUMEN

Los estudios informático-realizados en la enzima hipoxantina-guanina-xantina fosforribosiltransferasa de *T. brucei* (*TbHGXPRT*) como target para el desarrollo de medicamentos fueron docking, refinamiento de estructuras y un análisis filogenético. El proceso de docking consistió en usar una biblioteca de compuestos (CASPeR), la finalidad del estudio fue determinar aquellos compuestos (fármacos) que son potenciales inhibidores de la enzima *TbHGXPRT*. El resultado del estudio determino que 381 fármacos presentan un K_i significativo y por lo tanto se pueden considerar como potenciales inhibidores.

El proceso de refinamiento se realizó con dos ligandos específicos (ANPs), este proceso de refinamiento proporciona información acerca de las interacciones que se generan entre los residuos del sitio activo y el ligando. Esta información se usó para observar cómo los 20 fármacos seleccionados en el estudio de docking, se ubican en el sitio activo de la enzima *TbHGXPRT*.

El último análisis realizado fue el estudio filogenético de la familia de enzimas fosforribosiltransferasas (PRTasas), en este estudio se realizó el alineamiento de las secuencias proteicas de 30 enzimas pertenecientes a la familia PRTasas de varios organismos. En base al alineamiento se pudo determinar aquellos organismos que presentaban sitios de residuos altamente conservados y aquellos que tenían variaciones en estos sitios.

El estudio es importante debido a que los compuestos seleccionados a partir del estudio de docking pueden ser usados para pruebas *in vitro* e *in vivo* contra el parásito. Además, que el estudio filogenético permitirá que dichos compuestos se prueben en otros parásitos que presentan enzimas de la familia PRTasas.

Palabras claves: *T. brucei*, hipoxantina-guanina-xantina fosforribosiltransferasa, docking, refinamiento, filogenético, bioinformática.

ABSTRACT

The computer-studies conducted on the enzyme hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase from *T. brucei* (TbHGXPRT) as a target for drug development were docking, refinement of structures and a phylogenetic analysis. The docking process consisted of using a library of compounds (CASPeR), the purpose of the study was to determine those compounds (drugs) that are potential inhibitors of the TbHGXPRT enzyme. The result of the study determined that 381 drugs have a significant K_i and therefore can be considered as potential inhibitors.

The refinement process was carried out with two specific ligands (ANPs), this refinement process provides information about the interactions that are generated between the residues of the active site and the ligand. This information was used to observe how the 20 drugs selected in

the docking study are located in the active site of the TbHGXPRT enzyme.

The last analysis was the phylogenetic study of the phosphoribosyltransferase (PRTases) enzyme family, in this study the alignment of the protein sequences of 30 enzymes belonging to the PRTases family of several organisms was performed. Based on the alignment, it was possible to determine those organisms that presented highly conserved waste sites and those that had variations in these sites.

The study is important because the compounds selected from the docking study can be used for in vitro and in vivo tests against the parasite. In addition, the phylogenetic study will allow these compounds to be tested in other parasites that have enzymes from the PRTase family.

Key words: *T. brucei*, hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyl transferase, docking, refinement, phylogenetic, bioinformatic.

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes Investigativos

1.1.1 Enfermedad del Sueño

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la tripanosomiasis africana humana (HAT) o denominada enfermedad del sueño (ES); ocurre en 36 países de África subsahariana en zonas donde habita la mosca tse-tsé (vector que transmite al parásito) y es provocada por dos subespecies de *Trypanosoma brucei*. La subespecie que provoca la ES de África occidental y central es el *Trypanosoma brucei gambiense*; mientras que *Trypanosoma brucei rhodesiense* causa la ES de África oriental (**Organización Mundial de la Salud , 2019**). HAT forma parte de las enfermedades desatendidas por el mundo, a pesar de que esta enfermedad es mortal si no se trata o el tratamiento suministrado es inadecuado. Además, representa un problema no solo en el ámbito de la salud si no también ganadero ya que la subespecie *Trypanosoma brucei brucei* causa la ES en el ganado presente en estas zonas (**Kennedy P. G., 2013**).

1.1.2 Ciclo de vida del parásito *T. brucei*

El ciclo de vida del parásito *T. brucei* comienza cuando la mosca tse-tsé (vector que permanece infectado de por vida) pica a un animal infectado (ganado salvaje, doméstico o los seres humanos) (**Figura N° 1**). En el caso de *T.b. gambiense* al realizar la ingesta de sangre infectada también ingesta los parásitos. Luego, los parásitos sufren cambios anatómicos y bioquímicos complejos en el intestino medio de la mosca. La transformación da como resultado formas altamente infecciosas del tripanosoma que llegan a las glándulas salivales (**Franco , Simarro, Diarra , & Jannin , 2014**).

La mosca infectada al picar a un huésped humano transfiere una carga de tripanosomas que entran y se diseminan en el torrente sanguíneo, los ganglios linfáticos y los órganos sistémicos (incluyendo el bazo, el corazón y el hígado); así como los ojos y órganos endocrinos hepáticos (**Centers of Disease Control and Prevention, 2018**). En este punto de la enfermedad se encuentra en la fase temprana o hemolinfática (también conocida como etapa 1).

El primer síntoma es una úlcera tripanosómica dolorosa que aparece entre 5 y 15 días después de la picadura inicial. Luego, de un período variable de unas pocas semanas en el caso de HAT provocada por *T.b. rhodesiense* y de varios meses en el caso de la HAT de *T.b. gambiense*, los parásitos cruzan la barrera hematoencefálica y entran en el sistema nervioso central (SNC). Según **Rodgers (2010)** a esta fase de la enfermedad se la denomina como etapa tardía o encefálica (también conocida como etapa del SNC o etapa 2). Patológicamente la etapa tardía se caracteriza por una meningoencefalitis con una extensa inflamación de la sustancia blanca cerebral con linfocitos, macrófagos y células plasmáticas. Además, se presentan alteraciones musculares causadas por células inflamatorias, activación de macrófagos y astrocitos (**Franco , Simarro, Diarra , & Jannin , 2014**).

La velocidad con la que el parásito causa la enfermedad y la duración de las dos etapas es diferente en las dos formas de HAT. La infección por *T.b. rhodesiense* causa una enfermedad aguda que dura varias semanas si no se trata. En tanto que la infección por *T.b. gambiense* suele durar varios meses o incluso años (**Kennedy P. G., 2013**). Cerca del 97% de los casos de HAT se deben a la variante *T. b. gambiense*, mientras la variante *T.b. rhodesiense* es responsable de solo el 3% de los casos (**Siguero, 2016**).

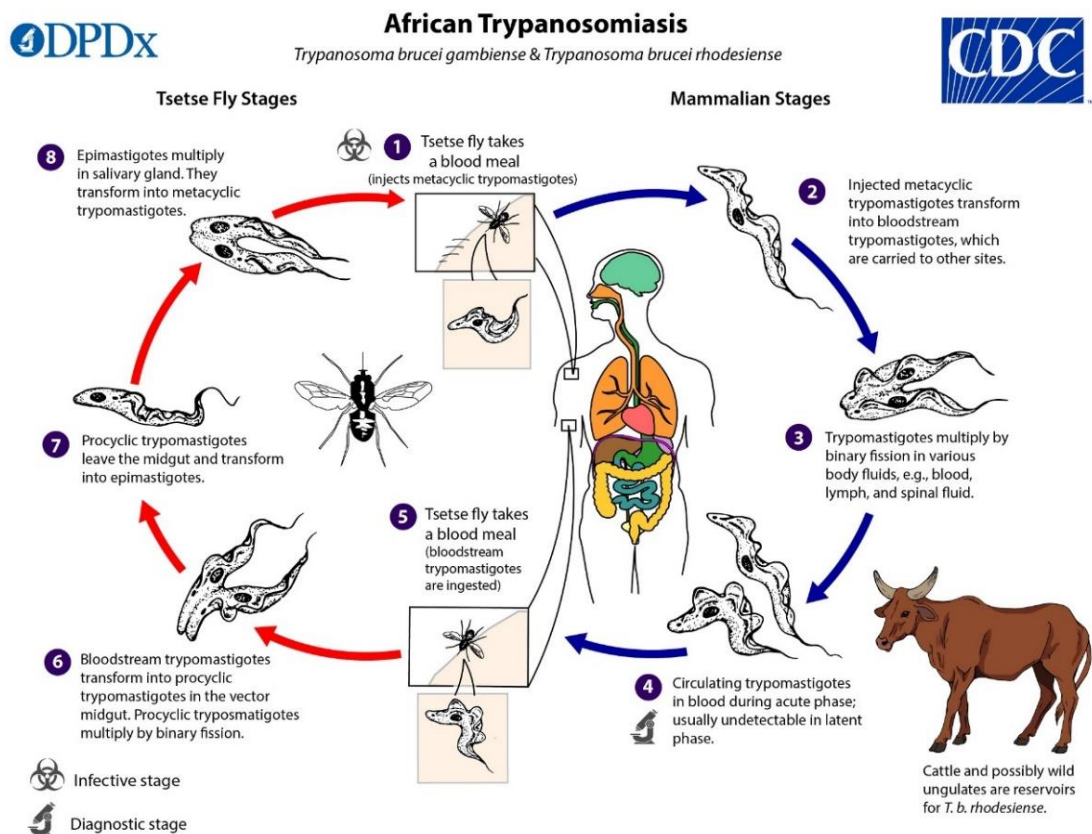


Figura N° 1. Ciclo de vida de *T. brucei* (Centers for Disease Control and Prevention, 2019).

1.1.3 Fármacos usados para el tratamiento de HAT

Los medicamentos usados en la actualidad para tratar el HAT (pentamidina, suramina, melarsoprol, eflornitina, nifurtimox y fexinidazol) presentan varias limitaciones (Fohl & David, 2003) en lo referente a especificidad, toxicidad, generación de resistencia (Bernhard, Nerima, Maser, & Brun, 2018) y efectos secundarios (World Health Organization, 2019).

La pentamidina actúa inhibiendo los sistemas enzimáticos del parásito además que se une a las nucleoproteínas de ADN afectando el proceso de replicación. En cuanto a la suramina su mecanismo de acción consiste en interferir en la división celular del tripanosoma, también favorece el proceso de fagocitosis por el sistema reticuloendotelial del huésped (Korolkovas & Burckhalter, 1983).

El melarsoprol ejerce un efecto tóxico en el parásito mediante la formación de enlaces covalentes con los grupos sulfhídricos presentes en residuos de aminoácidos. Estos residuos generalmente se encuentran en el sitio activo o zonas que contribuyen a la actividad de la enzima. El fármaco nifurtimox posee un efecto tripanomicida el cual consiste en la generación de productos de la reducción de oxígeno, generando un estrés oxidativo debido a que el parásito posee mecanismos de detoxificación deficientes (Weber, et al., 2008).

La eflornitina actúa inhibiendo la enzima ornitina decarboxilasa, misma que participa en la formación de poliamina. Este fármaco en el parásito afecta los procesos de biosíntesis de los ácidos nucleicos, así como la proliferación y diferenciación celular (Algranati, Serra, Carrillo, & González., 2006). El medicamento fexinidazol es el más usado en la actualidad debido a que sus efectos secundarios son muy leves, pero su mecanismo de acción aún no se comprende en su totalidad (Torreele, et al., 2010).

1.1.4 Biología de *Trypanosoma brucei*

T. brucei es un parasito protozoario hemoflagelado que pertenece al género *Trypanosoma*. La morfología que presenta este género es alargada con solo un flagelo que se mantiene unido al cuerpo celular por medio de una membrana. El tamaño de las células es variable encontrándose entre 18 y 42 μm de largo y 1-3 μm de ancho; en tanto que su núcleo es grande y ovalado (Gull, 1999). Este género presenta características estructurales particulares como que presentan solo una mitocondria con

un gran contenido de ADN condensado, muy ramificado y de gran tamaño, asociado al cuerpo basal del flagelo, que se conoce como kinetoplasto o cinetoplasto (**Brun, Hecker, & Lun, 1998**). También poseen un citoesqueleto flexible que es de gran importancia para el desarrollo de las distintas formas que adopta durante su ciclo de vida. El mismo está formado casi en su totalidad por microtúbulos subpeliculares interconectados; a diferencia del citoesqueleto de la célula eucariota que es una combinación de filamentos de actina e intermedios (**Baqui, Takata, Milder, & Pudles, 1998**).

En su superficie el parásito presenta una capa densa de proteínas (VSG o glicoproteína variable de superficie) en forma de dímeros cuya función es proteger al parásito de la respuesta inmune del huésped. Estas proteínas como su nombre lo indica son inmunogénicas y pueden variar rápidamente cuando el huésped desarrolla anticuerpos contra las mismas (**Pays, 2005**). En cuanto a la organización del axonema flagelar presenta un entramado proteico, el bastón paraflagelar se localiza de forma paralela al axonema (**Ralston & Hill, 2008**). Una membrana ondulante es la encargada de mantener unida el flagelo (parte del cuerpo basal) que sale del bolsillo flagelar (FP); al resto del cuerpo celular (**Bonhivers, Nowacki, Nicolas Landrein, & Robinson, 2008**).

En el estadio sanguíneo el parásito presenta un metabolismo basado en glucosa que se lleva a cabo por glucólisis. La diferencia con la mayoría de células eucariotas es que las enzimas involucradas en la glucólisis se encuentran en un orgánulo característico de los tripanosomátidos (el glicosoma) (**Opperdoes & Borst, 1997**); según **Parsons (2004)** este glicosoma es el resultado de la evolución del peroxisoma.

El género *Trypanosoma* puede presentar diversas formas o estadios en base a su morfología celular, la posición del kinetoplasto (anterior, lateral o posterior), en función del núcleo y la forma en la que sale el flagelo del FP (central o lateral). Las principales formas en las que se presenta son esferomastigote, epimastigote, tripomastigote y amastigote (**Masini d'Avila-Levy, et al., 2015**).

El estadio esferomastigote es no infectivo, pero es un estadio replicativo que se encuentra en el sistema digestivo del vector. También se puede encontrar en ensayos *in vitro*; presenta una forma esférica con un tamaño de 2-4 µm. El flagelo extracelular es pequeño y se encuentra bordeando el cuerpo del parásito. El estadio epimastigote

es similar al esferomastigote siendo replicativo y no infeccioso. La forma epimastigote se encuentra en el intestino del vector y también se desarrolla en cultivos axénicos. En esta forma el parásito es elongado, el flagelo se origina en el kinetoplasto adelante del núcleo, este emerge del costado del cuerpo celular liberándose en el extremo anterior, lo cual origina una imagen de membrana ondulante corta (**Sturat, et al., 2008; Dean, et al., 2015**).

El tripomastigote es un estadio infectivo, pero no replicativo que se halla en la ampolla rectal del vector; en la sangre del huésped mamífero (tripomastigote sanguíneo o circulante). También se desarrolla en cultivo en medio axénico (tripomastigote metacíclico) y cultivos celulares. Su forma es elongada; el kinetoplasto se ubica en la parte posterior del núcleo. El flagelo emerge a partir del kinetoplasto liberándose por el extremo anterior, dando lugar a una membrana ondulante extensa. El último estadio del parásito es el amastigote el cual es replicativo. Este estadio se presenta en el citoplasma de las células del huésped mamífero y también se pueden cultivar en cultivos celulares. La forma que presentan es esférica u ovalada, con un tamaño de 2-4 µm, su particularidad es que carece de flagelo (**Vickerman & Preston, 1976**).

T. brucei en su ciclo de vida solo presenta dos estadios el epimastigote y tripomastigote (**Figura N° 1**). En el caso del estadio tripomastigote se subdivide en otras cuatro subformas que son procíclico, metacíclico, slender o esbelto y stumpy o corto. La subforma procíclico es proliferativa y se halla en el intestino del vector. En tanto que el metacíclico es un estadio no proliferativo y se presenta en la saliva del vector (mosca tse-tse). El estadio slender es una forma sanguínea proliferativa que se encuentra en los mamíferos infectados. La subforma stumpy es un estadio que también se encuentra en el flujo sanguíneo, pero es no proliferativo (**Zeibing, 2014**).

1.1.5 Salvataje de purinas de *T. brucei*

Estudios acerca del metabolismo de purinas en parásitos protozoarios y helmínticos han demostrado que el metabolismo en estos organismos es distinto al de su huésped mamífero (**Adams, Knowler, & Leader, 1992**). Las células de los mamíferos son capaces de sintetizar *de novo* el anillo de purina con precursores simples (aminoácidos, ribosa, dióxido de carbono y formiato) y la utilización de once enzimas. Pero también pueden utilizar purinas y nucleósidos preformados. Los protozoos y helmintos carecen de una síntesis *de novo* del anillo de purina y por lo tanto solo pueden utilizar purinas

o nucleósidos preformados obtenidas del entorno del huésped. Por lo que estos parásitos usan diversas vías de salvataje de purinas, estas vías pueden ser simples o complejas dependiendo del estadio del parásito o helmíntico (**Berens, Krug, & Marr, Purine and Pyrimidine Metabolism, 1995**).

Estas vías de salvataje en los parásitos son similares a las usadas por los mamíferos, por lo cual las bases de purina son recuperadas al reaccionar con fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP) produciendo nucleósidos-5'-monofosfatos (**Figura N°2**). Las reacciones que son reversibles son llevadas a cabo por fosforribosiltransferasas individuales; mientras que la síntesis de mononucleótidos es irreversible debido a que el pirofosfato liberado se hidroliza rápidamente dentro de la célula (**Wang, Verham, Rice, & Tzeng, 1983**).

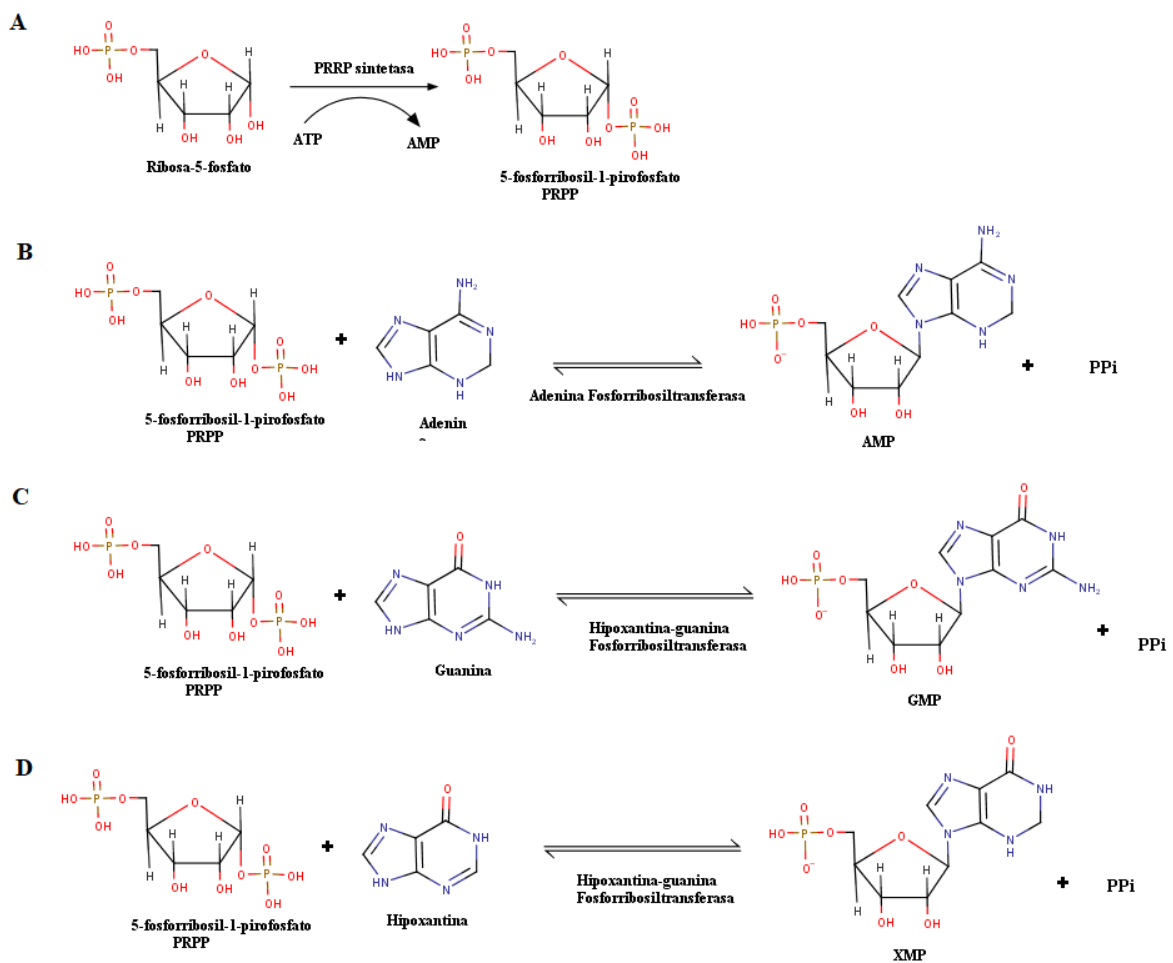


Figura N.º 2 A) Reacción para la formación de PPRP. B) Formación de AMP. C) Formación de GMP y D) Formación de XMP. (Romero, Chiacchio, Corsaro, & Merino, 2010)

Hay otras rutas de salvataje que se basan en la conversión de las bases púricas en nucleósidos y posteriormente en nucleótidos. Las reacciones son catalizadas por nucleósidos fosforilasas de purina, la reacción consiste en que la ribosa-1-fosfato sirve como donante de ribosa y forma fosfato inorgánico junto con el nucleósido de purina (**Figura N°2**). Después, se realiza una fosforilación en la posición 5' de la ribosa para llevar a cabo la conversión del nucleósido a nucleótido, esta conversión es llevada a cabo por una purina nucleósido quinasa (**Fish, Looker, Mar, & Berens, 1982**). La primera ruta de salvataje es específica para nucleósidos de purina determinados, en tanto que la segunda vía de salvataje es inespecífica debido a que el donador y el receptor del grupo fosfato no es un grupo químico determinado (**Hammond & Gutteridge, 1984**).

La producción de nucleótidos de purina en los miembros de la familia Tripanosomatidae es de gran interés debido a que en general no presentan una ruta biosintética de purinas *de novo*. Esta familia presenta una multiplicidad de rutas alternas para el salvataje de purinas (**Okochi, Abaelu, & Akinrimisi, 1983**). Generalmente las concentraciones de purinas preformadas (hipoxantina y adenosina) en estado estacionario en las células del huésped es similar a la del medio extracelular, por lo cual los endoparásitos (mayoritariamente protozoos) de los mamíferos pueden usar estas purinas preformadas para satisfacer sus necesidades de purina mediante el salvataje. Estos parásitos pueden incorporar y transformar una amplia gama de purinas, aunque en algunos casos se ha observado que presentan un requerimiento específico para determinadas purinas (**Hammond & Gutteridge, 1984**).

Estudios realizados en medios de cultivos para ciertas especies de tripanosomátidas demuestran que el requisito de purinas preformadas es necesario para su crecimiento. Todas las bases de purina son completamente transformables por los parásitos, pero su efectividad para estimular el crecimiento es variable (**Visser & Opperdoes, 1980**). Los tripomastigotes de *T. brucei* y de *T. congolense* presentan sitios de alta y baja afinidad por la adenosina. En el caso de *T. brucei* aumenta la tasa de absorción de adenina conforme aumenta la concentración externa. En tanto que la tasa de absorción de guanosina aumenta de forma mínima con el aumento de la concentración externa y la tasa de absorción de hipoxantina e inosina no muestran dependencia de la variación de la concentración externa (**Hart & Coombs, 1982**).

Específicamente en *T. brucei* y a diferencia de los parásitos *T. cruzi* y *Leshmania* se conoce más a cerca del proceso de recuperación de purinas preformadas; debido a que se han realizado una gran cantidad de estudios con el estadio procíclica (subtipo de la forma tripomastigote) del parásito. El estadio procíclico de *T. brucei* es el más estudiado dado que puede obtenerse fácilmente del torrente sanguíneo del huésped **(Berens, Krug, & Marr, 1995)**. Además, la incorporación de bases púricas en *T. brucei* es idéntica a la vista en *T. cruzi*; ambos tripanosomas carecen de la enzima adenina desaminasa. La carencia de la enzima adenina desaminasa obliga a *T.b. gambiense* y *T.b. Rhodesiense* a que se basen exclusivamente en el salvataje de purinas **(Berens, Krug, & Marr, 1995)**.

1.1.6 Enzimas involucradas en el salvataje de purinas

Las enzimas purinas fosforribosiltransferasa (PRTasas) catalizan la transferencia del grupo fosforribosil del fosforribosilpirofosfato (PRPP) a una base de purina (adenina, guanina, hipoxantina o xantina); después de la catálisis se libera un pirofosfato (PPi) y el nucleótido correspondiente **(Figura N° 2) (Craig III & Eakin, 2000)**.

La formación de AMP (adenosín monofosfato) se da por la enzima adenosina quinasa o adenina fosforribosiltransferasa (APRT); alternativamente la adenosina desaminasa y un nucleósido fosforilasa purina convierten la adenina en hipoxantina, que es recuperada por la hipoxantina fosforribosiltransferasa (HPRT). El IMP (inosina monofosfato) es un precursor para AMP y GMP (guanosín monofosfato). En casi la totalidad de eucariotas y en la mayoría de bacterias la HPRT cataliza también la recuperación de guanina y en algunos casos de xantina **(Aronov, Munagala, Ortiz, Kuntz, & Wang, 2000)**. La enzima hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HPRT) interviene en la vía catabólica de las purinas, realizando la recuperación de hipoxantina y guanina **(Herrera , Murrieta-Peralta, Campo, Ontiveros-Austria, & Jiménez-Botello, 2012)**.

Algunos organismos según **Boitz & Ullman (2006)** presentan dos enzimas distintas para el rescate de 6-oxipurinas, el sustrato primario en estos organismos para la HPRT en general es la hipoxantina; mientras la guanina se usa con eficiencia reducida. La enzima que tiene preferencia por llevar a cabo la recuperación de guanina y xantina se denomina xantina fosforribosiltransferasa (XPRT) **(Munagala & Wang, 1998)**.

T. brucei y *T. cruzi* tienen PRTasas para las cuatro bases, recuperando los ribonucleósidos por fosforilación a través de un nucleósido quinasa o por escisión de ribonucleósidos. Después se realiza una activación por una PRTasa específica para la base recuperada (**Bhatia , Vinitsky, & Grubmeyer, 1990**). Los estudios con las formas procíclicas de *T.b. gambiense* y *T.b. Rhodesiense* han demostrado la capacidad de transformar alopurinol en nucleótidos de aminopirazolopirimidina e integrarlos al ARN. El uso de estos sustratos indica que la HPRT, succino-AMP sintetasa, y succino-AMP liasa son enzimas presentes y de importancia en los parásitos (**Craig III & Eakin, 2000**) .

1.1.7 Diseño de fármacos contra HAT

El diseño de nuevos fármacos para tratar enfermedades se enfoca en el descubrimiento de compuestos que sean más específicos, eficientes, que no generen resistencia, con efectos secundarios leves o inexistentes y con una toxicidad baja o nula. Por lo tanto, en el diseño de medicamentos contra HAT se han tomado un enfoque dirigido hacia las rutas involucradas en los procesos reproductivos del parásito y síntesis de ácidos nucleicos, teniendo un interés especial las rutas de salvataje de purinas (**Doleželová, et al., 2018; Nagle, et al., 2014; Graf, et al., 2016**).

Para conseguir esta finalidad se pueden aplicar diferentes técnicas y métodos como la química combinatoria, diseño de moléculas análogas, diseño basado en cribado sistemático (**Arenas, Webber, Liberles , & Bastonella, 2017**), basado en información biológica, quimioinformática, diseño basado en moléculas bioactivas, modelo QSAR, redes neuronales artificiales (**Balaji, Nagendra, Balaji, & Rao, 2017**), modelo de farmacóforo, modelo 3D-QSAR, diseño basado en la estructura tridimensional de la diana y estudios de anclaje (**Aloy, Ceulemans, Stark, & Russell, 2003**).

En la actualidad los estudios de docking son los más utilizados por la industria farmacológica. El estudio de docking consiste en herramientas computacionales que buscan la mejor unión entre dos moléculas (un receptor y un ligando) para determinar la especificidad con la que el ligando encaja y poder mejorar dicha interacción (**Butterfield , et al., 2017; Kopec, Bozyczko-Coyne, & Williams, 2005; Congreve, Murray, & Blundell, 2005**). Estos estudios se ven favorecido si se tiene los complejos cristalizados de ligando-receptor debido a que facilitan el análisis de nuevos ligandos en el sitio activo (**Schenecke & Boström, 2006**).

Los programas de docking realizan una exploración de todas las posibles posiciones ligando-receptor evaluando la interacción intermolecular entre ambas moléculas mediante una función de scoring (**Hann & Oprea, 2004**). La utilidad del docking consiste en que se pueden analizar una serie de ligandos (cribado virtual) y determinar cuáles son los compuestos que presentan mayor factibilidad para ser utilizados como fármacos contra una enfermedad. El cribado virtual consiste en usar quimiotecas o librerías químicas para determinar los compuestos que presentan una mayor afinidad por la diana (**Ota, et al., 2014**).

Este método se ha aplicado para el diseño de inhibidores de la enzima hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT) en *T. cruzi*, logrando identificar 22 inhibidores potenciales. Los estudios realizados de estos posibles inhibidores dieron como resultado 16 compuestos que son potentes inhibidores de la enzima HGPRT de *T. cruzi*. Los compuestos restantes presentaron propiedades profilácticas *in vitro* contra la forma amastigote intracelular del parásito (**Rosa, et al., 2009**). Los principales programas de docking usados difieren en el método con el que trabajan; para *fast shape matching* los programas usados son DOCK, EUDOCK y LIGANDFIT. En tanto para la construcción incremental del ligando en la cavidad de la proteína se usa FLEXX y para el método basado en algoritmos genéticos se usan los programas FLEXIDOCK, GOLD y AUTODOCK 3.0 (**Campillo , Gonzáles-Naranjo, & Paéz, 2011**).

1.1.8 Filogenética de las enzimas 6-oxopurina PRTasas

T. brucei presenta un genoma dividido en dos unidades (genoma nuclear y mitocondrial o cinetoplasto), el tamaño estimado es de 35Mb / genoma haploide. El genoma nuclear se clasifica en tres clases de cromosomas en base al tamaño que presentan en la electroforesis en gel de campo pulsado (**Berriman, et al., 2005**). Siendo cromosomas de megabase con un tamaño de 0.9 a 5.7 Mb, intermedios de 300 a 900 kb y minicromosomas de 50 a 100 kb. También contiene una duplicación segmentaria de aproximadamente 0.5Mb que afecta a los cromosomas 4 y 8; esta sección es responsable de unos 75 duplicados de genes únicos de *T. brucei* (**SANGER INSTITUTE, 2005**).

El secuenciamiento del genoma de tripanosoma contiene alrededor de 9000 genes, de los cuales el 10% codifican glicoproteínas de superficie variantes. Estas proteínas se

encuentran presentes en la superficie del tripanosoma y ancladas a su membrana externa mediante un anclaje de glicosilfosfatidilinositol. La producción de estas glicoproteínas se da mediante la expresión de un gen de glicoproteína de superficie variante a la vez. Este fenómeno proporciona la base molecular para la variación antigénica que tipifica la enfermedad y por ende el parásito es capaz de evadir constantemente la respuesta inmune del huésped (**Siguero, 2016**).

Las HPRTs descienden de un gen *hpt* ancestral común entre los procariotas y la especificidad al sustrato pueda verse alterada por la sustitución de aminoácidos individuales (**Allen & Ullman, 1993**). En base a los datos del GenBankTM se determinó que las PRTasas de organismos relacionados filogenéticamente comparten una extensa homología en la secuencia primaria (**Craig III & Eakin, 2000**). Pero en base al análisis de las secuencias proteicas de 20 HPRTs existe únicamente 9 residuos constantes (invariantes); estos residuos conservados de HPRT y también de XPRT bacterianos tienden a diferir en sus posiciones homólogas. Se debe destacar el hecho de que estos residuos generalmente se encuentran cerca del sitio activo de las enzimas (**Janina C. Eads, Scapin, Xu, Grubmeyer, & Sacchetti, 1994**).

La Gly-69 y la Asp-134 de la HGPRT de los humanos son dos residuos altamente conservados en la mayoría de 6-oxopurina PRTasas de otros organismos (**Janina C. Eads, Scapin, Xu, Grubmeyer, & Sacchetti, 1994**). La Gly es de especial interés debido a que en la mayoría de 6-oxopurina PRTasas analizadas existe un residuo de Lys o Arg al lado izquierdo de esta Gly; específicamente en el loop del sitio activo (**Focia, Craig III, Nieves-Alicea, Fletterick, & Eakin, 1998**). La función que cumplen el cispéptido conjuntamente con la Lys es interactuar con los átomos de pirofosfato y una molécula de agua asociada con metales cuando se encuentran en el sitio activo lo que permite llevar a cabo la acción catalítica de la enzima (**Héroux, White, Ross, Davis, & Borhan, 1999**).

1.2.Objetivos

1.3.1. Objetivo general

- Analizar la enzima *Tbr*HGXPRT como target para el desarrollo de inhibidores.

1.3.2. Objetivos específicos

- Analizar datos de cristalografía para la resolución de estructuras de la enzima *Tbr*HGXPRT co-cristalizados con Acyclic Nucleoside Phosphonates.
- Realizar estudios de Docking con la enzima *Tbr*HGXPRT contra la librería Casper.
- Realizar un estudio filogenético de evolución de las enzimas 6-oxopurina PRTasas.

1.3.Hipótesis

1.3.1. Hipótesis nula

Los estudios informáticos (Docking, refinamiento y filogenética) de la enzima hipoxantina-guanina-xantina fosforribosiltransferasa de *T. brucei* no son factibles de realizar, por lo tanto, no se encontraron posibles fármacos que sean inhibidores de la enzima.

1.3.2. Hipótesis alternativa

Los estudios informáticos (Docking, refinamiento y filogenética) de la enzima Hipoxantina-guanina-xantina fosforribosiltransferasa de *T. brucei* se realizables por lo que, se encontraron posibles fármacos que sean inhibidores de la enzima.

1.4.Señalamiento de las variables de la hipótesis

1.4.1. Variables dependientes

- Fármacos de la biblioteca CASPeR

1.4.2. Variables independientes

- Programas informáticos (PyMol, Phoenix, Instant Jchem, MarvinSketch, AutoDock, COOT, Open Babel y PyRx).
- Archivos pdb, mtz y fasta.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Materiales, equipos y reactivos

2.1.1 Materiales

- Software bioinformáticas:
 - Phenix 1.14-3260
 - CASPeR
 - PyMol
 - PISA
 - PyRx
 - AutoDockTools-1.5.6
 - WinCoot
 - Instant Jchem
 - MarvinView
 - Open Babel GUI
 - CLUSTAL OMEGA
 - NCBI
 - PROTEIN DATA BANK
- Datos de X-ray y Sincrotrón, proporcionados por el Dr. David Terán. Los datos fueron colectados en el Australian Synchrotron.
- Archivos PDB y fasta
 - 6AR9
 - 3O7M
 - 1YFZ
 - 1Z7G
 - 5ESX
 - 1PZM
 - 5KNY
 - 6BO7
 - 2JKZ
 - 5IPF
 - 3ACD
 - 1QK3
 - 6APV
 - 3OHP
 - 1DQN

- 4QRI
- 3OZF
- 4ZFN
- 1DB

2.1.1 Equipos

- Computadora personal

2.2 Métodos

2.2.1 Refinamiento de estructuras

Para realizar el proceso de refinamiento se usó un archivo PDB, en este caso de la proteína 6AR9 que se obtuvo del Protein Data Bank. El archivo pdb se usó para realizar una comparación con el archivo mtz que contiene el mapa de densidad electrónica, este mapa de densidad electrónica es generado a partir del Sincrotrón. El archivo pdb fue el mismo para todas las muestras usadas en el estudio. La diferencia para cada uno de los refinamientos fue el archivo mtz y el ligando que es propio de cada una de las muestras de la proteína hipoxantina-guanina-xantina fosforribosiltransferasa cristalizadas. Para este proceso se usó la herramienta bioinformática Phenix.

2.2.1.1 Tratamiento del archivo pbd (6AR9)

Utilizando el programa Pymol se eliminó los ligandos, iones metálicos y otros grupos que estaban presentes en la estructura de la macromolécula que se analizó (en este caso la enzima *Tbr*HGXPRT). Además, se escogió solo una de las cadenas o subunidades de la macromolécula. La cadena o subunidad seleccionada fue aquella que presentó la secuencia proteica más completa. Se guarda el archivo pdb (llamado molécula de remplazo) en el cual solo se encuentra la subunidad seleccionada. En este estudio se decidió trabajar con dos subunidades es decir un dímero.

2.2.1.2 Tratamiento del archivo mtz

Mediante la opción “Data analysis” y al seleccionar “Xtriage” se comprobó que el archivo mtz este completo y no presentara problemas de reflexiones como puede ser los “Twins”. Estos “Twins” son reflexiones de cristales que se encontraban unidos al momento de realizar el proceso de X-ray. Para esto en la ventana “Xtriage” se cargó el archivo aimless_hsymm.mtz. Una vez cargado el archivo se generaron

automáticamente los datos de “Unit cell” y “Space group”. Los datos deben ser los correspondientes a la muestra cristalizada, si los datos no son iguales significa que no pertenecen a la muestra que se va a analizar. Se corrió el análisis seleccionando la opción “Run”.

Una vez terminado el proceso de “Xtriage” aparecerá la ventana “Results” en la cual se mostró los resultados obtenidos clasificados en base a colores (verde, amarillo y rojo). Estos resultados indicaron que los datos cristalográficos con los que se trabajó no presentaban “Twins”.

2.2.1.3 Reemplazo molecular

Para el reemplazo molecular del archivo pdb y mtz en Phenix mediante la opción “Molecular replacement” y al seleccionar la opción “Phaser-MR”, se despliega una nueva ventana en la cual se seleccionó todos los parámetros de interés y que permitieron unir los archivos mtz y pdb. En la opción “Date file” se cargó el archivo aimless_hsymm.mtz; una vez cargado se autocompletaron los demás parámetros como “Unit cell” y “Space group”. Se verificó que el “Space group” y “Unit cell” generados automáticamente sean los correctos.

Después en la pestaña “Ensembles” se añadió el archivo pdb tratado (llamado molécula de reemplazo); aquí se configuró la variación de identidad que va a tener el archivo pdb y el mtz se recomienda trabajar con un valor entre 80% y 90%. En la pestaña “ASU contents” se colocó el peso molecular (en Daltons) de la proteína con la que se trabajó (en este caso 60 kDa). Finalmente, en la pestaña “Search procedure” se seleccionó el número de subunidades (en este caso 3 subunidades) que va a tener el archivo final.

El número de subunidades se calculó en base al número de subunidades totales que presenta la enzima completa. En este caso como se trabajó con una proteína hexamérica y al ser la macromolécula de reemplazo un dímero, se necesitó 3 subunidades iguales a la molécula de reemplazo para que se forme la enzima completa. Se ejecutó el proceso “Phaser” y al terminar el “Phaser” se abrió la ventana “Results” la cual permite realizar el primer refinamiento.

2.2.1.4 Primer refinamiento

El primer refinamiento automático se realizó de manera inmediata después de realizado el “Phaser”, para lo cual solo se dio clic en la opción “Run phenix.refine”. Una vez terminado el primer refinamiento automático se generaron dos archivos un archivo con el mapa de densidad electrónica (mtz) y uno que contiene la ubicación (coordenadas en el espacio) de la molécula de remplazo (pdb). Después del refinamiento automático se abrió una ventana “Results” en la cual se encontraban los parámetros como R-work, R-free, clashes Core, Ramachandra plot, entre otros parámetros. Estos parámetros indican el estado del proceso de refinamiento.

Se procedió a refinar la estructura de manera manual para esto en la misma ventana de “Results” al seleccionar la opción “COOT”, se abren directamente los archivos mtz y pdb generados en el refinamiento en el programa COOT. En este programa se corrigió errores como ubicaciones incorrectas de los aminoácidos, clashes y aminoácidos que no corresponden a la secuencia de la proteína analizada. Para esto se movieron los residuos hasta que ocupen la densidad electrónica correspondiente. También se pudo eliminar, agregar, mutar, añadir conformaciones alternativas de los residuos mediante las opciones “Delete Item”, “Add residue”, “Simple mutate”, “Add Alternate” respectivamente. Esto se realizó en base a la densidad electrónica que se tenía; si la densidad no era adecuada para que el residuo se acomode, se procedió a eliminar el residuo o la cadena lateral del mismo. Cuando la densidad electrónica posterior al final de la secuencia de residuos era adecuada se procedió a agregar otros residuos. Generalmente se agregan residuos sin cadena lateral como la glicina o también se puede agregar valina eliminando su cadena lateral. Terminado el refinamiento manual se procedió a guardar el archivo en formato pdb.

Se volvió a realizar el refinamiento en Phenix, pero en esta ocasión en la pestaña “Configure” y en el menú “Input Data” se cambiaron los archivos que se encuentran en esta ventana por el pdb y mtz que se generaron al realizar el refinamiento manual. Se repitió este proceso hasta que se tuvo un estadístico de R-free menor a 0.30.

2.2.1.5 Adición del ligando al proceso de refinamiento

Para agregar el ligando (en este caso MIC-614 y Mic-654), primero se debe generar el código smile del ligando para lo cual se usó el programa MarvinSketch. En este

programa se dibujó el ligando y se generó el código smile. Mediante la opción “eLboW” del programa Phenix usando el código smile previamente generado se crean tres archivos con diferente formato (cif, pdb y pickle). Estos archivos se usaron para agregar el ligando al sitio activo de la enzima.

El ligando se añadió insertando el archivo cif en el programa COOT, mientras se realizaba el refinamiento manual. El proceso para añadir el ligando consistió en elegir “File” y seleccionar “Import CIF dictionary”, que abrió el archivo cif del ligando. Al abrirse el archivo se generó la molécula (ligando) en el programa, después se colocó el ligando en la densidad electrónica que le correspondía. Se debe unir el ligando a al mapa para lo cual en la opción “Edit” se seleccionó “Merge Molecules” que despliega una ventana en la cual se seleccionó el ligando y se añadió a nuestro mapa. Este proceso se debe repetir el número de veces que sea necesario para colocar el ligando en todos los sitios activos presentes en la proteína de interés, en este caso se realizó seis veces. Se siguió refinado hasta que el R-free sea menor o igual 0.26.

2.2.1.6 Adición de moléculas de agua, iones metálicos y otras moléculas al proceso de refinamiento

El proceso para agregar el solvente o moléculas de agua se realizó en Phenix para lo cual en la pestaña “Configure” y en la opción “Refine settings” se activó la opción “Update waters” y se corrió el refinamiento. Una vez terminado el refinamiento al abrir el archivo en COOT ya se habían adicionado las moléculas de agua. Las moléculas de agua también se revisaron de manera manual, especialmente aquellas que se encontraban en densidades electrónicas que no les correspondían o que provocaban clashes muy grandes. En este punto y en el mismo COOT se agregaron iones metálicos u otras moléculas como sulfatos en aquellas densidades electrónicas que presentaban los tamaños y las formas características de dichas moléculas.

Al haber realizado todo lo anterior en COOT y refinar en Phenix se alcanzó un R-free igual o menor a 0.24, este valor de R-free es aceptado para publicaciones. El valor de R-free que se alcance dependerá de la resolución con la que se esté trabajando. Así si la resolución es menor a un angstrom se obtendrá un R-free menor a 0.19, en tanto que si la resolución se encuentra entre 1.5 Å y 2.5 Å el valor de R-free estará entre 0.2 y 0.22. Finalmente, si es mayor a 2.5 Å el R-free será mayor a 0.23. Además, entre más cercana o superior a 3 Å sea el valor de la resolución, el proceso de adicción de

moléculas de agua se deberá realizar de manera manual en COOT como se realizó para el complejo *Tbr*HGXPRT-MIC-654.

2.2.2 Elaboración de figuras enzima-ligando (MIC-614 y MIC-654)

La elaboración de figuras se puede realizar en varios programas bioinformáticos, en este caso se utilizó Pymol.

Se uso el archivo en formato pdb resultante del proceso de refinamiento, se abrió el mismo arrastrando el archivo a la ventana de trabajo de Pymol.

Una vez abierto el archivo se procedió a encontrar todas las interacciones que tenga el ligando con la enzima, agua y otras moléculas. El proceso para observar las interacciones consistió en:

- Seleccionar el o los ligandos de interés (MIC-614 o MIC-654)
- Dar clic en la pestaña “A” del menú ubicado en la derecha.
- Seleccionar la opción “find” en el menú desplegado.
- Escoger la opción “polar contacts” del menú desplegado.
- En el menú abierto seleccionar “any contact whith object”.

El proceso anterior genero las interacciones existentes del ligando con residuos específicos de la macromolécula. Se procedió a eliminar todos aquellos elementos que no presentaron interacciones con el ligando. Para esto se seleccionaron todos los residuos, metales y otras moléculas que tenían interacciones con el ligando. Se renombro esta selección en “A” en la opción “rename”. Se procedió a ocultar el resto (moléculas de agua, residuos, iones metálicos y otras moléculas) que no presentaban interacciones representativas dando clic en la pestaña “H”.

Lo que se obtuvo fue una imagen en la cual se encontraba el ligando y todos aquellos elementos con los que tenía interacciones. Para tener una mejor vista de estas interacciones se debe mostrar los residuos en sticks. Para cambiar el formato a sticks en la pestaña “S” se escogió “sticks”. Se busco una posición que permita observar de mejor manera las interacciones existentes, si fuese necesario también se pueden ocultar las cadenas laterales de los residuos para esto en la opción “H” se selecciona “side chain”. Finalmente se realizó la imagen mediante la opción “Draw/Ray”.

Para determinar la naturaleza de las interacciones del ligando con los residuos de la enzima, se realizó el cálculo de la distancia entre los átomos que estaban implicados en las interacciones. Este proceso consistió en:

- Seleccionar los dos átomos que generan la interacción.
- En el menú superior, seleccionar “Wizard”.
- Seleccionar en el menú desplegado “Measurement”

Este proceso se realizó para cada una de las interacciones que se generaron.

2.2.3 Proceso de docking de la enzima *Tbr*HGXPRT con la librería de compuestos “CASPeR”

El estudio de docking para determinar posibles fármacos que se puedan utilizar para tratar HAT se realizó en dos partes. La primera consistió en la elaboración de la biblioteca de ligandos y el tratamiento de la macromolécula. La segunda parte del análisis fue el proceso de docking.

2.2.3.1 Elaboración de la biblioteca de ligandos

Se eligió una la biblioteca específica para trabajar, en este caso se seleccionó la biblioteca CASPeR de la Universidad de Griffith.

Se filtro los compuestos de la biblioteca en base a las necesidades del investigador; para este estudio se escogieron los compuestos clasificados como “DRUG” siendo un total de 3517 compuestos.

Se descargo los compuestos seleccionados mediante el menú “Export” y se seleccionó la opción “CSV”, esto descargo un archivo en este formato. El archivo se transformó a formato sdf antes de realizar el docking, para lo cual se usó el programa Instant Jchem en el cual se debe:

- Importar el archivo en formato csv descargado previamente de la librería CASPeR.
- Una vez importado se genera una tabla en la cual se encuentra la estructura, ID, el peso molecular, el nombre comercial, entre otros parámetros. Esta tabla se puede modificar añadiendo o eliminando parámetros según la necesidad.
- Exportar la tabla final en formato sdf.

2.2.3.2 Preparación de la enzima HGXPRT de *T. brucei*

La macromolécula se trató previamente minimizando la energía, añadiendo todos los hidrógenos que presenten contactos polares, eliminando el solvente (moléculas de agua) y los metales que se encontraban en la estructura. Para esto se utilizó el programa AutoDock y la interfase visual AutoDock Tools.

El tratamiento de la macromolécula consistió en:

- Descargar el archivo PDB desde el Protein Data Bank de la proteína con la cual se va a trabajar (en este caso la enzima HGXPRT de *T. brucei* que tiene el código 6AR9).
- Importar el archivo pdb al programa AutoDock Tools, mediante el menú “File” en la opción “Read Molecule” (**Figura N° 3a**).

En la sección “All Molecules” se crea una carpeta con el nombre o código de identificación de la proteína.

Para eliminar los ligandos, iones metálicos, moléculas de agua y otras moléculas que se encuentren en nuestra macromolécula se realizó:

- Seleccionar todos los ligandos, iones metálicos y otras moléculas.
- En la opción “Edit” seleccionar “Delete” que abre un menú en el cual se selecciona la opción “Delete Selected Atoms”.
- Eliminar las moléculas de aguas en “Edit” en la opción “Delete Water” (**Figura N° 3b**)

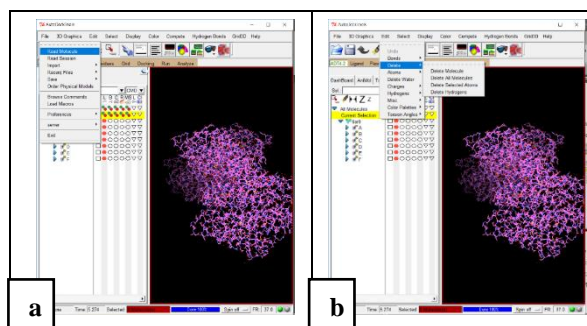


Figura N° 3. (a) Importar el archivo pdb de la macromolécula (6AR9) . (b) Tratamiento de la macromolécula (6AR9), eliminación de ligandos, iones metálicos y moléculas de agua.

- Añadir los hidrógenos con contactos polares mediante la opción “Edit”, en la alternativa “Hydrogens”. Se selecciona “Merge Non-Polar” (**Figura N° 4a**).

- Seleccionar una de las subunidades de la macromolécula, la subunidad seleccionada debe ser la que tenga el mayor número de residuos es decir la subunidad más completa.
- Eliminar el resto de las subunidades no seleccionadas, para esto se debe seguir los mismos pasos que para eliminar los ligandos, iones metálicos y otras moléculas.
- Añadir carga a la subunidad seleccionada para lo cual en “Edit” se selecciona “Charge” y se escoge “All Kollman Charges”(Figura N° 4b).

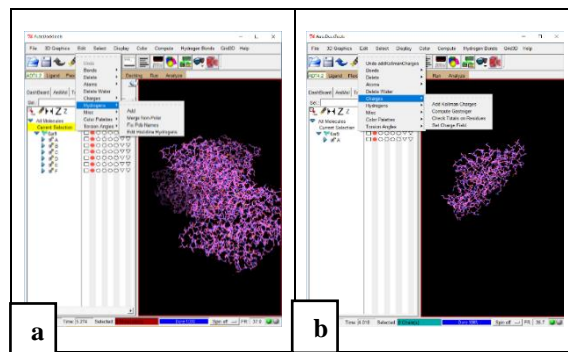


Figura N° 4. (a) Proceso de adición de hidrógenos a la macromolécula (6AR9). (b) Adición de cargas a la subunidad seleccionada.

- Realizar el Grid de la subunidad seleccionada previamente, para lo cual se debe abrir el menú de la pestaña “Grid”.
- Seleccionar la opción “Macromolecule”, seguido de la opción “Choose”. Se abrirá una nueva ventana en la que se selecciona la macromolécula (en este caso la subunidad) (Figura N° 5).

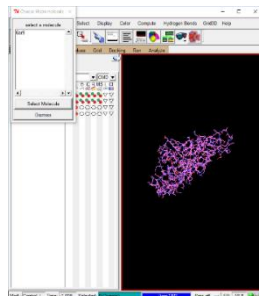


Figura N° 5. Creación del archivo pdbqt de la subunidad seleccionada y tratada.

Una vez seleccionada la macromolécula, la misma se guardará en formato pdbqt que es el archivo que se utilizara para realizar el docking en PyRx.

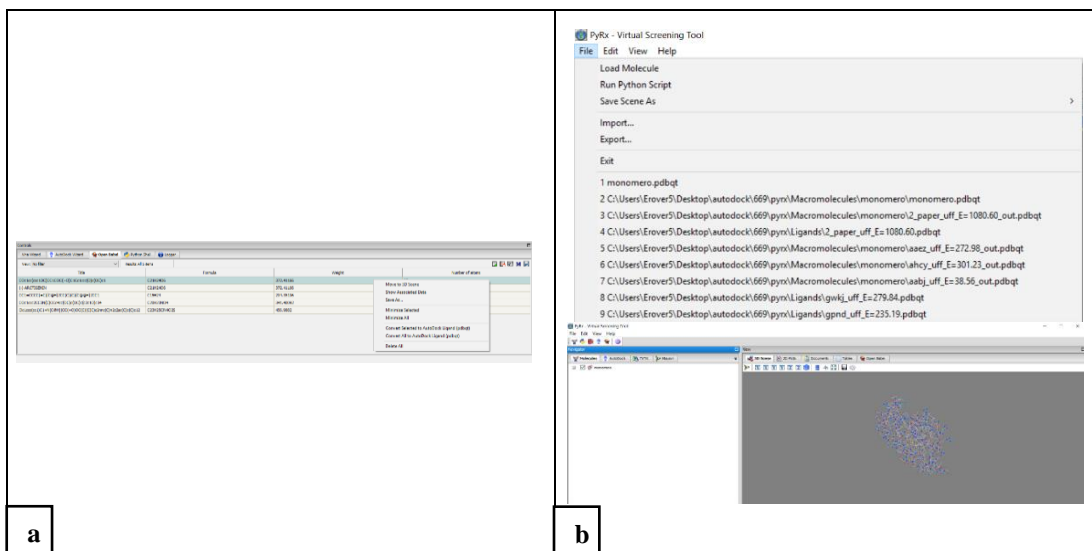


Figura N°7 (a) Transformación de los ligandos a formato pdbqt. (b) Adición de la macromolécula

- Convertir la macromolécula para poder usarla en el proceso de docking para lo cual en la macromolécula agregada se da clic derecho y en el menú que se despliega se selecciona “AutoDock”, seguido de la opción “Make Macromolecule” (**Figura N° 8a**).
- Comprobar que en la pestaña “AutoDock” de la sección “Navegador” se ha generado en la carpeta de “Ligands” todos los ligandos con los que se va a trabajar y la carpeta “Macromolecules” debe contener una carpeta con el nombre de la macromolécula diana (**Figura N° 8b**).

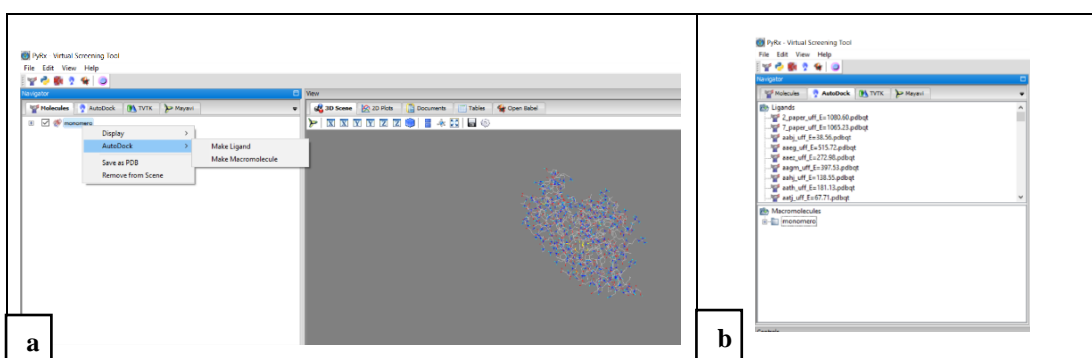


Figura N° 8. (a) Conversión de la macromolécula. (b) Archivos generados

- Realizar el docking para esto en la sección “Wizard/Shell” en la pestaña “Vina Wizard” se da clic en “Start”.
- Seleccionar los ligandos con los que se desea correr el docking de la carpeta “Ligands” y también la macromolécula de interés de la carpeta “Macromolecules” y se da clic en “Forward” (**Figura N° 9a**).

- Realizar el Autogrid, esto consiste en seleccionar el sitio específico de nuestra macromolécula donde se realizará el docking. Este sitio es generalmente el sitio activo de la enzima, para esto se usan los residuos que son importante en el sitio activo y que tienen interacciones con los ligandos (**Figura N° 9b**).

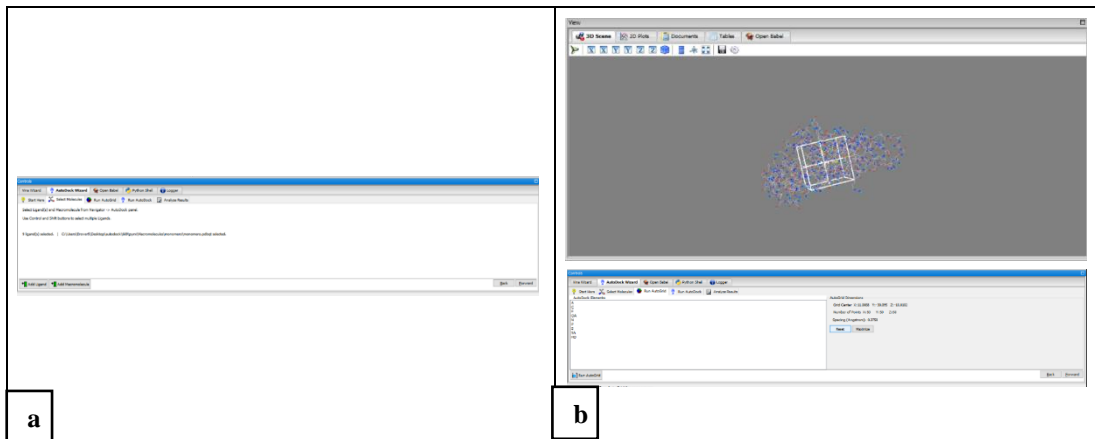


Figura 9. (a)Preparación del docking. (b) Elaboración del Autogrid

- Modificar los parámetros que se usaran para el docking, para esto en “Run AutoDock” se selecciona “Genetic Algorithm (GA)” y se modifican los mismo de acuerdo a los requerimientos (**Figura N°10**).

En este caso se usó un número de población igual a 100 y 20 corridas basadas en GA, estos valores para la población y número de corridas son 100 y 20 debido que el tiempo aumenta conforme aumenta el número de corridas. Además, al generar un número de poblaciones superior a 100 existe la posibilidad que se generen mutaciones que no son significativas para el proceso de docking (**Fogel, 1978; Gillet, Willet, & Bradshaw, 1998; Renner & Schneider, 2004; Miranda, 2009; Teodoro, Phillips, & Kavraki, 2002**).

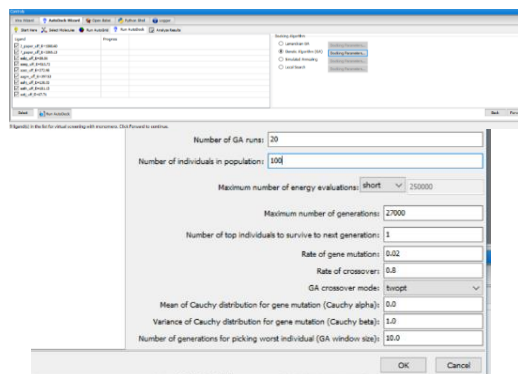


Figura N° 10. Modificación de parámetros GA para le docking

- Correr el docking dando clic en “Run Vina”
- Analizar los resultados en la pestaña “Analyze Result”, estos se pueden guardar en formato csv.

Se crean archivos en formato pdbqt en la carpeta “Macromolecules”. Los archivos pdb al abrirlos generan en la pestaña “Molecules” de la sección “Navegador” una lista de todas las posiciones del ligando en el sitio activo de la macromolécula.

Para guardar el archivo en formato pdbqt o pdb del complejo enzima-ligando, se debe dar clic derecho en el complejo enzima-ligando que sea de interés y seleccionar la opción “Save As”.

2.2.3.4 Cálculo del K_{iapp} corregido

Para el cálculo del k_{iapp} se utilizó la fórmula de energía de Gibbs manteniendo las condiciones estándares a las que trabaja la enzima HGXPRT.

Ecuación N° 1. Variación de energía de Gibbs

$$-\Delta G = RT \ln K_{iapp}$$

Donde:

T=310,15 K

R=1.987207 cal/mol*K

-ΔG= Energía obtenida en el docking

El cálculo del error se basó en el $K_{i\text{real}}$ y el k_{iapp} de un pro-fármaco ANP del cual se tenía el valor del K_i en pruebas *in vitro* y el K_i obtenido mediante el docking. El error se calculó simplemente restando en k_{iapp} del $K_{i\text{real}}$; la diferencia obtenida se restó del K_{iapp} de los ligandos usados para el docking y se obtuvo el K_{iapp} corregido.

2.2.4 Análisis filogenético y estructural de enzimas 6-oxopurina fosforribosiltransferasas

Para el análisis filogenético primero se recolectó todos los archivos pdb y fasta correspondientes a las proteínas pertenecientes a la familia de PRTasas; es decir aquellas proteínas que han sido cristalizadas y se han sometido a difracción de rayos x

(X-ray). Estos archivos se obtuvieron desde el Protein Data Bank, en total se recolectaron 30 archivos pdb y fasta.

El alineamiento de las secuencias se realizó en CLUSTAL OMEGA W, para lo cual se colocó las secuencias proteicas contenidas en el archivo fasta de cada uno de los organismos, en esta página web se realizó el alineamiento de las secuencias. La misma página se usó para realizar el árbol filogenético de los organismos analizados; después se realizó un alineamiento manual en el que se tuvo a *T. brucei* como organismo base.

El árbol filogenético circular se lo realizo en el programa Mega 7, para esto fue necesario realizar un alineamiento previo. Posteriormente se generó el árbol filogenético. Los árboles basados en los residuos de interés y más conservados se realizaron de manera manual; para esto se sobrepusieron las estructuras de cada una de las enzimas en el programa Pymol. Se tomó como referencia la estructura de *T. brucei*, se eligió a *T. brucei* dado que se conocen las posiciones de los residuos de interés. La ubicación de los residuos es importante debido a que los mismo se usaron para determinar con exactitud la ubicación de los residuos y su posición en las estructuras de los demás organismos. También al realizar la superposición de las estructuras se determinó el RMSD (desviación media cuadrática), que presentaban cada una de las estructuras en referencia a las otras.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de resultados

3.1.1. Refinamiento de las estructuras

Los residuos de la enzima *Tbr*HGXPRT que presentan interacciones son los mismo para ambos ligandos MIC-614 y MIC-654. Siendo estos residuos Y201, V202, K180, D151, T152, G153, T155 y E208 (**Figura N°11**). Estos residuos coinciden con aquellos descritos según **Doleželová, et al., (2018)**, en su estudio en el cual se realizó el refinamiento de ANPs con la misma enzima.

Los residuos que generan interacciones con los átomos de la base purínico del ligando MIC-614 son Y201, V202, K180 y E208. El O1 localizado en el cuerpo purínico del ligando (MIC-614) forma interacciones con el grupo OH de Y201 y también genera interacciones con el O de grupo carbonillo y N del grupo amino de E208. Además, el O2 (localizado en el cuerpo purínico) del ligando genera puentes de hidrogeno con el N del esqueleto carbonado de V201 y el N de la cadena lateral de K180. El N2 (de la base purínica) interactúa con el O del grupo carbonilo de V201 y el N3 con el N de K180. Esto en lo referente a los residuos que se encuentran formando el denominado bolsillo purínico.

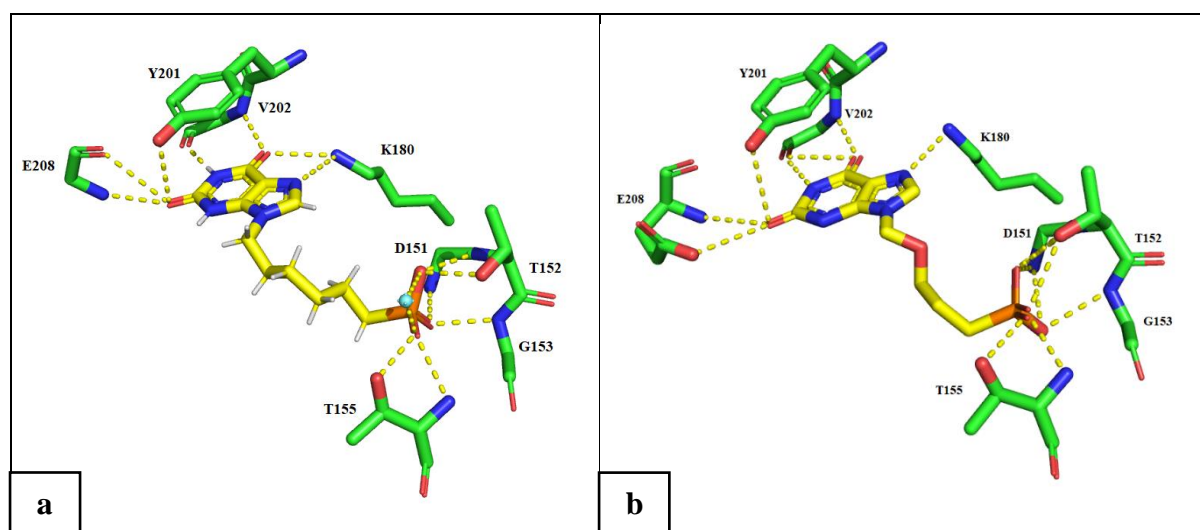


Figura N° 11. Interacciones entre los residuos del sitio activo de la enzima HGXPRT de *T. brucei* y los ligandos MIC-614 (a) y MIC-654 (b). La coloración roja en las imágenes representa los átomos de oxígeno, el color azul los átomos de nitrógeno y el color cian representa las moléculas de agua.

Los residuos del bolsillo 5'-fosfato que generan interacciones son T152, D151, G153 y T155. El O3 (de la cola fosfatada) del ligando (MIC-614) genera interacciones con el oxígeno del grupo carboxilo de la cadena lateral del residuo T152; también presenta una interacción con el N del grupo amino de este mismo residuo. Además, genera una interacción con la molécula de agua 421. El O4 localizado en la cola fosfatada del ligando interactúa con los nitrógenos del grupo amino de los esqueletos carbonados de los residuos D151 y G153. También, se generan interacciones entre el O5 (ubicado en la cola fosfatada) del ligando y los átomos de O y N de la cadena lateral del residuo T155. Además, este O5 presenta una interacción con la molécula de agua 421 (**Figura 11a**).

Para el ligando MIC-654 se generaron interacciones con los mismos residuos que generó interacciones el ligando MIC-614. La diferencia de las interacciones generadas por cada uno de los ligandos (MIC-614 y MIC-654) con los residuos, radica en los átomos que están realizando dicha interacción.

Así, los residuos Y201, V202 y E208 generan interacciones con los átomos O1, O2, N2 y N3 ubicados en el cuerpo purínico del ligando (MIC-654). Las interacciones generadas por O1 del ligando son con el O del grupo OH del residuo Y201 y con el O del OH del grupo carbonilo de la cadena lateral del residuo E208. En el caso del O2, este tiene interacciones con O y N del esqueleto carbonado del residuo V201, pero carece de la interacción con el residuo K180 que se encuentra presente en el complejo enzima-ligando *Tbr*HGXPRT-MIC-614 (**Figura N° 11a**). El N2 y N3 presentan las mismas interacciones que MIC-614. En lo referente al bolsillo 5'-fosfato se generan las mismas interacciones que las generadas por ligando MIC-614, presentado únicamente la ausencia de la interacción con la molécula de agua (**Figura N° 11b**).

Las interacciones generadas en ambos casos son puentes de hidrógeno dado que la realización del cálculo de la distancia entre los átomos que realizaban estas interacciones tuvieron una distancia mayor a 2 Å y menor a 3 Å (**Ávila & Mora, 2004**). Por ende, estas interacciones se encuentran en el rango de formación puentes de hidrógeno. Además, que intervinieron en las interacciones los elementos de grupos funcionales que forman puentes de hidrógeno.

Las variaciones producidas en las interacciones generadas entre los ligandos con la enzima *Tbr*HGXPRT se deben según **Blundell (2017)**, a que las interacciones sufren

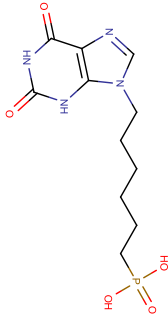
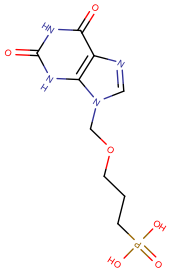
cambios (eliminación y generación de interacciones) debido a varios factores. El más importante es la semejanza entre ligandos; es decir mientras más parecidos estructuralmente sean los ligandos, los mismos serán capaces de formar interacciones iguales o similares con la enzima. En este caso los dos ligandos con los que se trabajó son ANPs (nucleósidos fosfonatos acíclicos) que son análogos al sustrato (purinas) natural de la enzima, pero con una cola fosfatada que le confieren sus propiedades inhibitorias (**De Clercq & Holý, 2005**). Estructuralmente estos dos ligandos son similares teniendo como única diferencia un oxígeno ubicado en medio de la cola fosfatada del ligando MIC-654 (**Tabla 1**). Por lo cual la interacción generada entre O de la cadena lateral de E208 y O1 se debe a que las fuerzas intermoleculares y extramoleculares generadas por el oxígeno añadido modifican la posición del ligando por lo que se modifica también la posición de los residuos posibilitando que la interacción más factible sea entre dichos átomos.

La ausencia de la interacción del oxígeno del grupo fosfato de la cola fosfatada del ligando MIC-614 con una molécula del agua no se debe directamente a la estructura de los ligandos. La ausencia de esta interacción se debe a la resolución que presenta el ligando MIC-614 que es de 2.84 Å, debido a que según **Podjarny, Howard, Mitschler, & Chevrier (2002)**, la resolución de los datos de difracción es importante dado que dicha resolución es la distancia mínima entre características estructurales que se pueden distinguir en los mapas de densidad electrónica. A partir de una resolución de aproximadamente 2.7 Å se pueden observar las moléculas de agua bien definidas (**Wlodawer, Minor, Dauter, & Jaskolsk, 2008**), por lo que en este caso al tener una resolución mayor de 2.7 Å, las densidades para las moléculas de agua no se observan claramente por lo que podrían existir interacciones con el agua para el ligando MIC-654 que no son visibles debido a la resolución.

En lo referente al R-work o R-factor de complejo enzima-ligando (**Tabla 1**), el mismo debe tener un valor máximo de 0.3 para poder ser publicado por el Protein Data Bank (**Lee & Kim, 2009**), en ambos casos este valor fue menor siendo 0.1764 y 0.2042 para *Tbr*HGXPRT_MIC614 y *Tbr*HGXPRT_MIC654 respectivamente. Estos valores obtenidos para el R-work son buenos debido a que se considera que un valor de R-work es mejor mientras más cercano al cero se encuentre el mismo; dado que este valor representa la diferencia que existe entre la observación experimental y el valor

calculado matemáticamente que se basa en la predicción de modelos de factores estructurales (Holton, Classen, Frankel, & Tainer, 2014).

Tabla N° 1. Valores obtenidos en el refinamiento de *Tbr*HGXPRT-MIC-614 y *Tbr*HGXPRT-MIC-614.

Enzima-ligando Parámetros	<i>Tbr</i> HGXPRT-MIC-614	<i>Tbr</i> HGXPRT-MIC-654
Estructura		
Resolución	2.05	2.84
R-work	0.1764	0.2042
R-free	0.2053	0.2598
Bonds	0.010	0.003
Angles	0.938	0.588
Clash core	5.18	8.51
K _{i app} corregido	2.35 μM	0.00654 μM

En estudios realizados de refinamiento con ANPs similares y la misma enzima reportan un R-work de 0.191 para un complejo con una resolución de 2.64 Å (Doleželová, et al., 2018). Este complejo presenta una resolución cercana a las resoluciones con las que se trabajó, en nuestro estudio se obtuvo un mejor valor de R-work. El mejor valor del R-work obtenido se debe a factores que modifican este estadístico como un mejor arreglo manual que permite que se corrijan los errores de ubicación de residuos y otras moléculas en la estructura (Schluenzen, et al., 2000). Además, en los complejos en los que se realizó el refinamiento se puede observar una mayor cantidad de residuos que formaban el loop móvil, lo que indica que la estructura es más completa, dicho factor favorece a la disminución del R-work.

En cuanto al R-free este valor es directamente proporcional a la resolución, este estadístico al igual que el R-work tiene un valor máximo de 0.3 para que dicha

estructura pueda ser publicada por el PDB o NCBI (**Lee & Kim, 2009**). En este caso se obtuvo un valor de R-free de 0.2053 y 0.2598 para los complejos *Tbr*HGXPRT-MIC614 y *Tbr*HGXPRT-MIC654 (**Tabla 1**) respectivamente. Se puede apreciar que estos valores al contrario que el R-work presentan un amplio margen de diferencia. El margen existente se puede deber a que el R-free es un parámetro similar al R-work pero este solo se calcula con aproximadamente 1000 reflexiones al azar del conjunto total de reflexiones (**Lubkowski, Dauter , Aghaiyp, Wlodawer, & Dauter, 2004**), por lo que en este factor la ubicación de las moléculas y de los residuos tiene un mayor impacto, debido a que si estas se encuentran en una densidad electrónica que no les corresponde causan un defecto en el modelo. Este defecto podría ser la adición de moléculas de agua en densidades electrónicas que son consideradas ruidos y por ende no deberían presentar ninguna molécula. En este caso se incrementa el R-free pero el R-work puede disminuir (**Laskowski , MacArthur , Moss, & Thornton, 1993**). Lo mencionado anteriormente es uno de los factores que provocaron que el complejo *Tbr*HGXPRT-MIC654 presente un R-free elevado pero su R-work sea bajo; debido a que para este complejo las moléculas de agua como se mencionó en la metodología se agregaron de manera manual. Por lo que existe una gran probabilidad que varias moléculas de agua se encuentren en densidades que son ruido.

El valor de R-free reportado por **Doleželová, et al., (2018)** en su estudio en el cual trabajaron con la misma enzima y ligandos similares, con una resolución de la estructura del complejo de 2.64 Å fue de 0.249. El R-free reportado tiene concordancia con el valor obtenido para el *Tbr*HGXPRT-MIC654 ya que la resolución del mismo como se mencionó antes es de 2.98 Å. En base a lo anteriormente mencionado se puede decir que los datos tanto de R-work y R-free obtenidos son buenos, están dentro del rango publicable y son similares a los obtenidos en estudios anteriores.

Los parámetros restantes Bonds, Angles y Clash core (**Tabla1**) hacen referencia a la energía de los enlaces existentes entre los átomos, el Ramachandra plot o si se encuentran los aminoácidos en los ángulos más favorables y si existen choques energéticos entre residuos o moléculas. Todo lo anterior son parámetros que favorecen a R-work y R-free para estos no existen rangos determinados.

3.1.2 Resultados del modelamiento molecular (docking)

Para el estudio de docking se pretendía utilizar de 3517 compuestos pertenecientes a la clasificación de fármacos (DRUGS) de la biblioteca CASPeR. El proceso de docking se llevó a cabo únicamente con 3257 compuestos del total de la librería (**Anexo digital**). Solo se trabajó con 3257 compuestos debido a que, al ser fármacos, varios de los mismo presentan moléculas coadyuvantes o excipientes y el estudio de docking se realiza únicamente con un ligando a la vez. Por lo que 260 fármacos que presentaban moléculas coadyuvantes fueron excluidos del docking.

De los 3257 ligandos con los que se realizó el docking se calculó su K_{iapp} (constante de inhibición aparente) mediante la fórmula de variación de energía de Gibbs. Posteriormente se corrige el error existente mediante un patrón del cual se conoce su K_{ireal} (**Tabla 2**). Se usó la ecuación de energía libre de Gibbs debido a que el proceso de docking se basa en el cálculo de la energía libre que se genera en las interacciones enzima-ligando, que toma en cuenta las posiciones que puede tener el ligando dentro del sitio activo y algoritmos genéticos (GA) basados en la genética natural y evolución biológica (**Morris, et al., 1998**). Por la complejidad de dichos GA es necesario limitar algunos parámetros como el número de poblaciones y corridas. Los parámetros anteriormente mencionados se modifican debido a que afectan directamente el tiempo en el cual se realiza el docking; así entre mayor número de corridas y poblaciones generadas el tiempo del proceso de docking se incrementa. Además, se prefiere trabajar con un número de poblaciones igual a 100 como se realizó en este caso, debido a que, según **Jones, Willet, Leach y Taylor (1997)**, el número de poblaciones hace referencia a posibles cambios que se pueden generar en la secuencia proteica del organismo a través del tiempo por el proceso evolutivo (**Fogel, 1978; Gillet, Willet, & Bradshaw, 1998; Renner & Schneider, 2004; Miranda, 2009; Teodoro, Phillips, & Kavraki, 2002**). Por lo que en un número de poblaciones superiores a 100 las variaciones en la secuencia proteica que se pueden generar son demasiado aleatorias dando lugar a datos de energía libre no significativos (**Jones, Willett, Glen, Leach, & Taylor, 1997**).

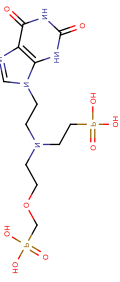
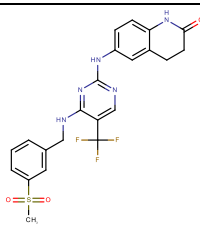
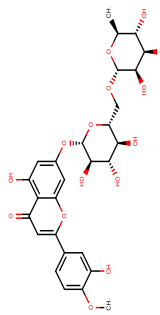
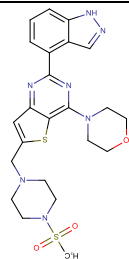
Se seleccionaron todos aquellos compuestos que presentaron un K_{iapp} corregido ≤ 6.10 μM , teniendo un total de 381 ligandos (**Anexo digital**) que se pueden considerar como posibles inhibidores de la enzima *Tbr*HGXPR. Los 381 ligandos representan un 11%

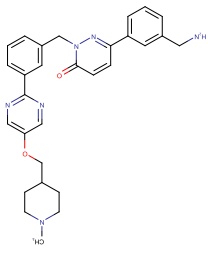
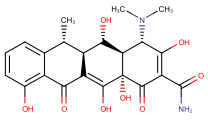
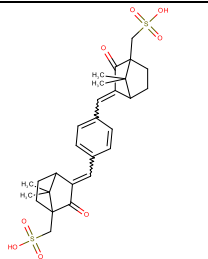
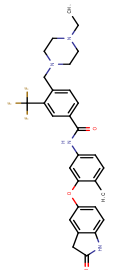
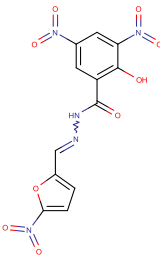
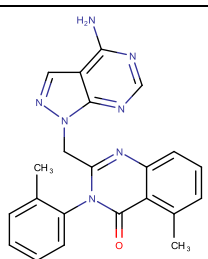
del total de la librería inicial que representa un valor más manejable en el caso que se deseen realizar pruebas *in vitro* e *in vivo*. Se escogieron aquellos con un K_{iapp} corregido $\leq 6.10 \mu\text{M}$, debido a que el límite se calculó en base a un ANPs del cual se conocía su K_i y al realizar el cálculo de la energía de Gibbs mediante el docking se obtuvo un valor de -7.4 kcal/mol . Por lo cual los ligandos que están en este rango son aquellos que tiene un mejor K_{iapp} corregido, es decir aquellos cuya energía sea igual o menor a -7.4 kcal/mol (**Tabla 2**).

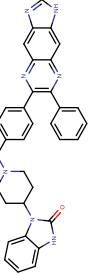
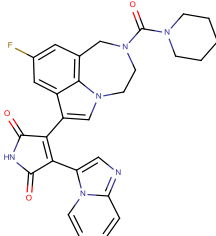
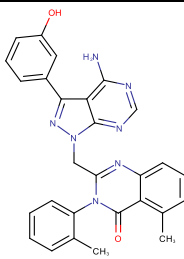
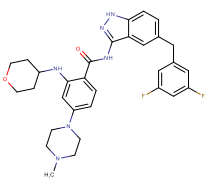
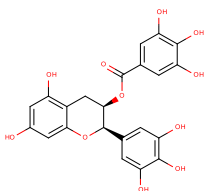
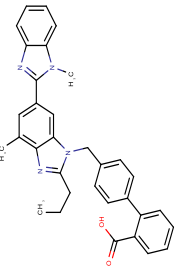
Todos los K_{iapp} corregidos calculados se basaron en una inhibición competitiva dado que se trabajó directamente en el sitio activo de la enzima y el compuesto con el cual se trabajó para corregir el K_i mostraba en su estudio una inhibición de este tipo. Como se reporta en su estudio este ANPs presenta un K_i de 6.54 nM (**Doleželová, et al., 2018**), en tanto que mediante las pruebas de docking el K_{iapp} más bajo que se obtuvo teniendo como referencia únicamente los 20 mejores resultados fue de $3.84 \mu\text{M}$, lo cual indica que estos fármacos tienen potencial para utilizarse como tratamientos para HAT. El valor de K_i tan elevado que presentan los ligandos estudiados en comparación con el ligando patrón puede deberse a varios factores. Uno de los factores más importantes es que la enzima *Tbr*HGXRT usa bases púricas preformadas para llevar a cabo la catálisis. Por lo cual entre más parecidos sean los ligandos a los sustratos que la enzima usa de manera natural (xantina, guanina e hipoxantina) tendrán un valor de K_i más bajo. Otro factor que interviene es la capacidad que presenta el ligando para formar interacciones en el sitio activo, es decir el ligando presente grupos funcionales que sean capaces de generar puentes de hidrogeno con los residuos del sitio activo. El último factor que afecta el valor de K_i es el tamaño del ligando, así los ligandos con un tamaño similar al del sitio activo no podrán encajar con facilidad y por lo tanto el K_i se incrementa. En tanto los ligandos que tengan un tamaño que les permita encajar en una posición adecuada con facilidad en el sitio activo tendrán un K_i más cercano al del patrón.

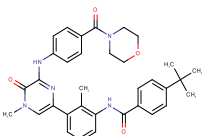
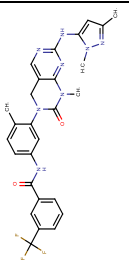
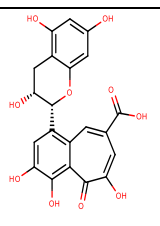
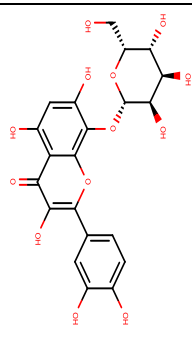
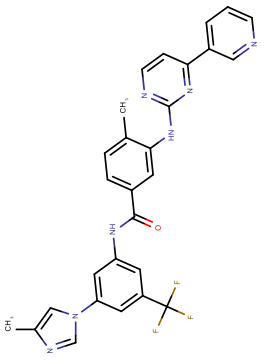
Al comparar los valores de K_i obtenidos en este estudio con los reportados por **Doleželová, et al., (2018)** para los sustratos naturales de *Tbr*HGXRT que son guanina, hipoxantina y xantina. Estos sustratos presentaron un K_m de 32 , 30.6 y $31.9 \mu\text{M}$ respectivamente (**Doleželová, et al., 2018**). Por lo que los 20 ligandos seleccionados (**Tabla 2**) son excelente competidores para los sustratos naturales de la enzima, ya que todos presentan un K_i menor a los reportados.

Tabla N° 2. Valores de K_{iapp} corregido de los mejores 20 compuestos

	Nombre	Estructura	Pm	#Corrida	Energía de unión	Ki	
						K_i (nM) \pm 0.4	k_i app (μ M)
Patrón	ANPs		441,27	0	-7.4	6.54	6.10
Error: 6.10E-06 mol							
N°	Fármaco	Estructura	PM	#Corrida	Energía de unión	K_i app (mol)	K_i app corregido (μ M)
1	PF-573228		491,49	2	-9.2	3.29064E-07	5.77
2	Diosmin		608,55	1	-9.3	2.7978E-07	5.81
3	Pictilisib (GDC-0941)		513,64	5	-8.9	5.35394E-07	5.56

4	Tepotinib (EMD 1214063)		496,62	0	-9.9	1.05689E-07	5.99
5	Doxycycline hydrochloride		444,44	0	-9.9	1.05689E-07	5.99
6	Ecamsule triethanolamine		562,69	4	-7.9	2.71217E-06	3.38
7	DDR1-IN-1		552,60	0	-9.8	1.24307E-07	5.97
8	Nifursol		365,21	2	-9.3	2.7978E-07	5.81
9	PIK-293		397,44	2	-8.6	8.71097E-07	5.23

10	Akti-1/2		551,65	4	-8.7	7.40631E-07	5.36
11	LY2090314		512,54	0	-9.7	1.46204E-07	5.95
12	PIK-294		489,54	0	-9.7	1.46204E-07	5.95
13	Entrectinib (RXDX-101)		560,65	4	-8.6	8.71097E-07	5.23
14	Epigallocatechin-3-monogallate		458,38	0	-9.7	1.46204E-07	5.95
15	Telmisartan		514,63	0	-9.6	1.71958E-07	5.93

16	CGI1746		579,70	1	-9.2	3.29064E-07	5.77
17	SC1		550,55	4	-8.6	8.71097E-07	5.23
18	Epitheafalvic acid		428.35	7	-8.2	1.667E-06	4.43
19	Gossypin		480,38	0	-9.6	1.71958E-07	5.93
20	Nilotinib (AMN-107)		529,53	2	-8.7	7.40631E-07	5.36

La figura N° 12 muestra el mapa de superficie de la enzima *Tbr*HGXPRT, en la cual se pueden observar los tres bolsillos que presenta la misma. La figura N° 13 muestra a los 20 ligandos en la posición seccionada de manera manual y como se encuentran interactuando con los diferentes bolsillos.

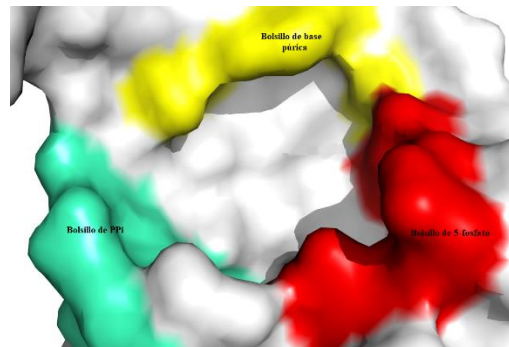
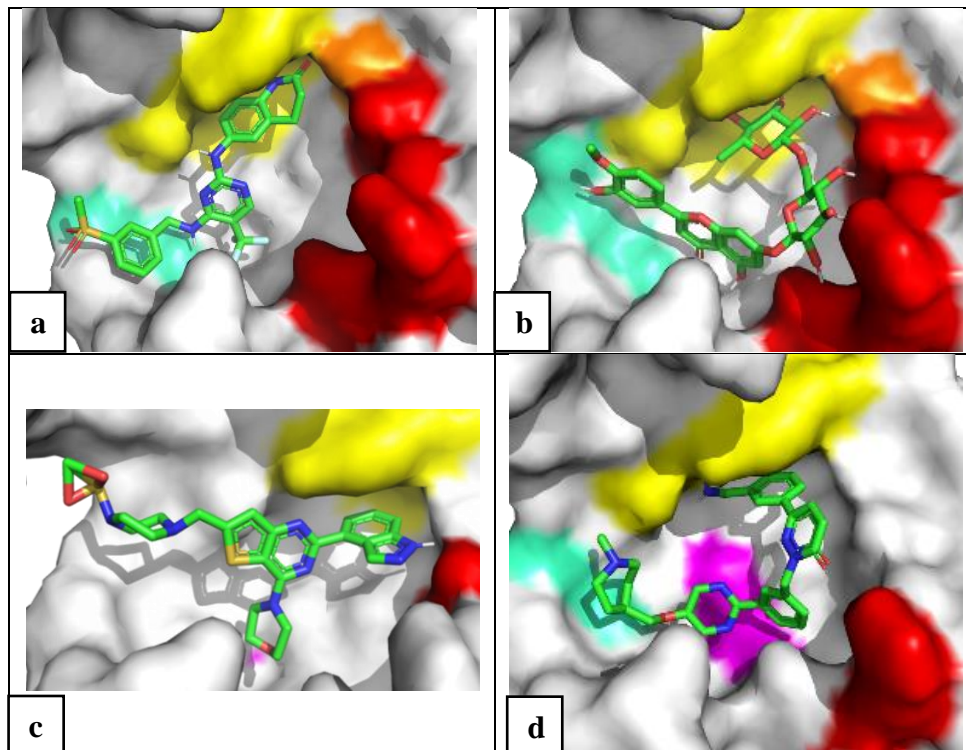
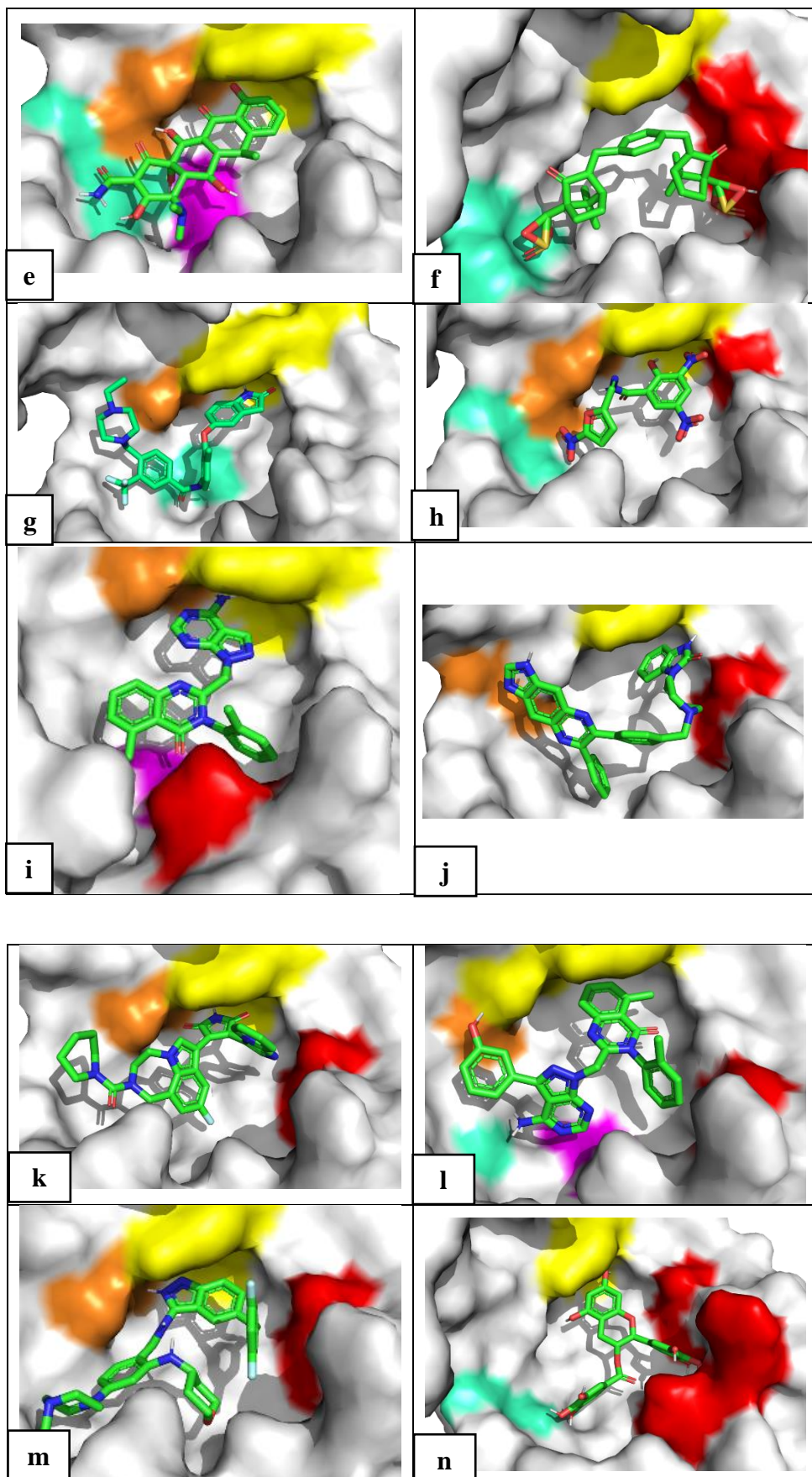


Figura N° 12. Ubicación de los tres bolsillos existentes en el sitio activo de la enzima *Tbr*HGXPR. El color amarillo representa el bolsillo de unión de la base púrica, el color rojo el bolsillo de unión del 5-fosfato y el color cian representa el bolsillo de unión del PPi.





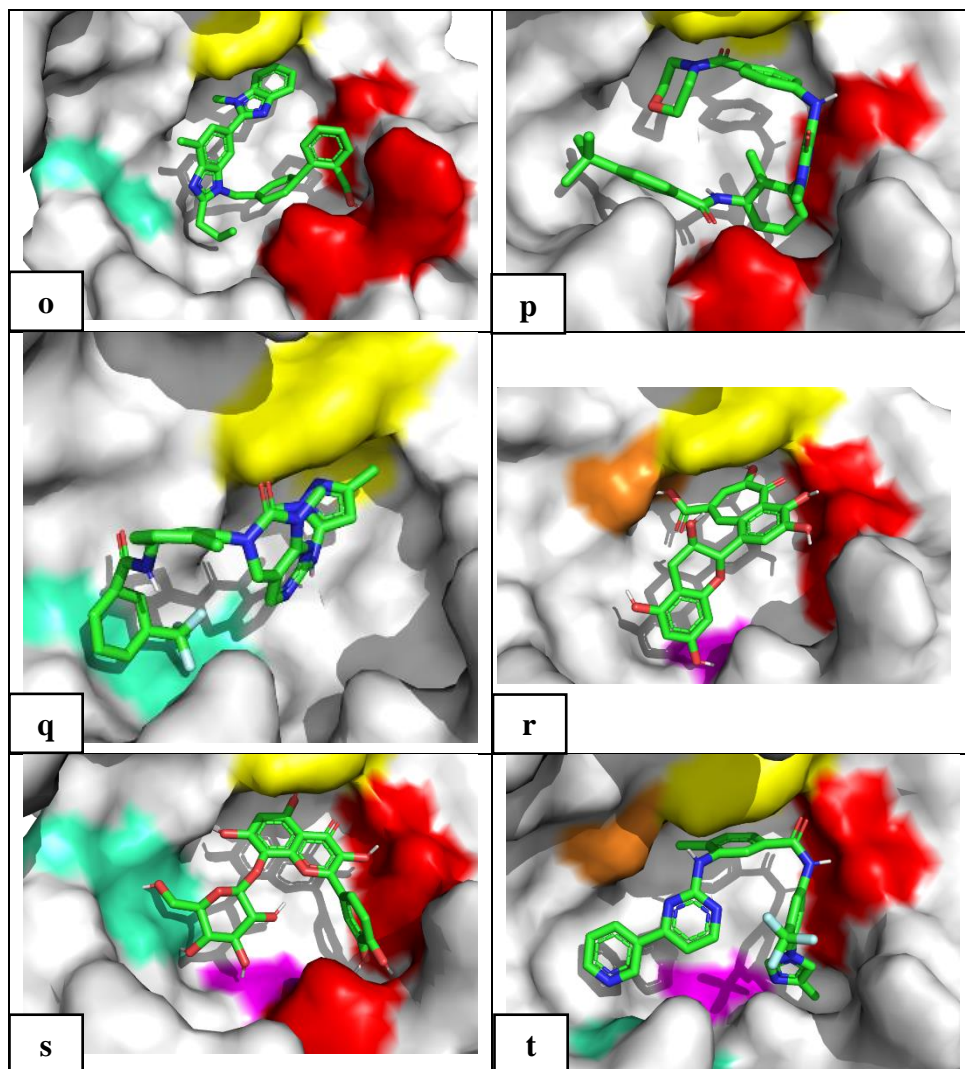


Figura N° 13. Mapa de superficie de los mejores 20 ligandos y como encajan en el sitio activo. a) PF-573228, b) Diosmin, c) Pictilisib (GDC-0941), d) Tepotinib (EMD 1214063) e) Doxycycline hydrochloride, f) Ecamsule triethanolamine, g) DDR1-IN-1, h) Nifursol, i) PIK-293,, j) Akti-1/2, k) LY2090314, l)PIK-294, m)Entrectinib (RXDX-101), n) Epigallocatechin-3-monogallate, o) Telmisartan, p) CGI1746, q) SC1, r) Epitheafalvic acid, s) Gossypin,t) Nilotinib (AMN-107).

Las figuras que muestran interacción únicamente con los tres bolsillos son 13a, 13b,13f, 13n y 13o . En tanto aquellos que tienen interacciones únicamente con dos bolsillos son 12c, 12g, 12p y 13q. Las figuras restantes (13d, 13e, 13h, 13i, 13j,13k, 13l, 13m,13n,13r, 13s y 13t) muestran interacciones con los bolsillos y también con otros residuos que no corresponden a ningún bolsillo por lo que se han representado con colores diferentes (morado y naranja).

El complejo enzima-ligando que se forma en el proceso de docking no es rígido, es decir el ligando y los residuos del sitio activo se orientan a la posición más adecuada, esta posición es aquella que sea energéticamente más favorable. Así el ligando se orienta mediante movimientos de translación y rotación, además de giros de enlaces

rotales (**García, DE Pascual, & Fernández, 2004**). Por lo que en todos los casos el acoplamiento del ligando al sitio activo de la enzima generó interacciones con los bolsillos de unión (bolsillo de base purínica, bolsillo de 5-fosfato y bolsillo de PPi) que actúan en la catálisis. Pero también se generaron interacciones por parte del ligando con otros residuos que por lo general no generan interacciones con el sustrato. Estas nuevas interacciones se deben a la ubicación de los ligandos y a los grupos funcionales que presentan, debido a que al encontrarse grupos funcionales (OH, NH, SH) capaces de formar puentes de hidrógeno a una distancia menor a 2.5 Å generan interacciones con los residuos del sitio activo. Por ende, existe una gran variedad de nuevas interacciones diferentes a las normales y también la ausencia en algunos casos de las interacciones con el bolsillo PPi y 5-fosfato. El bolsillo de unión a la base purínica es el único constante esto se debe a que en la primera parte del proceso de catálisis ingresa el cuerpo purínico y genera las interacciones con el bolsillo purínico; es decir que en todos los casos no importa cómo se ubique el ligando siempre se deben generar interacciones con dicho bolsillo (**Terán, et al., 2016**).

3.13. Análisis filogenético

3.1.3.1 Alineamiento de las secuencias proteicas de las PRTasas

Según Chothia y Lesk (1986), en las proteínas homologas existen regiones en las cuales existirá alta conservación de los residuos y otras con una baja o nula conservación de los mismo, la conservación está determinada por los cambios evolutivos propios de cada especie. Así en el alineamiento realizado se pueden observar estas regiones de alta conservación (**Figura N° 14**) siendo generalmente aquellas que se encuentran en el sitio activo o intervienen en la interacción enzima-sustrato. Estos cambios afectan a la estructura primaria de la proteína y se producen básicamente por remplazos, deleciones o inserciones cortas de residuos a la estructura base; dichas alteraciones afectan a la estructura tridimensional y de orden superior de la proteína; como se ve afectada la estructura depende del lugar del cambio y del tipo de residuo (**Matthews, 1995**). Según estudios cuando ocurre una sustitución de residuos, generalmente no se ve afectada la funcionalidad ni estabilidad de la proteína. Debido a que estos residuos sustituidos son del mismo tipo o son capaces de realizar la misma interacción con el sustrato que el residuo inicial (**Ardel, Eloffson, & Illergård, 2009**).

Los anteriormente mencionado se observa en el residuo más importante del sitio activo mostrado en el secueamiento con color amarillo y también en el residuo adyacente representado del mismo color. El residuo más importante del sitio activo puede ser Y, W o F, teniendo como única excepción la V de la enzima XPRT de *B. subtilis*. Estos aminoácidos (Y,W y F) pertenecen a los aminoácidos aromáticos, por lo que todos son capaces de formar puentes de hidrogeno e interactuar con grupos cargados positivamente (Stuer-Lauridsen & Nygaard, 1998).

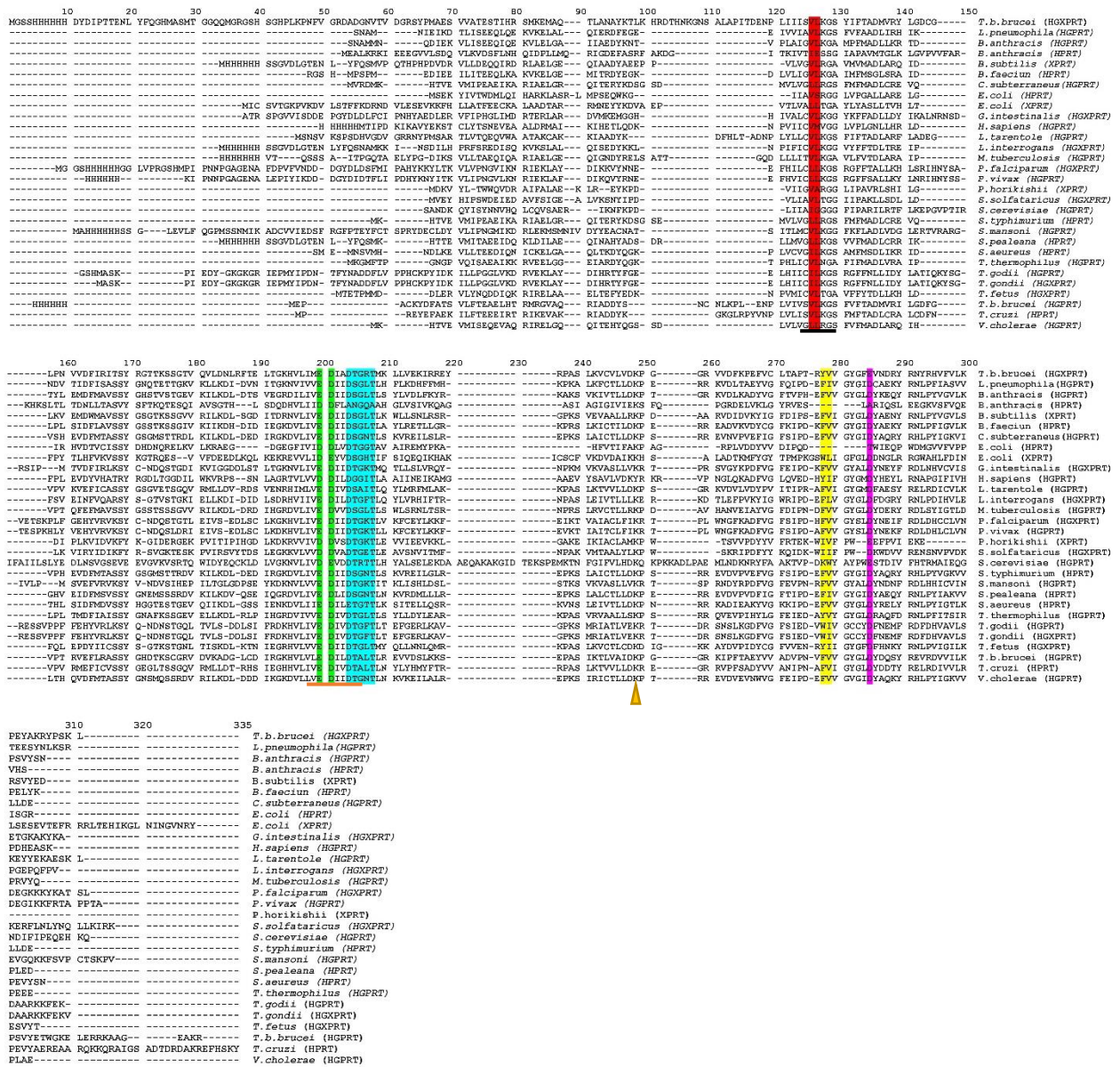


Figura N° 14. Alineamiento de las secuencias proteicas de las enzimas de la familia de las PRTasas. El residuo más importante y de mayor interés está señalado con color amarillo. El color rojo, verde y morado representa los residuos altamente conservados. Los residuos señalados en color celeste representan la sección más conservada. la línea negra y la línea naranja indica la sección de residuos que presentan variaciones importantes y que se han estudiado en las secuencias alineadas. El triángulo naranja representa en residuo conservado de interés.

La funcionalidad básica del residuo más importante del sitio activo es generar el apilamiento o “stacking” y formar una interacción del tipo π - π . El apilamiento se refiere al acomodamiento generalmente de moléculas aromáticas en pila (**Giese, et al., 2012**); debido a interacciones interatómicas (**Matta & Hernández-Trujillo, 2003**). Todas las posibles variaciones del residuo de interés del sitio activo son capaces de generar el apilamiento. Debido, a que todos los residuos tienen moléculas aromáticas y el sustrato natural de la enzima también tiene grupos aromáticos.

B. subtilis como se mencionó anteriormente presenta una valina en el sitio activo, por lo que no es capaz de realizar una interacción por apilamiento. La excepción del residuo del sitio activo que presenta *B. subtilis* se debe a que las XPRTs son más lejanas a las secuencias de las 6-oxo-purinas y se relacionan más con las APRTs (**Shi, et al., 1999**). Lo anterior mencionado también explica por qué este organismo y otros que presentan la enzima XPRT como *E. coli* y *P. horikishii* presenta dos residuos de aspartato (**Figura 22**) de manera consecutiva en tanto que la mayoría de los organismos presentan un residuo de glutamato seguido de un aspartato (**Arent, Kadziola, Larsen, Neuhard, & Jensen, 2006**).

El RMSD en filogenética describe la relación que existe entre el alineamiento de secuencias y como se encuentra ubicada estructuralmente (tridimensionalmente) en base a una estructura proteica guía (en este caso HGXPRT de *T. brucei*), el valor de este parámetro mientras más cercano sea a cero indica que la secuencia y la estructura tridimensional no presentan diferencias significativas. Mientras más se aleje este valor de 0 las secuencias y estructuras comparadas son diferentes, el factor más importante que influye en el cálculo del RMDS es la longitud de las secuencias que se están alineando, por lo que si se analizan secuencias que tengan un número de residuos demasiado distante entre sí, aumentaran el RMDS (**Guddat, Vos, Martin, Keough, & Jersey, 2002**).

Lo anterior mencionado explica los valores de RMDS tan elevados al usar como secuencia base la *Tbr*HGXPRT (misma que posee 234 residuos), que presentan las XPRT de *B. subtilis* y *E. coli* (**Tabla N.º 3**), debido a que ambas cuentan con una secuencia de 186 residuos siendo estas dos las secuencias más cortas. También el resto de valores de RMDS denotan que las demás secuencias presentan longitudes cercanas a *Tbr*HGXPRT. La variación del RMDS entonces depende directamente de la secuencia base, se determinaron los RMDS de todos tomando como base a cada una de las diferentes

secuencias (**Anexo 1**), los resultados obtenidos fueron contantes, es decir los RMSD más altos siempre fueron los relacionados con *B. subtilis* y *E. coli*.

Tabla N° 3. RMSD de los organismos analizados tomando como referencia *T. brucei* (HGXPRT)

<i>T. brucei</i> (HGXPRT)			
Organismo	RMSD	#Residuos alineados	Enzima
<i>B. anthracis</i>	0.843	121-121	HGPRT
<i>C. subterraneus</i>	0.813	133-133	HGPRT
<i>H. sapiens</i>	1.281	97-97	HGPRT
<i>L. pneumophila</i>	0.940	116-116	HGPRT
<i>L. tarentolae</i>	0.858	154-154	HGPRT
<i>M. tuberculosis</i>	0.724	130-130	HGPRT
<i>P. vivax</i>	0.917	95-95	HGPRT
<i>S. cerevisiae</i>	1.319	89-89	HGPRT
<i>S. mansoni</i>	0.972	127-127	HGPRT
<i>T. thermophilus</i>	0.820	141-141	HGPRT
<i>T. gondii</i>	1.081	94-94	HGPRT
<i>T. brucei</i>	0.847	147-147	HGPRT
<i>V. cholerae</i>	0.867	128-128	HGPRT
<i>L. interrogans</i>	0.960	119-119	HGXPRT
<i>P. falciparum</i>	0.988	121-121	HGXPRT
<i>S. solfataricus</i>	2.875	69-69	HGXPRT
<i>T. gondii</i>	1.125	102-102	HGXPRT
<i>T. foetus</i>	0.683	123-123	HGXPRT
<i>G. intestinalis</i>	1.770	93-93	HGXPRT
<i>B. anthracis</i>	0.827	124-124	HPRT
<i>B. faecium</i>	0.888	136-136	HPRT
<i>E. coli</i>	0.715	124-124	HPRT
<i>S. typhimurium</i>	0.747	120-120	HPRT
<i>S. pealeana</i>	0.914	109-109	HPRT
<i>S. aureus</i>	0.928	115-115	HPRT
<i>T. cruzi</i>	0.775	140-140	HPRT
<i>B. subtilis</i>	9.354	117-117	XPRT
<i>E. coli</i>	17.814	75-75	XPRT
<i>P. horikoshii</i>	1.643	68-68	XPRT

3.1.3.2 Árboles filogenéticos

Se considero para este análisis solo las 6-oxopurinas PRTasas que presentan una estructura publicada en el PDB, ya que este análisis filogenético fue enlazado a un análisis estructural.

El árbol filogenético muestra cómo ha cambiado las secuencias proteicas de las enzimas pertenecientes a la familia de las 6-oxopurina PRTasas (XPRT, HGPRT y HGXPRT); en diversos organismos. Existen cuatro grandes grupos; el primero y más grande conformado por *B. anthracis* (HPRT), *C. subterraneus* (HGPRT), *S. aureus* (HPRT), *B. faeciu* (HPRT), *M. tuberculosis* (HGPRT), *S. pealeana* (HPRT), *V. cholerae* (HGPRT), *S. typhimurium* (HPRT) y *E. coli* (HPRT), el segundo grupo está formado por *H. sapiens* (HGPRT), *S. mansoni* (HPRT), *T. gondii* (HGPRT y HGXPRT), *P. vivax* (HGPRT) y *P. falciparum* (HGXPRT), el tercer grupo tiene a *T. brucei* (HGXPRT y HGPRT), *L. tarentolae* (HGPRT) y *T. cruzi* (HPRT) y el último grupo de gran tamaño está formado por *E. coli* (XPRT), *S. cerevisiae* (HGPRT), *S. solfataricus* (HGXPRT) y *L. pneumophila* (HGPRT). Los organismos restantes *T. thermophilus* (HGPRT) y *T. foetus* (HGXPRT) no se encuentran formando un grupo específico, pero se relacionan con los grupos de mayor tamaño de manera posterior lo que nos indica que presentan un ancestro común con los grupos más grandes (**Figuras N° 15 y 16**).

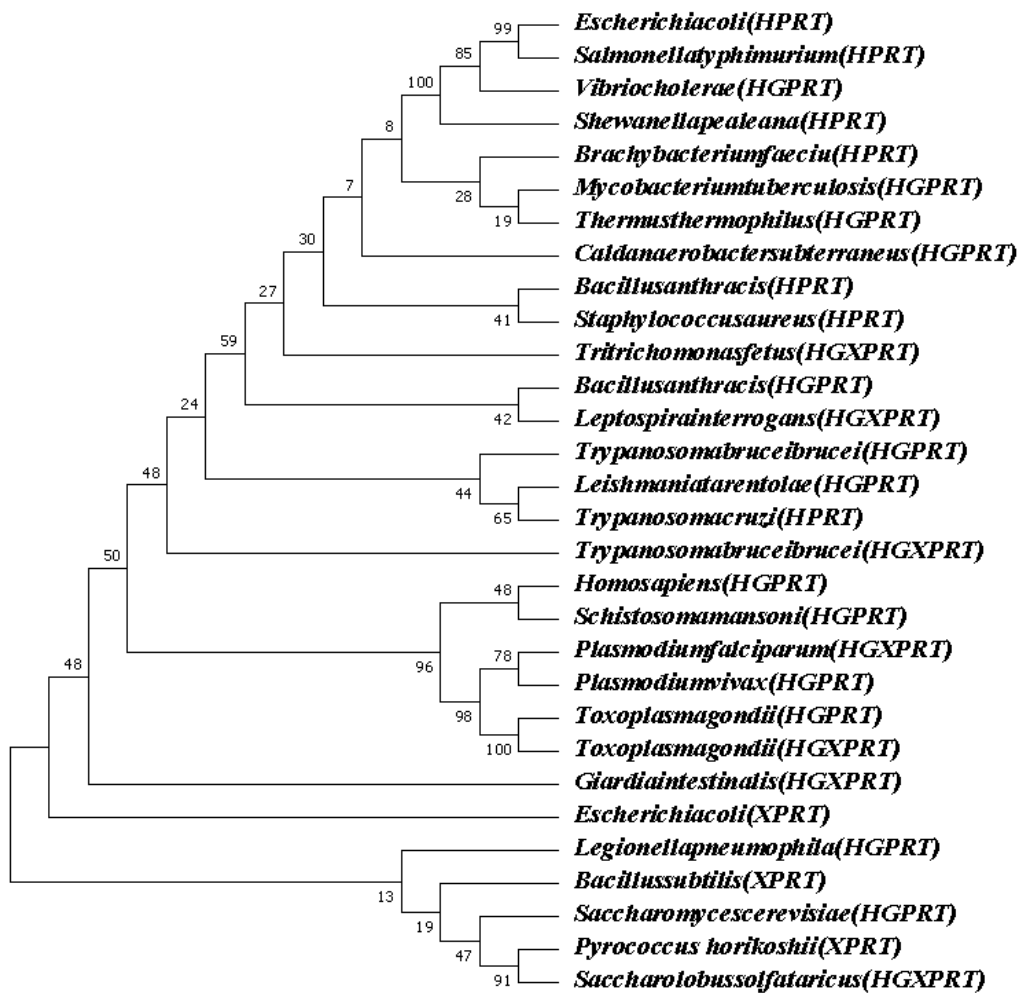


Figura N° 15. Árbol filogenético general de las enzimas 6-oxopurina PRTasas

Se observa cómo *B. subtilis* (XPRT) es el organismo que se encuentra más alejado filogenéticamente de los demás; por lo que se considera como el organismo más antiguo de todos los analizados (**Figuras N° 15 y 16**). Se debe mencionar que solo se está analizando una secuencia proteica de una única familia de enzimas por lo que los genes involucrados en la producción de la misma reflejan la relación evolutiva de dicha enzima y o una relación de parentesco entre los organismos (**Sinha, et al., 2003**).

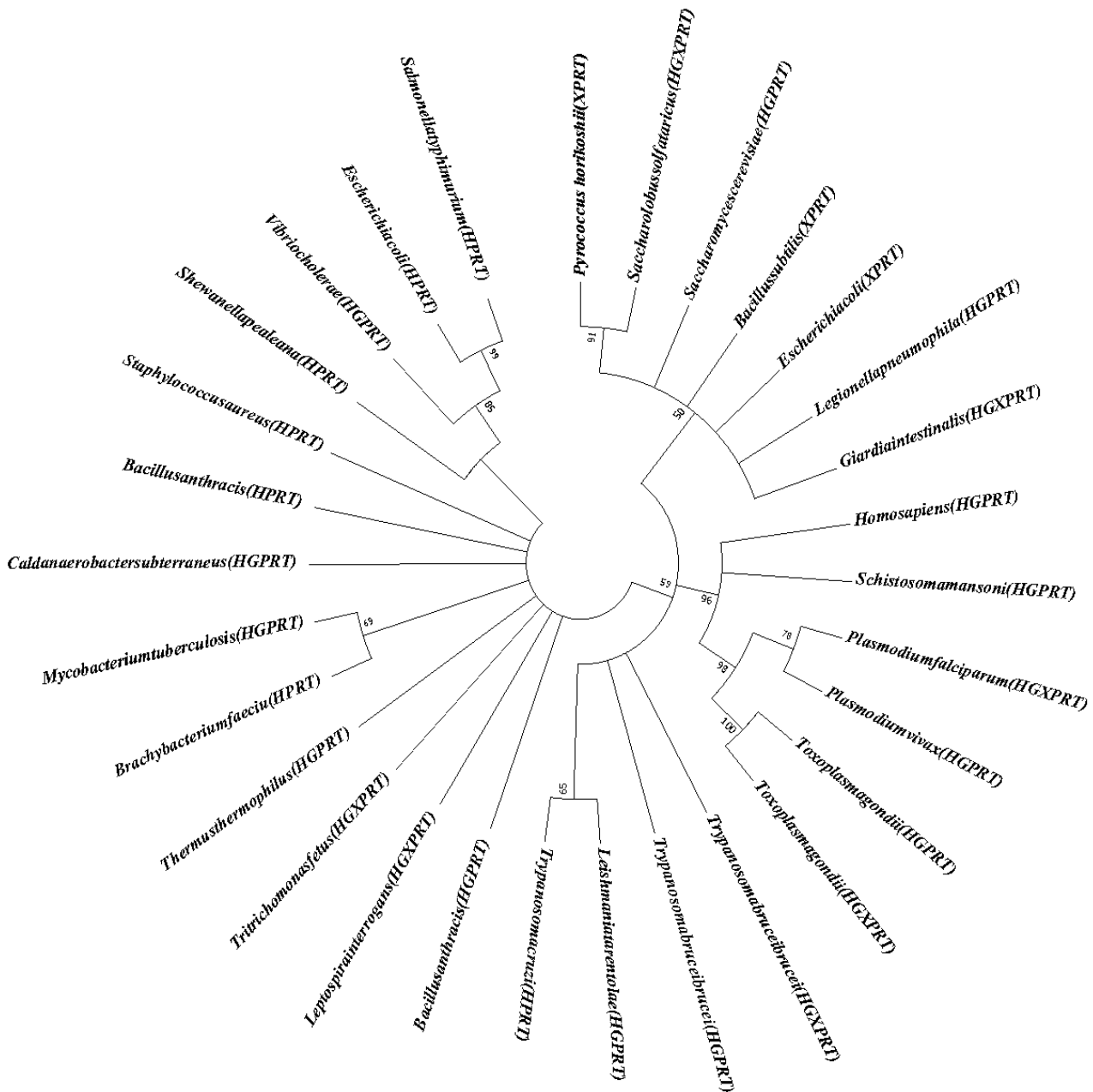


Figura N° 16. Árbol filogenético circular de las enzimas 6-oxopurinas PRTasas

En el caso de las enzimas *BsXPRT* (enzima XPRT de *B. subtilis*), *EcXPRT* (enzima XPRT de *E.coli*) y *PhXPRT* (enzima XPRT de *P. horikoshii*) son codificadas por el gen *xpt*, este gen similar en todos aquellos organismos que lo poseen. Las variaciones que este presenta en contraste con los genes *hpt*, confieren la alta especificidad que presenta esta enzima por su sustrato (Christiansen, Schou, Nygaard, & Saxild, 1997). Dichas variaciones se ven relegadas en la secuencia proteica (Figuras N.º 17,18,19,20 y 21) que presentan cambios en residuos conservados y de importancia del sitio activo en comparación con los organismos que poseen enzimas HPRT, HGXPRT y HGPRT codificadas por los genes *hpt*.

En el caso de *EcXPRT* y *PhXPRT*, la especificidad que presentan por el sustrato disminuye, por lo que son capaces de usar otros sustratos como guanina e hipoxantina aunque con menor medida (Vos, De Jersey, & Martin, 1997); esta alteración en la especificidad por el sustrato se debe principalmente a que estos presentan en su sitio activo un residuo de triptófano (Figura N.º 17), que facilita la captación de diversos sustratos debido a que forma interacciones más fácilmente.

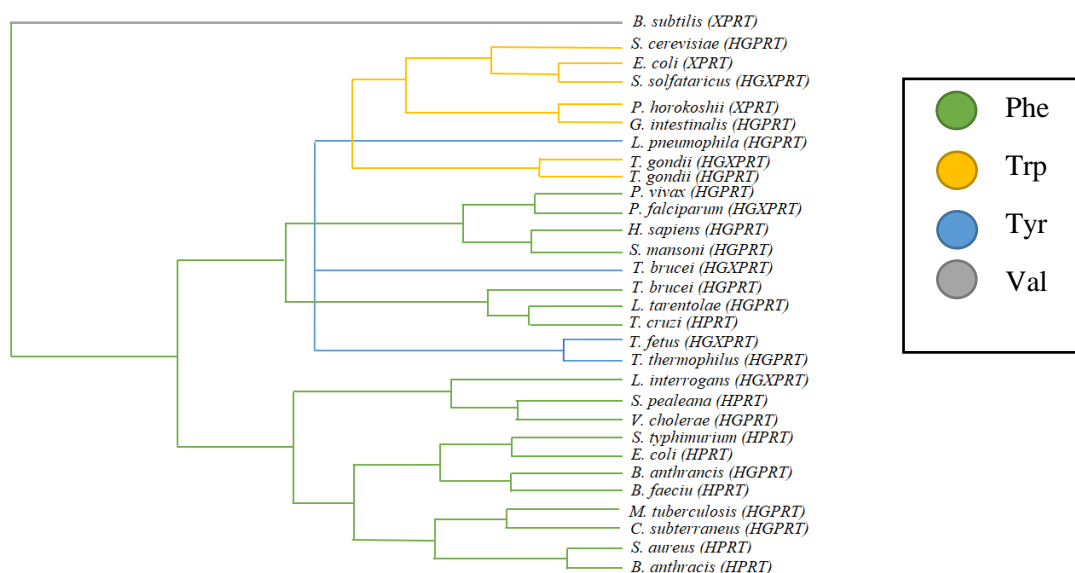


Figura N.º 17. Árbol de relaciones basado en el residuo del sitio activo de las 6-oxopurinas PRTasas

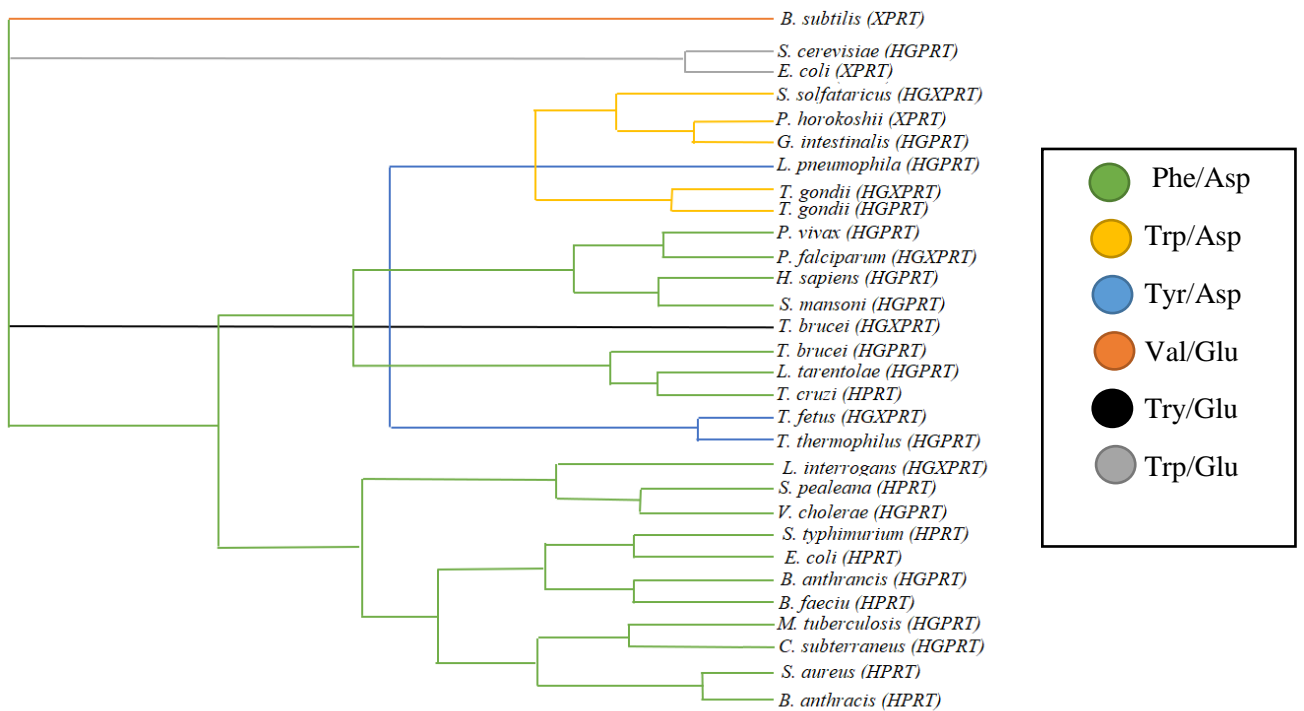


Figura N° 18. Árbol de relación del residuo de interés del sitio activo y el residuo de alado.

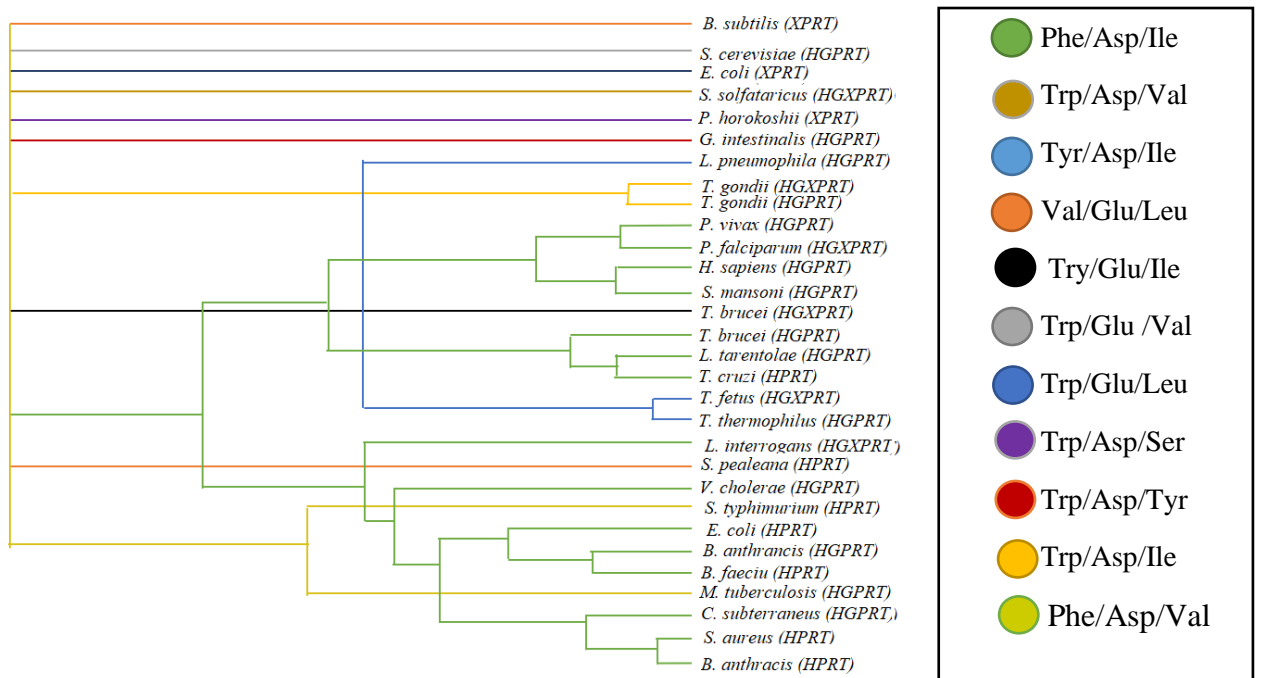


Figura N° 19. Árbol de relación de los residuos que forman el bolsillo de purina de las PRTasas.

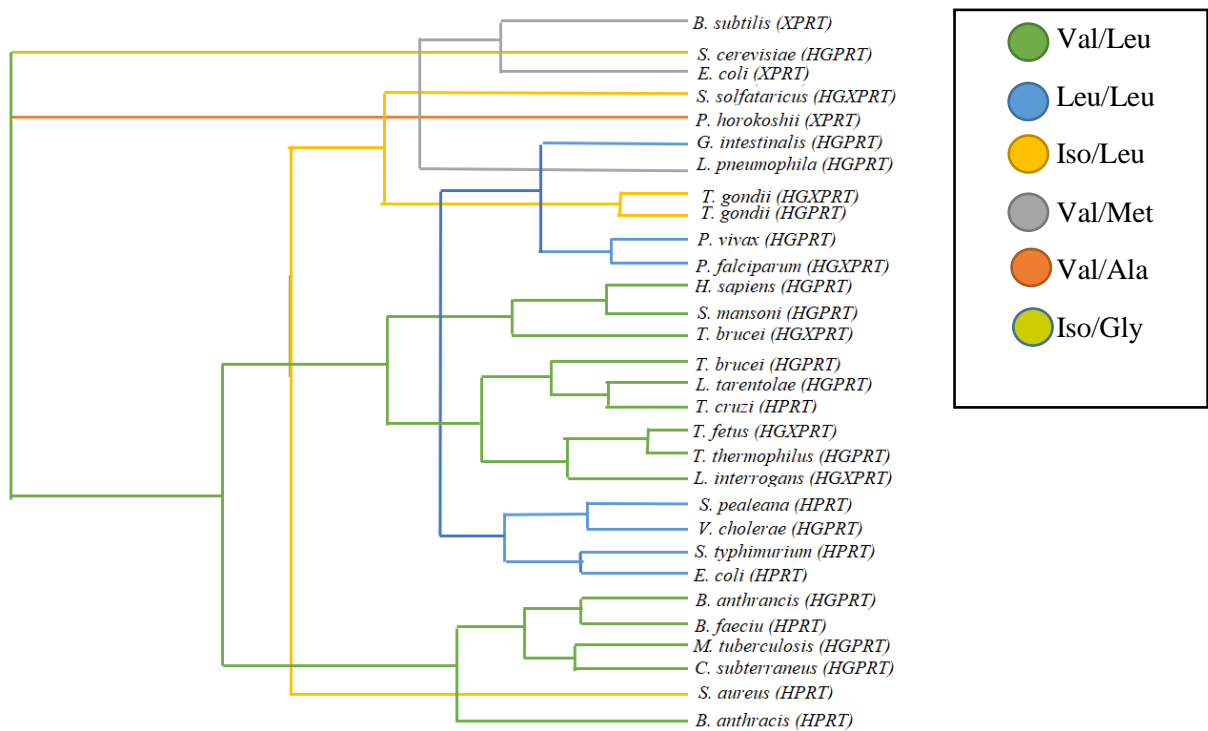


Figura N° 20 Árbol de relación los residuos más conservados y de importancia en *T. brucei* (85V/86L)

EcHPRT (enzima HPRT de *E.coli*) esta pobremente conservada si se compara con las XRPTs ya que tan solo el 23% de su secuencia de aminoácidos es idéntica a *EcXPRT* (Guddat, Vos, Martin, Keough, & Jersey, 2002). Pero al ser comparada con las pertenecientes a las HPRTasas (véase Tabla N.º 5), todas presentan residuos conservados E/D que se aprecian en el alineamiento filogenético resaltados de color verde, también se observa (Figura N° 21) como están relacionadas con HGPRTs y HGXPRTs. La función de estos residuos conservados es interactuar con iones metálicos (generalmente Mg^{2+}), para que ocurra la catálisis., esta interacción ayuda a estabilizar la enzima antes de la reacción catalítica (Héroux, White, Ross, Kuzin, & Borhani, 2000). En las estructuras analizadas (Figura 21) que presentaban en su archivo pdb la interacción enzima-ligando presentaron iones de Mg^{2+} , lo que indica que todas estas enzimas necesitan del ion metálico para estabilizar la estructura enzimática.

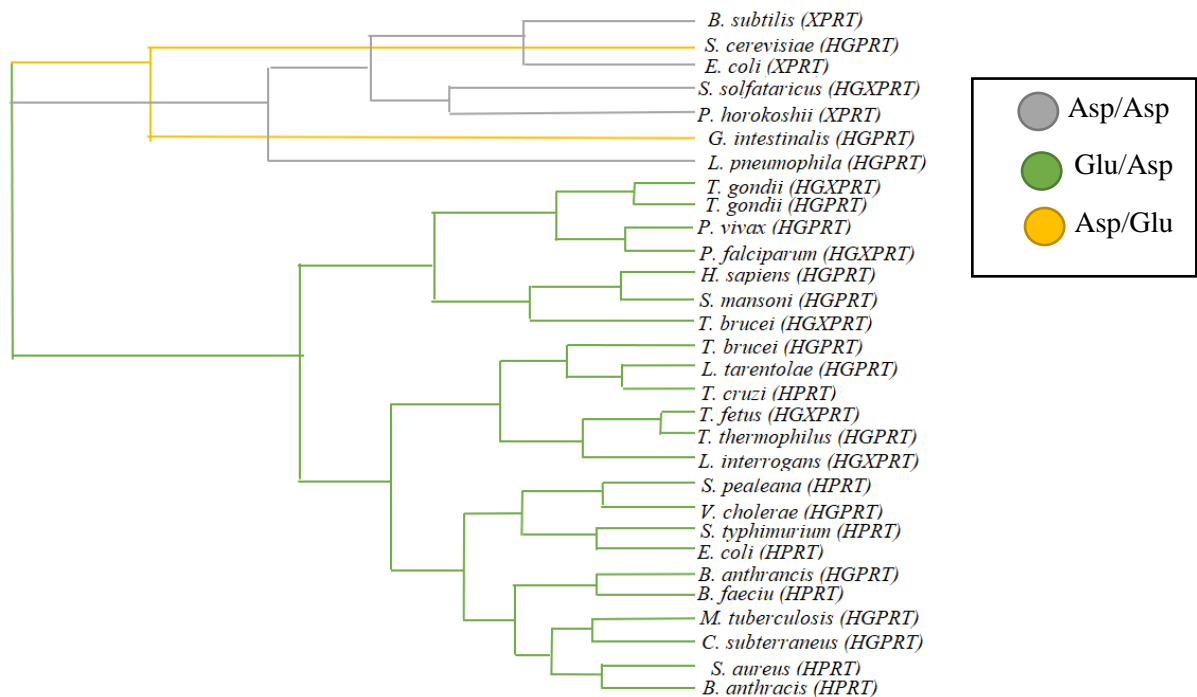


Figura N° 21. Árbol de relación de residuos altamente conservados y de importancia *T. brucei* (147E/148E)

Los residuos conservados resaltados de color rojo en el alineamiento filogenético para *TcHPRT* (enzima HPRT de *T. cruzi*), son V/L (**Figura N.º 20**), el residuo más importante es el segundo debido a que el mismo se encarga de estabilizar las interacciones formadas por el residuo adyacente generalmente K con el grupo fosfato (**Canyuk, Focia, & Ann, 2001**). La L está presente en 24 de los 30 organismos analizados, lo que indica que este residuo se ha conservado en la mayoría de las PRTasas. Por ende, la función que realiza en estos organismos es igual a la realizada en *TcHPRT*. Los organismos restantes pueden presentar A, G o M en lugar de L (**Figura N° 20**), la variación de esto residuos no tiene gran impacto y siguen cumpliendo la misma función que el residuo más conservado (L), debido a que todos pertenecen a los aminoácidos apolares y difieren únicamente en el número de carbonos que conforman su cadena latera y en ciertos grupos funcionales como es el caso de la metionina que contiene el grupo tio. Las mutaciones de este residuo y el adyacente generan incrementos o decrementos en la constante de Michaelis Menten, esta variación depende del residuo con el que se sustituya en estudios realizados en los que se reemplazó la L por K mostraron un incremento de la constante de Michaels Menten, en tanto que la misma se redujo cuando se reemplazó la L por W este se realizó en *T/HXGPRT* (enzima HGXPRT de *T.foetus*) (**Canyuk, et al., 2003**)

Alrededor del 30% de la secuencia de *Tf*HXPRT es similar a *Hs*HGPRT (enzima HGPRT de *H.sapiens*), la principal diferencia entre ambas es que *Tf*HXPRT puede usar xantina como sustrato en tanto que *Hs*HGPRT no usa xantina como sustrato (**Somoza,, Chin, Focia, Wang, & Fletterick, 1996**). Esta diferencia en la especificidad por el sustrato se debe según **Hazleton, Ho, Cassera, Clinch & Crump (2012)**, a la estructura terciaria de estas enzimas (**Figura 21**), dado que la estructura de *Tf*HXPRT es más compacta que la *Hs*HGPRT permitiendo interacciones de otros residuos con los sustratos.

*Tg*HXPRT (enzima HXPRT de *T.gondii*), *Tf*HXPRT, *Pf*HGRT (enzima HGPRT de *T.falciparum*) y *Tbr*HXPRT son capaces de usar xantina de manera eficiente, las dos primeras tienen en su sitio activo W, mientras que *Pf*HGRT presenta un residuo de P y *Tbr*HXPRT tiene Y; lo cual indica que la presencia de estos residuos no es crítica en el uso de xantina como sustrato (**Schumacher, Darrick, Roos, Ullman, & Brennan, 1996**). El uso de xantina entonces está condicionado por otros residuos que se encuentran adyacente a la sección conservada resaltada en color rojo en el alineamiento (**Figura N° 14**), esta sección se denomina loop I, el mismo que es flexible y es de gran importancia en la unión del pirofosfato (**Schumacher, Darrick, Roos, Ullman, & Brennan, 1996**). Como se visualiza en el alineamiento los dos residuos ubicados a la izquierda de este sitio conservado mencionado anteriormente en todos los casos se trata de I/C a excepción de *Tbr*HXPRT en el cual presenta I/C, este cambio en uno de los residuos no genera gran diferencia en su funcionalidad ya que la cisteína al igual que la serina son aminoácidos polares con la capacidad de formar puentes de hidrógeno en el caso de la serina y puentes disulfuro en el caso de la cisteína.

*Ss*HGRT (enzima HXPRT de *S.solfataricus*) no presenta actividad catalítica para la xantina, esta prefiere usar como sustrato a la hipoxantina; la especificidad para las bases 6-oxopurinas se debe a que se generan interacciones entre el grupo 6-oxo con un residuo de lisina conservado. En *Ss*HGRT se trata de la K133 (**Chen, et al., 2005**), en el alineamiento este residuo se encuentra marcado con un triángulo en la parte inferior. A pesar de que según **Chen, Liang, Su, Gu, Zheng & Lou (2005)** indican que este residuo es el responsable de la especificidad del sustrato como se observa en el alineamiento y específicamente para este residuo (K) no existe algún residuo diferente al mismo; por lo que la especificidad debe estar dada por un conjunto de residuos cercanos, mismos que si presentan variaciones.

*Tt*HGPRT (enzima HGPRT de *T.thermophilus*), esta enzima presenta una característica especial y es su capacidad para seguir trabajando a temperaturas elevadas, esta capacidad se debe a varios factores como su composición de aminoácidos, su hidrofobicidad general, puentes salinos, enlaces de hidrogeno y su estructura compacta (**Figura 22**), esta enzima presenta una gran cantidad de residuos cargados y puentes salinos en relación a su longitud y a enzimas homologas de similares como *Pf*HGPRT (**Kanagawa, et al., 2010**).

Tabla N° 4. Resumen de los residuos de interés y sus posiciones.

Organismo	#Residuo (SA)	#Residuo/ Alado	#Residuo/ Cont.	#Residuo/ Abajo	#Residuo/ Import	#Residuo/ Imp.Cont	Conformación	Enzima
<i>B. anthracis</i>	151/ PHE	158/ASP	157/ILE	100/ILE	40/VAL 98/GLU	41/LEU 99/ASP	Tetramero	HGPRT
<i>C. subterraneus</i>	154/ PHE	161/ASP	160/LEU	103/ILE	43/VAL 101/GLU	44/LEU 102/ASP	Dímero	HGPRT
<i>H. sapiens</i>	186/ PHE	193/ASP	192/LEU	135/ILE	66/VAL 133/GLU	67/LEU 134/ASP	Tetramero	HGPRT
<i>L. pneumophila</i>	160/ TYR	167/ASP	166/MET	107/ILE	48/VAL 105/ASP	49/MET 106/ASP	Dímero	HGPRT
<i>L. tarentolae</i>	178/ PHE	185/ASP	184/MET	127/ILE	64/VAL 125/GLU	65/LEU 126/ASP	Dímero	HGPRT
<i>M. tuberculosis</i>	175/ PHE	182/ASP	181/LEU	124/VAL	64/VAL 122/GLU	65/LEU 123/ASP	Tetramero	HGPRT
<i>P. vivax</i>	197/ PHE	ASP/204	203/LEU	146/ILE	75/LEU 144/GLU	76/LEU 145/ASP	Tetramero	HGPRT
<i>S. Cerevisiae</i>	188/ TRP	194/GLU	193/TRP	112/VAL	36/ISO 110/ASP	37/GLY 111/GLU	Tetramero	HGPRT
<i>S. mansoni</i>	193/ PHE	200/ASP	199/LEU	142/ILE	73/VAL 140/GLU	74/LEU 141/ASP	Tetramero	HGPRT
<i>T. thermophilus</i>	155/ TRY	162/ASP	161/LEU	104/ILE	44/VAL 102/GLU	45/LEU 103/ASP	Monómero	HGPRT
<i>T. gondii</i>	199/ TRP	206/ASP	205/TYR	148/ILE	77/ISO 146/GLU	78/LEU 147/ASP	Tetramero	HGPRT
<i>T. brucei</i>	166/ PHE	173/ASP	172/LEU	115/ILE	52/VAL 113/GLU	53/LEU 114/ASP	Tetramero	HGPRT
<i>V. cholerae</i>	151/ PHE	158/ASP	157/ISO	100/ILE	40/LEU 98/GLU	41/LEU 99/ASP	Tetramero	HGPRT
<i>L. interrogans</i>	153/ PHE	160/ASP	159/LEU	102/ILE	43/VAL 100/GLU	44/LEU 101/ASP	Dímero	HGXPRT

<i>P. falciparum</i>	197/ PHE	204/ASP	203/LEU	146/ILE	75/LEU 144/GLU	76/LEU 145/ASP	Tetrámero	HGXPRT
<i>S. solfataricus</i>	142/ TRP	151/ASP	150/TRP	95/VAL	36/VAL 93/ASP	37/LEU 94/ASP	Dímero	HGXPRT
<i>T. gondii</i>	199/ TRP	206/ASP	205/TYR	148/ILE	77/ISO 146/GLU	78/LEU 147/ASP	Tetrámero	HGXPRT
<i>T. foetus</i>	156/ TYR	163/ASP	164/PHE	104/ILE	45/VAL 102/GLU	46/LEU 103/ASP	Dímero	HGXPRT
<i>T. brucei</i>	201/ TYR	208/GLU	207/PHE	149/ILE	85/VAL 147/GLU	86/LEU 148/ASP	Hexámero	HGXPRT
<i>G. intestinalis</i>	180/ TRP	187/ASP	186/LEU	127/TYR	68/LEU 125/ASP	69/LEU 126/GLU	Dímero	HGXPRT
<i>B. anthracis</i>	152/ PHE	159/ASP	158/LEU	101/ILE	41/VAL 99/GLU	42/LEU 100/ASP	Dímero	HPRT
<i>B. faecium</i>	179/ PHE	186/ASP	185/LEU	128/ILE	68/VAL 126/GLU	69/LEU 127/ASP	Octámero	HPRT
<i>E. coli</i>	156/ PHE	163/ASP	162/ISO	105/ILE	45/LEU 103/GLU	46/LEU 104/ASP	Dímero	HPRT
<i>S. typhimurium</i>	152/ PHE	159/ASP	158/ISO	92/VAL	41/LEU 99/GLU	42/LEU 100/ASP	Dímero	HPRT
<i>S. pealeana</i>	151/ PHE	158/ASP	157/ISO	100/LEU	40/LEU 98/GLU	41/LEU 99/ASP	Tetrámero	HPRT
<i>S. aureus</i>	157/ PHE	164/ASP	163/LEU	106/ILE	46/ISO 104/GLU	47/LEU 105/ASP	Monómero	HPRT
<i>T. cruzi</i>	164/ PHE	171/ASP	170/LEU	113/ILE	50/VAL 111/GLU	51/LEU 112/ASP	Tetrámero	HPRT
<i>B. subtilis</i>	126/ VAL	173/GLU	172/VAL	127/LEU	66/VAL 124/ASP	67/MET 125/ASP	Dímero	XPRT
<i>E. coli</i>	136/ TRP	173/GLU	172/VAL	127/LEU	66/VAL 124/ASP	67/MET 125/ASP	Dímero	XPRT
<i>P. horikoshii</i>	139/ TRP	130/ASP	129/PRO	93/SER	33/VAL 90/ASP	34/ALA 91/ASP	Dodecámero	XPRT

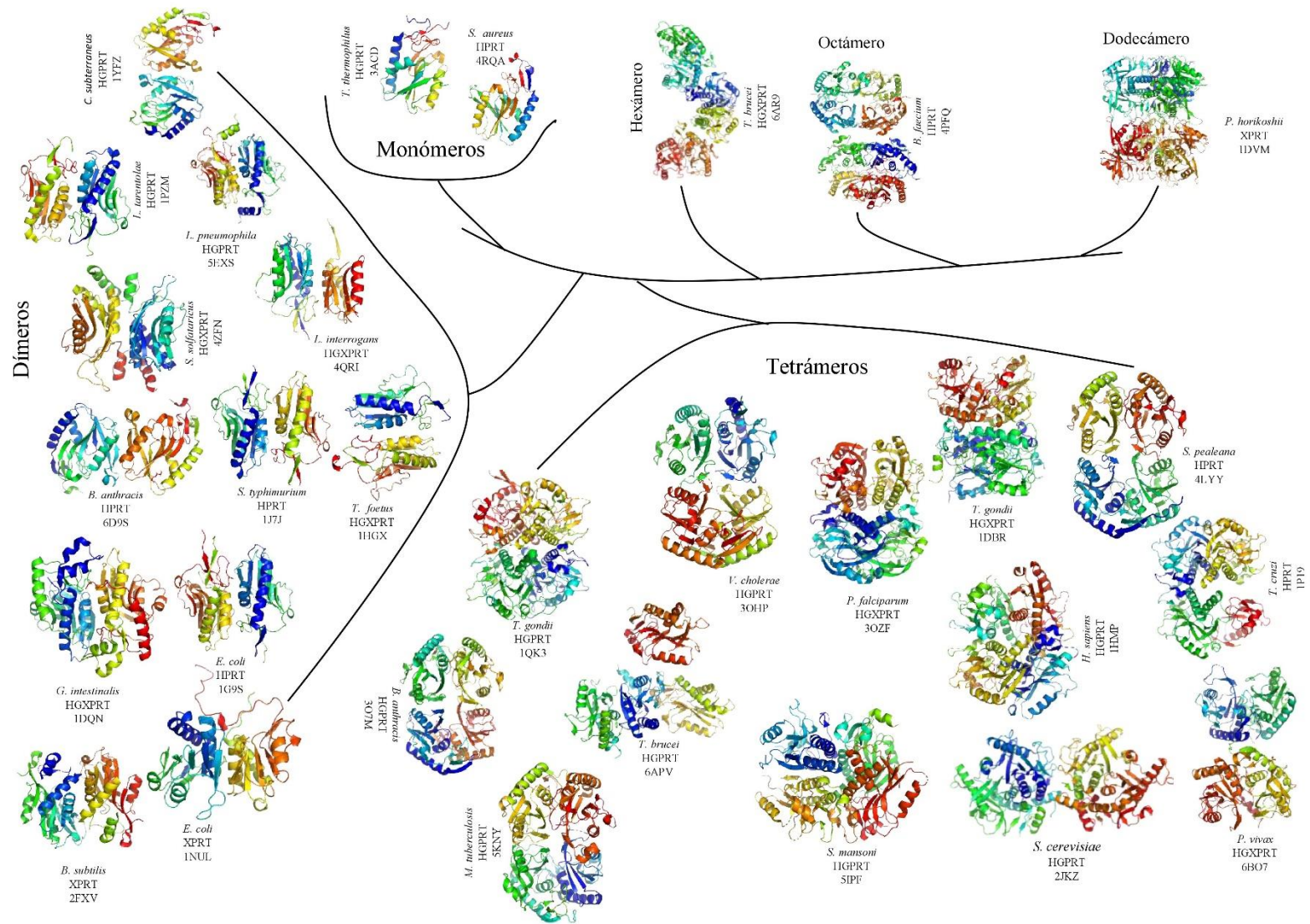


Figura 22. Árbol de estructuras basado en el número de subunidades que presenta cada una de las PRTS.

La figura N° 22 y la tabla N° 5 muestra la conformación estructural de las PRTasas de los organismos analizados, aquí podemos ver que el grupo más grande es aquel que presenta a tetrámeros, en este grupo se encuentra el 40% del total de estructuras analizadas; además como se aprecia sus estructuras tienden a ser similares entre varias de las mismas. El 37% de las estructuras se trató de dímeros, y en estos se encuentran aquellas estructuras pertenecientes a los organismos más alejados filogenéticamente, además su forma estructural es muy similar en todos los casos. Un 6,67% está representado por estructuras monoméricas (**Figura 21**) por lo que se podría decir que son las más sencillas, pero esto no es correcto debido a que pueden llegar a ser muy complejas como le caso de *T. thermophilus* que puede actuar a temperaturas elevadas, uno de los factores esta enzima es compacta en comparación a otras similares.

El restante está formado por tres estructuras aisladas que representan 3,33% cada una; estas estructuras son un hexámero de *T. brucei* (HGXPRT), un octámero de *B. faeciu* (HPRT) y un dodecámero de *P. horikoshii* en este ultimo caso no se tiene la seguridad de que sea un dodecamero ya que en el proceso de formacion del cristal este puedo quedar pegado a otro por lo que en la difraccion de rayos x, se genera lo que se conoce como Twins que no es más que un cristal gemelo que duplica el número real de subunidades de la enzima.

3.2. Verificación de la hipótesis

Los estudios informáticos de la enzima *Tbr*HGXPRT, se realizaron con éxito por lo tanto la hipótesis alternativa “Los estudios informáticos (Docking, refinamiento y filogenética) de la enzima Hipoxantina-guanina-xantina fosforribosiltransferasa de *T. brucei* se realizables por lo que, se encontraron posibles fármacos” se acepta y se rechaza la hipótesis nula.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Se analizó la enzima *Tbr*HGXPRT como target para el desarrollo de inhibidores, mediante tres estudios informáticos (docking, refinamiento y filogenética); encontrando que varios fármacos pueden presentar una inhibición significativa de la enzima.
- Se refino a partir de los datos cristalográficos las estructuras de la enzima *Tbr*HGXPRT co-cristalizados con ANPs. El proceso de refinamiento se realizó específicamente para dos sets de datos que fueron los MIC-614 y MIC-654, resolviendo estas estructuras. El resolver las estructuras apporto el conocimiento de las interacciones que se generan al formarse el complejo enzima-ligando.
- Se efectuaron estudios de Docking con la enzima *Tbr*HGXPRT, trabajando con un total de 3517 compuestos (ligandos), mediante el programa Autodock/PyRx. Con este programa se calculó la variación de energía que presentaba la interacción enzima-ligando y con este valor se pudo calcular la constante de inhibición aparente. Al haber calculado y corregido el k_i , se obtuvieron 386 fármacos con una posible acción inhibitoria frente a la enzima *Tbr*HGXPRT, de esto se seleccionó los 20 medicamentos que presentaron el k_i más bajo.
- Se realizó un estudio filogenético de la evolución de 30 enzimas pertenecientes al grupo de PRTasas, aquí se realizó un árbol filogenético para determinar cómo están emparentadas los organismos analizados; además se realizaron comparaciones estructurales basadas en el número de subunidades que forman las enzimas y también como varían los residuos del sitio activo dependiendo de la enzima PRTasas que se trata y también del organismo del cual proviene; definiendo que existen secciones de alta conservación entre todas las enzimas y que los residuos más variantes son aquellos que más lejos se encuentran del sitio activo; pero aun cumplen con la función determinada.

4.2. Recomendaciones

- Realizar estudios *in vitro* e *in vivo* de los 20 fármacos seleccionados; para determinar su actividad inhibitoria ante la enzima *Tbr*HGXPRT.
- Para realizar las figuras resultado del refinamiento, buscar programas que permitan una visualización estereoscópica de las figuras.

BIBLIOGRAFÍA

- Ávila, E. E., & Mora, A. J. (2004). EL ENLACE PUENTE HIDRÓGENO Y SUS APLICACIONES. Retrieved April 27, 2019, from http://www.saber.ula.ve/bitstream/handle/123456789/16752/puente_hidrogeno.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Adams, R. L., Knowler, J. T., & Leader, D. P. (1992). The metabolism of nucleotides. *The Biochemistry of the Nucleic Acids*, 135-151. Recuperado el 25 de Abril de 2019, de https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-011-2290-0_5
- Arent, S., Kadziola, A., Larsen, S., Neuhard, J., & Jensen, K. F. (2006). The Extraordinary Specificity of Xanthine Phosphoribosyltransferase from *Bacillus subtilis* Elucidated by Reaction Kinetics, Ligand Binding, and Crystallography. *Biochemistry*. doi:10.1021/bi060287y
- Blundell, T. L. (29 de Junio de 2017). Protein crystallography and drug discovery: recollections of knowledge exchange between academia and industry. *IUCrJ*, 308-321. doi:10.1107/S2052252517009241
- Bonhivers, M., Nowacki, S., Nicolas Landrein, N., & Robinson, D. R. (06 de Mayo de 2008). Biogenesis of the Trypanosome Endo-Exocytotic Organelle Is Cytoskeleton Mediated. *PLOS: Biology*. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060105>
- Canyuk, B., Medrano, F. J., Wenck, M. A., Focia, J. P., Eakin, A. E., & Craig III, S. P. (2003). Interactions at the Dimer Interface Influence the Relative Efficiencies for Purine Nucleotide Synthesis and Pyrophosphorolysis in a Phosphoribosyltransferase. *Journal of Molecular Biology*. doi:10.1016/j
- Chen, Q., Liang, Y., Su, X., Gu, X., Zheng, X., & Luo, M. (2005). Alternative IMP Binding in Feedback Inhibition of Hypoxanthine–Guanine Phosphoribosyltransferase from *Thermoanaerobacter tengcongensis*. *Journal of Molecular Biology*, 1199-1210. doi:10.1016/j.jmb.2005.02.064
- Chothia, C., & Lesk, A. M. (1986). The relation between the divergence of sequence and structure in. *The EMBO Journal*, 5, 823-826. Recuperado el 17 de Septiembre de 2019, de <https://www.embopress.org/doi/pdf/10.1002/j.1460-2075.1986.tb04288.x>
- Craig III, S. P., & Eakin, A. E. (7 de Julio de 2000). Purine Phosphoribosyltransferases. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 20231-20234. doi:doi:10.1074/jbc.R000002200
- Craig III, S. P., & Eakin, A. E. (07 de Julio de 2000). Purine Phosphoribosyltransferases. *BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 20231-30234. doi:10.1074/jbc.R000002200
- De Clercq, E., & Holý, A. (2005). Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*. doi:10.1038/nrd1877

- Franco, J., Simarro, P. P., Diarra, A., & Jannin, J. G. (2014). Epidemiology of human African trypanosomiasis. 257-275. Recuperado el 29 de Abril de 2019, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4130665/>
- Graf, F. E., Ludin, P., Arquint, C., Schmidt, R. S., Schaub, N., Renggli, C. K., . . . Caccone, A. (2016). Comparative genomics of drug resistance in *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Cellular and Molecular Life Science*, 73(17), 3387-3400. doi:10.1007/s00018-016-2173-6
- Kanagawa, M., Baba, S., Ebihara, A., Shinkai, A., Hirotsu, K., Mega, R., . . . Kawai, G. (2010). Structures of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (TTHA0220) from *Thermus thermophilus* HB8. *Structural Biology and Crystallization Communications*, 679-5148. doi:10.1107/S1744309110023079
- Kennedy, P. G. (21 de Diciembre de 2013). Clinical features, diagnosis, and treatment of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). *Lancet Neurol*, 186-194. doi:doi:10.1016/s1474-4422(12)70296-x
- Keough, D. T., Hockova, D., Holy, A., Naesens, L. M., Skinner-Adams, T. S., Jersey, J., & Guddat, L. W. (2009). Inhibition of Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase by Acyclic Nucleoside Phosphonates: A New Class of Antimalarial Therapeutics†. *Medical Chemistry*. doi:10.1021/jm900267n
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., & Thornton, J. M. (Abril de 1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 26(2). doi:10.1107/S0021889892009944
- Lee, J., & Kim, S.-H. (13 de Mayo de 2009). Water polygons in high-resolution protein crystal structures. *ProteinScience*. doi:10.1002/pro.162
- Lubkowski, J., Dauter, M., Aghaiyp, K., Wlodawer, A., & Dauter, Z. (07 de Junio de 2004). Atomic resolution structure of *Erwinia chrysanthemil*-asparaginase. *Acta Crystallographica Section D*, 59(1). doi:10.1107/S09074444902019443
- Masini d'Avila-Levy, C., Boucinha, C., Kostygov, A., Carneiro Santos, H. L., Morelli, K. A., Grybchuk-Ieremenko, A., . . . Lukeš, J. (Diciembre de 2015). Exploring the environmental diversity of kinetoplastid flagellates in the high-throughput DNA sequencing era. *SCIELO*, 956-965. doi:10.1590/0074-02760150253
- Munagala, N. R., & Wang, C. C. (1998). Altering the Purine Specificity of Hypoxanthine-Guanine-Xanthine Phosphoribosyltransferase from *Tritrichomonas foetus* by Structure-Based Point Mutations in the Enzyme Protein. *Biochemistry*, 37, 16612-16619. doi:10.1021/bi9818974
- Podjarny, A., Howard, E., Mitschler, A., & Chevrier, B. (Julio de 2002). X-ray crystallography at subatomic resolution. *Europhysics News*. Recuperado el 07 de Septiembre de 2019, de <https://www.europhysicsnews.org/articles/e pn/pdf/2002/04/e pn02401.pdf>

- Ralston, K. S., & Hill, K. L. (2008). The flagellum of *Trypanosoma brucei*: New tricks from an old dog. *International Journal for Parasitology*, 38, 869-884. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.03.003>
- Stuer-Lauridsen, B., & Nygaard, P. (1998). Purine Salvage in Two Halophilic Archaea: Characterization of Salvage Pathways and Isolation of Mutants Resistant to Purine Analogs. *Journal of Bacteriology*, 180(3), 457-463. Recuperado el 08 de Septiembre de 2019, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC106908/>
- Vos, S., De Jersey, J., & Martin, J. L. (1997). Structure of *Escherichia coli* Xanthine Phosphoribosyltransferase. *Biochemistry*, 4125-4134. doi:10.1021/bi962640d
- Wlodawer, A., Minor, W., Dauter, Z., & Jaskolsk, M. (Febrero de 2008). Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures. *Departament of Health and Human Services U.S.A.*, 1-21. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.06178.x.
- Algranati, I., Serra, M., Carrillo, C., & González., N. (5 de Agosto de 2006). Biología molecular del metabolismo de poliaminas en parásitos tripanosomátidos. Expresión de genes heterólogos de ornitina y arginina decarboxilasa en *Trypanosoma cruzi*. *Química Viva*(2). Recuperado el 16 de Agosto de 2019, de <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v5n2/Algranati.pdf>
- Allen , T., & Ullman, B. (1993). Clonación y expresión del gen de la hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa de *Trypanosoma brucei*. *PUbMed*. Recuperado el 11 de Abril de 2019, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC310582/>
- Aloy, P., Ceulemans, H., Stark, A., & Russell, R. B. (03 de Octubre de 2003). The Relationship Between Sequence and Interaction Divergence in Proteins. *Journal of Molecular Biology*, 332(5), 989-998. doi:10.1016/j.jmb.2003.07.006
- Ardel, H. D., Elofsson, A., & Illergård, K. (20 de Abril de 2009). Structure is three to ten times more conserved than sequence—A study of structural response in protein cores. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 77(3). doi:10.1002/prot.22458
- Arenas, M., Webber, C. C., Liberles , D. A., & Bastonella, U. (Noviembre de 2017). ProtASR: An Evolutionary Framework for Ancestral Protein Reconstruction with Selection on Folding Stability. *Systematic Biology*, 66(6), 1054-1064. doi:10.1093/sysbio/syw121
- Aronov, A. M., Munagala, N. R., Ortiz, P. R., Kuntz, I. D., & Wang, C. C. (2000). Rational Design of Selective Submicromolar Inhibitors of *Tritrichomonas foetus* Hypoxanthine-Guanine-Xanthine Phosphoribosyltransferase. *Biochemistry*, 39(16), 4684-4691. doi:10.1021/bi992555g

- Balaji, G. A., Nagendra, H. G., Balaji, V. N., & Rao, S. N. (2017). Experimental conformational energy maps of proteins and peptides. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 85(6). doi:10.1002/prot.25266
- Baqui, M. M., Takata, C. S., Milder, R. V., & Pudles, J. (1998). Giant protein associated with the anterior pole of a trypanosomatid cell body skeleton. *European Journal of Cell Biology*, 70, 243-249. Recuperado el 10 de Octubre de 2019, de <https://bdpi.usp.br/item/000910965>
- Berens, R. L., Krug, E. C., & Marr, J. J. (1995). Purine and Pyrimidine Metabolism. En J. J. Marr, & M. Muller, *Biochemistry and Molecular Biology of Parasites* (págs. 87-117). New York. Recuperado el 27 de Agosto de 2019
- Berens, R. L., Krug, E. C., & Marr, J. J. (1995). Purine and Pyrimidine Metabolism. (A. P. LIMITED, Ed.) *Biochemistry and Molecular Biology of Parasites*, 89-117. Recuperado el 22 de Agosto de 2019
- Bernhard, S., Nerima, B., Maser, P., & Brun, R. (2018). *Melarsoprol- and pentamidine-resistant Trypanosoma brucei rhodesiense populations and their cross-resistance*. Recuperado el 06 de Marzo de 2019, de https://www.researchgate.net/publication/6234319_Melarsoprol-_and_pentamidine-resistant_Trypanosoma_brucei_rhodesiense_populations_and_their_cross-resistance
- Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renauld, H., & Bartholomeu, D. C. (2005). The Genome of the African Trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science*, 309(5733), 416-422. doi:10.1126/science.1112642
- Bhatia, M. B., Vinitsky, A., & Grubmeyer, C. (20 de Noviembre de 1990). Kinetic mechanism of orotate phosphoribosyltransferase from *Salmonella typhimurium*. *Biochemistry*, 29(46), 10480-10487. Recuperado el 10 de Agosto de 2019, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2271660?dopt=Abstract>
- Boitz, J. M., & Ullman, B. (2006). *Leishmania donovani* singly deficient in HGPRT, APRT or XPRT are viable in vitro and within mammalian macrophages. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 140(30), 24-30. doi:10.1016/j.molbiopara.2006.02.015
- Brun, R., Hecker, H., & Lun, Z.-R. (1998). *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: distribution. *Veterinary Parasitology*, 79, 95-107. Recuperado el 25 de Abril de 2019, de <http://paper.edu.cn/scholar/showpdf/NUz2cNwINTj0UxeQh>
- Butterfield, G. L., Lajole, M. J., Gustafson, H. H., Sellers, D. L., Nattermann, U., Ellis, D., . . . Baker, D. (2017). Evolution of a designed protein assembly encapsulating its own RNA genome. *Nature*, 552, 415-420. doi:10.1038/nature25157

- Campillo, N. E., Gonzáles-Naranjo, P., & Paéz, J. A. (2011). *Presente y Futuro en el descubrimiento de Fármacos para la enfermedad de Chagas*. Química médica, Madrid. Recuperado el 18 de Agosto de 2019
- Canyuk, B., Focia, P. J., & Ann, E. E. (2001). The Role for an Invariant Aspartic Acid in Hypoxanthine Phosphoribosyltransferases Is Examined Using Saturation Mutagenesis, Functional Analysis, and X-ray Crystallography. *Biochemistry*, 40(9), 2754-2765. doi:10.1021/bi001195q
- Centers for Disease Control and Prevention. (2019). *Centers of Disease Control and Prevention*; Recuperado el 05 de Abril de 2019, de <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisafriican/index.html>
- Christiansen, L. C., Schou, S., Nygaard, P., & Saxild, H. H. (1997). Xanthine metabolism in *Bacillus subtilis*: characterization of the xpt-pbuX operon and evidence for purine- and nitrogen-controlled expression of genes involved in xanthine salvage and catabolism. *Journal of Bacteriology*, 179(8), 2540-2550. doi:10.1128/jb
- Congreve, M., Murray, C. W., & Blundell, T. L. (2005). Keynote review: Structural biology and drug discovery. *Drug Discovery Today*. doi:10.1016/S1359-6446(05)03484-7
- Dean, S., Sunter, J., Wheeler, R. J., Hodkinson, I., Gluenz, E., & Gull, K. (2015). A toolkit enabling efficient, scalable and reproducible gene tagging in trypanosomatids. *The Royal Society*. doi:10.1098/rsob.140197
- Doleželová, E., Terán, D., Gahura, O., Kotrbová, Z., Procházková, M., Keough, D., . . . Zíková, A. (2018). Evaluation of the *Trypanosoma brucei* 6-oxopurine salvage pathway as a potential target for drug discovery. Recuperado el 01 de Abril de 2019, de <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0006301>
- Fish, W. R., Looker, D. L., Mar, J. J., & Berens, R. L. (1982). Purine metabolism in the bloodstream forms of *trypanosoma gambiense* and *Trypanosoma rhodesiense*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- General Subjects*, 719(2), 223-231. doi:10.1016/0304-4165(82)90092-7
- Focia, P. J., Craig III, S. P., Nieves-Alicea, R., Fletterick, R. J., & Eakin, A. E. (1998). A 1.4 Å Crystal Structure for the Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase of *Trypanosoma cruzi*. *Biochemistry*, 15066-15075. doi:10.1021/bi981052s
- Fohl, L. M., & David, R. S. (2003). Fitness effects of DHFR-TS mutations associated with pyrimethamine resistance in apicomplexan parasites. *Molecular Microbiology*, 50(4), 1365-2958. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03756.x
- Fogel, L. J. (1978). Algoritmos Genéticos. In L. J. Fogel. Retrieved Abril 25, 2019, from <https://ccc.inaoep.mx/~emorales/Cursos/Busqueda/ga.pdf>
- Franco, J. (2009). *Tripanosomiasis africana: Situación global*. Recuperado el 06 de Marzo de 2019, de <http://enfermedadesemergentes.com/articulos/a604/s-11-2-004.pdf>

- García, M. L., DE Pascual, B. T., & Fernández, M. (2004). Estudio terico del modo de unin entre CDK2 y butirolactona I. 325-356. Recuperado el 07 de Septiembre de 2019, de file:///C:/Users/Erover5/Downloads/238-1439-1-PB.pdf
- Giese, M., Albrecht, M., Plum, C., Hintzen, D., Valkonen, A., & RissanenKari. (2012). Pentafluorophenyl salicylamine receptors in anion- π interaction studies. *Supramolecular Chemistry*, 755-761. doi:10.1080/10610278.2012.715648
- Gillet, V. J., Willet, P., & Bradshaw, J. (1998). Identification of Biological Activity Profiles Using Substructural Analysis and Genetic Algorithms. *Journal of Chemicl Information and Computer Science*, 38(2), 165-179. doi:10.1021/ci970431+
- Guddat, L. W., Vos, I., Martin, J. L., Keough, D. T., & Jersey, J. (2002). *Crystal structures of free, IMP-, and GMP-bound Escherichia coli hypoxanthine phosphoribosyltransferase*. Recuperado el 10 de Abril de 2019, de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1110/ps.0201002>
- Gull, K. (1999). *The cytoskeleton of trypanosomatid parasites*. Recuperado el 27 de Agosto de 2019, de NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10547703>
- Hammond, D. J., & Gutteridge, W. E. (9 de Julio de 1984). PURINE AND PYRIMIDINE METABOLISM IN THE TRYPANOSOMATIDAE. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 243-261. Recuperado el 18 de Agosto de 2019
- Hann, M. M., & Oprea, T. (2004). Pursuing the leadlikeness concept in pharmaceutical research. *Corrent Opinion in Chemical Biology*, 8(3), 255-263. doi:10.1016/j.cbpa.2004.04.003
- Hart, D. T., & Coombs, G. H. (1982). Leishmania mexicana: Energy metabolism of amastigotes and promastigotes. *Experimental Parasitology, Diciembre*, 397-409. doi:10.1016/0014-4894(82)90049-2
- Hazleton, K. Z., Ho, M.-C., Cassera1, M. B., Clinch, K., Crump, D. R., Irving, R. J., . . . Schramm, V. L. (2012). Acyclic Immucillin Phosphonates: Second generation inhibitors of Plasmodium falciparum hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase. *Chem BIOL*, 19(6), 721-730. doi:10.1016/j.chembiol.2012.04.012
- Héroux, A., White, L., Ross, L. J., Davis, R. L., & Borhan, D. W. (1999). Crystal Structure of Toxoplasma gondii Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase with XMP, Pyrophosphate, and Two Mg²⁺ Ions Bound: Insights into the Catalytic Mechanism. *Biochemistry*, 14495-14506. doi:10.1021/bi990508i
- Héroux, A., White, L., Ross, L. J., Kuzin, A., & Borhani, D. W. (Diciembre de 2000). Substrate Deformation in a Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase Ternary Complex: The Structural Basis for Catalysis. *Structure*, 8(12), 1227-1340. doi:10.1016/S0969-2126(00)00546-3

- Herrera , Á. F., Murrieta-Peralta, E., Campo, N. A., Ontiveros-Austria, J. L., & Jiménez-Botello, L. C. (2012). *HGPRT, Una enzima y tres enfermedades*. Universidad Panamericana , Anatomía y Neurociencias . Recuperado el 19 de Agosto de 2019
- Holton, J. M., Classen, S., Frankel, K. A., & Tainer, J. A. (17 de Septiembre de 2014). The R-factor gap in macromolecular crystallography: an untapped potential for insights on accurate structures. *THE FEBS JOURNAL*, 4046-4060. doi:10.1111/febs.12922
- Janina C. Eads, J. C., Scapin, G., Xu, Y., Grubmeyer, C., & Sacchettini, J. C. (1994 de Julio de 1994). The Crystal Structure of Human Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase with Bound GMP. *Cell Press*, 78, 325-334. doi:10.1016/0092-8674(94)90301-8
- Jones , G., Willett , p., Glen , R., Leach , A., & Taylor, R. (04 de Abril de 1997). Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J Mol Biol*, 727-748. doi:10.1006/jmbi.1996.0897
- Kennedy, P. G. (2013). Clinical features, diagnosis, and treatment of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). *ScienceDirect*. Recuperado el 01 de Abril de 2019, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S147444221270296X?via%3Dihub>
- Keough , D. T., Brereton, I. M., Jersey, J., & Guddat , L. W. (2005). La estructura cristalina de la hipoxantina-guanina humana libre fosforribosiltransferasa revela una gran plasticidad conformacional a lo largo del ciclo catalítico. *ScienceDirect*, 170-181. Recuperado el 10 de Abril de 2019, de <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.05.061>
- Kopec, K. K., Bozyczko-Coyne, D., & Williams, M. (2005). Target identification and validation in drug discovery: the role of proteomics. *Biochemical Pharmacology*, 69(8), 1133-1139. doi:10.1016/j.bcp.2005.01.004
- Korolkovas, A., & Burckhalter, J. H. (1983). *Compendio esencial de química farmacéutica*. Rio Janeiro: Reverte . Recuperado el 25 de Julio de 2019
- Matta, C. F., & Hernández-Trujillo, J. (2003). Bonding in Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Terms of the Electron Density and of Electron Delocalization. *Journal of Molecular Structure THEOCHEM (J MOL STRUC-THEOCHEM)*, 170A. Retrieved Octubre 27, 2019, from <https://pdfslide.net/documents/bonding-in-polycyclic-aromatic-hydrocarbons-in-terms-of-the-electron-density.html>
- Matthews, B. W. (1995). Studies on Protein Stability With T4 Lysozyme. *Advances in Protein Chemistry*, 46, 249-278. doi:10.1016/S0065-3233(08)60337-X
- Miranda, S. E. (2009). Estudio por Modelación Molecular de la interacción del dominio C-terminal de unión a fosfotirosina de FE65 (PTB2) con la región C-terminal de APP (AICD). Retrieved Octubre 24, 2019, from

http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/105322/qf-miranda_se.pdf?sequence=3&isAllowed=y

- Morris, G. M., Goodsel, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., & Olson, A. (24 de Junio de 1998). Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function. *Journal of Computational Chemistry*, 19(14). doi:10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B
- Nagle, A. S., Khare, S., Kumar, A. B., Supek, F., Buchynskyy, A., Mathison, C. J., . . . Molteni, V. (2014). Recent Developments in Drug Discovery for Leishmaniasis and Human African Trypanosomiasis. *Chemical Reviews*, 114(2), 11305-11347. doi:10.1021/cr500365f
- Okochi, V., Abaelu, A. M., & Akinrimisi, E. O. (1983). Studies on the mechanism of adenosine transport in *Trypanosoma vivax*. *Biochemistry International*, 6(2), 129-139. Recuperado el 05 de Abril de 2019, de <https://europepmc.org/abstract/med/6679318>
- OMS. (2018). *La tripanosomiasis africana (enfermedad del sueño)*. Recuperado el 06 de Marzo de 2019, de [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-\(sleeping-sickness\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-(sleeping-sickness))
- Opperdoes, F. R., & Borst, P. (Agosto de 1997). LOCALIZATION OF NINE GLYCOLYTIC ENZYMES IN A MICROBODY-LIKE ORGANELLE IN *TRYPANOSOMA BRUCEI*: THE GLYCOSOME. *FEBS LETTERS*. doi:10.1016/0014-5793(77)80476-6
- Organización Mundial de la Salud . (25 de Julio de 2019). OMS. Obtenido de OMS: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-\(sleeping-sickness\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-(sleeping-sickness))
- Ota, M., Koike, R., Amemiya, T., Tenno, T., Romero, P. R., Hidekazu, H., . . . Fukuchi, S. (2014). An assignment of intrinsically disordered regions of proteins based on NMR structures. *Journal of Structural Biology*, 181(1), 29-36. doi:10.1016/j.jsb.2012.10.017
- Parsons, M. (2004). Glycosomes: parasites and the divergence of peroxisomal purpose. *Molecular Microbiology*, 717-724. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04203.x
- Pays, E. (11 de Noviembre de 2005). Regulation of antigen gene expression in *Trypanosoma brucei*. *ELSEVIER*, 21. doi:10.1016/j.pt.2005.08.016
- Renner, S., & Schneider, G. (2004). Fuzzy Pharmacophore Models from Molecular Alignments for Correlation-Vector-Based Virtual Screening. *Journal of Medical Chemistry*, 47(19), 4653-4664. doi:10.1021/jm031139y
- Rodgers, J. (2010). Trypanosomiasis and the brain. *Parasitology*, 137(14), 1995-2006. doi:10.1017/S0031182009991806

- Romero, G., Chiacchio, U., Corsaro, A., & Merino, P. (2010). Chemical Synthesis of Heterocyclic–Sugar Nucleoside Analogues. *Chemical Reviews*, 3337-3370. doi:doi.org/10.1021/cr800464r
- Rosa, L. H., Machado, K. M., Rabello, A. L., Souza-Fagundes, E. M., Correa-Oliveira, R., Rosa, C. A., & Zani, C. L. (2009). Cytotoxic, immunosuppressive, trypanocidal and antileishmanial activities of Basidiomycota fungi present in Atlantic Rainforest in Brazil. *Antonie van Leeuwenhoek*, 95(3), 227-237. doi:10.1007%2Fs10482-009-9306-y
- SANGER INSTITUTE. (2005). *Sanger Institute*. Recuperado el 02 de Septiembre de 2019, de Project: Pathogens: <https://www.sanger.ac.uk/resources/downloads/protozoa/trypanosoma-brucei.html>
- Schenecke, V., & Boström, J. (2006). *Drug Discovery Today*, 11(1-2), 43-50. doi:10.1016/S1359-6446(05)03703-7
- Schlutzen, F., Tocilj, A., Zarivach, R., Harms, J., Gluehmann, M., Janell, D., . . . Yonath, A. (01 de Septiembre de 2000). Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstrom resolution. *CELL*, 102(5), 615-623. doi: 10.1016/S0092-8674(00)00084-2
- Schumacher, M. A., Darrick, C., Roos, D. S., Ullman, B., & Brennan, R. R. (1996). Crystal structures of Toxoplasma gondii HGXPRTase reveal the catalytic role of a long flexible loop. *Nature Structural Biology*, 3, 881-887. Recuperado el 08 de Septiembre de 2019, de <https://www.nature.com/articles/nsb1096-881>
- Shi, W., Li, M. C., Tyler, P. C., Furneaux, R. H., Grubmeyer, C., Schramm, V. L., & Almo, S. C. (1999). The 2.0 Å structure of human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase in complex with a transition-state analog inhibitor. *Natural Structure and Molecular Biology*, 6, 588-593. Recuperado el 08 de Septiembre de 2019, de https://www.nature.com/articles/nsb0699_588
- Siguero, D. C. (2016). SITUACIÓN ACTUAL DE LA ENFERMEDAD DEL SUEÑO. Recuperado el 01 de Abril de 2019, de <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/MARIA%20DOLORES%20CANALES%20SIGUERO.pdf>
- Sinha, S. C., Krahn, J., Shin, B. S., Tomchick, D. R., Zalkin, H., & Smith, J. L. (2003). The Purine Repressor of Bacillus subtilis: a Novel Combination of Domains Adapted for Transcription Regulation. *Journal of Bacteriology*, 185(14), 4098.2003. doi:10.1128
- Somoza, J. R., Chin, M. S., Focia, P. J., Wang, C. C., & Fletterick, R. J. (1996). Crystal Structure of the Hypoxanthine-Guanine-Xanthine Phosphoribosyltransferase from the Protozoan Parasite Tritrichomonas foetus. *Biochemistry*, 35, 7032-7040. Recuperado el 08 de Septiembre de 2019, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8679528>

- Sturat, K., Brun, R., Croft, S., Fairlamb, A., Gürtleer, R. E., Mckerrow, J., . . . Tarleton, R. (2008). Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *The Journal of Clinical Investigation*, 1301-1310. doi:10.1172/JCI33945
- Teodoro, M. L., Phillips, G. N., & Kavraki, L. (2002). Molecular Docking: A Problem With Thousands Of Degrees Of Freedom. *Proceedings - IEEE International Conference on Robotics and Automation*. doi:10.1109/ROBOT.2001.932674
- Terán, D., Hocková, D., Česne, M., Zíková, A., Naesens, L., Keough, D. T., & Guddat, L. W. (2016). *Crystal structures and inhibition of Trypanosoma brucei hypoxanthine–guanine phosphoribosyltransferase*. Recuperado el 06 de Marzo de 2019, de https://www.researchgate.net/publication/309521501_Crystal_structures_and_inhibition_of_Trypanosoma_brucei_hypoxanthine-guanine_phosphoribosyltransferase
- Torreele, E., Bourdin Trunz, B., Tweats, D., Kaiser, M., Brun, R., Mazué, G., . . . Pécou, B. (Diciembre de 21 de 2010). Fexinidazole – A New Oral Nitroimidazole Drug Candidate Entering Clinical Development for the Treatment of Sleeping Sickness. *PLOS: NEGLECTED TROPICAL DISEASES*. Recuperado el 16 de Agosto de 2019, de <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000923>
- Vickerman, K., & Preston, T. (1976). Comparative cell biology of the kinetoplastid flagellates. *FAO*. Recuperado el 28 de Agosto de 2019, de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302971463>
- Visser, N., & Opperdoes, F. R. (1980). Glycolysis in *Trypanosoma brucei*. *European Journal of Biochemistry*, 103, 623-632. doi:10.1111/j.1432-1033.1980.tb05988.x
- Wang, C. C., Verham, R., Rice, A., & Tzeng, S. (1983). Purine salvage by *Tritrichomonas foetus*. *Molecular and Biochemistry Parasitology*, 8(4), 325-337. doi:10.1016/0166-6851(83)90079-8
- Werner, A. B., Heitmann, I. G., Jercic L., I. L., Jofré, L. M., Muñoz, P., Noemí, I. H., . . . Zulantay, I. A. (2008). Guidelines for the Chagas disease: Part VI. Antiparasitic treatment for Chagas disease. *Revista chilena de infectología*, 25(5). Recuperado el 16 de Agosto de 2019, de <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182008000500013>
- World Health Organization. (12 de Abril de 2019). *WHO*. Recuperado el 16 de Agosto de 2019, de WHO: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-\(sleeping-sickness\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-(sleeping-sickness))
- Zeibing, E. A. (2014). *Clinical Parasitology: A Practical Approach*. En ELSEVIER (Ed.). Recuperado el 28 de Agosto de 2019, de [https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=0rFWAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=A.+Zeibig,+Elisabeth+\(2013\).+Clinical+Parasitology:+A+practical+Approach.+Elsevier.&ots=Hxeh41z2Gx&sig=rK8xCXn4gZend6cZnoQdckOMUqU#v=onepage&q=A.%20Zeibig%2C%20Elisabeth%20\(2013\)](https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=0rFWAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=A.+Zeibig,+Elisabeth+(2013).+Clinical+Parasitology:+A+practical+Approach.+Elsevier.&ots=Hxeh41z2Gx&sig=rK8xCXn4gZend6cZnoQdckOMUqU#v=onepage&q=A.%20Zeibig%2C%20Elisabeth%20(2013))

ANEXOS

Anexo 1. Valor de RMSD usando como organismo guía a cada uno de los organismos analizados.

Organismo	RMSD	# Átomos alineados
<i>B. anthracis</i>		
<i>C. subterraneus</i>	0.804	144 -144
<i>H. sapiens</i>	1.140	121-121
<i>L. pneumophila</i>	0.991	142-142
<i>L. tarentolae</i>	0.795	133-133
<i>M. tuberculosis</i>	0.673	128-128
<i>P. vivax</i>	0.802	99-99
<i>S. cerevisiae</i>	1.189	77-77
<i>S. mansoni</i>	0.956	123-123
<i>T. thermophilus</i>	0.698	140-140
<i>T. gondii</i>	1.161	114-114
<i>T. brucei</i>	0.814	121-121
<i>V. cholerae</i>	0.570	140-140
<i>L. interrogans</i>	0.701	124-124
<i>P. falciparum</i>	0.881	98-98
<i>S. solfataricus</i>	1.235	85-85
<i>T. gondii</i>	0.880	115-115
<i>T. foetus</i>	0.854	139-139
<i>T. brucei</i>	0.843	121-121
<i>G. intestinalis</i>	2.502	101-101
<i>B. anthracis</i>	0.905	142-142
<i>B. faecium</i>	0.739	129-129
<i>E. coli</i>	0.602	140-140
<i>S. typhimurium</i>	0.549	135-135
<i>S. pealeana</i>	0.707	144-144
<i>S. aureus</i>	0.640	146-146
<i>T. cruzi</i>	0.757	128-128
<i>B. subtilis</i>	11.353	91-91
<i>E. coli</i>	16.673	115-115
<i>P. horikoshii</i>	1.339	87-87
<i>C. subterraneus</i>		
<i>H. sapiens</i>	1.398	123-123
<i>L. pneumophila</i>	1.004	135-135
<i>L. tarentolae</i>	0.830	140-140
<i>M. tuberculosis</i>	0.497	146-146
<i>P. vivax</i>	0.877	106-106
<i>S. Cerevisiae</i>	2.590	57-57
<i>S. mansoni</i>	0.960	118-118
<i>T. thermophilus</i>	0.591	136-136
<i>T. gondii</i>	1.187	111-111
<i>T. brucei</i>	0.734	126-126

<i>V. cholerae</i>	0.485	131-131
<i>L. interrogans</i>	0.900	136-136
<i>P. falciparum</i>	1.002	122-122
<i>S. solfataricus</i>	1.722	100-100
<i>T. gondii</i>	1.181	120-120
<i>T. foetus</i>	0.729	139-139
<i>T. brucei</i>	0.813	133-133
<i>G. intestinalis</i>	1.118	98-98
<i>B. anthracis</i>	0.770	168-168
<i>B. faecium</i>	0.527	147-147
<i>E. coli</i>	0.603	137-137
<i>S. typhimurium</i>	0.650	137-137
<i>S. pealeana</i>	0.610	134-134
<i>S. aureus</i>	0.683	155-155
<i>T. cruzi</i>	0.964	157-157
<i>B. subtilis</i>	7.942	79-79
<i>E. coli</i>	14.761	77-77
<i>P. horikoshii</i>	1.939	115-115
<i>H. sapiens</i>		
<i>L. pneumophila</i>	1.548	116-116
<i>L. tarentolae</i>	1.469	121-121
<i>M. tuberculosis</i>	1.298	109-109
<i>P. vivax</i>	1.267	157-157
<i>S. cerevisiae</i>	15.359	113-113
<i>S. mansoni</i>	1.719	164-164
<i>T. thermophilus</i>	1.453	114-114
<i>T. gondii</i>	1.293	155-155
<i>T. brucei</i>	1.158	89-89
<i>V. cholerae</i>	1.329	113-113
<i>L. interrogans</i>	1.258	105-105
<i>P. falciparum</i>	1.280	152-152
<i>S. solfataricus</i>	3.189	93-93
<i>T. gondii</i>	1.243	158-158
<i>T. foetus</i>	1.352	127-127
<i>T. brucei</i>	1.281	97-97
<i>G. intestinalis</i>	3.802	123-123
<i>B. anthracis</i>	1.436	126-126
<i>B. faecium</i>	1.387	117-117
<i>E. coli</i>	1.216	114-114
<i>S. typhimurium</i>	1.166	115-115
<i>S. pealeana</i>	1.553	106-106
<i>S. aureus</i>	1.212	120-120
<i>T. cruzi</i>	1.334	122-122
<i>B. subtilis</i>	14.746	154-154
<i>E. coli</i>	17.136	125-125
<i>P. horikoshii</i>	3.306	79-79
<i>L. pneumophila</i>		
<i>L. tarentolae</i>	0.900	124-124

<i>M. tuberculosis</i>	0.976	124-124
<i>P. vivax</i>	4.505	152-152
<i>S. cerevisiae</i>	2.895	79-79
<i>S. mansoni</i>	0.908	124-124
<i>T. thermophilus</i>	0.807	128-128
<i>T. gondii</i>	1.211	113-113
<i>T. brucei</i>	0.863	125-125
<i>V. cholerae</i>	0.846	113-113
<i>L. interrogans</i>	0.987	117-117
<i>P. falciparum</i>	1.117	125-125
<i>S. solfataricus</i>	1.400	97-97
<i>T. gondii</i>	1.396	115-115
<i>T. foetus</i>	1.006	134-134
<i>T. brucei</i>	0.940	116-116
<i>G. intestinalis</i>	2.226	123-123
<i>B. anthracis</i>	0.902	130-130
<i>B. faecium</i>	1.001	132-132
<i>E. coli</i>	0.851	124-124
<i>S. typhimurium</i>	0.944	113-113
<i>S. pealeana</i>	0.814	130-130
<i>S. aureus</i>	1.055	139-139
<i>T. cruzi</i>	0.980	132-132
<i>B. subtilis</i>	0.781	34-34
<i>E. coli</i>	16.387	125-125
<i>P. horikoshii</i>	2.759	91-91
<i>L. tarentolae</i>		
<i>M. tuberculosis</i>	0.637	130-130
<i>P. vivax</i>	3.289	107-107
<i>S. cerevisiae</i>	1.217	67-67
<i>S. mansoni</i>	0.743	101-101
<i>T. thermophilus</i>	0.707	133-133
<i>T. gondii</i>	1.375	95-95
<i>T. brucei</i>	0.542	147-147
<i>V. cholerae</i>	0.794	140-140
<i>L. interrogans</i>	0.928	110-110
<i>P. falciparum</i>	3.193	99-99
<i>S. solfataricus</i>	1.355	74-74
<i>T. gondii</i>	1.254	101-101
<i>T. foetus</i>	0.789	110-110
<i>T. brucei</i>	0.858	154-154
<i>G. intestinalis</i>	3.471	127-127
<i>B. anthracis</i>	0.893	136-136
<i>B. faecium</i>	0.662	134-134
<i>E. coli</i>	0.597	134-134
<i>S. typhimurium</i>	0.694	135-135
<i>S. pealeana</i>	0.639	136-136
<i>S. aureus</i>	0.841	141-141
<i>T. cruzi</i>	0.505	148-148

<i>B. subtilis</i>	16.519	80-80
<i>E. coli</i>	15.477	85-85
<i>P. horikoshii</i>	1.633	95-95
<i>M. tuberculosis</i>		
<i>P. vivax</i>	0.755	113-113
<i>S. cerevisiae</i>	0.866	201-201
<i>S. mansoni</i>	0.827	119-119
<i>T. thermophilus</i>	0.525	119-119
<i>T. gondii</i>	1.553	113-113
<i>T. brucei</i>	0.735	133-133
<i>V. cholerae</i>	0.538	125-125
<i>L. interrogans</i>	0.826	134-134
<i>P. falciparum</i>	0.944	123-123
<i>S. solfataricus</i>	1.620	90-90
<i>T. gondii</i>	1.187	112-112
<i>T. foetus</i>	0.722	130-130
<i>T. brucei</i>	0.724	130-130
<i>G. intestinalis</i>	1.127	106-106
<i>B. anthracis</i>	0.628	144-144
<i>B. faecium</i>	0.479	145-145
<i>E. coli</i>	0.494	122-122
<i>S. typhimurium</i>	0.510	121-121
<i>S. pealeana</i>	0.552	125-125
<i>S. aureus</i>	0.589	136-136
<i>T. cruzi</i>	0.679	143-143
<i>B. subtilis</i>	13.438	74-74
<i>E. coli</i>	18.216	105-105
<i>P. horikoshii</i>	1.742	98-98
<i>P. vivax</i>		
<i>S. cerevisiae</i>	12.940	98-98
<i>S. mansoni</i>	0.926	164-164
<i>T. thermophilus</i>	0.666	114-114
<i>T. gondii</i>	1.037	174-174
<i>T. brucei</i>	1.028	108-108
<i>V. cholerae</i>	0.883	115-115
<i>L. interrogans</i>	0.862	105-105
<i>P. falciparum</i>	0.368	1662-162
<i>S. solfataricus</i>	8.320	104-104
<i>T. gondii</i>	0.807	166-166
<i>T. foetus</i>	0.707	117-117
<i>T. brucei</i>	0.917	95-95
<i>G. intestinalis</i>	3.396	98-98
<i>B. anthracis</i>	0.896	125-125
<i>B. faecium</i>	0.760	115-115
<i>E. coli</i>	0.769	107-107
<i>S. typhimurium</i>	0.871	110-110
<i>S. pealeana</i>	0.814	113-113
<i>S. aureus</i>	0.985	130-130

<i>T. cruzi</i>	0.924	113-113
<i>B. subtilis</i>	18.621	94-94
<i>E. coli</i>	19.812	116-116
<i>P. horikoshii</i>	0.788	48-48
<i>S. cerevisiae</i>		
<i>S. mansoni</i>	4.872	66-66
<i>T. thermophilus</i>	6.103	109-109
<i>T. gondii</i>	17.766	107-107
<i>T. brucei</i>	2.106	73-73
<i>V. cholerae</i>	1.303	43-43
<i>L. interrogans</i>	3.083	75-75
<i>P. falciparum</i>	10.945	87-87
<i>S. solfataricus</i>	3.187	100-100
<i>T. gondii</i>	6.844	78-78
<i>T. foetus</i>	4.880	102-102
<i>T. brucei</i>	1.319	89-89
<i>G. intestinalis</i>	2.394	82-82
<i>B. anthracis</i>	3.278	109-109
<i>B. faecium</i>	80458	52-52
<i>E. coli</i>	4.790	84-84
<i>S. typhimurium</i>	4.093	107-107
<i>S. pealeana</i>	2.967	101-101
<i>S. aureus</i>	3.101	89-89
<i>T. cruzi</i>	1.235	81-81
<i>B. subtilis</i>	5.647	90-90
<i>E. coli</i>	12.171	39-39
<i>P. horikoshii</i>	1.649	97-97
<i>S. mansoni</i>		
<i>T. thermophilus</i>	0.659	108-108
<i>T. gondii</i>	1.329	141-141
<i>T. brucei</i>	0.819	124-124
<i>V. cholerae</i>	0.879	117-117
<i>L. interrogans</i>	0.980	106-106
<i>P. falciparum</i>	0.740	151-151
<i>S. solfataricus</i>	9.251	113-113
<i>T. gondii</i>	1.130	140-140
<i>T. foetus</i>	0.846	113-113
<i>T. brucei</i>	0.972	127-127
<i>G. intestinalis</i>	1.334	99-99
<i>B. anthracis</i>	0.967	112-112
<i>B. faecium</i>	0.729	115-115
<i>E. coli</i>	0.677	112-112
<i>S. typhimurium</i>	0.754	112-112
<i>S. pealeana</i>	0.848	97-97
<i>S. aureus</i>	6.967	125-125
<i>T. cruzi</i>	0.769	128-128
<i>B. subtilis</i>	1.119	38-38
<i>E. coli</i>	16.492	104-104

<i>P. horikoshii</i>	3.086	64-64
<i>T. thermophilus</i>		
<i>T. gondii</i>	0.858	97-97
<i>T. brucei</i>	0.853	124-124
<i>V. cholerae</i>	0.604	141-141
<i>L. interrogans</i>	0.763	126-126
<i>P. falciparum</i>	0.723	114-114
<i>S. solfataricus</i>	0.902	53-53
<i>T. gondii</i>	1.100	112-112
<i>T. foetus</i>	0.664	130-130
<i>T. brucei</i>	0.820	141-141
<i>G. intestinalis</i>	4.738	100-100
<i>B. anthracis</i>	0.745	124-142
<i>B. faecium</i>	0.560	124-124
<i>E. coli</i>	0.532	134-134
<i>S. typhimurium</i>	0.644	136-136
<i>S. pealeana</i>	0.686	131-131
<i>S. aureus</i>	0.726	133-133
<i>T. cruzi</i>	0.824	137-137
<i>B. subtilis</i>	17.125	95-95
<i>E. coli</i>	18.808	122-122
<i>P. horikoshii</i>	2.283	82-82
<i>T. gondii</i>		
<i>T. brucei</i>	1.238	118-118
<i>V. cholerae</i>	1.098	98-98
<i>L. interrogans</i>	1.075	97-97
<i>P. falciparum</i>	1.143	172-172
<i>S. solfataricus</i>	4.990	92-92
<i>T. gondii</i>	1.056	180-180
<i>T. foetus</i>	1.076	117-117
<i>T. brucei</i>	1.081	94-94
<i>G. intestinalis</i>	2.923	119-119
<i>B. anthracis</i>	1.190	114-114
<i>B. faecium</i>	1.322	113-113
<i>E. coli</i>	1.263	102-102
<i>S. typhimurium</i>	1.278	105-105
<i>S. pealeana</i>	1.229	108-108
<i>S. aureus</i>	1.254	122-122
<i>T. cruzi</i>	1.969	131-131
<i>B. subtilis</i>	14.249	87-87
<i>E. coli</i>	19.050	124-124
<i>P. horikoshii</i>	0.899	57-57
<i>T. brucei</i>		
<i>V. cholerae</i>	0.732	121-121
<i>L. interrogans</i>	0.929	116-116
<i>P. falciparum</i>	0.991	101-101
<i>S. solfataricus</i>	0.805	56-56
<i>T. gondii</i>	1.247	131-131

<i>T. foetus</i>	0.991	122-122
<i>T. brucei</i>	0.847	147-147
<i>G. intestinalis</i>	4.120	84-84
<i>B. anthracis</i>	0.860	122-122
<i>B. faecium</i>	0.808	121-121
<i>E. coli</i>	0.718	124-124
<i>S. typhimurium</i>	0.669	120-120
<i>S. pealeana</i>	0.642	122-122
<i>S. aureus</i>	0.864	130-130
<i>T. cruzi</i>	0.587	151-151
<i>B. subtilis</i>	14.438	106-106
<i>E. coli</i>	16.259	107-107
<i>P. horikoshii</i>	1.373	70-70
<i>V. cholerae</i>		
<i>L. interrogans</i>	0.708	128-128
<i>P. falciparum</i>	0.958	111-111
<i>S. solfataricus</i>	3.830	106-106
<i>T. gondii</i>	1.067	115-115
<i>T. foetus</i>	0.885	137-137
<i>T. brucei</i>	0.867	128-128
<i>G. intestinalis</i>	3.782	96-96
<i>B. anthracis</i>	0.749	137-137
<i>B. faecium</i>	0.558	124-124
<i>E. coli</i>	0.504	155-155
<i>S. typhimurium</i>	0.364	141-141
<i>S. pealeana</i>	0.544	152-152
<i>S. aureus</i>	0.526	141-141
<i>T. cruzi</i>	0.830	135-135
<i>B. subtilis</i>	9.588	102-102
<i>E. coli</i>	17.742	79-79
<i>P. horikoshii</i>	1.528	79-79
<i>L. interrogans</i>		
<i>P. falciparum</i>	1.015	109-109
<i>S. solfataricus</i>	2.787	80-80
<i>T. gondii</i>	0.922	110-110
<i>T. foetus</i>	0.959	139-139
<i>T. brucei</i>	0.960	119-119
<i>G. intestinalis</i>	2.239	109-109
<i>B. anthracis</i>	0.815	131-131
<i>B. faecium</i>	0.818	130-130
<i>E. coli</i>	0.649	113-113
<i>S. typhimurium</i>	0.603	110-110
<i>S. pealeana</i>	0.668	117-117
<i>S. aureus</i>	0.695	128-128
<i>T. cruzi</i>	0.826	119-119
<i>B. subtilis</i>	13.395	102-102
<i>E. coli</i>	18.147	84-84
<i>P. horikoshii</i>	1.428	83-83

<i>P. falciparum</i>		
<i>S. solfataricus</i>	1.065	56-56
<i>T. gondii</i>	0.938	169-169
<i>T. foetus</i>	0.842	114-114
<i>T. brucei</i>	0.988	121-121
<i>G. intestinalis</i>	2.960	104-104
<i>B. anthracis</i>	0.953	122-122
<i>B. faecium</i>	0.863	121-121
<i>E. coli</i>	0.937	114-114
<i>S. typhimurium</i>	1.010	113-113
<i>S. pealeana</i>	0.950	122-122
<i>S. aureus</i>	1.096	124-134
<i>T. cruzi</i>	0.885	114-114
<i>B. subtilis</i>	0.655	13-13
<i>E. coli</i>	18.019	146-146
<i>P. horikoshii</i>	1.328	49-49
<i>S. solfataricus</i>		
<i>T. gondii</i>	6.399	94-94
<i>T. foetus</i>	4.441	97-97
<i>T. brucei</i>	2.875	69-69
<i>G. intestinalis</i>	1.617	53-53
<i>B. anthracis</i>	4.691	107-107
<i>B. faecium</i>	3.042	98-98
<i>E. coli</i>	1.483	81-81
<i>S. typhimurium</i>	1.737	92-92
<i>S. pealeana</i>	3.100	86-86
<i>S. aureus</i>	3.100	86-86
<i>T. cruzi</i>	1.960	96-96
<i>B. subtilis</i>	4.169	65-65
<i>E. coli</i>	14.722	73-73
<i>P. horikoshii</i>	1.042	118-118
<i>T. gondii</i>		
<i>T. foetus</i>	1.011	120-120
<i>T. brucei</i>	1.125	102-102
<i>G. intestinalis</i>	2.966	127-127
<i>B. anthracis</i>	1.041	118-118
<i>B. faecium</i>	1.114	112-112
<i>E. coli</i>	1.112	105-105
<i>S. typhimurium</i>	1.051	108-108
<i>S. pealeana</i>	1.076	112-112
<i>S. aureus</i>	0.978	126-126
<i>T. cruzi</i>	1.469	122-122
<i>B. subtilis</i>	8.519	93-93
<i>E. coli</i>	21.583	80-80
<i>P. horikoshii</i>	1.380	57-57
<i>T. foetus</i>		
<i>T. brucei</i>	0.683	123-123
<i>G. intestinalis</i>	1.485	86-86

<i>B. anthracis</i>	0.884	146-146
<i>B. faecium</i>	0.817	141-141
<i>E. coli</i>	0.786	128-128
<i>S. typhimurium</i>	0.827	125-125
<i>S. pealeana</i>	0.744	127-127
<i>S. aureus</i>	0.887	140-140
<i>T. cruzi</i>	0.873	126-126
<i>B. subtilis</i>	12.522	67-67
<i>E. coli</i>	17.651	44-44
<i>P. horikoshii</i>	1.609	76-76
<i>T. brucei</i>		
<i>G. intestinalis</i>	1.770	93-93
<i>B. anthracis</i>	0.827	124-124
<i>B. faecium</i>	0.888	136-136
<i>E. coli</i>	0.715	124-124
<i>S. typhimurium</i>	0.747	120-120
<i>S. pealeana</i>	0.914	109-109
<i>S. aureus</i>	0.928	115-115
<i>T. cruzi</i>	0.775	140-140
<i>B. subtilis</i>	9.354	117-117
<i>E. coli</i>	17.814	75-75
<i>P. horikoshii</i>	1.643	68-68
<i>G. intestinalis</i>		
<i>B. anthracis</i>	1.319	105-105
<i>B. faecium</i>	4.755	116-116
<i>E. coli</i>	1.059	90-90
<i>S. typhimurium</i>	1.119	99-99
<i>S. pealeana</i>	1.131	97-97
<i>S. aureus</i>	1.266	111-111
<i>T. cruzi</i>	1.355	109-109
<i>B. subtilis</i>	8.997	74-74
<i>E. coli</i>	10.403	36-36
<i>P. horikoshii</i>	2.057	61-61
<i>B. anthracis</i>		
<i>B. faecium</i>	0.665	156-156
<i>E. coli</i>	0.875	144-144
<i>S. typhimurium</i>	0.725	132-132
<i>S. pealeana</i>	0.780	135-135
<i>S. aureus</i>	0.628	149-249
<i>T. cruzi</i>	0.814	148-148
<i>B. subtilis</i>	8.018	115-115
<i>E. coli</i>	16.979	91-91
<i>P. horikoshii</i>	1.838	78-78
<i>B. faecium</i>		
<i>E. coli</i>	0.528	125-125
<i>S. typhimurium</i>	0.574	123-123
<i>S. pealeana</i>	0.631	137-137
<i>S. aureus</i>	0.659	123-123

<i>T. cruzi</i>	0.761	149-149
<i>B. subtilis</i>	6.485	98-98
<i>E. coli</i>	17.054	100-100
<i>P. horikoshii</i>	1.792	94-94
<i>E. coli</i>		
<i>S. typhimurium</i>	0.320	143-143
<i>S. pealeana</i>	0.434	142-142
<i>S. aureus</i>	0.664	146-146
<i>T. cruzi</i>	0.671	129-129
<i>B. subtilis</i>	12.902	131-131
<i>E. coli</i>	19.612	115-115
<i>P. horikoshii</i>	1.324	69-69
<i>S. typhimurium</i>		
<i>S. pealeana</i>	0.499	135-135
<i>S. aureus</i>	0.412	140-140
<i>T. cruzi</i>	0.661	126-126
<i>B. subtilis</i>	12.785	128-128
<i>E. coli</i>	16.892	97-97
<i>P. horikoshii</i>	1.319	69-69
<i>S. pealeana</i>		
<i>S. aureus</i>	0.656	140-140
<i>T. cruzi</i>	0.723	141-141
<i>B. subtilis</i>	13.348	100-100
<i>E. coli</i>	17.113	74-74
<i>P. horikoshii</i>	1.577	100-100
<i>S. aureus</i>		
<i>T. cruzi</i>	0.858	146-146
<i>B. subtilis</i>	6.558	104-104
<i>E. coli</i>	16.878	124-124
<i>P. horikoshii</i>	1.521	84-84
<i>T. cruzi</i>		
<i>B. subtilis</i>	13.896	130-130
<i>E. coli</i>	15.131	13-13
<i>P. horikoshii</i>	1.651	102-102
<i>B. subtilis</i>		
<i>E. coli</i>	6.978	132-132
<i>P. horikoshii</i>	1.231	54-54
<i>E. coli</i>		
<i>P. horikoshii</i>	17.708	49-49