



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

**Cribado computacional de productos naturales
inhibidores de la enzima malato sintasa de *Candida
albicans***

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Christhy Massiell CAMPBELL SÁNCHEZ

ASESORES

Christian SOLIS CALERO

María Elena MONTOYA ALFARO (Coasesor)

Lima, Perú

2023



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

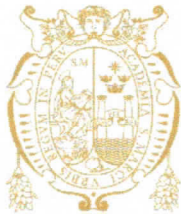
Referencia bibliográfica

Campbell C. Cribado computacional de productos naturales inhibidores de la enzima malato sintasa de *Candida albicans* [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2023.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Christhy Massiell Campbell Sánchez
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	71501766
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Christian Solis Calero
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	10373255
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-0016-3750
Datos de coasesor	
Nombres y apellidos	María Elena Montoya Alfaro
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	07300450
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-9596-0730
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Yadira Fernández Jerí
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	28307333
Miembro del jurado 1	

Nombres y apellidos	Gabriela Norma Solano Canchaya
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	41679636
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Julio Reynaldo Ruiz Quiroz
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07760326
Datos de investigación	
Línea de investigación	B.2.5.4 Tecnologías ómicas bioinformática aplicadas en salud
Grupo de investigación	No aplica.
Agencia de financiamiento	Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos – RR N° 03556-R-19 con código de proyecto A19041071.
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Universidad Nacional Mayor de San Marcos País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Lima Latitud: -12.05819215 Longitud: -77.0189181894387
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2022-2023
URL de disciplinas OCDE	Bioquímica, Biología molecular https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03 Bioinformática https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.02.03



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

Cribado computacional de productos naturales inhibidores de la enzima malato sintasa de *Candida albicans*

Que presenta la Bachiller en Farmacia y Bioquímica:

CHRISTHY MASSIELL CAMPBELL SÁNCHEZ

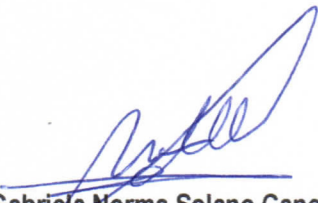
Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, ha obtenido la siguiente calificación final:

DIECIOCHO (18) - APROBADA CON MENCIÓN HONROSA

de conformidad con el Art. 14.º del Reglamento General de Grados y Títulos de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos para la obtención del Título Profesional de Químico Farmacéutico (a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica.

Lima, 19 de mayo de 2023.


Dra. Yadira Fernández Jerí
Presidente


Dra. Gabriela Norma Solano Canchaya
Miembro


Dr. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz
Miembro



INFORME DE EVALUACIÓN DE CRITERIOS DE ORIGINALIDAD

1	Facultad	FARMACIA Y BIOQUÍMICA
2	Escuela	FARMACIA Y BIOQUÍMICA
3	Autoridad que emite el informe de originalidad	Director de la Escuela Profesional
4	Apellidos y nombres de la autoridad académica	Luis Miguel V. Felix Veliz
5	Operador del programa informático de similitudes	Luis Miguel V. Felix Veliz
6	Documento evaluado	Tesis para optar al título profesional de Químico Farmacéutico: Cribado computacional de productos naturales inhibidores de la enzima malato sintasa de <i>Candida albicans</i> .
7	Autor(es) del documento	Br. Campbell Sánchez, Christhy Massiell
8	Fecha de recepción del documento	20/04/2023
9	Fecha de aplicación del programa informático de similitudes	20/04/2023
10	Software utilizado	Turnitin
11	Configuración del programa detector de similitudes	Excluye: - Textos entrecomillados - Bibliografía - Cadenas menores de 40 palabras
12	Porcentaje de similitud según programa detector de similitudes	6 % (El % de similitud debe ser \leq 10%)
13	Fuentes originales de las similitudes encontradas	<ul style="list-style-type: none">• Fuentes de internet varias 7 %• Publicaciones 4 %• Trabajo de estudiantes entregados a otras universidades 5 %
14	Observaciones	Realizar la edición final de la tesis. Procede la sustentación.
15	Calificación de originalidad	Documento cumple con los criterios de originalidad.
16	Fecha del informe	20/04/2023

Nota: se adjunta archivo de reporte del sistema Turnitin en el que se resaltan las similitudes detectadas.



UNMSM

Firmado digitalmente por FELIX
VELIZ Luis Miguel Visitacion FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 20.04.2023 16:56:36 -05:00

Dr. Luis Miguel V. Felix Veliz

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi madre Enma, quien, sin escatimar esfuerzo alguno, ha sacrificado gran parte de su vida para formarme y educarme y así convertirme en la persona que soy ahora, nunca podré pagar todos sus desvelos ni aún con las riquezas más grandes del mundo. A mis hermanas Briggite y Liz por su apoyo incondicional y ser mi ejemplo para seguir y a mis tíos por su acompañamiento.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre y hermanas que me han dado su apoyo incondicional para superarme y desear lo mejor en cada paso dado. Gracias por ser como son, porque su presencia y persona han ayudado a construir y forjar la persona que soy hoy en día.

Quisiera expresar también mi agradecimiento a mis asesores el Dr. Cristhian Solís Calero y la Dra. María Elena Montoya Alfaro, por sus enseñanzas, motivación y apoyo para que culmine este trabajo de investigación.

A mis amigos por su acompañamiento y siempre brindarme su apoyo.

Esta investigación fue financiada por la Universidad Nacional Mayor de San Marcos – RR N° 03556-R-19 con código de proyecto A19041071.

Esto es posible gracias a todos ustedes.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	I
RESUMEN	II
ABSTRACT	III
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 Determinación del problema de investigación	2
I.1.1. Planteamiento del problema:	2
I.1.2 Objetivos	3
I.1.2.1 Objetivo general	3
I.1.2.2 Objetivos específicos	4
I.3. Importancia y alcance de la investigación	4
I.4 Limitaciones de la investigación	5
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA	5
II.1. Marco teórico	5
II.1.1. Ciclo del glioxilato	5
II.1.1.1 Regulación	8
II.1.2. Candidiasis	8
II.1.3. Malato sintasa	10
II.1.3.1 Detalles cinéticos:	11
II.1.3.2 Detalles genómicos:	11
II.1.3.3 Detalles estructurales:	12
a.	12
b.	13
II.1.3.4 Cofactores	14
II.1.3.5 Regulación	14
II.1.3.6 Inhibidores	15
II.2. Antecedentes del estudio	16
II.2.1 Docking en Candida	16
II.2.2 Docking en Malato Sintasa	16
II.3. Bases teóricas	18
II.3.1 Predicción de la estructura de proteínas	18
II.3.1.1 Modelado por homología	18
II.3.1.2 Modelado por aprendizaje automático - AlphaFold	20
II.3.2 Alineamiento estructural de proteínas	21
II.3.3 Acoplamiento molecular Docking	22

II.3.3.1 Autodock	24
II.3.3.2 Vina	25
II.3.3.3 LeDock	26
II.3.3.4 Sistema ANT de proteína-ligando (PLANTS)	27
II.4. Glosario de términos	28
III. HIPÓTESIS Y VARIABLES	29
III.1. Hipótesis	29
III.2. Variables	29
III.2.1 Variables independientes: Estructura del receptor (coordenadas de la posición de los átomos en el espacio) y de los productos naturales.	29
III.2.2 Variables dependientes: Puntajes (“scoring”) para la unión del receptor (malato sintasa) con los productos naturales evaluados por el cribado computacional, interacciones intermoleculares predecidas entre el receptor y los ligandos evaluados.	29
III.3. Operacionalización de variables	29
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	29
IV.1. Área de estudio	29
IV.2. Diseño de investigación	29
IV.3. Población y muestra	29
IV.4. Procedimientos, técnicas e instrumentos de recolección de información	30
IV.4.1 Predicción de la estructura tridimensional de la enzima malato sintasa de <i>Candida albicans</i>	30
IV.4.1.1 Preparación de la estructura de la proteína	30
IV.4.2 Identificación de los compuestos anti-MS	30
IV.4.2 Cribado Virtual	31
IV.4.3 Análisis de los complejo ligando- receptor obtenidos	32
IV.5. Análisis estadístico	33
V. RESULTADOS	34
V.1 Presentación y análisis de los resultados	34
V.1.1 Desarrollo y análisis de la estructura tridimensional de la enzima malato sintetasa de <i>Candida albicans</i>	34
V.1.2 Obtención de la información de los 2223 compuestos de la base de datos NuBBE	37
V.1.3 Análisis de los programas a utilizar y cribado virtual de los candidatos anti-MS	38
V.1.3 Caracterización y análisis de las propiedades de las interacciones moleculares de los candidatos anti-MS	41
VI. DISCUSIÓN	52

VI.1 Predicción la estructura tridimensional de la enzima malato sintetasa de <i>Candida albicans</i>	52
VI.2 Cribado computacional de potenciales inhibidores de la enzima malato sintasa de <i>Candida albicans</i> por el método de acoplamiento molecular “docking”	54
VI.3 Análisis de los resultados obtenidos por las técnicas de acoplamiento molecular Docking	57
VII. CONCLUSIONES	61
VIII. RECOMENDACIONES	61
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
IX. ANEXOS	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1: Operacionalización de variables	29
Tabla N° 2: Interacción de los aminoácidos de la enzima malato sintasa con los 9 mejores ligandos	46
Tabla N° 3: Propiedades farmacocinéticas de los 9 candidatos anti-MS	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. N° 1: Ciclo de TCA y Ciclo del glioxilato (baipás)	6
Fig. N° 2: Esquema general del ciclo del glioxilato	7
Fig. N° 3: Resumen del proceso de modelado de homología y sus aplicaciones en el descubrimiento de fármacos	19
Fig. N° 4: Modelo de arquitectura Alphafold. Las flechas muestran el flujo de información entre los diversos componentes descritos en este documento. Las formas de matriz se muestran entre paréntesis con s, número de secuencias (Nseq en el texto principal); r, número de residuos (Nres en el texto principal); c, número de canales	21
Fig. N° 5: Pasos claves comunes del docking molecular	23
Fig N° 6: Fundamento del Docking Molecular	26
Fig. N° 7: Árbol de decisión para elegir los mejores ligandos anti-Malato Sintasa según la energía libre de unión (ΔG).	32
Fig. N° 8: Diagramas esquemáticos de la estructura primaria y secundaria de la malato sintasa de <i>Candida albicans</i> (imagen generada en la aplicación PDBsum).	34
Fig N° 9: Estructura Tridimensional de la enzima malato sintetasa (cepa SC5314 / ATCC MYA-2876) de <i>Candida albicans</i> obtenida en Alphafold (visualizada en Uniprot: https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q5APD2/entry#structure)	35

- Fig N° 10:** Estructura Tridimensional de la enzima malata sintetasa de *Candida albicans* optimizada en Yasara Structure (Visualizada en PDBSum: <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/Generate.html>) 35
- Fig. N° 11:** Diagrama de Ramachandran de PROCHECK que muestra la distribución de la cadena principal de la enzima malato sintasa de *Candida albicans*. Regiones más favorecidas [A,B,L] : representan un 94,4%. Regiones adicionales permitidas [a,b,l,p] representan un 5,6 %. 36
- Fig. N° 12:** Obtención de los datos de importancia: a) estructura, b)Especies, c) Propiedades biológicas d) Nombre común, e) Nombre IUPAC, f) SMILES de los compuestos de la librería de la base de datos NuBBE 37
- Fig. N° 13:** Correlación entre los resultados de acoplamiento obtenidos con los programas Vina, Plants, LeDock y Autodock 38
- Fig. N° 14:** Mapa de calor de la energía libre estandarizada de los valores de unión (puntaje Z) después de los procedimientos de acoplamiento con los programas de acoplamiento usados teniendo en cuenta solo los ligandos con puntaje z inferior a -0.75. 39
- Fig. N° 15:** Mapa de calor de la energía libre absoluta de los valores de unión después de los procedimientos de acoplamiento con los programas Autodock, LeDock y Vina, considerando el procedimiento del árbol de decisión para seleccionar los mejores candidatos para la unión a la malato sintasa. 40
- Fig N° 16.1:** Estructuras 2D de los complejos anti-MS - malato sintasa de *Candida albicans* visualizados en PoseView. a) 1,7-dihydroxy-3-hydroxymethyl-9,10-anthraquinone. b) Colletopiperazine. 41
- Fig. N° 16.2:** Estructuras 2D de los complejos anti-MS - malato sintasa de *Candida albicans* visualizados en PoseView. c) Glycocitrine-IV. d) 1,3,5-trihydroxy- 2,8-bis(3-methylbut-2-enyl)-10-methyl-9-acridone. 42
- Fig N° 16.3:** Estructuras 2D de los complejos anti-MS - malato sintasa de *Candida albicans* visualizados en PoseView.. e) Citrusinine-II. f) Toddaliopsin C. 43
- Fig N° 16.4:** Estructuras 2D de los complejos anti-MS - malato sintasa de *Candida albicans* visualizados en PoseView. g) citbrasine. h) 4-(3-(5-hydroxybenzo[d][1,3]dioxol-6-yl)propyl)-2,6-dimethylbenzene-1,3-diol. 44
- Fig N° 16.5:** Estructuras 2D de los complejos anti-MS - malato sintasa de *Candida albicans* visualizados en PoseView. i) Vismiaquinone B 45
- Fig. N° 17.1:** Radar de biodisponibilidad de NuBBE_0376, NuBBE_0906 y NuBBE_0953. El área rosa representa el rango óptimo para cada propiedad (lipofilia: XLOGP3 entre -0.7 y +5.0, tamaño: PM entre 150 y 500 g/mol, polaridad: TPSA entre 20 y 130 Å², solubilidad: log S no superior a 6, saturación: fracción de carbonos en la hibridación sp³ no inferior a 0,25, y flexibilidad: no más de 9 enlaces giratorios. 49
- Fig. N° 17.2:** Radar de biodisponibilidad de NuBBE_0955, NuBBE_1076 y NuBBE_1238. El área rosa representa el rango óptimo para cada propiedad (lipofilia: XLOGP3 entre -0.7 y +5.0, tamaño: PM entre 150 y 500 g/mol, polaridad: TPSA entre 20 y 130 Å², solubilidad: log S no superior a 6, saturación: fracción de

carbonos en la hibridación sp³ no inferior a 0,25, y flexibilidad: no más de 9 enlaces giratorios. 50

Fig. N° 17.3: Radar de biodisponibilidad de NuBBE_1474, NuBBE_2082 y NuBBE_2089. El área rosa representa el rango óptimo para cada propiedad (lipofilia: XLOGP3 entre -0.7 y +5.0, tamaño: PM entre 150 y 500 g/mol, polaridad: TPSA entre 20 y 130 Å², solubilidad: log S no superior a 6, saturación: fracción de carbonos en la hibridación sp³ no inferior a 0,25, y flexibilidad: no más de 9 enlaces giratorios. 51

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 001 Operacionalización de variables.....	72
---	----

ABREVIATURAS

- 3D Tridimensional
- aceA: gen que codifica isocitrato liasa en *E. coli*
- aceB: gen que codifica malato sintasa en *E. coli*
- aceBAK: operón de regulación del ciclo del glioxilato
- aceK: gen que codifica IDH quinasa / fosfatasa en *E. coli*
- Acetil-CoA: Acetil coenzima A
- ADNc: ADN complementario
- CoA: Coenzima A
- ICL: Isocitrato Liasa
- IclR: regulador de la enzima isocitrato liasa
- ITS: Infecciones del Torrente Sanguíneo
- Km: Constante de Michaelis Menten
- MS: Malato Sintasa
- ORF: marco de lectura abierto
- PDB: Protein Data Bank (Banco de datos de proteínas)
- TCA cycle: Tricarboxylic acid cycle (ciclo del ácido tricarbóxico)
- HTS: High Throughput Screening (cribado de alto flujo)
- sdf: formato de entrada de las herramientas de acoplamiento molecular
- pdb: formato de entrada de las herramientas de acoplamiento molecular
- mol2: formato de entrada de las herramientas de acoplamiento molecular
- pdbqt: formato de entrada de las herramientas de acoplamiento molecular

RESUMEN

La candidiasis es la micosis invasiva más frecuente en el mundo y puede causar infecciones potencialmente mortales en individuos inmunodeprimidos, su patógeno, *Candida albicans*, ha incrementado su resistencia a los fármacos antifúngicos en los últimos años. Buscar inhibir enzimas claves de las rutas metabólicas de este patógeno es importante para proponer nuevos fármacos. **Objetivos:** Predecir inhibidores potenciales de la enzima malato sintasa de *Candida albicans* en productos naturales por cribado computacional. **Metodología:** Para identificar nuevos compuestos candidatos anti-MS, realizamos un cribado virtual multi puntuación basado en el acoplamiento molecular de una biblioteca de 2223 compuestos naturales de la base de datos NuBBE, en el sitio de unión del ligando de un modelo de MS de *Candida albicans* en AlphaFold. Después de la detección virtual mediante cuatro programas de acoplamiento, el análisis de agrupamiento de los resultados de puntuación de los mejores compuestos clasificados se investigó sus propiedades farmacocinéticas en el programa SwissAdme y sus interacciones moleculares en el programa PoseView. **Resultados:** Se obtuvo la estructura tridimensional optimizada de la enzima malato sintasa, la cual presenta buena calidad y una estructura altamente confiable. Mediante en cribado virtual se logró identificar 9 candidatos anti-MS, NuBBE_0376, NuBBE_0906, NuBBE_0955, NuBBE_0953, NuBBE_1076, NuBBE_1823, NuBBE_1474, NuBBE_2082, NuBBE_2089, los cuales cumplen con las reglas de Lipinski sin ninguna violación, además al analizar la interacción enzima-ligando se observa una buena calidad de diseño debido a que se caracteriza por una disposición sin colisiones de todos los componentes. **Conclusiones:** los 9 compuestos naturales analizados, son candidatos farmacológicos para el desarrollo de nuevos antifúngicos contra *Candida albicans*; ya que, siguen la regla de cinco de Lipinski sin ninguna violación, lo que hace suponer que presentan buena solubilidad, absorción y permeabilidad. Por lo tanto, estos compuestos son candidatos farmacológicos para el desarrollo de nuevos antifúngicos contra *Candida albicans*.

Palabras clave: malato sintasa, *Candida albicans*, ciclo del glioxilato, productos naturales, cribado virtual multi puntuación, base de datos NuBBE

ABSTRACT

Candidiasis is the most common invasive fungal infection in the world and can cause life-threatening infections in immunocompromised individuals. Its pathogen, *Candida albicans*, has increased its resistance to antifungal drugs in recent years. Seeking to inhibit key enzymes of the metabolic pathways of this pathogen is important to propose new drugs. **Objectives:** To predict potential inhibitors of the *Candida albicans* malate synthase enzyme in natural products by computational screening. **Methodology:** To identify novel anti-MS candidate compounds, we performed a virtual multi-score screen based on molecular docking of a library of 2223 natural compounds from the NuBBE database to the ligand binding site of a *Candida MS* model. *albicans* in AlphaFold. After virtual screening by four docking programs, cluster analysis of scoring results of the best ranked compounds was investigated for their pharmacokinetic properties in the SwissAdme program and their molecular interactions in the PoseView program. **Results:** The optimized three-dimensional structure of the malate synthase enzyme was obtained, which presents good quality and a highly reliable structure. Through virtual screening, it was possible to identify 9 anti-MS candidates, NuBBE_0376, NuBBE_0906, NuBBE_0955, NuBBE_0953, NuBBE_1076, NuBBE_1823, NuBBE_1474, NuBBE_2082, NuBBE_2089, which comply with Lipinski's rules without any violation, in addition to analyzing the enzyme-enzyme interaction. ligand, a good design quality is observed because it is characterized by a collision-free arrangement of all components. **Conclusions:** the 9 natural compounds analyzed are pharmacological candidates for the development of new antifungals against *Candida albicans*; since they follow Lipinski's rule of five without any violation, which suggests that they present good solubility, absorption, and permeability. Therefore, these compounds are pharmacological candidates for the development of new antifungals against *Candida albicans*.

Keywords: malate synthase, *Candida albicans*, glyoxylate cycle, Tricarboxylic Acid Cycle, natural products, multi-score virtual screen, NuBBE database,

I. INTRODUCCIÓN

La candidiasis es la micosis invasiva más frecuente asociada a la atención sanitaria y una de las principales causas de morbilidad y mortalidad. Estimaciones globales recientes informan 750,000 casos de candidiasis anualmente y más de 50.000 muertes^{1,2}. La levadura *Candida albicans* es considerada la especie de *Candida* patógena humana más común y puede causar un amplio espectro de enfermedades que incluyen infecciones cutáneas, mucosas y sistémicas (candidiasis)³. Las especies de *Candida* están presentes en hasta 400.000 enfermedades fúngicas sistémicas, pueden causar infecciones potencialmente mortales en individuos inmunodeprimidos o cuando se dañan las barreras naturales durante estas infecciones, el hongo puede colonizar y multiplicarse en casi todos los órganos del cuerpo humano⁴.

En circunstancias normales, *Candida albicans* es un comensal mucoso, predominantemente en el tracto gastrointestinal, de la mayoría de la población humana. Está controlada por: (1) la microbiota normal, (2) las barreras epiteliales y (3) el sistema inmunológico innato⁵. Los azoles y las equinocandinas son fármacos antimicóticos que se utilizan para tratar las infecciones por *Candida*; sin embargo, la resistencia a estos fármacos ha aumentado en muchas de las especies de *Candida* con efectos que se pueden observar en el entorno clínico⁶.

El ciclo del glioxilato es una variante del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) que está presente en plantas y microorganismos, a través de la cual logran conseguir su fuente de energía⁷. Esta derivación metabólica del ciclo del TCA sirve para consumir compuestos simples de carbono (C2) (acetato, etanol, etc.) cuando hay poca cantidad de glucosa disponible como fuente de carbono⁸; así mismo, juega un papel importante en la patogenia y la respuesta al estrés oxidativo⁹. Dados sus roles potenciales en la defensa del estrés oxidativo, la resistencia a los antimicrobianos y la patogénesis, las enzimas del ciclo del glioxilato son consideradas como objetivos prometedores para el desarrollo de nuevos antimicrobianos⁷. Malato sintasa, la segunda enzima clave del ciclo del glioxilato, fue descubierta por Wong y Ajl (1956) en extractos de *E. coli*. Esta

enzima cataliza la condensación de la acetil coenzima A con glioxilato, para producir malato, un segundo intermedio del ciclo del ácido tricarbónico¹⁰. La actividad de MS es necesaria para el crecimiento de los microorganismos en fuentes de carbono no fermentables¹¹.

En la investigación de desarrollo de fármacos en fase inicial, los nuevos compuestos principales se detectan mediante la detección computacional de grandes bibliotecas de compuestos. Dado que el objetivo de la detección computacional es básicamente el mismo que el de la detección experimental, es decir, se espera que la integración y la mejora de los enfoques computacionales y experimentales aumenten la productividad del descubrimiento de fármacos. Actualmente, el cribado de alto flujo (HTS) es ampliamente adoptado y crucial para la generación de blancos farmacológicos¹². Entre las diversas metodologías computacionales basadas en estructuras adoptadas para la selección de compuestos, la principal es el acoplamiento molecular. Cuando la estructura tridimensional de una proteína objetivo está disponible o se puede modelar, el acoplamiento molecular se usa a menudo para la selección de bibliotecas de compuestos. El acoplamiento molecular predice la conformación de un complejo proteína-ligando y calcula la afinidad de unión¹³.

Según lo descrito en los párrafos anteriores, la resistencia a los antifúngicos se ha incrementado en las últimas décadas. Por lo que en la actualidad es innegable la necesidad de nuevos agentes antifúngicos. A la fecha no hay estudios que hayan evaluado la potencialidad de los productos naturales como inhibidores de la enzima malato sintasa de *Candida albicans*. Por ello es importante, plantear nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de candidiasis, a partir de productos naturales.

I.1 Determinación del problema de investigación

I.1.1. Planteamiento del problema:

En la actualidad es innegable la necesidad de nuevos agentes antifúngicos. Las opciones terapéuticas actuales para el tratamiento de infecciones fúngicas se limitan a tres clases de fármacos (azoles, equinocandinas y

polienos) ^{14,15}. La mayoría de los agentes antifúngicos utilizados no son completamente efectivos debido al desarrollo de resistencias por su capacidad de adaptación a los cambios ambientales que poseen, toxicidad en el huésped, y los efectos secundarios indeseables que limitan su uso en la práctica médica. Así mismo, estas infecciones fúngicas han aumentado significativamente en las últimas décadas y las tasas de mortalidad siguen siendo inaceptablemente altas¹⁶.

Candida albicans es una levadura comensal capaz de causar una infección oportunista en hospederos susceptibles denominada candidiasis. El tratamiento para combatir la candidiasis puede ser tópico o sistémico según el tipo de infección, los antifúngicos más utilizados son los derivados imidazólicos (fluconazol, itraconazol, ketoconazol, miconazol etc.); sin embargo, en la actualidad se observa una disminución en la efectividad de estos fármacos, esto debido principalmente, al surgimiento de levaduras resistentes, a la aparición de nuevas especies patógenas, a la prescripción irracional de antimicóticos como profilaxis y al aumento de las dosis terapéuticas¹⁷.

De otra parte, la industria farmacéutica ha invertido menos en el desarrollo de nuevos antifúngicos, debido a que estas enfermedades infecciosas están concentradas en países del tercer mundo, además de la reducción de los incentivos económicos y los desafiantes requisitos reglamentarios¹⁸, lo cual sumado al desarrollo de cepas resistentes o extremadamente resistentes, generan la necesidad de encontrar nuevas alternativas para el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Hasta la fecha no hay estudios que hayan evaluado la potencialidad de los productos naturales como inhibidores de la enzima malato sintasa de *Candida albicans* y así plantear nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de la candidiasis.

I.1.2 Objetivos

I.1.2.1 Objetivo general

Predecir inhibidores potenciales de la enzima malato sintasa de *Candida albicans* en productos naturales por Cribado computacional.

I.1.2.2 Objetivos específicos

1. Obtener la estructura tridimensional de la enzima malato sintetasa de *Candida albicans* y determinar su sitio de unión a ligandos.
2. Identificar potenciales inhibidores de la enzima malato sintetasa de *Candida albicans* mediante el cribado computacional por el método de acoplamiento molecular “docking”.
3. Caracterizar las interacciones moleculares de los mejores complejos enzima-ligando obtenidos en base a los mejores puntajes (scoring) de unión.

I.3. Importancia y alcance de la investigación

En las últimas décadas se han incrementado las infecciones fúngicas, acompañadas de una alta mortalidad, generalmente ocasionadas por infecciones del torrente sanguíneo; causadas por especies del género *Candida*, en un 20 % a 50 % de los casos^{19,20}. Por otra parte, el uso masivo de antifúngicos tanto en forma preventiva como terapéutica ha originado la aparición de resistencia y probablemente el desplazamiento de cepas sensibles por otras más resistentes²¹. Es por ello necesario el desarrollo de nuevos fármacos antifúngicos con mecanismos de acción diferentes a los ya conocidos.

El ciclo de glioxilato es una vía metabólica no presente en humanos⁷ pero que es fundamental para la supervivencia de muchos microorganismos como los hongos, y no se ha estudiado mucho en *Candida albicans*, a pesar de ser sus componentes enzimáticos como la malato sintasa potenciales blancos farmacológicos. La ausencia de genes que codifican estas enzimas en el genoma de los seres humanos permite hipotetizar que sus inhibidores causan menos efectos tóxicos en el huésped dado que no encontrarán blancos específicos, y si en el organismo fúngico infeccioso.

Por lo tanto, en el presente trabajo se plantea la búsqueda de potenciales inhibidores de la malato sintasa, considerando a esta enzima como un blanco farmacológico para el desarrollo de nuevos fármacos en el tratamiento de la candidiasis. En un primer paso planteamos la determinación de la estructura

de esta enzima por métodos computacionales, la que posteriormente es usada para realizar un cribado computacional en bases de datos de productos naturales, a fin de obtener entre estos posibles inhibidores de la enzima.

I.4 Limitaciones de la investigación

Las limitaciones encontradas en el desarrollo del presente estudio fueron principalmente el número limitado de estructuras disponibles de la enzima malato sintasa de *Candida albicans*; así mismo, la bibliografía referida a la inhibición de la enzima malato sintasa de *Candida albicans* a partir de productos naturales mediante cribado computacional, lo cual limita la referenciación del presente estudio. También se encontró limitaciones en el uso de programas de docking molecular ya que muchos de ellos no son de libre acceso, y suponen un elevado costo para su uso.

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

II.1. Marco teórico

II.1.1. Ciclo del glioxilato

El ciclo del ácido cítrico o ácido tricarboxílico (TCA), el cual fue explicado por Krebs y Johnson en 1937, es reconocido como el centro metabólico de la célula. Este ciclo toma carbono (a partir del acetil-CoA) y oxida los dos átomos de carbono entrante a dos moléculas de CO₂^{22,23}. Cuando se requiere que los microorganismos crezcan en sustratos como acetato, ácidos grasos o aminoácidos cetogénicos como única fuente de carbono, surge un problema; ya que, estos sustratos se degradan exclusivamente a fracciones de acetilo, y debido a la ausencia de un mecanismo para conservar parte del carbono contenido para la gluconeogénesis (y, por lo tanto, la producción de biomasa), no debería ser posible el crecimiento. Sin embargo, muchas bacterias crecen fácilmente en estos sustratos, lo que sugiere que desarrollaron un mecanismo para desviar el carbono de los pasos oxidativos del ciclo TCA para la gluconeogénesis²⁴. Este mecanismo también se mostró utilizando extractos libres de células de bacterias cultivadas en acetato y resultó de la actividad combinada de dos enzimas previamente caracterizadas. Una de estas condensaba acetil-

CoA con glioxilato para formar malato, y la otra proporcionaba el glioxilato necesario mediante la escisión del isocitrato²⁵⁻²⁷. Estos dos pasos permitieron al organismo conservar el carbono para la generación de biomasa. Por esta razón, dicha secuencia, descubierta por primera vez en 1957 por Kornberg & Krebs²⁸, se denominó derivación del glioxilato.

El ciclo del glioxilato es una derivación del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) que está presente en plantas y microorganismos. Como se muestra en la Figura N° 1, la derivación del ciclo del glioxilato comparte tres de las ocho enzimas que participan del ciclo de TCA. El ciclo de glioxilato evita los pasos de producción de dióxido de carbono del ciclo del ácido tricarboxílico los cuales son catalizados por las enzimas isocitrato deshidrogenasa y α -cetoglutarato deshidrogenasa⁷. Esta derivación metabólica del ciclo del TCA juega un papel importante en la patogenicidad y la respuesta al estrés oxidativo⁹.

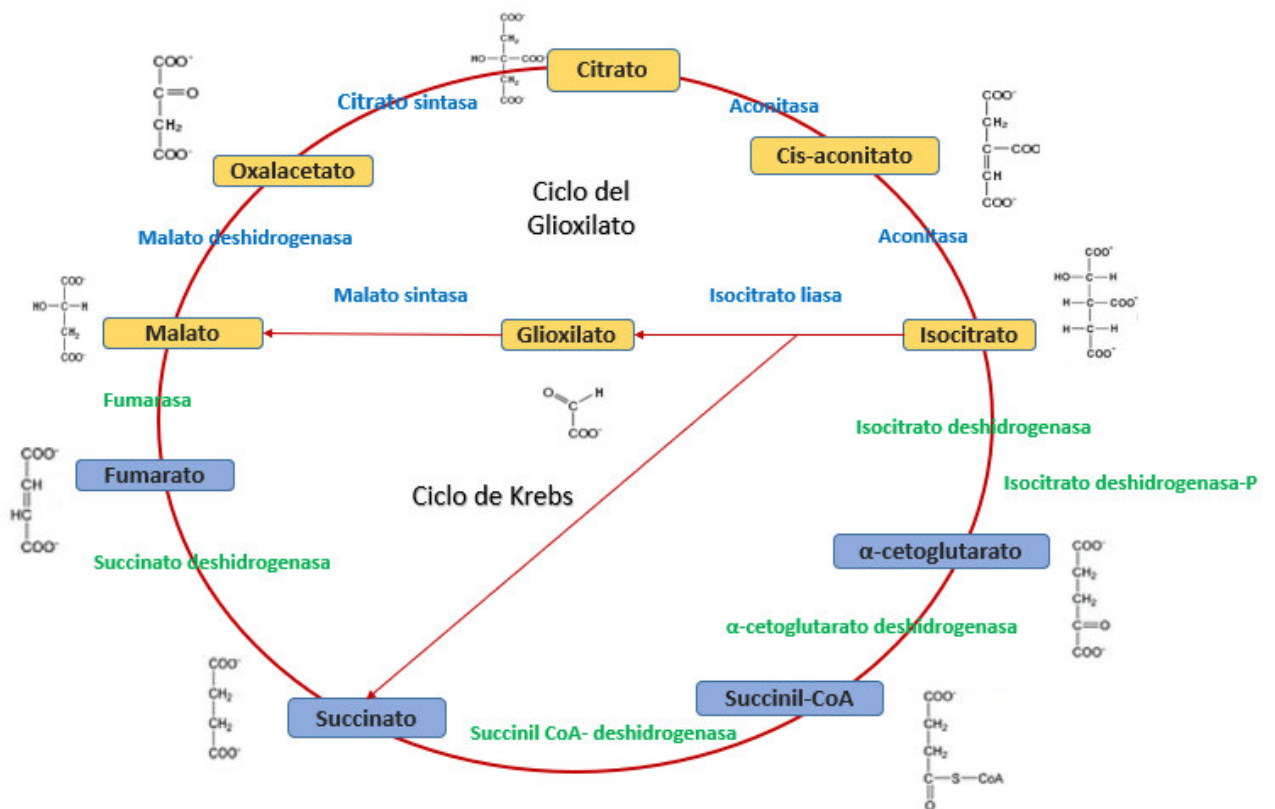


Fig. N° 1: Ciclo de TCA y Ciclo del glioxilato (bajpás)²⁴

El ciclo del glioxilato tiene dos pasos críticos. En el primero, el isocitrato (seis carbonos) se hidroliza a succinato (cuatro carbonos) y glioxilato (dos carbonos) mediante la enzima isocitrato liasa. En el segundo paso, la acetil-CoA (dos carbonos) se condensa con glioxilato para producir malato (cuatro carbonos) mediante malato sintasa. El malato, un intermedio del ciclo del TCA, se convierte en oxaloacetato, y este último en citrato (mediante la adición de otra molécula de acetil-CoA) y luego en isocitrato nuevamente. Estos pasos (Figura N°2) son enzimáticamente idénticos a los del ciclo del TCA, pero existe una especificidad reguladora conferida tanto por isoenzimas de glioxilato dedicadas como por compartimentación. Por tanto, los compuestos de dos carbonos pueden reponer los intermedios del ciclo del TCA a través del ciclo del glioxilato⁹. Cuando el acetato es la única fuente de carbono y energía, primero debe activarse el acetyl coenzima A (acetyl CoA) para volverse utilizable para reponer intermedios del ciclo del ácido tricarbóxico a través de la derivación de glioxilato²⁹.

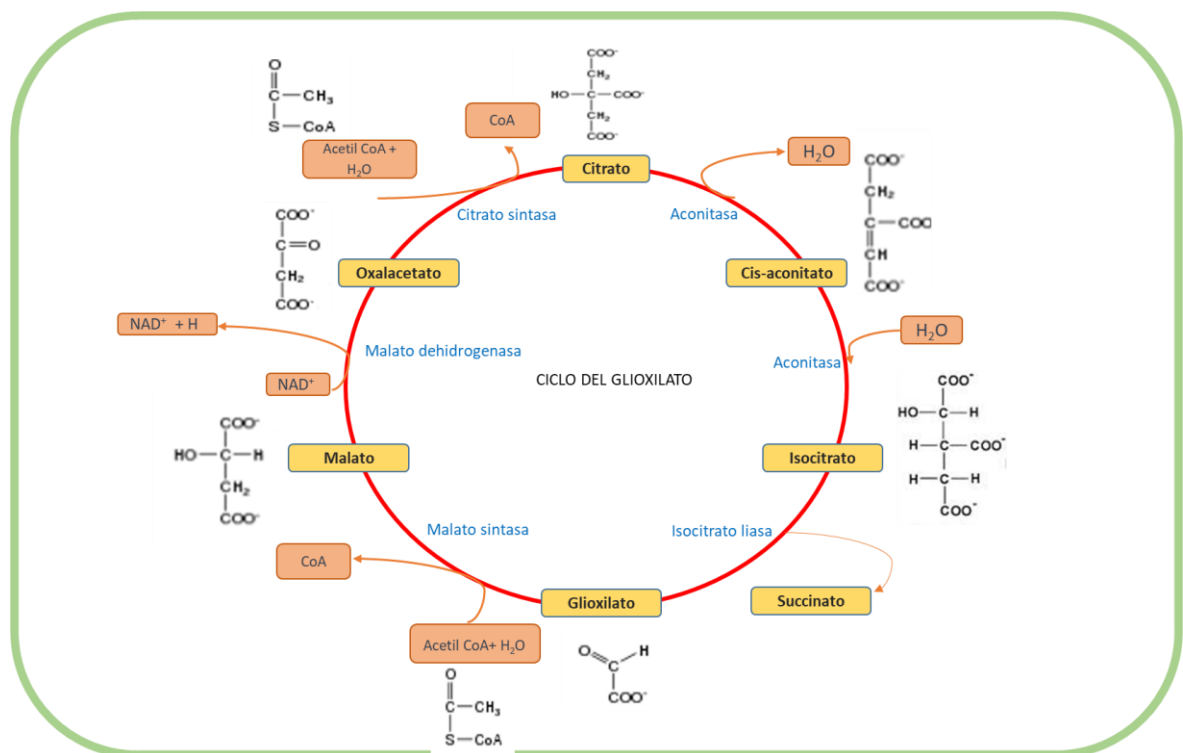


Fig. N° 2: Esquema general del ciclo del glioxilato ²⁴

II.1.1.1 Regulación

La mayoría de los reguladores transcripcionales de las levaduras pertenecen a una subclase de proteínas conocidas como proteínas de grupo de zinc. Estas proteínas se caracterizan por un motivo bien conservado (CysX2CysX6CysX5–12CysX2CysX6–8Cys) y son específicas de hongos³⁰. Hasta la fecha, la regulación transcripcional del metabolismo alternativo del carbono no ha sido bien estudiada en las especies de *Candida*. En *Sacharomyces cerevisiae*, la quinasa Snf1 es el principal activador de los genes reprimidos por glucosa aguas abajo y es importante para la activación del metabolismo alternativo del carbono. En general, la quinasa Snf1 se induce en respuesta a condiciones de deficiencia de glucosa y se desactiva por fosforilación del represor transcripcional Mig1^{11,30}. La disociación de Mig1 del complejo proteico co-represor Ssn6-Tup1 conduce a una mayor expresión de Cat8, un regulador transcripcional que se une al elemento sensible a la fuente de carbono (CSRE) ubicado en la región promotora de muchos genes del ciclo del glioxilato y gluconeogénicos como ICL1, MLS1, FBP1 y PCK1^{11,30,31}. Cat8 también es un activador de Sip4, otro importante regulador transcripcional de unión a CSRE que se encuentra en *S. cerevisiae*. Aunque Cat8 y Sip4 tienen funciones similares en la regulación del ciclo del glioxilato y los genes gluconeogénicos, Cat8 parece ser el principal regulador, porque la eliminación de Cat8 reduce significativamente la expresión de genes dependientes de CSRE, mientras que la ausencia de Sip4 solo provocó una reducción menor en la expresión de estos genes³². Además, la activación de Sip4 requiere un CAT8 funcional, mientras que la activación de Cat8 no depende de SIP4. A diferencia de Cat8 regulado por Mig1, la activación de Sip4 está regulada por la quinasa Snf1 y Rds2, otro regulador transcripcional. Al igual que Cat8 y Sip4, Rds2 también se une a la región promotora de los genes dependientes de CSRE del ciclo del glioxilato y la gluconeogénesis luego de la exposición a fuentes de carbono alternativas. En resumen, los genes dependientes de CSRE del ciclo del glioxilato son al menos reconocidos y regulados por tres reguladores transcripcionales, a saber, Cat8, Sip4 y Rds2^{11,33}.

II.1.2. Candidiasis

Los hongos son un grupo de organismos eucariotas que pueden provocar una amplia gama de enfermedades infecciosas en los seres humanos, que

van desde infecciones superficiales leves hasta infecciones sistémicas potencialmente mortales. El hongo polimórfico, *Candida albicans*, es un constituyente del microbioma humano normal. Este hongo, junto con otros miembros de la familia Candida, está presente en la piel, en la cavidad oral y en los tractos gastrointestinal y urogenital de la mayoría de las personas sanas^{34,35}. En el huésped sano, *Candida albicans* normalmente existe como un organismo comensal benigno. Sin embargo, como patógeno oportunista, este hongo puede causar infecciones superficiales, como candidiasis oral o vaginal, o infecciones sistémicas potencialmente mortales³⁵. La perturbación del microbioma a través del uso de antimicóticos o defectos leves a graves en las defensas inmunitarias, como en pacientes con VIH, puede provocar infecciones orales y vaginales superficiales (aftas), denominadas candidiasis oral (CO) y vulvovaginal (VVC), respectivamente³⁶. Significativamente, el 75% de las mujeres en edad fértil sufren de VVC, el 45% de las cuales tienen al menos una infección recurrente³⁷. La candidiasis superficial también puede manifestarse como infecciones crónicas de la piel y las uñas, lo que resulta en candidiasis mucocutánea (CMC)³⁸. La candidiasis invasiva es común entre los pacientes de la unidad de cuidados intensivos (UCI) y de trasplante de órganos y, a menudo, se asocia con mayores costos de atención, reducciones significativas en la esperanza de vida y hospitalización prolongada incluso después de recibir tratamientos antimicóticos. Aunque las infecciones superficiales son muy comunes, no ponen en peligro la vida y pueden tratarse fácilmente.

En líneas generales, la candidemia es la cuarta causa de infección del torrente sanguíneo (ITS) en UCI, y fácilmente puede estar entre la séptima y décima causa de ITS³⁹. La candidiasis invasiva presenta tasas de mortalidad cercanas al 50%. *Candida albicans* presenta atributos de virulencia adhesinas e invasinas, polimorfismo, cambio fenotípico, enzimas hidrolíticas extracelulares y formación de biopelículas que contribuyen a la patogenicidad de *Candida albicans*⁴⁰. Se estima que aproximadamente el 75% de todas las mujeres sufren al menos una vez en su vida de candidiasis vulvovaginal (CVV), con un 40-50% experimentando al menos un episodio adicional de infección⁴¹.

En el Perú, en un reciente estudio en pacientes con VIH/SIDA, se estimó un total de 581 174 casos de enfermedades fúngicas, de los cuales 1557 casos corresponden a candidemia y 1621 casos a aspergilosis invasiva. Sin embargo, estas cifras pueden estar subestimadas, debido a que las enfermedades fúngicas, no son de notificación obligatoria, además de la ausencia de un sistema de vigilancia epidemiológica⁴². En un estudio realizado en un hospital nacional de alta complejidad de Lima en los años 2004-2006, reveló que el género *Candida* se encontró en el 11,6% de las muestras de hemocultivo de pacientes de UCI⁴³. Otro estudio realizado en nueve hospitales de Lima entre los años 2009-2011, reportó 153 especies del género *Candida* que causaron candidemia⁴⁴ y uno realizado en tres hospitales de Lima y Callao, entre el 2013 al 2015, reportó 158 aislamientos y una incidencia de candidemia por centro entre 1 y 2,6 casos por 1000 ingresos⁴⁵.

El ciclo del glioxilato en especies de *Candida* se ha estudiado principalmente en *Candida albicans*, la especie de *Candida* predominante que causa candidiasis invasiva en humanos. El ciclo del glioxilato permite que *C. albicans* sobreviva y crezca en un entorno limitado en nutrientes dentro de las células fagocíticas, como los macrófagos y los neutrófilos, mediante la utilización de fuentes alternativas de carbono, como los lípidos y los aminoácidos. El ciclo del glioxilato de *C. albicans* se activa cuando los macrófagos y los neutrófilos engullen las células. ICL y MS son esenciales para la virulencia de *Candida albicans*⁴⁰⁹.

II.1.3. Malato sintasa

La malato sintasa es la segunda enzima clave del ciclo del glioxilato, cataliza la condensación del grupo carbonilo del glioxilato con el grupo metilo del acetil-coA y la hidrólisis del tioéster. Los productos de la reacción son L-malato y CoA-SH. La enzima se puede encontrar en glioxisomas de algas y plantas superiores (en este caso, a menudo se ha informado como una enzima unida a la membrana), en las mitocondrias de nematodos como en

Turbatrix y *Ascaris*, pero en orgánulos similares a glioxisomas en *Caenorhabditis* como en fungi y protozoos⁴⁶. Según Koller y Kindl (1977)⁴⁷ la malato sintasa del cotiledón del pepino está asociada con la membrana de los glioxisomas. Por el contrario, la enzima malato sintasa de los peroxisomas de las levaduras está localizada en la matriz peroxisomal. También se ha demostrado una localización similar de la malato sintasa en la matriz del microcuerpo con *Candida utilis* cultivada en etanol/metilamina mediante el método de tinción citoquímica⁴⁸.

II.1.3.1 Detalles cinéticos:

Un estudio realizado en *Candida tropicalis*, por Okada y colaboradores (1986)⁴⁹, mostró que la enzima malato sintasa tiene una mayor actividad a pH 8.0. Los valores de Km medidos a pH 8.0 fueron 4.7 mM para Mg²⁺, 80 mM para acetil-CoA y 1.0 mM para glioxilato.

Dixon y colaboradores (1960)⁵⁰, purificaron malato sintetasa de levadura de panadería y de *Pseudomonas ovalis* Chester y las cultivaron con glicolato, mostraron que cuando se varía la concentración de glioxilato en presencia de una concentración constante de Acetil CoA y Mg²⁺, se sigue la cinética simple de Michaelis-Menten. La constante de Michaelis-Menten (Km) para el glioxilato a pH 8.0 y temperatura de 25°C para la enzima de levadura es 9.3×10^{-5} M y para la enzima de *Pseudomonas*, 6.3×10^{-5} M. También demostraron que la afinidad de la enzima purificada por la Acetil-CoA es extremadamente alta. No observaron disminución en la velocidad inicial a la concentración más baja de acetil CoA (1.3×10^{-5} M). Por lo tanto, la Km para Acetil CoA debe ser $\leq 1.10 \times 10^{-5}$ M.

II.1.3.2 Detalles genómicos:

La secuencia de nucleótidos de malato sintasa de *Candida albicans* contiene un marco de lectura abierto (ORF: open reading frame) de 1653 pb que mostró una alta homología con las enzimas malato sintasa conocidas. Este ORF se denominó CaMLS1 y la proteína correspondiente CaMIs1p. El CaMIs1p deducido contiene una secuencia característica conservada de malato sintasa de los

aminoácidos 274-289. El índice de adaptación de codones (CAI) de 0.574 para CaMLS1 es superior al CAI de ScMLS1 (ORF de *Saccharomyces cerevisiae*) (0.222). El plásmido contiene una secuencia reguladora de 5P de 768 pb de CaMLS1. El plásmido contiene una secuencia reguladora de 5P de 768 pb de CaMLS1⁵¹.

Lorenz y Fink (2001)⁹, clonaron los genes de *C. albicans* para la isocitrato liasa (ICL1) y la malato sintasa (MLS1). Ambos genes comparten una homología significativa con proteínas de hongos, plantas y bacterias; pero, no con mamíferos, que no tienen el ciclo del glioxilato. Los genes ICL1 o MLS1, según el análisis Northern del ARN de células de *S. cerevisiae* y *C. albicans* cultivadas en presencia de macrófagos, muestran que se inducen significativamente por contacto con macrófagos en comparación con las células cultivadas solo en los medios. Por lo tanto, sugieren que la inducción de las enzimas del ciclo del glioxilato es una respuesta conservada a la fagocitosis en estos dos microorganismos, que se separaron de un ancestro común hace aproximadamente 150 millones de años atrás⁹.

II.1.3.3 Detalles estructurales:

a. Estructura primaria

En el trabajo realizado por Beeckmans(2001)⁵², determinó las secuencias de aminoácidos de la enzima malato sintasa a partir del gen o ADNc de hongos, vegetales y *Escherichia coli*. Todas estas secuencias pueden alinearse fácilmente y muestran altos porcentajes de identidad. Identificó nueve cajas de homología especialmente alta⁵³. Además, encontró que nueve residuos de triptófano estaban completamente conservados en todas las malato sintasa secuenciadas hasta el momento. La masa molecular de los monómeros de malato sintasa oscila entre 59 y 64 kDa. Todas las malato sintasa de plantas y hongos tienen un tripéptido C-terminal importante para el direccionamiento

peroxisomal. La enzima de *E. coli* es unos 10 residuos más corta en el extremo C-terminal, por lo que carece de este tripéptido. A pesar de los informes anteriores, ahora se acepta generalmente que las malato sintasa no son glicoproteínas⁵⁴.

b. Estructura secundaria, terciaria y cuaternaria

Howard y colaboradores (2000)⁵⁵, revelaron la estructura tridimensional de malato sintasa monomérica (81 kDa), complejada con Mg^{2+} y glioxilato (entrada PDB 1D8C) de *E. coli*. La malato sintasa de *E. coli* también se construye como un barril central $(\beta/\alpha)_8$ (TIM). Tiene un dominio helicoidal N-terminal en un lado, un dominio de hoja β insertado que se pliega contra el lado opuesto del cilindro y un dominio helicoidal C-terminal de 15 kDa que cubre el sitio activo de la enzima. Este dominio C-terminal es particularmente flexible y puede moverse en relación con el resto de la enzima. A partir de estos estudios se concluyó que malato sintasa ejemplifica una evolución divergente (con una semejanza estructural general, así como una semejanza en la forma de unión del sustrato en comparación con otras enzimas de barril TIM como la piruvato quinasa y la piruvato fosfato diquinasa) y una evolución convergente. Con respecto a la función enzimática: la malato sintasa y la citrato sintasa muestran pliegues totalmente diferentes, pero han evolucionado estructuralmente para catalizar reacciones similares, ambas conducen a la formación de enlaces C-C.

Existen diferencias entre las estructuras oligoméricas de las malato sintasa vegetales cuando se comparan con las levaduras y las enzimas bacterianas. Mientras que las malato sintasa de plantas purificadas se comportan como octámeros, las malato sintasa de levadura aparentemente son tetrámeros o dímeros, y las enzimas bacterianas son monómeros. Debe tenerse en cuenta, que el estado oligomérico de las enzimas *in vitro* puede diferir del estado adoptado *in situ*. Se sabe que las malato sintasa de plantas en particular son proteínas bastante hidrofóbicas, por lo que se agregan fácilmente no

solo para formar homopolímeros sino también para asociarse con fosfolípidos. Dado que se sabe que la inactivación es una consecuencia de la agregación, puede cuestionarse cuál podría ser la estructura cuaternaria real de las malato sintasa dentro de la célula⁵².

Se han identificado un residuo de aspartato y uno de arginina (D375 y R274 respectivamente en malato sintasa de *E. coli*) que podrían ser esenciales para la catálisis, proporcionando la química ácido-base necesaria para la formación del intermediario enolato de acetil-CoA. Así mismo, la modificación del residuo de cisteína evita estéricamente el cierre adecuado del sitio activo, que es un requisito previo para la catálisis⁵².

II.1.3.4 Cofactores

Para realizar su actividad la malato sintasa purificada requiere de Mg^{2+} . Mg^{2+} solo puede ser reemplazado parcialmente por Mn^{2+} , ya que a concentraciones de Mn^{2+} correspondientes a las concentraciones de Mg^{2+} requeridas para saturar la enzima, la enzima comenzó a precipitarse. Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} y Co^{2+} son ineficaces y sólo en el caso de Co^{2+} se restaura la actividad de la malato sintasa mediante la adición de Mg^{2+} ⁵⁰. En un estudio realizado por Okada y colaboradores (1986)⁴⁹ en *Candida tropicalis*, obtuvieron como resultado que la actividad de la enzima es dependiente del ion Mg^{2+} , también que los iones metálicos divalentes, como Mn^{2+} , Ca^{2+} y Ba^{2+} , no pueden sustituir al Mg^{2+} ⁴⁹. Otro estudio realizado en *Mycobacterium tuberculosis*, encontraron también que, para malato sintasa, el catión más eficaz para realizar su actividad era Mg^{2+} . Mn^{2+} fue capaz de reemplazar a Mg^{2+} , produciendo un 40% de la actividad obtenida con Mg^{2+} . Co^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} y Hg^{2+} no pudieron soportar una actividad significativa⁵⁶.

II.1.3.5 Regulación

La expresión de malato sintasa en *Saccharomyces cerevisiae* está regulada a partir de un gen que participa en el catabolismo de fuentes de carbono pobres, es decir, es muy sensible a la represión de catabolitos de

carbono y es casi insensible a la fuente de nitrógeno proporcionada. Se puede esperar este tipo de regulación para un componente del ciclo del glioxilato⁵³. La actividad de la Malato sintasa en *C. albicans* muestra una regulación dependiente de la fuente de carbono, lo que indica que también existe un sistema de represión/desrepresión de glucosa en *C. albicans* comparable al de *S. cerevisiae*. Un estudio mostró que cuando las células se cultivan en medio de acetato en presencia de glucosa al 1%, no se observa aumento en las actividades específicas, lo que indica la represión de la síntesis de malato sintasa⁵⁷.

II.1.3.6 Inhibidores

Las enzimas purificadas son fuertemente inhibidas por varios C₂-ácidos: la cinética de las inhibiciones muestra que es estrictamente competitiva por el glioxilato. El oxalato es el inhibidor más potente ($K_i = 1.9 \times 10^{-5}$ M), seguido del fluoroacetato ($K_i = 2.46 \times 10^{-4}$ M) y el glicolato ($K_i = 3.08 \times 10^{-4}$ M). La malato sintasa no es inhibida por acetato, glicolaldehído u oxalacetato. El L-malato fue un inhibidor no competitivo débil. Esto nos sugiere que los requisitos para la inhibición competitiva incluyen una cadena de carbono de 2 unidades y un grupo carboxilo. El acetato es ineficaz, pero la sustitución del grupo metilo por flúor o un grupo OH⁻ le confiere poder inhibitor, mientras que la sustitución del metilo por carboxilo produce un potente inhibidor que tiene una afinidad casi cinco veces mayor que la del sustrato, el glioxilato. La concentración a la que el oxalato produce su efecto es 16 veces menor que la concentración de Mg⁺² en la mezcla de reacción, por lo tanto, su efecto inhibitor no puede ser por formación de complejos con Mg⁺². Los compuestos que reaccionan con los grupos SH, como el yodoacetato y la N-etilmaleimida, no afectan la actividad enzimática, ni los compuestos tiol estimulan la actividad⁵⁰.

II.2. Antecedentes del estudio

II.2.1 Docking en *Candida*

El estudio realizado por Verma y colaboradores (2021)⁵⁸, evaluó los medicamentos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) contra tres objetivos farmacológicos: TRR1, TOM40 y YHB1 en *Candida albicans*, utilizando enfoque in-silico, modelaron, refinaron y evaluaron las estructuras terciarias de tres los objetivos farmacológicos en cuanto a su integridad estructural según PROCHECK, ERRAT y PROSA. La detección virtual de alto rendimiento de medicamentos aprobados por la FDA (8815), el análisis de interacción y los perfiles de energía revelaron que DB01102 (arbutamina), DB01611 (hidroxicloroquina) y DB09319 (carindacilina) exhibieron una mejor afinidad de unión con TRR1, TOM40 y YHB1, respectivamente. En particular, la simulación dinámica molecular explicó que Gln45, Thr119 y Asp288 de TRR1; Thr107 y Ser121 de TOM40; Arg193, Glu213 y Ser228 de YHB1 son residuos cruciales para una interacción estable entre el fármaco y el objetivo. Además, priorizaron arbutamina-TRR1 como el mejor complejo de fármaco-objetivo según el análisis de MM-PBSA (-52.72 kcal/mol), RMSD (2.43 Å) y radio de giro (-21.49 Å). Los resultados de PCA en profundidad respaldaron los hallazgos de las simulaciones dinámicas moleculares. Curiosamente, la región conservada (>70 %) entre las secuencias TRR1 de las especies patógenas de *Candida*, también indicó la eficacia de la arbutamina contra múltiples especies de *Candida*. Por lo tanto, el estudio brinda nuevos conocimientos y enriquece la comprensión del desarrollo de una técnica avanzada para considerar posibles antifúngicos contra *C. albicans*. No obstante, se necesita una validación experimental detallada para investigar la eficacia de la arbutamina contra la candidiasis potencialmente mortal.

II.2.2 Docking en Malato sintasa

Lima⁵⁹ en su estudio, seleccionó 6 (seis) proteínas de unión (PL), a partir de referencia de estudios realizados *in vitro* en donde clasifican varias proteínas que interaccionan con la enzima malato sintasa de *Paracoccidioides* sp. (PbMLS). Las estructuras tridimensionales de estas

proteínas, así como PbMLS, las predijo por homología utilizando el servidor I-TASSER, realizó simulaciones de dinámica molecular (DM) utilizando el programa GROMACS y determinó los modos de las conformaciones más representativas de cada proteína en base al análisis de conglomerados a partir de las trayectorias generadas por DM. Luego, realizó simulaciones de acoplamiento molecular con GRAMM-X entre los modos conformacionales de PbMLS frente a los obtenidos de PL, lo que le dio como resultado un total de 36 complejos. En base a la mayor frecuencia de algunos pequeños fragmentos de proteínas, observada en los IPP, seleccionó inicialmente 57 péptidos con tamaños entre 5 y 20 residuos de aminoácidos de 5 regiones PbMLS consideradas más frecuentes en la interacción proteína-proteína. Consiguientemente realizó simulaciones con FlexPepDock para optimizar las coordenadas atómicas de péptidos complejados con MLS y, conjuntamente, realizó simulaciones con PepFOLD para evaluar la estabilidad de cada péptido en solución. En función de las puntuaciones de energía más bajas de los péptidos unidos a MS, así como la estabilidad de sus estructuras no unidas en solución, seleccionó 5 péptidos como ligandos prometedores de MS⁵⁹.

Guimaraes y colaboradores (2015)⁶⁰, buscaron compuestos con capacidad inhibitoria contra la malato sintasa de especies de *Paracoccidioides* (PbMLS). La estructura tridimensional (3D) de PbMLS la determinó utilizando el servidor I-TASSER y los compuestos fueron seleccionados de la base de datos ZINC. Mediante cribado virtual revelaron que los principales compuestos seleccionados por los parámetros de afinidad y eficiencia tenían una similitud estructural con los alcaloides de β -carbolina; en consecuencia, identificaron el resto β -carbolina como una estructura clave estándar. Investigaron los compuestos con fracción β -carbolina que tenían disponibles, luego, mediante docking molecular (Autodock Vina), identificaron y compararon los principales mecanismos de interacción de los compuestos alcaloides en el sitio de unión de PbMLS con el mecanismo de interacción de la acetil coenzima A (acetil-CoA). Descubrieron que la naturaleza anfipática de los compuestos, concomitante con la presencia del resto β -carbolina, fue

crucial para su estabilidad en el sitio de unión de PbMLS, además, observaron la importancia de un balance crítico de los contactos polares y no polares de los compuestos en esta región. Cuatro compuestos alcaloides de β -carbolina mostraron la capacidad de inhibir la actividad de PbMLS recombinante (PbMLSr), el crecimiento de especies de *Paracoccidioides* y la adhesión del hongo y PbMLSr a los componentes de la matriz extracelular.

Ansari y colaboradores⁶¹, estudiaron el efecto de perillyl alcohol (PA) en el ciclo del glioxilato (GC), comprobaron mediante análisis de acoplamiento molecular, que tienen afinidad de unión in-silico PA con Isocitrato liasa y Malato sintasa, además, exploraron que PA se une a los sitios activos de ambas proteínas con una mejor energía de unión en comparación con sus inhibidores conocidos 3 -nitropropionato y bromopiruvato respectivamente. La cinética enzimática de Lineweaver-Burk revela que el PA inhibe las enzimas IL y MS de manera competitiva y no competitiva, respectivamente. También, encontraron a través de un análisis por RT-PCR semicuantitativa que PA inhibe las expresiones de ARNm de IL y MS⁶¹.

II.3. Bases teóricas

II.3.1 Predicción de la estructura de proteínas

II.3.1.1 Modelado por homología

El modelado comparativo o de homología es una metodología que se utiliza para predecir la estructura de la proteína basada en la observación general de que las proteínas con secuencias similares tienen estructuras similares. Dada una estructura de proteína establecida experimentalmente (plantilla), se pueden generar modelos para una secuencia homóloga (objetivo) que comparte con la plantilla una secuencia significativa (30% o más) o una similitud estructural (por ejemplo, los GPCR de clase A comparten una estructura helicoidal transmembrana común de siete, a pesar de las bajas similitudes de secuencia entre los

miembros de la familia). El proceso de homología o modelado comparativo de proteínas consta de los siguientes pasos (Ver Figura N° 3) ⁶² :

1. Identificación de estructuras 3D conocidas de una proteína relacionada que puede servir como plantilla;
2. Alineación de secuencias de proteínas diana y plantilla;
3. Construcción del modelo para el objetivo basado en la estructura 3D de la plantilla y la alineación;
4. Refinación/validación/evaluación de los modelos.

Estos pasos pueden repetirse hasta que se construya un modelo satisfactorio.

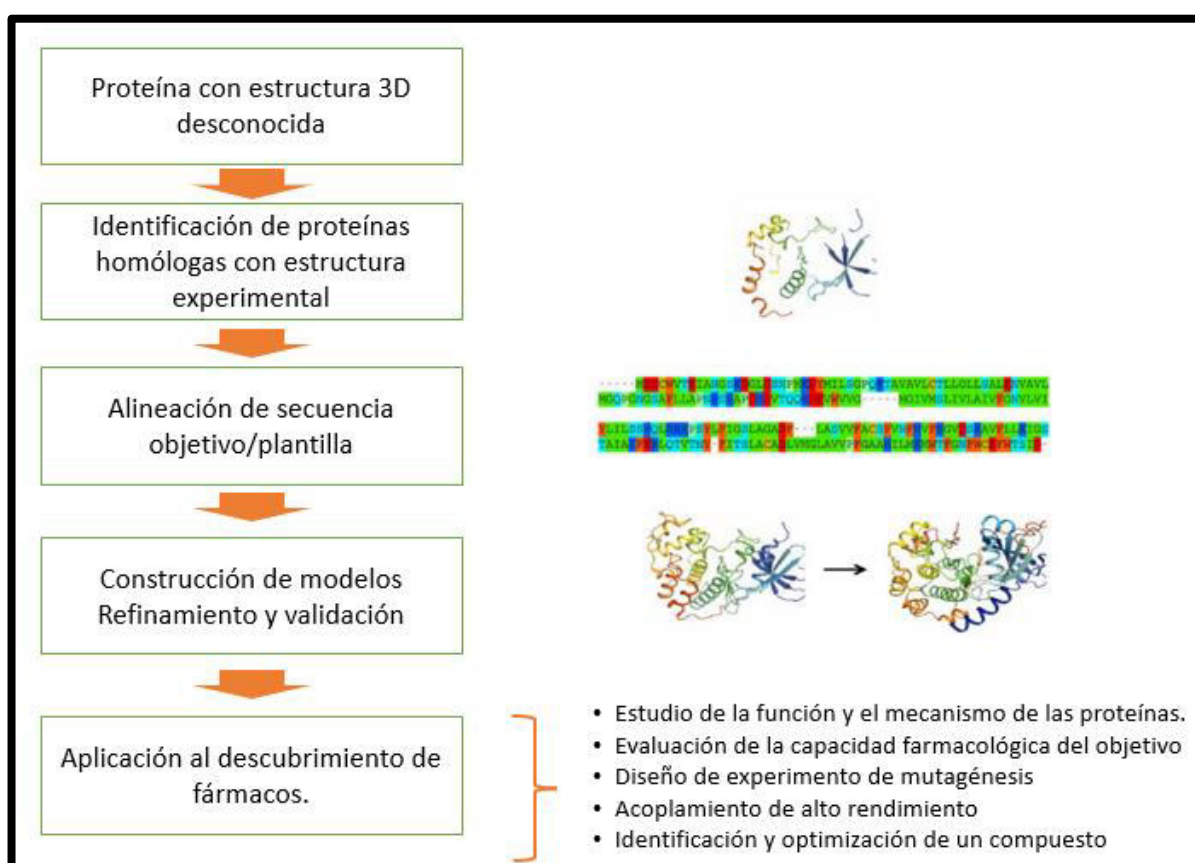


Fig. N° 3: Resumen del proceso de modelado de homología y sus aplicaciones en el descubrimiento de fármacos⁶³.

Los modelos, por definición, son una abstracción y, por lo tanto, pueden contener errores. Según el grado de identidad o similitud de la secuencia, y la calidad de la alineación, la precisión de los modelos de homología en comparación con la estructura experimental real puede ser de hasta 1–2 átomos de $A^\circ C\alpha$ RMSD (desviación cuadrática media de la distancia entre los correspondientes átomos de calcio). Como regla general, los modelos creados con más del 50 % de identidades de secuencia son lo suficientemente precisos para las aplicaciones de descubrimiento de fármacos, los que tienen entre el 25 y el 50 % de identidades se pueden usar para evaluar la capacidad de los fármacos objetivo y diseñar experimentos de mutagénesis, y los que tienen entre el 10 y el 25 % son especulativos⁶⁴.

II.3.1.2 Modelado por aprendizaje automático - Alphafold

El método basado en aprendizaje automático Alphafold, predice directamente las coordenadas 3D de todos los átomos para una proteína determinada utilizando la secuencia de aminoácidos primarios y secuencias alineadas de homólogos como entradas (Figura N° 4). La red comprende dos etapas principales. Primero, el tronco de la red procesa las entradas a través de capas repetidas de un nuevo bloque de red neuronal que se llama Evoformer para producir una matriz $N_{seq} \times N_{res}$ (N_{seq} , número de secuencias; N_{res} , número de residuos) que representa una secuencia procesada de múltiples alineaciones (MSA) y un Matriz $N_{res} \times N_{res}$ que representa pares de residuos. La representación de MSA se inicia con el MSA sin procesar. Los bloques de Evoformer contienen una serie de componentes basados en la atención y no basados en la atención. El tronco de la red es seguido por el módulo de estructura que introduce una estructura 3D explícita en forma de rotación y traslación para cada residuo de la proteína (marcos de cuerpo rígido global). Estas representaciones se inicializan en un estado trivial con todas las rotaciones establecidas en la identidad y todas las posiciones establecidas en el origen, pero desarrollan y refinan rápidamente una estructura proteica de alta precisión con detalles anatómicos precisos. Las innovaciones clave en esta sección de la red incluyen romper la estructura de la cadena para permitir el refinamiento local

simultáneo de todas las partes de la estructura, un transformador equivalente novedoso para permitir que la red razone implícitamente sobre los átomos de la cadena lateral no representados y un término de pérdida que coloca peso en la corrección orientacional de los residuos. Tanto dentro del módulo de estructura como en toda la red, se refuerza la noción de refinamiento iterativo lo que contribuye notablemente a la precisión con un tiempo de entrenamiento adicional menor⁶⁵.

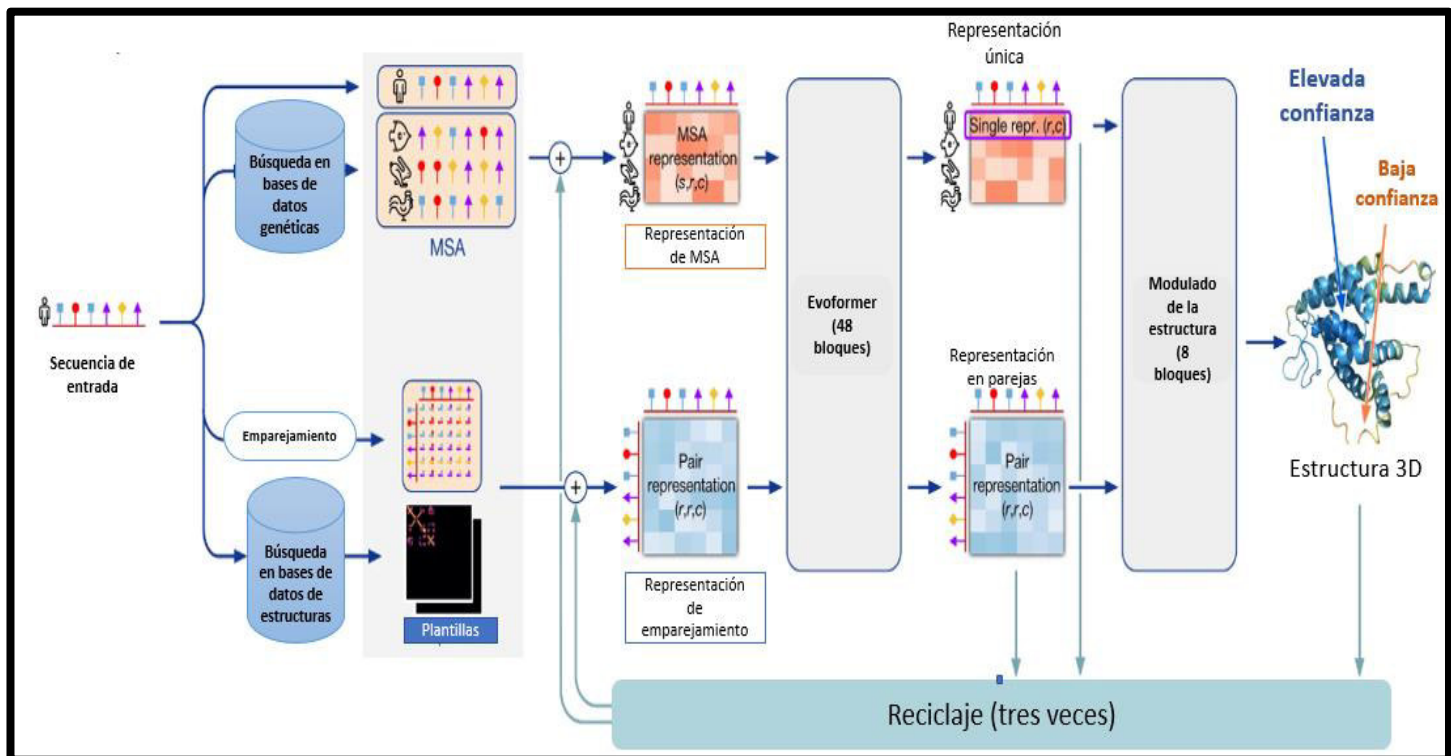


Fig. N° 4: Modelo de arquitectura AlphaFold. Las flechas muestran el flujo de información entre los diversos componentes descritos en este documento. Las formas de matriz se muestran entre paréntesis con s, número de secuencias (Nseq en el texto principal); r, número de residuos (Nres en el texto principal); c, número de canales⁶⁵.

II.3.2 Alineamiento estructural de proteínas

Los alineamientos estructurales múltiples se llevan a cabo utilizando el programa STAMP⁶⁶, que minimiza la distancia C_{α} entre residuos alineados en cada molécula a través de transformaciones de cuerpo rígido globalmente óptimas. STAMP es utilizado por las bases de datos HOMSTRAD⁶⁷ y PALI⁶⁸, para generar alineaciones de estructuras de proteínas. A partir de esta

superposición inicial, el alineamiento de estructuras múltiples sigue un procedimiento similar al alineamiento de secuencias múltiples basado en árboles. Cada par de estructuras se alinea y se calculan las puntuaciones de similitud para derivar un dendrograma que guía el algoritmo de alineación estructural progresiva. Las estructuras y los conjuntos de estructuras se superponen en orden de similitud siguiendo el dendrograma desde las ramas hasta la raíz. En cada nodo, un algoritmo de programación dinámica obtiene una alineación tentativa de los dos conjuntos de estructuras y genera una superposición de las estructuras. Este proceso se repite para maximizar el número de residuos alineados. La alineación estructural requiere que las moléculas que se alinean tengan estructuras similares. Por esta razón, la alineación múltiple debe usarse para un análisis evolutivo de un solo dominio y no para la alineación de proteínas multidominio más grandes, a menos que las proteínas multidominio muestren homología en todos los dominios⁶⁹.

II.3.3 Acoplamiento molecular Docking

Los estudios de acoplamiento molecular, también conocido como docking, exploran la interacción de un ligando con su sitio de unión en una macromolécula diana (ADN, ARN y/o proteínas) (Ver figura N° 5). La fuerza con la que se dan estas interacciones se califica de acuerdo con una escala o score. Una aplicación importante de estos estudios es el cribado virtual de cientos de moléculas diferentes, con el objetivo de identificar nuevos compuestos con potencial actividad biológica y/o aplicación terapéutica. En este proceso (Ver figura N° 6), el cribado virtual ofrece varias ventajas, como la optimización de recursos y tiempo, así como la identificación de compuestos líderes, que son aquellos que presentan la actividad farmacológica deseada⁷⁰. Por lo tanto, los estudios de acoplamiento molecular son una de las herramientas más usadas en el diseño de fármacos basado en la estructura de un receptor, en donde, el receptor es una macromolécula involucrada en algún padecimiento o enfermedad⁷¹. Actualmente existen diversos programas o softwares que se emplean para realizar estudios de acoplamiento molecular. Entre los más nombrados en la literatura especializada se encuentran, Vina, LeDock, Plants, AutoDock, entre otros. Con estos programas se pueden visualizar las estructuras de

macromoléculas en tres dimensiones (3D), lo que permite a los usuarios una mejor comprensión de las mismas. También, permiten entender las interacciones que puede llevar a cabo un fármaco o una molécula bioactiva con un sitio determinado de su diana⁷².

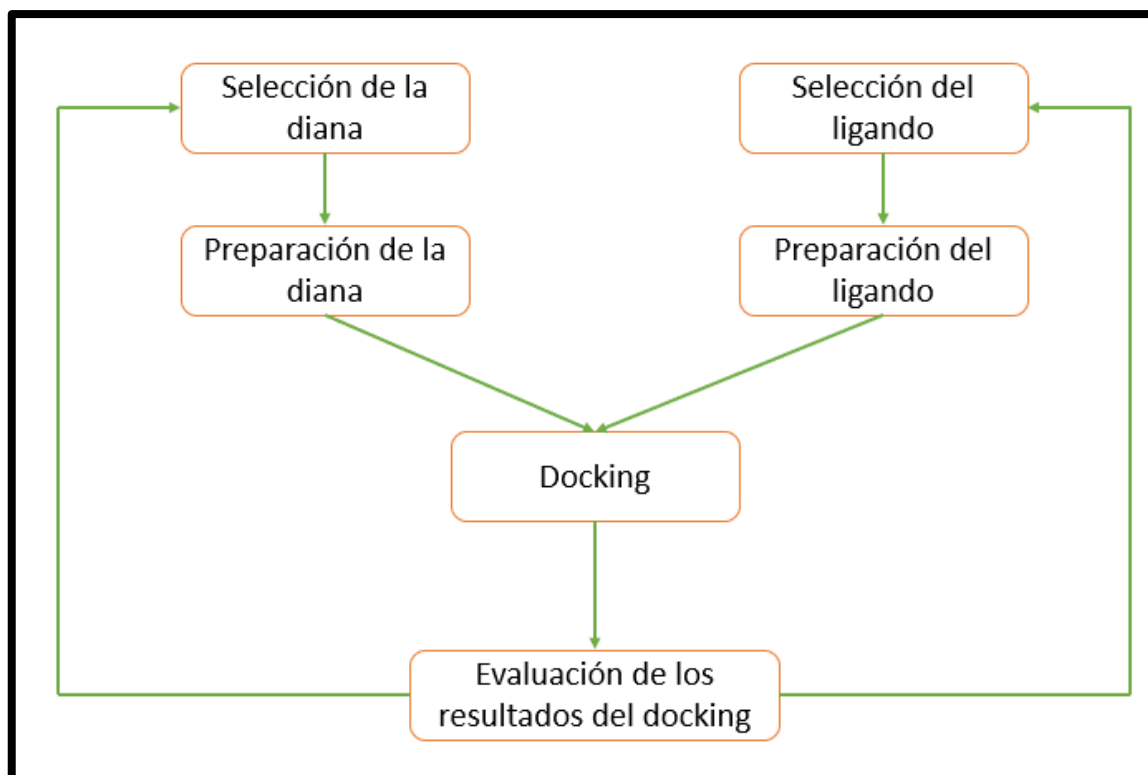


Fig. N° 5: Pasos claves comunes del docking molecular⁷³.

II.3.3.1 Autodock

Es un paquete de software de aplicabilidad general para el acoplamiento automatizado de moléculas pequeñas, como péptidos, inhibidores de enzimas y fármacos, a macromoléculas, como proteínas, enzimas, anticuerpos, ADN y ARN. Autodock predice la afinidad de unión utilizando una conformación del complejo ligando-proteína⁷⁴. La evaluación rápida de la energía se logra pre calculando los potenciales de afinidad atómica para cada tipo de átomo en la molécula de sustrato⁷⁵. En el procedimiento AutoGrid, la proteína se incrusta en una cuadrícula tridimensional y se coloca un átomo de sonda en cada punto de la cuadrícula. La energía de interacción de este único átomo con la proteína se asigna al punto de la cuadrícula. Se calcula una cuadrícula de afinidad para cada tipo de átomo en el sustrato, típicamente carbono, oxígeno, nitrógeno e hidrógeno, así como una

cuadrícula de potencial electrostático, ya sea usando una carga puntual de +1 como sonda, o usando método de diferencias finitas Poisson-Boltzmann⁷⁶. La energía de una configuración del sustrato particular se encuentra luego mediante la interpolación trilineal de los valores de afinidad de los ocho puntos de cuadrícula que rodean a cada uno de los átomos en el sustrato. La interacción electrostática se evalúa de manera similar, interpolando los valores del potencial electrostático y multiplicándolos por la carga del átomo (el término electrostático se evalúa por separado para permitir un control más preciso de las cargas atómicas del sustrato). El tiempo para realizar un cálculo de energía utilizando las cuadrículas es proporcional a la cantidad de átomos en el sustrato y es independiente de la cantidad de átomos en la proteína⁷⁷.

AutoDock es un conjunto de tres programas C: AutoTors, que facilita la entrada de coordenadas de ligando, AutoGrid, que precalcula una cuadrícula tridimensional de energía de interacción basada en coordenadas macromoleculares, y AutoDock, que realiza la simulación de acoplamiento. Estos programas van acompañados de una gran cantidad de scripts de shell para agilizar la entrada de nuevas estructuras, lanzar simulaciones de AutoDock en paralelo en un grupo de máquinas y facilitar el análisis de los resultados. AutoTors filtra las coordenadas del ligando inicial. El usuario proporciona las coordenadas atómicas del ligando en una conformación arbitraria, junto con las cargas puntuales asociadas con cada átomo. Las consultas interactivas definen ángulos de torsión giratorios y, si se desea, eliminan átomos de hidrógeno no polares, uniendo sus cargas parciales con sus átomos de carbono enlazados. AutoGrid, ejecutado en modo por lotes, calcula cuadrículas de energía de interacción en función del objetivo macromolecular. AutoDock realiza la simulación de acoplamiento real. El ligando explora seis grados espaciales de libertad (rotación y traslación) y un número arbitrario de grados de libertad de torsión. Se aplica una perturbación aleatoria a cada uno en cada paso de tiempo, y se evalúa la energía de interacción para la nueva ubicación y conformación. El nuevo estado se acepta o se rechaza de forma probabilística en función de la temperatura de recocido del sistema. La simulación comienza a alta temperatura, acepta casi

todos los movimientos y el ligando explora grandes áreas del espacio de conformación. A medida que se reduce la temperatura, los movimientos desfavorables se rechazan cada vez más. El ligando finalmente encuentra una posición y una conformación óptimas dentro del pozo energético más profundo que ha muestreado. Al realizar múltiples simulaciones separadas, a partir de estados iniciales aleatorios, se pueden ubicar conformaciones de unión favorables consistentes⁷⁸.

II.3.3.2 Autodock Vina

AutoDock Vina es uno de los motores de acoplamiento de código abierto más rápidos y utilizados. Es un programa de acoplamiento computacional que se basa en una función de puntuación simple y una búsqueda conformacional de optimización de gradiente rápida. Vina utiliza un sofisticado método de optimización de gradientes en su procedimiento de optimización local. El cálculo del gradiente le da efectivamente al algoritmo de optimización un "sentido de dirección" a partir de una sola evaluación. Mediante el uso de subprocesos múltiples, Vina puede acelerar aún más la ejecución al aprovechar múltiples CPU o núcleos de CPU⁷⁹. Para su entrada y salida, Vina usa el mismo formato de archivo de estructura molecular PDBQT que usa AutoDock. Los archivos PDBQT se pueden generar (interactivamente o en modo por lotes) y visualizarse mediante MGLTools⁸⁰.

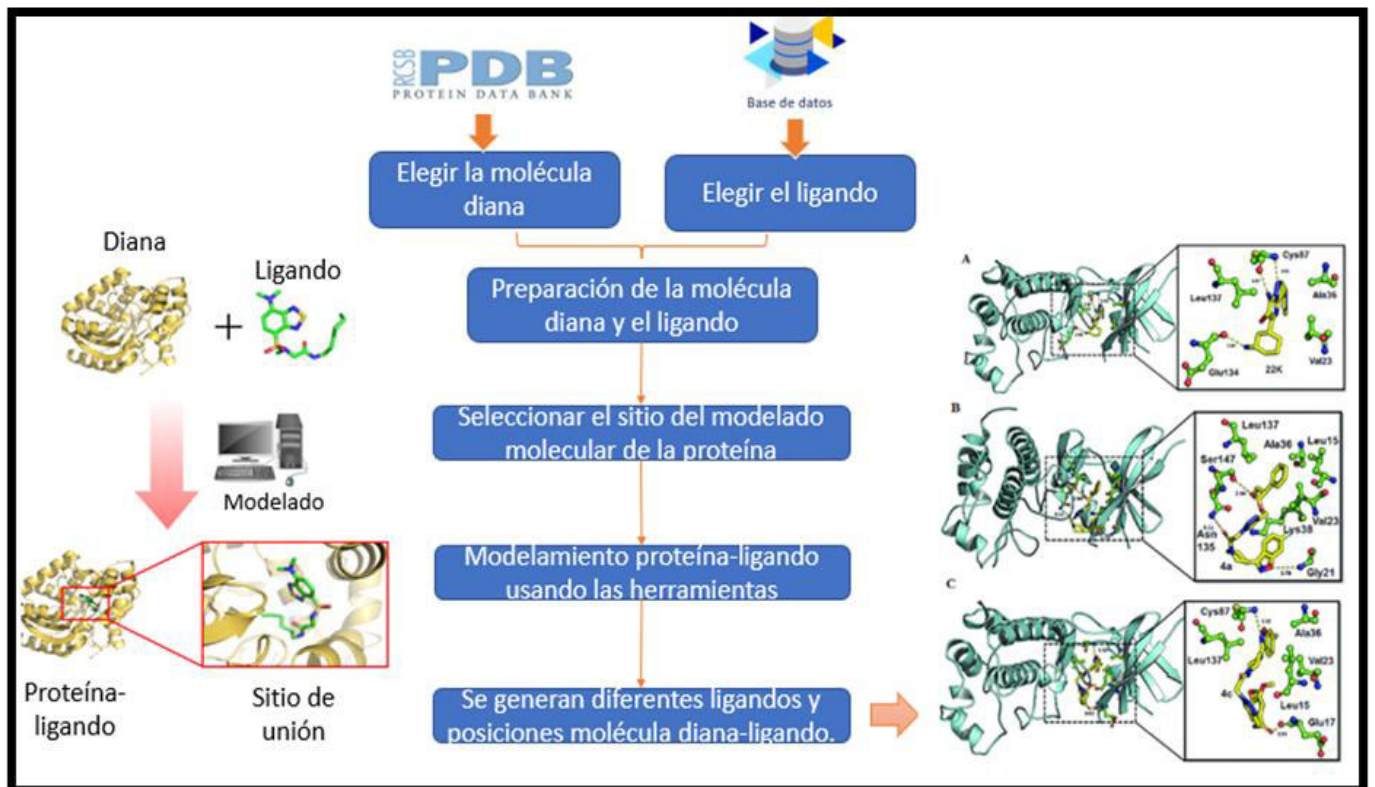


Fig N° 6: Fundamento del Docking Molecular⁸¹

II.3.3.3 LeDock

Se basa en una combinación de recocido simulado y optimización evolutiva de la pose del ligando (posición y orientación) y sus enlaces giratorios, utilizando un esquema de puntuación híbrido de física/conocimiento derivado de campañas de detección virtual prospectivas. LeDock está diseñado para el acoplamiento flexible rápido y preciso de moléculas pequeñas en una proteína⁸². El software LeDock se usa para calcular la energía de unión entre los ligandos y las proteínas objetivo, este software presenta una confiabilidad y precisión significativas. Primero, la estructura de la proteína de entrada debe cargarse eléctricamente. Luego, las estructuras compuestas se introducen como ligandos. Posteriormente, el sitio de la cuadrícula se debe identificar según las coordenadas de los ligandos positivos en el complejo proteico diana⁸³. Después de colocar bien el bolsillo activo, se realizan los cálculos de LeDock para el acoplamiento molecular. Para cada estructura química, se recomiendan varias poses de acoplamiento a través de LeDock además de generar la energía de unión⁸⁴.

II.3.3.4 Sistema ANT de proteína-ligando (PLANTS)

Plants, es un método de optimización estocástica para algoritmos de acoplamiento de proteína-ligando no covalente, que toma como referencia el sistema de organización de las colonias de hormigas (ACO). PLANTS trata al ligando como flexible y la flexibilidad de la proteína está parcialmente considerada por la optimización de las posiciones de los átomos de hidrógeno que podrían estar involucrados en los enlaces. El espacio de búsqueda con respecto a los grados de libertad traslacionales del ligando es definido por el tamaño del sitio de unión dado para cada proteína⁸⁵.

La función de puntuación empírica utilizada en PLANTS se basa en una combinación de partes. La primera parte de la puntuación intermolecular se basa en una versión modificada de la función de puntuación del potencial lineal por partes (PLP)⁸⁶. Esta parte se utiliza principalmente para modelar interacciones estéricas entre la proteína y el ligando. La segunda parte presenta las interacciones de enlace de hidrógeno dirigidas entre ambos complejos proteína-ligando⁸⁷. La función de puntuación de ligando intramolecular consiste en un término de choque simple y un potencial de torsión⁸⁸. Además, si el punto de referencia del ligando está fuera del sitio de unión predefinido, se agrega un término de penalización⁸⁵.

II.4. Glosario de términos

- **Malato sintasa:** enzima del ciclo del glioxilato que cataliza la condensación aldólica de glioxilato con acetil-CoA para formar L-malato⁸⁹.
- **Ciclo del glioxilato:** ruta alternativa al ciclo del ácido tricarboxílico presente en bacterias, hongos y plantas⁴⁶.
- ***Candida albicans*:** es una levadura comensal que reside en las membranas mucosas de las cavidades oral y vaginal y también en el tracto gastrointestinal de los humanos. Normalmente es inofensiva en el hospedero sano, pero su patogenicidad aumenta en el hospedero inmunocomprometido⁹⁰.
- **Candidiasis:** es una infección primaria o secundaria, causada por levaduras del género *Candida*, presenta manifestaciones clínicas variables de evolución aguda, subaguda, crónica o episódica, en las cuales el hongo

puede causar lesiones cutáneas, mucocutáneas, profundas o diseminadas⁹¹.

- **Cribado computacional:** es una técnica basada en computadora para identificar prometedores compuestos para unirse a una molécula objetivo de estructura conocida. Dado el número cada vez mayor de estructuras de proteínas y ácidos nucleicos, la detección virtual continúa creciendo como un método eficaz para el descubrimiento de nuevos inhibidores y moléculas de fármacos⁹².
- **NuBBE:** base de datos basada en la web, que incorpora varias clases de metabolitos secundarios y derivados de la biodiversidad de Brasil. Esta base de datos de productos naturales incorpora información sobre compuestos botánicos, químicos, farmacológicos y toxicológicos⁹³.
- **PROCHECK:** conjunto de programas que proporciona una verificación detallada de la estereoquímica de la estructura de una proteína. Sus resultados comprenden una serie de gráficos en formato PostScript y una lista completa de residuo por residuo⁹⁴.

III. HIPÓTESIS Y VARIABLES

III.1. Hipótesis

Se puede predecir potenciales inhibidores de la enzima malato sintasa de *Candida albicans* por Cribado computacional en bases de datos de productos naturales

III.2. Variables

III.2.1 Variables independientes: Estructura del receptor (coordenadas de la posición de los átomos en el espacio) y de los productos naturales.

III.2.2 Variables dependientes: Puntajes (“scoring”) para la unión del receptor (malato sintasa) con los productos naturales evaluados por el cribado computacional, interacciones intermoleculares predecidas entre el receptor y los ligandos evaluados.

III.3. Operacionalización de variables

Tabla N° 1: Operacionalización de variables (Ver anexo 001)

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. Área de estudio

La investigación no lo requiere

IV.2. Diseño de investigación

Para determinar si existen productos naturales inhibidores de la enzima malato sintasa de *Candida albicans*, la investigación se orientará por un estudio de tipo cuantitativo, no experimental.

IV.3. Población y muestra

2223 compuestos de productos naturales de la base de datos NuBBE (Centro de Bioensayos, Biosíntesis y Ecofisiología de Productos Naturales),

IV.4. Procedimientos, técnicas e instrumentos de recolección de información

IV.4.1 Predicción de la estructura tridimensional de la enzima malato sintasa de *Candida albicans*

Se partió de la secuencia de aminoácidos obtenida de la base de datos de proteínas Uniprot^{95,96} [Uniprot: Q5APD2]. Luego, se aplicó el método basado en aprendizaje automático Alphafold⁶⁵, en el cual mediante la combinación de características derivadas de plantillas homólogas y de alineación de secuencias múltiples se generó la estructura tridimensional de la enzima malato sintasa. Seguido, para identificar el sitio de unión a ligandos en la enzima malato sintasa, se utilizó el programa STAMP⁹⁷, se realizó la obtención de la información de la estructura de enzimas malato sintetasa de otras especies unidas a ligandos, seguida del alineamiento de las estructuras de estas enzimas con el modelo de la estructura de la enzima malato sintasa de *Candida albicans*. La identificación de las enzimas con similitud estructural a la enzima de *Candida albicans* se realizó por búsqueda de similitud de secuencias usando el programa BlastP⁹⁸.

IV.4.1.1 Preparación de la estructura de la proteína

La geometría del modelo de la estructura de la enzima malato sintasa de *Candida albicans* obtenida en el paso anterior se optimizó por el algoritmo de recocido simulado “simulated annealing”^{99,100,101}, usando el programa Yasara Structure¹⁰².

IV.4.2 Identificación de los compuestos anti-MS

A partir de la biblioteca de 2223 compuestos de productos naturales, NuBBE (Centro de Bioensayos, Biosíntesis y Ecofisiología de Productos Naturales), se obtuvo información del SMILES de los ligandos; para luego, convertirlos en formatos pdb, pdbqt, mol2, sdf, en el programa Open Babel¹⁰³, que posteriormente se utilizaron para realizar el cribado virtual.

IV.4.2 Cribado Virtual

A continuación, tanto los ligandos como la enzima se analizaron en programas de modelamiento molecular como Vina⁸⁰, LeDock⁸², Autodock⁷⁵ y Plants⁸⁵. Se evaluaron las puntuaciones, en el programa Autodock Vina, se debe considerar la pose menos energética o la afinidad de unión y, junto con eso, los valores de RMSD, tanto el límite inferior (lb) como el límite superior (ub), deben ser mínimos⁷⁹. AutoDock precalcula cuadrículas de energía para cada tipo de átomo en el ligando con respecto al receptor estático. Debido a que las redes de energía se pueden calcular basándose únicamente en el receptor, se pueden reutilizar para acoplamiento con múltiples ligandos. La herramienta AutoGrid utiliza los parámetros del campo de fuerza en el archivo de parámetros de cuadrícula (GPF). Es en este GPF donde se definen los aspectos intermoleculares del campo de fuerza. Del mismo modo que Autodock Vina, Para Autodock, se tomó la conformación con energía menor a -0,75⁷⁸. Ledock, utiliza un esquema de puntuación híbrido de física/conocimiento derivado de campañas prospectivas de detección virtual, del mismo modo,

se considerarán las energías mínimas ($z < -0,75$). PLANTS, utiliza la función de puntuación CHEMPLP, y también se consideró la energía mínima encontrada. Las mejores puntuaciones obtenidas de la unión enzima/ligando se eligieron mediante un algoritmo de aprendizaje supervisado no paramétrico, árbol de decisión (Ver figura N° 7)¹⁰⁴, en donde se consideró las energías mínimas ($z < -0,75$) medidas por los programas de modelamiento.

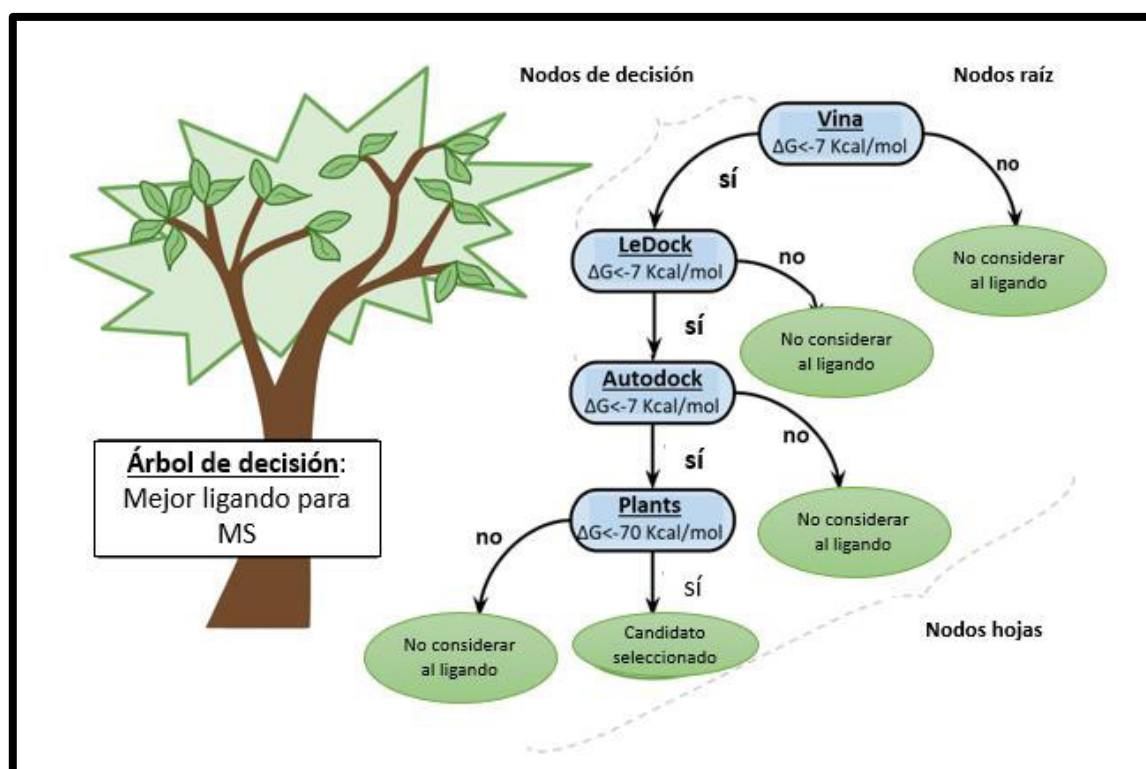


Fig. N° 7: Árbol de decisión para elegir los mejores ligandos anti-Malato Sintasa según la energía libre de unión (ΔG).

IV.4.3 Análisis de los complejo ligando- receptor obtenidos

Una vez obtenido los mejores ligandos, estos se analizarán en cuanto a sus propiedades farmacocinéticas, semejanza a las drogas y compatibilidad con la química médica de los mejores ligandos en el programa SwissADME¹⁰⁵, la herramienta web permite el cálculo de parámetros fisicoquímicos, farmacocinéticos, similares a fármacos y relacionados para una o varias moléculas. En este programa se evaluó la lipofilicidad, debido a la

importancia crítica de esta propiedad fisicoquímica para el descubrimiento farmacocinético de fármacos. Así mismo las reglas de Lipinsky las cuales predicen una alta probabilidad de éxito o fracaso debido a la semejanza con el fármaco para moléculas que cumplen con 2 o más de las siguientes reglas: masa molecular inferior a 500 Dalton, alta lipofilia (expresada como LogP inferior a 5), menos de 5 donantes de enlaces de hidrógeno, menos de 10 aceptores de enlaces de hidrógeno y la refractividad molar debe estar entre 40-130.

Una vez analizadas las propiedades de los complejos enzima-ligando que obtuvieron los mejores puntajes, finalmente, los mejores complejos enzima/ligando se refinaron y optimizaron en el programa Yasara Structure¹⁰² y luego se analizaron las interacciones moleculares en el programa PoseView¹⁰⁶, la cual es una herramienta que genera automáticamente diagramas de estructura 2D con calidad de publicación de complejos proteína-ligando proporcionados como entrada 3D. Tal entrada puede provenir directamente de estructuras cristalinas o ser computada, por ejemplo, por un programa de acoplamiento.

IV.5. Análisis estadístico

Procesamiento y análisis de datos mediante gráficos de dispersión, histogramas, tablas u otros recursos presentes en el programa Microsoft Excel.

V. RESULTADOS

V.1 Presentación y análisis de los resultados

V.1.1 Desarrollo y análisis de la estructura tridimensional de la enzima malato sintetasa de *Candida albicans*

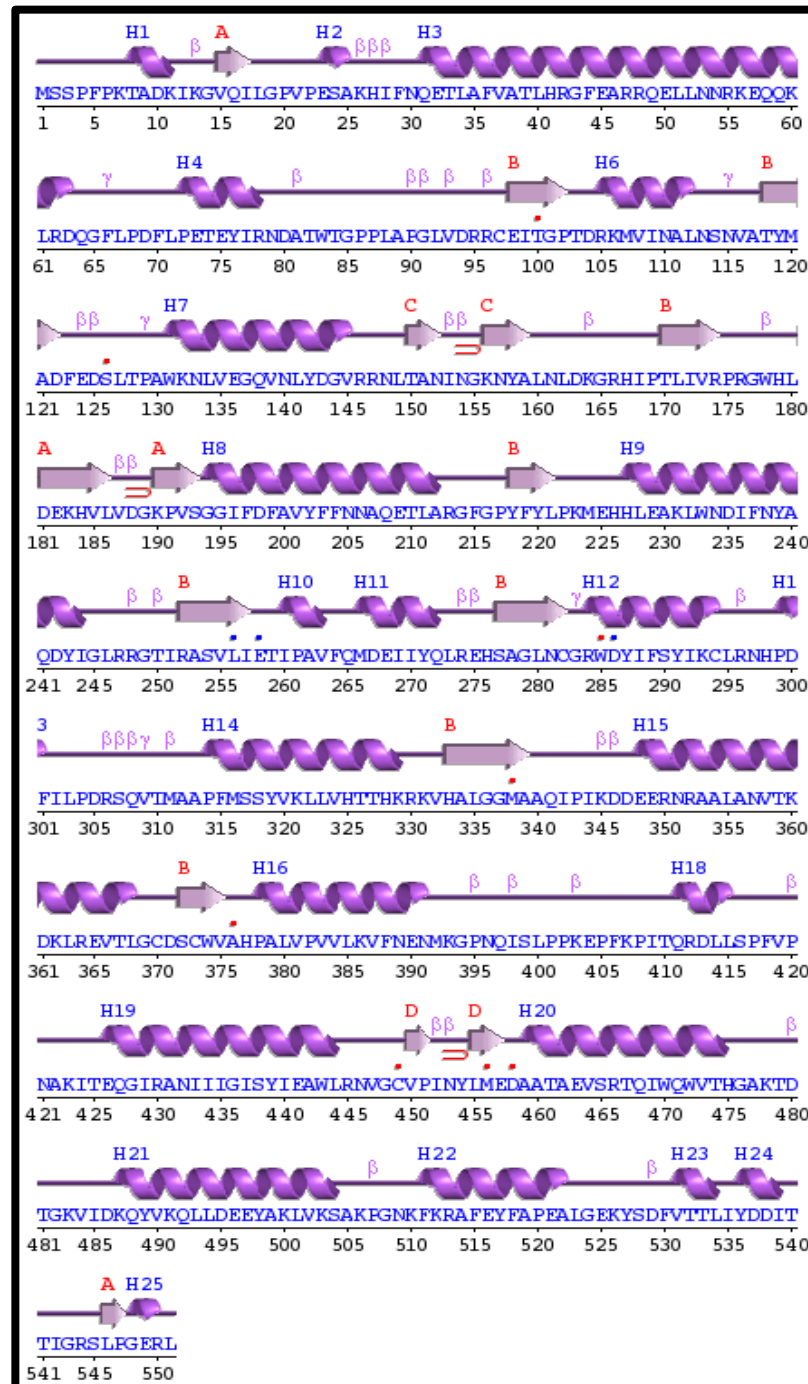


Fig. N° 8: Diagramas esquemáticos de la estructura primaria y secundaria de la malato sintetasa de *Candida albicans* (imagen generada en la aplicación PDBsum).

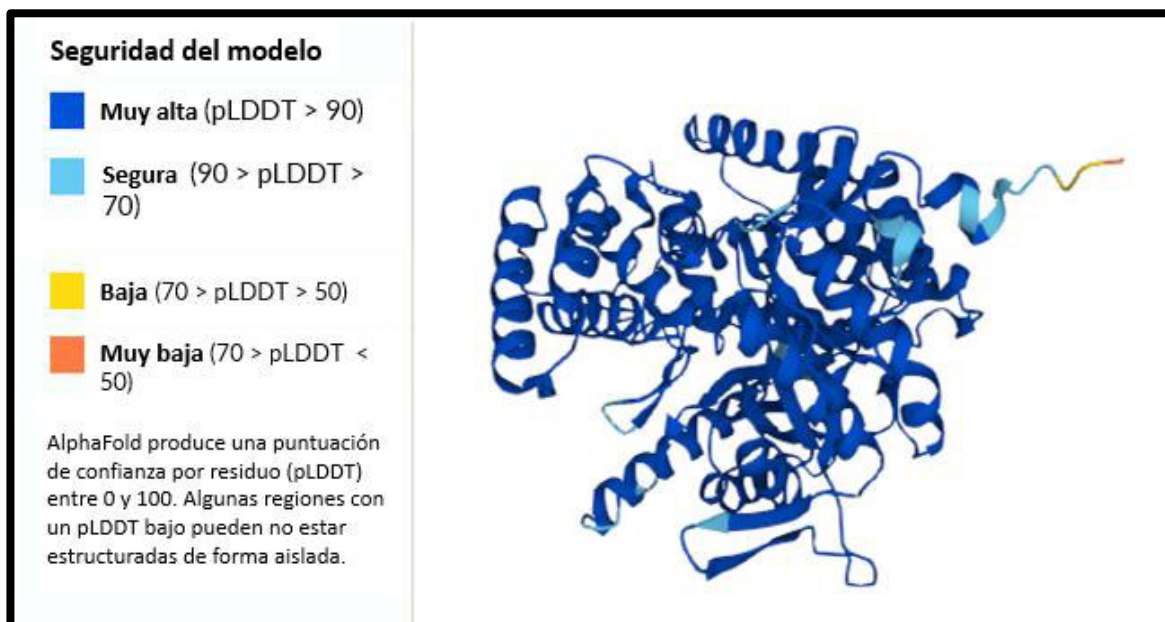


Fig N° 9: Estructura Tridimensional de la enzima malato sintetasa (cepa SC5314 / ATCC MYA-2876) de *Candida albicans* obtenida en Alphafold (visualizada en Uniprot: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q5APD2/entry#structure>)

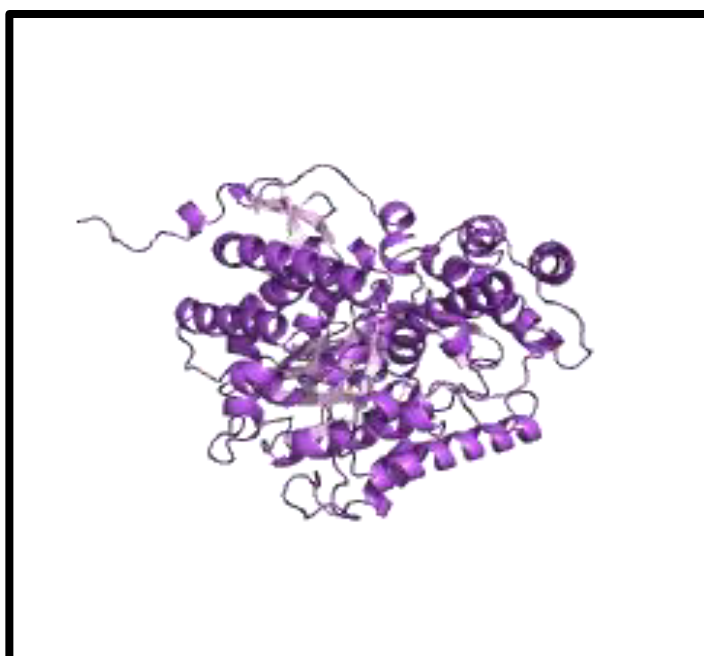


Fig N° 10: Estructura Tridimensional de la enzima malata sintetasa de *Candida albicans* optimizada en Yasara Structure (Visualizada en PDBSum: <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/Generate.html>)

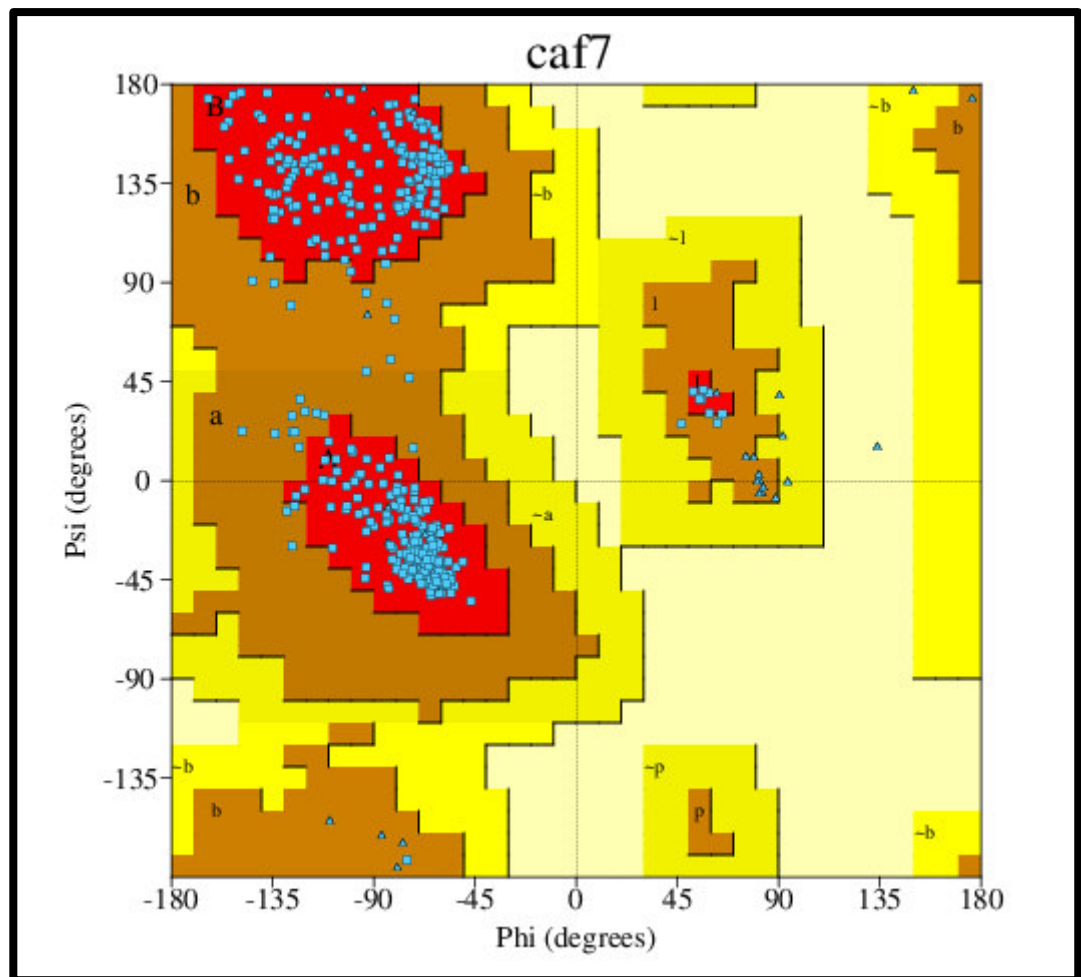
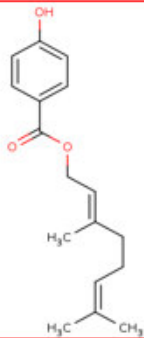


Fig. N° 11: Diagrama de Ramachandran de PROCHECK que muestra la distribución de la cadena principal de la enzima malato sintasa de *Candida albicans*. Regiones más favorecidas [A,B,L] : representan un 94,4%. Regiones adicionales permitidas [a,b,l,p] representan un 5,6 %.

V.1.2 Obtención de la información de los 2223 compuestos de la base de datos NuBBE

a) 

b) Species: Piperaceae Piper crassinervium; Araraquara-SP;

Source(s): Biotransformation product

References: DOI: 10.1016/j.biortech.2010.01.041; LÓPEZ, S. N.; LOPES, A. A.; BATISTA JR, J. M.; FLAUSINO JR, O. A.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Geranylation of benzoic acid derivatives by enzymatic extracts from Piper crassinervium (Piperaceae). Bioresource Technology, v. 101, p. 4251–4260. 2010.

c) Biological properties: Inhibition of Protease, Antiviral

Files: NuBBE_4_obabel.mol [Download](#), NuBBE_4_obabel_3D.mol2 [Download](#)

d) Common Name: p-hydroxybenzoic acid-geranyl ester

e) IUPAC Name: (2E)-3,7-dimethylocta-2,6-dien-1-yl 4-hydroxybenzoate

Inchi: 15/C17H22O3/c1-13(2)5-4-6-14(3)11-12-20-17(19)15-7-9-16(18)10-8-15/h5,7-11,18H,4,6,12H2,1-3H3/b14-11+

Inchikey: ZMIOERHZBVFLW-SDNWHVSQSA-N

Chemical Class: Aromatic derivatives -

Mol. Formula: C17H22O3

f) SMILES: OC1=CC=C(C(OC/C=C(C)/CC/C=C(C)/C)=O)C=C1

Molecular Mass	274.3548
Monoisotopic Mass	274.1569
cLogP	5.150
TPSA	46.533
Lipinski Violations	1
H-bond acceptors	3
H-bond donors	1
Rotatable Bonds	7
Molecular Volume	274.952

Additional Info

Fig. N° 12: Obtención de los datos de importancia: a) estructura, b) Especies, c) Propiedades biológicas d) Nombre común, e) Nombre IUPAC, f) SMILES de los compuestos de la librería de la base de datos NuBBE

V.1.3 Análisis de los programas a utilizar y cribado virtual de los candidatos anti-MS

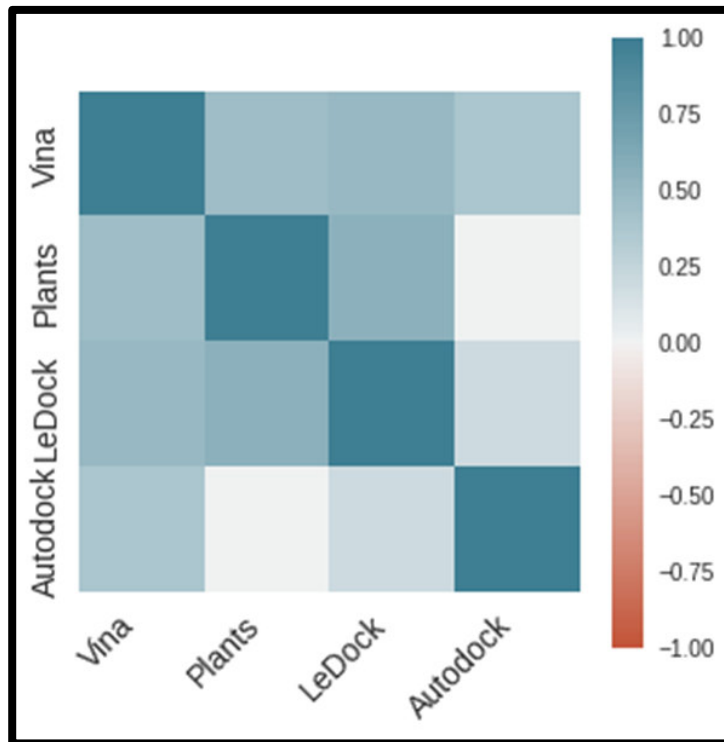


Fig. N° 13: Correlación entre los resultados de acoplamiento obtenidos con los programas Vina, Plants, LeDock y Autodock

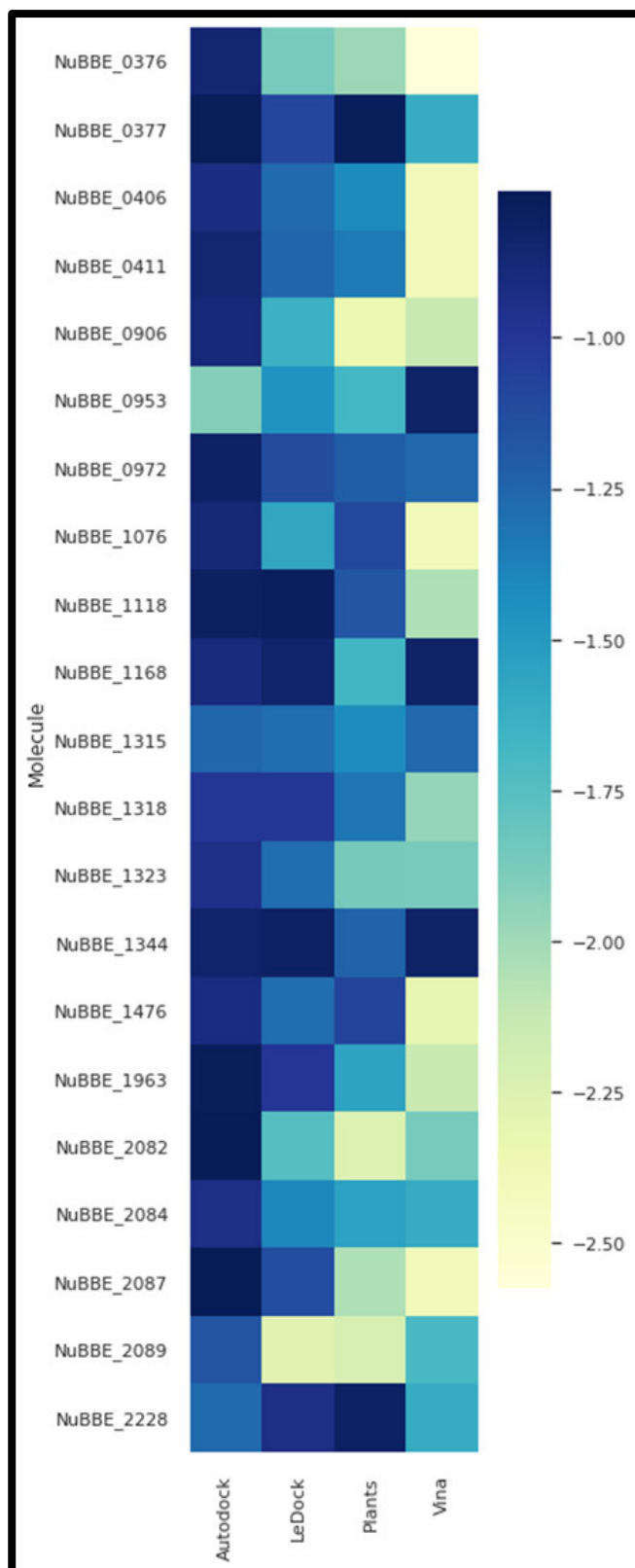


Fig. N° 14: Mapa de calor de la energía libre estandarizada de los valores de unión (puntaje Z) después de los procedimientos de acoplamiento con los programas de acoplamiento usados teniendo en cuenta solo los ligandos con puntaje z inferior a -0.75.

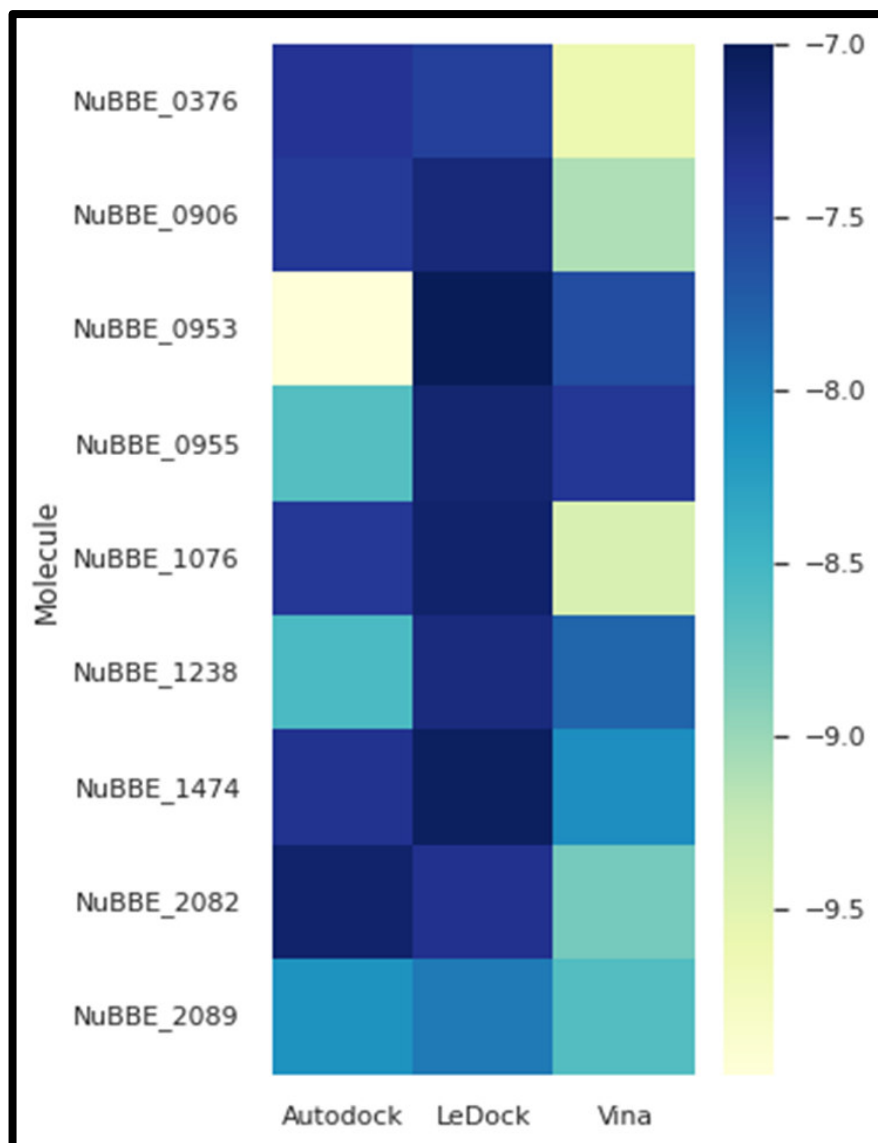


Fig. N° 15: Mapa de calor de la energía libre absoluta de los valores de unión después de los procedimientos de acoplamiento con los programas Autodock, LeDock y Vina, considerando el procedimiento del árbol de decisión para seleccionar los mejores candidatos para la unión a la malato sintasa.

V.1.3 Caracterización y análisis de las propiedades de las interacciones moleculares de los candidatos anti-MS

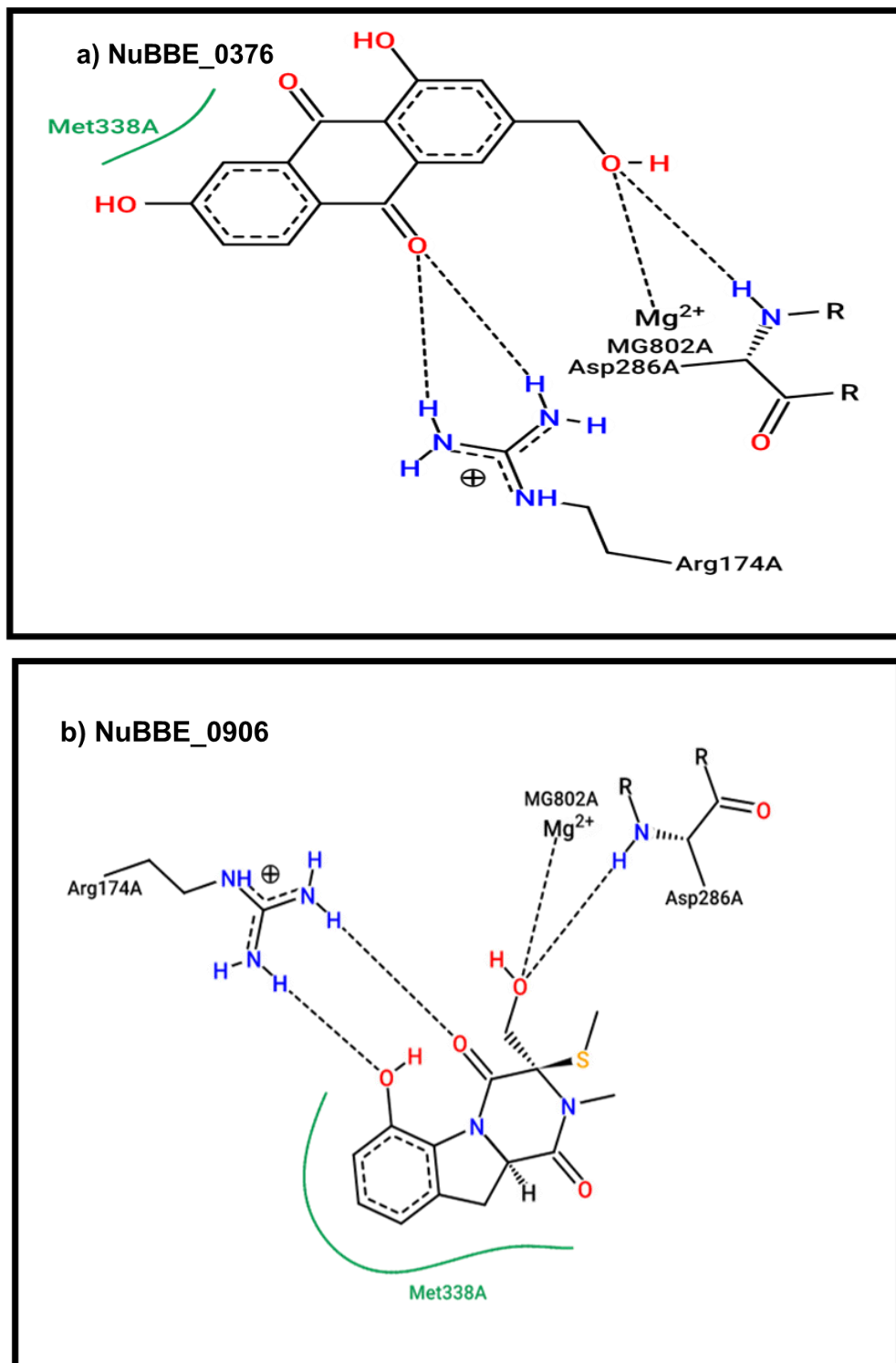


Fig N° 16.1: Estructuras 2D de los complejos anti-MS - malato sintasa de *Candida albicans* visualizados en PoseView. a) NuBBE_0376 (1,7-dihydroxy-3-hydroxymethyl-9,10-anthraquinone) b) NuBBE_0906 (Colletopiperazine)

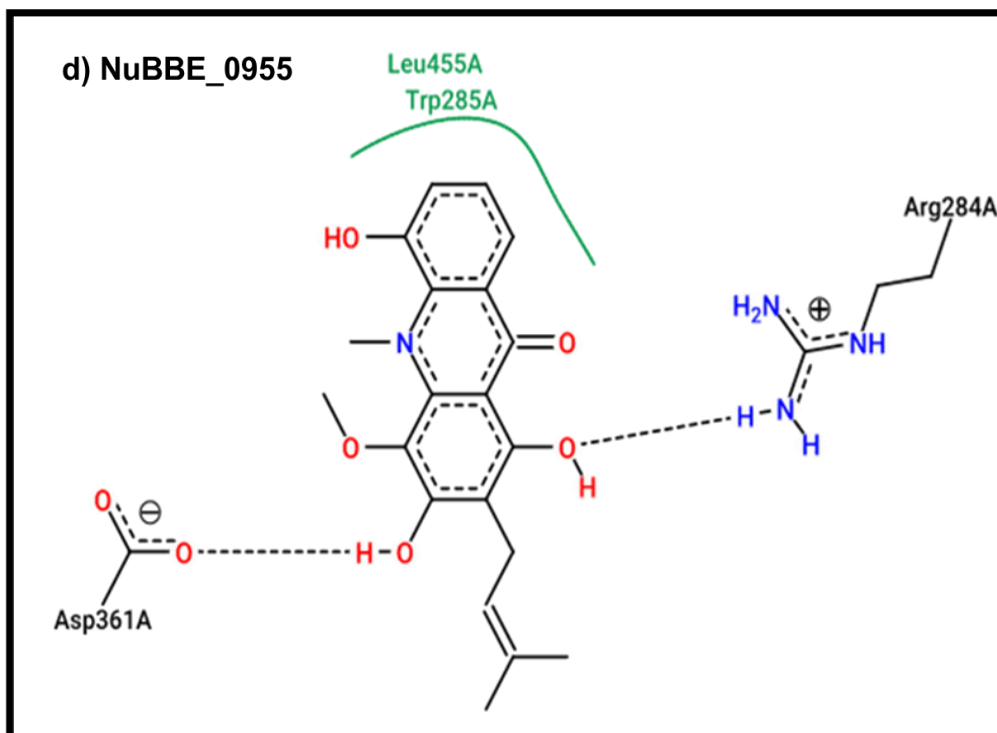
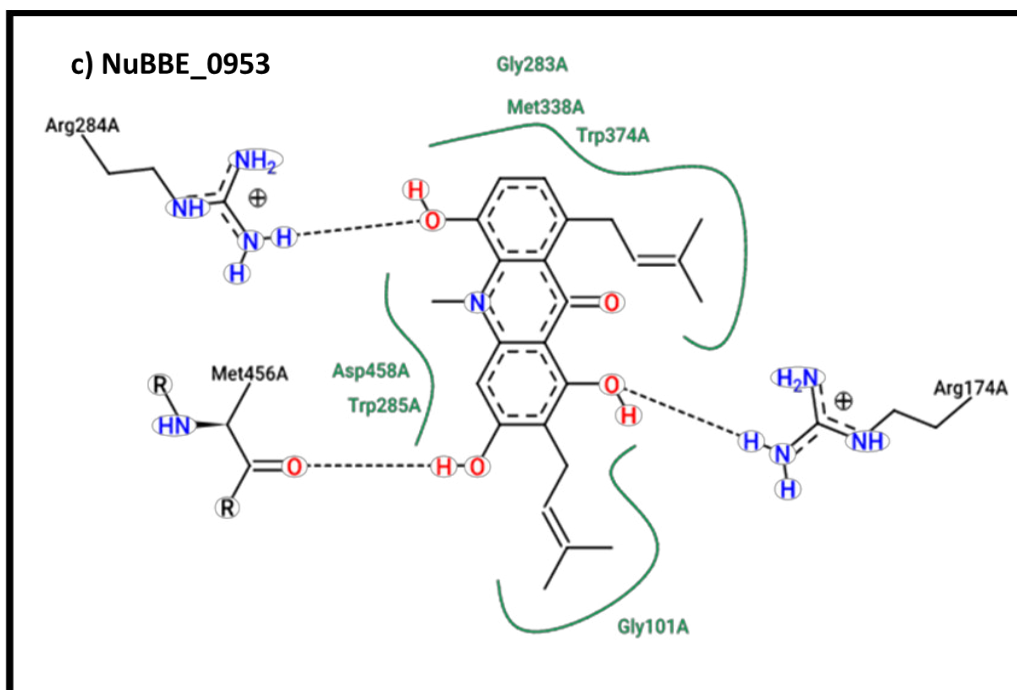


Fig. N° 16.2: Estructuras 2D de los complejos anti-MS - malato sintasa de *Candida albicans* visualizados en PoseView. c) NuBBE_0953 (Glycocitrine-IV) d) NuBBE_0955 (1,3,5-trihydroxy-2,8-bis(3-methylbut-2-enyl)-10-methyl-9-acridone)

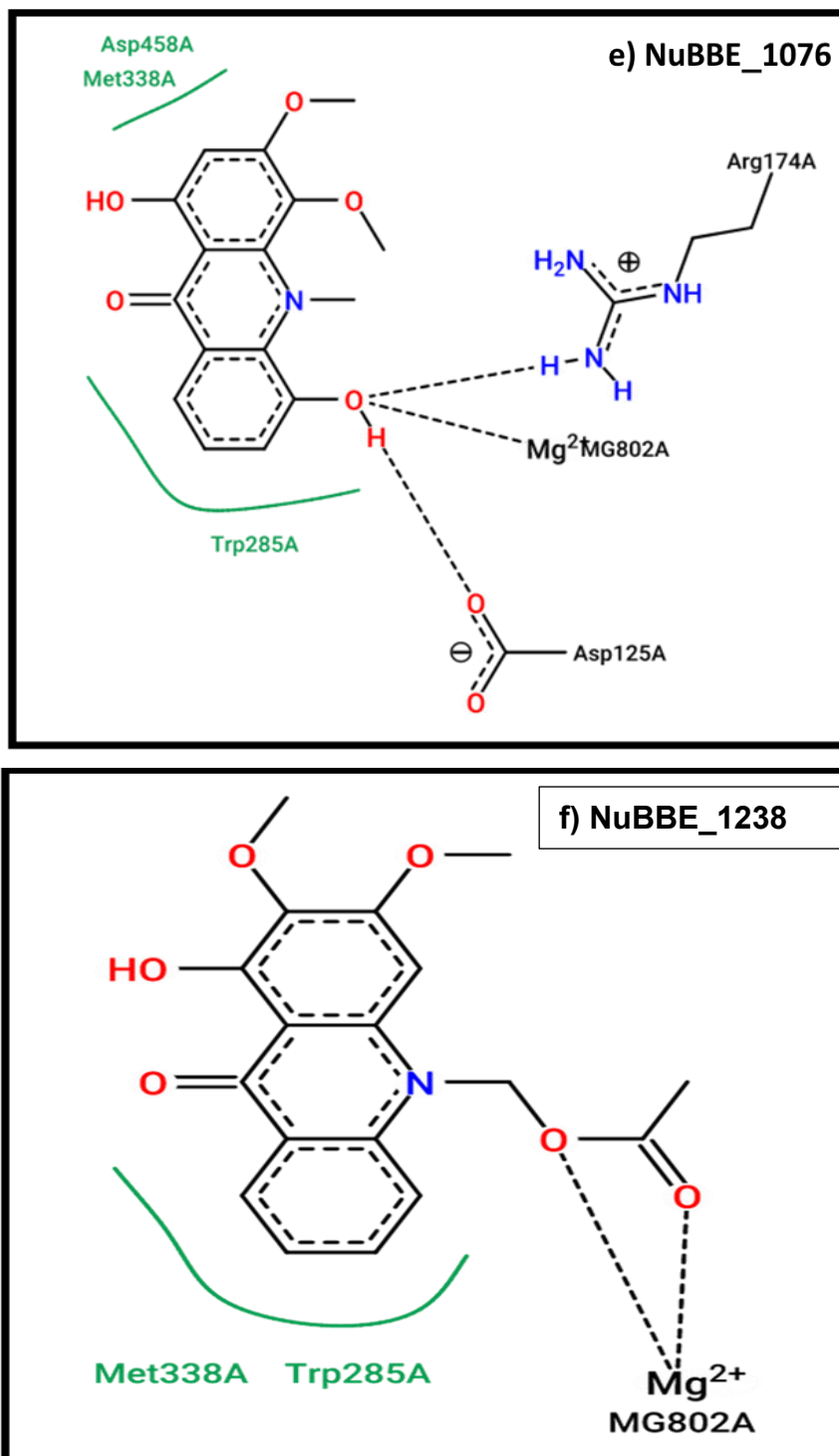


Fig N° 16.3: Estructuras 2D de los complejos anti-MS - malato sintasa de *Candida albicans* visualizados en PoseView. e) NuBBE_1076 (Citrusinine-II) f) NuBBE_1238 (Toddaliopsin C)

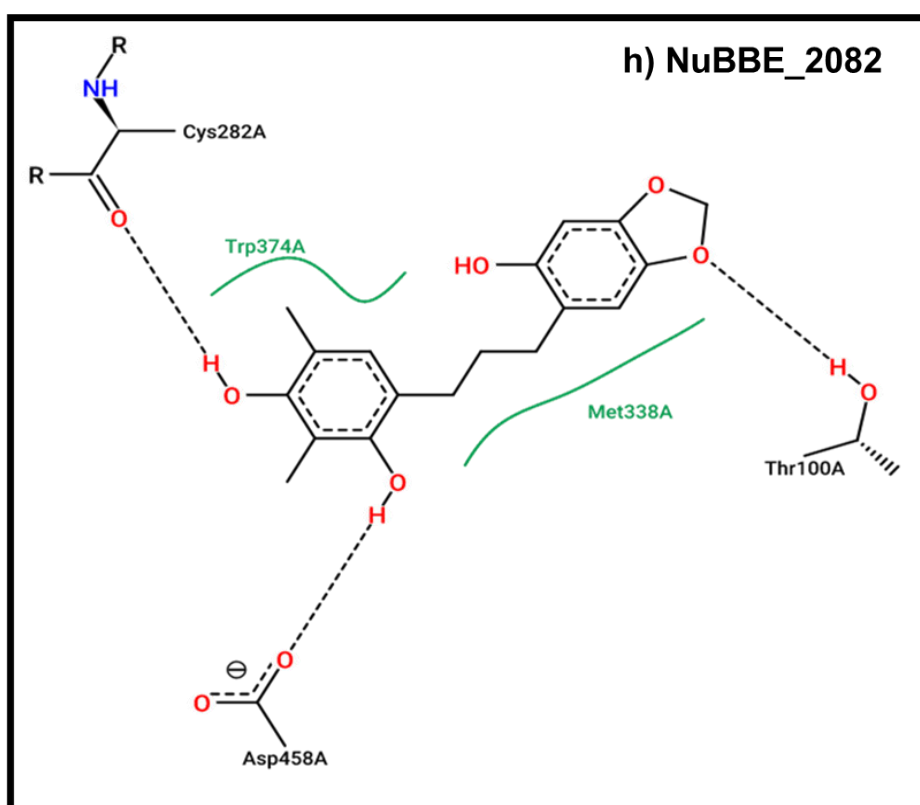
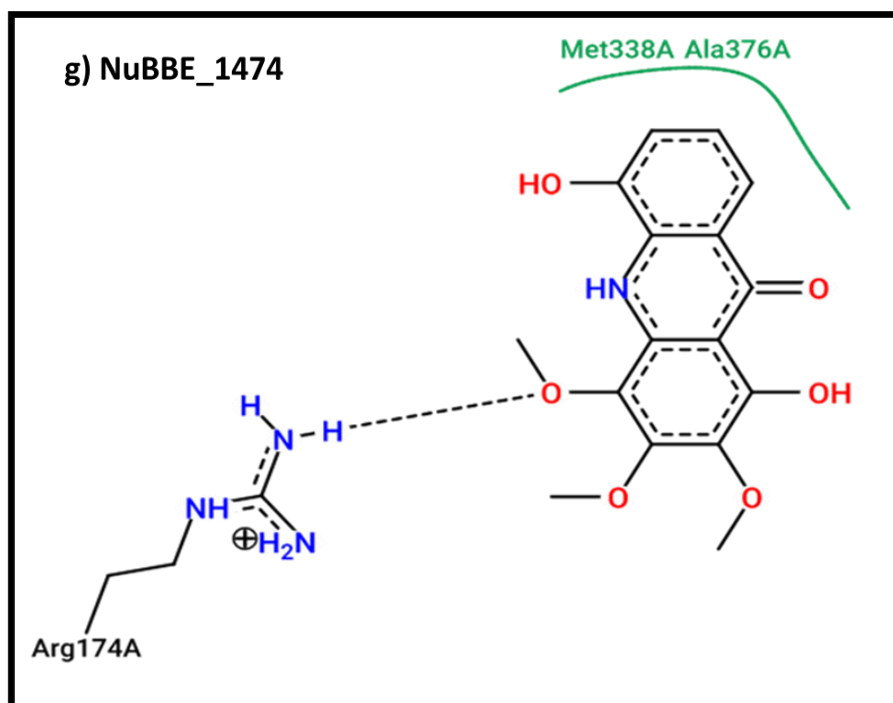


Fig N° 16.4: Estructuras 2D de los complejos anti-MS - malato sintasa de *Candida albicans* visualizados en PoseView. g) NuBBE_1474 (Citbrasine) h) NuBBE_2082 (4-(3-(5-hydroxybenzo[d][1,3]dioxol-6-yl)propyl)-2,6-dimethylbenzene-1,3-diol)

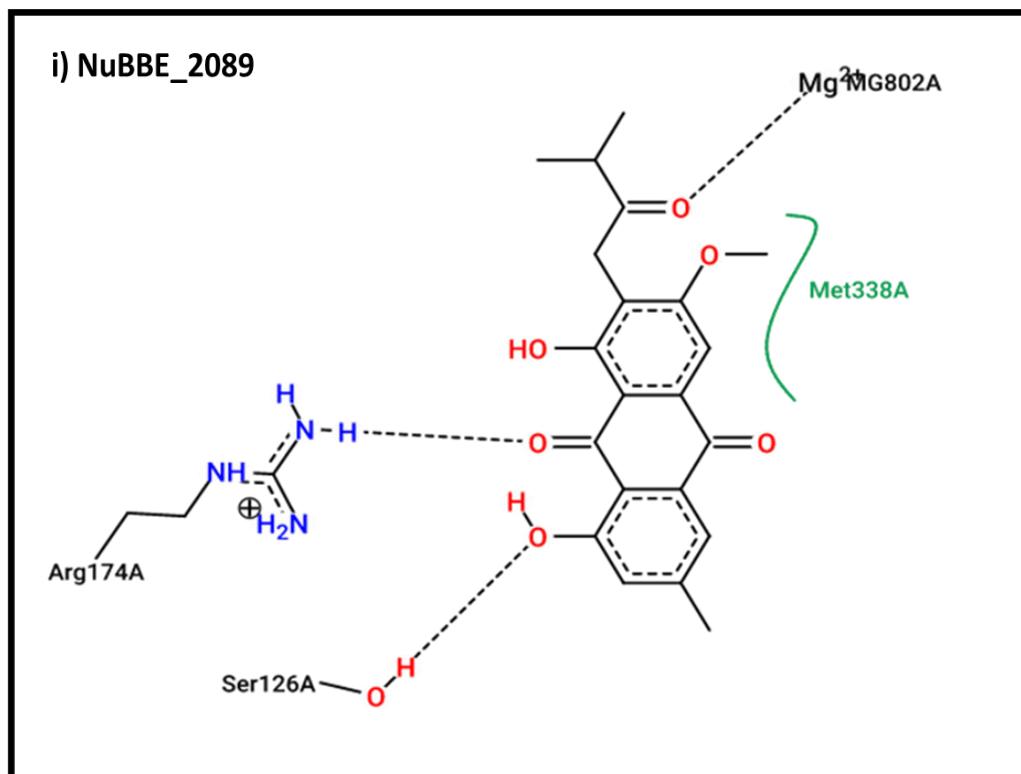


Fig N° 16.5: Estructuras 2D de los complejos anti-MS - malato sintasa de *Candida albicans* visualizados en PoseView. i) NuBBE_2089 (Vismiaquinone B)

Tabla N ° 2: Interacción de los aminoácidos de la enzima malato sintasa con los 9 mejores ligandos

Ligando	Arg 174	Ser 126	Cys 282	Thr 100	Asp 458	Asp 125	Arg 284	Met45 6	Asp 361	Asp 286	Met 338	Leu 455	Trp 285	Gly 283	Trp 374	Gly 101	Ala 376	Mg ²⁺
NuBBE_0376	HB									HB	Vd W							C
NuBBE_0906	HB									HB	Vd W							C
NuBBE_0953	HB				Vd W		HB	HB			Vd W		Vd W	Vd W	Vd W	Vd W		
NuBBE_0955							HB		HB			Vd W	Vd W					
NuBBE_1076	HB				Vd W	HB					Vd W		Vd W					C
NuBBE_1238											Vd W		Vd W					C
NuBBE_1474	HB										Vd						Vd	

											W						W	
NuBBE_2082			HB	HB	HB						Vd W				Vd W			
NuBBE_2089	HB	HB									Vd W							C

Nota: (HB: Puente hidrógeno, VdW: interacción de Van der Waals, C: coordinación a metal)

Tabla N° 3: Propiedades farmacocinéticas de los 9 candidatos anti-MS

Ligandos	Afinidad de VINA	N°Rb	Puntuación B	Propiedades similares a las de las drogas (regla de cinco de Lipinski)				
				Log P	Molar R.	N° enlace H a.	N° enlace H d.	Violación
NuBBE_0376	-9.6	1	0.55	1.44	69.92	5	3	0
NuBBE_0906	-9.1	2	0.55	0.57	86.38	4	2	0
NuBBE_0953	-7.6	4	0.55	4.64	120.49	4	3	0
NuBBE_0955	-7.4	3	0.55	3.19	103.26	5	3	0
NuBBE_1076	-9.4	2	0.55	2.04	84.01	5	2	0
NuBBE_1238	-7.8	5	0.55	2.41	92.88	6	1	0
NuBBE_1474	-8.1	3	0.55	2.02	85.6	6	3	0
NuBBE_2082	-8.8	4	0.55	2.31	87.57	5	3	0
NuBBE_2089	-8.6	4	0.55	3.03	4.54	6	2	0

Rb: enlaces rotativos, B.score: puntuación de biodisponibilidad, Molar R.: refractividad molar, enlace N°H a.: N° aceptores de H, enlace N°H d.: N° donadores de

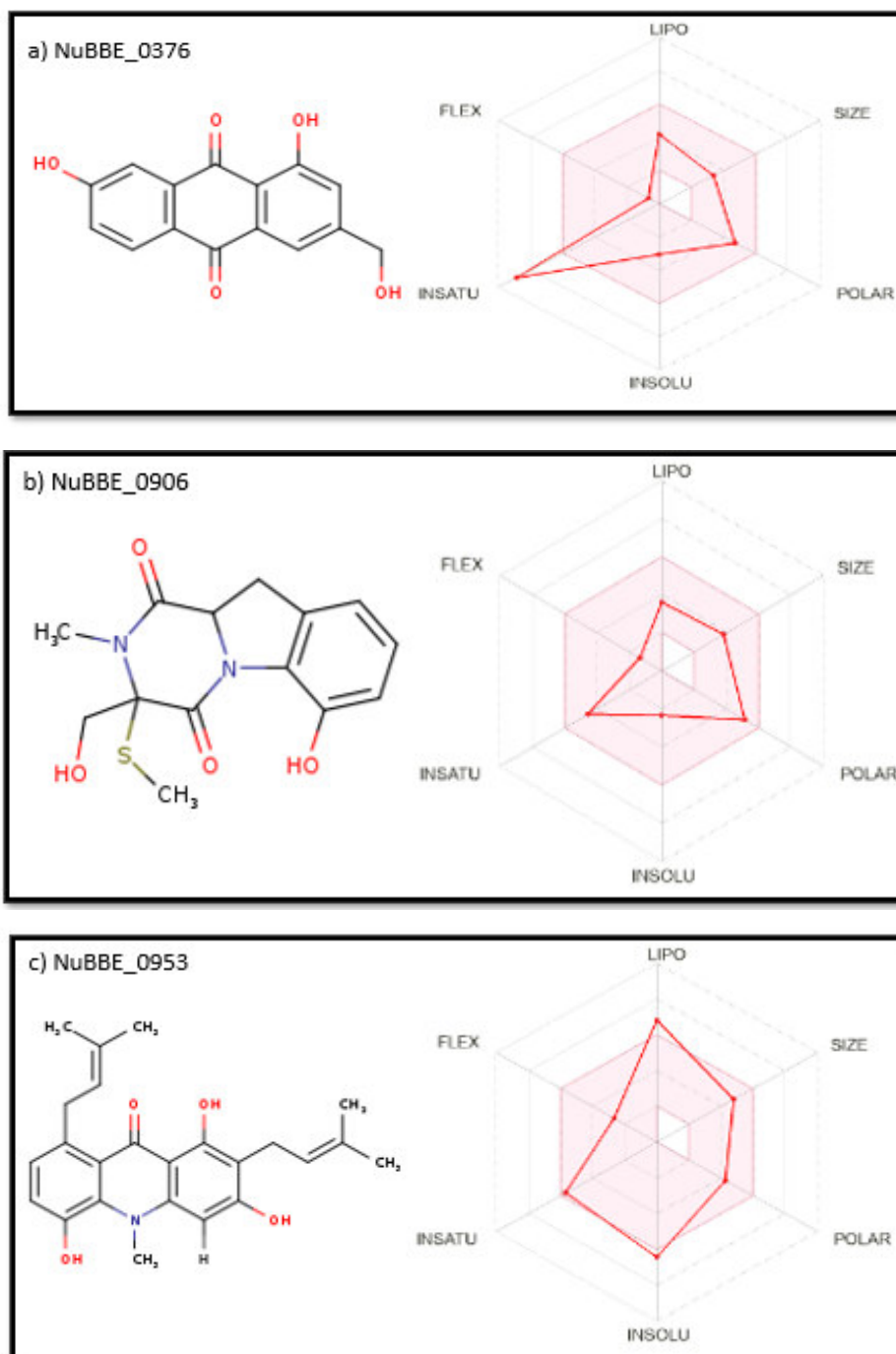


Fig. N° 17.1: Radar de biodisponibilidad de NuBBE_0376, NuBBE_0906 y NuBBE_0953. El área rosa representa el rango óptimo para cada propiedad (lipofilia: XLOGP3 entre -0.7 y +5.0, tamaño: PM entre 150 y 500 g/mol, polaridad: TPSA entre 20 y 130 Å², solubilidad: log S no superior a 6, saturación: fracción de carbonos en la hibridación sp³ no inferior a 0,25, y flexibilidad: no más de 9 enlaces giratorios).

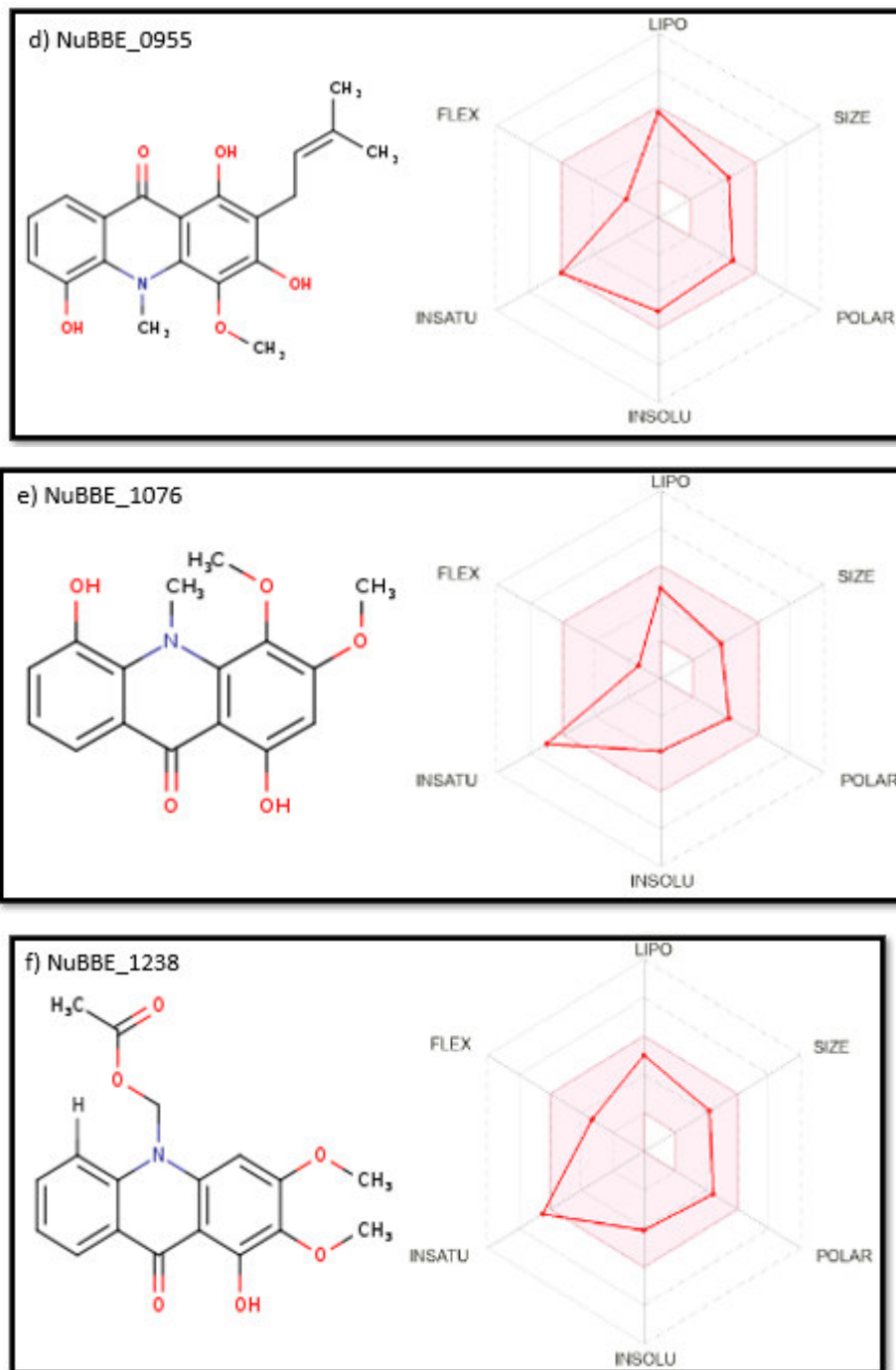


Fig. N° 17.2: Radar de biodisponibilidad de NuBBE_0955, NuBBE_1076 y NuBBE_1238. El área rosa representa el rango óptimo para cada propiedad (lipofilia: XLOGP3 entre -0.7 y $+5.0$, tamaño: PM entre 150 y 500 g/mol, polaridad: TPSA entre 20 y 130 Å², solubilidad: log S no superior a 6, saturación: fracción de carbonos en la hibridación sp³ no inferior a 0,25, y flexibilidad: no más de 9 enlaces giratorios).

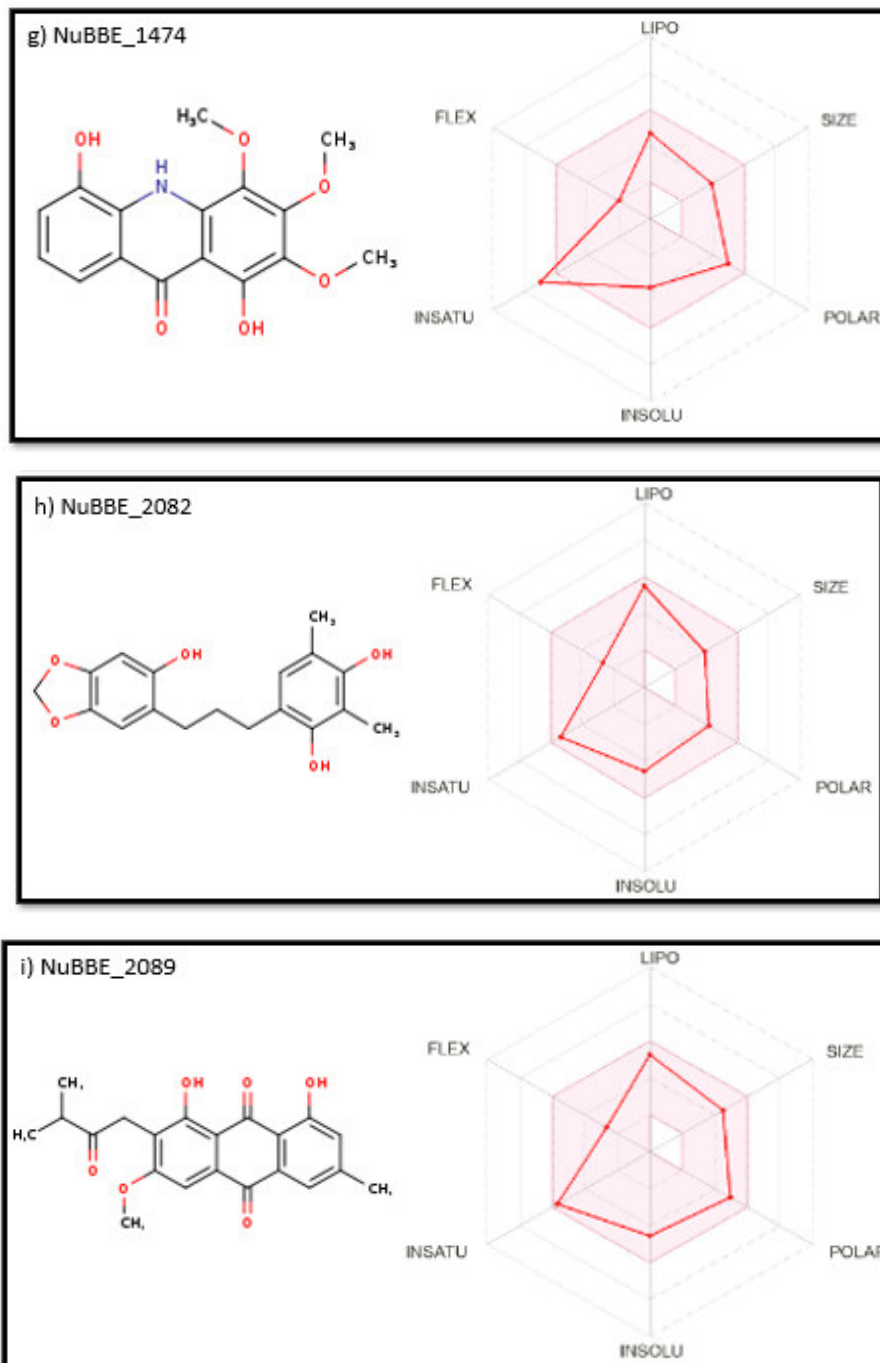


Fig. N° 17.3: Radar de biodisponibilidad de NuBBE_1474, NuBBE_2082 y NuBBE_2089. El área rosa representa el rango óptimo para cada propiedad (lipofilia: XLOGP3 entre -0.7 y $+5.0$, tamaño: PM entre 150 y 500 g/mol, polaridad: TPSA entre 20 y 130 Å², solubilidad: log S no superior a 6, saturación: fracción de carbonos en la hibridación sp³ no inferior a 0,25, y flexibilidad: no más de 9 enlaces giratorios).

VI. DISCUSIÓN

La enzima malato sintasa es una de las enzimas clave del ciclo del glioxilato, que permite que *C. albicans* sobreviva en medios agotados de glucosa y establezca candidiasis¹⁰⁷. Así mismo, malato sintasa es esencial para la virulencia de los patógenos, y se ha explorado como un posible objetivo farmacológico en algunos de ellos^{9,49}. Además, debido a que no existe un ortólogo humano conocido de esta enzima⁷, es un objetivo antifúngico atractivo para el descubrimiento de nuevos fármacos, con toxicidad y efectos secundarios adversos mínimos, para tratar la candidiasis. En este estudio, examinamos e identificamos posibles inhibidores de malato sintasa a partir de una librería de 2223 compuestos de productos naturales, NuBBE (Centro de Bioensayos, Biosíntesis y Eco fisiología de Productos Naturales)⁹³ como posibles fármacos antimicóticos para tratar la candidiasis. Estos productos naturales seleccionados son compuestos terpénicos, alcaloides, flavonoides, los cuales se encuentran entre los principales metabolitos secundarios de las plantas⁹³. La detección de estos compuestos derivados de plantas en busca de fármacos antifúngicos es un enfoque más prometedor, ya que se sabe que tienen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas¹⁰⁸.

VI.1 Predicción la estructura tridimensional de la enzima malato sintetasa de *Candida albicans*

Para predecir la estructura tridimensional de la enzima malato sintetasa de *Candida albicans* y su sitio de unión a ligandos se usó la estructura generada por programa de inteligencia artificial AlphaFold, debido a que es un enfoque novedoso de aprendizaje automático que incorpora conocimientos físicos y biológicos sobre la estructura de las proteínas, aprovechando las alineaciones de múltiples secuencias, en el diseño del algoritmo de aprendizaje profundo⁶⁵. AlphaFold produce una estimación por residuo de su confianza en una escala de 0 a 100. Esta medida de confianza se denomina pLDDT y corresponde a la puntuación predicha del modelo en la métrica IDDT-C α . Las regiones con confianza muy alta (pLDDT > 90) están coloreadas de azul oscuro,

las regiones predichas con confianza ($90 > \text{pLDDT} > 70$) son de color azul claro, las regiones de confianza baja ($70 > \text{pLDDT} > 50$) son de color amarillo y las regiones de confianza muy baja ($\text{pLDDT} < 50$) son de color naranja^{65,109,110}. En nuestra estructura generada (Fig. N° 9), debido a que la estructura en su mayoría está coloreada de color azul oscuro, nos hace suponer que presenta una puntuación de confianza (pLDDT) > 90 y que la seguridad del modelo es muy alta.

La estructura generada en AlphaFold fue evaluada en la herramienta PROCHECK presente en el servidor de análisis de proteínas PDBSum¹¹¹. PROCHECK evalúa la geometría de cada proteína, destacando las regiones que son de alguna manera inusuales (y posiblemente incorrectas) a través del diagrama de Ramachandran. Este diagrama indica rápidamente cuántos de los residuos de la estructura se encuentran en conformaciones "no permitidas", proporcionando así una idea de su calidad general, según un análisis de 118 estructuras de resolución de al menos 2,0 Angstroms y un factor R no superior a 20,0, se esperaría que un modelo de buena calidad tuviera más del 90 % en las regiones más favorecidas (A,B,L) para considerarse de buena calidad⁹⁴. En la evaluación de la enzima de malato sintasa generada según el diagrama de Ramachandran, se puede observar (Fig N° 11) el modelo es de buena calidad ya que el 94% de los aminoácidos de la enzima cae en las regiones más favorecidas (A,B y L). La estructura secundaria (Fig, N° 8) fue evaluada utilizando la herramienta Promotif¹¹² presente en el servidor de análisis de proteínas PDBSum, en donde se muestra que dicha estructura tiene 551 residuos de aminoácidos, 72 son hojas, 250 hélices alfa, 12 de 3-10 hélices, 217 otros. Estos aminoácidos se han agrupado en 4 hojas, 5 unidades beta alfa beta, 3 horquillas beta, 2 protuberancias beta, 16 hilos, 25 hélices, 37 interacciones hélice-hélice, 37 giros beta y 5 giros gamma.

VI.2 Cribado computacional de potenciales inhibidores de la enzima malato sintasa de *Candida albicans* por el método de acoplamiento molecular “docking”

La búsqueda de nuevas estructuras químicas y novedosos andamios estructurales con aplicaciones en las áreas terapéuticas es siempre el corazón de la química farmacéutica. En la actualidad, el cribado virtual es una herramienta informática de gran importancia que se usa ampliamente para predecir la unión de una gran base de datos de ligandos a un objetivo en particular, con el objetivo de identificar los compuestos más prometedores de la base de datos para su posterior estudio⁹². Una de las técnicas del cribado virtual es el acoplamiento molecular, este es una herramienta clave en biología molecular estructural y diseño de fármacos asistido por computadora. El objetivo del acoplamiento ligando-proteína es predecir los modos de unión predominantes de un ligando con una proteína de estructura tridimensional conocida. Los métodos de acoplamiento exitosos buscan espacios de alta dimensión de manera efectiva y utilizan una función de puntuación que clasifica correctamente los acoplamientos candidatos. El acoplamiento se puede usar para realizar un cribado virtual en grandes bibliotecas de compuestos, clasificar los resultados y proponer hipótesis estructurales de cómo los ligandos inhiben el objetivo, lo que es invaluable en la optimización de prospectos¹¹³.

En el desarrollo del presente trabajo se utilizaron 4 programas de acoplamiento molecular, Autodock, Vina, LeDock y Plants. La correlación de estos programas según la evaluación del puntaje z se reporta mediante un mapa de calor (figura N° 12), en dicho mapa se visualiza que hay una mejor correlación Vina, Autodock y Plants, mientras que Autodock es el que muestra una baja correlación con los otros tres programas esto se puede deber a que la ecuaciones que gobierna la predicción de las interacciones son diferentes, así mismo, según los resultados indicados en el estudio realizado por Çınaroğlu y Timuçin (2019)¹¹⁴ Plants (80 %) seguido de LeDock (77 %), y Vina (73 %) tenían los algoritmos de pose más precisos, mientras que

AutoDock4 (48 %) fue el menos exitoso. Chang y colaboradores (2010) en su estudio compararon Autodock y Vina, y hallaron que, en un sentido amplio, la ventaja de Vina sobre Autodock se debe a la representación molecular, función de puntuación y algoritmo de búsqueda; como Autodock y Vina usan los mismos archivos de entrada para el receptor y el ligando, las diferencias en la representación no son un factor. Las funciones de puntuación y los algoritmos de búsqueda, por otro lado, comparten similitudes en su forma general, pero tienen distintas implementaciones¹¹⁵.

Para obtener los compuestos naturales candidatos que podrían ser potentes inhibidores de la enzima malato sintasa de *Candida albicans*, se obtuvo el mapa de calor de los puntaje Z (Figura N° 14) generados a partir de los valores de la energía libre de unión predichos en los cálculos de docking. Se usó el puntaje Z para normalizar los resultados de los puntajes de energía libre de unión de los ligandos al receptor obtenidos por los 4 programas, con el propósito de analizarlos comparativamente. Sastry y colaboradores (2013)¹¹⁶ consideraron que las puntuaciones Z son particularmente útiles porque indican cuántas desviaciones estándar un valor está por encima o por debajo de la media de una distribución. El puntaje Z es una cantidad adimensional derivada de restar la media de la población de un puntaje bruto individual y luego dividir la diferencia por la desviación estándar de la población. Además, la puntuación Z se puede convertir directamente en un rango porcentual dentro de la distribución, donde 1σ por encima de la media (σ es una desviación estándar) representa el 84,1 % superior de la distribución, 2σ representa el 97,7 % superior, 3σ representa el 99,9% superior, etc¹¹⁶ ; así mismo, la fórmula de puntuación Z esencialmente elimina la energía fondo y, por lo tanto, una puntuación Z más baja puede indicar una alta afinidad de unión¹¹⁷. La normalización de los datos permite cuantificar la importancia de una puntuación de acoplamiento; sin embargo, como una única distribución normal se ajusta a todos los puntajes de acoplamiento, la normalización

no induce un orden de clasificación diferente del obtenido con los puntajes de acoplamiento sin procesar¹¹⁸. Se realizó esta normalización porque los puntajes de docking generados por el programa PLANTS no son comparables en términos absolutos con los de los demás programas. En la figura se consideró a los ligandos con puntaje inferior a -0.75. El análisis en términos de los valores absolutos para las energías libres de unión predichas pro docking molecular, se realizó con los resultados de los programas Ledock, Autodock y Vina, porque a pesar de que las ecuaciones de los campos de fuerza no son exactamente iguales¹¹⁹, son comparables (Figura N° 15).

Después de realizar el cribado molecular de los compuestos en los programas de acoplamiento molecular, se seleccionó los ligandos con mejores puntajes de unión a la enzima malato sintasa, de acuerdo con la técnica aprendizaje no supervisado de árbol de decisión, para el caso de los programas Vina, Ledock y Autodock se tomaron los valores de la energía libre de unión (ΔG) menor a -7kcal/mol y para Plants se consideró $\Delta G < -70$ kcal/mol. Según esta condición, 9 compuestos cumplían con este requisito, los cuales son los siguientes: NuBBE_0376, NuBBE_0906, NuBBE_0955, NuBBE_0953, NuBBE_1076, NuBBE_1823, NuBBE_1474, NuBBE_2082, NuBBE_2089, sus nombres comunes correspondientes son los siguientes 1,7-dihydroxy-3-hydroxymethyl-9,10-anthraquinone, Colletopiperazine, Glycocitrine-IV, 1,3,5-trihydroxy-2,8-bis(3-methylbut-2-enyl)-10-methyl-9-acridone, Citrusinine-II, Toddaliopsin C, citbrasine, 4-(3-(5-hydroxybenzo[d][1,3]dioxol-6-yl)propyl)-2,6-dimethylbenzene-1,3-diol, Vismiaquinone B.

VI.3 Análisis de los resultados obtenidos por las técnicas de acoplamiento molecular Docking

Un primer análisis fue la determinación de las interacciones intermoleculares predichas para los mejores ligandos, posibles candidatos a inhibidores de la enzima malato sintasa. Con este propósito las estructuras de los complejos ligando-receptor generados por Docking usando el programa Vina para los 9 compuestos seleccionados, fueron evaluados con la herramienta PoseView¹²⁰ (Figura N° 16). Los resultados del análisis (Tabla N° 2) muestran que, 1,7-dihydroxy-3-hydroxymethyl-9,10- anthraquinone (Fig. 16.1 a) interactúa con Arg174 y Asp286 mediante enlace puente de hidrógeno, con el residuo Met338 mediante interacción de Van der Waals y presenta enlace de coordinación a metal con el Mg²⁺. Colletopiperazine (Fig. 16.1 b) presenta las mismas interacciones que 1,7-dihydroxy-3-hydroxymethyl-9,10- anthraquinone. Glycocitrine-IV (Fig. 16.2 c) es la que presenta interacción de Van der Waals con la mayor cantidad de residuos, Asp458, Met338, Trp285, Gly283, Trp374 y Gly101. También presenta enlaces puente de hidrógeno con Arg174, Arg284 y Met456. 1,3,5-trihydroxy- 2,8-bis(3-methylbut-2-enyl)-10-methyl-9-acridone (Fig 16.2 d) interactúa mediante puentes de hidrógeno con los residuos Arg284, Asp361 y presenta interacción de Van der Waals con los residuos Leu455 y Trp285. Citrusinine-II (Fig. 16.3 e), interactúa mediante puentes de hidrógeno con Arg174 y Asp125, mediante interacción de Van der Waals con Asp458, Met338 y Trp285; además, presenta enlace de coordinación a metal con el Mg²⁺ presente en la enzima. El ligando que presenta interacción de Van der Waals con Met338 y Trp285, además de enlace de coordinación al metal Mg²⁺ es el ligando Toddaliopsin C (Fig. 16.3 f). Citbrasine (Fig. 16.4 g) es el único compuesto que interactúa con Ala376 mediante fuerzas de Van der Waals, pero sí presenta interacción de Van der Waals con el residuo Met338 como la gran mayoría de compuestos, así como enlace puente de hidrógeno con Arg174. El ligando 4-(3-(5-hydroxybenzo[d][1,3]dioxol-6-yl) propyl)-2,6-dimethylbenzene-1,3-diol (Fig. 16.4 h) presenta tres

enlaces puente de hidrógeno con los residuos Cys282, Thr100 y Asp458 respectivamente e interacciones de Van der Waals con los residuos Met338 y Trp374. Por último, Vismiaquinone B (Fig. 16.5 i) tiene enlace puente de hidrógeno con Arg174, y es el único compuesto que presenta interacción con el aminoácido Ser126, mediante enlace puente de hidrógeno; así mismo, presenta interacción mediante fuerza de Van der Waals con Met338 y enlace de coordinación al metal Mg^{2+} . Además en las 9 interacciones analizadas en la figura N° 16, se observa una buena calidad de diseño debido a que se caracteriza por una disposición sin colisiones de todos los componentes, Stierand y Rarey (2010)¹⁰⁶, en su estudio, también mencionan que la calidad del diseño de interacción proteína- ligando se centran en las colisiones entre los diferentes componentes del diagrama, que pueden ser diagramas de estructura del ligando o de los residuos del receptor que interactúan, líneas discontinuas que visualizan las interacciones dirigidas, segmentos spline que denotan áreas de contacto hidrofóbico del ligando, o las etiquetas de residuos.

Los ligandos que se postulan como posibles inhibidores de la enzima malato sintasa con actividad terapéutica, no solo deben unirse a la enzima, si no presentar propiedades que permitan su paso a través de los diversos compartimentos biológicos, si su administración es por vía oral. Para ello se debe tomar en cuenta que las moléculas que se proponen como posibles fármacos deben cumplir las reglas de Lipinski, las cuales predicen la similitud farmacológica de un compuesto químico con cierta actividad biológica diseñado para la vía de administración oral¹²¹. Según estas reglas, un compuesto similar a un fármaco debe tener un peso molecular (MW) de <500 g/mol, un valor de log p de <5 que represente su hidrofobicidad, no >5 donantes de enlaces de hidrógeno (HBD) y no >10 sitios aceptores de enlaces de hidrógeno (HBA)¹²². Investigaciones posteriores han agregado dos condiciones más: un área de superficie polar (PSA) de ≤ 140 Å² y <10 enlaces giratorios (Rot B) ^{123 124}, que se correlacionan con la permeabilidad y

flexibilidad del fármaco, respectivamente. Si un compuesto cumple con los cinco principios, tendrá propiedades farmacocinéticas mejoradas y mayor biodisponibilidad en el proceso metabólico del organismo¹²⁵.

Es por ello que se evaluaron en el servidor SwissADME si las estructuras moleculares de estos 9 compuestos naturales, NuBBE_0376, NuBBE_0906, NuBBE_0955, NuBBE_0953, NuBBE_1076, NuBBE_1823, NuBBE_1474, NuBBE_2082, NuBBE_2089 cumplían con las 5 reglas de Lipinski. En la Tabla N° 3 se observa que todos estos compuestos cumplen con la regla de cinco de Lipinski¹²⁶ sin ninguna violación con respecto a la lipofilidad (LogP), el peso molecular, el número de donantes y aceptores de enlaces de hidrógeno y la refractividad molar. Estos parámetros fisicoquímicos están asociados con una aceptable solubilidad acuosa y permeabilidad intestinal y constituyen los primeros pasos en la biodisponibilidad oral, mencionados con anterioridad. Entre los resultados generados en el servidor SwissADME, están unos diagramas denominados radares de biodisponibilidad (Fig. 17.1, 17.2, 17.3). En estos diagramas se tienen en cuenta seis propiedades fisicoquímicas: lipofilia, tamaño, polaridad, solubilidad, flexibilidad y saturación. El gráfico del radar de la molécula tiene que caer por completo en el área rosa para que se considere un compuesto con características similares a un fármaco en cuanto a su biodisponibilidad¹⁰⁵.

En los fármacos, una baja solubilidad en agua se correlaciona con problemas de biodisponibilidad. Para la administración oral, los fármacos poco solubles en agua tienen una velocidad de disolución lenta y una mala absorción en el tracto gastrointestinal¹²¹, mientras que, en la administración intravenosa, los efectos secundarios y los efectos tóxicos pueden ser el resultado de la precipitación y la agregación de los fármacos poco solubles¹²⁷. Nielsen y colaboradores (2015)¹²⁸, en su estudio describen que la flexibilidad de las moléculas es importante para la permeabilidad pasiva de la membrana y absorción oral de estas. Así

mismo, el papel de la lipofilicidad en la determinación de la calidad general de las moléculas candidatas a fármacos es de suma importancia. La lipofilia juega un papel crucial en la determinación de los parámetros ADME. Es más probable que la solubilidad y el metabolismo se vean comprometidos con valores altos de lipofilicidad, mientras que es más probable que la permeabilidad y el aclaramiento renal sean problemáticos cuando la lipofilicidad es demasiado baja. El impacto sobre parámetros más complejos como la distribución y la biodisponibilidad es menos evidente debido a su naturaleza más compleja¹²⁹. Con respecto al tamaño de las partículas del fármaco, es importante evaluarlo debido a que puede afectar directamente a la solubilidad y la velocidad de disolución del fármaco, lo que afecta a la eficacia clínica. Por ejemplo, para un fármaco de baja solubilidad acuosa, el tamaño de partícula y el área de superficie resultante podrían tener un efecto significativo en la velocidad de disolución durante el intervalo de tiempo durante el cual ocurre la absorción gastrointestinal y, por lo tanto, afectar la biodisponibilidad del fármaco¹³⁰. La polaridad juega un papel importante en la absorción de las drogas, si una droga es altamente polar tendrá una baja absorción ya que no atravesará con facilidad las barreras¹²³. La saturación, relacionada con la ausencia de dobles enlaces, tiene que ver con la flexibilidad de la molécula y su baja solubilidad en agua¹³¹. En los resultados mostrados se observa que para el caso de las moléculas NuBBE_0376, NuBBE_1076, NuBBE_1238, NuBBE_1474 (Fig. 17.1, 17.2, 17.3), se podría predecir que su biodisponibilidad oral se reduce un poco en comparación a NuBBE_0906, NuBBE_0955, NuBBE_2082, NuBBE_2089. Estos últimos presentan un radar de biodisponibilidad cumplen con las seis propiedades fisicoquímicas antes mencionadas.

VII. CONCLUSIONES

1. Se obtuvo la estructura tridimensional de la enzima malato sintetasa de *Candida albicans* mediante el programa AlphaFold, la cual presenta alta de seguridad (pLDDT > 90). Así mismo su evaluación en la herramienta PROCHECK mostró que la estructura es de buena calidad ya que el 94% de los aminoácidos de la enzima cae en las regiones más favorecidas (A, B y L). Y se determinó su sitio de unión a ligandos mediante el alineamiento estructural en el programa STAMP.
2. Se identificó 9 potenciales inhibidores de la enzima malato sintetasa de *Candida albicans* mediante cribado computacional y el análisis de los puntajes (scoring) de unión, de un total de 2223 compuestos naturales de la librería NuBBE. Dichos inhibidores fueron seleccionados ya que presentaron la mejor puntuación en su interacción enzima-ligando. Así mismo, cumplen con las reglas de Lipinski sin ninguna violación, indicando que estos inhibidores presentan buena biodisponibilidad oral y serían candidatos farmacológicos.
3. Se caracterizó las interacciones moleculares de los 9 compuestos naturales identificados como potenciales inhibidores. En la mayoría de las interacciones enzima-ligando se encontraron enlaces de tipo puente hidrógeno, interacción de Van der Waals y enlace de coordinación a metal.

VIII. RECOMENDACIONES

- Se debe realizar análisis *in vitro* de los mejores inhibidores identificados en el presente estudio, puesto que, presentan alta afinidad de unión a la enzima malato sintasa de *Candida albicans*. De esta forma se puede determinar si efectivamente son inhibidores de la enzima y además se puede calcular las constantes de inhibición de la enzima (K_i).
- Es necesario realizar estudios relacionados con la inhibición enzimática de malato sintasa de *Candida albicans* u otras enzimas que participan en el ciclo del glioxilato, empleando la librería de compuestos estudiada en el presente trabajo, dado al aumento de la resistencia a los agentes antifúngicos por su uso inadecuado.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bongomin F, Gago S, Oladele R, Denning D. Global and multi-national prevalence of fungal diseases-estimate precision. *J Fungi (Basel)*. 2017;3(4):57.
2. McCarty T, White C, Pappas P. Candidemia and Invasive Candidiasis. *Infect Dis Clin North Am*. 2021; 35: 389-413.
3. Moran G, Coleman D, Sullivan D. An introduction to the medically important candida species. En: *Candida and Candidiasis*. Washington, DC, USA: ASM Press; 2014. p. 9–25.
4. Mukaremera L, Lee K, Mora-Montes H, Gow NAR. *Candida albicans* Yeast, Pseudohyphal, and Hyphal Morphogenesis Differentially Affects Immune Recognition. *Front Immunol*. 2017;8. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00629.
5. Mochon A, Jin Y, Kayala M, Wingard J, Clancy C, Nguyen M, et al. Serological profiling of a *Candida albicans* protein microarray reveals permanent host-pathogen interplay and stage-specific responses during candidemia. *PLoS Pathog*. 2010;6(3):e1000827. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000827
6. Pristov K, Ghannoum M. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. *Clinical Microbiology and Infection*. 2019; 25: 792–798.
7. Ahn S, Jung J, Jang I-A, Madsen E, Park W. Role of glyoxylate shunt in oxidative stress response. *J Biol Chem*. 2016;291(22):11928–38.
8. Han L, Reynolds K. A novel alternate anaplerotic pathway to the glyoxylate cycle in streptomycetes. *Journal of Bacteriology*. 1997; 179: 5157–5164.
9. Lorenz M, Fink G. The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature*. 2001; 412: 83–86.
10. Kornberg H. The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*. *Biochemical Journal*. 1966; 99: 1-11.
11. Chew S, Chee WJY, Than LTL. The glyoxylate cycle and alternative carbon metabolism as metabolic adaptation strategies of *Candida glabrata*: perspectives from *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biomed Sci*. 2019; 26: 52.
12. Okimoto N, Futatsugi N, Fuji H, Suenaga A, Morimoto G, Yanai R, et al. High-performance drug discovery: computational screening by combining docking and molecular dynamics simulations. *PLoS Comput Biol*. 2009;5(10):e1000528. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1000528.
13. Friesner R, Banks J, Murphy R, Halgren T, Klicic J, Mainz D, et al. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J Med Chem*. 2004;47(7):1739-49.

14. Chamba V, De Los Ángeles Calero J, Torres J. La resistencia antimicrobiana: situación actual. *Recimundo*. 2019; 3:307–23.
15. Pontón J, Quindós G. Mecanismos de resistencia a la terapéutica antifúngica. *Med Clin (Barc)*. 2006; 126:56-60.
16. Campoy S, Adrio J. Antifungals. *Biochem Pharmacol*. 2017; 133:86-96.
17. López-Ávila K, Dzul-Rosado K, Lugo-Caballero C, Arias-León J, Zavala-Castro J. Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*. Una revisión. *Rev Biomed*. 2016;27(3).
18. Lee Ventola C. The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. *Pharmacy and Therapeutics*. 2015; 40: 277.
19. Lortholary O, Renaudat C, Sitbon K, Madec Y, Denoed-Ndam L, Wolff M, et al. Worrisome trends in incidence and mortality of candidemia in intensive care units (Paris area, 2002-2010). *Intensive Care Med*. 2014;40(9):1303-12.
20. Bassetti M, Righi E, Ansaldi F, Merelli M, Trucchi C, De Pascale G, et al. A multicenter study of septic shock due to candidemia: outcomes and predictors of mortality. *Intensive Care Med*. 2014;40(6):839–45.
21. Macalupú S. Situación de la resistencia antifúngica de especies del género *Candida* en Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2018;35(1):126-31.
22. Thauer R. Citric-acid cycle, 50 years on. Modifications and an alternative pathway in anaerobic bacteria. *European Journal of Biochemistry*. 1988; 176: 497-508.
23. Krebs H, Johnson W. The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues. *FEBS Lett*. 1980;117(S1):K2–10.
24. Dolan S, Welch M. The Glyoxylate Shunt, 60 Years On. *Annu Rev Microbiol*. 2018; 72: 309-330.
25. Aji S. Conversion of acetate and glyoxylate to malate¹. *Journal of the American Chemical Society*. 1956; 78: 3230–3231.
26. Kornberg H, Madsen N. Synthesis of C4-dicarboxylic acids from acetate by a 'glyoxylate bypass' of the tricarboxylic acid cycle. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1957; 24: 651–653.
27. Singh V, Ghosh I. Kinetic modeling of tricarboxylic acid cycle and glyoxylate bypass in *Mycobacterium tuberculosis*, and its application to assessment of drug targets. *Theor Biol Med Model*. 2006; 3: 27.
28. Kornberg H, Krebs H. Synthesis of cell constituents from C2-units by a modified tricarboxylic acid cycle. *Nature*. 1957; 179: 988-991.
29. Cozzone A. Regulation of acetate metabolism by protein phosphorylation in

- enteric bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 1998; 52: 127-164.
30. MacPherson S, Laroche M, Turcotte B. A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2006; 70: 583-604.
 31. Turcotte B, Liang XB, Robert F, Soontornngun N. Transcriptional regulation of nonfermentable carbon utilization in budding yeast. *FEMS Yeast Res.* 2010; 10: 2–13.
 32. Hiesinger M, Roth S, Meissner E, Schüller H. Contribution of Cat8 and Sip4 to the transcriptional activation of yeast gluconeogenic genes by carbon source-responsive elements. *Curr Genet.* 2001;39(2):68–76.
 33. Soontornngun N, Laroche M, Drouin S, Robert F, Turcotte B. Regulation of gluconeogenesis in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by activator and repressor functions of Rds2. *Mol Cell Biol.* 2007;27(22):7895–905.
 34. Stelzner A, Odds C, Candidosis A. X 468 S., 97 Abb., 92 Tab. u. 22 Farbtafeln. Vol. 30. London-Philadelphia-Toronto-Sydney-Tokyo: W. B. Saunders; 1988.
 35. Calderone R, Clancy C. *Candida and Candidiasis.* 2a ed. Calderone RA, Clancy CJ, editores. Washington D.C., DC, Estados Unidos de América: American Society for Microbiology; 2011.
 36. Talapko J, Juzbašić M, Matijević T, Pustijanac E, Bekić S, Kotris I, et al. *Candida albicans*-the virulence factors and clinical manifestations of infection. *J Fungi (Basel).* 2021;7(2):79.
 37. Rudramurthy S, Singh S. *Candida Infections in Immunocompetent Hosts: Pathogenesis and Diagnosis.* *Curr Fungal Infect Rep.* 2020; 14: 233-245.
 38. Pathakumari B, Liang G, Liu W. Immune defence to invasive fungal infections: A comprehensive review. *Biomed Pharmacother.* 2020; 130: 110550.
 39. Guinea J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clinical Microbiology and Infection.* 2014; 20: 5–10.
 40. Cheah H-L, Lim V, Sandai D. Inhibitors of the Glyoxylate Cycle Enzyme ICL1 in *Candida albicans* for Potential Use as Antifungal Agents. *PLoS ONE.* 2014; 9: e95951. DOI: 10.1371/journal.pone.0095951.
 41. Sobel J. Vulvovaginal candidiasis. *The Lancet.* 2007; 369: 1961–1971.
 42. Valdez N, Tambini J. Efecto antimicótico *in vitro* del extracto etanólico de *Vaccinium corymbosum* L. (Arándanos) en cepas de “*Candida albicans*”. [Lima]: Universidad Inca Garcilaso de la Vega; 2020. Disponible en: <http://repositorio.uigv.edu.pe/handle/20.500.11818/5204>
 43. Rojas P, De León Pandolfi E, Ponce R. Resistencia bacteriana en cuidados intensivos y tendencia actual: Departamento de Cuidados Críticos, Servicio de Cuidados Intensivos del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen. *Acta*

- méd Peru. 2004; 25:140-7.
44. Bustamante B, Martins MA, Bonfietti LX, Szeszs MW, Jacobs J, Garcia C, et al. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* isolates from bloodstream infections in Lima, Peru. *J Med Microbiol*. 2014;63(Pt 6):855-60.
 45. Rodriguez L, Bustamante B, Huaroto L, Agurto C, Illescas R, Ramirez R, et al. A multi-centric Study of *Candida* bloodstream infection in Lima-Callao, Peru: Species distribution, antifungal resistance and clinical outcomes. *PLoS One*. 2017;12(4): e0175172. DOI: 10.1371/journal.pone.0175172
 46. Cioni M, Pinzauti G, Vanni P. Comparative biochemistry of the glyoxylate cycle. *Comp Biochem Physiol B*. 1981;70(1):1–26.
 47. Köller W, Kindl H. Glyoxylate cycle enzymes of the glyoxysomal membrane from cucumber cotyledons. *Arch Biochem Biophys*. 1977; 181: 236–248.
 48. Zwart KB, Veenhuis M, Plat G, Harder W. Characterization of glyoxysomes in yeasts and their transformation into peroxisomes in response to changes in environmental conditions. *Arch Microbiol*. 1983;136(1):28–38.
 49. Okada H, Ueda M, Tanaka A. Purification of peroxisomal malate synthase from alkane-grown *Candida tropicalis* and some properties of the purified enzyme. *Arch Microbiol*. 1986; 144: 137–141.
 50. Dixon G, Kornberg H, Lund P. Purification and properties of malate synthetase. *Biochim Biophys Acta*. 1960; 41: 217–233.
 51. Eschrich D, Kötter P, Entian K-D. Gluconeogenesis in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res*. 2002; 2: 315–325.
 52. Beeckmans S. Glyoxylate Cycle. Wiley Online Library; 2001. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/npg.els.0001370>
 53. Hikida M, Atomi H, Fukuda Y, et al. Presence of Two Transcribed Malate Synthase Genes in an n-Alkane-Utilizing Yeast, *Candida tropicalis*. *The Journal of Biochemistry*. 1991; 110: 909–914.
 54. Khan A, Van Driessche E, Kanarek L, Beeckmans S. Purification of the glyoxylate cycle enzyme malate synthase from maize (*Zea mays* L.) and characterization of a proteolytic fragment. *Protein Expr Purif*. 1993;4(6):519-28.
 55. Howard BR, Endrizzi JA, James Remington S. Crystal Structure of *Escherichia coli* Malate Synthase G Complexed with Magnesium and Glyoxylate at 2.0 Å Resolution: Mechanistic Implications. *Biochemistry*. 2000; 39: 3156–3168.
 56. Smith C, Huang C-C, Miczak A. Biochemical and Structural Studies of Malate Synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278:1735-43.

57. Duntze W, Atzpodien W, Holzer H. Glucose-dependent enzyme activities in different yeast species. *Archiv für Mikrobiologie*.1967; 58: 296-301.
58. Verma R, Pradhan D, Nayek A, Singh H, Jain A, Khan L. Target-based drug repurposing against *Candida albicans*-A computational modeling, docking, and molecular dynamic simulations study. *J Cell Biochem*. 2022;123(2):289–305.
59. Lima R. Busca de peptídeos com potencial modulador da enzima malato sintase, a partir de estudos de interação proteínaproteína. [Goiás]: Universidade Federal de Goiás; 2016.
60. Costa F, Neto B da S, Gonçalves R, da Silva R, de Oliveira C, Kato L, et al. Alkaloids as inhibitors of malate synthase from *Paracoccidioides* spp.: receptor-ligand interaction-based virtual screening and molecular docking studies, antifungal activity, and the adhesion process. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(9):5581-94.
61. Silverstein R. Monoterpenoid perillyl alcohol impairs metabolic flexibility of *Candida albicans* by inhibiting glyoxylate cycle. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018; 495: 560-566.
62. Sali A, Eswar N, Pieper U, Marti-Renom MA, Madhusudhan M, Fiser A, et al. Comparative Protein Structure Modeling of Genes and Genomes. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. 2000; 29: 291-325.
63. Cavasotto C, Phatak S. Homology modeling in drug discovery: current trends and applications. *Drug Discov Today*. 2009; 14: 676-683.
64. Hillisch A, Pineda L, Hilgenfeld R. Utility of homology models in the drug discovery process. *Drug Discovery Today*.2004; 9: 659–669.
65. Jumper J, Evans R, Pritzel A, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 2021; 596: 583-589.
66. Russell R, Barton G. Multiple protein sequence alignment from tertiary structure comparison: assignment of global and residue confidence levels. *Proteins*.1992; 14: 309–323.
67. Mizuguchi K, Deane CM, Blundell TL, Overington JP. HOMSTRAD: a database of protein structure alignments for homologous families. *Protein Sci*. 1998;7(11):2469-71.
68. Sujatha S, Balaji S, Srinivasan N. PALI: a database of alignments and phylogeny of homologous protein structures. *Bioinformatics*.2001; 17: 375–376.
69. Eargle J, Wright D, Luthey-Schulten Z. Multiple Alignment of protein structures and sequences for VMD. *Bioinformatics*. 2006; 22: 504-506.
70. Pagadala NS, Syed K, Tuszynski J. Software for molecular docking: a review. *Biophys Rev*. 2017; 9: 91–102.

71. Barbosa N, de Almeida Lima E, Tavares F. Molecular Modeling in Chemical Engineering. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. 2017.
72. Helgren T, Hagen T. Demonstration of AutoDock as an Educational Tool for Drug Discovery. *J Chem Educ.* 2017; 94: 345-349.
73. Barbosa N, Lima ER de A, Tavares F. Molecular modeling in chemical engineering. En: Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. Elsevier; 2017.
74. Morris G, Goodsell D, Halliday R, Huey R, Hart W, Belew R, et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J Comput Chem.* 1998;19(14):1639–62.
75. Goodford P. A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *Journal of Medicinal Chemistry.* 1985; 28: 849-857.
76. Sharp K, Fine R, Honig B. Computer Simulations of the Diffusion of a Substrate to an Active Site of an Enzyme. *Science.* 1987; 236: 1460–1463.
77. Morris G, Huey R, Lindstrom W, Sanner M, Belew R, Goodsell D, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem.* 2009;30(16):2785–91.
78. Goodsell D, Morris G, Olson A. Automated docking of flexible ligands: applications of AutoDock. *J Mol Recognit.* 1996; 9: 1-5.
79. Trott O, Olson A. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem.* 2010; 31: 455–461.
80. Eberhardt J, Santos-Martins D, Tillack A, Forli S. AutoDock Vina 1.2.0: New docking methods, expanded force field, and Python bindings. *J Chem Inf Model.* 2021;61(8):3891–8.
81. Muniyappan G, Kathavarayan S, Balachandran C, Kalliyappan E, Mahalingam SM, Ajees Abdul Salam A, et al. Synthesis, anticancer and molecular docking studies of new class of benzoisoxazolyl-piperidinyl-1, 2, 3-triazoles. *J King Saud Univ Sci.* 2020;32(8):3286-92.
82. Liu N, Xu Z. Using LeDock as a docking tool for computational drug design. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci.* 2019; 218: 012143.
83. Jin Z, Du X, Xu Y, Deng Y, Liu M, Zhao Y, et al. Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *Nature.* 2020; 582: 289-293.
84. Hu X, Cai X, Song X, Li C, Zhao J, Luo W, et al. Possible SARS-coronavirus 2 inhibitor revealed by simulated molecular docking to viral main protease and host toll-like receptor. *Future Virology.* 2020; 15: 359–368.

85. Korb O, Stützle T, Exner TE. PLANTS: Application of ant colony optimization to structure-based drug design. In: *Ant Colony Optimization and Swarm Intelligence*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2006, pp. 247–258.
86. Gehlhaar D, Verkhivker G, Rejto P, Sherman C, Fogel D, Fogel L, et al. Molecular recognition of the inhibitor AG-1343 by HIV-1 protease: conformationally flexible docking by evolutionary programming. *Chem Biol*. 1995;2(5):317-24.
87. Verdonk M, Cole J, Hartshorn M, Murray C, Taylor R. Improved protein-ligand docking using GOLD. *Proteins*. 2003;52(4):609-23.
88. Clark M, Cramer R, Van Opdenbosch N. Validation of the general purpose tripos 5.2 force field. *Journal of Computational Chemistry*. 1989; 10: 982-1012.
89. Huayhua J, Rodriguez L, Sandoval G. Caracterización *in silico* y análisis filogenético de la malato sintasa de *Paracoccidioides brasiliensis* asociada a su proceso de infección. *Ágora Rev Cient*. 2016;3(2):381–8.
90. Panizo M, Reviákina V. *Candida albicans* y su efecto patógeno sobre las mucosas. *Rev Soc Ven Microbiol*. 2001; 21: 38–45.
91. Pappas P, Lionakis M, Arendrup M, Ostrosky-Zeichner L, Kullberg B. Invasive candidiasis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4(1).
92. Cosconati S, Forli S, Perryman A, Harris R, Goodsell D, Olson A. Virtual screening with AutoDock: Theory and practice. *Expert Opin Drug Discov*. 2010;5(6):597–607.
93. Valli M, dos Santos R, Figueira L, Nakajima C, Castro-Gamboa I, Andricopulo AD, et al. Development of a natural products database from the biodiversity of Brazil. *J Nat Prod*. 2013;76(3):439-44.
94. Laskowski R, MacArthur M, Moss D, Thornton J. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Crystallogr*. 1993;26(2):283-91.
95. Pundir S, Martin MJ, Donovan O. UniProt Protein Knowledgebase. *Protein Bioinformatics*. New York, NY.: Humana Press. 2017; pp.41-55.
96. UniProt Consortium. UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Res*. 2015;43: D204-12.
97. Tyagi M, Gowri V, Srinivasan N, de Brevern A, Offmann B. A substitution matrix for structural alphabet based on structural alignment of homologous proteins and its applications. *Proteins*. 2006;65(1):32-9.
98. Hu G, Kurgan L. Sequence similarity searching. *Curr Protoc Protein Sci*. 2019;95(1): e71. DOI: 10.1002/cpps.71
99. Lyne P. Structure-based virtual screening: an overview. *Drug Discovery Today*.

- 2002; 7: 1047-1055.
100. Aarts E, Korst J, Michiels W. Simulated Annealing. In: Search Methodologies. Boston MA: Springer, Boston, MA, 2005, pp. 187–210.
 101. Woods BS, Acioli P. Drag Assisted Simulated Annealing Method for Geometry Optimization of Molecules. *Procedia Computer Science*. 2015; 51: 1878-1886.
 102. Land H, Humble M. YASARA: A Tool to Obtain Structural Guidance in Biocatalytic Investigations. In: *Protein Engineering*, . New York, NY: Humana Press, 2018, pp. 43-67.
 103. O’Boyle N, Banck M, James CA, et al. Open Babel: An open chemical toolbox. *J Cheminform*. 2011; 3: 33.
 104. Kotsiantis S. Decision trees: a recent overview. *Artificial Intelligence Review*. 2013; 39: 261-283.
 105. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep*. 2017; 7: 42717.
 106. Stierand K, Rarey M. Drawing the PDB: Protein-Ligand Complexes in Two Dimensions. *ACS Med Chem Lett*. 2010; 1: 540–545.
 107. Dunn F, Ramírez-Trujillo J, Hernández-Lucas I. Major roles of isocitrate lyase and malate synthase in bacterial and fungal pathogenesis. *Microbiology*. 2009; 155: 3166-3175.
 108. Arif T, Bhosale J, Kumar N, et al. Natural products--antifungal agents derived from plants. *J Asian Nat Prod Res*. 2009; 11: 621-638.
 109. Laskowski R, Thornton J. PDBsum extras: SARS-CoV-2 and AlphaFold models. *Protein Sci*. 2022; 31: 283–289.
 110. Varadi M, Anyango S, Deshpande M, et al. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res*. 2022; 50: D439–D444.
 111. Laskowski R, Jabłońska J, Pravda L, Vařeková R, Thornton J. PDBsum: Structural summaries of PDB entries. *Protein Sci*. 2018; 27(1):129–34.
 112. Hutchinson E, Gail Hutchinson E, Thornton J. PROMOTIF-A program to identify and analyze structural motifs in proteins. *Protein Science*. 1996; 5: 212–220.
 113. Morris G, Lim-Wilby M. Molecular Docking. *Molecular Modeling of Proteins*. 2008; 365–382.
 114. Çınaroğlu S, Timuçin E. Comparative Assessment of Seven Docking

- Programs on a Nonredundant Metalloprotein Subset of the PDBbind Refined. *J Chem Inf Model.* 2019; 59: 3846-3859.
115. Chang M, Ayeni C, Breuer S, Torbett B. Virtual screening for HIV protease inhibitors: a comparison of AutoDock 4 and Vina. *PLoS One.* 2010;5(8): e11955. DOI: 10.1371/journal.pone.0011955
 116. Sastry G, Inakollu V, Sherman W. Boosting virtual screening enrichments with data fusion: coalescing hits from two-dimensional fingerprints, shape, and docking. *J Chem Inf Model.* 2013; 53: 1531–1542.
 117. Zhang C, Tang B, Wang Q, Lai L. Discovery of binding proteins for a protein target using protein-protein docking-based virtual screening. *Proteins.* 2014; 82: 2472–2482.
 118. Wallach I, Jaitly N, Nguyen K, Schapira M, Lilien R. Normalizing molecular docking rankings using virtually generated decoys. *J Chem Inf Model.* 2011; 51: 1817–1830.
 119. Reddy A, Pati S, Kumar P, Pradeep H, Sastry G. Virtual screening in drug discovery -- a computational perspective. *Curr Protein Pept Sci.* 2007; 8: 329–351.
 120. Stierand K, Maass P, Rarey M. Molecular complexes at a glance: automated generation of two-dimensional complex diagrams. *Bioinformatics.* 2006; 22: 1710-1716.
 121. Lipinski C, Lombardo F, Dominy B, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012; 64:4-17.
 122. Doak BC, Over B, Giordanetto F, Kihlberg J. Oral druggable space beyond the rule of 5: insights from drugs and clinical candidates. *Chem Biol.* 2014; 21: 1115–1142.
 123. Veber D, Johnson S, Cheng H-Y, Smith B, Ward K, Kopple K. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem.* 2002; 45: 2615-2623.
 124. Chagas C, Moss S, Alisaraie L. Drug metabolites and their effects on the development of adverse reactions: Revisiting Lipinski's Rule of Five. *Int J Pharm.* 2018;549(1-2):133-49.
 125. Chen X, Li H, Tian L, Li Q, Luo J, Zhang Y. Analysis of the physicochemical properties of acaricides based on Lipinski's Rule of Five. *J Comput Biol.* 2020;27(9):1397-406.
 126. Lipinski C. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discov Today Technol.* 2004;1(4):337-41.
 127. He C-X, He Z-G, Gao J-Q. Microemulsions as drug delivery systems to

improve the solubility and the bioavailability of poorly water-soluble drugs. *Expert Opin Drug Deliv.* 2010; 7: 445-460.

128. Nielsen D, Lohman R-J, Hoang H, Hill T, Jones A, Lucke A, et al. Flexibility versus rigidity for orally bioavailable cyclic hexapeptides. *Chembiochem.* 2015;16(16):2289-93.
129. Waring M. Lipophilicity in drug discovery. *Expert Opin Drug Discov.* 2010; 5: 235-248.
130. Hintz R, Johnson K. The effect of particle size distribution on dissolution rate and oral absorption. *Int J Pharm.* 1989; 51: 9-17.
131. Killian J, Antoinette Killian J, von Heijne G. How proteins adapt to a membrane–water interface. *Trends in Biochemical Sciences.* 2000; 25: 429-434.

IX. ANEXOS

Tabla N° 1: Operacionalización de variables

VARIABLE(S)	TIPO DE VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	UNIDAD DE MEDIDA	OBSERVACIONES
Coordenadas de la posición de los átomos en el espacio del receptor y los ligandos	Variable Independiente	Es la posición de un átomo usando coordenadas cartesianas.	Estructuras obtenidas experimentalmente por difracción de rayos X o por optimización usando métodos de mecánica molecular		Coordenadas en Å respecto al origen en 3 dimensiones	-
Puntajes (“scoring”) del acoplamiento molecular	Variable dependiente	Son funciones matemáticas que se utilizan para predecir aproximadamente la afinidad de unión entre dos moléculas después de haberlas acoplado	Cálculo de las ecuaciones que gobiernan la predicción de las energías de las interacciones intermoleculares por los programas de “docking”	Energías de las interacciones intermoleculares	Z score	-

