

**UNIVERSIDAD NACIONAL SAN ANTONIO
ABAD DEL CUSCO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE
FARMACIA Y BIOQUÍMICA**



ANÁLISIS IN SILICO DEL GENOMA DE *Ancylostoma duodenale* Y *Necator americanus* PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BLANCOS FARMACOLÓGICOS CON CAPACIDAD DE INTERACCIÓN CON DROGAS ANTIPARASITARIAS

TESIS PRESENTADA POR:

Bach. INGRID GIMENA RODRIGUEZ LIMA

PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL

DE: QUÍMICO FARMACÉUTICO

ASESORA. Dra CARLA DEL CARPIO JIMENEZ

CUSCO –PERÚ

2019

DEDICATORIA

Dedico este trabajo con todo el cariño, a Dios por darme la vida, por siempre estar a mi lado y haberme acompañado e iluminado en este camino soñado.

A mis padres Angélica Lima Mamani y Pedro Rodríguez Suni, por su apoyo y amor incondicional, porque a pesar de las circunstancias me enseñaron a siempre mirar hacia adelante.

Gracias papá por darme siempre tus consejos y motivación, por exigirme día a día a mejorar y cambiar mis errores, me enseñaste que toda situación tiene una enseñanza de vida, dedico este trabajo al gran amor que tienes por tus hijas y a los deseos de superación profesional.

Gracias mamá por todo tu cariño y amor, por la confianza y comprensión que siempre me has brindado en este largo camino de formación profesional, por ser la mejor amiga que me aconseja y apoya, siempre te lo digo mamá, que te quiero, por eso te dedico este trabajo como símbolo de un sueño cumplido.

A mi hermana Ruth Gimena Rodríguez Lima, por ser el pilar de la alegría en mi familia y los ánimos que me das, empiezas una nueva etapa universitaria y siempre estaré ahí para apoyarte, gracias hermanita.

Gracias Papá y Mamá por el gran sacrificio que hacen por ver superar a sus hijas, las situaciones pueden no ser fáciles, pero gracias a ustedes siempre daremos el mayor esfuerzo para enfrentar las adversidades y lograr nuestros sueños.

A quien me apoyo y acompaño durante toda esta etapa, Aldo Daniel, por ser mi soporte emocional en los momentos difíciles y ser compañero de alegrías, gracias por estar presente en los acontecimientos más importantes.

A mis amigos, junto a ellos terminamos la etapa universitaria lleno de experiencias y enseñanzas, siempre unidos, dedico este trabajo al símbolo de la amistad que nos une.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco por ser el sitio donde me forme como profesional y ser humano.

A la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica por ser el centro de enseñanza, que durante estos años de estudio fomento siempre a sus estudiantes a cumplir y seguir nuestras metas.

A los Docentes, por todas sus enseñanzas valiosas en las diferentes áreas que me sirvieron de mucho, en mi formación profesional.

A la Dra Carla del Carpio Jiménez docente de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica por aceptar ser mi asesora en este trabajo de investigación que me apoyó y animó mucho en la realización de este trabajo.

Al Docente de la Escuela Profesional de Biología Jorge Acurio Saavedra quien me abrió las puertas de su laboratorio de Biología Molecular y Genética para ser parte del grupo de estudiantes de Bioinformática y por brindarme toda la confianza.

Al Biólogo Georcki G. Ropón Palacios por brindarme sus conocimientos y apoyo guiado en la realización de este trabajo de investigación.

A toda mi familia por brindarme siempre la motivación para continuar esta investigación, a los amigos cercanos por el apoyo moral que me dieron.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	iii
RESUMEN.....	viii
ÍNDICE DE ABREVIATURA.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	xiii
CAPÍTULO I.....	1
1.GENERALIDADES.....	1
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	1
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	2
1.3.OBJETIVOS.....	2
1.3.1. OBJETIVO GENERAL.....	2
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	2
1.4.LIMITACIONES DE LA INVESTIGACIÓN.....	3
1.5.JUSTIFICACIÓN.....	3
1.6.HIPÓTESIS.....	4
CAPÍTULO II.....	5
2.MARCO TEÓRICO-CONCEPTUAL.....	5
2.1.VISIÓN HISTÓRICA.....	5
2.2.ANTECEDENTES.....	5
2.2.1. ANTECEDENTES INTERNACIONALES.....	5
2.2.2. ANTECEDENTES NACIONALES.....	7
2.3.ESTADO DE LA CUESTIÓN.....	8
2.4.BASES TEÓRICO CIENTÍFICAS.....	8
2.4.1. HELMINTOS.....	8
2.4.1.1. NEMÁTODOS.....	9
2.4.1.2. UNCINARIASIS.....	10
2.4.4. TRATAMIENTO DE UNCINARIASIS.....	14
2.4.5. SECUENCIACIÓN DE GENOMAS.....	15
2.4.5.1. GENOMA.....	16
2.4.5.2. ESTRUCTURA PROTEÍCA.....	17
2.4.5.3. PROTEÍNAS SECUENCIADAS POR HERRAMIENTAS COMPUTACIONALES.....	18
2.4.6. ENZIMAS.....	18
2.4.6.1. MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS ENZIMAS.....	18
2.4.6.2. CLASIFICACIÓN Y NOMENCLATURA DE LAS ENZIMAS.....	19
2.4.7. MÉTODOS COMPUTACIONALES-IN SILICO.....	20
2.4.8. MODELIZACIÓN DE PROTEÍNAS POR HOMOLOGÍA.....	23

2.2.8.1 MODELIZACIÓN MOLECULAR	23
2.4.9. MINIMIZACION DE ENERGÍA	25
2.4.10. DOCKING MOLECULAR	25
2.4.10.1. ENERGÍA LIBRE DE GIBBS	26
2.4.11. PATHOGEN BOX.....	27
2.4.12. BASE DE DATOS DE GENOMAS:	28
2.4.13. SOFTWARE:	29
CAPÍTULO III	33
3.MATERIALES Y MÉTODOS	33
3.1. MATERIALES.....	33
3.2. DISEÑO METODOLÓGICO	33
3.2.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	33
3.2.1.1. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LOS GENOMAS	34
3.2.1.2. PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA TERCIARIA Y VALIDACIÓN DEL MODELO	35
3.2.1.3. SCREENING VIRTUAL	35
3.2.1.4. DOCKING MOLECULAR	36
3.2.2. VARIABLES	38
3.3. PROCEDIMIENTO.....	43
CAPÍTULO IV	48
4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	48
4.1. GENOMAS Y FILTRADO	48
4.2. COMPARACIÓN DE VÍAS METABÓLICAS.....	49
4.3. ANOTACIÓN BIOLÓGICA DE LAS ENZIMAS SELECCIONADAS.....	61
4.4. MODELAMIENTO MOLECULAR DE LAS ENZIMAS ÚNICAS.....	62
4.5. REFINAMIENTO Y VALIDACIÓN DE LAS ENZIMAS ÚNICAS	63
4.6. SCREENING VIRTUAL.....	65
4.7. DOCKING MOLECULAR.....	73
CONCLUSIONES.....	88
BIBLIOGRAFIA.....	91
ANEXOS.....	99
ANEXO N°1 OBTENCIÓN DE PROTEOMAS DE <i>Ancylostoma duodenale</i> , <i>Necator americanus</i> y <i>Homo sapiens</i> DE LA DATA BASE NCBI	99
ANEXO N°2. IDENTIFICACIÓN DE ENZIMAS A TRAVÉS DEL SOFTWARE DEEPre	100
ANEXO N°3 COMPARACIÓN DE LAS ENZIMAS DE <i>Ancylostoma duodenale</i> Y EL PROTEOMA DE <i>Necator americanus</i> USANDO EL SOFTWARE BLASTp.....	101
ANEXO N°4 ANOTACIÓN BIOLÓGICA A TRAVÉS DE LA DATA BASE InterProScan	102

ANEXO N°5 MODELAMIENTO MOLECULAR A TRAVÉS DEL SOFTWARE PHYRE2	103
ANEXO N°6 VALIDACIÓN MEDIANTE EL SOFTWARE RAMPAGE	104
ANEXO N°7 SCREENING VIRTUAL DE LAS ENZIMAS MEDIANTE AUTODOCK TOOLS PARA DOCKING RÍGIDO	105
ANEXO N°8 FILTRADO DE LOS LIGANDOS POR EL SOFTWARE SWISSADME (REGLAS DE LIPINZKY)	106
ANEXO N°9 SCREENING VIRTUAL DE LOS LIGANDOS PARA DOCKING RÍGIDO	107
ANEXO N°10 DOCKING MOLECULAR RÍGIDO	108
ANEXO N°11 SCREENING VIRTUAL DE LAS ENZIMAS MEDIANTE AUTODOCK TOOLS PARA DOCKING MOLECULAR FLEXIBLE	109

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO N°01	DIFERENCIA DE LOS AGENTES ETIOLÓGICOS DE ANQUILOSTOMIASIS	10
CUADRO N°02	MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE UNCINARIASIS	13
CUADRO N°03	FÁRMACOS UTILIZADOS EN LA HELMINTIASIS	14

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N°01	RESULTADO DEL FILTRADO DE LOS GENOMAS DE <i>Ancylostoma duodenale</i> y <i>Necator americanus</i>	48
TABLA N°02	RESULTADO DEL FILTRADO DE LAS ENZIMAS ENCONTRADAS EN LOS PARÁSITOS <i>Ancylostoma duodenale</i> y <i>Necator americanus</i>	49
TABLA N°03	RESULTADO DEL SOFTWARE EC2KEGG; COMPARACIÓN DE ENZIMAS DE <i>Homo sapiens</i> y ENZIMAS DE LOS PARÁSITOS	54
TABLA N°04	RESULTADO DE LAS ANOTACIONES BIOLÓGICAS DE LAS ENZIMAS	61
TABLA N°05	RESULTADO DE LA VALIDACIÓN DE LAS CINCO ENZIMAS	63
TABLA N°06	FILTRADO DE LA BIBLIOTECA DE LOS 200 COMPUESTOS QUÍMICOS	65
TABLA N°07	RESULTADOS DE LA PREDICCIÓN DE LOS SITIOS DE ACCIÓN DE LAS ENZIMAS	71
TABLA N°08	RESULTADOS DE DOCKING MOLECULAR RÍGIDO ENTRE LA ENZIMA ASTACYN Y LOS 200 LIGANDOS	73
TABLA N°09	RESULTADOS DE DOCKING MOLECULAR RÍGIDO ENTRE LA ENZIMA CHITINASE Y LOS 200 LIGANDOS	74
TABLA N°10	RESULTADOS DE DOCKING MOLECULAR RÍGIDO ENTRE LA ENZIMA COA-LIGASA Y LOS 200 LIGANDOS	75

TABLA N°11	RESULTADOS DE DOCKING MOLECULAR RÍGIDO ENTRE LA ENZIMA APYRASE Y LOS 200 LIGANDOS	76
TABLA N°12	RESULTADOS DE DOCKING MOLECULAR RÍGIDO ENTRE LA ENZIMA HEXOKINASE Y LOS 200 LIGANDOS.....	77
TABLA N°13	RESULTADOS DE LA SELECCIÓN DE LIGANDOS CON LA ENZIMA ASTACYN	78
TABLA N°14	RESULTADOS DE LA SELECCIÓN DE LIGANDOS CON LA ENZIMA CHITINASE.....	79
TABLA N°15	RESULTADOS DE LA SELECCIÓN DE LIGANDOS CON LA ENZIMA COA LIGASA	80
TABLA N°16	RESULTADOS DE LA SELECCIÓN DE LIGANDOS CON LA ENZIMA APYRASE	81
TABLA N°17	RESULTADOS DE LA SELECCIÓN DE LIGANDOS CON LA ENZIMA HEXOKINASE	81
TABLA N°18	RESULTADOS DE LOS RESIDUOS DE AMINOÁCIDOS IMPLICADOS EN EL SITIO ACTIVO PARA REALIZAR DOCKING MOLECULAR FLEXIBLE	82
TABLA N°19	RESULTADOS DE DOCKING MOLECULAR FLEXIBLE DE LAS 5 ENZIMAS.....	83

ÍNDICE DE FIGURAS

FIG N°01	PATRÓN DE CRECIMIENTO DE LARVAS	09
FIG N°02	CICLO DE VIDA DE NECATOR AMERICANUS	12
FIG N°03	SUBCLASES DE CADA CLASE DE ENZIMAS	20
FIG N°04	DOCKING MOLECULAR ENTRE UN RECEPTOR Y UN LIGANDO ...	26
FIG N°05	RESULTADO DEL MODELAMIENTO DE LAS CINCO ENZIMAS.....	62
FIG N°06	DOCKING MOLECULAR ENTRE LA ENZIMA CHITINASE Y EL LIGANDO 111	79
FIG N° 07	DOCKING MOLECULAR ENTRE LA ENZIMA HEXOKINASA Y EL LIGANDO 111MMV020537	82
FIG N° 08	LIGANDO 111.....	83
FIG N° 09	INTERACCIÓN 2D DE ASTACYN Y EL LIGANDO 111MMV020537 ..	84
FIG N° 10	INTERACCIÓN 2D DE CHITINASE Y EL LIGANDO 111 MMV020537	85
FIG N° 11	INTERACCIÓN 2D DE HEXOKINASA Y EL LIGANDO 111 MMV020537	86

RESUMEN

La presencia de Anquilostomas conocida comúnmente como parasitosis intestinal, en el Perú es un serio problema de salud pública, las infecciones intensas pueden presentar diversos síntomas como: manifestaciones intestinales, malnutrición, malestar general, así como disminución del crecimiento físico y desarrollo cognitivo. El desarrollo de métodos computacionales en la industria farmacéutica facilita el descubrimiento de nuevos fármacos como alternativas de tratamiento mucho más eficaces.

El presente trabajo de investigación fue realizado con el objetivo de analizar el genoma de *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus* mediante simulación computacional (in silico) para la identificación de blancos farmacológicos capaces de interactuar con drogas antiparasitarias.

Se realizó la obtención de los genomas de *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus* mediante métodos computacionales; ambos genomas fueron extraídos de la database NCBI, para luego ser filtrados. Luego se identificó las enzimas de *Ancylostoma duodenale* mediante el software DEEpre. Seguidamente se usó el software BLASTp para encontrar las similitudes de las enzimas de *Ancylostoma duodenale* con el genoma de *Necator americanus*. Posteriormente se realizó una comparación entre las enzimas de los patógenos y las vías metabólicas de *Homo sapiens* a través del software EC2KEGG. Se hizo la predicción de las estructuras terciarias y validación de los modelos; el modelamiento molecular de las enzimas seleccionadas se realizó mediante el software PHYRE2. También se diseñó y filtro los 200 compuestos químicos donados por la empresa PATHOGEN BOX, mediante el método de Screening virtual, para el posterior análisis de Docking molecular rígido, entre las enzimas seleccionadas y los compuestos químicos. Finalmente se realizó Docking molecular flexible entre las enzimas seleccionadas y los compuestos químicos con mayor afinidad.

Los resultados mostraron:

Se seleccionaron cinco enzimas Apyrase, Astacyn, Hexokinasa, Chitinase, CoA ligasa. En el Docking molecular rígido realizado se encontró que las enzimas: chitinase obtuvo una afinidad de -10.5 kcal/mol con el ligando 111 y la enzima hexokinasa igualmente con el ligando 111 presentó una afinidad de -11 kcal/mol, las mayores afinidades.

En el Docking molecular flexible realizado con las mejores afinidades se obtuvo que la enzima Chitinase presentó la mayor afinidad al ligando 111 con -12.1 kcal/mol, le sigue la enzima hexokinasa con una afinidad de -11.3 kcal/mol.

Conclusiones:

Se obtuvo los genomas de los anquilostomas de los cuales se les realizó el filtrado, descartando proteínas hipotéticas, parciales y putativas.

Mediante acoplamiento molecular se observó que la mayor afinidad es de -12.1 kcal/mol, se considera finalmente al ligando 111, de los 200 compuestos del Pathogen Box como una posible potencial droga para el tratamiento de parasitosis por anquilostomas (*Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus*), frente al blanco farmacológico la enzima Chitinase. que fue seleccionado entre cinco enzimas.

Palabras clave: Genoma de *Ancylostoma duodenale*, Genoma de *Necator americanus*, in silico, Blancos Farmacológicos, Enzimas, Acoplamiento molecular.

ABSTRACT

The presence of hookworms commonly known as intestinal parasitosis, in Perú is a serious public health problem, intense infections can present various symptoms such as: intestinal manifestations, malnutrition, malaise, as well as decreased physical growth and cognitive development. The development of computational methods in the pharmaceutical industry facilitates the discovery of new drugs as much more effective treatment alternatives.

The present research work was carried out with the objective of analyzing the genome of *Ancylostoma duodenale* and *Necator americanus* by computer simulation (in silico) for the identification of pharmacological targets capable of interacting with antiparasitic drugs.

The genomes of *Ancylostoma duodenale* and *Necator americanus* were obtained by computational methods; both genomes were extracted from the NCBI database, and then filtered. Then the enzymes of *Ancylostoma duodenale* were identified using the DEEpre software. The BLASTp software was then used to find the similarities of the enzymes of *Ancylostoma duodenale* with the genome of *Necator americanus*. Subsequently, a comparison was made between the enzymes of the pathogens and the metabolic pathways of *Homo sapiens* through the EC2KEGG software. The prediction of the tertiary structures and validation of the models were made; Molecular modeling of the selected enzymes was carried out using the PHYRE2 software. The 200 chemical compounds donated by the company PATHOGEN BOX were also designed and filtered, using the Virtual Screening method, for the subsequent analysis of rigid molecular Docking, between the selected enzymes and the chemical compounds. Finally, flexible molecular docking was carried out between the selected enzymes and the chemical compounds with greater affinity.

The results showed:

Five enzymes Apyrase, Astacyn, Hexokinase, Chitinase, CoAligase were selected. In the rigid molecular Docking carried out, it was found that the enzymes: chitinase obtained an affinity of -10.5 kcal/mol with the ligand 111 and the enzyme hexokinase, as well as the ligand 111 showed an affinity of -11 kcal/mol, the highest affinities.

In the flexible molecular Docking carried out with the best affinities, it was obtained that Chitinase enzyme showed the highest affinity to ligand 111 with -12.1 kcal/mol, followed by the enzyme hexokinase with an affinity of -11.3kcal/mol.

Conclusions:

The genomes of the hookworms were obtained from which the filtering was carried out, discarding hypothetical, partial and putative proteins.

By means of molecular docking it was observed that the highest affinity is -12.1kcal/mol, it is finally considered to ligand 111, of the 200 compounds of the Pathogen Box as a possible potential drug for the treatment of parasitic infections by hookworms (*Ancylostoma duodenale* and *Necator americanus*), against the pharmacological target enzyme Chitinase, which was selected among five enzymes.

Key words: Genome of *Ancylostoma duodenale*, Genome of *Necator americanus*, in silico, Pharmacological Targets, Enzymes, Docking molecular.

ÍNDICE DE ABREVIATURA

FDA	Food and Drug Administration
STH	Helminthiasis Transmitida por el Suelo
NTD	Enfermedades Tropicales Desatendidas
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
PHYRE	Protein Homology/analogy Recognition Engine
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RMSD	Root Mean Square Deviation
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
PDB	Protein Data Bank
MDIC	Medical Device Innovation Consortium
OMS	Organización Mundial de la Salud
MM	Mecánica Molecular
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
SMILE	Simplified Molecular Input Line Entry Specification (Especificación de Introducción Lineal Molecular Simplificada)
ADV	Autodock Vina
ADME	Absorción, Distribución, Metabolismo, Eliminación
Met	Metionina
Phe	Fenilalanina
Leu	Leucina
Ala	Alanina
Gly	Glicina
Cys	Cisteína
EC	Enzyme Commission Number
OPS	Organización Panamericana de Salud

INTRODUCCIÓN

Hoy en día, para mantener el crecimiento exponencial de la innovación, los mundos médico y farmacéutico están entrando en una era en la que se realizarán una gran cantidad de experimentos por computadora, conocidos como **in silico**, para completar y acelerar los enfoques in vivo e in vitro. Esto tiene el potencial de revolucionar la ciencia y la medicina. (1)

Recientemente, autoridades reguladoras como la Food and Drug Administration de EE. UU (FDA) han reconocido el valor del modelado y la simulación por computadora dentro de sus procesos de aprobación cuando la simulación se aplica correctamente. Las autoridades fomentan la adopción de la simulación para complementar otros enfoques, como las pruebas de laboratorio en animales y humanos. Aunque el modelado por computadora todavía es una pequeña fracción de las pruebas, el Medical Device Innovation Consortium (MDIC) dijo que el enfoque podría representar más del 50 por ciento de los ensayos clínicos en el futuro. (1)

La industria farmacéutica y muchos grupos de investigación alrededor del mundo, incorporan herramientas computacionales para el descubrimiento de fármacos, como los siguientes fármacos comerciales desarrollados con la ayuda de métodos computacionales: Noroxin (Norfloxacin), Cozaar (Sal de potasio de losartan), Viracept (Mesilato de nelfinavir), Crixivan (Sulfato de Indinavir). (2)

Los experimentos in silico incorporan la computadora y los softwares de simulación. El avance de los modelos in silico ha sido importante y ya hay quienes plantean el reemplazo de experimentos con animales por experimentos en simuladores. (2)

A principios del siglo pasado Paul Erlinch propuso el término “receptor”. De esta forma, la interacción de cada fármaco con su respectivo receptor o sitio de acción inicia los cambios bioquímicos y fisiológicos que son características de ese fármaco. Un ejemplo de un sitio de acción son las enzimas, proteínas especializadas en acelerar reacciones bioquímicas. La interacción de un fármaco con su blanco molecular se ha comparado en forma muy sencilla con lo que sucede entre una llave y una cerradura. (3)

Según la OMS (Organización Mundial de la Salud) en todo el mundo, casi el 24% de la población mundial, está infectada por helmintos transmitidos por el suelo. Distribuidos ampliamente por las zonas tropicales y subtropicales, especialmente en el África subsahariana, América, China y Asia Oriental. La morbilidad depende del número de gusanos albergados. Las personas con infecciones de baja intensidad no suelen presentar síntomas. Las infecciones más intensas pueden causar diversos síntomas, entre ellos manifestaciones intestinales, malnutrición, malestar general y debilidad, así como disminución del crecimiento y del desarrollo físico. (4)

Por tanto, la presente investigación busca encontrar fármacos con potencial efecto antiparasitario especialmente contra los anquilostomas *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus* mediante las técnicas computacionales o comúnmente llamado análisis in silico. Se inicia con la búsqueda de posibles blancos farmacológicos que serán hallados en los genomas de los parásitos para luego realizar principalmente el uso del acoplamiento molecular entre las proteínas o blancos farmacológicos hallados y las sustancias químicas, donde realiza una predicción de su interacción mediante el uso de Software.

CAPÍTULO I

1. GENERALIDADES

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El descubrimiento de fármacos es un proceso complejo y costoso en el cual convergen diversas áreas del conocimiento. En años recientes métodos computacionales se han integrado a este esfuerzo multidisciplinario y su enseñanza en cursos de Química Farmacéutica es fundamental. A la fecha, los métodos computacionales han contribuido, entre otras aplicaciones, al análisis eficiente de datos, al filtrado de colecciones de compuestos para seleccionar moléculas para evaluación experimental, a la generación de hipótesis para ayudar a entender el mecanismo de acción de fármacos y al diseño de nuevas estructuras químicas.(5)

Según la Organización Panamericana de Salud (OPS) en el Perú se observa que en el rango de 1-10 hay una prevalencia de 27.3 % de helmintiasis transmitida por el suelo. (6)

Un estudio realizado en la amazonia peruana se registró una incidencia de 16.10% de *Ancylostoma duodenale* y 19.07% de *Necator americanus*. (7)

A pesar de existir tratamientos farmacológicos antiparasitarios, las tasas de prevalencia siguen siendo elevadas.

Las geohelmintiasis son las infecciones más comunes en todo el mundo, afectan a las comunidades de menos recursos. Son conocidas como helmintiasis transmitidas por el suelo (STH) y comúnmente como parasitosis intestinal. Los agentes causantes son los nemátodos *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* y anquilostomas (*Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus*). (4)

La infección se produce por la ingestión de productos agrícolas crudos contaminados con tierra que contiene huevos infectantes, o por la penetración de las larvas del suelo a través de la piel (anquilostomas). (6)

Por otro lado, el estudio integrado de los seres vivos a través de las herramientas POST-genómicas (transcriptómica, genómica funcional, proteómica, metabolómica e interactómica) ha resultado de gran utilidad en la identificación de nuevos blancos para el desarrollo de vacunas, así como de nuevos fármacos y mejores herramientas de diagnóstico, que coadyuven al tratamiento y control de las enfermedades parasitarias. (8)

La industria farmacéutica se ha sujeto a la genómica y a los análisis in silico como un recurso de la búsqueda de drogas que reducen significativamente el número de ensayos biológicos, sin embargo, es un proceso predictivo que debe integrarse con ensayos experimentales que validen las predicciones de los ensayos in silico. Por ello se ha reconocido a las técnicas in silico como crucial en la producción de data en el amplio campo farmacéutico para el diseño de drogas. Los análisis in silico incluye aspectos de ciencia computacional,

ingeniería de software, matemáticas y en otras ramas como la bioinformática incluye la biología molecular. Va más allá de la administración de data y ha logrado un status de la nueva disciplina científica.(9)

Por ello se decidió realizar el análisis del genoma de *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus* (anquilostomas) para su posterior diseño de drogas probables, mediante métodos computacionales, que nos permitirá simular los sistemas biológicos.

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Los genomas de *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus* presentaran blancos farmacológicos in silico con capacidad de interacción con drogas antiparasitarias?

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Analizar el genoma de *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus* mediante simulaciones computacionales (in silico) para la identificación de blancos farmacológicos con capacidad de interacción con drogas antiparasitarias.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener el genoma de *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus* de la DataBase del NCBI y filtrado de proteínas con función enzimática a través de los scripts escritos en el programa Python del sistema Linux.
2. Comparar las vías metabólicas del Hospedero *Homo sapiens* y los huéspedes *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus* e identificar las enzimas únicas de los patógenos que no son compartidas con el hospedero como posibles blancos farmacológicos mediante el Software EC2KEGG.
3. Realizar el modelamiento molecular de las enzimas únicas obtenidas, por el método de Homología de Proteínas mediante el Software PHYRE2
4. Refinar la conformación estructural de las enzimas modeladas mediante la herramienta 3D REFINE y Validar las mismas moléculas modeladas mediante la herramienta computacional RAMPAGE.
5. Diseñar la estructura 3D de los 200 compuestos químicos obtenidos por la Empresa PATHOGENBOX mediante minimización de energía a través del software OPENBABEL.
6. Realizar el acoplamiento molecular rígido entre las enzimas únicas y la biblioteca de las 200 sustancias químicas de PATHOGEN BOX y seleccionar aquellas con mayor afinidad a las proteínas, a través del software AUTODOCK VINA.

7. Realizar el acoplamiento molecular flexible entre las enzimas únicas y los mejores ligandos (que serán seleccionados del docking molecular rígido), será realizado a través del software AUTODOCK VINA.

1.4. LIMITACIONES DE LA INVESTIGACIÓN

La principal limitación que se presentó en este trabajo de investigación fue la realización de dinámica molecular, entre la mejor afinidad de proteína ligando como resultado del docking molecular, los paquetes de dinámica molecular están disponibles de forma gratuita, pero para realizar la simulación de sistemas biológicos como proteínas, requieren de tiempos de cálculo elevado, que puede ir horas hasta semanas o meses, es por ello que para realizar dinámica molecular se necesita tener a disposición computadoras de alto rendimiento o supercomputadoras lo que limito a trabajar esta simulación computacional de dinámica molecular. En cambio, sí se realizó las simulaciones de docking molecular con ayuda de capacitaciones y tutoriales.

1.5. JUSTIFICACIÓN

JUSTIFICACIÓN TEÓRICA

Los anquilostomas adultos difieren principalmente en la estructura de su abertura bucal; *Ancylostoma* con dos pares de dientes o ganchos de igual tamaño y *Necator* con un par de placas cortantes. La especie predominante en las zonas subtropicales y tropicales de la costa de Pacífico en América del Sur es *A. duodenale*. Ambas especies se adhieren a la mucosa del intestino delgado, absorben sangre, causan erosiones, úlceras, y favorecen la pérdida de sangre por secreción de sustancias anticoagulantes y enzimas. La anemia resultante puede ser leve, moderada o grave, dependiendo de la carga parasitaria. (10)

El desarrollo tecnológico tanto en el ámbito de la electrónica como el desarrollo del software y las telecomunicaciones han permitido un avance significativo en las técnicas para el procesamiento y análisis inteligente de los datos, beneficiando los estudios científicos que permiten conocer mejor las estructuras de los organismos vivos. (11)

JUSTIFICACIÓN METÓDICA

La predicción in silico utiliza métodos computacionales para generar y comprobar diferentes hipótesis sobre los mecanismos de absorción de los fármacos. Sus aplicaciones son diversas y permiten, entre otras, la predicción de la farmacocinética de un compuesto, el diseño de nuevas entidades químicas o fármacos, cribados de diferente tipo, estudios virtuales en varias poblaciones. Presentan la ventaja de ser rápidas, están en evolución constante y que disminuyen notablemente el tiempo y la inversión comparado con los test in vitro e in vivo. (12)

Se admite que, para resultar completamente eficaces, estos modelos requieren extenderse más allá de la evaluación farmacocinética, con la inclusión de parámetros farmacodinámicos y toxicológicos. Así, la mayoría de las dificultades para estimar la absorción por vía oral, la biodisponibilidad y la depuración no se encuentran en la formulación de los modelos *in silico*, sino que residen en la cuantificación experimental de la solubilidad, la permeabilidad de las membranas, el metabolismo y el transporte activo. (13)

La importancia de realizar este estudio en anquilostomas es con el objetivo principal de mejorar la calidad de la salud de las personas en las zonas tropicales del Perú más afectadas que están dentro del grupo de Enfermedades Tropicales Desatendidas (NTD) y todas las zonas vulnerables que están expuestas al contagio de esta patología, disminuyendo el porcentaje de personas infectadas a través de un adecuado tratamiento farmacológico, A través del uso de herramientas computacionales (*in silico*), softwares que fueron diseñados con el propósito de simular condiciones biológicas que ayudan de gran manera a reducir el tiempo de investigación en el desarrollo de nuevos fármacos.

1.6. HIPÓTESIS

Los genomas de *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus* presentarán blancos farmacológicos capaces de interactuar con drogas antiparasitarias diseñadas por métodos computacionales (*in silico*),

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO-CONCEPTUAL

2.1. VISIÓN HISTÓRICA

En las ciencias biológicas es común el empleo de las palabras *in vitro* e *in vivo*, para referirse a la experimentación que se hace con organismos vivos o a la que se realiza en tejidos o cultivos celulares extraídos de un ser vivo. En el mismo tono, conforme avanza el siglo XXI, es cada vez más común el empleo del término *in silico*, que hace referencia a los experimentos que se realizan mediante simulaciones en computadora. *In silico* hace referencia a “en silicio”, material presente en los semiconductores que forman parte de los dispositivos de almacenamiento y los procesadores de las computadoras. (14)

Hace 30 años Wodak y Janin desarrollaron el primer sistema de acoplamiento molecular. (15) Desde entonces el problema de acoplamiento molecular ha sido muy estudiado y se han generado algoritmos de búsqueda con enfoques muy diversos. Sin embargo, a pesar de las mejoras, estos algoritmos generan muchas soluciones para la orientación del ligando, entre las cuales se encuentran múltiples falsos positivos.(16)

Actualmente hay muchos algoritmos diferentes para resolver el problema del acoplamiento molecular, cada uno usando métodos de muestreo diferentes, tomando en cuenta la flexibilidad de la proteína y diferentes formas de calificar la fuerza de las interacciones entre el ligando y la proteína. (16)

2.2. ANTECEDENTES

2.2.1. ANTECEDENTES INTERNACIONALES

2.2.1.1. Hu.M, et al. “**Los genomas mitocondriales de los anquilostomas humanos, *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus*”** Universidad de Melbourne (2002) (17)

El objetivo principal fue secuenciar los genomas mitocondriales completos, determinados para dos especies de Anquilostomas humanos, *Ancylostoma duodenale* (13, 721 bp) y *Necator americanus* (13, 604 bp).

El genoma circular de los anquilostomas está entre los más pequeños de los organismos metazoo. Ambos genomas de anquilostomas codifican 12 proteínas, 2 RNA ribosomal y 22 genes de RNA transferasa pero con la ausencia del gen de la ATP sintetasa subunidad 8. Todos los genes están transcritos en la misma dirección y tienen una composición de nucleótidos alta en A y T pero baja en G y C.

Para ambos anquilostomas, los genes fueron arreglados en el mismo orden tal como para *Caenorhabditis elegans* excepto por la presencia de una región no codificante entre los genes *nad3* y *nad5*. En *Ancylostoma duodenale* esta región no codificante está previsto para formar una estructura steam-loop (patrón estructural), el cual no está presente en *Necator americanus*.

2.2.1.2. Sarkar.M,et al.“**Búsqueda in silico de supuestos blancos farmacológicos en Helicobacter pylori HPAG1: modelado molecular de enzimas candidatas de la vía de biosíntesis de lipopolisacáridos**” Indian Institute of Chemical Biology (2011) (18)

Dirigido a la identificación y caracterización estructural de nuevas dianas terapéuticas putativas en *H. pylori*, el agente etiológico de numerosas enfermedades gastrointestinales como la úlcera péptica y el cáncer gástrico, el presente estudio comprendió tres fases. En primer lugar, a través del análisis sustractivo de las rutas metabólicas de *Helicobacter pylori* HPAG1 y humano, en la base de datos de KEGG, se identificaron 11 rutas específicas de patógenos. A continuación, todas las proteínas implicadas en estas rutas específicas de patógenos se analizaron en busca de dianas prometedoras y el estudio produjo 25 proteínas diana candidatas que probablemente sean esenciales para la viabilidad del patógeno, pero no tienen homólogo en humanos. Se encontró que la vía de biosíntesis de lipopolisacáridos (LPS) era la que más contribuía (nueve proteínas) a esta lista de proteínas candidatas. Teniendo en cuenta la importancia de los LPS en la virulencia de *H. pylori*, modelos estructurales tridimensionales de tres enzimas objetivo predichas de esta vía, es decir, 2dehidro-3-deoxy-phosphooctonato aldolasa, UDP-3-O-[3hidroxymiristoyl] N-acetylglucosamina deacetylase y Phosphoheptosa isomerasa, se construyeron utilizando los enfoques de modelado de homología.

2.2.1.3. Porollo. A “**EC2KEGG: una Herramienta de comando lineal para la comparación de Rutas Metabólicas**” Biomed Central (2014) (19)

La secuencia de la siguiente generación y el rendimiento de los proyectos de metagenoma con un gran número de nuevos genomas necesitan promover anotaciones, tal como la identificación de enzimas y rutas metabólicas, o estrategias metabólicas de especies recién secuenciadas en comparación de organismos conocidos, mientras están disponibles los métodos de identificación de enzimas, desarrollando las herramientas del comando lineal para la comparación del análisis de alto rendimiento y visualización de enzimas identificadas.

La comparación de análisis de un conjunto de enzimas dado con organismos de referencia especificado incluye el mapeo de rutas metabólicas conocidas, encontrando enzimas compartidas y únicas, generando links para visualizar el mapa de la ruta KEGG, y un listado de enzimas no mapeadas.

2.2.1.4. Rodriguez.C, et al “**Estrategias in silico para el diseño y selección de compuestos con potencial aplicación en la enfermedad de Alzheimer**” Universidad Autónoma de Barcelona.2014 (20)

Este estudio pone en manifiesto la utilidad de la química computacional en el desarrollo de nuevos fármacos. Como resultado se seleccionaron tres compuestos multifuncionales, HBX, HBT y BM, cuyo esqueleto molecular presenta propiedades quelantes-intercalantes, además de propiedades farmacocinéticas adecuadas para su uso como fármaco. Adicionalmente la

presencia de un anillo fenol o anilina en su estructura le confiere propiedades antioxidantes y facilita su yodación para su potencial aplicación en el tratamiento y diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

2.2.1.5. Subbashree.R, et al. **“Una estrategia in silico para la Identificación de novedosas Drogas contra *Plasmodium falciparum*”**, Escuela de Biotecnología-India (2017) (21)

En el presente trabajo se hizo un estudio de comparación genómico para la identificación de genes esenciales posibles y candidatos terapéuticos en *P. falciparum*. Se predijo 11 proteínas como blancos para drogas antimaláricas, obtenidas de PlasmoDB data base. En esta investigación para la identificación de blancos en el genoma de *P.falciparum* se usó métodos computacionales donde se usó también la data base Malaria Parasite Metabolic Pathway. El estudio reportó la identificación de 71 proteínas como potenciales drogas para intervenciones antimaláricas. Además, los estudios de simulación de modelado por homología y dinámica molecular son uno de los estudios que permitieron predecir la estructura de la proteína en 3D también permite diseñar las estructuras ligando-receptor del Pathogen Box. La simulación fue realizada en GROMACS a 20ns en un medio de agua.

2.2.1.6. Sanchaita R. et al. **Diseño del Inhibidor PI(4)KIIIB de *Plasmodium falciparum* usando Dinámica Molecular y métodos de Docking Molecular**. India. 2017 (22)

En este estudio se modeló a PI(4)KIIIB usando enfoques de homología. Su modelo fue validado además fue estabilizado usando simulaciones de dinámica molecular. Un total de 178 compuestos fueron extraídos de la base de datos PubChem que fueron examinados por el software HERG. Los cálculos de acoplamiento molecular se realizaron utilizando dos softwares para estudiar la interacción de las moléculas seleccionadas con la proteína modelo. Los resultados mostraron que de las cinco moléculas, tres compuestos son estables dentro de la unión. La cavidad de la proteína tiene el potencial de inhibir el PI(4)KIIIB. Este trabajo proporciona una estrategia para el diseño de proyectos específicos inhibidores que potencialmente podrían dirigirse al PI(4)KIIIB y podría resultar ser un instrumento para erradicar la malaria.

2.2.2. ANTECEDENTES NACIONALES

2.2.2.1. Calero C **“Análisis Bioinformático de las Secuencias de Aminoácidos de diversas Fosfolipasas D”** Universidad Nacional Mayor San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica (2004) (23)

Se analizó in silico las secuencias de aminoácidos de las isoformas humanas D1 y D2 de la Fosfolipasa D, obteniendo la predicción de sus propiedades químicas responsables de sus diferentes niveles de acción. Usando el programa MACAW se realizó alineamientos múltiples locales de secuencias obtenidas de la base de datos NR del NCBI correspondientes a la “Fosfolipasa D” de varias especies encontrando sólo un segmento conservado entre las secuencias de origen bacteriano, y ocho entre las secuencias de origen vegetal. Se detectó además

tres segmentos de secuencia de aminoácidos comunes en secuencias de especies de distante origen filogenético, la visualización de estos segmentos en la estructura 3D de la fosfolipasa D de la Bacteria *Streptomyces sp* nos reveló que los residuos de aminoácidos altamente conservados de estos segmentos se localizan cercanamente, formando una zona en la proteína que probablemente contiene los residuos esenciales para su actividad.

2.3. ESTADO DE LA CUESTIÓN

La incorporación de métodos de cómputo al esfuerzo multidisciplinario que implica el desarrollo de medicamentos ha llevado al desarrollo de fármacos que se encuentran en uso clínico. Además, los métodos de Cómputo hacen constantes aportaciones a proyectos de investigación para analizar datos en forma eficiente y plantear hipótesis valiosas que guían el diseño de nuevos fármacos. (5)

El diseño de fármacos asistido por computadora cobra cada vez mayor importancia en la investigación y desarrollo de medicamentos. Esto se ha favorecido por el número de aplicaciones exitosas de métodos de cómputo para el desarrollo de compuestos que actualmente se encuentran en el mercado. (24)

Diversas universidades y centros de investigación en el mundo cuentan con grupos especializados en el desarrollo y/o aplicación de metodologías computacionales para la investigación de fármacos. (24)

Actualmente se desarrollan estudios in silico, como la predicción de posibles alteraciones en la absorción de fármacos en pacientes celíacos, con el fin de discernir los mecanismos implicados en la aparición de dichas alteraciones y se utilizaron herramientas de simulación para predecir las alteraciones en la absorción. (25)

También se realizan investigaciones para la identificación de drogas contra *Plasmodium falciparum* mediante comparación de genomas mediante métodos computacionales. (22)

A nivel nacional se desarrollan estudios enfocados principalmente a la bioinformática, es decir a la biología molecular, como el desarrollo del análisis de las secuencias de aminoácidos, las técnicas in silico facilitan la realización de estas investigaciones. No se han desarrollado nuevas opciones farmacológicas a nivel nacional, así como a nivel local no se han realizado estudios relacionados con las técnicas in silico.

2.4. BASES TEÓRICO CIENTÍFICAS

2.4.1. HELMINTOS

Se sabe que las enfermedades parasitarias repercuten en la salud del hombre, en su esperanza de vida al nacer y en su productividad; han causado a lo largo de los años más muerte y daño económico a la humanidad que todas las guerras juntas. Las enfermedades parasitarias y la parasitosis se favorecen en las diferencias climáticas, de los fenómenos demográficos y del desarrollo

socioeconómico de las diferentes zonas del planeta. Al parecer, mediante técnicas moleculares aplicadas a los coprolitos encontrados en zonas arqueológicas de Chile y Perú se inició la búsqueda de DNA y se halló el nematodo *Enterobius vermicularis*, uno de los parásitos más antiguos encontrados en el hombre. (26)

Los metazoarios o helmintos son un grupo de organismos morfológicamente más complejos que los protozoarios, primero por su tamaño y segundo porque estos poseen órganos y tejidos; se reproducen sexualmente, pudiendo ser hermafroditas o pueden presentar dimorfismo sexual. La mayoría son ovíparos es decir que las hembras fecundadas originan huevos que poseen diferentes formas. Sin embargo, hay gusanos hembra que paren larvas como: la *Onchocerca volvulus* que origina microfilarias envainadas, el *Dracunculus medinenses* y la *Trichinella spiralis*, de acuerdo a la forma del gusano se dividen en tres clases:

Platelmintos: Céstodos

Tremátodos

Nematelmintos Nemátodos (26)

2.4.1.1. NEMÁTODOS

El phylum nematoda incluye una gran cantidad y diversidad de especies de gusanos cilíndricos, la mayoría son de vida libre, se encuentran en aguas marina, continentales y en el suelo húmedo, también existe un gran número de especies parásitas de plantas, así como de animales que parasitan a todos los grupos de vertebrados, y a diversos grupos de insectos y otros invertebrados.(27)

Los nematodos parásitos de humanos y otros animales se estudian dentro de la helmintología, son organismos generalmente pequeños, alargados, redondeados, con sus extremos más o menos puntiagudos, presentan movimientos activos, su cavidad corporal es incompleta, que se conoce como pseudoceloma. La pared del cuerpo está compuesta de tres capas, la más externa es la cutícula, la media se conoce como epidermis, la más interna está compuesta por musculatura somática. (27)

Los ciclos de vida de los nematodos presentan dos patrones básicos: directo o monoxeno (un solo hospedero en su ciclo) e indirecto o heteroxeno (dos o más hospederos en su ciclo). En ambos patrones se presenta una forma de desarrollo básico, cuando las larvas eclosionan, sufren una serie de cambios, que se inician con el primer estadio o larva uno L1, cada cambio o etapa se caracteriza por presentar una muda o renovación de la cutícula. Se conocen cuatro estadios larvales, después del cuarto se presenta el estadio adulto en el hospedero definitivo. El patrón de crecimiento de las larvas (L) y las sucesivas (M) se pueden esquematizar como sigue (27)

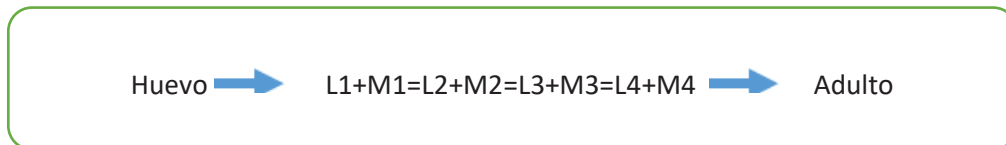


Fig N° 01 Patrón de crecimiento de Larvas

Fuente: Cruz A. Generalidades sobre Nematodos In Tay J, editor. Microbiología y Parasitología Médica. México: Méndez Editores; 2013. p. 576-579 (27)

2.4.1.2. UNCINARIASIS

La anquilostomiasis o uncinariasis es geohelminthiasis intestinal, causada por nematodos hematófagos de la familia Ancylostomidae, caracterizados por poseer una cápsula bucal quitinosa provista con piezas cortantes; es causada por la infección con los parásitos *Necator americanus* y *Ancylostoma duodenale* y se transmite por el contacto con los suelos de las regiones tropicales y subtropicales. (28)

Ancylostoma duodenale y *Necator americanus* son dos parásitos presentes en muchas partes del mundo, fundamentalmente en países de desarrollo, donde representan un problema para la salud pública. Se trata de dos nematodos que tienen diferencias en cuanto a la gravedad de la infección que ocasionan y la respuesta al tratamiento, pero su biología, epidemiología y manifestaciones clínicas son muy similares. (29)

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

1. Reino:	Animalia	Animalia
2. Phylum:	Nemathelminthes	Nemathelminthes
3. Clase:	Nematodos	Nematodos
4. Orden:	Strongylida	Strongylida
5. Familia:	Ancylostomatoidea	Ancylostomatoidea
6. Género:	<i>Necator</i>	<i>Ancylostoma</i>
7. Especie:	<i>americanus</i>	<i>duodenale</i>

CUADRO N° 01 DIFERENCIA DE LOS AGENTES ETIOLÓGICOS DE ANQUILOSTOMIASIS

<i>Ancylostoma duodenale</i>	<i>Necator americanus</i>
a) Hembra: mide de 10 a 18 mm de longitud.	a) Hembra: mide de 9 a 11 mm de longitud. b) Macho: mide de 7 a 9 mm de longitud.
b) Macho: mide de 8 a 11 mm de longitud.	c) Una vez fijado, el cuerpo de la hembra describe un gran arco, cuya parte cóncava corresponde a la cara ventral, y en su extremidad anterior, hace un pequeño arco en sentido
c) Una vez fijado, presenta una posición más irregular, y la extremidad cefálica es recta o con una	

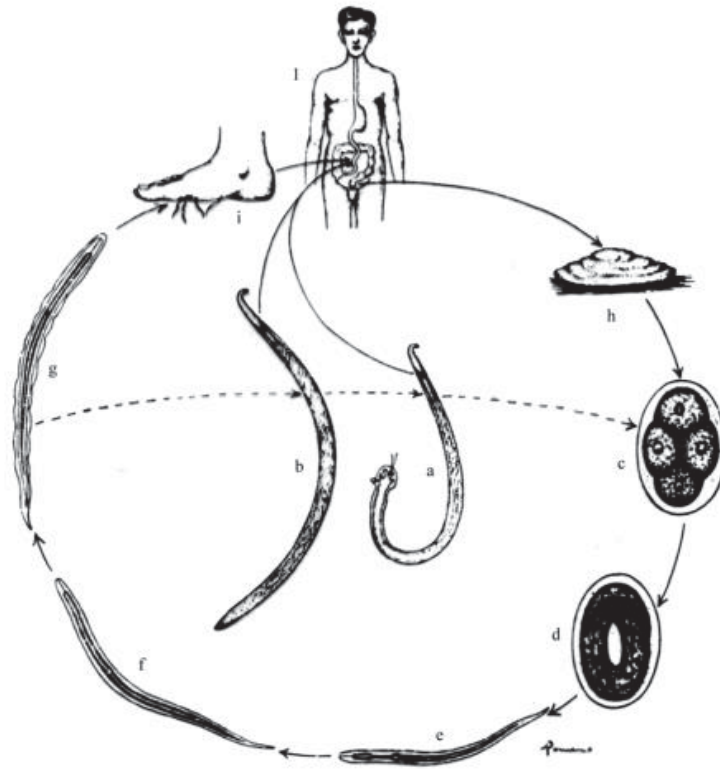
<p>curva muy ligera que sigue la curva general del cuerpo, siempre menos marcada que la de <i>Necator americanus</i>.</p> <p>d) Cápsula bucal con dos pares de ganchos.</p> <p>e) La hembra posee la vulva en el tercio posterior y en su extremo terminal un apéndice caudal.</p> <p>f) El macho presenta la bolsa copulatriz con 11 ó 13 costillas. Sus dos espículas son divergentes y terminan en una punta fina.</p>	<p>inverso a la curva general del cuerpo, o sea, hacia la cara dorsal. El macho describe el arco de forma más cerrada, pero tiene la curva cefálica igual a la hembra.</p> <p>d) Cápsula bucal con dos placas cortantes semilunares.</p> <p>e) La hembra muestra la vulva en el tercio medio.</p> <p>f) El macho presenta la bolsa copulatriz con 12 ó 14 costillas. Sus dos espículas son largas y se unen</p>
---	---

Fuente: Escobedo.A. et al. *Ancylostoma* y *Necator* Cap 97. In Sanchez T, editor. Microbiología y Parasitología Médicas Tomo III. La Habana: Editorial de Ciencias Médicas; 2015. p. 219-226.(29)

CICLO BIOLÓGICO DE UNCINARIAS

Las uncinarias tienen parte de su ciclo biológico en la tierra, y se adquieren por el contacto directo con ella cuando hay fecalismo. La hembra de *Necator americanus* pone entre 9000 y 10 000 huevos diarios y la de *Ancylostoma duodenale*, de 25 000 a 30 000. En el suelo se depositan los huevos diarios y eclosionan (26°C y 100% de humedad) a las 48 horas larvas rhabditoides L1 o L2; posteriormente se transforman en formas larvarias infectantes que entran por la piel como larvas filariformes L3. Estas penetran a través de la piel intacta y llegan hasta el corazón derecho y, después a los pulmones. Rompen el endotelio de capilares y alvéolos pulmonares, y provocan una alveolitis conocida como síndrome de Loeffler. Luego ascienden por bronquiólos, tráquea y laringe. Son deglutidos, alcanzan la faringe, llegan hasta el intestino delgado y se alojan en la mucosa duodenal. Finalmente, mudan para alcanzar la fase adulta. Los adultos muerden las vellosidades intestinales con sus placas cortantes y succionan sangre, pues poseen potentes y desarrollados esófagos para ello. Se ha encontrado que, en *Ancylostoma caninum*, la producción de una proteincinasa inhibidora de los factores de la coagulación Xa, VII/factor, denominada ancylostomina, permite que la sangre de los capilares fluya dentro de la cápsula bucal al intestino del parásito; este tipo de proteína también es producida por el *Necator americanus*.(26)

Fig N°02 . Ciclo de vida de *Necator americanus*. a y b Macho y hembra del parásito adulto.



Fuente: Escobedo.A. et al. *Ancylostoma* y *Necator* Cap 97. In Sanchez T, editor. Microbiología y Parasitología Médicas Tomo III. La Habana: Editorial de Ciencias Médicas; 2015. p. 223 (29)

2.4.2. PATOGENIA Y FISIOPATOLOGÍA

Al entrar las larvas filariformes por la piel, pueden causar una dermatitis conocida popularmente como sabañones, aparece eritema y ocasionalmente edema. Durante la fase pulmonar, con la migración de las larvas desde los capilares al alvéolo, se producen pequeñas hemorragias e infiltración de leucocitos. Esto raramente ocasiona síntomas, excepto en infecciones muy intensas. Ya en la fase intestinal los vermes se adhieren a la pared del intestino delgado, mediante sus dientes quitinosos o placas cortantes, la traumatizan con el fin de succionar sangre del huésped (entre 0,16 y 0.34 ml de sangre por cada verme en el caso de la infección por *Ancylostoma duodenale* y entre 0.03 y 0,05 ml por cada verme en el caso de la infección por *Necator americanus*). Es así que la cantidad de sangre perdida estará en dependencia de la especie parasitaria y el número de parásitos presentes en el intestino.(29)

CUADRO N° 02 MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE UNCINARIASIS

Localización	Signos y Síntomas	Patogenia
Dérmica	Dermatitis local pruriginosa, erupción papular o vesicular.	Invasión y migración de larvas. Larvas en reposo en tejidos: <i>A. duodenale</i>
Pulmonar	Fiebre, disnea, tos y ocasionalmente adenopatías llamado Loeffler..	Migración larvaria, hiperinfección
Gastrointestinal	Dolor y distensión abdominales, diarrea, melena, hiporexia.	Fijación de gusanos adultos, daño local a mucosa de intestino delgado, expoliación, enzimas.
Hematológica	Anemia hipocrómica microcítica (ferropénica), eosinofilia periférica.	Succión del huésped entre 0,16 y 0.34 ml de sangre por cada verme en el caso de la infección por <i>Ancylostoma duodenale</i> y entre 0.03 y 0,05 ml por cada verme en el caso de la infección por <i>Necator americanus</i>
General	Signos y síntomas agravados por desnutrición previa. Pérdida de peso y déficit cognitivo (niños), anemia y signos asociados, disnea, cianosis, fatiga.	Expoliación. Metabolitos, enzimas de los gusanos, carga parasitaria; contribuyen edad del hospedero, cronicidad, embarazo.

Fuente: Escobedo.A. et al. *Ancylostoma* y *Necator* Cap 97. In Sanchez T, editor. Microbiología y Parasitología Médicas Tomo III. La Habana: Editorial de Ciencias Médicas; 2015. p. 224 (29)

2.4.3. DIAGNÓSTICO DE UNCINARIASIS

El diagnóstico se establece por el hallazgo de los huevos o las larvas rhabditiformes en las materias fecales. Los huevos de *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus* son similares; a pesar de pequeñas diferencias en la talla, no pueden distinguirse uno de otro, por lo que su hallazgo debe ser informado como huevos de ancilostomídeos. La identificación por especies puede hacerse estudiando las características de los gusanos adultos cuando son expulsados de forma natural o después del tratamiento antihelmíntico. También es posible reconocerlas a través del coprocultivo de larvas por métodos como el de Harada-Mori, con el que se pueden observar los rasgos distintivos de estos parásitos.(29)

Se confirma mediante la identificación de los huevos de las uncinarias en exámenes coproparasitoscópicos, con métodos directos y de concentración. La técnica cuantitativa de Kato-katz es una referencia utilizada a nivel mundial para evaluar morbilidad, prevalencia, transmisión y en programas de vigilancia y control (Ej. determinación de la intensidad de la carga parasitaria y evaluación de la eficacia del fármaco empleado, entre otras funciones), a pesar de ciertas

limitaciones en relación a la sensibilidad de los resultados con una sola muestra.(30)

CUADRO N°03 FÁRMACOS UTILIZADOS EN LA HELMINTIASIS

HELMINTO	FÁRMACO UTILIZADO
Oxiuro (<i>Entamoeba vermicularis</i>)	Mebendazol-Albendazol
Strongyloides stercoralis	Albendazol, tiabendazol, ivermectina
Nematodos (<i>áscaris lumbricoides</i>)	Mebendazol, pirantel
Otros nematodos (filarias) <i>Onchocerca volvulus</i> <i>Triquinosis (Trichinella spiralis)</i> <i>Cisticercosis (Tenia solium)</i> <i>Hidatidosis (Echinococcus granulosus)</i> <i>Uncinariasis (Ancylostoma duodenale y Necator americanus)</i>	Ivermectina Tiabendazol, mebendazol Prazicuantel, albendazol Albendazol, prazicuantel Mebendazol, albendazol
Tremátodos hemáticos (especies de Schistosoma) <i>S. haematobium</i> <i>S. mansoni</i> <i>S. japonicum</i>	Prazicuantel Prazicuantel Prazicuantel

Fuente: Rang H et al. Farmacología. Quinta ed. Iglesias V, editor. Londres: Elsevier Science; 2003.pag 687-691 (31)

2.4.4. TRATAMIENTO DE UNCINARIASIS BENZOIMIDAZOLES

Los antihelmínticos benzoimidazólicos incluyen mebendazol, tiabendazol y albendazol. Estos compuestos son fármacos de amplio espectro y constituyen uno de los principales grupos de antihelmínticos que se utilizan clínicamente. Se unen a la B-tubulina libre, inhibiendo la polimerización y de esta manera interfieren el consumo de glucosa dependiente de los microtúbulos del helminto. Tienen una acción inhibitoria selectiva sobre la función de los microtúbulos del helminto y son 250-400 veces más potentes en los helmintos que en el tejido de los mamíferos. Hace falta tiempo para que aparezca este efecto y los helmintos no se eliminan en varios días. (31)

ALBENDAZOL:

Albendazol es un antihelmíntico de amplio espectro. Por vía oral, se absorbe rápidamente y se metaboliza a sulfóxido y sulfona, que son responsables de su acción antihelmíntica y se elimina gran parte por la orina, presenta una semivida en el plasma de unas ocho horas. Los efectos adversos (principalmente trastornos digestivos) no son frecuentes y habitualmente no precisan interrumpir el fármaco.(31)

MEBENDAZOL

Solo el 10% de mebendazol se absorbe después de la administración oral: una comida grasa aumenta la absorción. Se metaboliza rápidamente y los productos se excretan en la orina y la bilis en las siguientes 24-48 horas. Se aplica en dosis única en los oxiuros y dos veces al día durante tres días en las infestaciones por uncinarias y nematodos. Los efectos adversos son escasos con mebendazol, aunque de manera ocasional surgen trastornos digestivos. (31)

Las pequeñas cantidades absorbidas tras la administración oral sufren una fuerte metabolización en el hígado que las transforma en fracciones inactivas. La semivida en el plasma, que por lo general es de 2-9 horas, se alarga considerablemente en caso de trastorno de la función hepática. El mebendazol se elimina con las heces en gran parte sin transformar. (32)

EMPLEO EN EL EMBARAZO

Se ha demostrado experimentalmente que el mebendazol y albendazol pueden ser teratógenos. Aunque hay que dar siempre prioridad al tratamiento de las embarazadas, no debe administrarse mebendazol y albendazol durante el primer trimestre. (32)

2.4.5. SECUENCIACIÓN DE GENOMAS

El proyecto Earth Biogenoma es un consorcio internacional de científicos que tienen el objetivo de secuenciar, catalogar y analizar los genomas de todas las especies eucariotas conocidas de la tierra, para preservar la biodiversidad del planeta. También es similar al proyecto Earth Microbiome, que ha contado con el apoyo de más de 500 científicos. La genómica ha ayudado a desarrollar nuevos medicamentos y nuevas fuentes de energía renovable, alimentar a una población en crecimiento, proteger el medio ambiente y apoyar la supervivencia y el bienestar humano.(33)

Las dos cadenas de DNA están estabilizadas entre si por puentes de hidrógenos, que ocurren entre las bases de las dos cadenas, se dice que las cadenas están apareadas esto es muy preciso adenina con timina, citosina con guanina. La información biológica presente en el DNA se encuentra codificada en el orden preciso de estos nucleótidos dentro de la molécula de DNA, lo que denominamos **secuencia de nucleótidos**. (34)

La técnica empleada en la actualidad para la secuenciación de DNA es una modificación de la desarrollada por Frederik Sanger conocida como el método de los **terminadores de cadena**, basado en el uso de una enzima, la DNA polimerasa (cuya actividad es la de extender una cadena de DNA polimerizando nucleótidos en uno de sus extremos), para su funcionamiento necesita de tres reactivos: un DNA que le sirve de molde, otro DNA que le sirve de iniciador de la reacción y los 4 nucleótidos componentes del DNA.(34)

La clave de esta técnica consiste en adicionar, junto a los reactivos una pequeña cantidad de nucleótidos modificados que se incorporan en la cadena que se está elongando haciendo imposible que la polimerización en esta molécula continúe, es decir que actúen como terminadores de la cadena. Por ejemplo, si en una reacción se añade un porcentaje de nucleótido A modificado que se denominará ddA,, en cada una de las posiciones en las que se debe incorporar una A, una fracción de las moléculas que se están sintetizando incorporaran en su lugar ddA y la polimerización se detendrá en este nucleótido. En el resto de las moléculas en las que se ha incorporado correctamente una A, la polimerización continuará hasta la siguiente A de la secuencia, momento en que se repetirá la situación anterior, una fracción de las moléculas incorporará ddA deteniéndose la reacción de polimerización en estas moléculas y el resto continuará con el proceso de polimerización. Para obtener la secuencia completa de una molécula de DNA, lo que se hace es correr en paralelo reacciones como la descrita anteriormente para los cuatro componentes del DNA. En ellas se añaden los mismos reactivos y un nucleótido modificado diferente (ddA, ddG, ddC o ddT), según cual sea el tipo de bases que queremos determinar en esa reacción. Las moléculas de DNA sintetizadas en cada una de las reacciones se separan en paralelo mediante electroforesis y la secuencia de la molécula de DNA se deduce observando en que reacción se ha parado la elongación correspondiente a esa posición.(34)

2.4.5.1. GENOMA

El genoma es un depósito de información biológica, pero por sí mismo es incapaz de liberar esa información a la célula. La utilización de la información biológica contenida en el genoma requiere la actividad coordinada de enzimas y otras proteínas, que participan en una compleja serie de reacciones bioquímicas conocida como expresión del genoma. El producto inicial de la expresión del genoma es el transcriptoma, un conjunto de moléculas de RNA derivadas de los genes que codifican proteínas, cuya información biológica es requerida por la célula de un determinado momento. El transcriptoma es mantenido por el proceso denominado transcripción, que copia genes individuales a moléculas de RNA. (35)

PROTEÍNAS Y PROTEOMA

El segundo producto de expresión del genoma es el proteoma, el repertorio de proteínas de la célula, que especifica el carácter de las reacciones bioquímicas que ésta es capaz de realizar. Estas proteínas son sintetizadas por traducción de las moléculas mRNA que forman el transcriptoma. (35)

El proteoma comprende todas las proteínas presentes en una célula en un momento determinado. El número de copias de cada proteína varía enormemente, de menos de 20 000 moléculas por célula, para los tipos más raros, hasta 100 millones de copias, para los más comunes se considera que cualquier proteína que está presente con un número de copias superior a 50 000

por célula es relativamente abundante y en la célula promedio de mamífero, alrededor de 2000 proteínas caen dentro de esta categoría. (36)

2.4.5.2. ESTRUCTURA PROTEÍCA

Una proteína, al igual que una molécula de DNA, es un polímero lineal, no ramificado. En las proteínas, las subunidades monoméricas se denominan aminoácidos y los polímeros resultantes, o polipéptidos, rara vez tienen más de 2 000 unidades de longitud. Como en el caso del DNA, las características claves de la estructura proteica se determinaron en la primera mitad del siglo XX; esta fase de la bioquímica proteica culminó en la década de 1940 y principios de la de 1950 con el esclarecimiento, por Pauling y Corey, de las principales conformaciones o estructuras secundarias, adoptadas por los polipéptidos. (36)

LOS CUATRO NIVELES DE LA ESTRUCTURA PROTEÍCA

- ✓ ESTRUCTURA PRIMARIA: Está compuesta por la unión de los aminoácidos en un polipéptido. Los aminoácidos están unidos por enlaces peptídicos, formados por una reacción de condensación entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino de un segundo aminoácido.
- ✓ ESTRUCTURA SECUNDARIA: Hace referencia a las diferentes conformaciones que puede adoptar el polipéptido. Los dos tipos principales de estructura secundaria son la hélice alfa y la hoja beta. Estas son estabilizadas sobre todo por enlaces de hidrógeno que se forman entre distintos aminoácidos del polipéptido. La mayoría de los polipéptidos son suficientemente largos para plegarse en una serie de estructuras secundarias, uno después de otro a lo largo de la molécula.
- ✓ ESTRUCTURA TERCIARIA: Obedece al plegamiento de los componentes de la estructura secundaria del polipéptido en una configuración tridimensional. La estructura terciaria estabilizada por diversas fuerzas químicas, como enlaces de hidrógeno entre aminoácidos individuales, interacciones electrostáticas entre los grupos R de los aminoácidos con carga y fuerzas hidrófobas, también puede haber enlaces covalentes denominados puentes disulfuro.
- ✓ ESTRUCTURA CUATERNARIA: Consiste en la asociación de dos o más polipéptidos, cada uno plegado en su estructura terciaria, en una proteína de múltiples subunidades. No todas las proteínas forman estructuras cuaternarias, pero estas son una característica de muchas proteínas con funciones complejas, incluidas varias que participan en la expresión del genoma. (36)

2.4.5.3. PROTEÍNAS SECUENCIADAS POR HERRAMIENTAS COMPUTACIONALES

PROTEÍNAS HIPOTÉTICAS

Una gran parte de los proteomas de mamíferos está representada por proteínas hipotéticas, es decir, proteínas pronosticadas solo a partir de secuencias de ácido nucleico y secuencias de proteínas con función desconocida. Las bases de datos están lejos de estar completas y se esperan errores. La legión de proteínas hipotéticas está a la espera de experimentos para mostrar su existencia a nivel de proteínas y el manejo bioinformático posterior para asignar proteínas a una función tentativa es obligatoria. La electroforesis en gel bidimensional con posterior identificación espectrométrica de masas de manchas de proteínas es una herramienta adecuada para buscar proteínas hipotéticas en el modo de alto rendimiento. (37)

PROTEÍNAS PUTATIVAS

La capacidad de desarrollar hipótesis de manera rápida y confiable sobre la función de las secuencias de proteínas recién descubiertas requiere un análisis sistemático y completo. Esta proteína se llama como proteína putativa. Porque aún no está purificado. Su presencia y función no está establecida por los métodos estándar aceptados. (38)

2.4.6. ENZIMAS

Son biomoléculas de naturaleza proteica que aceleran la velocidad de reacción hasta alcanzar el equilibrio. Constituyen el tipo de proteínas más numeroso y especializado y actúan como catalizadores de reacciones químicas específicas en los seres vivos o sistemas biológicos. Muchas de las enzimas no trabajan solas, se organizan en secuencias, también llamadas rutas metabólicas, y muchas de ellas tienen la capacidad de regular su actividad enzimática. (39)

2.4.6.1. MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS ENZIMAS

- Energía de Activación

En toda reacción química se produce la transformación de unas moléculas iniciales denominadas sustratos (S) en las reacciones bioquímicas, en unas sustancias finales o productos (P). Esta transformación necesita, en la mayoría de las reacciones un aporte inicial de energía que aumenta la energía cinética de las moléculas y estas reaccionan permitiendo que un mayor número de ellas, choquen con suficiente fuerza para superar su repulsión mutua y debilitar los enlaces químicos que poseen.(39)

- El Catalizador

Un catalizador disminuye la energía de activación necesaria para una reacción, porque forma una asociación pasajera con las moléculas que reaccionan. Esto

favorece tanto a la ruptura de enlaces existentes, como la formación de otros nuevos. El catalizador no sufre ninguna alteración permanente en el proceso y puede volver a utilizarse.(39)

- Reacciones Enzimáticas

En estas reacciones, la enzima (E) se une al sustrato (S) para formar el complejo enzima-sustrato (ES). Después tiene lugar la transformación del sustrato (S) en producto (P), liberándose el producto (P) y quedando libre la enzima (E) para una nueva unión con el sustrato. Las enzimas, como los demás catalizadores aceleran la reacción sin alterar la posición de equilibrio en una reacción química.(39)

- La Constante de Equilibrio

La constante de equilibrio K, se produce en las reacciones enzimáticas y siempre tiene un valor constante fijado por la relación entre las velocidades en uno u otro sentido, independientemente de que el catalizador esté o no presente. La catálisis hace disminuir considerablemente el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio. (39)

2.4.6.2. CLASIFICACIÓN Y NOMENCLATURA DE LAS ENZIMAS

La International Union of Biochemistry (IUB), adoptó un esquema para la clasificación funcional sistemática y la nomenclatura de las enzimas. Así, las enzimas se clasifican y designan de acuerdo con la naturaleza de las reacciones químicas que catalizan. De esta manera se definieron 6 clases de enzimas divididas a su vez en subclases y sub-subclases. (40)

- Oxidoreductasas: son las que catalizan reacciones de oxidación o reducción del sustrato, es decir, procesos de transferencia de electrones.
- Transferasas: las que intervienen en reacciones de transferencia de un grupo funcional de un sustrato a otro. Por ejemplo, las quinasas, que transfieren grupos fosfato.
- Hidrolasas: son las que aceleran reacciones de hidrólisis en las que se rompe una molécula por introducción de una molécula de agua disociada en sus componentes: OH^- y H^+ . Por ejemplo, las esterasas, las peptidasas y las glucosidasas.
- Liasas: si participan en reacciones en las que se rompen enlaces C-C; C-O o C-N, dando lugar a la aparición de dobles enlaces o liberación de grupos químicos. Ejemplos desaminasas y descarboxilasas.
- Isomerasas: intervienen en reacciones en las que una molécula se transforma en su isómero. Ejemplo la triosa isomerasa.
- Ligasas: las aceleran reacciones en las que dos o más moléculas se unen para dar otra más compleja. Catalizan la formación de enlaces y precisan energía que procede del ATP. (40)

Enseguida se presentan las clases y algunas de las subclases correspondientes a cada clase.

Fig N°03 Subclases de cada clase de enzimas

1.- Oxidorreductasas	Transferencia de electrones	2.- Transferasas	Transferencia de grupos funcionales	3.- Hidrolasas	Reacciones de hidrólisis
1.1 Actúan sobre grupos hidroxilo	$\begin{array}{c} \diagup \\ \text{CH-OH} \\ \diagdown \end{array}$	2.1 Grupos de un átomo de carbono		3.1 Esteres	
1.2 Actúan sobre grupos ceto	$\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C=O} \\ \diagdown \end{array}$	2.2 Grupos aldehído y cetona		3.2 Enlaces glucosídicos	
1.3 Actúan sobre grupos alqueno	$-\text{CH}=\text{CH}-$	2.3 Grupos de acilo		3.3 Enlaces peptídicos	
1.4 Actúan sobre grupos amino	$\begin{array}{c} \diagup \\ \text{CH-NH}_2 \\ \diagdown \end{array}$	2.4 Grupos glucósido		3.4 Otros enlaces C-N	
1.5 Actúan sobre grupos imino	$\begin{array}{c} \diagup \\ \text{CH-NH-} \\ \diagdown \end{array}$	2.5 Grupos fosfato		3.5 Enlaces anhidridos	
1.6 Actúan sobre grupos	NADH y NADPH	2.6 Grupos con azufre			
4.- Liasas	Adición a dobles enlaces	5.- Isomerasas	Reacciones de isomerización (racemasas)	6.- Ligasas	Participan en la formación de enlaces covalentes, con hidrólisis de ATP
4.1 Adición de grupos a alquenos	$-\text{CH}=\text{CH}-$			6.1 C-O	
4.2 Adición de grupos ceto	$\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C=O} \\ \diagdown \end{array}$			6.2 C-S	
4.3 Adición de grupos nitrilo	$\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C=N} \\ \diagdown \end{array}$			6.3 C-N	
				6.4 C-C	

Fuente: Peña A, et al. Bioquímica. Segunda ed. Editores GN, editor: Limusa; México 2004. (40)

La nomenclatura de la IUB comienza con las siglas EC que significa Enzyme Commission, seguida por el número de la clase, luego la subclase, la sub subclase y el cuarto número, es el número de serie de la enzima asignada arbitrariamente en la sub subclase. Por ejemplo, EC 3.4.17.1.(40)

El número 3 indica que la enzima pertenece a la clase de las hidrolasas, el 4 indica que actúa sobre el enlace peptídico (C-N), el número 17 designa la sub subclase metalocarboxipeptidasas. El cuarto número (1) es el número de serie. La enzima en cuestión es la carboxipeptidasa A, la cual tiene un ion Zn como cofactor que es esencial para su actividad catalítica. (40)

ENERGÍA DE UNIÓN ENTRE ENZIMA Y SUSTRATO

Mediante la formación de un gran número de interacciones débiles entre sustrato y su enzima complementaria se libera energía libre. Solamente el sustrato correcto puede participar en la mayoría de las interacciones con la enzima y de esta manera incrementar la energía de unión. La energía liberada por las interacciones entre la enzima y el sustrato permite que la energía de activación disminuya (40)

2.4.7. MÉTODOS COMPUTACIONALES-IN SILICO

La modelización de los fenómenos naturales no es una práctica que se inició en los últimos años. Sin embargo, con el avance de la tecnología, la posibilidad de modelizar los fenómenos naturales se ha hecho cada vez más común, debido a la velocidad a la que se pueden resolver los modelos con la ayuda de las ciencias informáticas. La interrelación de las ciencias biológicas con las ciencias de la computación y la ingeniería han permitido construir y resolver modelos

matemáticos que permiten llevar a una computadora un determinado fenómeno.(41)

Estos modelos matemáticos computacionales o modelos in silico permiten simular situaciones reales, modificando los valores de las variables involucradas en un amplio rango de valores y contrastarlos con los valores reales. De esta manera nos mostrarán comportamientos que quizá llevaría décadas obtener de la observación o de la experimentación. Los modelos in silico a nivel biológico podríamos decir que están surgiendo lentamente, pero de manera sostenida. El número de publicaciones periódicas en esa área lo avalan. (41)

Los experimentos in silico son novedosos, ya que incorporan la computadora y los softwares de simulación, pero no son novedosos en la ciencia. El avance de los modelos in silico ha sido importante y ya hay quienes plantean el reemplazo de experimentos con animales por experimentos en simuladores. Por ejemplo, a nivel de la genotoxicidad, se estima que con el enorme número de sustancias con dicha capacidad podría llevar cientos de años llegar a obtener resultados fiables con modelos in vitro o in vivo. En cambio, el uso de algoritmos adecuados puede conducir a resultados fiables en mucho menos tiempo. (41)

Durante las últimas dos décadas, varios métodos in silico han aplicado y desarrollado pruebas. de hipótesis farmacodinámicas, farmacocinéticas y toxicológicas. Estos métodos in silico incluyen bases de datos, modelos de homología y otros enfoques de modelado molecular, herramientas de análisis de redes y datos. Herramientas de análisis que utilizan computadoras. Una vasta y rápida literatura creciente y una gama de herramientas in silico ahora están disponibles. (13)

VENTAJAS Y LIMITACIONES

Las ventajas de los enfoques in silico son claras: ofrecen muy alto rendimiento a un costo razonable. Algunos puntos pueden ser determinados con alta precisión (por ejemplo, propiedades fisicoquímicas), mientras que otros aún son difíciles o imposible de predecir (por ejemplo, toxicidad del órgano diana) (13)

Es verdaderamente efectivo, un modelo in silico debe extenderse más allá de la farmacocinética y también incluyen puntos finales farmacodinámicos y toxicológicos. Los modelos in silico se basan generalmente en datos existentes de humanos, por lo que sus predicciones son directamente aplicables a los humanos.(13)

La dificultad para predecir la absorción oral, la biodisponibilidad y depuración se encuentra en la cuantificación experimental de solubilidad, permeabilidad de membrana, proteína plasmática, metabolismo y transporte activo.

A pesar de los avances sustanciales que se han hecho, sigue siendo una falta general de correlación cuantitativa de in vivo en parámetros de ADME in vitro-in silico. (13)

▪ BIOINFORMÁTICA

La bioinformática es una disciplina que se origina a partir de los primeros análisis computacionales de secuencias de DNA y proteínas. Con el transcurrir del tiempo, el análisis de dichas secuencias sentó las bases de la bioinformática estructural, ahora tras el éxito científico y tecnológico de diversos proyectos de secuenciación de genomas como el humano, de *Arabidopsis thaliana* y de arroz y abordado principalmente por biólogos moleculares que desarrollan investigación en genómica y proteómica. Por otra parte, la bioinformática formal se enfoca al desarrollo de procesos informáticos para modelar y simular sistemas biológicos, así como al desarrollo y aplicación de algoritmos orientados al análisis de datos de distintas disciplinas científicas, para lo cual se aplican tanto métodos clásicos en bioinformática como de vida e inteligencia artificial. Además de técnicas de simulación, en este último enfoque se incluyen algoritmos bioinspirados o procedimientos computacionales inspirados en sistemas y fenómenos naturales como el crecimiento, el desarrollo, la reproducción, la evolución, la selección y la adaptación, entre otros.(42)

La bioinformática es una ciencia multi e interdisciplinaria con sólidos fundamentos de las ciencias básicas de biología molecular, del funcionamiento básico de los dispositivos aplicados en informática y de computación aplicada a la biología de sistemas.(42)

El análisis bioinformático no solo puede acelerar la identificación del objetivo del fármaco y la selección y el refinamiento del candidato, sino que también facilita la caracterización de los efectos secundarios y predice la resistencia al fármaco. Los datos de alto rendimiento, como los datos genómicos, epigenéticos, de arquitectura genómica, cistrómicos, transcriptómicos, proteómicos y de perfiles de ribosomas, han hecho una contribución significativa al descubrimiento de fármacos basado en mecanismos y la reposición de fármacos. (43)

TECNOLOGÍAS EXPERIMENTALES PARA LA VALIDACIÓN DE BLANCOS

Actualmente, el número de blancos conocidos que responden a la acción de medicamentos conocidos se aproxima a varios cientos, mientras que el número de nuevos blancos de perspectiva que se pueden recuperar de la información genómica está llegando a miles. En este contexto, es muy difícil elegir blancos óptimos. En las industrias farmacéuticas y biotecnológicas, esta selección es vital para reducir el costo y el tiempo necesarios para producir un medicamento. Las fallas costosas se pueden evitar tan pronto como sea posible mediante el uso de la validación de blancos experimentales: el proceso de decidir si una proteína blanco probable se puede usar para diseñar nuevas drogas. Por lo tanto, la validación del blanco es actualmente el cuello de botella de la implementación de la plataforma "from gene to lead". Es importante tener en cuenta que la selección del blanco final define todas las fases posteriores de la plataforma. Cuando se seleccionan varios blancos, el proyecto se dividirá en varios proyectos independientes con un aumento proporcional en los gastos totales. Por lo tanto, la tarea principal de la validación del blanco es una reducción máxima en el número de blancos potenciales (al menos hasta 10) y la

obtención de información adicional para la priorización del objetivo. Las técnicas experimentales existentes para la validación del blanco son diversas y van desde enfoques in vitro hasta modelos animales. Está estipulado por la novedad del problema dado, cuya solución es solo al principio. Los investigadores pueden realizar la elección final del objetivo "correcto" o "mejor" una vez que la implementación del blanco haya resultado exitosa y factible.(43)

2.4.8. MODELIZACIÓN DE PROTEÍNAS POR HOMOLOGÍA

La modelización por homología usa estructuras determinadas experimentalmente (plantillas) para predecir la conformación de otra proteína (diana) que tiene una secuencia de aminoácidos similar a la plantilla. Esta aproximación a la modelización de proteínas es posible ya que un pequeño cambio en la secuencia de la proteína usualmente resulta en un pequeño cambio en su estructura 3D. Se asume que la estructura está más conservada que la secuencia, de modo que, si la proteína que se quiere modelar presenta más de un 30% de identidad con una proteína de estructura conocida, ambas proteínas pueden considerarse estructuralmente semejantes. Las condiciones necesarias son pues que la similitud entre la secuencia diana y la/las plantilla/s sea detectable y que se pueda construir un correcto alineamiento entre ellas.

La modelización por homología se basa en dos grandes observaciones:

- La estructura de una proteína está únicamente determinada por su secuencia de aminoácidos. Conocer la secuencia debería ser suficiente, al menos en teoría, para obtener la estructura.
- Durante la evolución, la estructura es más estable y cambia más lentamente que la secuencia asociada, con lo que secuencias similares adoptan prácticamente idénticas estructuras, y secuencias relacionadas distantes en el tiempo todavía se pliegan en estructuras similares. Esta relación fue identificada primeramente por Chothia and Lesk (1986) y después cuantificada por Sander and Schneider (1991).

La modelización por homología empieza con la búsqueda de estructuras de proteínas conocidas en una base de datos, típicamente el Protein Data bank, PDB O NCBI, usando la secuencia diana como referencia. Se compara la secuencia diana con cada una de las secuencias de las estructuras encontradas en la base de datos. Existen diferentes métodos de comparación secuencia-secuencia, así como muchos servidores de buscadores en bases de datos como BLASTT, FASTA, 123D, PHDTHREADER, UCLA-DOE FRSSVR o PROFIT entre otros. (44)

2.2.8.1 MODELIZACIÓN MOLECULAR

Existen dos grandes áreas en la química computacional para el desarrollo de modelos moleculares: las técnicas de Mecánica Molecular (modelos clásicos) y las de Mecánica Cuántica (modelos cuánticos). Ambos métodos pretenden:

- Calcular la energía asociada a una estructura molecular determinada y así poder derivar propiedades asociadas a ésta.
- Encontrar la estructura molecular con menor energía (optimización de geometría o minimización de energía).
- Simular la variación a lo largo del tiempo de una determinada estructura molecular (dinámica molecular). Aunque tradicionalmente este estudio era exclusivo de la mecánica molecular por su coste y recursos computacionales necesarios, actualmente se empieza a utilizar en sistemas pequeños a través de modelos cuánticos.

Ahora bien, estos problemas se abordan de manera diferente. La Mecánica Molecular (MM) estudia el comportamiento dinámico de los átomos, mientras que la Mecánica Cuántica (QM) estudia la dinámica electrónica. Así pues, la Mecánica Molecular trata la geometría en el equilibrio o análisis conformacional entre otras cosas, y es aplicable a entidades moleculares grandes, de entre cien y cien mil átomos.

La mecánica molecular considera a los átomos como bolas unidas por muelles (representando los enlaces entre átomos) según los criterios de la física clásica. Para definir el sistema en Mecánica Molecular, se utilizan los denominados campos de fuerza o force fields (conjunto que forman las ecuaciones para calcular las contribuciones a la energía y los valores de los parámetros ajustables al equilibrio). Cada force field define una ecuación de energía potencial, de manera que la energía de una molécula en una conformación determinada se calcula a partir de la que tendrían idealmente las partes que la constituyen.(44)

REGLA DE CINCO DE LIPINZKI

Modelo desarrollado por Christopher A. Lipinzi conocida como regla de cinco. El estudio tuvo como propósito analizar las propiedades físico-químicas que determinan la permeabilidad a través del epitelio intestinal en los medicamentos actualmente suministrados por vía oral. El nombre del modelo se debe a que los parámetros de evaluación se enmarcan en múltiplos de 5 y la molécula candidata no puede violar más de dos de las siguientes reglas: no más de 5 átomos de Nitrógeno y Oxígeno donantes de Hidrógenos, no más de 10 átomos de Nitrógeno y Oxígeno receptores de Hidrógenos, Peso molecular por debajo de los 500 Daltons y un coeficiente de partición Octanol-Agua (LogP) menor de 4.15. (45)

La inserción del peso molecular es un determinante esencial dado que afecta de manera directamente proporcional la permeabilidad a través de la barrera intestinal y vascular, puesto que la evidencia experimental indica que solo las moléculas liposolubles y de peso molecular menor de 500 Daltons son transferidas por intermediación lipídica o por unión a proteínas de plasma en cantidades farmacológicamente significativas. En química farmacéutica la

lipofilicidad se expresa como la división de la solubilidad en octanol sobre la solubilidad en agua de la forma no ionizada, la cual se conoce como LogP y puede ser calculado matemáticamente de la estructura química. Estudios han reportado que moléculas con un número elevado de aceptores o donadores de hidrógeno tienen menor difusión a través de las membranas lipídicas. En resumen si dos o mas de estos parámetros están fuera de rango es probable que los compuestos presenten una escasa solubilidad (cuando supera los valores críticos de logP o peso molecular) o una pobre absorción (cuando supera los valores críticos de los números de donadores o aceptores de hidrógeno). (45)

2.4.9. MINIMIZACION DE ENERGÍA

La optimización de la geometría de un sistema molecular consiste en localizar la estructura molecular con menor energía; por ello se utilizan de manera indistinta los términos de minimización de energía y optimización de geometría.

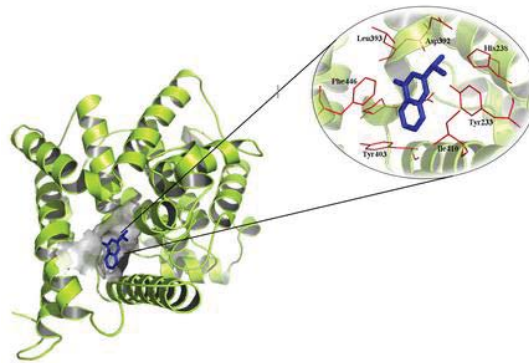
Los métodos habituales de optimización de geometría se basan en el cálculo de las derivadas de la energía con respecto a los grados de libertad geométricos. Los métodos derivativos se diferencian entre los de orden uno y orden dos. Los métodos derivativos de orden uno son los basados en el gradiente de energía, los cuales buscan desplazar el sistema en una dirección que conduzca a un valor menor de energía. Estos métodos presentan el inconveniente de tender a conducir el sistema hacia mínimos de energía próximos a la posición de partida (mínimos locales), los cuales no tienen por qué coincidir con el mínimo global correspondiente a la geometría óptima que se pretende hallar. (44)

2.4.10. DOCKING MOLECULAR

El acoplamiento molecular (conocido como docking) es una técnica de mecánica molecular ampliamente utilizada para predecir energías y modos de enlace entre ligandos y proteínas, información de gran utilidad en el estudio de nuevos compuestos con efectos terapéuticos. No obstante, los resultados obtenidos mediante esta técnica tienden a la subjetividad, debido a que los programas utilizados para llevarla a cabo proporcionan más de un criterio de selección de la mejor pose. (46)

En otras palabras, el Docking molecular apunta a predecir si una molécula se une a otra, si la geometría del par de moléculas es complementaria e involucra interacciones bioquímicas favorables, esas moléculas podrán unirse potencialmente *in vivo* o *in vitro*.

Fig N° 04 Docking Molecular entre un Receptor y un Ligando



Fuente: Medina J, et al. Avances en el diseño de Fármacos asistido por Computadora.2015(24)

El objetivo del acoplamiento molecular es encontrar el modo de unión más favorecido de un ligando con el receptor. El acoplamiento molecular requiere de dos componentes que pueden ser caracterizados, en forma general, como la etapa de “búsqueda” y la etapa de “evaluación”.

La búsqueda se refiere a la exploración del espacio configuracional accesible para el ligando dentro del receptor. El objetivo de esta exploración es encontrar la orientación y conformación del ligando que corresponda al mínimo global de la energía libre de unión.

Por su parte, la etapa de evaluación se refiere a la asignación de un valor numérico a cada una de las configuraciones generadas durante la etapa de búsqueda. Esto permite establecer un orden entre las diferentes posiciones y configuraciones encontradas. Generalmente, aquella posición con la mejor evaluación es la que representa el modo de unión más probable. La predicción o cálculo del modo de unión de un ligando con su receptor es muy valiosa para el entendimiento del modo de acción de moléculas con actividad biológica. Como consecuencia, el acoplamiento molecular es un auxiliar muy útil para el diseño de nuevas estructuras. (24)

2.4.10.1. ENERGÍA LIBRE DE GIBBS

En los últimos años, se ha vuelto común expresar la energía de unión en términos de eficiencia de enlace (LE). La eficiencia de enlace y propiedades termodinámicas constitutivas del ΔG (ΔH y ΔS), pueden proporcionar información sobre la unión de una molécula con su ligando.

La energía libre estándar (ΔG°) de unión del complejo enzima-sustrato, puede ser calculada utilizando la siguiente ecuación.

$$\Delta G^\circ = -2.3RT \log (1/K_i) = 2.3RT \log (K_i)$$

La temperatura usada normalmente es 298 K (25° C). Valores más negativos indican mayores energías de unión.

Los cambios de entalpía (ΔH) y de entropía (ΔS), deben ser considerados en la evaluación de la energía de unión

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Interacciones que son controladas por la entalpía, son los puentes de hidrógeno formados entre el medicamento y la enzima, mientras que efectos hidrofóbicos controlan los cambios en entropía. Cuando un compuesto no polar se encuentra en solución acuosa, las moléculas de agua forman una capa altamente ordenada alrededor de las porciones no polares del compuesto (efecto hidrofóbico).

En el diseño de fármacos, el valor de ΔG permite evaluar si la modificación de un medicamento aumenta o disminuye la afinidad con su objetivo biológico, estimando la estabilidad relativa de los diferentes compuestos. En síntesis, se puede utilizar para determinar si el sistema está en equilibrio, o qué tan rápido y en qué medida es probable que se dé la reacción de asociación.

La importancia descriptiva de ΔG , hace que sea interesante determinar su valor mediante métodos computacionales. (47)

2.4.11. PATHOGEN BOX

La MMV (Medicines for Malaria Venture) fue creada en el año 1999, para llenar el vacío creado en un mercado deficiente por la falta de investigación farmacológica contra el paludismo, con el objetivo de trabajar con socios del sector público y privado para descubrir, desarrollar y ofrecer nuevos y eficaces tratamientos. Actualmente la MMV se pone a disposición de los investigadores, un ejemplo fue la creación de la MMV Malaria Box, que ofrece a los investigadores la oportunidad de realizar, sin costo alguno, un cribado entre 400 compuestos antipalúdicos para comprobar su eficacia contra otras enfermedades. El éxito de la MMV Malaria Box ha motivado el lanzamiento de Pathogen Box, que ofrece 400 moléculas activas contra diversas enfermedades desatendidas y se requiere que los datos resultantes pasen a formar parte del dominio público. (48)

Pathogen Box contiene 400 moléculas diversas, similares a medicamentos, contra enfermedades de interés desatendidas y está disponible de forma gratuita. Los compuestos de Pathogen Box contienen 10 μL de una solución de dimetilsulfóxido (DMSO) 10 mM de cada compuesto. A solicitud, los investigadores de todo el mundo reciben una caja de moléculas contra patógenos para ayudar a catalizar el descubrimiento de medicamentos para enfermedades desatendidas. A cambio, se les pide a los investigadores que compartan cualquier información generada en el dominio público dentro de los 2 años, creando un foro abierto y de colaboración para la investigación de medicamentos de enfermedades desatendidas.

Especialmente Pathogen box está dirigida a las siguientes enfermedades: ascariasis, chagas, criptosporidiosis, anquilostomas, tripanosomiasis, leishmaniosis, malaria, trichuriasis, tuberculosis. (48)

SISTEMA OPERATIVO

LINUX-UBUNTU

Linux es un sistema operativo (es lo que da vida a la máquina, se trata de un conjunto de componentes de software que permiten administrar y controlar los componentes de hardware de una computadora) de libre distribución creado por Linus Torvalds, entregado a la comunidad de software libre y desarrollado por la misma.

Este sistema operativo posee un gran volumen de desarrolladores y es muy reconocido a nivel mundial, Linux se da en distribuciones (versión diferente del mismo sistema); algunas distribuciones famosas son: Fedora, Debian, Suse, Mandriva y Ubuntu.

Ubuntu es una de las grandes distribuciones de Linux, Ubuntu está preparada para todo tipo de usuarios, pudiendo controlar todo el equipo en forma gráfica.
(49)

2.4.12. BASE DE DATOS DE GENOMAS:

A medida que se fueron introduciendo las líneas de comunicación, los terminales y los discos, se fueron escribiendo programas que permitían a varios usuarios consultar los mismos ficheros on-line y de forma simultánea. Más adelante fue surgiendo la necesidad de hacer las actualizaciones también on-line.

En otras palabras, una base de datos es un conjunto estructurado de datos que representa entidades y sus interrelaciones. La representación será única e integrada, a pesar de que se debe permitir utilizaciones varias y simultaneas.
(50)

- **NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica)**

Es parte de la biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos, una rama de los Institutos Nacionales de Salud. Localizado en Bethesda Maryland y fue fundado el 4 de noviembre de 1968 con la misión de ser una importante fuente de información de biología molecular, almacena y constantemente actualiza la información referente a secuencias genómicas en GenBank, un índice de artículos científicos referentes a biomedicina, biotecnología, bioquímica, genética y genómica en PubMed, una recopilación de enfermedades genéticas humanas en ONIM, además de otros datos biotecnológicos de relevancia en diversas bases de datos. Todas las bases de datos del NCBI están disponibles en línea de manera gratuita. (51)

El NCBI agrupa sus bases de datos en tres grandes sectores: Literature Databases (PubMed), Molecular Databases (Nucleotide Sequences, Protein Sequences, Genes, Gene Expression) y Genomes. Estas dos últimas clases comprenden un grupo amplio y diverso de base de datos biológicos cuya información procede básicamente de los resultados de experimentos científicos, suministrados directamente por los laboratorios o instituciones que lo realizan.

Donde con frecuencia se aplican tecnologías de experimentación de muy alto rendimiento y el análisis computacional, la información contenida en estas bases de datos comprende: funciones, estructura y localización de los genes, así como las similitudes entre secuencias y estructuras biológicas. (51)

2.4.13. SOFTWARE:

El software es el conjunto de los programas de cómputo, procedimientos, reglas, documentación y datos asociados, que forman parte de las operaciones de un sistema de computación, en otras palabras, son todos los programas o aplicaciones que integran un ordenador y que le permiten realizar tareas específicas. (49)

OPEN BABEL

En pocas palabras, Open Babel es una versión gratuita y de código abierto del programa de traducción de archivos de química de Babel. Open Babel es un proyecto diseñado para continuar donde Babel lo dejó, como un programa multiplataforma y una biblioteca diseñada para interconvertir entre muchos formatos de archivo utilizados en modelado molecular, química computacional y muchas áreas relacionadas. Open Babel incluye dos componentes, un comando de línea de utilidad C ++ library. La línea de comandos se pretende utilizar como reemplazo del programa Babel original, para traducir entre varios formatos de archivos químicos. La biblioteca C ++ incluye todo el código de traducción de archivos, así como una amplia variedad de utilidades para fomentar el desarrollo de otro software científico de fuente abierta. (52)

AUTODOCK VINA

Autodock Vina se desarrolló más recientemente para satisfacer la necesidad de un método de acoplamiento llave en mano que no requiera un amplio conocimiento experto de usuarios. Está altamente optimizado para realizar experimentos de acoplamiento. Es rápida y efectiva para la mayoría de los sistemas. Típicamente, los usuarios comienzan con las coordenadas del receptor de cristalografía o de espectroscopia de RMN y las coordenadas del ligando generadas a partir de cadenas SMILES (Sistema de Entrada de Línea de Entrada Molecular Simplificada). Autodock y Autodock Vina actualmente utilizan varias simplificaciones que afectan los resultados que se obtienen. La simplificación más significativa es el uso de un receptor rígido. (53)

PYMOL

Es un visualizador molecular muy potente creado por Warren Lyford Delano, muy potente para visualizar moléculas de forma interactiva y no solo de forma estática sino en movimiento al poder leer colecciones de fotogramas, también es posible generar imágenes 3D de calidad de moléculas pequeñas y de macromoléculas biológicas, como las proteínas.

Pymol es una de las pocas herramientas de visualización de fuente abierta disponibles para biología estructural (54)

EC2KEGG

KEGG es el servidor web actualmente disponible para realizar trabajos de análisis comparativos de vías metabólicas, pero requiere la conversión de

números de EC a KEGG identificadores de ontología y no proporciona estadísticas sobre Enzimas y vías superpuestas.

Una lista dada de genes y un genoma de referencia puede contener la misma cantidad de enzimas no superpuestas dentro de un camino y esto no se reflejará en las pruebas de enriquecimiento. EC2KEGG ha sido desarrollado para proporcionar una herramienta de comando lineal para el análisis comparativo automatizado de Vías metabólicas entre dos organismos. Adicionalmente al análisis de enriquecimiento de la vía, la herramienta produce un informe sobre las enzimas compartidas y únicas para cada organismo, genera cadenas de URL para visualizar datos. utilizando los mapas de KEGG Pathway. También enumera las enzimas que no forman parte de las vías metabólicas definidas.(20)

SWISSADME

La herramienta web SwissADME es de libre acceso y está destinada a una presentación fácil de usar y un análisis fácil de los resultados, también para los no expertos. Da acceso a modelos predictivos rápidos para propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas, similitud de fármacos y a química amigable, gracias a que es una interfaz fácil de usar, especialistas, pero también no expertos en química o química computacional pueden predecir rápidamente parámetros clave para una colección de moléculas para apoyar sus esfuerzos en el descubrimiento de fármacos.

La interoperabilidad con un solo clic da acceso a varias herramientas desarrolladas por Molecular Modelling Group del SIB Swiss Institute of Bioinformatics. (55)

DEEPre

DEEPre es un predictor de función enzimática basado en la secuencia. Predice la función de la enzima al predecir los números de la Comisión de Enzimas (EC). Utiliza la codificación de secuencia, la matriz de puntuación específica de la posición y la codificación de dominio funcional como las codificaciones de características en bruto.

DEEPre propone un enfoque de entrenamiento de modelo de clasificación y selección de características de extremo a extremo, así como un método de uniformidad de dimensionalidad de características automáticas y robustas, DEEPre, en el campo de la predicción de la función enzimática. En lugar de extraer características creadas manualmente de secuencias de enzimas, toma la secuencia de codificación sin procesar como entradas, extrayendo las características convolucionales y secuenciales de la codificación sin procesar en función del resultado de la clasificación para mejorar directamente el rendimiento de la predicción. (56)

PHYRE

Phyre2 es un conjunto de herramientas disponibles en la web para predecir y analizar la estructura, la función y las mutaciones de las proteínas. El enfoque de Phyre2 es proporcionar a los biólogos una interfaz sencilla e intuitiva para las herramientas bioinformáticas de proteínas de vanguardia. Phyre2 utiliza métodos avanzados de detección de homología remota para construir modelos 3D, predecir los sitios de unión a ligandos y analizar el efecto de las variantes de aminoácidos para la secuencia de proteínas de un usuario. Se describe una gama de herramientas adicionales disponibles para encontrar la estructura de una proteína en un genoma, para enviar un gran número de secuencias a la vez y para realizar automáticamente búsquedas semanales de proteínas que son difíciles de modelar. (57)

3D REFINE

3Drefine es computacionalmente muy eficiente. El servidor web utiliza la versión del protocolo 3Drefine que normalmente requiere menos de 5 minutos de cálculo para una proteína de longitud típica (300 residuos) para una sola interacción y, por lo tanto, necesita alrededor de 25 minutos para generar 5 modelos refinados. Sin embargo, el tiempo de respuesta de su trabajo de modelado es directamente proporcional al tamaño de la proteína enviada para su refinamiento, así como a la carga del servidor. Si se acumulan demasiados trabajos en la cola, el procedimiento puede llevar más tiempo de lo habitual.

Después de completar un trabajo, los resultados de refinamiento se pueden ver en la página de resultados que contiene las estructuras inicial y refinada, junto con las estadísticas de trabajo, como los puntajes de calidad de los modelos de refinamiento, la similitud y la desviación de las estructuras refinadas con respecto a la estructura de entrada proporcionada. El usuario puede descargar las estructuras individuales haciendo clic en ellas. También se pone a disposición en la web una versión completa y comprimida del trabajo, que también se envía por correo electrónico si se especifica. (58)

INTERPROSCAN

InterPro es un recurso que proporciona un análisis funcional de las secuencias de proteínas al clasificarlas en familias y predecir la presencia de dominios y sitios importantes. Para clasificar las proteínas de esta manera, InterPro utiliza modelos predictivos, conocidos como firmas, proporcionados por varias bases de datos diferentes (denominadas bases de datos miembros) que forman el consorcio InterPro.

InterPro es utilizado por científicos de investigación interesados en el análisis a gran escala de proteomas completos, genomas y metagenomas, así como por investigadores que buscan caracterizar secuencias de proteínas individuales. Dentro del EBI, InterPro se utiliza para ayudar a anotar secuencias de proteínas en UniProtKB. También es utilizado por el grupo Anotación de ontología de genes para asignar automáticamente términos de ontología de genes a

secuencias de proteínas. InterProScan es el paquete de software que permite que las secuencias (proteínas y nucleicos) se escaneen contra las firmas de InterPro. Las firmas son modelos predictivos, proporcionados por varias bases de datos diferentes, que conforman el consorcio InterPro. (59)

BLAST- BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL

BLAST es la herramienta bioinformática más utilizada en todo el mundo. Compara una secuencia problema (query sequence) de nucleótidos o de proteínas con todas las secuencias de una base de datos de nucleótidos o de proteínas. Se puede considerar como el “Google” de las secuencias. Como resultado de esta comparación, puede ocurrir que:

- La secuencia problema coincide al 100% con una secuencia de la base de datos: la secuencia problema ya se conocía con anterioridad
- La secuencia problema coincide al 100% con parte de una secuencia de la base de datos: la secuencia problema es una subsecuencia de otra secuencia de la base de datos
- No se encuentren parecidos: la secuencia problema puede corresponder a un nuevo gen. A partir de los resultados de una búsqueda con BLAST se pueden inferir relaciones funcionales, estructurales o evolutivas entre dos secuencias y, de este modo, identificar nuevos miembros de una familia de genes o de proteínas. Además de encontrar secuencias idénticas o con similitud local, BLAST hace un alineamiento con la secuencia problema y calcula la significancia estadística de los resultados. (60)

CAPÍTULO III

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

- 200 Compuestos Químicos obtenidos de la Empresa PATHOGEN BOX

SISTEMA OPERATIVO

- LINUX-UBUNTU
- WINDOWS

BASE DE DATOS:

- Buscador NCBI

SOFTWARE:

- AUTODOCK TOOLS
- BLAST
- PYMOL
- EC2KEGG
- AUTODOCK VINA
- RAMPAGE
- INTERPROSCAN
- DEEPRE
- SWISSADME
- OPEN BABEL
- ACTIVE SITE PREDICTION
- PHYRE2
- 3D REFINE
- MAESTRO SCHRODINGER

3.2. DISEÑO METODOLÓGICO

3.2.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN

El presente estudio es de tipo **descriptivo** (porque indagan la incidencia de las modalidades o niveles de la variable, en una población, proporcionando su descripción) y **prospectivo** (por que la información se registra según va ocurriendo el proceso de investigación), **transversal** (porque los datos se recolectan en un solo momento, en un tiempo único y no involucran un seguimiento a través del tiempo); orientado a demostrar la probable existencia de blancos tentativos para el diseño de drogas.

3.2.1.1. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LOS GENOMAS

El genoma de los helmintos *Necator americanus* ID:770 (57) y *Ancylostoma duodenale* ID:348 (61) fueron retiradas del National Centre for Biotechnology Information NCBI en formato multifasta. El genoma del hospedero (*Homo sapiens*) fue retirado en el mismo formato citado arriba, esto con la finalidad de buscar posibles homólogos, que puedan impedir el desarrollo de drogas eficientes. Los genomas tanto del hospedero como de los helmintos fueron filtrados usando un script, esto con la finalidad de eliminar proteínas hipotéticas, putativas y parciales, así mismo, solo las proteínas con función enzimática fueron usadas para los siguientes análisis, para clasificar su función enzima se usará la herramienta online DEEpre (56).

El software Blastp (60) se usó para la comparación del genoma de *Necator americanus* con las enzimas halladas en *Ancylostoma duodenale*, que mediante identities o identidades se determina la similitud que tiene las enzimas de *Ancylostoma duodenale* con el genoma de *Necator americanus*.

Luego se trabajó con EC2KEGG un software, el cual trabaja bajo un entorno de líneas de comando muy fáciles de comprender. Este software realiza la comparación automatizada de vías metabólicas entre dos organismos. La herramienta arroja un reporte de ambos organismos, en las cuales se muestran las enzimas compartidas y únicas tanto en el organismo problema y el de referencia.(20) En este contexto, los genomas previamente filtrados tanto de los helmintos como la del hospedero, fueron usados para comparar las vías metabólicas, principalmente se usaron como problema los genomas de los helmintos y como referencia la del hospedero, esto con la finalidad de eliminar las vías metabólicas y/o enzimas presentes en vías metabólicas similares entre los patógenos y hospederos, con lo cual se aseguraría la efectividad de desarrollo de nuevos fármacos específicos para los patógenos, sin interacción con enzimas del hospedero.

Las proteínas únicas; son las enzimas únicas identificadas de los patógenos mediante el programa EC2KEGG. Estos sirvieron como problema para el proceso de anotación biológica, este proceso asigna funciones biológicas a las macromoléculas procedentes de diferentes organismos y permite obtener mayor información que permita inferir su función en condiciones biológicas in vivo. Para la anotación biológica se usó la herramienta bioinformática que asigna la función biológica, haciendo uso de la herramienta InterProScan (59), la cual asigna funciones biológicas basadas en alineamientos con bases de datos que usan el algoritmo BLASTp, esta herramienta las clasifica en tres categorías ontológicas: función molecular, procesos biológicos, componentes celulares.

3.2.1.2. PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA TERCIARIA Y VALIDACIÓN DEL MODELO

El modelamiento molecular se realizó mediante el software Phyre2(Protein Homology/Analogy Recognition Engine) (57), el cual realiza los modelamientos moleculares, el que permite realizar un proceso de alineamiento con proteínas de estructura conocida y alinea la secuencia problema. Las secuencias primarias de las enzimas únicas de los patógenos, obtenidos durante la comparación de metaboloma fueron usados como problema para el modelamiento estructural, los mejores fueron retirados en formato PDB (Protein Data Bank), los cuales fueron observadas usando el software Pymol. (54)

Las refinaciones de las enzimas seleccionadas modeladas fueron realizadas por el servidor 3D Refine (58).

Las validaciones de los modelos refinados se realizaron usando la herramienta RAMPAGE (62), este último genera un plot de Ramachandran en donde se puede verificar las interacciones de los ángulos de torsión Phi y Psi en las cadenas polipeptídicas, para poder encontrar conformaciones estables.

Para la determinación del sitio activo de las enzimas seleccionadas se usó el software Active Site Prediction (63)

3.2.1.3. SCREENING VIRTUAL

El screening virtual es un método computacional que permite enfrentar una biblioteca de pequeñas moléculas, de diferentes orígenes (plantas, sintéticos, microorganismos, etc) con un target, principalmente una proteína (enzima), en la que principalmente el ligando (pequeña molécula), es flexible y puede adoptar diferentes conformaciones y el target (proteína) es rígido, manteniéndolo invariable, este proceso permite la interacción entre un ligando-receptor o inhibidor –enzima, el cual fue ranqueado en base a la energía libre de unión que es calculado por el programa usado:

$$\Delta G = G_{\text{complex}} - (G_{\text{receptor}} + G_{\text{ligand}})$$

En este sentido, el screening virtual, fue realizado usando como ligandos, la biblioteca de compuestos químicos donados por la empresa Pathogen Box, el cual contiene 200 moléculas, con potencial a ser nuevas drogas contra enfermedades tropicales desatendidas y como receptores fueron usadas las estructuras modeladas de las enzimas únicas de los helmintos, previamente las 200 moléculas fueron filtradas, descartando las que no cumplen con las reglas de Lipinzky a través del software SWISSADME. (55)

Primero los ligandos fueron generadas en formato sdf luego fueron optimizados con el software OpenBabel mediante minimización de energía con el algoritmo de pasos descendientes (200 steps) luego convertirlos a formato pdbqt que

usado como input en el software Autodock Tools. Los receptores que se encuentran en formato fasta fueron preparados agregando hidrógenos y cargas luego transformarlos a formato pdbqt igualmente esto se realizó en el software Autodock Tools. (53)

El screening virtual para el Docking Molecular con cadenas laterales flexibles:

Los ligandos continuaron con los cambios realizados en el software Autodock Tools formato pdbqt. En cambio, los receptores a partir del formato pdbqt que se obtuvo, se seleccionaron los residuos de aminoácidos implicados en el sitio activo y convertidos flexibles para el docking molecular esto se realizó igualmente en el software Autodock Tools. (53)

3.2.1.4. DOCKING MOLECULAR

El proceso de Docking molecular o Acoplamiento molecular se realizó en el software AUTODOCK VINA que es un software ideal para trabajar con muchos ligandos. Su interfaz es amigable para el usuario y ofrece la ventaja de ser más rápido. Para realizar el docking molecular los ligandos y receptores tienen que estar previamente transformados al formato pdbqt.(53)

Seguidamente se le diseñó un grid box (caja de grid) en 3D que tiene que ser un tamaño suficiente para que el movimiento de las moléculas sea más libre en el espacio, las dimensiones se pueden ajustar y se localizó en el sitio activo tentativo de la proteína ligando o el sitio de unión.

DOCKING CON LIGANDO FLEXIBLE Y RECEPTOR RÍGIDO

Es de vital importancia considerar las flexibilidades tanto del ligando como del receptor, ya que en ese caso tanto el ligando como el receptor cambian sus conformaciones para formar un ajuste perfecto o complejo de energía mínima. Sin embargo, el costo es muy alto cuando el receptor también es flexible. Por lo que, el enfoque común, también tiene un compromiso entre la precisión y el tiempo computacional, es tratar al ligando como flexible mientras que el receptor se mantiene rígido durante el acoplamiento. Casi todos los programas de acoplamiento han adoptado esta metodología, como AutoDock Vina (es capaz de modelar la flexibilidad del receptor permitiendo que las cadenas laterales se muevan). AutoDock Vina mostró simultáneamente una mejora exponencial de magnitud en velocidad. (64)

Para la realización del docking molecular con receptores rígidos, desde la terminal del sistema Linux Ubuntu se digita el comando: (65)

```
Vina -config config.text -log log.text
```

DOCKING CON LIGANDO FLEXIBLE Y RECEPTOR FLEXIBLE

La movilidad intrínseca de las proteínas se ha demostrado que está estrechamente relacionada con el comportamiento de unión al ligando. La incorporación de la flexibilidad del receptor es un desafío importante en el campo del acoplamiento. Otro obstáculo es su alto costo computacional, que evita que este método se utilice en la selección de grandes bases de datos de productos químicos.(64)

Actualmente se dispone de varios métodos para implementar la flexibilidad del receptor. El más simple es el denominado "acoplamiento suave" disminuye el término de energía de repulsión de van der Waals en la función de puntuación para permitir un grado de superposición de átomos y átomos entre el receptor y el ligando. (64)

Para la realización del docking molecular con receptores flexibles, los ligandos y receptores deben estar en formato pdbqt, se trabajó con el comando:

```
Vina -receptor dock.receptor.rigid.pdbqt -flexdock receptor.flex.pdbqt -ligand dock.ligand.pdbqt -config dock.conf -out flex.pdbqt (53)
```

Como resultado el software mostró valores de la Afinidad de Unión (kcal/mol), cuanto más negativo sea los valores de Afinidad de Unión mejor será la orientación del ligando en el sitio activo debido a que, en este estado el sistema es más estable y hay una mayor posibilidad de interacción.

3.2.2. VARIABLES

A. Obtención de los genomas de *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus* y filtrado de proteínas con función enzimática.

Definición Conceptual: Es el proceso por el cual se obtiene la codificación hereditaria o información biológica, de los patógenos *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus*, por métodos in silico, (35)

Definición Operacional: La obtención de los genomas fue a través de la database NCBI y la filtración por medio de la terminal del sistema operativo Ubuntu mediante scripts.

Naturaleza: Cualitativa

Forma de Medición: Directa

Escala: Nominal

Instrumento de medición: Base de datos

Expresión final: total de proteínas

Indicador:

- Filtración de las proteínas hipotéticas.
- Filtración de las proteínas putativas.
- Filtración de las proteínas parciales.

B. Comparación de las vías metabólicas del Hospedero y los huéspedes *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus* e Identificación las enzimas únicas de los patógenos.

Definición Conceptual: Es el proceso por el cual se comparan las vías metabólicas (sucesión de reacciones químicas donde un sustrato inicial se transforma y da lugar a productos finales, a través de una serie de metabolitos intermediarios), de ambos patógenos y el hospedero *Homo sapiens*. (19)

Definición Operacional: La comparación de vías metabólicas fue a través del software EC2KEGG, de los cuales se seleccionaron cinco enzimas.

Naturaleza: Cualitativa

Forma de Medición: Directa

Escala: Nominal

Instrumento de medición: Software

Expresión final: enzimas únicas seleccionadas

Indicador:

- Vías metabólicas únicas del Hospedero
- Identificación de las proteínas con función enzimática.

C. Modelamiento molecular de las enzimas únicas obtenidas.

Definición Conceptual: Es el proceso por el cual se pueden modelar proteínas a estructuras terciarias mediante métodos in silico (métodos computacionales).(57)

Definición Operacional: El modelamiento molecular de las enzimas seleccionadas se realizó mediante el software PHYRE2.

Naturaleza: Cualitativa

Forma de Medición: Directa

Escala: Nominal

Instrumento de medición: Software

Expresión final: enzimas únicas modeladas

Indicador:

-Modelamiento de las enzimas únicas por Homología de proteínas

D. Refinamiento de la conformación estructural de las enzimas modeladas y validación.

Definición Conceptual: Es el proceso por el cual las enzimas seleccionadas modeladas tienen que ser refinadas es decir corregir las imperfecciones que pudieron quedar en el modelado y la validación de las enzimas que muestra el porcentaje de aprobación de las enzimas modeladas. (58)

Definición Operacional: El refinamiento de las enzimas se desarrolló mediante el software 3DREFINE, y la validación de las enzimas modeladas se realizó mediante el software RAMPAGE.

Naturaleza: Cualitativa

Forma de Medición: Directa

Escala: Nominal

Instrumento de medición: Software

Expresión final: enzimas refinadas y validadas

Indicador:

-Refinamiento de las enzimas modeladas mediante 3D REFINE.

-Validación de las enzimas refinadas mediante RAMPAGE

E. Diseño de las estructuras 3D de los 200 compuestos químicos obtenidos de la empresa PATHOGEN BOX.

Definición Conceptual: El diseño de las estructuras 3D de los 200 compuestos químicos, consiste en aplicar algún procedimiento realizado de manera digital para tener acondicionadas a los compuestos químicos para relacionar la actividad de un compuesto con su estructura química. (48)

Definición Operacional: El diseño 3D de los compuestos químicos se desarrolló primeramente mediante el software OPENBABEL, y luego se usó el software AUTODOCKVINA para adecuar a los compuestos químicos.

Naturaleza: Cualitativa

Forma de Medición: Directa

Escala: Nominal

Instrumento de medición: Software

Expresión final: compuestos químicos diseñados en 3D

Indicador:

- Conversión de formato de los compuestos químicos mediante OPENBABEL.
- Optimización de los compuestos químicos mediante minimización de energía.
- Adecuar al formato pdbqt mediante AUTODOCK TOOLS

F. Acoplamiento molecular rígido entre las enzimas únicas y los 200 compuestos químicos de PATHOGEN BOX.

Definición Conceptual: Es el proceso por el cual se realiza la interacción proteína ligando entre los compuestos químicos y las enzimas seleccionadas.(53)

Definición Operacional: El acoplamiento molecular se desarrolló mediante el software AUTODOCK VINA.

Naturaleza: Cuantitativa

Forma de Medición: Directa

Escala: Razón (kcal/mol)

Instrumento de medición: Software

Expresión final: Afinidad de proteína ligando

Indicador:

-Acoplamiento molecular rígido entre las enzimas y los compuestos químicos seleccionados mediante AUTODOCK VINA

G. Acoplamiento molecular flexible entre las enzimas únicas y los mejores ligandos.

Definición Conceptual: Es el proceso por el cual se realiza la interacción proteína ligando entre los compuestos químicos y las enzimas seleccionadas.

Definición Operacional: El acoplamiento molecular se desarrolló mediante el software AUTODOCK VINA.

Naturaleza: Cuantitativa

Forma de Medición: Directa

Escala: Razón (kcal/mol)

Instrumento de medición: Software

Expresión final: Afinidad de proteína ligando

Indicador:

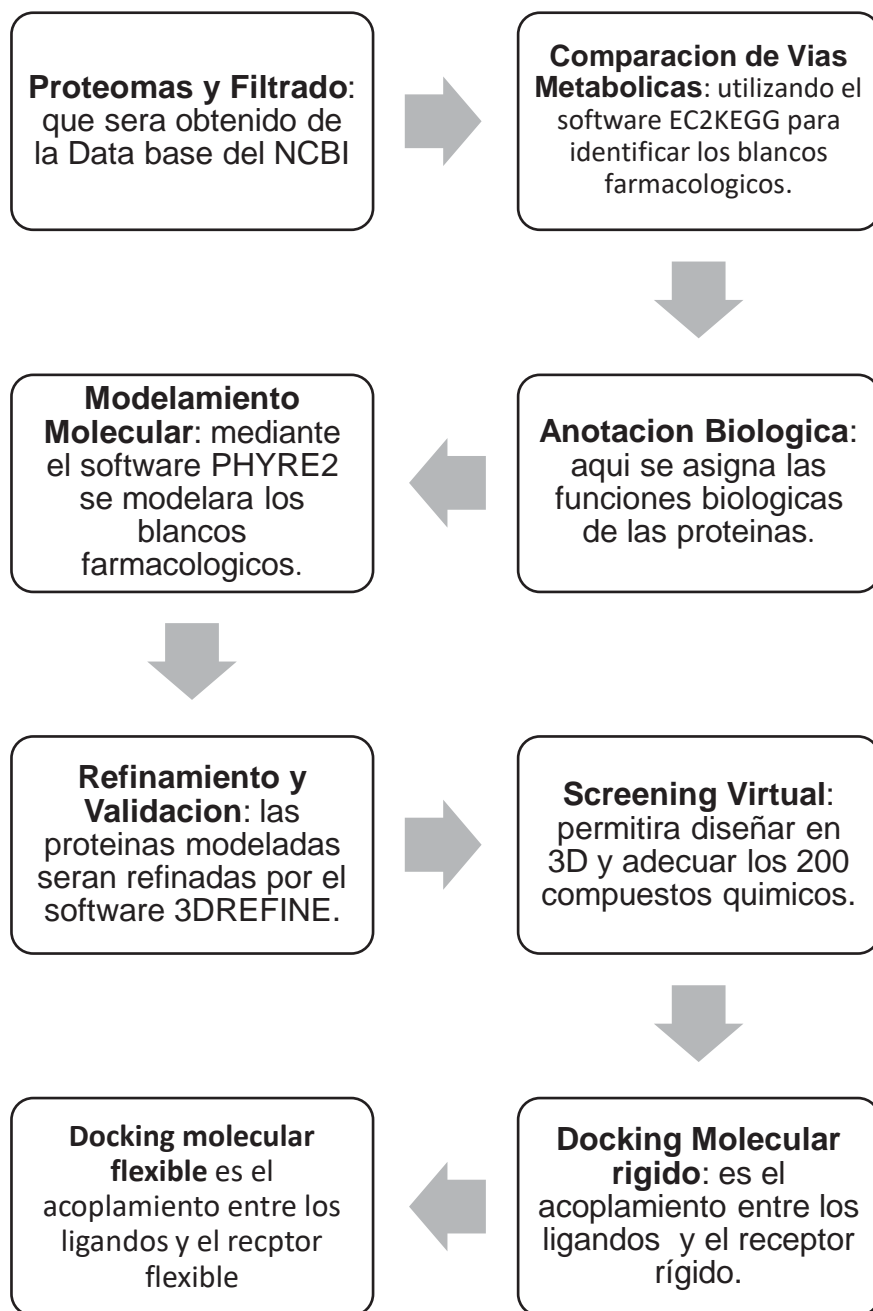
-Acoplamiento molecular flexible entre las enzimas y los compuestos químicos seleccionados mediante AUTODOCK VINA

VARIABLES	INDICADORES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	NATURALEZA	FORMA DE MEDICIÓN	ESCALA DE MEDICIÓN
Obtención de los genomas de <i>Ancylostoma duodenale</i> y <i>Necator americanus</i> y filtrado de proteínas con función enzimática	-Filtración de las proteínas hipotéticas. -Filtración de las proteínas putativas. -Filtración de las proteínas parciales.	Es el proceso por el cual se obtiene la codificación hereditaria o información biológica, de los patógenos <i>Ancylostoma duodenale</i> y <i>Necator americanus</i> , por métodos in silico,	La obtención de los genomas fue a través de la database NCBI y la filtración por medio de la terminal del sistema operativo Ubuntu mediante comandos.	Cualitativa	directa	Nominal
Comparación de las vías metabólicas del Hospedero <i>Homo sapiens</i> y los huéspedes e Identificar las enzimas únicas de los patógenos.	Identificación de las proteínas con función enzimática.	Es el proceso por el cual se comparan las vías metabólicas (sucesión de reacciones químicas donde un sustrato inicial se transforma y da lugar a productos finales, a través de una serie de metabolitos intermediarios), de ambos patógenos y el hospedero	La comparación de vías metabólicas fue a través del software EC2KEGG, de los cuales se seleccionaron cinco enzimas.	Cualitativa	directa	Nominal
Modelamiento molecular de las enzimas únicas obtenidas.	Modelamiento de las enzimas únicas por Homología de proteínas	Es el proceso por el cual se pueden modelar proteínas a estructuras terciarias mediante métodos in silico (métodos computacionales).	El modelamiento molecular de las enzimas seleccionadas se realizó mediante el software PHYRE2	Cualitativa	directa	Nominal

VARIABLES	INDICADORES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	NATURALEZA	FORMA DE MEDICIÓN	ESCALA DE MEDICIÓN
Refinamiento de la conformación estructural de las enzimas modeladas y validación.	-Refinamiento de las enzimas modeladas mediante 3D REFINE. -Validación de las enzimas refinadas mediante RAMPAGE	Es el proceso por el cual las enzimas seleccionadas modeladas tienen que ser refinadas es decir corregir y la validación de las enzimas que muestra el porcentaje de aprobación de las enzimas modeladas.	El refinamiento de las enzimas se desarrolló mediante el software 3DREFINE, y la validación de las enzimas modeladas se realizó mediante el software RAMPAGE.	Cualitativa	directa	Nominal
Diseño de las estructuras 3D de los 200 compuestos químicos obtenidos de la empresa PATHOGEN BOX.	-Conversión de formato de los compuestos químicos mediante OPENBABEL. -Optimización de los compuestos químicos mediante minimización de energía. -Adecuar al formato pdbqt mediante AUTODOCK TOOLS	Es el proceso por el cual los 200 compuestos químicos se diseñaron en 3D mediante diversos procedimientos.	El diseño 3D de los compuestos químicos se desarrolló primeramente mediante el software OPENBABEL, y luego se usó el software AUTODOCKVINA para adecuar a los compuestos químicos.	Cualitativa	directa	Nominal
Acoplamiento molecular rígido y flexible entre las enzimas únicas y los mejores ligandos.	Acoplamiento molecular rígido y flexible entre las enzimas y los compuestos químicos seleccionados mediante AUTODOCK VINA	Es el proceso por el cual se realiza la interacción proteína ligando entre los compuestos químicos y las enzimas seleccionadas.	El acoplamiento molecular se desarrolló mediante el software AUTODOCK VINA.	Cuantitativa	directa	Razón (kcal/mol)

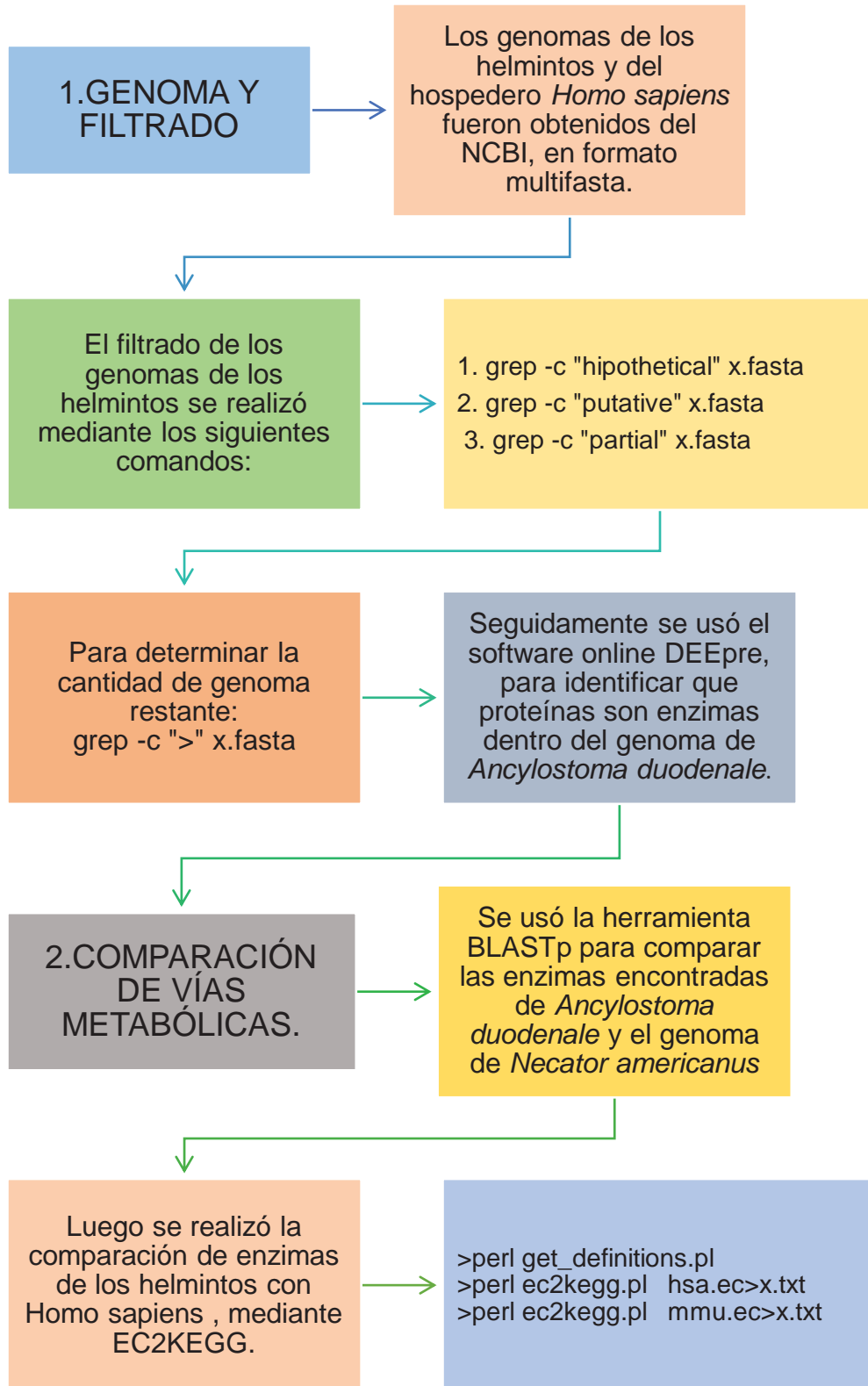
3.3. PROCEDIMIENTO

FLUJOGRAMA N° 01 RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO



Fuente: Elaboración propia

FLUJOGRAMA N°02 PROCEDIMIENTO DEL FILTRADO DEL GENOMA Y COMPARACIÓN DE VÍAS METABÓLICAS



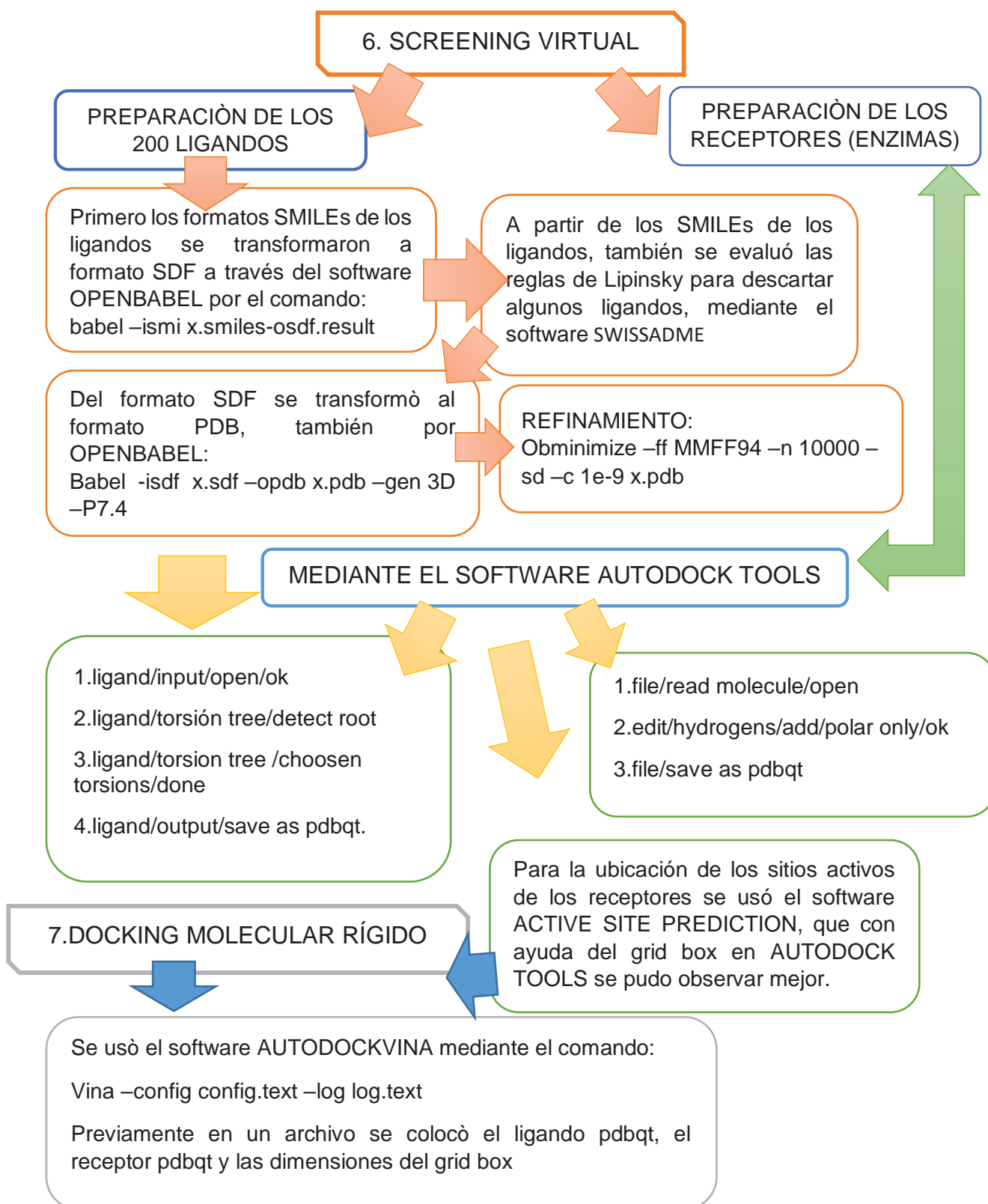
Fuente: Elaboración propia

FLUJOGRAMA N°03 PROCEDIMIENTO DE ANOTACIÓN BIOLÓGICA Y MODELAMIENTO MOLECULAR



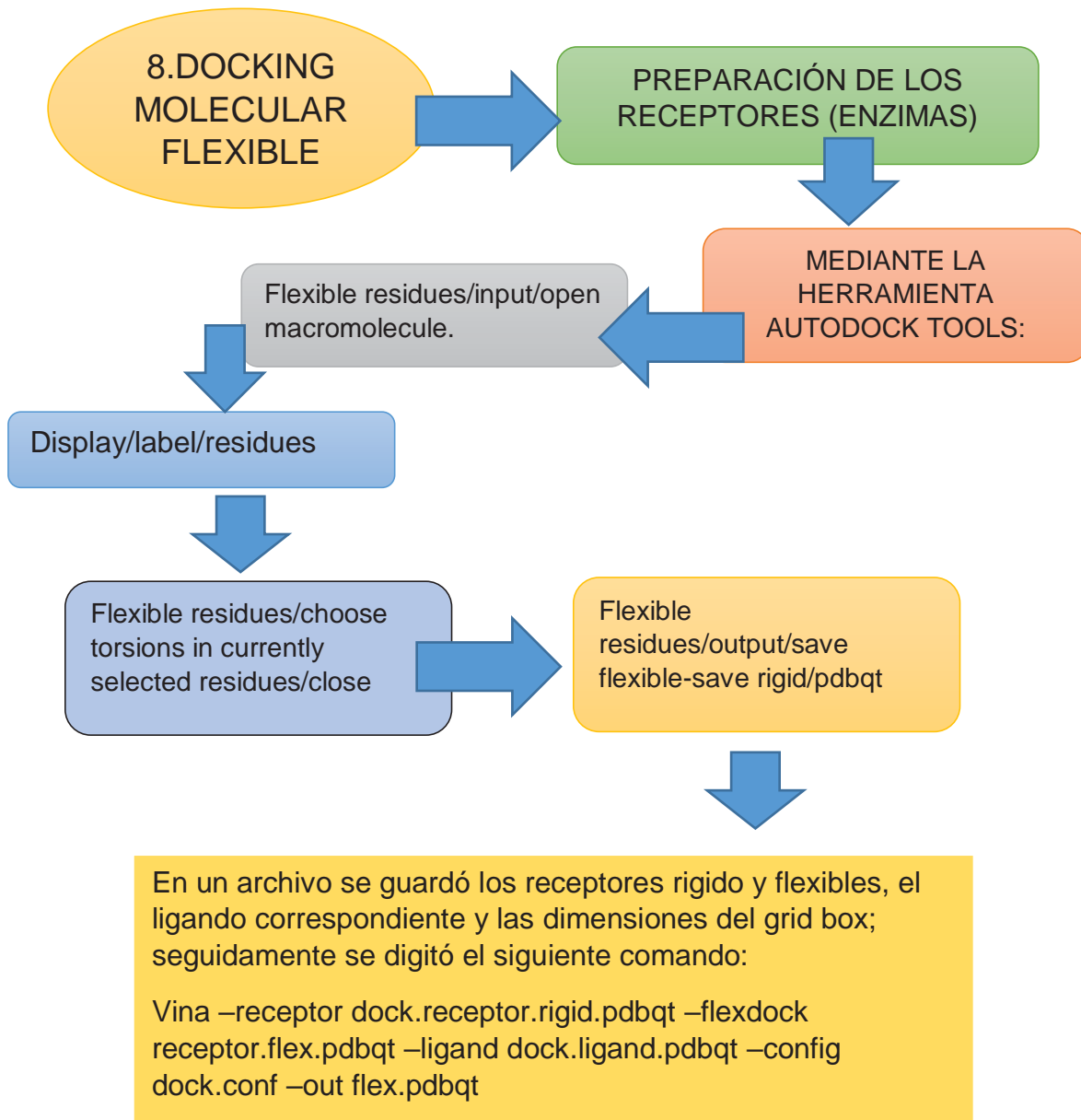
Fuente: Elaboración propia

FLUJOGRAMA N° 04 PROCEDIMIENTO DE SCREENING VIRTUAL Y DOCKING



Fuente: Elaboración propia

FLUJOGRAMA N°05 PROCEDIMIENTO DE DOCKING MOLECULAR FLEXIBLE



Fuente: Elaboración propia

CAPÍTULO IV

4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1. GENOMAS Y FILTRADO

TABLA N° 01 RESULTADO DEL FILTRADO DE LOS GENOMAS DE *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus*

	<i>Ancylostoma duodenale</i>	<i>Necator americanus</i>	<i>Homo sapiens</i>
Total del genoma	24 863 proteínas	19 153 proteínas	31 970
Filtrado de las proteínas hipotéticas	17 082 proteínas	12 542 proteínas	-
Filtrado de las proteínas putativas	187 proteínas	195 proteínas	-
Filtrado de las proteínas parciales	1987 proteínas	953 proteínas	-
Resto del proteoma	5656 proteínas	5485 proteínas	-

Fuente: Datos experimentales del estudio obtenido de: NCBI-Centro Nacional para la Información Biotecnológica.

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la tabla N°01 se muestra los resultados del filtrado de los genomas de los parásitos. Donde se observa inicialmente 24 863 proteínas en *Ancylostoma duodenale* y 19 153 proteínas en *Necator americanus*. La filtración de los genomas de los parásitos se realizó descartando a las proteínas hipotéticas, putativas y parciales, debido a que estas proteínas no fueron comprobadas experimentalmente, sus funciones no están establecidos o tienen información incompleta. Solo quedaron las proteínas que fueron secuenciadas completamente, es decir las que tienen información biológica completa y funciones establecidas. Es así como se obtuvieron las proteínas a partir de los genomas de ambos anquilostomas.

En el estudio realizado por Subhashree R “Una estrategia in silico para la Identificación de novedosas drogas contra *Plasmodium falciparum*” extrajeron el genoma de la database MPMP, donde tuvieron como resultado una lista de 3090 secuencias primarias de proteína que fueron filtrados encontrándose 30 proteínas que son proteínas hipotéticas con información no funcional (19).

Por lo que realizar un filtrado del genoma de una especie, es necesario para obtener una calidad de resultados en este caso la selección de proteínas para la búsqueda de blancos farmacológicos y que existen otras databases para la obtención de genomas de otras especies.

4.2. COMPARACIÓN DE VÍAS METABÓLICAS

Lo siguiente fue usar el software online DEEpre, que identifica enzimas a través de la secuencia de aminoácidos de una proteína, que se muestra en el anexo N° 02.

TABLA N° 02 RESULTADO DEL FILTRADO DE LAS ENZIMAS ENCONTRADAS EN LOS PARÁSITOS *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus*

	Identificación de <i>A. duodenale</i>	NOMBRE DE LA ENZIMA	CÓDIGO DE ENZIMA	CLASE	IDENTITIES (IDENTIDAD)
1	KIH42194.1	60s Acidic ribosomal protein	EC.4.2.1.18	Lyases	92%
2	KIH42217.1	fructose-bisphosphate aldolase class-I	EC.4.1.2.13	Lyases	99%
3	KIH42236.1	peptidase, S8/S53 family	EC.3.4.21.75	Hydrolases	98%
4	KIH42246.1	Hexokinase	EC.2.7.1.1	Transferases	96%
5	KIH42286.1	DEAD/DEAH box helicase	EC.3.1.21.13	Hydrolases	74%
6	KIH42300.1	Protein-tyrosine phosphatase	EC.3.1.3.48	Hydrolases	92%
7	KIH42334.1	S1 RNA binding domain protein	EC.2.7.7.6	Transferases	100%
8	KIH42366.1	glycosyltransferase, group 2 family protein	EC.2.4.1.41	Transferases	92%
9	KIH42371.1	spectrin repeat-containing domain protein	EC.2.7.7.1	Transferases	99%
10	KIH42387.1	FAD linked oxidase protein	EC.3.1.21.39	Hydrolases	84%
11	KIH42393.1	RNA polymerase Rpb5 protein	EC.2.7.7.0	Transferases	91%
12	KIH42397.1	protein, SNF2 family	EC.3.6.1.12	Hydrolases	74%
13	KIH42426.1	thioredoxin	EC.5.3.4.1	Isomerases	80%
14	KIH42427.1	Neuralized	EC.4.1.3.0	Lyases	98%
15	KIH42465.1	glycerophosphodiester phosphodiesterase family protein	EC.3.1.4.44	Hydrolases	80%
16	KIH42472.1	CoA-ligase	EC.4.2.1.4	Lyases	87%
17	KIH42499.1	papain family cysteine protease	EC.3.4.22.1	Hydrolases	99%
18	KIH42508.1	rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillar domain protein	EC.2.7.7.166	Transferases	71%
19	KIH42528.1	ABC transporter, ATP-binding protein	EC.3.6.3.44	Hydrolases	81%
20	KIH42536.1	phospholipase D domain protein	EC.3.1.4.4	Hydrolases	85%
21	KIH42641.1	copper/zinc superoxide dismutase	EC.1.15.1.1	Oxidoreductases	58%
22	KIH42728.1	serine carboxypeptidase	EC.3.4.16.5	Hydrolases	91%
23	KIH42741.1	Bromodomain protein	EC.3.1.21.1	Hydrolases	97%
24	KIH42755.1	Transthyretin-like family protein	EC.2.7.7.0	Transferases	97%
25	KIH42909.1	DNA-directed RNA polymerase subunit N	EC.2.7.7.6	Transferases	100%
26	KIH42914.1	Ubiquitin-fold modifier-conjugating enzyme 1	EC.4.1.2.0	Lyases	93%

27	KIH43088.1	astacin	EC.3.4.24.21	Hydrolases	70%
28	KIH43099.1	core histone H2A/H2B/H3/H4	EC.2.7.7.0	Transferases	100%
29	KIH43146.1	zinc carboxypeptidase	EC.3.4.17.22	Hydrolases	96%
30	KIH43355.1	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, cyclophilin-type	EC.5.2.1.8	Isomerases	88%
31	KIH43357.1	eukaryotic aspartyl protease	EC.3.4.23.25	Hydrolases	66%
32	KIH43458.1	adenylate/guanylate cyclase catalytic domain protein	EC.4.6.1.2	Lyases	86%
33	KIH43531.1	phosphoprotein phosphatase 1 domain protein	EC.3.1.3.16	Hydrolases	80%
34	KIH43545.1	peptidase dimerization domain protein	EC.3.5.1.14	Hydrolases	61%
35	KIH43687.1	Sel1 repeat protein	EC.3.5.1.6	Hydrolases	88%
36	KIH43875.1	alpha amylase, all-beta domain protein	EC.2.7.7.18	Transferases	92%
37	KIH43928.1	Phosphofructokinase	EC.2.7.1.11	Transferases	59%
38	KIH43997.1	glutathione S-transferase protein	EC.2.5.1.18	Transferases	59%
39	KIH44065.1	orotate phosphoribosyltransferase domain protein	EC.2.4.2.23	Transferases	51%
40	KIH44072.1	Beta-ketoacyl synthase protein	EC.2.3.1.41	Transferases	75%
41	KIH44119.1	shTK domain protein	EC.1.14.13.21	Oxidoreductases	86%
42	KIH44123.1	stearoyl-CoA 9-desaturase	EC.1.14.15.1	Oxidoreductases	82%
43	KIH44350.1	ThiF family protein	EC.2.7.7.45	Transferases	80%
44	KIH44411.1	MOFRL family protein	EC.2.7.1.31	Transferases	74%
45	KIH44416.1	peptidase, M48 family	EC.3.4.24.84	Hydrolases	96%
46	KIH44437.1	di-trans,poly-cis-decaprenylcistransferase-like protein	EC.2.5.1.87	Transferases	81%
47	KIH44468.1	kinase domain protein	EC.2.7.11.1	Transferases	94%
48	KIH44601.1	DREV methyltransferase	EC.3.1.26.0	Hydrolases	79%
49	KIH44632.1	phosphogluconate dehydrogenase, NAD binding domain protein	EC.1.4.1.44	Oxidoreductases	87%
50	KIH44708.1	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase, family 1	EC.3.4.19.12	Hydrolases	91%
51	KIH44792.1	MaoC-like protein	EC.4.2.1.119	Lyases	70%
52	KIH44812.1	minichromosome maintenance protein MCM domain protein	EC.3.6.4.12	Hydrolases	99%
53	KIH44825.1	chitinase class I	EC.3.2.1.14	Hydrolases	71%
54	KIH44944.1	protein tyrosine kinase	EC.2.7.11.1	Transferases	80%
55	KIH45001.1	GNS1/SUR4 family protein	EC.2.3.1.199	Transferases	90%
56	KIH45054.1	tRNA ligase class II core domain protein	EC.6.1.1.15	Ligases	83%

57	KIH45085.1	5'-methylthioadenosine phosphorylase II domain protein	EC.2.4.2.28	Transferases	67%
58	KIH45099.1	glucose-6-phosphate isomerase	EC.5.3.1.9	Isomerases	75%
59	KIH45102.1	Transketolase protein	EC.1.2.4.4	Oxidoreductases	83%
60	KIH45146.1	glutaminase	EC.3.5.1.2	Hydrolases	83%
61	KIH45170.1	tRNA dimethylallyltransferase domain protein	EC.2.5.1.75	Transferases	75%
62	KIH45217.1	3-ketodihydrosphingosine reductase domain protein	EC.1.1.1.102	Oxidoreductases	88%
63	KIH45231.1	bacterial transferase hexapeptide repeat protein	EC.2.3.1.1	Transferases	81%
64	KIH45234.1	malic enzyme, NAD binding domain protein	EC.1.1.1.38	Oxidoreductases	77%
65	KIH45246.1	helicase protein	EC.3.6.4.13	Hydrolases	99%
66	KIH45300.1	ATPase/histidine kinase/DNA gyrase B/HSP90 domain protein	EC.4.2.1.2	Lyases	79%
67	KIH45316.1	selenide, water dikinase	EC.2.7.4.3	Transferases	87%
68	KIH45354.1	haloacid dehalogenase-like hydrolase	EC.3.1.3.9	Hydrolases	69%
69	KIH45416.1	Pellino	EC.4.2.1.0	Lyases	93%
70	KIH45489.1	DB module	EC.4.1.1.0	Lyases	94%
71	KIH45549.1	inositol-pentakisphosphate 2-kinase	EC.2.7.4.21	Transferases	95%
72	KIH45574.1	fatty acid hydroxylase family protein	EC.1.14.19.5	Oxidoreductases	91%
73	KIH45631.1	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	EC.2.7.7.9	Transferases	83%
74	KIH45735.1	peptidase, T1 family	EC.3.4.25.1	Hydrolases	98%
75	KIH45825.1	acyl-CoA dehydrogenase, middle domain protein	EC.1.3.99.5	Oxidoreductases	84%
76	KIH45895.1	tryptophan--tRNA ligase	EC.6.1.1.2	Ligases	91%
77	KIH45923.1	alanine--tRNA ligase	EC.5.4.99.7	Isomerases	56%
78	KIH45981.1	26S proteasome subunit P45 family protein	EC.3.6.1.6	Hydrolases	91%
79	KIH46005.1	diacylglycerol kinase catalytic domain protein	EC.2.7.1.91	Transferases	91%
80	KIH46095.1	cytidyltransferase domain protein	EC.2.7.7.3	Transferases	83%
81	KIH46109.1	Apyrase	EC.4.2.2.6	Lyases	65%
82	KIH46203.1	threonine/alanine tRNA ligase second additional domain protein	EC.4.2.2.7	Lyases	59%
83	KIH46222.1	MCM2/3/5 family protein	EC.3.6.4.12	Hydrolases	89%
84	KIH46231.1	histidine acid phosphatase	EC.3.1.3.2	Hydrolases	70%
85	KIH46260.1	DM DNA binding domain protein	EC.2.7.11.0	Transferases	88%
86	KIH46284.1	DNA-directed RNA polymerase subunit A' domain protein	EC.2.7.7.6	Transferases	80%

87	KIH46289.1	V-type ATPase, C subunit	EC.3.6.3.0	Hydrolases	98%
88	KIH46298.1	proteasome-activating nucleotidase domain protein	EC.3.6.4.6	Hydrolases	91%
89	KIH46311.1	unspecific monooxygenase	EC.1.14.14.1	Oxidoreductases	83%
90	KIH46348.1	zinc finger, C2H2 type	EC.3.1.3.0	Hydrolases	89%
91	KIH46361.1	RNA polymerase Rpb1, domain 2	EC.2.7.7.6	Transferases	75%
92	KIH46371.1	WD domain, G-beta repeat protein	EC.2.7.1.1	Transferases	76%
93	KIH46403.1	eukaryotic phosphomannomutase	EC.4.1.1.8	Lyases	89%
94	KIH46424.1	acyl-CoA dehydrogenase family protein	EC.1.3.8.1	Oxidoreductases	80%
95	KIH46439.1	Carboxylesterase	EC.3.1.1.1	Hydrolases	70%
96	KIH46466.1	glycosyl hydrolase family 2, TIM barrel domain protein	EC.3.2.1.31	Hydrolases	77%
97	KIH46565.1	NUC130/3NT domain protein	EC.3.6.1.0	Hydrolases	83%
98	KIH46566.1	MIT domain protein	EC.3.1.21.1	Hydrolases	83%
99	KIH46583.1	formate--tetrahydrofolate ligase	EC.4.2.3.3	Lyases	60%
100	KIH46611.1	PAN domain protein	EC.4.2.2.0	Lyases	91%
101	KIH46645.1	pyridoxal-dependent decarboxylase domain protein	EC.4.1.1.25	Lyases	77%
102	KIH46657.1	lactate/malate dehydrogenase, NAD binding domain protein	EC.4.2.2.27	Lyases	94%
103	KIH46674.1	PPIC-type PPIASE domain protein	EC.5.2.1.8	Isomerases	96%
104	KIH46687.1	DSHCT domain protein	EC.3.1.21.13	Hydrolases	92%
105	KIH46692.1	biotin carboxylase domain protein	EC.6.3.4.3	Ligases	60%
106	KIH46741.1	integrase core domain protein	EC.2.7.7.0	Transferases	70%
107	KIH46771.1	phenylalanine--tRNA ligase	EC.6.1.1.20	Ligases	78%
108	KIH46892.1	S4 domain protein	EC.5.4.99.0	Isomerases	95%
109	KIH46896.1	Pao retrotransposon peptidase	EC.2.7.7.0	Transferases	56%
110	KIH46966.1	Phosphatidylinositol-specific phospholipase C, X domain protein	EC.4.6.1.11	Lyases	54%
111	KIH46995.1	protein disulfide-isomerase domain protein	EC.5.3.4.1	Isomerases	97%
112	KIH46997.1	ricin-type beta-trefoil lectin domain protein	EC.4.2.3.41	Lyases	54%
113	KIH47051.1	Emp24/gp25L/p24 family protein	EC.3.1.26.0	Hydrolases	82%
114	KIH47073.1	Succinate dehydrogenase and fumarate reductase iron-sulfur protein	EC.1.3.5.1	Oxidoreductases	75%
115	KIH47107.1	beta-galactosidase domain protein	EC.3.2.1.23	Hydrolases	74%
116	KIH47112.1	Metaxin-1-like family protein	EC.2.5.1.0	Transferases	91%
117	KIH47119.1	zinc finger, C3HC4 type	EC.3.4.21.1	Hydrolases	87%

118	KIH47180.1	tRNA-guanine transglycosylase	EC.2.4.2.29	Transferases	60%
119	KIH47254.1	RNA polymerase Rpb7 protein	EC.2.7.7.89	Transferases	99%
120	KIH47257.1	molybdenum cofactor biosynthesis protein A	EC.5.4.3.18	Isomerases	75%
121	KIH47276.1	cytochrome c oxidase subunit VIIc	EC.1.9.3.0	Oxidoreductases	85%
122	KIH47284.1	eukaryotic aspartyl protease	EC.3.4.23.1	Hydrolases	89%
123	KIH47329.1	hyaluronoglucosaminidase	EC.3.2.1.35	Hydrolases	62%
124	KIH47336.1	Phosphatidylinositol-specific phospholipase C, Y domain protein	EC.3.1.4.11	Hydrolases	98%
125	KIH47345.1	THAP domain protein	EC.3.1.26.0	Hydrolases	100%

Fuente: Datos experimentales del estudio

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Después de la identificación de enzimas de *Ancylostoma duodenale* en el software DEEpre, se realizó una comparación de identidades, entre el genoma de *Necator americanus* y la lista de enzimas identificadas en *Ancylostoma duodenale* con el software BLAST.

En la tabla N° 02 se muestra los resultados del filtrado de las enzimas encontradas en ambos parásitos, donde se observa una lista de 125 enzimas con su respectivo código de enzima y clase. Las 125 enzimas son el resultado de “identities” o identidades, que tuvieron que superar el 50% de identidad; tomando como referencia a las enzimas identificadas de *Ancylostoma duodenale* con respecto a las proteínas de *Necator americanus*, tal como se muestra en el anexo N°03. Por lo tanto, solo se eligieron a las enzimas de *Ancylostoma duodenale*, que presentaron identidad mayor al 50% con las proteínas de *Necator americanus*.

En el estudio realizado por Sanchaita R “Diseño del Inhibidor de Plasmodium falciparum PI(4)KIIIB usando Dinámica molecular y Métodos de Docking” se realizó la obtención de la secuencia primaria del blanco PI(4)KIIIB de la data base UnitProtKB, luego Blastp fue empleado para encontrar el modelo de estructura de una proteína conocida del Protein Data Bank (PDB) y el sitio catalítico de III fosfoinositol 4-quinasa beta que fue identificado como el mejor resultado. Los seis mejores resultados fueron retirados del programa BLASTp.(22)

Por lo que estas 125 enzimas es el resultado del filtrado del genoma de *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus*, y algunas de estas enzimas serán seleccionadas para realizar los siguientes pasos en este estudio.

TABLA N° 03 RESULTADO DEL SOFTWARE EC2KEGG; COMPARACIÓN DE ENZIMAS DE *Homo sapiens* Y ENZIMAS DE LOS PARÁSITOS

	ID	Nombre de la Vía Metabólica	EC_Referencia (homo sapiens)	EC_Given (dado)	EC_compartido	EC_único_Ref	EC_único_Given
1	10	Glycolysis / Gluconeogenesis Carbohydrate metabolism	1.1.1.2	1.1.1.27	1.1.2.7	1.1.2.8	1.1.5.5
2	20	Citrate cycle (TCA cycle) Carbohydrate metabolism	1.1.1.37	1.1.1.41	1.1.1.42	1.1.5.4	1.2.4.1
3	30	Pentose phosphate pathway Carbohydrate metabolism	1.1.1.343	1.1.1.359	1.1.1.360	1.1.1.363	1.1.1.388
4	40	Pentose and glucuronate interconversions Carbohydrate metabolism	1.1.1.11	1.1.1.12	1.1.1.127	1.1.1.13	1.1.1.130
5	51	Fructose and mannose metabolism Carbohydrate metabolism	1.1.1.122	1.1.1.132	1.1.1.135	1.1.1.138	1.1.1.14
6	52	Galactose metabolism Carbohydrate metabolism	1.1.1.16	1.1.1.21	1.1.1.251	1.1.1.359	1.1.1.360
7	53	Ascorbate and aldarate metabolism Carbohydrate metabolism	1.1.1.129	1.1.1.130	1.1.1.19	1.1.1.20	1.1.1.203
8	61	Fatty acid biosynthesis Lipid metabolism	1.14.19.2	1.3.1.10	1.3.1.104	1.3.1.9	2.3.1.179
9	62	Fatty acid elongation Lipid metabolism	1.1.1.330	1.1.1.35	1.3.1.38	1.3.1.8	1.3.1.93
10	71	Fatty acid degradation Lipid metabolism	1.1.1.192	1.1.1.211	1.1.1.35	1.1.99.20	1.14.14.1
11	72	Synthesis and degradation of ketone bodies Lipid metabolism	2.3.1.9	2.3.3.10	2.8.3.5	4.1.1.4	4.1.3.4
12	100	Steroid biosynthesis Lipid metabolism	1.1.1.270	1.14.13.70	1.14.14.17	1.14.14.24	1.14.15.16
13	120	Primary bile acid biosynthesis Lipid metabolism	1.1.1.35	1.1.1.50	1.14.14.23	1.14.14.25	1.14.14.26

14	130	Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis Metabolism of cofactors and vitamins	1.13.11.27	1.14.13.11	1.14.13.116	1.14.13.240	1.14.99.60
15	140	Steroid hormone biosynthesis Lipid metabolism	1.1.1.146	1.1.1.148	1.1.1.149	1.1.1.152	1.1.1.213
16	190	Oxidative phosphorylation Energy metabolism	1.3.5.1	1.6.5.11	1.6.5.3	1.6.99.3	1.9.3.1
17	220	Arginine biosynthesis Amino acid metabolism	1.14.14.47	1.2.1.38	1.4.1.2	1.4.1.3	1.4.1.4
18	230	Purine metabolism Nucleotide metabolism	1.1.1.205	1.1.1.350	1.1.98.6	1.14.13.113	1.17.1.4
19	232	Caffeine metabolism Biosynthesis of other secondary metabolites	1.14.13.178	1.14.13.179	1.14.14.1	1.17.3.2	1.17.5.2
20	240	Pyrimidine metabolism Nucleotide metabolism	1.14.99.46	1.17.4.1	1.17.4.2	1.17.99.4	1.3.1.1
21	250	Alaninell aspartate and glutamate metabolism Amino acid metabolism	1.2.1.24	1.2.1.79	1.2.1.88	1.4.1.1	-
22	260	Glycinell serine and threonine metabolism Amino acid metabolism	1.1.1.103	1.1.1.29	1.1.1.3	1.1.1.381	-
23	270	Cysteine and methionine metabolism Amino acid metabolism	1.1.1.3	1.1.1.310	1.1.1.338	1.1.1.37	1.13.11.20
24	280	Valinell leucine and isoleucine degradation Amino acid metabolism	1.1.1.31	1.1.1.35	1.2.1.27	1.2.1.3	-
25	290	Valinell leucine and isoleucine biosynthesis Amino acid metabolism	1.1.1.86	1.4.1.9	2.2.1.6	2.3.1.182	-
26	310	Lysine degradation Amino acid metabolism	1.13.12.2	1.14.11.1	1.14.11.4	1.14.11.8	1.14.13.59
27	330	Arginine and proline metabolism Amino acid metabolism	1.13.12.1	1.14.11.2	1.14.13.39	1.14.14.47	1.2.1.19
28	340	Histidine metabolism Amino acid metabolism	1.14.13.5	1.14.99.50	1.14.99.51	1.2.1.3	1.2.1.5
29	350	Tyrosine metabolism Amino acid metabolism	1.1.1.222	1.1.1.237	1.1.1.312	1.1.1.90	1.10.3.1

30	360	Phenylalanine metabolism Amino acid metabolism	1.1.1.222	1.1.1.237	1.1.1.90	1.11.1.21	1.13.11.16
31	380	Tryptophan metabolism Amino acid metabolism	1.1.1.190	1.1.1.191	1.1.1.35	1.10.3.4	1.11.1.21
32	400	Phenylalanine tyrosine and tryptophan biosynthesis Amino acid metabolism	1.1.1.25	1.1.1.282	1.1.5.8	1.14.16.1	
33	410	beta-Alanine metabolism Metabolism of other amino acids	1.2.1.15	1.2.1.18	1.2.1.19	1.2.1.3	1.2.1.5
34	430	Taurine and hypotaurine metabolism Metabolism of other amino acids	1.13.11.19	1.13.11.20	1.14.11.17	1.2.1.73	1.4.1.1
35	440	Phosphonate and phosphinate metabolism Metabolism of other amino acids	1.11.1.23	1.13.11.72	1.13.11.73	1.13.11.78	1.14.11.46
36	450	Selenocompound metabolism Metabolism of other amino acids	1.97.1.9	2.1.1.12	2.1.1.13	2.1.1.14	2.1.1.96
37	471	D-Glutamine and D-glutamate metabolism Metabolism of other amino acids	1.4.3.15	1.4.3.7	2.3.2.1	3.5.1.2	3.5.1.35
38	472	D-Arginine and D-ornithine metabolism Metabolism of other amino acids	1.4.1.25	1.4.1.26	1.4.3.3	1.4.99.6	2.6.1.21
39	480	Glutathione metabolism Metabolism of other amino acids	1.1.1.43	1.1.1.44	1.1.1.49	1.11.1.11	1.11.1.12
40	500	Starch and sucrose metabolism Carbohydrate metabolism	2.4.1.1	2.4.1.10	2.4.1.11	2.4.1.12	2.4.1.13
41	510	N-Glycan biosynthesis Glycan biosynthesis and metabolism	2.4.1.117	2.4.1.131	2.4.1.132	2.4.1.141	2.4.1.142
42	511	Other glycan degradation Glycan biosynthesis and metabolism	3.2.1.23	3.2.1.24	3.2.1.25	3.2.1.45	3.2.1.51

43	512	Mucin type O-glycan biosynthesis Glycan biosynthesis and metabolism	2.4.1.122	2.4.1.147	2.4.1.148	2.4.1.41	2.4.99.3
44	514	Other types of O-glycan biosynthesis Glycan biosynthesis and metabolism	2.4.1.221	2.4.1.222	2.4.1.255	2.4.1.50	2.4.1.66
45	515	Mannose type O-glycan biosynthesis Glycan biosynthesis and metabolism	2.4.1.135	2.4.1.152	2.4.1.312	2.4.1.313	2.4.99.6
46	520	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism Carbohydrate metabolism	1.1.1.135	1.1.1.136	1.1.1.187	1.1.1.22	1.1.1.271
47	524	Neomycin kanamycin and gentamicin biosynthesis Biosynthesis of other secondary metabolites	1.1.1.355	1.1.3.43	1.1.3.44	1.1.99.38	1.14.11.37
48	531	Glycosaminoglycan degradation Glycan biosynthesis and metabolism	3.1.6.12	3.1.6.13	3.1.6.14	3.1.6.18	3.1.6.4
49	532	Glycosaminoglycan biosynthesis - chondroitin sulfate / dermatan sulfate Glycan biosynthesis and metabolism	2.4.1.134	2.4.1.135	2.4.1.174	2.4.1.175	2.4.1.226
50	533	Glycosaminoglycan biosynthesis - keratan sulfate Glycan biosynthesis and metabolism	2.4.1.38	2.4.1.68	2.4.99.4	2.4.99.6	2.8.2.21
51	534	Glycosaminoglycan biosynthesis - heparan sulfate / heparin Glycan biosynthesis and metabolism	2.4.1.134	2.4.1.135	2.4.1.223	2.4.1.224	2.4.1.225
52	561	Glycerolipid metabolism Lipid metabolism	1.1.1.2	1.1.1.202	1.1.1.21	1.1.1.6	1.1.1.72
53	562	Inositol phosphate metabolism Carbohydrate metabolism	1.1.1.369	1.1.1.370	1.1.1.371	1.13.99.1	1.2.1.18

54	563	Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor biosynthesis and metabolism	3.1.4.50	3.5.1.89	2.4.1.198	3.1.4.50	3.5.1.89
55	564	Glycerophospholipid metabolism	1.1.1.261	1.1.1.8	1.1.1.94	1.1.3.21	1.1.5.3
56	565	Ether lipid metabolism	1.14.99.19	2.3.1.105	2.3.1.121	2.3.1.125	2.3.1.25
57	590	Arachidonic acid metabolism	1.1.1.188	1.1.1.189	1.1.1.196	1.1.1.232	1.11.1.20
58	591	Linoleic acid metabolism	1.13.11.33	1.13.11.45	1.13.11.58	1.13.11.60	1.13.11.62
59	592	alpha-Linolenic acid metabolism	1.13.11.12	1.3.1.42	1.3.3.6	2.1.1.141	2.3.1.16
60	600	Sphingolipid metabolism	1.14.18.5	1.14.19.17	2.3.1.24	2.3.1.50	2.4.1.23
61	601	Glycosphingolipid biosynthesis - lacto and neolacto series	2.4.1.150	2.4.1.152	2.4.1.206	2.4.1.228	2.4.1.275
62	603	Glycosphingolipid biosynthesis - globo and isoglobo series	2.4.1.179	2.4.1.228	2.4.1.69	2.4.1.79	2.4.1.87
63	604	Glycosphingolipid biosynthesis - ganglio series	2.4.1.92	2.4.99.4	2.4.99.7	2.4.99.8	2.4.99.9
64	620	Pyruvate metabolism	1.1.1.28	1.1.1.283	1.1.1.37	1.1.1.38	1.1.1.39
65	630	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	1.1.1.29	1.1.1.36	1.1.1.37	1.1.1.60	1.1.1.77
66	640	Propanoate metabolism	1.1.1.27	1.1.1.283	1.1.1.59	1.1.1.6	1.1.1.77
67	650	Butanoate metabolism	1.1.1.30	1.1.1.303	1.1.1.304	1.1.1.35	1.1.1.36

68	670	One carbon pool by folate Metabolism of cofactors and vitamins	1.5.1.20	1.5.1.3	1.5.1.5	1.5.1.6	1.5.7.1
69	730	Thiamine metabolism Metabolism of cofactors and vitamins	1.4.3.19	2.2.1.7	2.4.2.59	2.4.2.60	2.5.1.2
70	740	Riboflavin metabolism Metabolism of cofactors and vitamins	1.1.1.302	1.13.11.79	1.5.1.30	1.5.1.36	1.5.1.37
71	750	Vitamin B6 metabolism Metabolism of cofactors and vitamins	1.1.1.262	1.1.1.290	1.1.1.65	1.1.3.12	1.1.99.42
72	760	Nicotinate and nicotinamide metabolism Metabolism of cofactors and vitamins	1.1.1.328	1.13.11.9	1.14.13.10	1.14.13.114	1.14.13.163
73	770	Pantothenate and CoA biosynthesis Metabolism of cofactors and vitamins	1.1.1.169	1.1.1.84	1.1.1.86	1.2.1.33	1.3.1.1
74	780	Biotin metabolism Metabolism of cofactors and vitamins	1.14.14.46	1.3.1.10	2.1.1.197	2.3.1.179	2.3.1.41
75	785	Lipoic acid metabolism Metabolism of cofactors and vitamins	2.8.1.8	6.3.1.20	2.3.1.181	2.8.1.8	
76	790	Folate biosynthesis Metabolism of cofactors and vitamins	1.1.1.184	1.1.1.21	1.1.1.213	1.1.1.325	1.13.11.81
77	830	Retinol metabolism Metabolism of cofactors and vitamins	1.1.1.105	1.13.11.63	1.14.14.1	1.14.15.3	1.14.19.53
78	860	Porphyrin and chlorophyll metabolism Metabolism of cofactors and vitamins	1.1.1.396	1.14.13.122	1.14.13.81	1.14.13.83	1.14.14.18
79	900	Terpenoid backbone biosynthesis Metabolism of terpenoids and polyketides	1.1.1.267	1.1.1.34	1.1.1.354	1.1.1.88	1.17.7.1
80	910	Nitrogen metabolism Energy metabolism	1.14.99.39	1.18.6.1	1.19.6.1	1.4.1.13	1.4.1.14
81	920	Sulfur metabolism Energy metabolism	1.13.11.18	1.13.11.55	1.14.11.17	1.14.13.111	1.14.13.131
82	970	Aminoacyl-tRNA biosynthesis Translation	2.5.1.73	2.7.1.164	2.9.1.1	2.9.1.2	6.1.1.1

83	980	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450 Xenobiotics biodegradation and metabolism	1.1.1.146	1.1.1.184	1.14.14.1	1.2.1.5	1.3.1.20
84	982	Drug metabolism - cytochrome P450 Xenobiotics biodegradation and metabolism	1.14.13.8	1.14.14.1	1.2.1.5	1.2.3.1	1.4.3.4
85	983	Drug metabolism - other enzymes Xenobiotics biodegradation and metabolism	1.11.1.21	1.11.2.2	1.17.3.2	1.17.4.1	1.3.1.2
86	1040	Biosynthesis of unsaturated fatty acids Lipid metabolism	1.1.1.211	1.1.1.330	1.14.19.1	1.14.19.2	1.14.19.3
87	1100	Metabolic pathways Global and overview maps	1.1.1.10	1.1.1.100	1.1.1.101	1.1.1.102	1.1.1.105
88	4070	Phosphatidylinositol signaling system Signal transduction	2.7.1.127	2.7.1.137	2.7.1.140	2.7.1.149	2.7.1.150
89	4150	mTOR signaling pathway Signal transduction	2.7.11.1	2.7.11.11	2.7.11.24	2.7.11.9	2.7.1.153
90	4151	PI3K-Akt signaling pathway Signal transduction	2.7.11.1	2.7.1.153	2.7.11.1	2.7.1.153	2.7.11.1
91	4658	Th1 and Th2 cell differentiation Immune system	3.1.3.16	-	-	3.1.3.16	-
92	4660	T cell receptor signaling pathway Immune system	3.1.3.16	2.7.10.2	3.1.3.16	2.7.10.2	3.1.3.16
93	5163	Human cytomegalovirus infection Infectious diseases: Viral	2.7.11.1	2.7.1.153	2.7.11.1	2.7.1.153	2.7.11.1
94	5165	Human papillomavirus infection Infectious diseases: Viral	2.7.11.1	2.7.1.153	2.7.11.1	2.7.1.153	2.7.11.1

Fuente: Datos experimentales del estudio obtenidos del software EC2KEGG ; *EC Enzyme Commission Numbers;*ID identificación

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la tabla N° 03 se muestra el resultado del software EC2KEGG que da una lista de nombres de vías metabólicas relacionados con los códigos de enzimas de los parásitos y *Homo sapiens*, donde los datos más resaltantes son los que están seleccionados, de la columna de EC único-Ref y EC único-dado; que son códigos de enzimas únicos del Hospedero *Homo sapiens*, por lo que estas enzimas no se deben encontrar en la lista de enzimas seleccionadas de ambos parásitos, es decir las 125 enzimas seleccionadas de los parásitos no deben contener las enzimas que se encuentren en el hospedero, deben ser únicas. Por ello se procedió a eliminar las enzimas EC Unique-Ref y EC Unique-Given de lista de 125 enzimas seleccionadas de los parásitos.

En el estudio realizado por Porollo A “EC2KEGG: Una Herramienta de línea de Comandos para la Comparación de vías metabólicas” se realizó un análisis de enzimas identificadas computacionalmente dentro de una especie poco investigada. *Pneumocystis carinii*, Donde se obtuvo una serie de vías metabólicas agotadas en comparación con sus congéneres de vida libre, proporcionando así una base para desarrollar hipótesis comprobables sobre los nutrientes que faltan en los medios para cultivar el patógeno. (17)

Estos resultados muestran que este software ayuda de gran manera a la identificación de vías metabólicas, en caso de este estudio nos ayuda a descartar enzimas que estén relacionadas con las vías metabólicas del hospedero.

4.3. ANOTACIÓN BIOLÓGICA DE LAS ENZIMAS SELECCIONADAS

TABLA N° 04 RESULTADO DE LAS ANOTACIONES BIOLÓGICAS DE LAS ENZIMAS

ENZIMAS	PROCESOS BIOLÓGICOS	FUNCIÓN MOLECULAR
APYRASE	-	Unión de iones de calcio, actividad nucleósido-difosfatasa
ASTACIN	Proteolysis	Actividad metaloendopeptidasa
HEXOKINASE	Homeostasis, proceso metabólico de carbohidratos	Actividad de hexokinasa, enlace ATP, enlace de glucosa
COA-LIGASE	Ciclo del ácido tricarboxílico, proceso metabólico	Actividad catalítica
CHITINASE	Proceso catabólico de la macromolécula de la pared celular	Actividad chitinase

Fuente: Datos del estudio obtenidos del software online InterProScan <https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>.

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

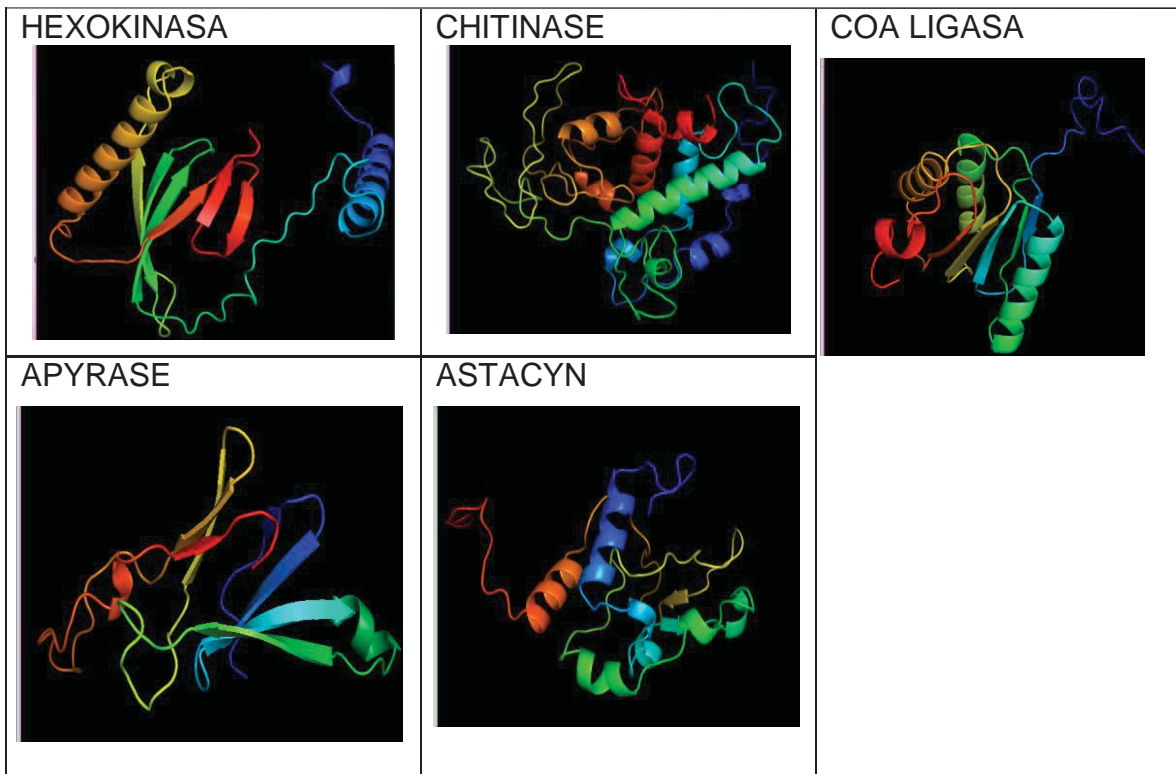
En la tabla N°04 muestra los resultados del software online InterProScan que da información de los procesos biológicos y función molecular a partir de la secuencia de cada una de las enzimas. El software muestra los resultados en flujogramas tal como se observa en el anexo N°04.

Como se observa, las enzimas seleccionadas muestran funciones en los procesos biológicos excepto la enzima apyrase y también tienen funciones moleculares que están comprometidas con los parásitos, lo que favorece al estudio para ser buenas opciones como blancos farmacológicos.

En el informe realizado por Quevillon E “InterProScan: protein domains identifier” menciona que InterPro es una base de datos que contiene información superpuesta sobre proteínas, familias, dominios y sitios funcionales que combina métodos de reconocimiento de la función proteica. (65)

4.4. MODELAMIENTO MOLECULAR DE LAS ENZIMAS ÚNICAS

Fig N° 05 Resultado del modelamiento de las cinco enzimas



Fuente: Datos experimentales del estudio obtenidos del software online PHYRE2

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la figura N°05 se muestra los resultados de modelamiento molecular de las cinco enzimas, imágenes en 3D. Estos modelamientos fueron realizados por homología mediante el software PHYRE2, este tipo de modelización usa estructuras determinadas experimentalmente para predecir la conformación de las enzimas seleccionadas, es así que se construye las estructuras con un correcto alineamiento de las proteínas a modelar (enzimas seleccionadas) y estructuras de proteínas conocidas.

Un estudio realizado por Kelley L “Predicción de estructura de proteínas en la Web: un caso de estudio usando el servidor Phyre” indica que la precisión de la estructura de la proteína depende fundamentalmente de la similitud de secuencia entre el problema y la plantilla. Si la plantilla detecta > al 30% de identidad la alineación será precisa. Phyre da un alto nivel de confianza > al 90%.(57)

4.5. REFINAMIENTO Y VALIDACIÓN DE LAS ENZIMAS ÚNICAS

Previamente a la validación de las enzimas, las enzimas en texto plano fueron modelados por Homología de Proteínas mediante el software PHYRE2 en formato PDB, para luego refinarlos en el software 3D REFINE.

TABLA N°05 RESULTADO DE LA VALIDACIÓN DE LAS CINCO ENZIMAS

ZONA	Hexokinasa	Coligasa	Chitinase	Astacyn	Apyrase
Favorecida	138(98.6%)	126(96.2%)	199(82.6%)	121(94.5%)	95(95.0%)
Permitida	2(1.4%)	3(2.3%)	30(12.4%)	5(3.9%)	5(5.0%)
Atípica	0(0%)	2(1.5%)	12(5.0%)	2(1.6%)	0(0%)

Fuente: Datos experimentales del estudio obtenidos del software online RAMPAGE-Ramachandran Plot Analysis. <http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>.

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la tabla N° 05 muestra los resultados de las validaciones de las cinco enzimas a través del software RAMPAGE que da los diagramas de Ramachandran, porque en estos diagramas se pueden visualizar todas las combinaciones posibles de ángulos psi contra phi en los aminoácidos de un polipéptido que contribuyen a la conformación de la estructura de las proteínas. Por lo que esta herramienta permite aproximar de manera temprana y confiable cual será la estructura secundaria del péptido.

La ubicación de los ángulos y de las torsiones de los enlaces de los aminoácidos que forman la estructura secundaria evaluada se encuentran dentro de los niveles:

favorecida, permitida y atípica, obteniéndose una validación suficiente para los modelos propuestos.

Las cinco enzimas validadas presentan la zona favorecida un alto porcentaje superando el 60% quiere decir que los modelos de enzimas fueron muy bien modelados por Homología de proteínas.

Según el estudio de Diaz A. realizado Modelación por Homología de las Proteína Luxs de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83; menciona que usó diversos métodos de validación dentro de ellos el software RAMPAGE que permite aproximar de manera temprana y confiable cual será la estructura secundaria y que se considera validado por encima de un 60% considerando esta herramienta que es el más idóneo para validar los modelos de proteína. (66)

4.6. SCREENING VIRTUAL

TABLA N° 06 FILTRADO DE LA BIBLIOTECA DE LOS 200 COMPUESTOS QUÍMICOS

	ID del Compuesto	Peso Molecular Total	Fórmula Molecular	Reglas de Lipinzky	cLogP
1	MMV010764	320.44	C14H16N4OS2	0 ERRORES	2.54
2	MMV688472	393.82	C21H16N3O3Cl	0 ERRORES	4.00
3	MMV688416	456.99	C23H25N4O2ClS	0 ERRORES	5.93
4	MMV689758	669.55	C32H31N2O2Br	PM>500;MLOGP>4.15	7.17
5	MMV688796	354.38	C19H19N4O2F	0 ERRORES	3.14
6	MMV676526	385.82	C21H17NO3ClF	MLOGP>4.15	5.03
7	MMV688553	343.38	C18H21N3O4	0 ERRORES	1.81
8	MMV676501	346.21	C11H5N3O2Cl2S2	0 ERRORES	4.51
9	MMV676449	344.84	C19H21N2O2Cl	0 ERRORES	3.70
10	MMV676412	344.77	C16H9N2O3ClS	0 ERRORES	3.17
11	MMV1110498	327.31	C15H16N3O2F3	0 ERRORES	2.33
12	MMV000907	457.28	C11H13N5O	0 ERRORES	0.57
13	MMV688889	349.82	C19H16N5Cl	0 ERRORES	3.46
14	MMV688776	313.78	C17H16N3OCl	0 ERRORES	3.90
15	MMV688934	383.87	C21H22N3O2Cl	0 ERRORES	3.79
16	MMV676389	368.43	C20H24N4O3	0 ERRORES	2.13
17	MMV676603	431.39	C17H16N3O5F3S	0 ERRORES	1.29
18	MMV676401	308.38	C18H20N4O	0 ERRORES	3.22
19	MMV102872	367.71	C16H9N3O2ClF3	0 ERRORES	4.46
20	MMV676477	383.47	C19H21N5O2S	0 ERRORES	3.28
21	MMV084603	377.51	C22H23N3OS	0 ERRORES	3.53
22	MMV688548	267.33	C15H17N5	0 ERRORES	2.05
23	MMV688888	349.40	C20H20N5F	0 ERRORES	2.72
24	MMV690028	546.66	C30H38N6O4	PM>500	5.05
25	MMV688943	406.26	C19H17N3O3Cl2	0 ERRORES	3.55
26	MMV053220	252.27	C15H12N2O2	0 ERRORES	1.82
27	MMV676584	314.79	C12H8N2OClFS2	0 ERRORES	2.93
28	MMV676439	302.82	C16H15N2ClS	0 ERRORES	3.66
29	MMV676395	307.30	C17H13N3O3	0 ERRORES	0.99
30	MMV676379	321.17	C15H13O3Br	0 ERRORES	3.20
31	MMV687762	320.39	C20H20N2O2	0 ERRORES	3.73
32	MMV1028806	339.39	C18H14N3OFS	0 ERRORES	3.99
33	MMV661713	435.33	C21H19N6Br	0 ERRORES	3.30
34	MMV688793	337.37	C19H19N3O3	0 ERRORES	3.06
35	MMV688942	337.42	C20H23N3O2	0 ERRORES	3.74
36	MMV688554	321.39	C15H19N3O3S	0 ERRORES	1.96
37	MMV676555	283.76	C16H14N3Cl	0 ERRORES	3.44

38	MMV676383	319.40	C14H13N3O2S2	0 ERRORES	3.76
39	MMV676444	345.44	C19H27N3O3	0 ERRORES	2.81
40	MMV676409	329.35	C16H12N3O2FS	0 ERRORES	2.95
41	MMV688514	263.29	C16H13N3O	0 ERRORES	2.26
42	MMV676350	345.85	C17H16N3OCIS	0 ERRORES	3.53
43	MMV553002	239.25	C10H9NO4S	0 ERRORES	-0.31
44	MMV688797	331.38	C18H22N3O2F	0 ERRORES	3.33
45	MMV688756	353.41	C16H20N3O3FS	0 ERRORES	0.93
46	MMV090930	375.42	C16H13N3O4S2	0 ERRORES	2.89
47	MMV676431	317.77	C17H16N3OCI	0 ERRORES	3.75
48	MMV676571	433.43	C24H20N3O4F	0 ERRORES	4.34
49	MMV676445	281.35	C17H19N3O	0 ERRORES	2.71
50	MMV676589	365.43	C21H23N3O3	0 ERRORES	4.31
51	MMV026020	420.49	C23H20N2O4S	0 ERRORES	3.24
52	MMV688471	343.38	C21H17N3O2	0 ERRORES	3.89
53	MMV676388	330.36	C15H14N4O3S	0 ERRORES	1.22
54	MMV202553	269.30	C15H15N3O2	0 ERRORES	2.32
55	MMV688936	386.86	C18H15N4O2CIS	0 ERRORES	3.75
56	MMV676476	380.43	C23H24O5	0 ERRORES	4.03
57	MMV676377	318.13	C13H8N3O2Br	0 ERRORES	2.54
58	MMV676406	475.61	C26H29N5O2S	0 ERRORES	3.09
59	MMV676461	357.43	C18H19N3O3S	0 ERRORES	4.47
60	MMV676509	376.84	C22H17N2O2CI	0 ERRORES	5.41
61	MMV688470	464.58	C24H28N6O2S	0 ERRORES	3.12
62	MMV688704	391.29	C19H20N4OCI2	0 ERRORES	4.77
63	MMV188296	312.34	C18H17N2O2F	0 ERRORES	2.29
64	MMV688958	308.40	C18H16N2OS	0 ERRORES	3.66
65	MMV063404	345.87	C19H24N3OCI	0 ERRORES	3.52
66	MMV676558	371.45	C22H17N3OS	0 ERRORES	5.52
67	MMV688555	339.84	C15H18N3O2CIS	0 ERRORES	2.43
68	MMV676597	343.42	C18H25N5O2	0 ERRORES	3.77
69	MMV676588	258.38	C15H18N2S	0 ERRORES	3.47
70	MMV676554	335.36	C19H17N3O3	0 ERRORES	3.27
71	MMV688350	465.50	C24H20N3O4FS	0 ERRORES	3.05
72	MMV688360	421.53	C25H31N3O3	0 ERRORES	3.92
73	MMV099637	297.33	C17H16N3OF	0 ERRORES	2.94
74	MMV688798	365.45	C21H19NO3S	0 ERRORES	3.48
75	MMV676539	332.35	C20H16N2O3	0 ERRORES	2.50
76	MMV202458	319.79	C17H18NO3CI	0 ERRORES	3.62
77	MMV676474	336.43	C21H24N2O2	0 ERRORES	4.51
78	MMV461553	419.37	C18H14NO3F5S	MLOGP>4.15	4.78

79	MMV676520	364.39	C21H20N2O4	0 ERRORES	3.48
80	MMV676512	347.39	C18H13N5O5	0 ERRORES	2.95
81	MMV676480	474.53	C26H22N2O5S	0 ERRORES	3.43
82	MMV652003	321.06	C15H11N03BF3	0 ERRORES	2.62
83	MMV000062	592.69	C19H24N4O2	0 ERRORES	1.75
84	MMV006372	269.35	C15H19N5	0 ERRORES	1.62
85	MMV688854	452.98	C24H28N6O	0 ERRORES	3.26
86	MMV011903	374.40	C20H18N6O2	0 ERRORES	2.88
87	MMV020591	385.47	C24H23N3O2	0 ERRORES	3.95
88	MMV020623	414.51	C25H26N4O2	0 ERRORES	4.54
89	MMV020512	415.49	C25H25N3O3	0 ERRORES	3.76
90	MMV688761	461.51	C20H19N3O6S2	0 ERRORES	2.24
91	MMV012074	299.76	C16H14N3OCI	0 ERRORES	2.52
92	MMV676604	371.46	C18H21N5O2S	0 ERRORES	2.11
93	MMV002529	312.41	C19H24N2O2	0 ERRORES	2.54
94	MMV687776	609.20	C28H23N2O4BCI2F4	PM>500;MLOGP>4.15	7.71
95	MMV687800	473.40	C27H22N4CI2	MLOGP>4.15	6.28
96	MMV020982	374.44	C22H22N4O2	0 ERRORES	3.53
97	MMV020120	354.54	C23H34N2O	0 ERRORES	3.74
98	MMV676605	421.49	C26H23N5O	0 ERRORES	4.04
99	MMV007638	416.52	C20H20N2O4S2	0 ERRORES	3.68
100	MMV021057	403.39	C22H17N3O5	0 ERRORES	2.94
101	MMV690027	584.71	C33H40N6O4	PM>500;MLOGP>4.15	5.44
102	MMV676600	474.55	C26H30N6O3	0 ERRORES	0.73
103	MMV676382	377.44	C20H23N7O	0 ERRORES	1.68
104	MMV001625	236.60	C6H12N2O2F2	0 ERRORES	-4.99
105	MMV001493	371.39	C19H21N3O5	0 ERRORES	3.19
106	MMV020136	366.46	C15H18N4O3S2	0 ERRORES	0.96
107	MMV020710	399.84	C19H18N5O3CI	0 ERRORES	1.98
108	MMV020517	364.45	C21H24N4O2	0 ERRORES	3.02
109	MMV019721	437.97	C19H20N3O3CIS2	0 ERRORES	3.80
110	MMV688763	351.83	C13H10N5OCIS2	0 ERRORES	2.88
111	MMV020537	334.82	C16H15N2O2CIS	0 ERRORES	3.89
112	MMV637953	1435.28	C51H40N6O23S6	PM>500;N o O>10; NH o OH>5	-2.91
113	MMV676536	373.49	C18H19N3O2S2	0 ERRORES	3.05
114	MMV000063	515.71	C21H33N3O	0 ERRORES	4.23
115	MMV689255	253.21	C9H11N5O4	0 ERRORES	-2.54
116	MMV019838	412.29	C18H10N4OF6	0 ERRORES	3.93
117	MMV020520	417.51	C25H27N3O3	0 ERRORES	3.41
118	MMV019234	382.44	C20H18N2O4S	0 ERRORES	3.59
119	MMV016136	349.82	C19H16N5CI	0 ERRORES	3.50

120	MMV688762	353.46	C24H23N3	0 ERRORES	4.63
121	MMV676386	335.36	C19H17N3O3	0 ERRORES	3.03
122	MMV688773	260.25	C12H12N4O3	0 ERRORES	-0.25
123	MMV000011	480.90	C22H24N2O8	NH o OH>5	-1.17
124	MMV687775	462.03	C19H14NO3BCl2F4	0 ERRORES	6.51
125	MMV002817	396.95	C9H5NOI2	0 ERRORES	2.50
126	MMV676442	415.53	C25H29N5O	0 ERRORES	3.82
127	MMV020152	278.31	C17H14N2O2	0 ERRORES	3.33
128	MMV024397	335.45	C21H25N3O	0 ERRORES	3.52
129	MMV019807	323.78	C18H14N3OCl	0 ERRORES	3.15
130	MMV560185	289.38	C19H19N3	0 ERRORES	3.65
131	MMV019189	309.39	C17H15N3OS	0 ERRORES	3.88
132	MMV688774	700.78	C37H42N8O4F2	PM>500;N o O>10	4.23
133	MMV003270	168.58	C7H5N2OCl	0 ERRORES	1.97
134	MMV637229	459.97	C21H26NOCl	MLOGP>4.15	4.60
135	MMV688853	389.88	C19H23N5O2	0 ERRORES	1.75
136	MMV020321	386.80	C18H18N2O2ClF3	0 ERRORES	3.48
137	MMV019087	420.39	C19H19N6O2F3	0 ERRORES	1.61
138	MMV676528	433.88	C20H17N3O3ClFS	0 ERRORES	3.47
139	MMV020320	359.39	C20H17N5O2	0 ERRORES	2.86
140	MMV085210	445.97	C22H24N3O3ClS	0 ERRORES	3.71
141	MMV069458	222.56	C6H2N4ClF3	0 ERRORES	0.61
142	MMV688991	307.28	C12H9N3O5S	0 ERRORES	1.69
143	MMV687801	277.23	C10H24N2O2	0 ERRORES	-0.38
144	MMV689480	326.43	C21H26O3	0 ERRORES	4.69
145	MMV003152	295.30	C16H13N3O3	0 ERRORES	2.67
146	MMV006239	368.24	C18H14N3OBr	0 ERRORES	2.43
147	MMV000858	399.92	C16H18N3O3ClS2	0 ERRORES	2.21
148	MMV006741	378.48	C22H26N4O2	0 ERRORES	3.19
149	MMV688768	325.47	C19H23N3S	0 ERRORES	3.38
150	MMV000023	455.35	C15H21N3O	0 ERRORES	1.90
151	MMV676602	460.57	C25H32N8O	0 ERRORES	2.09
152	MMV000016	414.78	C17H16N2OF6	0 ERRORES	3.51
153	MMV687803	337.35	C16H20N3O4F	0 ERRORES	0.52
154	MMV668727	384.28	C17H10N4F6	0 ERRORES	3.45
155	MMV019742	410.50	C21H22N4O3S	0 ERRORES	2.35
156	MMV009054	351.19	C15H12N4O2Cl2	0 ERRORES	2.30
157	MMV006901	306.37	C18H18N4O	0 ERRORES	3.36
158	MMV020391	394.92	C19H23N2O3ClS	0 ERRORES	3.73
159	MMV676380	370.79	C18H15N4O3Cl	0 ERRORES	2.47
160	MMV688994	725.50	C21H39N7O12	PM>500;N o O>10; NH o OH>5	-8.21

161	MMV675997	424.51	C24H29N4O2F	0 ERRORES	3.48
162	MMV676204	334.39	C21H19N2OF	MLOGP>4.15	4.30
163	MMV687239	341.35	C19H17N3OF2	0 ERRORES	2.84
164	MMV688122	320.37	C16H12N6S	0 ERRORES	2.86
165	MMV688852	333.79	C16H17N5CIF	0 ERRORES	2.88
166	MMV687145	267.35	C12H17N3O2S	0 ERRORES	1.49
167	MMV688327	474.91	C22H23N6O3F	0 ERRORES	0.88
168	MMV008439	384.52	C23H32N2O3	0 ERRORES	2.39
169	MMV595321	458.54	C21H26N6O4S	0 ERRORES	2.38
170	MMV687747	385.25	C19H17N2O2Br	0 ERRORES	3.53
171	MMV020388	365.90	C19H28N3O2Cl	0 ERRORES	2.69
172	MMV688547	613.47	C21H21N7O	0 ERRORES	0.90
173	MMV688466	502.00	C24H24N5O2FS	0 ERRORES	2.43
174	MMV687749	448.95	C24H24N6O	0 ERRORES	3.13
175	MMV688846	383.84	C20H21NOCIF3	MLOGP>4.15	4.95
176	MMV054312	240.31	C15H16N2O	0 ERRORES	2.81
177	MMV689060	313.23	C14H18N4Cl2	0 ERRORES	2.29
178	MMV689061	422.50	C24H27N4O2F	0 ERRORES	4.09
179	MMV689028	474.57	C26H26N4O3S	0 ERRORES	3.34
180	MMV688371	449.76	C22H19N2O2Cl3	MLOGP>4.15	5.30
181	MMV688508	358.36	C19H19N2O4F	0 ERRORES	1.91
182	MMV688283	495.00	C24H23N6O2ClS	0 ERRORES	3.73
183	MMV687243	336.18	C15H14N3Br	0 ERRORES	2.83
184	MMV687730	384.52	C22H32N4O2	0 ERRORES	5.00
185	MMV687251	275.30	C8H9N3O4S2	0 ERRORES	-0.04
186	MMV687254	305.37	C19H19N3O	0 ERRORES	4.07
187	MMV688509	455.52	C28H26N3O2F	0 ERRORES	5.71
188	MMV688361	357.41	C21H19N5O	0 ERRORES	2.31
189	MMV689029	490.57	C26H26N4O4S	0 ERRORES	2.93
190	MMV022236	439.48	C21H28N5O2F3	0 ERRORES	3.08
191	MMV688410	384.90	C21H25N4OCl	0 ERRORES	2.39
192	MMV676048	325.23	C16H18N2OCl2	0 ERRORES	4.00
193	MMV687703	377.48	C22H27N5O	0 ERRORES	2.90
194	MMV687248	320.32	C18H13N4OF	0 ERRORES	3.11
195	MMV688125	427.60	C24H33N3O2S	0 ERRORES	3.60
196	MMV687188	352.38	C20H20N2O4	0 ERRORES	2.96
197	MMV690103	349.43	C19H23N7	0 ERRORES	2.63
198	MMV688124	443.65	C25H37N3O2S	0 ERRORES	4.30
199	MMV688845	435.54	C24H25N3O3S	0 ERRORES	3.23
200	MMV1030799	330.39	C20H18N4O	0 ERRORES	3.99

Fuente: Datos experimentales del estudio

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En esta Tabla N°06 se muestra los 200 compuestos químicos donados por la empresa PATHOGEN BOX, cada molécula con su respectivo ID del compuesto, peso molecular, fórmula molecular, clogP (coeficiente de partición Octanol-Agua).

Las 200 moléculas fueron filtradas a través del software swissADME, que verifica si cumplen con las reglas de Lipinzy. Se descartaron 15 moléculas de la biblioteca de los compuestos químicos, por no cumplir con las reglas propuestas por Lipinzy, es decir tienen una alta probabilidad de carecer de permeabilidad a través de la barrera intestinal (relacionado con el número de donadores o aceptores de hidrógeno) y tener baja solubilidad (relacionado cuando supera los valores de logP o peso molecular) El resto de moléculas se encuentran aptas para continuar con el estudio.

El estudio “Diseño Racional de nuevos Dicetoácidos purínicos y sus derivados Bioisostéricos con potencial Actividad Inhibidora de la Enzima Integrasa del VIH”, menciona sobre las 5 reglas de Lipinsky como una regla empírica derivada de la base de datos de fármacos que, si se incumplen dos de los parámetros de esta regla, no se podría administrar por vía oral debido a su poca permeabilidad o absorción.(45)

Estas reglas de Lipinzy son:

- $\text{Peso molecular} \leq 500$
- $\text{MLOGP} \leq 4.15$ (Coeficiente de Partición Octanol Agua)
- $\text{N o O} \leq 10$
- $\text{NH o OH} \leq 5$

Por lo que queda un resto de 185 moléculas que, si cumplen con las reglas de Lipinzy, el descarte de las 15 moléculas fue un primer filtro que se realizó a los compuestos químicos; ahora estos compuestos están listos para continuar con las siguientes etapas.

TABLA N° 07 RESULTADOS DE LA PREDICCIÓN DE LOS SITIOS DE ACCIÓN DE LAS ENZIMAS

ENZIMA ASTACYN

	X	Y	Z
CAVIDAD 1	2.164	5.822	22.470
CAVIDAD 2	-4.788	7.892	13.032
CAVIDAD 3	5.387	10.817	12.700
CAVIDAD 4	-0.159	2.925	10.397

ENZIMA APYRASE

	X	Y	Z
CAVIDAD 1	13.451	-5.852	57.254
CAVIDAD 2	-1.176	-1.047	66.743
CAVIDAD 3	5.374	0.676	69.854
CAVIDAD 4	1.722	-6.517	60.460

ENZIMA CHITINASE

	X	Y	Z
CAVIDAD 1	-43.922	4.384	7.639
CAVIDAD 2	-38.398	-4.040	18.301
CAVIDAD 3	-47.440	17.269	19.205
CAVIDAD 4	-48.869	-10.675	17.854
CAVIDAD 5	-41.886	-15.962	11.745
CAVIDAD 6	-53.028	-12.791	0.725
CAVIDAD 7	-52.493	11.877	4.609
CAVIDAD 8	-47.595	4.874	25.445
CAVIDAD 9	-47.643	-6.725	7.203
CAVIDAD 10	-57.782	-5.723	2.398
CAVIDAD 11	-58.954	0.599	14.307
CAVIDAD 12	-53.859	8.675	11.515

ENZIMA COLIGASA

	X	Y	Z
CAVIDAD 1	17.767	-27.233	37.327
CAVIDAD 2	20.977	-18.336	31.328
CAVIDAD 3	20.120	-29.133	24.730
CAVIDAD 4	14.655	-21.871	22.513

ENZIMA HEXOKINASA

	X	Y	Z
CAVIDAD 1	28.827	19.711	48.304
CAVIDAD 2	21.472	27.766	51.906
CAVIDAD 3	23.024	25.939	44.710

Fuente: Datos experimentales del estudio obtenidos de: Active Site Prediction software <http://www.scfbio-iitd.res.in/dock/ActiveSite.jsp>.

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la tabla N°07 se encuentran los resultados sobre los probables sitios de acción en las enzimas mediante la herramienta ACTIVE SITE PREDICTION, lo cual significa que para cada enzima se tiene varias posibilidades para realizar el acoplamiento molecular con los aproximadamente 200 ligandos.

En este trabajo de investigación solo se trabajó con un solo sitio catalítico. Para seleccionar al sitio activo se realizó docking molecular con todas las posiciones de sitio activo y los ligandos al azar. Finalmente se seleccionó las posiciones con las que presentó mayor afinidad, los ligandos a las correspondientes enzimas.

Los sitios activos seleccionados están resaltados en la tabla N°07, los valores x,y,z son los valores que indican la posición del sitio activo, estos valores serán útiles para colocar bien el Grid box para la preparación del docking molecular.

4.7. DOCKING MOLECULAR

TABLA N° 08 RESULTADOS DE DOCKING MOLECULAR RÍGIDO ENTRE LA ENZIMA ASTACYN Y LOS LIGANDOS

ligando1	-7.4	ligando16	-7.5	ligando30	-6.8	ligando43	-7.5	ligando56	-8.1	ligando69	-7.5	ligando84	-8.2
ligando2	-7.7	ligando17	-7.6	ligando31	-7.2	ligando44	-6	ligando57	-8	ligando70	-8.9	ligando85	-8.1
ligando3	-7.6	ligando18	-7.7	ligando32	-7.2	ligando45	-6.6	ligando58	-6.9	ligando71	-7.7	ligando86	-7.3
ligando5	-7.4	ligando19	-7.5	ligando33	-7.1	ligando46	-7	ligando59	-8.1	ligando72	-7.9	ligando87	-8.5
ligando7	-6.4	ligando20	-8.5	ligando34	-6.7	ligando47	-7.9	ligando60	-7.9	ligando73	-7.2	ligando88	-7.5
ligando8	-6.2	ligando21	-7.2	ligando35	-5.9	ligando48	-6.6	ligando61	-7.4	ligando74	-8	ligando89	-7.4
ligando9	-8	ligando22	-7.7	ligando36	-7.3	ligando49	-7.4	ligando62	-7.4	ligando75	-6.5	ligando90	-6.9
ligando10	-6.8	ligando23	-8.3	ligando37	-6.6	ligando50	-8.1	ligando63	-7.8	ligando76	-5.7	ligando91	-7.4
ligando11	-7	ligando25	-7.1	ligando38	-8.4	ligando51	-7.5	ligando64	-7.5	ligando77	-7.1	ligando92	-8.1
ligando12	-8	ligando26	-6.3	ligando39	-7	ligando52	-7.3	ligando65	-8.4	ligando79	-7.2	ligando96	-7.7
ligando13	-7.9	ligando27	-7	ligando40	-7.5	ligando53	-7.1	ligando66	-6.3	ligando80	-7.8	ligando97	-8.6
ligando14	-7	ligando28	-7	ligando41	-6.4	ligando54	-6.7	ligando67	-7	ligando82	-6.1	ligando98	-7.1
ligando15	-7.6	ligando29	-7	ligando42	-6.3	ligando55	-7.5	ligando68	-6.7	ligando83	-6.5	ligando99	-7

ligando102	-7.7	ligando118	-7.4	ligando137	-8	ligando152	-6.7	ligando169	-6.7	ligando186	-8.6		
ligando103	-5.6	ligando119	-7.9	ligando138	-7.8	ligando153	-7.3	ligando170	-6.6	ligando187	-7.4		
ligando104	-6.9	ligando120	-7.5	ligando139	-7.4	ligando154	-7.8	ligando171	-7.5	ligando188	-8		
ligando105	-6.9	ligando121	-7.2	ligando140	-6.5	ligando155	-6.8	ligando172	-7.5	ligando189	-7.4		
ligando106	-7.2	ligando124	-6.3	ligando141	-6.5	ligando156	-7	ligando173	-8.3	ligando190	-6.7		
ligando107	-7.1	ligando125	-7.8	ligando142	-5.2	ligando157	-6.6	ligando174	-8.2	ligando191	-6.8		
ligando108	-6.7	ligando126	-6.5	ligando143	-7.3	ligando158	-7.1	ligando176	-6	ligando192	-7.2		
ligando109	-6.3	ligando127	-7.3	ligando144	-6.9	ligando159	-6.8	ligando177	-8	ligando193	-7.7		
ligando110	-6.7	ligando128	-8.4	ligando145	-7.7	ligando161	-6.9	ligando178	-7.6	ligando194	-6.7		
ligando111	-10	ligando129	-8.4	ligando146	-7.1	ligando163	-7.6	ligando179	-7.3	ligando195	-7.5		
ligando113	-6	ligando130	-7.8	ligando147	-7	ligando164	-7.1	ligando181	-7.9	ligando196	-7.5		
ligando114	-6.7	ligando131	-7.6	ligando148	-6.7	ligando165	-6.6	ligando182	-7.3	ligando197	-7.1		
ligando115	-8.3	ligando133	-6.7	ligando149	-7.3	ligando166	-7.3	ligando183	-7.5	ligando198	-7.9		
ligando116	-8.2	ligando135	-7.8	ligando150	-8	ligando167	-7.3	ligando184	-5.2	ligando199	-7.7		
ligando117	-6.7	ligando136	-8.1	ligando151	-7.7	ligando168	-7.9	ligando185	-6.8				

TABLA N° 09 RESULTADOS DE DOCKING MOLECULAR RÍGIDO ENTRE LA ENZIMA CHITINASE Y LOS LIGANDOS

ligando1	-8.4	ligando16	-7.4	ligando30	-7.1	ligando43	-7.9	ligando56	-6.7	ligando69	-7.1	ligando84	-6.8
ligando2	-7.2	ligando17	-7.1	ligando31	-7.2	ligando44	-6.2	ligando57	-8	ligando70	-8.2	ligando85	-8.6
ligando3	-7.6	ligando18	-8.6	ligando32	-7.3	ligando45	-6.9	ligando58	-8.5	ligando71	-7.3	ligando86	-7.6
ligando5	-8	ligando19	-6.6	ligando33	-8.8	ligando46	-7.9	ligando59	-8.1	ligando72	-7.8	ligando87	-7.5
ligando7	-6	ligando20	-7.3	ligando34	-7.7	ligando47	-8	ligando60	-7.6	ligando73	-8.2	ligando88	-7.6
ligando8	-7.8	ligando21	-7.2	ligando35	-6.8	ligando48	-7.4	ligando61	-7	ligando74	-8.1	ligando89	-6.8
ligando9	-7.1	ligando22	-8.2	ligando36	-8.1	ligando49	-7.5	ligando62	-7.4	ligando75	-7.6	ligando90	-7.9
ligando10	-7	ligando23	-6.8	ligando37	-7.3	ligando50	-7.6	ligando63	-7.2	ligando76	-6.3	ligando91	-7.4
ligando11	-7	ligando25	-6.7	ligando38	-6.3	ligando51	-8.3	ligando64	-7.4	ligando77	-8.6	ligando92	-9.5
ligando12	-8.8	ligando26	-7.1	ligando39	-7.5	ligando52	-7.2	ligando65	-8.3	ligando79	-6.5	ligando96	-7.8
ligando13	-7.6	ligando27	-6.9	ligando40	-7.9	ligando53	-6.4	ligando66	-7.3	ligando80	-7.9	ligando97	-8
ligando14	-6.8	ligando28	-9	ligando41	-7.1	ligando54	-6.6	ligando67	-8.1	ligando82	-6.6	ligando98	-7.6
ligando15	-8.2	ligando29	-7	ligando42	-6.7	ligando55	-7.9	ligando68	-8.2	ligando83	-7.1	ligando99	-8.3

ligando102	-7.2	ligando118	-8.1	ligando137	-8.2	ligando152	-8.4	ligando169	-7.2	ligando186	-8.3
ligando103	-4.6	ligando119	-8	ligando138	-8.2	ligando153	-7.9	ligando170	-7.5	ligando187	-8.3
ligando104	-6.4	ligando120	-7.6	ligando139	-8.1	ligando154	-7.9	ligando171	-7.2	ligando188	-8.8
ligando105	-6.5	ligando121	-6.7	ligando140	-6.2	ligando155	-8.1	ligando172	-7.3	ligando189	-6.8
ligando106	-6.4	ligando124	-5.9	ligando141	-7.8	ligando156	-7.9	ligando173	-7.8	ligando190	-6.5
ligando107	-7.3	ligando125	-7.2	ligando142	-4.4	ligando157	-6.6	ligando174	-7.7	ligando191	-7.6
ligando108	-6.7	ligando126	-8.4	ligando143	-8.1	ligando158	-6.9	ligando176	-7.2	ligando192	-7.3
ligando109	-7.7	ligando127	-7.5	ligando144	-7.9	ligando159	-6.1	ligando177	-8.4	ligando193	-8.4
ligando110	-7.5	ligando128	-7.3	ligando145	-7.6	ligando161	-7.8	ligando178	-8	ligando194	-7
ligando111	-10.5	ligando129	-8.4	ligando146	-7.1	ligando163	-8.7	ligando179	-6.5	ligando195	-7.7
ligando113	-5.6	ligando130	-7	ligando147	-7.9	ligando164	-7.3	ligando181	-8.1	ligando196	-8.5
ligando114	-6.5	ligando131	-8.2	ligando148	-6.7	ligando165	-6.6	ligando182	-7.4	ligando197	-7.1
ligando115	-7.5	ligando133	-6.7	ligando149	-6.3	ligando166	-7.9	ligando183	-7.8	ligando198	-7.8
ligando116	-8.8	ligando135	-7.2	ligando150	-7.3	ligando167	-6.9	ligando184	-6.7	ligando199	-8.7
ligando117	-7.8	ligando136	-7.3	ligando151	-8.7	ligando168	-7	ligando185	-7		

TABLA N° 10 RESULTADOS DE DOCKING MOLECULAR RÍGIDO ENTRE LA ENZIMA COA-LIGASA Y LOS LIGANDOS

ligando1	-7.1	ligando16	-7	ligando30	-6.9	ligando43	-6.6	ligando56	-5.9	ligando69	-6.7	ligando84	-7
ligando2	-7.8	ligando17	-6.1	ligando31	-6.9	ligando44	-6.1	ligando57	-6.9	ligando70	-7.7	ligando85	-7.3
ligando3	-6.5	ligando18	-6.8	ligando32	-7	ligando45	-6.1	ligando58	-6.4	ligando71	-7	ligando86	-7
ligando5	-6.9	ligando19	-6.2	ligando33	-6.9	ligando46	-6.2	ligando59	-7.1	ligando72	-7	ligando87	-7.3
ligando7	-5.7	ligando20	-6.7	ligando34	-6.4	ligando47	-7.7	ligando60	-7.8	ligando73	-6.3	ligando88	-7.6
ligando8	-5.2	ligando21	-6.2	ligando35	-5.2	ligando48	-5.4	ligando61	-6.4	ligando74	-7.2	ligando89	-6.5
ligando9	-7	ligando22	-6.8	ligando36	-6.2	ligando49	-7.3	ligando62	-6.4	ligando75	-6	ligando90	-6.6
ligando10	-6.2	ligando23	-6.1	ligando37	-5.4	ligando50	-7.5	ligando63	-5.9	ligando76	-5.1	ligando91	-6.5
ligando11	-5.8	ligando25	-6.3	ligando38	-6.6	ligando51	-7.3	ligando64	-6.8	ligando77	-6.5	ligando92	-6.8
ligando12	-7.2	ligando26	-5.6	ligando39	-6.1	ligando52	-6.6	ligando65	-7.1	ligando79	-6.7	ligando96	-6.8
ligando13	-7	ligando27	-5.9	ligando40	-6.6	ligando53	-5.9	ligando66	-5.9	ligando80	-7.4	ligando97	-8
ligando14	-6.9	ligando28	-6.2	ligando41	-6.2	ligando54	-5.7	ligando67	-6.3	ligando82	-5.2	ligando98	-6.9
ligando15	-7.1	ligando29	-5.8	ligando42	-5	ligando55	-6.6	ligando68	-5.9	ligando83	-5.6	ligando99	-6.6

ligando102	-6.9	ligando118	-7	ligando137	-6.3	ligando152	-6.2	ligando169	-5.5	ligando186	-7.7
ligando103	-4.1	ligando119	-6.7	ligando138	-7	ligando153	-6.6	ligando170	-5.9	ligando187	-7.4
ligando104	-5.6	ligando120	-7.5	ligando139	-6.2	ligando154	-7.4	ligando171	-6.9	ligando188	-7.6
ligando105	-6.2	ligando121	-6	ligando140	-5.3	ligando155	-6.2	ligando172	-7.1	ligando189	-6.6
ligando106	-6.5	ligando124	-5.1	ligando141	-5.4	ligando156	-6.5	ligando173	-7.8	ligando190	-5.9
ligando107	-6.8	ligando125	-8.2	ligando142	-4.2	ligando157	-6.5	ligando174	-6.5	ligando191	-5.9
ligando108	-6.4	ligando126	-6.7	ligando143	-7	ligando158	-6.8	ligando176	-5.6	ligando192	-6.2
ligando109	-6.2	ligando127	-6.5	ligando144	-6.7	ligando159	-6.3	ligando177	-7.1	ligando193	-7.2
ligando110	-6.3	ligando128	-7.2	ligando145	-7.2	ligando161	-5.8	ligando178	-8.1	ligando194	-7
ligando111	-9.6	ligando129	-6.5	ligando146	-6.2	ligando163	-6.1	ligando179	-6.4	ligando195	-6.3
ligando113	-5.2	ligando130	-7.1	ligando147	-6.5	ligando164	-6.2	ligando181	-7.8	ligando196	-6.7
ligando114	-5.1	ligando131	-7.9	ligando148	-6	ligando165	-5.2	ligando182	-4.9	ligando197	-7.2
ligando115	-8.1	ligando133	-6.6	ligando149	-5.4	ligando166	-6.9	ligando183	-6.2	ligando198	-6.4
ligando116	-7.1	ligando135	-6.7	ligando150	-7.7	ligando167	-6.5	ligando184	-5	ligando199	-6.7
ligando117	-6.3	ligando136	-7.2	ligando151	-6.8	ligando168	-6.8	ligando185	-6.4	-	-

TABLA N° 11 RESULTADOS DE DOCKING MOLECULAR RÍGIDO ENTRE LA ENZIMA APYRASE Y LOS LIGANDOS

ligando1	-6.7	ligando16	-7.5	ligando30	-6.8	ligando43	-5.9	ligando56	-6.1	ligando69	-7	ligando84	-6.9
ligando2	-6.6	ligando17	-6.4	ligando31	-6.4	ligando44	-5.7	ligando57	-6.2	ligando70	-7	ligando85	-6.9
ligando3	-6.5	ligando18	-6.9	ligando32	-5.9	ligando45	-6.2	ligando58	-5.9	ligando71	-6.9	ligando86	-6.9
ligando5	-6.3	ligando19	-6.1	ligando33	-6.2	ligando46	-6.1	ligando59	-7.1	ligando72	-6.6	ligando87	-6.8
ligando7	-5.5	ligando20	-6.7	ligando34	-6.1	ligando47	-7.5	ligando60	-6.1	ligando73	-5.8	ligando88	-7.5
ligando8	-6	ligando21	-5.8	ligando35	-5.2	ligando48	-6.2	ligando61	-6.3	ligando74	-7	ligando89	-5.8
ligando9	-6.6	ligando22	-6.4	ligando36	-6.2	ligando49	-6.6	ligando62	-6.5	ligando75	-5.8	ligando90	-6.1
ligando10	-5.8	ligando23	-6	ligando37	-5.3	ligando50	-7.3	ligando63	-6.5	ligando76	-5.1	ligando91	-6
ligando11	-5.6	ligando25	-6.4	ligando38	-6	ligando51	-6.9	ligando64	-6.9	ligando77	-6.8	ligando92	-6.5
ligando12	-7.1	ligando26	-5.6	ligando39	-6.2	ligando52	-6	ligando65	-7.4	ligando79	-6.9	ligando96	-6.3
ligando13	-6.6	ligando27	-5.8	ligando40	-6.6	ligando53	-5.9	ligando66	-5.6	ligando80	-6.9	ligando97	-7.7
ligando14	-6.9	ligando28	-6.5	ligando41	-6.8	ligando54	-5.2	ligando67	-6.4	ligando82	-5.6	ligando98	-6.8
ligando15	-6.4	ligando29	-5.8	ligando42	-5.7	ligando55	-6.7	ligando68	-6.4	ligando83	-5.6	ligando99	-6

ligando102	-6.1	ligando118	-6.2	ligando137	-7.2	ligando152	-5.6	ligando169	-6.1	ligando186	-7.8
ligando103	-3.7	ligando119	-6.7	ligando138	-6.9	ligando153	-6.9	ligando170	-5.6	ligando187	-7.6
ligando104	-5.1	ligando120	-7	ligando139	-6.2	ligando154	-7.5	ligando171	-6.6	ligando188	-6.8
ligando105	-5.9	ligando121	-6	ligando140	-6.1	ligando155	-6.2	ligando172	-6.9	ligando189	-6.1
ligando106	-6.3	ligando124	-5.1	ligando141	-6.2	ligando156	-5.9	ligando173	-7.4	ligando190	-5.7
ligando107	-6	ligando125	-6.6	ligando142	-4	ligando157	-5.7	ligando174	-6.5	ligando191	-5.8
ligando108	-6.2	ligando126	-6.9	ligando143	-6.2	ligando158	-7.4	ligando176	-5.5	ligando192	-6.2
ligando109	-6	ligando127	-6.6	ligando144	-6.5	ligando159	-5.9	ligando177	-6.7	ligando193	-6.8
ligando110	-6	ligando128	-7.3	ligando145	-6.8	ligando161	-5.9	ligando178	-7.1	ligando194	-6.7
ligando111	-9	ligando129	-6.1	ligando146	-5.8	ligando163	-6.5	ligando179	-6.2	ligando195	-6.3
ligando113	-5.5	ligando130	-6.4	ligando147	-6.3	ligando164	-6	ligando181	-7.4	ligando196	-6.8
ligando114	-4.9	ligando131	-7.1	ligando148	-5.5	ligando165	-4.9	ligando182	-5.3	ligando197	-6.6
ligando115	-7	ligando133	-6.1	ligando149	-5.2	ligando166	-6.5	ligando183	-5.9	ligando198	-6.2
ligando116	-7.4	ligando135	-6.1	ligando150	-7.3	ligando167	-6	ligando184	-5.3	ligando199	-6.6
ligando117	-6.1	ligando136	-6.7	ligando151	-6.2	ligando168	-6.3	ligando185	-6.7		

TABLA N° 12 RESULTADOS DE DOCKING MOLECULAR RÍGIDO ENTRE LA ENZIMA HEXOKINASE Y LOS LIGANDOS

ligando1	-8	ligando16	-8.1	ligando30	-8.3	ligando43	-8	ligando56	-8	ligando69	-7.6	ligando84	-9
ligando2	-8.7	ligando17	-7.7	ligando31	-8.1	ligando44	-6.5	ligando57	-8.9	ligando70	-8.1	ligando85	-9.1
ligando3	-8.4	ligando18	-8.6	ligando32	-8.7	ligando45	-6.9	ligando58	-6.8	ligando71	-8.6	ligando86	-8.4
ligando5	-8.6	ligando19	-7.3	ligando33	-7.7	ligando46	-7.8	ligando59	-9.1	ligando72	-9	ligando87	-9.1
ligando7	-7.2	ligando20	-8.5	ligando34	-8	ligando47	-8.5	ligando60	-7.6	ligando73	-7.3	ligando88	-8.4
ligando8	-6.6	ligando21	-7.5	ligando35	-6.6	ligando48	-6.5	ligando61	-7.9	ligando74	-7.9	ligando89	-6.9
ligando9	-7.9	ligando22	-9.1	ligando36	-7.9	ligando49	-8.1	ligando62	-8.3	ligando75	-7.3	ligando90	-7.6
ligando10	-6.7	ligando23	-7.9	ligando37	-6.8	ligando50	-9	ligando63	-7.7	ligando76	-6.2	ligando91	-6.8
ligando11	-6.2	ligando25	-7.8	ligando38	-8.1	ligando51	-8.5	ligando64	-7.8	ligando77	-7.5	ligando92	-7.2
ligando12	-8.5	ligando26	-6.6	ligando39	-7.4	ligando52	-7.7	ligando65	-8.5	ligando79	-8.2	ligando96	-7.6
ligando13	-9.1	ligando27	-7	ligando40	-8	ligando53	-7.4	ligando66	-6.9	ligando80	-8.9	ligando97	-9.4
ligando14	-7.7	ligando28	-8	ligando41	-8.3	ligando54	-6.6	ligando67	-7.3	ligando82	-5.6	ligando98	-8.3
ligando15	-8.5	ligando29	-6.9	ligando42	-5.9	ligando55	-7.8	ligando68	-7.2	ligando83	-7	ligando99	-6.9

ligando102	-7.8	ligando118	-7.9	ligando137	-8.9	ligando152	-6.7	ligando169	-7.4	ligando186	-8.8
ligando103	-4.5	ligando119	-8	ligando138	-8.1	ligando153	-9	ligando170	-7	ligando187	-8.8
ligando104	-6.4	ligando120	-8.6	ligando139	-7.4	ligando154	-8.5	ligando171	-8.4	ligando188	-8.7
ligando105	-7	ligando121	-6.8	ligando140	-5.4	ligando155	-7.1	ligando172	-8.8	ligando189	-7.1
ligando106	-7.3	ligando124	-5.4	ligando141	-6.4	ligando156	-7.8	ligando173	-8.3	ligando190	-8
ligando107	-7.5	ligando125	-8.3	ligando142	-4.6	ligando157	-7	ligando174	-7.4	ligando191	-6.5
ligando108	-7.4	ligando126	-8.6	ligando143	-8.3	ligando158	-8.4	ligando176	-7	ligando192	-8.2
ligando109	-7.3	ligando127	-8.1	ligando144	-7.9	ligando159	-6	ligando177	-8.2	ligando193	-8.2
ligando110	-7.3	ligando128	-8.7	ligando145	-7.4	ligando161	-7.3	ligando178	-9.4	ligando194	-7.8
ligando111	-11	ligando129	-8	ligando146	-7	ligando163	-8.4	ligando179	-7.2	ligando195	-7.2
ligando113	-6.1	ligando130	-8.1	ligando147	-8	ligando164	-8	ligando181	-8.6	ligando196	-8.6
ligando114	-5.4	ligando131	-8.8	ligando148	-6.6	ligando165	-5.8	ligando182	-7.1	ligando197	-8.1
ligando115	-8.4	ligando133	-7.4	ligando149	-5.9	ligando166	-8.7	ligando183	-7.2	ligando198	-8.5
ligando116	-8.5	ligando135	-7.3	ligando150	-8.5	ligando167	-7.6	ligando184	-5.3	ligando199	-8.2
ligando117	-7.1	ligando136	-8.5	ligando151	-7.2	ligando168	-7.9	ligando185	-7.5		

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

1. En la tabla N°08 se observa los resultados del docking molecular rígido entre la enzima Astacyn y cada uno de los 180 ligandos, tal como muestra en la tabla, donde se observa valores muy variados de afinidad. Se observa que los ligandos: 70 MMV676554,97 MMV020120 y 111 MMV020537 muestran los valores de mayor afinidad con la enzima Astacyn, en especial el ligando 111 MMV020537 que muestra un valor de afinidad de -10 kcal/mol.
2. En la tabla N° 09 se muestra los resultados del docking molecular rígido realizado entre la enzima Chitinase y cada uno de los 180 ligandos. Como resultado se tiene que el ligando28 MMV676439, ligando92 MMV676604 y ligando111 MMV020537; presentan las mejores afinidades con la enzima Chitinase, sobre todo el ligando 111 con una afinidad de -10.5 kcal/mol.
3. En la tabla N° 10 indica el docking molecular rígido entre la enzima coA ligasa y cada uno de los 180 ligandos, donde se observan a los ligandos: ligando111 MMV020537 y ligando125 MMV002817 que presentan mayor afinidad, sobre todo el ligando 111 MMV020537 con una afinidad de -9.6 kcal/mol.
4. En la tabla N°11 El docking molecular rígido se realizó entre la enzima Apyrase y cada uno de los 180 ligandos, en los resultados no se muestra muchos ligandos con considerables valores de afinidad, excepto el ligando 111 MMV020537 que muestra una afinidad de -9 kcal/mol.
5. Por último, en la tabla N° 12 se realizó el docking molecular rígido entre la enzima Hexokinase y los 180 ligandos. En los resultados muestra cuatro ligandos de afinidad considerable (ligando 85 MMV688854, ligando 87 MMV020591, ligando 97 MMV020120 y ligando 111 MMV020537) especialmente el ligando 111 MMV020537 que tiene una afinidad de -11 kcal/mol .

TABLA N° 13 RESULTADOS DE LA SELECCIÓN DE LIGANDOS CON LA ENZIMA ASTACYN

Ligando	Afinidad (kcal/mol)	Ligando	Afinidad (kcal/mol)	Ligando	Afinidad (kcal/mol)
ligando70-1	-8.9	ligando97-1	-8.6	ligando111-1	-9.4
ligando70-2	-8.9	ligando97-2	-8.6	ligando111-2	-10.4
ligando70-3	-8.9	ligando97-3	-8.6	ligando111-3	-8
ligando70-4	-8.9	ligando97-4	-8.6	ligando111-4	-10
ligando70-5	-8.8	ligando97-5	-8.6	ligando111-5	-9.9
ligando70-6	-8.9	ligando97-6	-8.6	ligando111-6	-9.9
ligando70-7	-8.8	ligando97-7	-8.6	ligando111-7	-9.9
ligando70-8	-8.8	ligando97-8	-8.6	ligando111-8	-9.8
ligando70-9	-8.8	ligando97-9	-8.6	ligando111-9	-9.8
ligando70-10	-8.8	ligando97-10	-8.6	ligando111-10	-9.9

Fuente: Datos experimentales del estudio

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

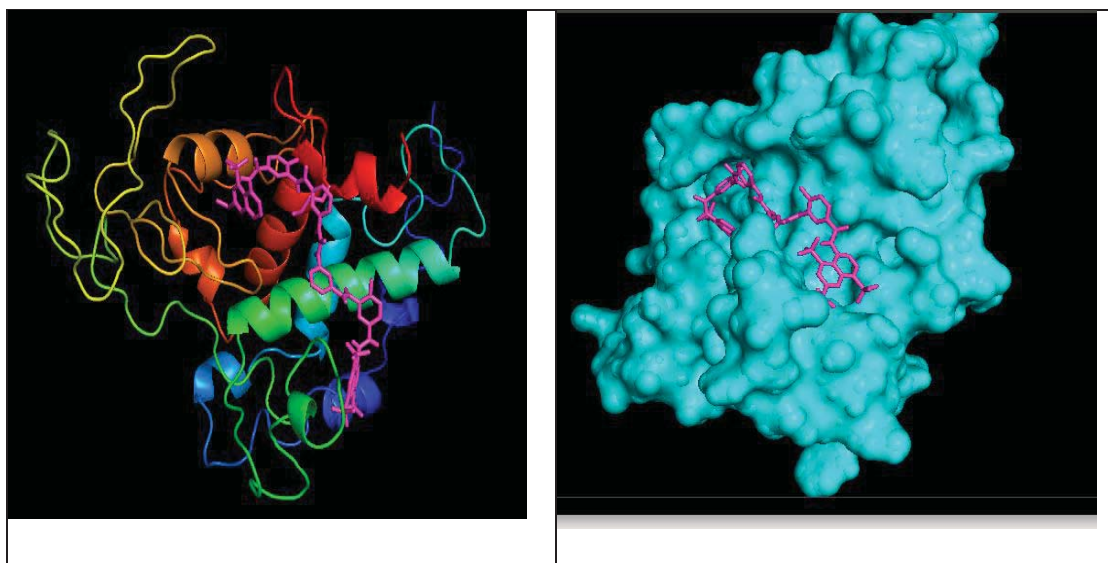
En la tabla N° 13 el docking molecular rígido realizado con la enzima Astacyn, se escogieron tres ligandos: ligando 70 MMV676554, ligando 97 MMV020120, ligando 111 MMV020537, por demostrar mayor afinidad a la proteína, se decidió realizar 10 veces más el docking molecular a los ligandos seleccionados por ser una búsqueda estocástica es decir da valores aleatorios que pueden variar con el tiempo. De los tres ligandos se observa que con el ligando 111-2 hay una mayor afinidad a la proteína Astacyn de -10.4 kcal/mol.

TABLA N° 14 RESULTADOS DE LA SELECCIÓN DE LIGANDOS CON LA ENZIMA CHITINASE

Ligando	Afinidad (kcal/mol)	Ligando	Afinidad (kcal/mol)	Ligando	Afinidad (kcal/mol)
ligando28-1	-9	ligando92-1	-9.5	ligando111-1	-10.3
ligando28-2	-9	ligando92-2	-9.5	ligando111-2	-11.5
ligando28-3	-9	ligando92-3	-8.4	ligando111-3	-10
ligando28-4	-9	ligando92-4	-8.4	ligando111-4	-10.4
ligando28-5	-9	ligando92-5	-8.5	ligando111-5	-10.9
ligando28-6	-9	ligando92-6	-9.5	ligando111-6	-10.5
ligando28-7	-9	ligando92-7	-9.5	ligando111-7	-10.5
ligando28-8	-9	ligando92-8	-9.5	ligando111-8	-10.4
ligando28-9	-9	ligando92-9	-6.3	ligando111-9	-10.4
ligando28-10	-9	ligando92-10	-9.5	ligando111-10	-10.4

Fuente: Datos experimentales del estudio

Fig N°06 Docking Molecular entre la enzima Chitinase y el ligando 111



Fuente: Datos experimentales del estudio obtenidos del software: Pymol v2.2.

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la tabla 14, el docking molecular rígido realizado entre la proteína Chitinase y los ligandos, se seleccionaron los de mayor afinidad que son: ligando28 MMV676439, ligando92 MMV676604, ligando111 MMV020537; a los que se les realizó 10 veces más el docking molecular, donde dio como resultado que el ligando 111-2 muestra -11.5 kcal/mol de afinidad con la molécula chitinase.

TABLA N° 15 RESULTADOS DE LA SELECCIÓN DE LIGANDOS CON LA ENZIMA COA LIGASA

Ligando	Afinidad (kcal/mol)	Ligando	Afinidad (kcal/mol)
ligando111-1	-9.7	ligando125-1	-8.2
ligando111-2	-9.4	ligando125-2	-8.2
ligando111-3	-9.3	ligando125-3	-8.2
ligando111-4	-9.7	ligando125-4	-8.2
ligando111-5	-10	ligando125-5	-8.2
ligando111-6	-10.1	ligando125-6	-8.6
ligando111-7	-9.8	ligando125-7	-8.2
ligando111-8	-9.7	ligando125-8	-8.1
ligando111-9	-9.8	ligando125-9	-8.2
ligando111-10	-9.9	ligando125-10	-8.2

Fuente: Datos experimentales del estudio

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la tabla N° 15, el docking molecular rígido realizado entre la proteína coA ligasa y los ligandos, se escogieron los ligandos 111 MMV020537 y ligando 125 MMV002817, por presentar los mayores valores de afinidad al receptor, por lo cual a ambas moléculas se les realizó nuevamente docking 10 veces más. Obteniendo como resultado que el ligando 125 MMV002817-6 presenta una afinidad de -8.6 kcal/mol y que en el ligando 111 MMV020537-6 presenta mayor afinidad al receptor con -10.1 kcal/mol.

De ambos ligandos es el ligando MMV020537 quien presenta mejor afinidad a la enzima coA ligasa.

TABLA N° 16 RESULTADOS DE LA SELECCIÓN DE LIGANDOS CON LA ENZIMA APYRASE

Ligando	Afinidad(kcal/mol)
ligando111-1	-9.4
ligando111-2	-8.7
ligando111-3	-9.3
ligando111-4	-9.3
ligando111-5	-9
ligando111-6	-9.3
ligando111-7	-9.2
ligando111-8	-9.2
ligando111-9	-9.3
ligando111-10	-9.2

Fuente: Datos experimentales del estudio

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

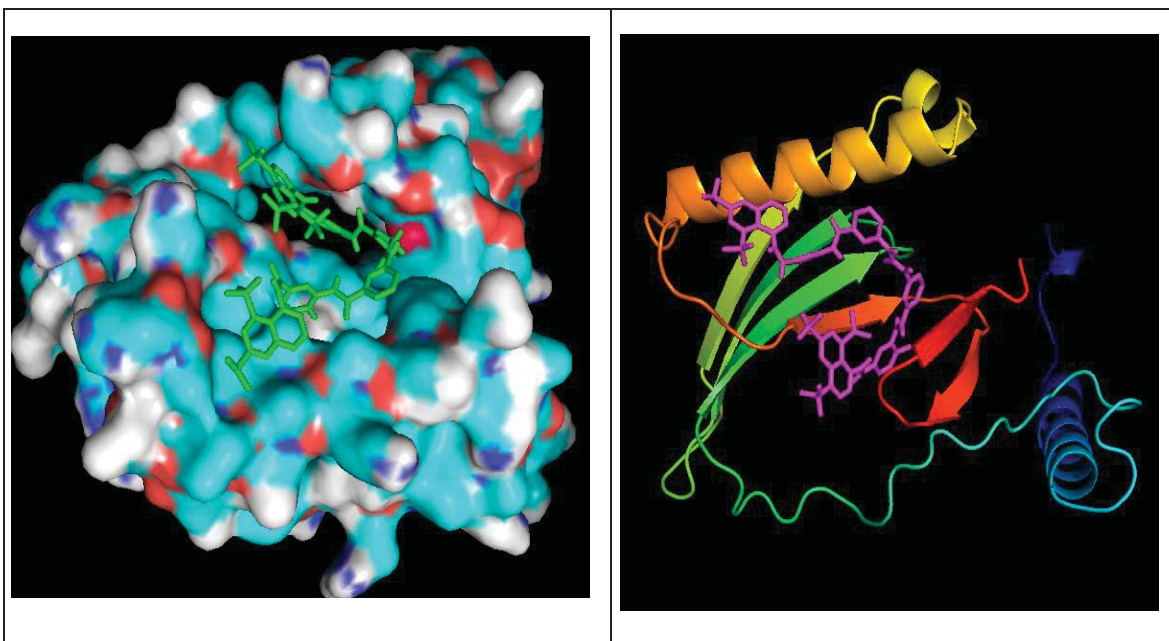
En la tabla N° 16 el docking molecular rígido que se realizó entre el receptor Apyrase y los ligandos, se seleccionó solo el ligando 111 MMV020537 por ser el que mayor afinidad presentó; por ello se le realizó 10 docking más para poder seleccionar el mejor acoplamiento a la proteína. Se observa como resultado que el ligando 111 MMV020537-1 muestra una afinidad de -9.4 kcal/mol con la proteína Apyrase, la mejor afinidad.

TABLA N° 17 RESULTADOS DE LA SELECCIÓN DE LIGANDOS CON LA ENZIMA HEXOKINASE

Ligando	Afinidad(kcal/mol)
ligando111-1	-11
ligando111-2	-10.8
ligando111-3	-10.1
ligando111-4	-11
ligando111-5	-9.5
ligando111-6	-9.4
ligando111-7	-9.6
ligando111-8	-9.5
ligando111-9	-9.5
ligando111-10	-9.6

Fuente: Datos experimentales del estudio

Fig N° 07 Docking Molecular entre la enzima Hexokinasa y el Ligando 111MMV020537



Fuente: Datos experimentales del estudio obtenidos del software Pymol

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la tabla N° 17, el docking molecular rígido realizado entre la proteína Hexokinase y los ligandos se seleccionó el ligando 111 MMV020537 con -11kcal/mol de afinidad al ligando, por ello se le realizó 10 veces más el docking molecular, donde dio como resultado que el ligando 111MMV020537-1 y 111 MMV020537-4 presentan el mayor valor de afinidad a la proteína con -11kcal/mol.

TABLA N° 18 RESULTADOS DE LOS RESIDUOS DE AMINOÁCIDOS IMPLICADOS EN EL SITIO ACTIVO PARA REALIZAR DOCKING MOLECULAR FLEXIBLE

ASTACYN	APYRASE	COLIGASA	CHITINASE	HEXOKINASE
GLY 75	GLY 102	LEU 109	ALA 77	MET 57
HIS 25	LYS 96	CYS 104	ALA 76	PHE 124
HIS 15	THR 97	VAL 101	MET 236	LEU 106
ILE 71	VAL 46	VAL 111		ILE 102
MET 72	ILE 95	PRO 112		ALA 107
TYR 74	ILE 98	LEU 113		

Fuente: Datos experimentales del estudio obtenidos del software AUTODOCK TOOLS

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la tabla N° 18, para realizar docking molecular flexible, a las enzimas seleccionadas se les sometió al software AUTODOCK TOOLS para primeramente encontrar los aminoácidos que se encuentran en el sitio activo y poder acondicionarlos para el docking flexible. Los aminoácidos que se muestran en la tabla para cada enzima están enumerados, que indican la ubicación que tienen.

TABLA N° 19 RESULTADOS DE DOCKING MOLECULAR FLEXIBLE DE LAS 5 ENZIMAS

ASTACYN		APYRASE		COLIGASA		CHITINASE		HEXOKINASE	
Ligando 111-1	-10.6	Ligando 111	-9.7	Ligando 111	-9.4	Ligando 111-1	-12.1	Ligando 111-1	-10.6
Ligando 111-2	-9.8	-	-	-	-	Ligando 111-2	-10.8	Ligando 111-2	-9.8
Ligando 111-3	-10	-	-	-	-	Ligando 111-3	-10.6	Ligando 111-3	-10.1
Ligando 111-4	-10.7	-	-	-	-	Ligando 111-4	-9.9	Ligando 111-4	-11.3
Ligando 111-5	-10.6	-	-	-	-	Ligando 111-5	-11.3	Ligando 111-5	-9.3

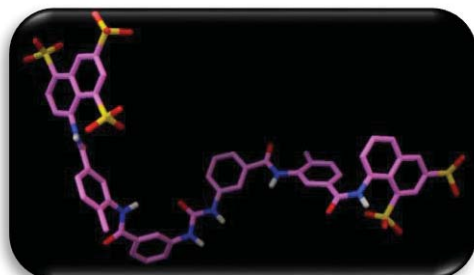
Fuente: Datos experimentales del estudio

ANALISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Finalmente se realizó el docking molecular flexible entre las cinco enzimas seleccionadas y el ligando 111 MMV020537 por ser la molécula que obtuvo mayor afinidad con las enzimas. Como se observa en la tabla N° 19, de las cinco enzimas son tres: Astacyn, Chitinase y Hexokinase quienes presentan mayor afinidad. Por lo que se les realizó cuatro docking mas, para poder encontrar el mejor acoplamiento, lo que se encontró es que el ligando 111 MMV020537 y la enzima chitinase con -12.1 kcal/mol presentó mayor afinidad que las otras enzimas.

El ligando 111 MMV020537 es un compuesto químico que tiene un peso molecular de 334.82, y presenta una estructura ramificada extendida en comparación a los demás compuestos es la de mayor tamaño.

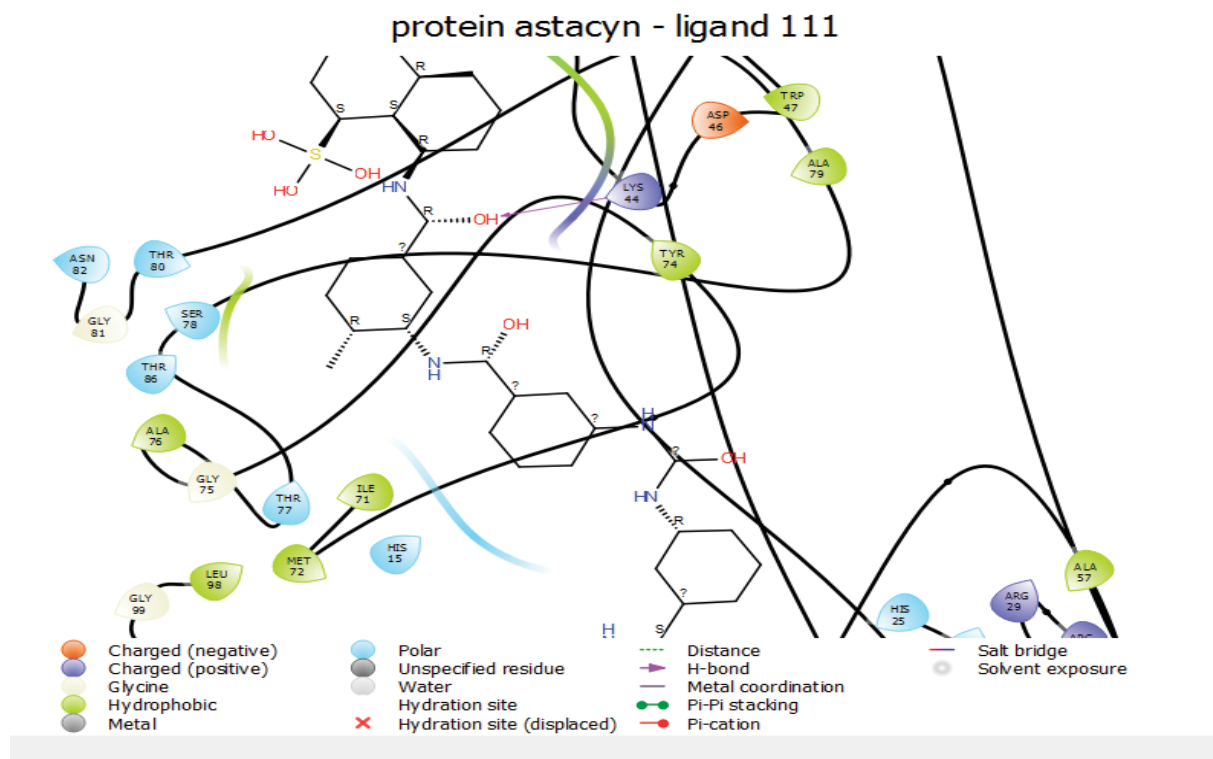
Fig N° 08 Ligando 111



Fuente: Schodinger K. Pymol v2.2. Cambridge [Online].; 2018 [cited 2018 Julio. Available from: <https://pymol.org/dokuwiki/?id=media:new22>.

Tal como se observa en Fig N° 08 por su estructura, puede que tenga mayor posibilidad de poder ajustarse al sitio activo al tener mayor facilidad de realizar una variedad de poses para poder acoplarse mejor a la proteína, tal como ocurrió en el docking molecular, siendo el ligando que mayor afinidad obtuvo con las cinco proteínas.

FIG N° 09 Interacción 2D de Astacyn y el Ligando 111 MMV20537



Fuente: Datos experimentales del estudio obtenidos del software Schrodinger.K. Maestro-Schrodinger. <https://www.schrodinger.com/maestro>.

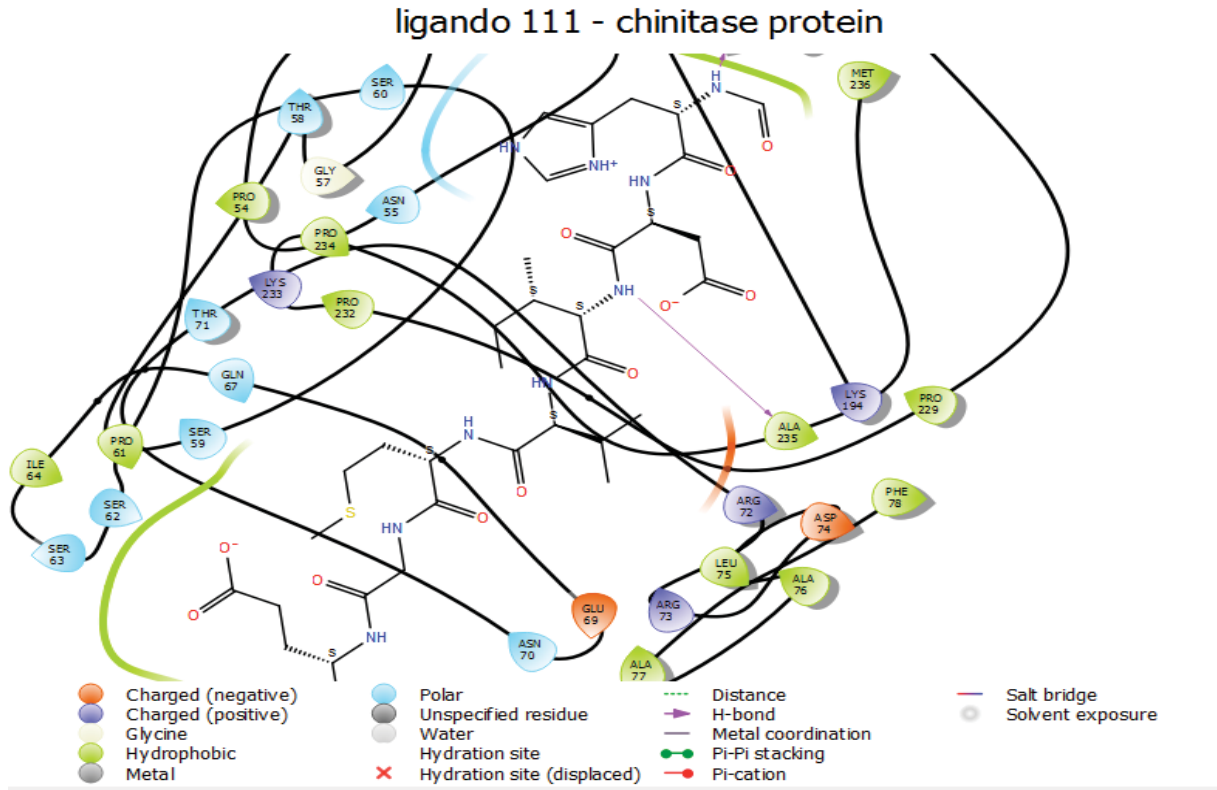
ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la Fig N° 09 se muestra la interacción de la enzima Astacyn y el mejor ligando, el compuesto 111 MMV020537, esta imagen proporcionada por el software Maestro-Schodinger (68) permite visualizar el tipo de relación que existe de proteína ligando.

En este caso se observa principalmente el sitio activo de la enzima Astacyn y el ligando 111 MMV020537, los aminoácidos implicados se muestran de distintos colores: los que son de color rojo son aminoácidos que tienen carga negativa, los de color azul son aminoácidos de carga positiva, los de color verde son aminoácidos hidrofóbicos, los de color celeste son aminoácidos polares; en especial los

aminoácidos que son parte del sitio activo Histidina 15 que es polar, Isoleucina 75 que es hidrofóbico, Metionina 72 hidrofóbico, Tirosina 74 hidrofóbico; como también se observa el puente hidrogeno entre el aminoácido lisina 44 y el grupo hidroxilo.

FIG N° 10 Interacción 2D de Chitinase y el Ligando 111 MMV020537



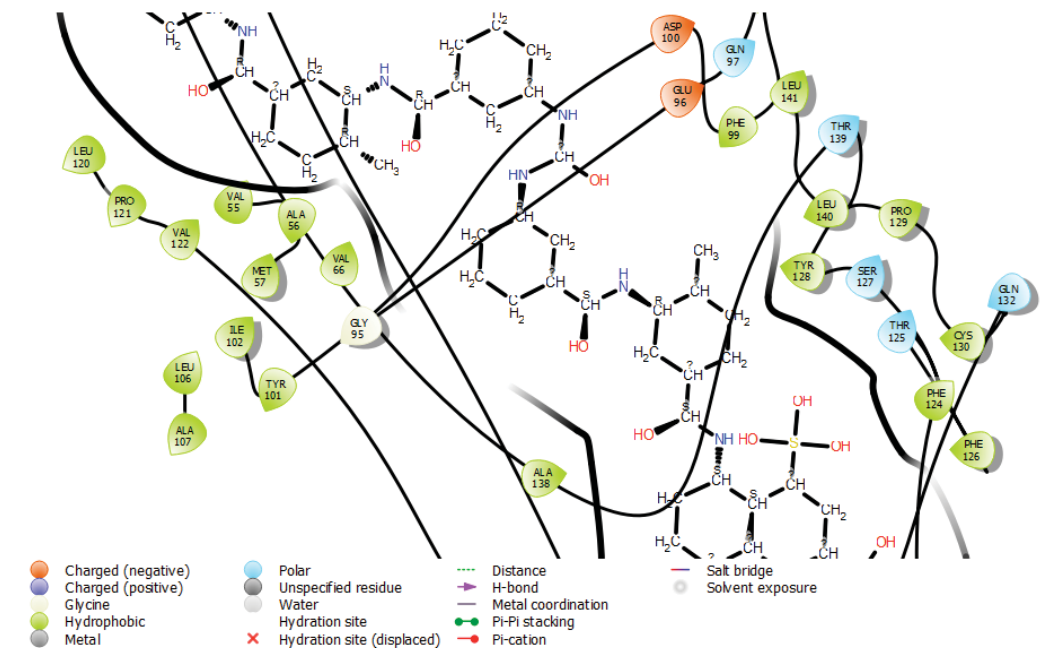
Fuente: Datos experimentales del estudio obtenidos del software Schrodinger.K. Maestro-Schrodinger. <https://www.schrodinger.com/maestro>.

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la Fig N° 10 se presenta la imagen 2D de la enzima Chitinase y el mejor ligando, el compuesto 111 MMV020537; como resultado del acoplamiento molecular realizado, con un score de 12.1 kcal/mol siendo la mejor pose entre los cinco acoplamientos que se realizó y el mejor score entre las cinco enzimas. Esta imagen muestra en especial los aminoácidos implicados en el sitio activo de la enzima, los tipos de aminoácidos que son y los enlaces que se formaron.

En el sitio activo se encuentran los aminoácidos; Alanina 76 y 77 se muestran de un color verde que indica que son hidrofóbicos, Metionina 236 también es un aminoácido hidrofóbico; se observa que se origina un enlace puente de hidrogeno entre el aminoácido Alanina 235 y un grupo NH, con respecto a los demás aminoácidos, los de color rojo son de carga negativa, los de color azul son de carga positiva, los de color celeste son polares.

FIG N° 11 Interacción 2D DE Hexokinasa y el Ligando 111 MMV020537



Fuente: Datos experimentales del estudio obtenidos del software Schrodinger.K. Maestro-Schrodinger. <https://www.schrodinger.com/maestro>.

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la Fig N° 11 se observa la interacción 2D de la enzima hexokinasa y el ligando 111MMV020537, su mejor score de acoplamiento molecular fue -11.3kal/mol una afinidad considerable entre proteína y ligando. En la imagen se muestra principalmente los aminoácidos del sitio activo; el aminoácido Fenilalanina 124 es de color verde e implica que es hidrofóbico, Leusina 106 hidrofóbico, Isoleusina 102 hidrofóbico, Alanina 107 hidrofóbico; en este pequeño fragmento no se observa algún enlace, con respecto a los demás aminoácidos cercanos los de color rojo son de carga negativa, los celestes son aminoácidos polares.

DISCUSION

Como se observa en los resultados de la realización de docking molecular flexible, el ligando MMV020537 quien presenta mayor afinidad a las enzimas chitinase con -12.1 kcal/mol, a la enzima hexokinasa con -11.3kcal/mol y a la enzima astacyn con -10.7kcal/mol; a comparación de los resultados del docking molecular rígido con el mismo ligando MMV020537 presenta afinidad con la enzima chitinase de: -11.5kcal/mol, la enzima hexokinasa de -11kcal/mol y la enzima astacyn de -10.4kcal/mol; la realización de docking molecular flexible mejora las poses del ligando al sitio de unión de las enzimas donde existe mayor afinidad entre ligando receptor.

Según el autor Stevens E. "Medicinal Chemistry: The modern Drug Discovery Process" menciona que la afinidad está relacionada con la energía de enlace, que está determinada a partir de la constante de equilibrio. El valor de esta constante permite además calcular la energía libre de Gibbs para la unión del complejo medicamento-sitio activo. (47)

Es decir que los resultados de afinidad proporcionados del docking molecular están relacionados con la energía libre de Gibbs, la fuerza de interacción entre ligando receptor está representada por la afinidad de enlace entre ambas moléculas y expresada en kcal/mol.

Según el autor Mark J et al "Bioquímica" menciona que solamente el sustrato correcto puede participar en la mayoría de las interacciones con la enzima y de esta manera incrementar la energía de unión, de esta manera cuando la enzima favorece la formación del estado de transición se libera la energía de unión máxima, la energía liberada por las interacciones entre enzima y el sustrato permite que la energía de activación disminuya. (68)

Es por ello que la energía libre de unión es negativa, las interacciones ligando receptor cuanto más negativas sean, mayor afinidad de enlace tendrán. La energía libre de Gibbs (ΔG) ya es calculada por el software AutodockVina y es presentada en forma de afinidad.

Los diferentes valores de afinidad que se obtuvieron entre enzimas y ligandos son diferentes posiciones espaciales en que el ligando va entrar e interaccionar con el sitio activo de la enzima

El ligando MMV020537 es el compuesto químico que mejor capacidad de enlace tiene hacia las enzimas seleccionadas, de los 200 compuestos de Pathogen Box, esto se observa en los valores de afinidad.

CONCLUSIONES

1. Se realizaron los análisis de los genomas de *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus* mediante las simulaciones computacionales, de los cuales se identificaron posibles blancos farmacológicos que demostraron ser capaces de interactuar con los compuestos de PathogenBox.
2. Se obtuvieron los genomas de *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus* a partir de la database NCBI, con un total de 24 863 proteínas en *Ancylostoma duodenale* y 19 153 en *Necator americanus* en los genomas. Como también se les realizó el filtrado, descartando a las proteínas hipotéticas, proteínas parciales y proteínas putativas; por lo que en el genoma de *Ancylostoma duodenale* quedo 5656 proteínas y en *Necator americanus* 5485 proteínas.
3. Se compararon las vías metabólicas del hospedero y los huéspedes *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus* donde se descartó las enzimas homólogas de *Homo sapiens*, que se encuentran en las 125 enzimas, finalmente solo quedaron enzimas compartidas entre *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus*. Luego se identificó las cinco enzimas únicas de los patógenos: apyrase, astacyn, hexokinasa, chitinase, coA ligasa como posibles blancos farmacológicos.
4. Las cinco enzimas seleccionadas se modelaron por homología de proteínas en formato PDB a partir de la secuencia de aminoácidos, realizado en el software PHYRE2. Este modelamiento permitió llevar a las enzimas a una estructura tridimensional dando espacio y oportunidad de desarrollar sus interacciones in silico.
5. Los modelos de enzimas se refinaron mediante 3DREFINE, y se validaron por el software RAMPAGE, donde se observaron la calidad de los modelos a través del diagrama de Ramachandran, que contribuye a la conformación de la estructura de las proteínas visualizando las posibles combinaciones de los ángulos de los aminoácidos de las enzimas. Se observó que la validación de todas las enzimas presenta altos porcentajes en zonas favorecidas, es decir muestran una calidad eficiente.

6. Se diseñaron las estructuras 3D de los 200 compuestos químicos que fueron filtrados inicialmente, mediante las reglas de Lipinsky, que descartan moléculas que no cumplen con los parámetros de la farmacocinética, a los compuestos químicos restantes se les acondicionó mediante minimización de energía para la realización del docking molecular.

7. Se realizaron el acoplamiento molecular rígido entre las cinco enzimas y cada uno de los ligandos, donde la enzima Astacyn obtuvo una afinidad de -10kcal/mol con el ligando 111; la enzima Chitinase obtuvo la afinidad de -10.5 kcal/mol con el ligando 111; la enzima coA ligasa obtuvo una afinidad de -9.6kcal/mol con el ligando 111; la enzima Apyrase obtuvo una afinidad de -9kcal/mol con el ligando 111; la enzima Hexokinasa obtuvo una alta afinidad de -11kcal/mol con el ligando 111; por lo que se observa que la enzima Hexokinasa tiene la mayor afinidad al ligando 111 y que el ligando 111 se unió mucho mejor a todas las enzimas estudiadas que los otros ligandos.

8. Se realizó el acoplamiento molecular flexible entre las cinco enzimas y los ligandos con mejor afinidad. Donde la enzima Astacyn presentó una afinidad de -10.7kcal/mol con el ligando 111, se ve que incremento la afinidad a la enzima; la enzima Chitinase obtuvo una afinidad de -12.1kcal/mol con el ligando 111 es la mayor afinidad que se dio en el docking flexible; la enzima coA ligasa obtuvo una afinidad de -9.4kcal/mol con el ligando 111; la enzima Apyrase obtuvo una afinidad de -9.7kcal/mol con el ligando 111; la enzima Hexokinasa obtuvo una afinidad de -11.3kcal/mol con el ligando 111 una considerable afinidad. Se concluye que la enzima Chitinase obtuvo mayor afinidad al ligando 111, el ligando 111 MV020537, es la molécula que más afinidad o mejor capacidad de enlace tuvo con todas las enzimas por lo que se considera como una posible potencial droga para el tratamiento de parasitosis frente al blanco farmacológico ideal chitinase.

RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS

Para las investigaciones posteriores in silico (métodos computacionales).

- **A la Universidad**
 - ✓ A las autoridades, poder brindar mayor apoyo económico y orientación para la investigación.
 - ✓ Implementar los laboratorios informáticos en las Escuelas Profesionales de mayor necesidad.

- **A los Docentes de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica**
 - ✓ Que promuevan a los estudiantes a la investigación por métodos computacionales
 - ✓ Organizar, realizar cursos de bioinformática, química computacional, mostrando la importancia de estos temas en la actualidad especialmente en el desarrollo de medicamentos.
 - ✓ Se sugiere reformular la malla curricular de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, para integrar cursos de simulación computacional.

- **A los estudiantes que desean continuar con la Investigación**
 - ✓ Realizar la Dinámica molecular a las moléculas ya seleccionadas a través del software más conveniente.
 - ✓ Realizar la búsqueda de blancos farmacológicos in silico a las proteínas aun no evaluadas de los anquilostomas
 - ✓ Desarrollar la expresión de proteínas seleccionadas por medio del vector más adecuado para comprobar la actividad antiparasitaria con el mejor ligando, in vitro.
 - ✓ Evaluar la actividad antiparasitaria en animales de experimentación.
 - ✓ Existe una gran cantidad de información científica, como la secuenciación de muchos organismos, que son de acceso libre, al igual existen muchas herramientas informáticas que simplifican el desarrollo de una investigación y que hoy en día son muy básicos y necesarios; por ello se sugiere realizar más estudios en este campo, ya que a nivel nacional hay escasos estudios.

BIBLIOGRAFIA

1. Marchat T, Director Healthcare Industry Marketing. In Vivo, In Vitro, In Silico. Revista ANSYS,INC. 2015; IX(1). Disponible en <https://www.ansys.com/-/media/Ansys/corporate/resourcelibrary/article/In-Vivo-In-Vitro-In-Silico-AA-V9-I1.pdf>.
2. Franco.J et al. Aplicaciones exitosas del Diseño de Fármaco utilizando métodos computacionales. Revista Ciencia. 2007 Marzo; 58(1). Disponible en https://www.amc.edu.mx/revistaciencia/images/revista/58_1/PDF/aplicaciones_exitosas.pdf
3. Agudelo.A. Diseño de Farmacos Basado en la Estructura. Trabajo de fin de Grado. Universidad Complutense, Facultad de Farmacia; 2013.p 19. Disponible en <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/GUILLERMO%20ALBALADEJO%20AGUDELO.pdf>
4. Saboyá M, Catalá L,Ault S, Nicholls R. Intensidad de la infección de Helminthos transmitidos por el Suelo en países de América Latina y el Caribe. Publicación. Washinton DC: Pan American Health Organization, Neglected and Parasitic Diseases Group; 2011. Disponible en <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002419>
5. Saldivar. F et al. Descubrimiento y Desarrollo de Fármacos: un Enfoque Computacional. Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de Farmacia. Rev Educación Química. 2016 Septiembre. Vol(28). P 51-58. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/eq/v28n1/0187-893X-eq-28-01-00009.pdf>
6. Oficina Panamericana de Salud OPS/ Organización Mundial de la Salud OMS. Información General: Geohelminthiasis. [Online].; 2014 [cited 2018 Noviembre 10. Available from: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5747:2011-informacion-general-geohelminthiasis&Itemid=4138&lang=es
7. Briones C, et al. Differences in Prevalence of Geohelminth Infections between Indigenous and Settler populations in a remote Amazonian region of Perú. Revista de Tropical Medicine and International Health. 2013 Mayo;

vol 18 N°(5). Disponible en <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/tmi.12077>

8. Lacleste .J, et al. La era Posgenómica en el Estudio de Helminetos. Revista de Ciencia. 2017 Marzo; vol 68 N°(1). Disponible en https://www.amc.edu.mx/revistaciencia/images/revista/68_1/PDF/helminetos.pdf
9. Searls.B.. Using Bioinformatics in gene and drug discovery. Rev SmithKline Beecham Pharmaceuticals. 2000 Abril; 5. Disponible en https://pdfs.semanticscholar.org/2bcc/e180aff078e53f442d986c2d4b96ada_d293a.pdf
10. Brown H, et al. Hookworm. Basic Clinical Parasitology. 5th ed. Norwalk C, editor. Unites States of America: Appleton-Century-Crofts; 1983; p 122-3. Disponible en <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v34n5/0716-1018-rci-34-05-0499.pdf>
11. Meneses.C et al. Tecnologías bioinformáticas para el análisis de secuencias de ADN. Revista Scientia et technica Año XVI. 2011 Diciembre; vol 3 N°(49). Disponible en <https://Dialnet-TecnologiasBioinformaticasParaElAnalisisDeSecuenci-4321929.pdf>
12. Lopez A. Modelos in silico para la prediccion de la absorcion de fármacos administrados por via oral (SYMCPY): estatinas. Departamento de Ciencias Fármaceuticas. Universidad de Salamanca Rev FarmaJournal. 2017; 2(2): p. 69-79. Disponible en [https://16015-58496-1-PB%20\(1\).pdf](https://16015-58496-1-PB%20(1).pdf).
13. Pelkonen. O et al . In Vivo-In Vitro-In Silico Pharmacokinetic Modelling in Drug Development. Department of Pharmacology and Toxicology, Institute of Biomedicine, University of Oulu. Rev Clin Pharmacokinet. 2011; 50(8). p. 483-491. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21740072>
14. Resendis O. Experimentos in silico. Departamento de Genómica Computacional del Instituto Nacional de Medicina Genómica. CONACYT agencia informativa. 2015. Disponible en <http://conacytprensa.mx/index.php/vocabulario/14538-experimentos-in-silico> .
15. Wodak S, et al. Computer analysis of protein-protein Interaction. Journal of Molecular Biology,Unidad de Bíoquímica celular.Francia.1978. p323-342 Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/712840>

16. Quintana J. Evolución in silico de Interacciones proteína ligando: Profilina/poli-L-prolina como modelo de estudio. Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis para optar el grado de Maestro en Ciencias Bioquímicas. Noviembre 2010. Disponible en <http://biocomputo.ibt.unam.mx/grupo/tesis/maestria.pdf>.
17. Hu.M, et al. The mitochondrial genomes of the human hookworms, *Ancylostoma duodenale* and *Necator americanus*. *Revista de International Journal for Parasitology-PubMed*. 2002 Febrero; 32(2). Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11812491>
18. Sarkar.M et al. In silico quest for putative drug targets in *Helicobacter pylori* HPAG1: molecular modeling of candidate enzymes from lipopolysaccharide biosynthesis pathway. Springer-Verlag. 2011 August. pag 1855-1866. Disponible en <https://www./publication/51579807> In silico quest for putative drug targets in *Helicobacter pylori* HPAG1 Molecular modeling of candidate enzymes from lipopolysaccharide biosynthesis pathway.
19. Porollo A. EC2KEGG: A comand line tool for comparison of metabolic pathways. *Revista Source Code for Biology and Medicine*. 2014; 9(19). Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25202338>
20. Rodriguez.C et al. Estrategias in silico para el diseño y seleccion de compuestos con potencial aplicacion en la enfermedad del Alzheimer. *Rev Informática y LIMS*. 2014 Diciembre; 7(10). Disponible en <http://www.xrqtc.com/wp-content/uploads/2014/07/alzheimer.pdf>
21. Subhashree.R et al. An in silico strategy for identification of novel drug targets against *Plasmodium falciparum*. *Revista de Springer-PubMed*. 2017 July; 116(9). Disponible en <https://www.researchgate.net/publication/318745809> An in silico strategy for identification of novel drug targets against *Plasmodium falciparum*
22. Sanchaita R. et al. Design *Plasmodium falciparum* PI(4)KIIIB inhibitor using Molecular Dynamics and Molecular Docking Methods. *Rev Chemistry Select*. 2017. India. (2) p 1783-1792. Disponible en <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/slct.201601052>

23. Calero SC. Análisis bioinformático de las secuencias de Aminoácidos de diversas fosfolipasas D. Informe de Encuentro Científico Internacional -Perú. Lima: Universidad Nacional Mayor San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2004. Disponible en https://guzlop-editoras.com/web_des/bio01/bioquimica/pld0280.pdf
24. Medina J, et al. Avances en el diseño de Fármacos asistido por Computadora. Rev ScienceDirect. 2015. 26(3) p 180-186. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0187893X15000294>
25. Gorostiola M, et al. Predicción "In Silico" De la Absorción de Fármacos en pacientes Celiacos. Departamento de Ciencias Farmacéuticas. Campus Miguel de Unamuno. Universidad de Salamanca. 2018. 3(1) p 87-97. Disponible en <https://search.proquest.com/openview/3738c8745d966f099a3572b3aad1bd43/1?pq-origsite=gscholar&cbl=2044559>
26. Rodriguez E. Parasitología Médica. Primera ed. LCC Uriza Gómez T, editor. México: Editorial El Manual Moderno S.A de C.V.; 2013. p. 386 . Disponible en <http://www.libun.edu.pe/carrito/principal.php/articulo/00102477>
27. Cruz A. Generalidades sobre Nematodos. In Tay J, editor. Microbiología y Parasitología Médica. México: Méndez Editores; 2003. p. 576-579. Disponible en http://metabase.uaem.mx/bitstream/handle/123456789/1473/280_11.pdf?sequence=1&isAllowed=y
28. Bravo T. Uncinariasis: ciclo vital, cuadros clinicos, patofisiologia y modelos animales. Rev Mex Patología Clínica. 2007 Diciembre; vol 54 Núm(4). pp 187-199. Disponible en <https://docplayer.es/21964176-Uncinariasis-ciclo-vital-cuadros-clinicos-patofisiologia-y-modelos-animales.html>
29. Escobedo.A. et al. Ancylostoma y Necator Cap 97. In Sanchez T, editor. Microbiología y Parasitología Médicas Tomo III. La Habana: Editorial de Ciencias Médicas; 2015. p. 219-226. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/287492122_Ancylostoma_y_Necator
30. Uribarren T. Necatoriasis. Documento de Sitio Web. México: Universidad Nacional Autónoma, Departamento de Microbiología y Parasitología Facultad de Medicina; 2016 Octubre. Disponible en <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/directorio/directorio.html>
31. Rang H et al. Farmacología. Quinta ed. Iglesias V, editor. Londres: Elsevier Science; 2003.pag 687-691

32. Modelo OMS de Información sobre Prescripción de Medicamentos; Medicamentos utilizados en las Enfermedades Parasitarias. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 1991. Report No.: ISBN 9. Informe del Comité de Expertos de la OMS. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Jh2924s/3.2.1.html>
33. Lewin. A et al. Earth BioGenome Project: Sequencing life for the future of Life. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS). 2018 Marzo; 115(17). Disponible en <https://www.pnas.org/content/115/17/4325>
34. Rodriguez. J. Secuenciación de Genomas. Rev Arbor. 2004 Febrero; CLXXVII(698) .pp 285-310. Disponible en <http://arbor.revistas.csic.es/index.php/arbor/article/viewFile/609/611>
35. Brown T. Genomas. Tercera ed. Lopez. G, editor. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2008. Disponible en <https://books.google.com.pe/books?id=4tYIcMOdsBwC&pg=PA4&lpg=PA4&dq>.
36. Lehninger. A . Principios de Bíoquímica. Cuarta ed. Barcelona: Editorial Omega; 2006. p. 194. Disponible en <https://www.berri.es/pdf/LEHNINGER%20PRINCIPIOS%20DE%20BIOQUIMICA/9788428216036>
37. Lubec G.et al. Searching for Hypothetical proteins: Theory and practice based upon original data and Literature. Department of Pediatrics Rev EISEvier 2005 Austria 77(1-2) p 90-127. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16271823>
38. Yan. L. et al. Assessment of putative protein target derived from SARS genome. Rev Accelrys.. 2003 San Diego USA 554(3) p 257-263. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579303011153>
39. Cremosi. P. El uso de Enzimas. II ed. Padova , editor. Italia: Prato; 2002. p. 15
40. Peña A, et al. Bioquímica. Segunda ed. Editores GN, editor: Limusa; México 2004.
41. Nantasenamat C et al. Advances in Computational methods to Predict the Biological activity of Compounds. Expert Opin. Rev Drug Discov. 2010; 5. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22823204>

42. Dr Gomez. et al . Bioinformatica aplicaciones a la genómica y proteómica. Primera ed. Perez P, editor. Mexico: Colegio de Postgraduados; 2010. Disponible en [https://www.researchgate.net/publication/253408324 Bioinformatica Aplicaciones en Genomica y Proteomica](https://www.researchgate.net/publication/253408324_Bioinformatica_Aplicaciones_en_Genomica_y_Proteomica)
43. Xuhua X. Bioinformatics and drug Discovery. Rev Current Topics in Medicinal Chemistry. 2017; 17(15). Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5421137/>
44. Nueno.V . Herramientas de Cribado virtual aplicadas a Inhibidores de Entrada del VIH. Diseño de nuevos Compuestos anti-VIH. Tesis Doctoral. Barcelona: Universidad Ramon Llull, Departamento de Quimica Organica; 2012
45. Olarte W. Diseño Racional de nuevos Dicetoácidos purínicos y sus derivados Bioisostéricos con potencial actividad Inhibidora de la enzima integrasa del VIH. Tesis de Maestria para optar al título de Magister en Ciencias Químicas. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Química; 2014. [Trujillo A. La quimioinformatica, una herramienta eficiente para desarrollar los medicamentos del futuro. Teoría y Praxis Investigativa (6), 77-86]
46. Velasquez.M et al . Metodo acoplado Autodock-PM6 para Seleccionar la mejor Pose en Estudios de Acoplamiento Molecular. Revista Colombiana de Química. 2013; 42(1).p 51-58. Disponible en <http://www.scielo.org.co/pdf/rcq/v42n1/v42n1a07.pdf>
47. Stevens E. Medicinal Chemistry: The Modern Drug Discovery Process. Primera edición. Pearson. USA. 2012. 106, 254 pp. Disponible en <http://www.gbv.de/dms/bs/toc/741347660.pdf>
48. Willis P. The Pathogen Box- Catalysing neglected disease drug discovery. [Online].; 2018 [cited 2018 Noviembre 19. Available from: <https://www.pathogenbox.org/team/pathogen-box-team>
49. Ramirez E. Introducción al software libre, uso básico de sistema operativo y programas de ofimática: Manual Básico de Ubuntu. Documento elaborado en el marco del Proyecto Fortalecimiento en el uso de Software libre. Universidad Nacional de Costa Rica, Ministerio de Economía Industria y Comercio; 2010. P 83
50. Camps P et al. Software Libre. Primera edición de Publicacion para la Obtención de Máster Internacional en Software Libre. Barcelona: Universitat Oberta de Catalunya, Free Software Foundation; 2005. p 460.
51. Cañedo.A. Centro Nacional para la Información Biotecnológica de los Estados Unidos: Un palacio de la Información para la medicina molecular. La

- Habana-Cuba: Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas, Departamento de Fuentes y Servicios de Información; Rev Acimed 2009. 19(4) Report No.: ISSN.
52. B.Hutchinson. Open Babel, version 2.3.2. [Online].; 2012 [cited 2018 Agosto 10. Available from: <http://openbabel.org>.
53. Forli S, et al. Computational protein-ligand docking and virtual Drug Screening with the AutoDock suite. Rev Nature Protocols. 2016 April; 11(5). Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27077332>
54. Schodinger K. Pymol v2.2. Cambridge [Online].; 2018 [cited 2018 Julio. Available from: <https://pymol.org/dokuwiki/?id=media:new22>.
55. Michielin O et al. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. Rev Scientific Reports-PubMed. 2017 Marzo; 3(7). disponible en : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28256516>.
56. Wang S et al . DEEpre: Sequence-based enzyme EC number prediction by deep learning. King Abdullah University of Science and Technology. Computational Bioscience Research Center. Rev PubMed. [Online].; 2018 [cited 2018 Junio 11. Available from: <http://www.cbrc.kaust.edu.sa/DEEPre/>
57. Kelley L. et al Phyre 2 Web portal for protein modeling, prediction and analysis. Rev PubMed [Online].; 2011 10(6) [cited 2018 Junio. Available from: <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>.
58. Cheng J et al. 3Drefine: Consistent protein structures refinement by optimizing hydrogen bonding network and atomic-level energy minimization. Rev Wiley Online Library. 2012. Agosto; 81(1) [3D REFINE: Protein Structure Refinement Server. [Online]. [cited 2018 Setiembre 11. Available from: [http://sysbio.rnet.missouri.edu/3Drefine/.](http://sysbio.rnet.missouri.edu/3Drefine/)]
59. GB, European Bioinformatics Institute Cambridge. InterProScan. [Online].; 2018 [cited 2018 Junio 12. Available from: <https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>.
60. National Library of Medicine-NCBI . BLAST-Basic Local Alignment Search Tool.U.S.A [Online]. [cited 2018 Octubre. Available from: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>.
61. Lipman D. NCBI-Centro Nacional para la Información Biotecnológica. [Online].; Maryland 1988 [cited 2018 Junio 11. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

62. Crystallography and Bioinformatics Group. RAMPAGE-Ramachandran Plot Analysis. University of Cambridge. [Online].2017 [cited 2018 Setiembre 11. Available from: <http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>.
63. Jayaram B. Active Site Prediction. Supercomputing Facility for Bioinformatics & Computational Biology, Delhi [Online].; 2009 [cited 2018 Julio 8. Available from: <http://www.scfbio-iitd.res.in/dock/ActiveSite.jsp>.
64. Meng X, et al. Molecular Docking: A powerful approach for Structure-based drug Discovery. Rev National Institute of Health. 2011 Junio; 7(2). Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21534921>
65. Quevillon E. et al . InterProScan: protein domains Identifier. Rev Nucleic Acid Research. 2005 Febrero; 33. Dsiponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15980438>
66. Diaz A. et al. Modelación por Homología de la proteína Luxs de Porphyromonas gingivalis cepa W83. Rev Elsevier. 2012. Colombia. 5(3): p 105-113. Disponible en https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0719-01072012000300001
67. Schrodinger.K. Maestro-Schrodinger. [Online].; 2018-4 [cited 2018 Octubre 8. Available from: <https://www.schrodinger.com/maestro>.
68. Mark J. et al. Bioquímica. Sexta edición. Editorial Reverte. Barcelona-España. 2008. ISBN:978-84-291-7600-1. 215-216 pp.

ANEXOS

ANEXO N°1 OBTENCIÓN DE PROTEOMAS DE *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus* y *Homo sapiens* DE LA DATA BASE NCBI

The screenshot shows the NCBI genome page for *Ancylostoma duodenale*. The search bar contains "ancylostoma duodenale[orgn]". The page displays the following information:


- Organism Overview:** *Ancylostoma duodenale* (ID: 348). Description: human hookworm infects intestine of a host causing diarrhea and anemia.
- Lineage:** Eukaryota[3237]; Metazoa[1062]; Ecdysozoa[465]; Nematoda[88]; Chromadorea[74]; Rhabditida[67]; Rhabditina[26]; Rhabditomorpha[20]; Strongyloidea[6]; Ancylostomatidae[4]; Ancylostomatinae[3]; Ancylostoma[3]; Ancylostoma duodenale[1].
- Summary:** Submitter: The Genome Institute; Assembly level: Scaffold; Assembly: GCA_000816745.1_A_duodenale_2.2.ec.cg.pg scaffolds: 69,981 contigs: 100,268 N50: 4,967 L50: 16,689; BioProjects: PRJNA72581; Whole Genome Shotgun (WGS): INSDC: JHFM00000000.1.
- Tools:** BLAST Genome.
- Related information:** Assembly, BioProject, Gene, Components, Protein, PubMed, Taxonomy.
- Search details:** "Ancylostoma duodenale"[Organism].

The screenshot shows the NCBI genome page for *Necator americanus*. The search bar contains "necator americanus[orgn]". The page displays the following information:

- Organism Overview:** *Necator americanus* (ID: 770). Description: Necator americanus causes Hookworm disease in humans.
- Lineage:** Eukaryota[3237]; Metazoa[1062]; Ecdysozoa[465]; Nematoda[88]; Chromadorea[74]; Rhabditida[67]; Rhabditina[26]; Rhabditomorpha[20]; Strongyloidea[6]; Ancylostomatidae[4]; Bunostominae[1]; Necator[1]; Necator americanus[1].
- Summary:** Submitter: The Genome Institute at Washington University; Assembly level: Scaffold; Assembly: GCA_000507365.1_N_americanus_v1 scaffolds: 11,864 contigs: 65,213 N50: 5,429 L50: 9,842; BioProjects: PRJNA279932, PRJNA72135; Whole Genome Shotgun (WGS): INSDC: ANCG00000000.1; Statistics: total length (Mb): 244.075, protein count: 19153, GC%: 41.3.
- Tools:** BLAST Genome.
- Related information:** Assembly, BioProject, Gene, Components, Protein, PubMed, Taxonomy.
- Search details:** "Necator americanus"[Organism].

En el Anexo N°01 se observa la base de datos del NCBI, de donde se obtuvo los genomas de ambos parásitos *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus*

ANEXO N°2. IDENTIFICACIÓN DE ENZIMAS A TRAVÉS DEL SOFTWARE DEEPre



جامعة الملك عبدالعزيز
العلوم والتقنية
King Abdullah University of
Science and Technology

COMPUTATIONAL
BIOSCIENCE RESEARCH
CENTER

DEEPre
Sequence-based enzyme function predictor

Query
Downloads
Information
About

[Input Sequence Requirements](#)
[Input File Format](#)
[Sample Input](#)

Upload an input file:

Or enter/paste your sequence:

Are you sure it is an enzyme?

Yes
▼

Sequence	*Full annotation	Class	Subclass	Sub-subclass
MKRLKVPPLSEKQKPVTTFSLGLFMGASLILISAILLSWWGAATRPN EPTWVAVRLFPGPFLLSIFMCGVNMAGWAGAGVNHVLI FEVDP RHLSYQTLMQIAAFMIMLWACAVLAYLYAHLHHPAFAPPLVLMII CAVIMFNPLSKPDYLFHKKSRRWWLIQHCYKCFAPLHFVTFDFWL GDQMNSLTTTFLDFQYFLCFYSTEVDYSPDNFLAVRTMNSTTGAVP WGYVDISTGKDMCMSASGVRSFVSIIPATVRFMQLRRYRDTKRM HPHLVNAGKYSTTYLVVACGALNKWAEKSDPNGTSPFFYIWIASYIL SFTYTFLDWDFMDWGLIDPRAPKEAPLLREEMVYGSKYAAAAIQQD FVLRSLVWLVNLSGEAWTLDSDFLTTLTAPAEVFRRFIWNRYFLENE HVNCCGQFRAVRDISVKPIRKGDLSELSKMDQCDGVTHRGQDL MERVKKQKQKQKTRTRLLRKARLNRFIAPVASAALVETQQ		Non-enzyme	0.0.0.0	
MAVSRSRATAADAPVLMGMIRELAEFEKMPKAVKISERLAADLD KNSVGGFVLRGEDEPAAMLLFYFAYSTWEGQFIHMDLYVRPGFR RKGYGQRLWQELGILAKEMGLRIQWDVLDWNSNAIAFYEKMPKC ENLTKKEGWLLYRLNANGIAALAEAKTKC	2.3.1.57	Transferases	Acyltransferases	Transferring groups other than amino-acyl groups
MQSRHSDRNLYLLNKDNIINPDNIHDFDKETPERNENYDIPYDYSI MHYHAWGFAKDTSKPTMVPKDEKYLRLTGSRVLSFYDKLLMNTHY GCLDKCDKNTAAKCTNGGFFHPKNCSEICPGYGGALCDQRPK GCGKVVRTSASPRKLNLFVGLREGEVSRCTYWLEVQKSYKPN HIHLLVVRGNSEEFQAPAGSKVEVKLISLNNWGIWGGCHIGGIEIKT QEDQKATGYRSDYFLQYCYSTAS	3.4.24.21	Hydrolases	Peptidase	Metallopeptidases
MEVVDPRSLIFQLFRVSGNLSAVQRRCQVDQKYNALVNEEDVH VLTGALKLFFRELAEPVFLSLTKDFLNAIKLQNPQRKRFKDFELLK MLPPENRETLKMLLRHLQVAAHSDKNRMQTHNLAIMFGPTLFN		Non-enzyme	0.0.0.1	

En el anexo N°02 se observa el servidor online DEEPre, el cual reconoce las enzimas a través de la secuencia de nucleótidos de cada proteína a analizar.

ANEXO N°3 COMPARACIÓN DE LAS ENZIMAS DE *Ancylostoma duodenale* Y EL PROTEOMA DE *Necator americanus* USANDO EL SOFTWARE BLASTp

```

BLASTP 2.6.0+

Reference: Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Reference for composition-based statistics: Alejandro A. Schaffer, L. Aravind, Thomas L. Madden, Sergei Shavirin, John L. Spouge, Yuri I. Wolf, Eugene V. Koonin, and Stephen F. Altschul (2001), "Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements", Nucleic Acids Res. 29:2994-3005.

Database: necator2.fasta
        5,485 sequences; 2,157,395 total letters

Query= KIH42181.1 acetyltransferase, GNAT family [Ancylostoma duodenale]
Length=163

***** No hits found *****

Lambda      K          H          a          alpha
0.321      0.136      0.414      0.792      4.96

Gapped
Lambda      K          H          a          alpha      sigma
0.267      0.0410     0.140      1.90       42.6       43.6

Texto plano  Anchura del tabulador: 8  Ln 24, Col 49

```

```

0.267  0.0410  0.140  1.90  42.6  43.6

Effective search space used: 469053630

Query= KIH42246.1 Hexokinase [Ancylostoma duodenale]
Length=142

Sequences producing significant alignments:

          Score      E
          (Bits)    Value
XP_013296043.1 Hexokinase [Necator americanus] 197      4e-63
XP_013302318.1 Hexokinase [Necator americanus] 125      9e-36
XP_013301121.1 Hexokinase [Necator americanus] 112      1e-30
XP_013296007.1 Hexokinase [Necator americanus] 90.9     3e-24

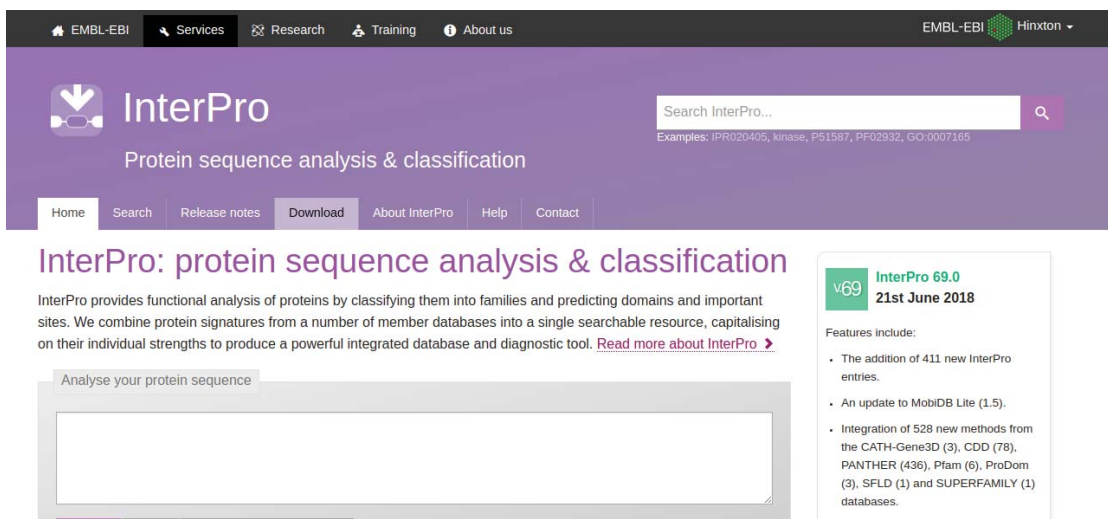
> XP_013296043.1 Hexokinase [Necator americanus]
Length=462

Score = 197 bits (501), Expect = 4e-63, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 93/97 (96%), Positives = 95/97 (98%), Gaps = 0/97 (0%)

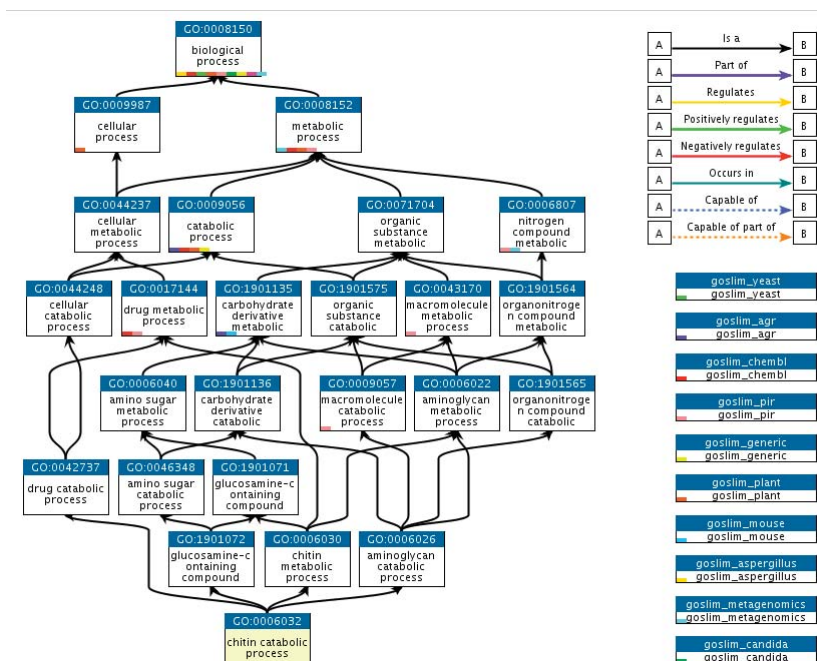
```

En el anexo N°03 se observa los resultados del software BLASTp, donde se realizó una comparación de las proteínas de *Ancylostoma duodenale* y el genoma de *Necator americanus*.

ANEXO N°4 ANOTACIÓN BIOLÓGICA A TRAVÉS DE LA DATA BASE InterProScan



ENZIMA CHITINASE



En el Anexo N°04 se observa el software online InterProScan, donde se obtuvieron las anotaciones biológicas de las enzimas seleccionadas

ANEXO N°5 MODELAMIENTO MOLECULAR A TRAVÉS DEL SOFTWARE PHYRE2

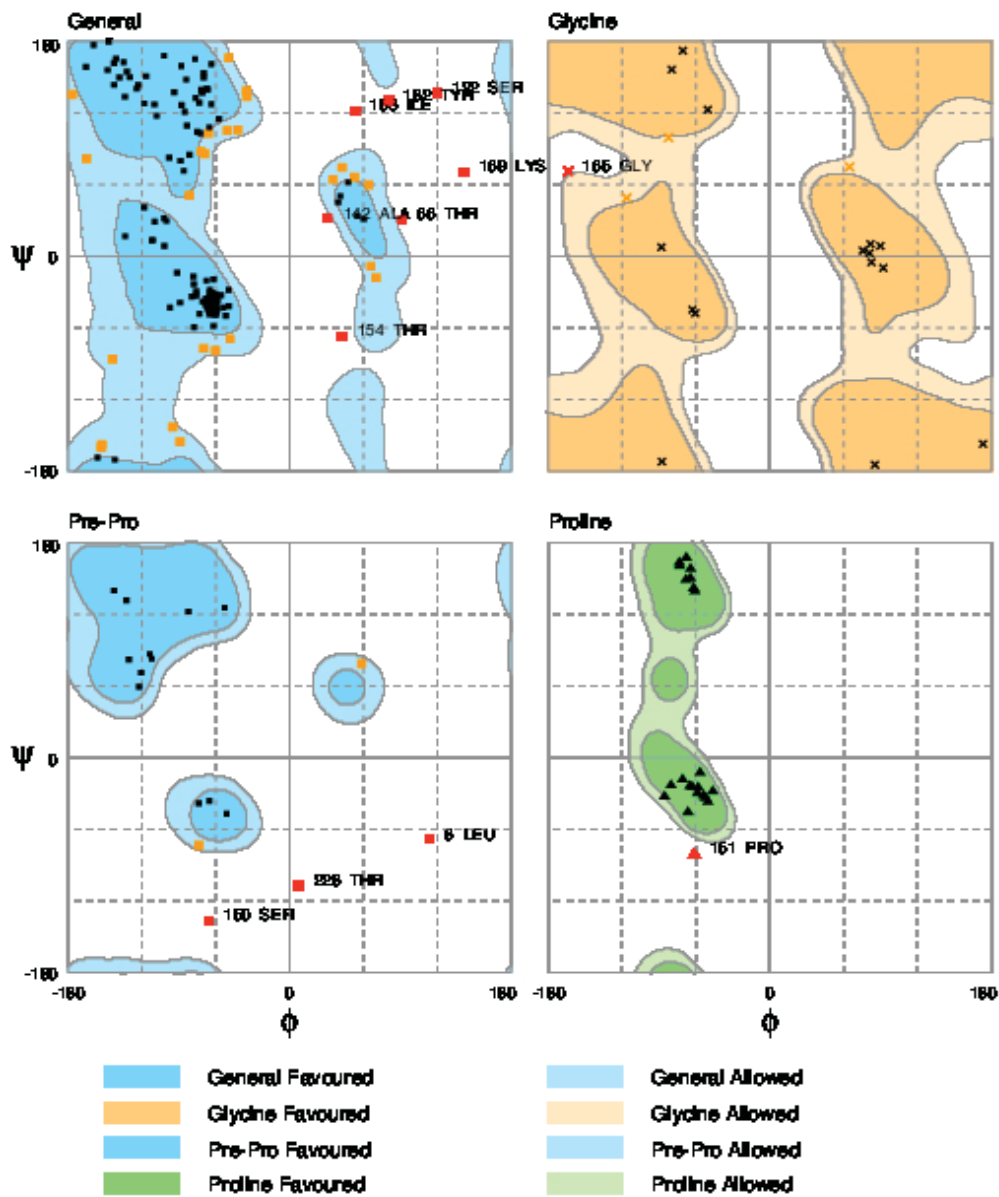
The screenshot displays the Phyre2 web interface for a protein modeling job. The main heading is "Phyre2". A table on the right provides job details:

Email	ingridgimena02994@gmail.com
Description	hexokinase
Date	Fri Aug 10 00:14:30 BST 2018
Unique Job ID	6e7e00e1f06ac26d
Sequence	MAEFKLSNNT ... Download FASTA
Job Type	intensive
Job Expiry	30 days

Below the table are two buttons: "Download Model" and "Download zip of all results". A "Confidence Summary" section shows a bar chart for residues 1 to 102, with a "Confidence Key" ranging from High (9) to Low (0). A note states "100% of residues modelled at >90% confidence (Details)". Under "Publication-ready images", there are links for "Hi-Res image (black background)" and "Hi-Res image (white background)". At the bottom, there is a link for "Interactive 3D view in JSmol".

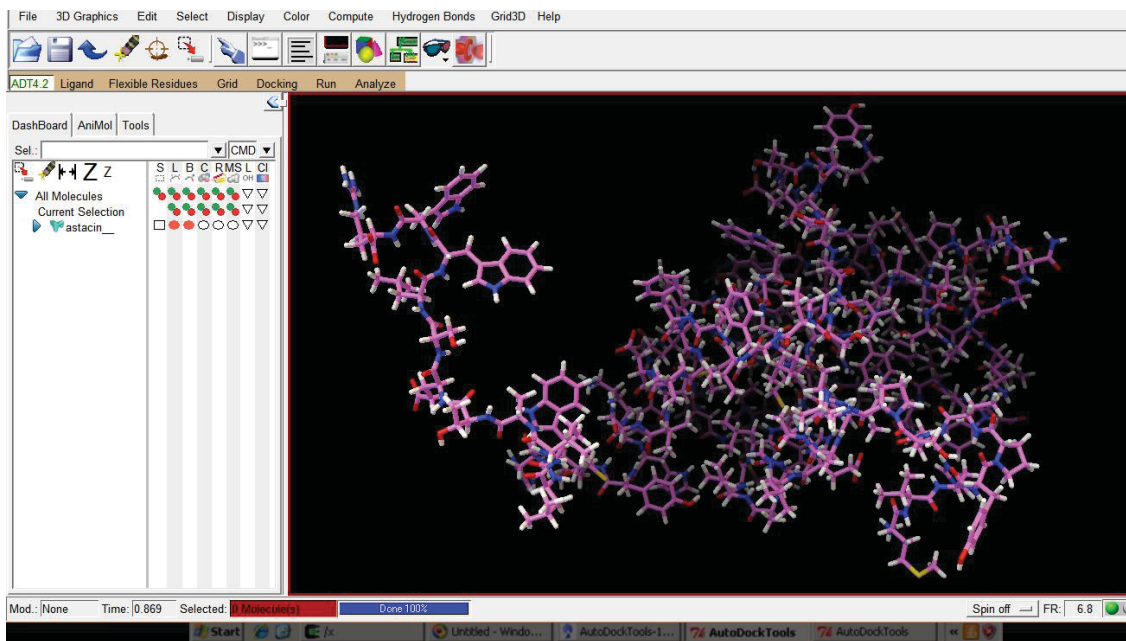
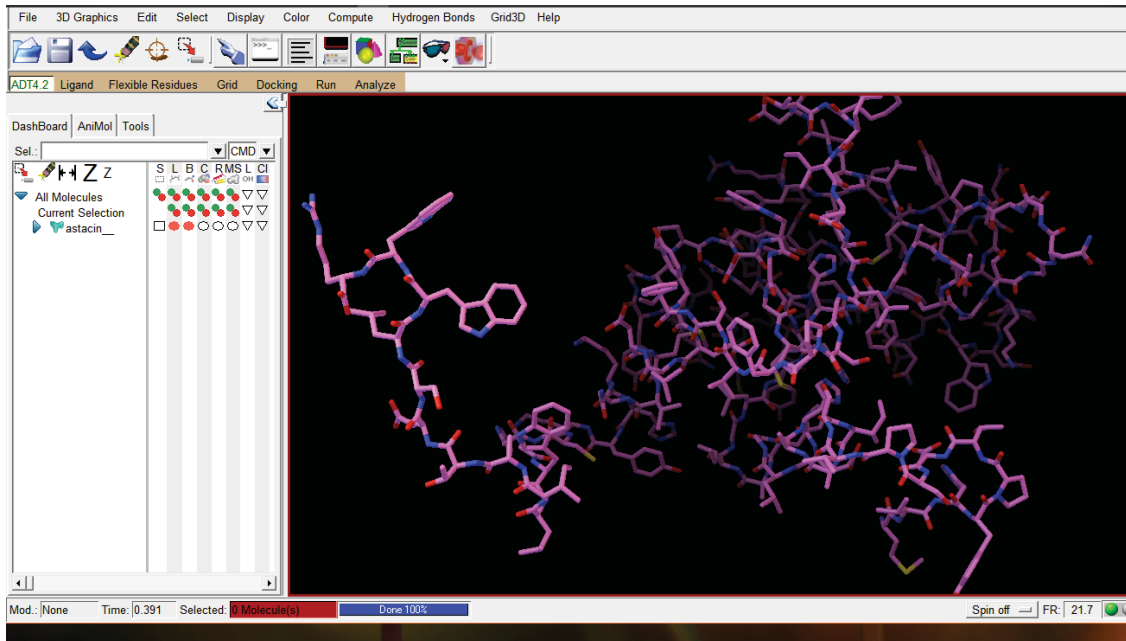
En el Anexo N° 05 se observa el software online Phyre2 , donde se realizó las modelaciones en 3D de las enzimas seleccionadas.

ANEXO N°6 VALIDACIÓN MEDIANTE EL SOFTWARE RAMPAGE
ENZIMA HEXOKINASA



En el anexo N°06 se observa los resultados del software RAMPAGE, muestra un gráfico de un plot de Ramachandran de la enzima hexokinasa, donde indica la estabilidad de la estructura 3D.

ANEXO N°7 SCREENING VIRTUAL DE LAS ENZIMAS MEDIANTE AUTODOCK TOOLS PARA DOCKING RÍGIDO



En el Anexo N°07 se muestra los resultados del software AUTODOCK TOOLS, donde se observa el acondicionamiento que se les da a las enzimas.

ANEXO N°8 FILTRADO DE LOS LIGANDOS POR EL SOFTWARE SWISSADME (REGLAS DE LIPINZKY)

The screenshot displays the SwissADME web application interface. At the top, there is a navigation bar with links for Click2Drug, SwissDock, SwissParam, SwissSidechain, SwissBioisostere, SwissTargetPrediction, **SwissADME**, SwissSimilarity, and About us. The main header includes the SIB logo and the text 'Swiss Institute of Bioinformatics' along with links for Home, FAQ, Help, and Disclaimer.

The main content area contains an introductory text: 'This website allows you to compute physicochemical descriptors as well as to predict ADME parameters, pharmacokinetic properties, druglike nature and medicinal chemistry friendliness of one or multiple small molecules to support drug discovery.' It also provides references for the underlying methodologies: SwissADME, iLOGP, and BOILED-Egg.

Below the text is a text input field labeled 'Enter a list of SMILES here:' containing three SMILES strings:


```
CC(C)CC1=CC=C(C=C1)C(C)(=O)O Ibuprofen
    CC1=CN=C(C(=C1OC)C)CS(=O)C2=NC3=C(N2)C=CC(=C3)OC Omeprazole
    c1ccccc1Oc1ccccc1
    COc1ccc(OCC(O)COC)c(C(=O)O)c2ccc(cc2N)N2CCNCC2)c1N
```

The interface also features a 'Marvin JS' logo and a set of chemical structure editing tools.

The analysis results are presented in a detailed table on the right side of the interface, including a radar chart for Lipinski's rules (LPO, SIZE, POLAR, INSOLU, INSATU, FLEX). The table lists various parameters such as Log S (ESOL), Solubility, Class, Log S (Ali), Log S (SILICOS-IT), GI absorption, BBB permeant, P-gp substrate, CYP1A2 inhibitor, CYP2C19 inhibitor, CYP2C9 inhibitor, CYP2D6 inhibitor, CYP3A4 inhibitor, Log K_p (skin permeation), Druglikeness, Lipinski, Ghose, Veber, Egan, Muegge, Bioavailability Score, Medicinal Chemistry (PAINS, Brenk, Leadlikeness, Synthetic accessibility).

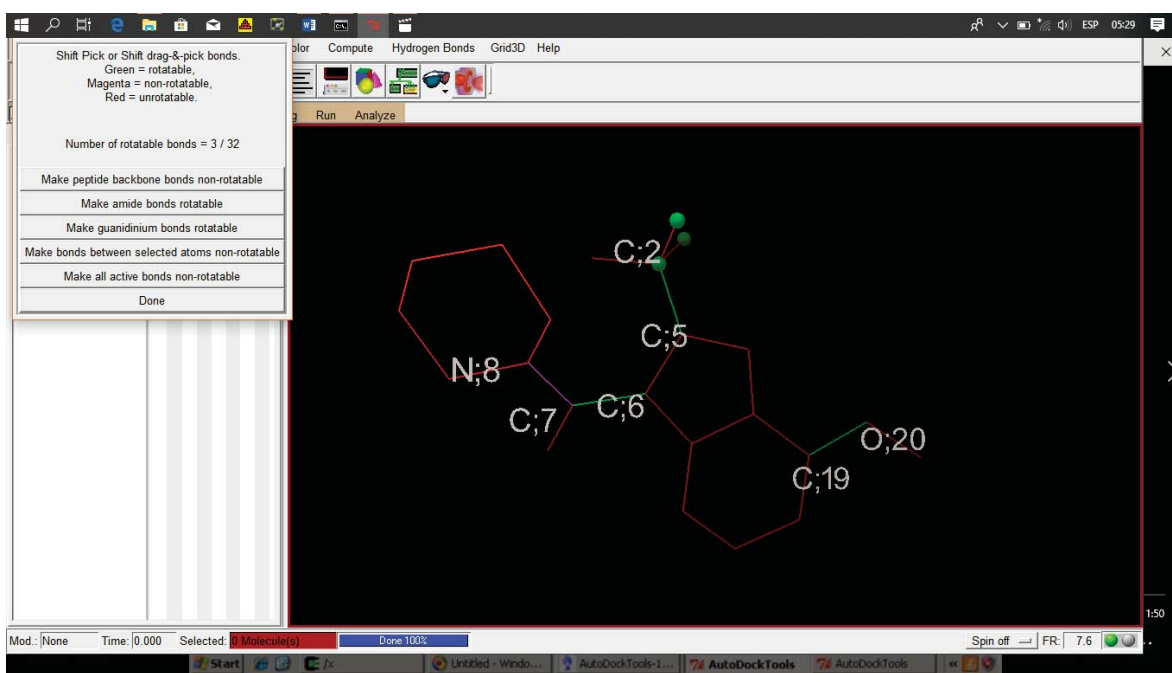
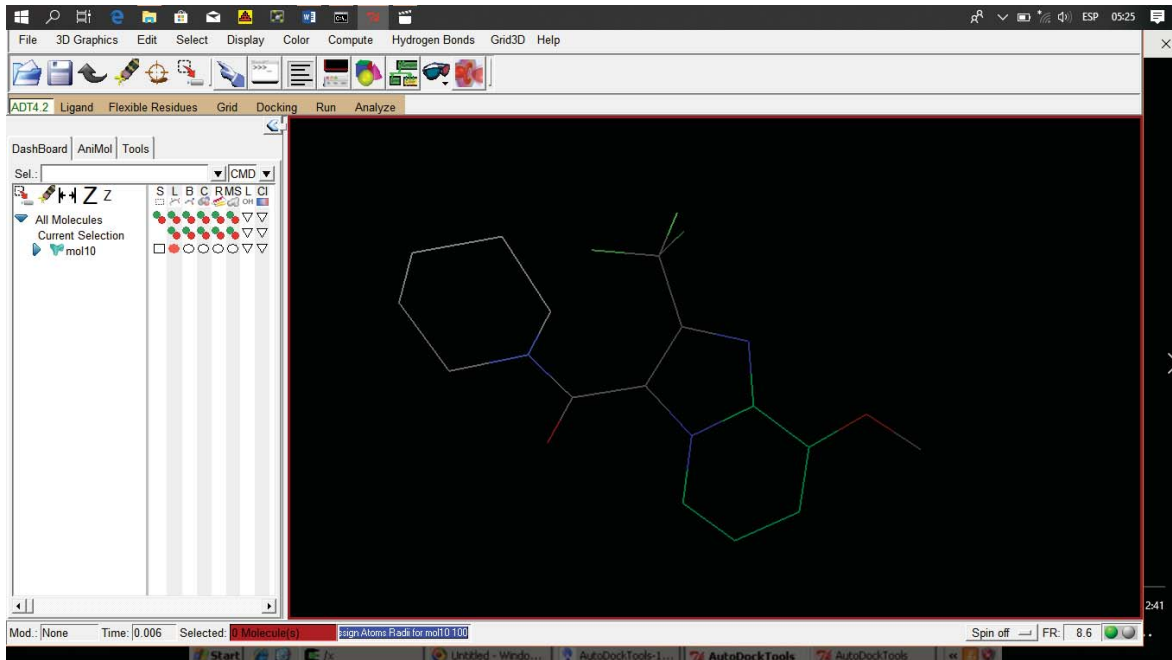
Parameter	Value
Log S (ESOL)	-3.52
Solubility	1.05e-01 mg/ml ; 3.03e-04 mol/l
Class	Soluble
Log S (Ali)	-3.89
Solubility	4.47e-02 mg/ml ; 1.29e-04 mol/l
Class	Soluble
Log S (SILICOS-IT)	-6.47
Solubility	1.17e-04 mg/ml ; 3.37e-07 mol/l
Class	Poorly soluble
Pharmacokinetics	
GI absorption	High
BBB permeant	No
P-gp substrate	Yes
CYP1A2 inhibitor	Yes
CYP2C19 inhibitor	Yes
CYP2C9 inhibitor	Yes
CYP2D6 inhibitor	Yes
CYP3A4 inhibitor	Yes
Log K _p (skin permeation)	-6.82 cm/s
Druglikeness	
Lipinski	Yes; 0 violation
Ghose	Yes
Veber	Yes
Egan	Yes
Muegge	Yes
Bioavailability Score	0.55
Medicinal Chemistry	
PAINS	0 alert
Brenk	0 alert
Leadlikeness	Yes
Synthetic accessibility	3.58

On the left side of the results, there is a chemical structure of the molecule and a table of Physicochemical Properties:

Property	Value
Formula	C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₃ S
Molecular weight	345.42 g/mol
Num. heavy atoms	24
Num. arom. heavy atoms	15
Fraction Csp ³	0.29
Num. rotatable bonds	5
Num. H-bond acceptors	5
Num. H-bond donors	1
Molar Refractivity	93.70
TPSA	96.31 Å ²
Lipophilicity	
Log P _{ow} (iLOGP)	2.14
Log P _{ow} (XLOGP3)	2.23
Log P _{ow} (WLOGP)	3.61
Log P _{ow} (MLOGP)	0.91
Log P _{ow} (SILICOS-IT)	3.16
Consensus Log P _{ow}	2.41

En el Anexo N°08 se observa al software SwissADME, donde se insertaron las moléculas de los ligandos en formato SMILE, para descartar a los que no cumplen las reglas de Lipinзки .

ANEXO N°9 SCREENING VIRTUAL DE LOS LIGANDOS PARA DOCKING RÍGIDO



En el Anexo N° 09 se observa la preparación que se le hizo a los ligandos en el software AUTODOCKTOOLS.

ANEXO N°10 DOCKING MOLECULAR RÍGIDO

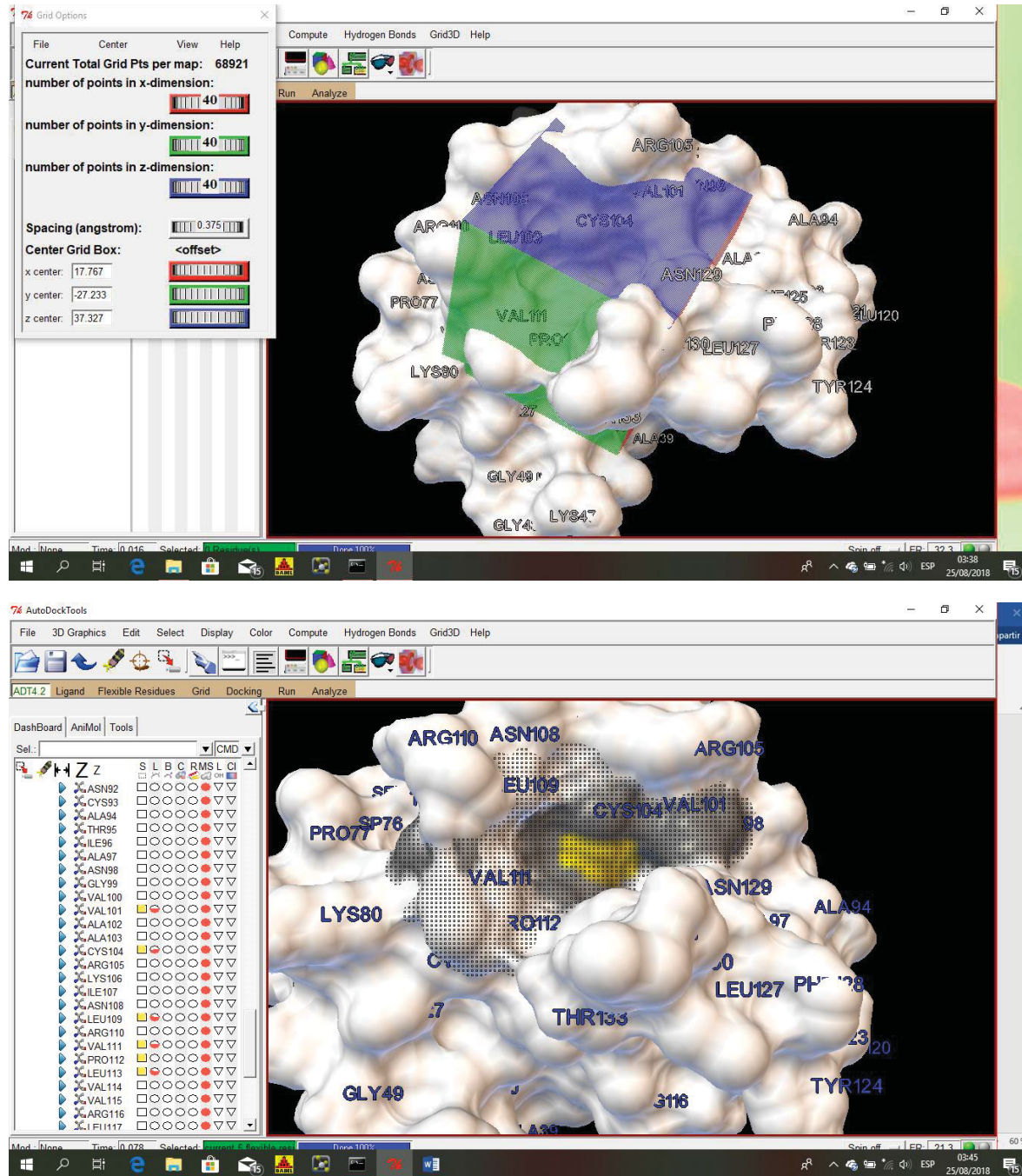
```
ades Terminal ▾ sáb 16:39 ●
asus@ubuntu: ~/Documentos/vinatesis

Archivo Editar Ver Buscar Terminal Ayuda
mode | affinity | dist from best mode
| (kcal/mol) | rmsd l.b. | rmsd u.b.
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1      -4.8      0.000      0.000
2      -4.3      2.178      8.982
3      -4.2      2.557      9.756
4      -4.2      2.081      9.579
5      -4.0      2.688      9.293
6      -4.0      4.150     10.263
7      -3.8      3.563      9.937
8      -3.8      4.644     11.530
9      -3.8      3.180      4.979
Writing output ... done.
asus@ubuntu:~/Documentos/vinatesis$ vina --config config.text --log loghexok5.text
#####
# If you used AutoDock Vina in your work, please cite:      #
#                                                           #
# O. Trott, A. J. Olson,                                    #
# AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking #
# with a new scoring function, efficient optimization and    #
# multithreading, Journal of Computational Chemistry 31 (2010) #
# 455-461                                                    #
#                                                           #
# DOI 10.1002/jcc.21334                                     #
#                                                           #
# Please see http://vina.scripps.edu for more information.  #
#####

Output will be ligando_out.pdbqt
Detected 4 CPUs
Reading input ... done.
Setting up the scoring function ... done.
Analyzing the binding site ... done.
Using random seed: -1310030055
Performing search ...
0% 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100%
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
*****
```

En el anexo N°10 se observa los resultados del software AUTODOCK VINA, los resultados se registraron en la terminal del sistema de Ubuntu.

ANEXO N°11 SCREENING VIRTUAL DE LAS ENZIMAS MEDIANTE AUTODOCK TOOLS PARA DOCKING MOLECULAR FLEXIBLE



En el anexo N°11, se observa el software AUTODOCK TOOLS, donde se adecuaron a las cinco enzimas para la realización de Docking Molecular Flexible.