

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Validación de la ADN Topoisomerasa Tipo II como diana
terapéutica en el tratamiento de leishmaniasis
Proyecto de investigación**

Luis Sebastián Espíndola López

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de titulación presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniero en Procesos Biotecnológicos

Quito, 21 de mayo de 2019

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN

**Validación de la ADN Topoisomerasa Tipo II como diana terapéutica en el
tratamiento de leishmaniasis**

Luis Sebastián Espíndola López

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Miguel Ángel Méndez, PhD

Firma del profesor

Quito, 21 de mayo de 2019

DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: _____

Nombres y apellidos: Luis Sebastián Espíndola López

Código: 00123462

Cédula de Identidad: 1003540083

Lugar y fecha: Quito, 21 de mayo de 2019

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, por su apoyo abnegado e incondicional, su amor, enseñanzas y ejemplo constante a lo largo de toda mi vida

A Luis, por su amistad, apoyo, comprensión, ejemplo de perseverancia y por sus conocimientos compartidos,

A mi hermana Emmily por alegrar mis días

A mis abuelos Alfredo y Nelly, por transmitirme su amor por la vida académica y su ejemplo de dedicación y tenacidad

A Miguel Ángel Méndez, por toda la paciencia, apoyo, y conocimientos compartidos

A María Fernanda y Mónica, por su apoyo incondicional y presencia en toda mi vida

A todos los miembros y profesores del Grupo de Química Computacional y Teórica de la USFQ por su tiempo y enseñanzas

A mis compañeros y amigos, por su amistad a lo largo de estos años

RESUMEN

La leishmaniasis hoy en día se ha constituido como una enfermedad tropical en constante crecimiento y de enorme incidencia principalmente en países con áreas tropicales y subtropicales que favorecen la presencia del vector de la enfermedad, lo cual genera enormes estragos principalmente en sociedades rurales. En tal virtud, esta enfermedad ha sido objeto de una serie de importantes investigaciones dentro de las ciencias biomédicas en búsqueda de una solución para esta enfermedad; a pesar de esto, esta enfermedad es ignorada desde la industria farmacéutica por su poca rentabilidad económica dados los altos costos de investigación y desarrollo de un fármaco específico para esta enfermedad. Los principales problemas asociados a esta enfermedad son que los medicamentos de primera línea para esta enfermedad que se encuentran disponibles hoy en día en el mercado muestran enormes niveles de toxicidad, y una serie de efectos secundarios negativos para el paciente, además que son costosos y de difícil aplicación, por lo que los pacientes prescinden de su uso. De igual manera, considerando que este tipo de parásitos son organismos eucariotas, se dificulta el tratamiento y la acción de una gran cantidad de fármacos, por lo que hoy en día una de las opciones ha sido la investigación de segundos usos de fármacos ya validados y que no ejerzan efectos negativos sobre el paciente, pero que actúen efectivamente contra este tipo de infecciones parasitarias. En el presente trabajo, mediante una metodología *in silico*, se determinó si la ADN Topoisomerasa Tipo II de *Leishmania*, puede ser considerada como una diana blanco que sea válida para el tratamiento de esta enfermedad. Se ensayaron dos diferentes fluoroquinolonas, la Moxifloxacina, y la Enrofloxacina, contrastándolas con la Glucantime, que es el fármaco de primera línea para esta enfermedad. Estos fármacos se seleccionaron partiendo de la evidencia de una serie de estudios previos por el Centro de Zoonosis de la Universidad Central del Ecuador que demostraron mediante ensayos *in vitro* e *in vivo* que este tipo de fármacos ejercen una acción leishmanicida. Se determinó también si existe o no una elevada similitud a nivel estructural entre las mismas proteínas en humanos y en especies del género *Leishmania* considerando que proteínas humanas sustancialmente similares a la proteína blanco, pueden generar diferentes eventos de reactividad cruzada al momento de aplicar el fármaco. Se encontró que la ADN Topoisomerasa Tipo II en *Leishmania amazonensis*, muestra una elevada similitud estructural con su homólogo en humano en sus dos diferentes isoformas, esto, considerando que este tipo de proteínas se encuentran conservadas a nivel de motivos y dominios estructurales. Además, se encontró en base a análisis de acoplamiento molecular e índices de energías libres de unión, constantes de inhibición y frecuencias de ocurrencia, que existe efectivamente una interacción favorable entre las dos fluoroquinolonas ensayadas, y la ADN Topoisomerasa Tipo II. Las métricas de interacción y acoplamiento sugieren que la Moxifloxacina, muestra una mejor interacción y unión a la proteína blanco del parásito en relación a la Enrofloxacina y la Glucantime. En el caso de la Enrofloxacina, los resultados de interacción fueron superiores a los de la Glucantime, que fue el fármaco que arrojó los peores resultados de entre los fármacos ensayados, lo cual coincide con los resultados obtenidos a nivel experimental. Esto sugiere que efectivamente el uso de estas dos fluoroquinolonas en casos de leishmaniasis puede arrojar resultados favorables. Este estudio valida los resultados obtenidos de forma experimental, y sugiere que este tipo de fármacos pueden ser usados contra este tipo de parásitos. Finalmente, la metodología que se describe en el presente trabajo de investigación puede ser usada para la validación de posibles segundos usos de otro tipo de fármacos, así como también para la búsqueda de potencial como blanco para fármacos en proteínas similares.

ABSTRACT

Today leishmaniasis has been constituted as a tropical disease in constant growth and of enormous incidence mainly in countries with tropical and subtropical areas that favor the presence of the vector of the disease, which generates enormous damage mainly in rural societies. As such, this disease has been the subject of a series of important investigations within the biomedical sciences in search of a solution for this disease; In spite of this, this disease is ignored by the pharmaceutical industry due to its low economic profitability given the high costs of research and development of a specific drug for this disease. The main problems associated with this disease are that the first-line drugs for this disease that are available on the market today show enormous levels of toxicity, and a series of negative side effects for the patient, as well as being expensive and of difficult application, so that patients dispense with its use. In the same way, considering that this type of parasites are eukaryotic organisms, the treatment and action of a large quantity of drugs is difficult, so nowadays one of the options has been the investigation of second uses of drugs already validated and that do not exert negative effects on the patient, but that act effectively against this type of parasitic infections. In the present work, by means of an *in silico* methodology, it was determined if *Leishmania* Type II DNA Topoisomerase can be considered as a valid target for the treatment of this disease. It was tested two different fluoroquinolones, Moxifloxacin, and Enrofloxacin, contrasting them with Glucantime, which is the first-line drug for this disease. These drugs were selected based on the evidence from a series of previous studies by the Universidad Central del Ecuador Zoonoses Center which demonstrated through *in vitro* and *in vivo* tests, this type of drugs exert a leishmanicidal action. It was also determined if there is a high similarity at a structural level between the same proteins in humans and in species of the genus *Leishmania*, considering that human proteins substantially similar to the target protein, can generate different events of cross-reactivity at the moment of applying the drug. It was found that DNA Type II Topoisomerase in *Leishmania amazonensis*, shows a high structural similarity with its homolog in human in its two different isoforms, thus, considering that this type of proteins are conserved at the level of structural motifs and domains. In addition, it was found based on analysis of molecular coupling and indices of binding free energies, inhibition constants and frequencies of occurrence, that there is indeed a favorable interaction between the two fluoroquinolones tested, and DNA Topoisomerase Type II. The interaction and coupling metrics suggest that Moxifloxacin shows a better interaction and binding to the target protein of the parasite in relation to Enrofloxacin and Glucantime. In the case of Enrofloxacin, the interaction results were superior to those of the Glucantime, which was the drug that yielded the worst results among the drugs tested, which coincides with the results obtained at the experimental level. This suggests that the use of these two fluoroquinolones in cases of leishmaniasis can indeed give favorable results. This study validates the results obtained experimentally, and suggests that this type of drugs can be used against this type of parasite. Finally, the methodology described in the present research work can be used for the validation of possible second uses of another type of drugs, as well as for the search of drug target potential in similar proteins.

TABLA DE CONTENIDOS

Introducción	13
El parásito y su ciclo de vida.....	13
Leishmaniasis	14
Leishmaniasis en Ecuador.....	15
Tratamiento y alternativas.....	16
Fluoroquinilonas y Topoisomerasa Tipo II como proteína blanco	19
Objetivos	21
Justificación	22
Área de estudio	23
Materiales.....	24
Métodos.....	26
Detección del gen de ADN Topoisomerasa tipo II en <i>Leishmania amazonensis</i>	26
Modelamiento estructural de proteína AND Topoisomerasa Tipo II	26
Validación de modelos estructurales obtenidos	27
Dinámica molecular	28
Alineamiento estructural y determinación de similitudes	29
Acoplamiento molecular	32
Resultados	33
Detección del gen de ADN Topoisomerasa tipo II en <i>Leishmania amazonensis</i>	33

Modelamiento estructural de la proteína ADN Topoisomerasa tipo II.....	33
Validación y caracterización de los modelos estructurales 3D obtenidos	33
Dinámica molecular	34
Alineamiento estructural y determinación de similitudes	35
Acoplamiento Molecular.....	37
Discusión.....	39
Conclusiones	49
Recomendaciones	50
Referencias Bibliográficas	51
Anexos	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°1: Secuencia nucleotídica obtenida para el gen de la ADN Topoisomerasa II, y secuencia de aminoácidos correspondiente en <i>Leishmania amazonensis</i>	67
Tabla N° 2: Predicción obtenida del software ProtParam sobre la composición a nivel atómico y fórmula química de la proteína predicha de ADN Topoisomerasa Tipo II en <i>Leishmania amazonensis</i>	69
Tabla N° 3: Coeficientes de extinción predichos a partir del software ProtParam para la proteína predicha de ADN Topoisomerasa Tipo II en <i>Leishmania amazonensis</i>	69
Tabla N° 4: Valores de vida media predicha a partir del software ProtParam para la proteína ADN Topoisomerasa Tipo II en <i>Leishmania amazonensis</i>	70
Tabla N° 5: Valores de índice de inestabilidad, índice alifático, y GRAVY a partir del software ProtParam para la proteína predicha de ADN Topoisomerasa Tipo II en <i>Leishmania amazonensis</i>	70
Tabla N°6: Resultados obtenidos para la predicción de la función molecular para la estructura proteica predicha de ADN Topoisomerasa Tipo II en <i>Leishmania amazonensis</i>	70
Tabla N°7: Resumen de las métricas de calidad mediante las herramientas de Errat, ProQ, y QMean4 para la proteína predicha de ADN Topoisomerasa Tipo II en <i>Leishmania amazonensis</i>	71
Tabla N° 8: Resumen de los principales Hits de proteínas humanas estructuralmente similares a la proteína predicha de ADN Topoisomerasa Tipo II en <i>Leishmania amazonensis</i> mediante BackPhyre.....	71

Tabla N° 9: Resumen de los principales Hits de proteínas humanas estructuralmente similares a la proteína predicha de ADN Topoisomerasa Tipo II en <i>Leishmania amazonensis</i> mediante DALI.v5	72
Tabla N° 10: Resumen de los valores de TM-Score para los Hits de proteínas estructuralmente similares versus la proteína predicha de ADN Topoisomerasa Tipo II en <i>Leishmania amazonensis</i> mediante TM-Align	72
Tabla N° 11: Resumen de los valores de RMSD para los Hits de proteínas estructuralmente similares versus la proteína predicha de ADN Topoisomerasa Tipo II en <i>Leishmania amazonensis</i> mediante alineamiento estructural en Pymol 1.7.4.5.....	73
Tabla N° 12: Resultados obtenidos para la predicción del sitio activo para la estructura proteica predicha de ADN Topoisomerasa Tipo II en <i>Leishmania amazonensis</i> mediante el algoritmo FINDSITE de I-TASSER	74
Tabla N° 13: Resultados obtenidos para la predicción del sitio activo para la estructura proteica predicha de ADN Topoisomerasa Tipo II en <i>Leishmania amazonensis</i> mediante el algoritmo FINDSITE de I-TASSER	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1: Estructura predicha por el servidor web Phyre 2 para la proteína predicha de ADN Topoisomerasa Tipo II en <i>Leishmania amazonensis</i>	57
Figura N° 2: Estructura generada por el servidor web I-TASSER. Se muestra la estructura con el C-Score más alto de 0.92, y con un TM-Score de	58
Figura N° 3: Superposición estructural entre la proteína predicha de ADN Topoisomerasa Tipo II en <i>Leishmania amazonensis</i> mediante la herramienta Phyre (verde) y TASSER (azul)	59
Figura N° 4: Superposición estructural entre la proteína predicha de ADN Topoisomerasa Tipo II en <i>Leishmania amazonensis</i> (Azul) con la proteína ADN Topoisomerasa Tipo II – Alfa (Naranja)	60
Figura N° 5: Superposición estructural entre la proteína predicha de ADN Topoisomerasa Tipo II en <i>Leishmania amazonensis</i> (Azul) con la proteína ADN Topoisomerasa Tipo II – Beta (Rosado).....	61
Figura N° 6: Validación cuantitativa para los modelos estructurales obtenidos mediante la herramienta de validación de ERRAT. La figura muestra una comparativa entre los valores de factor de calidad al obtener la estructura inicial y al finalizar el proceso de dinámica	62
Figura N° 7: Validación cuantitativa para los modelos estructurales obtenidos mediante la herramienta de validación ProQ. La figura muestra una comparativa entre los valores de LGScore al obtener la estructura inicial, y al finalizar el proceso de dinámica molecular.....	63

Figura N° 8: Validación cuantitativa para los modelos estructurales obtenidos mediante la herramienta de validación ProQ. La figura muestra una comparativa entre los valores de MaxSub al obtener la estructura inicial, y al finalizar el proceso de dinámica molecular63

Figura N° 9: Validación cuantitativa para los modelos estructurales obtenidos mediante la herramienta de validación QMean. La figura muestra una comparativa entre los valores de QMeanDisCo al obtener la estructura inicial, y al finalizar el proceso de dinámica molecular64

Figura N°10: Acoplamiento molecular entre Enrofloxacin y ADN Topoisomerasa Tipo II en *Leishmania amazonensis* Hacia la parte superior, se muestra la mejor posición obtenida para el acoplamiento de Enrofloxacin como ligando (verde), y el sitio activo (azul). El panel inferior muestra el sistema de acoplamiento completo entre ligando (verde), sitio activo (azul y la proteína ADN Topoisomerasa Tipo II como receptor (gris).....65

Figura N°11: Acoplamiento molecular entre Moxifloxacin y ADN Topoisomerasa Tipo II en *Leishmania amazonensis* Hacia la parte superior, se muestra la mejor posición obtenida para el acoplamiento de Moxifloxacin como ligando (verde), y el sitio activo (azul). El panel inferior muestra el sistema de acoplamiento completo entre ligando (verde), sitio activo (azul y la proteína ADN Topoisomerasa Tipo II como receptor (gris).....64

Figura N°12: Acoplamiento molecular entre Glucantime y ADN Topoisomerasa Tipo II en *Leishmania amazonensis*. Hacia la parte superior, se muestra la mejor posición obtenida para el acoplamiento de Glucantime como ligando (verde), y el sitio activo (azul). El panel inferior muestra el sistema de acoplamiento completo entre ligando (verde), sitio activo (azul y la proteína ADN Topoisomerasa Tipo II como receptor (gris)65

INTRODUCCIÓN

El parásito y su ciclo de vida

La *Leishmania*, se reconoce como un parásito extracelular o intracelular protozoario hemoflagelado perteneciente al orden Kinetoplastida, miembro de la familia Trypanosomatidae (Sancheza, Serranob, & Morrell, 2012). Este parásito muestra su ciclo de vida en dos grandes etapas en función de su hospedero, tenemos en primera instancia el flebótomo o insecto vector como hospedero temporal del parásito que en esta etapa se encuentra en su forma de promastigote extracelular con capacidades móviles flagelares y se encuentra presente en la saliva del insecto, y en su segunda etapa podemos encontrar como reservorios principales varios mamíferos como cerdos, perros y como hospedero final al humano, en donde el parásito se encuentra en forma de amastigote intracelular sin capacidades móviles (Calvopiña et al, 2012).

El ciclo infeccioso de *Leishmania* y su ciclo de vida es bastante complejo y muestra varias etapas y formas fisiológicas intermedias, en términos generales, su ciclo comienza con el ingreso del promastigote en la piel del hospedador causado por la picadura del insecto vector. Los promastigotes en primera instancia generan una respuesta del sistema inmune, que al activarse envía diferentes células inmunitarias al sitio de infección (Felix, et al, 2011). Al interior del hospedador, los promastigotes pierden sus flagelos y son fagocitados por neutrófilos, pero su objetivo principal son los macrófagos, que a su vez se ven infectados de manera directa, o al fagocitar neutrófilos que se encuentren infectados. A continuación, los promastigotes se transforman en amastigotes y estos infectan a células reticuloendoteliales donde si encuentran un pH y temperatura ideal comienzan a replicarse mediante un proceso de

mitosis generando destrucción a nivel celular de tejidos cutáneos (Murray, Rosenthal & Pfäuer, 2007). Los amastigotes se consideran la forma infecciosa para los flebótomos, y estos al ingerir sangre de un hospedero infectado permiten el ingreso de los amastigotes que al interior de los insectos se transforman en promastigotes dentro del intestino medio mediante fisión binaria, finalizado este proceso, los promastigotes viajan hacia la proboscis del insecto preparándose para una nueva infección repitiendo el ciclo (Murray, Rosenthal & Pfäuer, 2007).

Leishmaniasis

La leishmaniasis se reconoce como un grupo de enfermedades de origen zoonótico causada por parásitos del género *Leishmania* y transmitida por flebótomos hembra infectados como sus únicos vectores, principalmente de la familia Psychodidae que, subfamilia Phlebotominae (Lainson et al, 2002; Jojoa, 2012). Dependiendo de la especie, estos parásitos generan enfermedades con efectos a nivel cutáneo y mucocutáneo en su forma más común, y a nivel visceral, siendo esta última la forma más grave, endémica de la región de África Oriental, hoy en día, se ha clasificado al género *Leishmania* en dos subgéneros, *Leishmania* y *Viania* (Bañuls et al, 1999). La leishmaniasis ha sido reportada en todos los continentes del planeta a excepción de la Antártida, las estadísticas reportadas por la OMS de acuerdo con los datos recolectados hasta marzo del 2018 muestran que cada año se producen alrededor de un millón de nuevos casos, generando cerca de 30 000 muertes, siendo una enfermedad ampliamente distribuida y con un alto impacto a nivel mundial, pero que se encuentra desatendida y olvidada en una gran cantidad de países (Delgado, 2016). Desde el punto de vista patológico, la forma de leishmaniasis difiere en base a la especie precursora de la enfermedad (Weigel, et al, 1994). La leishmaniasis cutánea, presente mayoritariamente en América, Medio Oriente y Asia Central, ocasiona lesiones cutáneas ulcerosas graves, y es causada por 15 diferentes especies del

subgénero *Leishmania*; por otra parte, la leishmaniasis mucocutánea, genera destrucción de las mucosas del cuerpo, atacando zonas de la nariz, boca y garganta, esta forma está presente únicamente en Brasil, Bolivia, Etiopía y Perú y se la asocia principalmente a la especie *Leishmania braziliensis* y a especies del subgénero *Viania sp.* Finalmente, la leishmaniasis visceral causa episodios de fiebre, anemia grave y en un 95% de los casos causa la muerte de los pacientes infectados (Lainson, 2002) y se encuentra asociada a las especies *Leishmania donovani* y *Leishmania infantum*. Se ha encontrado que varias especies de este género han desarrollado mecanismos que le permiten al parásito generar infecciones crónicas al evitar su eliminación por parte del sistema inmunitario mediante diferentes mecanismos de evasión como la proliferación celular (Poveda, 2018)

El procedimiento de diagnóstico utilizado para leishmaniasis consiste en un cultivo de raspados, toma de trozos de piel o biopsia para un examen microscópico donde se busca la presencia de parásitos de *Leishmania*. o a su vez se puede realizar un proceso de identificación y detección a nivel molecular de este género de parásitos mediante amplificación de la secuencia ADNk mediante PCR con una sensibilidad entre 87 y 100% (Murray, Rosenthal & Pfäuer, 2007).

Leishmaniasis en Ecuador

En territorio ecuatoriano, la leishmaniasis se encuentra catalogada como un problema de salud pública que ha venido creciendo en cuanto a número de casos durante los últimos años por diferentes causas y se han detectado casos de la forma cutánea y mucocutánea (Weigel, et al, 1994; Kato, et. Al, 2016). Se han reportado casos principalmente en las regiones costera y amazónica, aunque también en regiones interandinas y zonas altas, considerando el flujo masivo de personas facilitando la transmisión de la enfermedad, siendo las zonas rurales con

altos niveles de precipitaciones, humedad inundaciones y otro tipo de desastres naturales las más expuestas a la enfermedad dado el constante contacto directo con el principal vector (Calvopiña et al, 2012; Ampudia & Terán, 2014). Otro de los factores de riesgo que afecta a las zonas rurales radica en la malnutrición en infantes, la inmunodepresión en personas adultas y adultos mayores lo que permite una escasa resistencia a la infección, además de la poca o nula atención que se le presta a los síntomas de la infección (Loayza, 2010).

El territorio ecuatoriano alberga varias zonas endémicas reconocidas de leishmaniasis, y se la ha reportado en 23 de las 24 provincias del país, convirtiéndose en un problema importante de salud pública considerando sus agravantes, como la alta presencia de diferentes vectores reportados para este parásito, un ambiente ideal para el ciclo de vida de este organismo, la deforestación en el país que facilita el movimiento de los mismos, la presencia de una gran cantidad de hospederos domésticos y silvestres, la falta de un sistema adecuado de salud público, además de la gran cantidad de especies de *Leishmania* presentes en el país, siendo *Leishmania amazonensis* la más prevalente (Weigel et al, 1994). El principal problema de este tipo de infecciones parasitarias sobre todo en territorio ecuatoriano es la ausencia de un tratamiento ideal que genere una reducción significativa de los síntomas presentes, y una inhibición del parásito que reduzca la infección, todo esto, sin generar efectos secundarios tóxicos para el paciente (Weigel et al, 1994; Bañuls et al, 1999).

Tratamiento y alternativas

En términos de tratamiento, existen diferentes fármacos a usarse contra la leishmaniasis, pero no existe ninguno con una alta especificidad y tampoco existe ninguna vacuna eficaz contra este parásito, a pesar de que en la actualidad se han hecho grandes esfuerzos por identificar el inmunógeno protector más adecuado además del correcto aislamiento del gen que lo codifica,

de tal manera que sea posible obtener una vacuna que sea verdaderamente práctica frente a este agente infeccioso, no se han logrado resultados favorables (Zorrilla, et al, 2005). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, se recomienda medidas sanitarias y de cuidado frente a picaduras del vector mediante mosquiteros, repelente y prendas protectoras como prevención (Villa, 2014). Por otra parte, en el caso de infecciones puede aplicarse un tratamiento sintomatológico estándar para lesiones menores a nivel cutáneo, aplicando compuestos que eviten un mayor daño tisular; o la otra opción es un tratamiento sistémico en casos aún más graves. Dentro de los principales compuestos usados para un tratamiento inmediato buscando la erradicación del parásito encontramos antimonio pentavalente, pentamidina intramuscular, miltefisona, fluconazol, diferentes antifúngicos, entre otros (Murray, Rosenthal & Pfäuer, 2007). Se considera como fármacos de elección común de primera línea al estibogluconato de sodio y la meglumina antimoniato, el principal problema de todos ellos son sus efectos secundarios, ya que todos muestran elevados niveles de toxicidad una serie de efectos secundarios nocivos entre los que se incluye alteración de las funciones hepáticas, dolores abdominales, pancreatitis, cefalea, edema facial, erupciones cutáneas, entre otros. Incluso, se han reportado defunciones relacionadas con el uso de este tipo de medicamentos, lo cual ha prescindir de su uso y optar por tratamientos alternativos de carácter más sintomatológico (Ochoa, Flórez, & Muskus, 2011). El único compuesto reportado que no muestra efectos secundarios es la anfotericina B liposómica, el problema con este fármaco es su alto costo que bordea los \$1500, por lo que no es una opción económicamente viable sobre todo si consideramos que la gran mayoría de casos se originan en países en vías de desarrollo (Villa, 2014). Adicionalmente, para la gran mayoría de fármacos se requieren varias dosis (desde unos días hasta varias semanas de tratamiento) lo que dificulta la adherencia al tratamiento completo (Aronson, et al., 2016; Cardona et al., 2015).

Uno de los grandes problemas que presenta el tratamiento para leishmaniasis, es que se han encontrado en los últimos años casos de infecciones por *Leishmania* resistentes a antimoniales, causado principalmente por tratamientos incompletos y uso excesivo de este tipo de medicamentos (Felix, et al, 2011). Se sabe que los mecanismos de resistencia del parásito se encuentran dados por alteraciones a nivel de estructura en las dianas terapéuticas lo cual dificulta o imposibilita la unión del compuesto terapéutico a su receptor, de igual manera, se ha encontrado una disminución en la tasa de ingreso del medicamento al interior de la célula, causada por alteraciones en el transportador (Zorrilla, et al, 2005). Además, se han reportado altos niveles de variabilidad en la respuesta al tratamiento, dicha heterogeneidad está dada por la gran cantidad de especies de *Leishmania* que causan la infección, además de diferentes condiciones inmunitarias en los pacientes afectados, lo cual también dificulta el tratamiento y reduce las alternativas terapéuticas (Murray, Rosenthal & Pfäuer, 2007). Tomando en cuenta este contexto, hoy en día, se han utilizado múltiples técnicas a nivel computacional con el objetivo de generar una investigación mucho más amplia y profunda en tópicos relacionados al descubrimiento de posibles compuestos con actividad biológica de interés (Loayza, 2010). Así, se han realizado diferentes estudios para determinar posibles segundos usos de múltiples compuestos. Además, se ha realizado una búsqueda exhaustiva de posibles nuevas proteínas blanco que participan en funciones biológicas importantes para los agentes infecciosos, de tal manera, que la incidencia del fármaco se de únicamente en el microorganismos, y no en el huésped, generando resultados mucho más beneficiosos y favorables (Reguera et al, 2007). Parte de la estrategia que se usará en este estudio es el análisis de las estructuras tridimensionales de enzimas que son posible blanco o diana de los fármacos de la familia de las fluoroquinolonas. En otros estudios relevantes, a partir de proteínas que participan en funciones biológicas importantes, y de sus estructuras tridimensionales se ha podido comprender cómo a nivel atómico y molecular un fármaco actúa mejorando la caracterización

del modo de acción del fármaco con los consecuentes beneficiosos para su aplicación clínica (Raguera et al, 2007).

Fluoroquinolonas y Topoisomerasa tipo II como proteína blanco

Las fluoroquinolonas se definen como un grupo de antibióticos sintéticos que se prescriben comúnmente para una amplia gama de infecciones bacterianas por su capacidad bactericida y su amplio espectro de acción (Romero, Saravia, & Walker, 2005). Estos antimicrobianos consisten básicamente en un tipo quinolona con un átomo de flúor introducido en su estructura. Se ha demostrado que esta adición incrementa la capacidad de penetración celular, además de su afinidad por la diana terapéutica, y reduce significativamente los posibles efectos negativos de su absorción (Nenortas, Burri, & Shapiro, 1999). El fundamento de su acción antibacteriana radica en su capacidad de inhibir la actividad de la enzima ADN Topoisomerasa Tipo II y la ADN Topoisomerasa Tipo IV generando muerte celular en las células afectadas. Estas proteínas son indispensables e importantes en procesos de transcripción, recombinación, y reparación del ADN por su capacidad de catalizar cambios en la conformación de esta molécula como la separación de sus cadenas, relajación, y desenrollamiento durante los procesos mencionados, siendo una proteína vital para microorganismos patógenos (Tufiño & Poveda, 2017).

En las especies del género *Leishmania*, la ADN Topoisomerasa tipo II se encuentra ubicada hacia el núcleo, y en el kinetoplasto, lo cual sugiere que en este tipo de parásitos esta enzima juega un papel crucial en el arreglo de la cromatina nuclear y el DNA kinetoplasto (Reguera, Pérez, Redondo, Díaz & Balaña, 2007). Una caracterización previa de este tipo de proteínas en *Leishmania*, indican que están formadas por dos subunidades heterólogas, siendo esta la principal diferencia con enzimas en mamíferos, quienes muestran una estructura monomérica,

además se encontró que tienen una elevada similitud y homología con la ADN Topoisomerasa II bacteriana (Romero, Saravia, & Walker, 2005). Esta evidencia, nos permite inferir que la aplicación de fluoroquinolonas tendría una efectiva acción terapéutica generando una inhibición en la ADN Topoisomerasa tipo II de *Leishmania* y a su vez que no existiría una reacción cruzada frente a las enzimas monoméricas del hospedador (Poveda, 2018). La evaluación de la acción de estos antibacterianos frente a *Leishmania*, se ha realizado en múltiples ocasiones a nivel *in vitro*, Nenortas, Burri & Shapiron, 1999, reportaron un posible potencial del uso de este tipo de compuestos como antileishmaniásicos al evaluar 6 fluoroquinolonas en un cultivo de *Leishmania*, de igual manera, Romero, Saravia & Walker, 2005 obtuvieron resultados similares y llegaron a esta misma conclusión, lo cual proporciona evidencia de que las fluoroquinolonas inhiben la ADN Topoisomerasa Tipo II en *Leishmania*. Tufiño & Poveda, 2017, realizaron ensayos de actividad leishmanicida en promastigotes de diferentes especies de *Leishmania* utilizando diferentes fluoroquinolonas a nivel *in vivo*. Los autores encontraron en el caso de la enrofloxacin y moxifloxacin una inhibición significativa del crecimiento del parásito incluso superior a la reportada por el tratamiento de primera línea (Tufiño & Poveda, 2017).

En tal virtud, en la presente investigación se busca generar un sistema a nivel computacional bastante detallado de interacción entre la ADN Topoisomerasa Tipo II de *Leishmania amazonensis*, y la enrofloxacin y moxifloxacin como los fármacos de interés, con el objetivo de validar los resultados experimentales obtenidos previamente a nivel *in vivo*, además que nos permite corroborar que efectivamente existe una inhibición de la proteína blanco por parte de estos fármacos, y de obtener resultados positivos, llegar a concluir que estos fármacos puntuales podrían ser empleados a futuro para el tratamiento de leishmaniasis.

OBJETIVOS

Objetivo general del trabajo de titulación

- Determinar si existen similitudes significativas entre la ADN Topoisomerasa tipo II como proteínas blanco en *Leishmania. amazonensis* frente a alguna proteína humana, y determinar si existe acoplamiento molecular entre los fármacos ensayados, y la proteína blanco

Objetivos específicos del trabajo de titulación

- Determinar mediante BLAST y análisis genómico computacional cuál es el gen que codifica para la Topoisomerasa tipo II en *Leishmania amazonensis*
- ◆ Obtener y validar un modelo de la estructura tridimensional de la proteína Topoisomerasa tipo II de *Leishmania* en base a su secuencia
- ◆ Determinar mediante Acoplamiento Molecular si la Topoisomerasa tipo II puede ser una diana terapéutica viable frente al uso de compuestos con actividad conocida contra este tipo de proteínas estructurales

JUSTIFICACIÓN

La leishmaniasis ha sido objeto de una serie de importantes investigaciones dentro de las ciencias biomédicas dado el impacto a nivel global que ha causado en poblaciones vulnerables; esta enfermedad tropical es ignorada por la industria farmacéutica por su poca rentabilidad económica y los altos costos de producción de un fármaco específico (Reguera et al, 2007). En este contexto, diferentes investigaciones han intentado evaluar el funcionamiento de fármacos ya existentes frente a esta enfermedad (Sánchez et al, 2012). Los problemas asociados a esta enfermedad son que los pacientes de zonas rurales recurren a tratamientos sintomatológicos considerando que el tratamiento convencional tarda muchos días, y su método de aplicación por inyecciones hace que los pacientes desistan del tratamiento (Aronson et al., 2016; Cardona-Arias et al., 2015). Por otra parte, los antileishmaniásicos han mostrado alta toxicidad, además que tienen un alto costo, y no existe una vacuna para esta enfermedad, en tal virtud, se busca drogas que tengan dianas de acción en la replicación del DNA de este parásito en función de las diferencias en determinadas proteínas que pueden ser candidatas como dianas terapéuticas (Lainson et al, 2002). Estas proteínas tienen su homólogo en el ser humano, por lo que existe una alta probabilidad de que muestren similitudes significativas a nivel estructural entre sí, principalmente en sus sitios activos; por esta razón, se considera importante generar estudios que validen efectivamente el uso de un determinado blanco y su receptor para el diseño de fármacos, con el objetivo de tener la seguridad de que no existirá ningún tipo de reacción cruzada con las proteínas del huésped (Reguera, Pérez, Redondo, Díaz & Balaña, 2007). En el presente trabajo, se busca determinar si la Topoisomerasa tipo II de *Leishmania amazonensis*, puede ser considerada como una diana blanco que sea válida para el tratamiento de esta enfermedad, validación que hasta la fecha no se ha realizado en este tipo de proteína de Leishmania, generando una importante alternativa de tratamiento frente a este tipo de infecciones parasitarias considerando sus efectos en salud pública.

ÁREA DE ESTUDIO

El proyecto macro se centra en el área de farmacología y biología computacional aplicado a la validación de determinados compuestos químicos como agentes de tratamiento en infecciones parasitarias. La principal interrogante en este campo es conocer si es posible evitar eventos de reactividad cruzada entre proteínas blanco y humanas generadas por sitios activos o cavidades significativamente similares entre sí, además de conocer si efectivamente es posible usar este tipo de fármacos obteniendo resultados favorables frente a la infección.

El uso de fármacos existentes en el mercado en otro tipo de infecciones causadas por organismos para los cuales no han sido desarrollados en un principio se basa en la idea de que las proteínas blanco son similares a nivel de sitios activos y receptores entre parásitos de familias cercanas. Estos estudios han venido en constante crecimiento en los últimos años considerando que estos fármacos han sido desarrollados, validados y que han pasado por todo tipo de pruebas a nivel *in silico* e *in vivo* bajo estrictas regulaciones de los principales órganos e instituciones reguladores a nivel mundial, de esta manera se evita el costoso, y extremadamente largo proceso de desarrollo y diseño de fármacos nuevos para un tipo de infección en específico, lo cual para las principales industrias no genera un beneficio económico considerable. Este tipo de nuevas aplicaciones para fármacos existentes debe encontrarse fundamentado en evidencias experimentales y estudios extensivos que garanticen que funcionen de manera adecuada. Los estudios computacionales permiten reducir los recursos a invertir en investigación, y nos dan una aproximación cercana y valiosas pautas para un futuro diseño experimental. En tal virtud, el presente trabajo de investigación se encuentra dirigido a la validación y análisis a nivel *in silico* de la posible inhibición por 3 fluoroquinolonas de la actividad de la Topoisomerasa tipo II en *Leishmania* como proteína blanco, involucrada en procesos de transcripción del ADN.

MATERIALES

5.1 Detección del gen de Topoisomerasa tipo II en *Leishmania amazonensis*

- Software Mega 7
- Biblioteca Gene del NCBI
- Servidor de secuencia de *Leishmania amazonensis*

5.2 Modelamiento de proteína

- Servidor web Phyre 2
- Servidor web I – TASSER
- Servidor web ProtParam

5.3 Validación de los modelos

- Servidor web Errat
- Servidor web ProQ
- Servidor web QMean4

5.4 Dinámica Molecular

- Software Gromacs 5.1.4
- Algoritmo *Steepest Descent*

5.4 Alineamiento y determinación de similitudes

- Servidor web BackPhyre
- Servidor web DALI.v5
- Software Pymol 1.7.4.5
- Servidor web de Alineamiento I-TASSER

5.5 Acoplamiento Molecular

- Servidor web Acoplamiento

- Software Autodock
- Software Autodock Vina
- Software Autodock Tools
- Padel-ADV

MÉTODOS

Búsqueda y detección del gen de ADN Topoisomerasa tipo II en *Leishmania amazonensis*

Para la detección del gen de la ADN Topoisomerasa Tipo II en *Leishmania amazonensis*, se realizó una búsqueda de todas las secuencias de los genes para esta misma proteína en otras especies del género *Leishmania*, y se obtuvo el genoma completo de nuestra especie de interés. Se descargó todas las secuencias de aminoácidos para esta proteína de la plataforma Gene del NCBI, y se realizó un BLAST nucleotídico en MEGA8. Se rescató la secuencia del gen a partir de la región similar correspondiente al genoma total de *Leishmania amazonensis*.

Modelamiento de proteína

Una vez obtenida la secuencia correspondiente a la proteína ADN Topoisomerasa tipo II de *Leishmania amazonensis*, se generó una construcción del modelo estructural putativo para esta proteína, para ello, se ejecutó el algoritmo de modelación estructural de Phyre 2 y I-TASSER, ingresando la secuencia de aminoácidos en sus respectivos servidores online, en el caso de I-TASSER, el fundamento de la construcción generada, se basa en homologías y modelos tridimensionales previos de proteínas similares conocidas y los agrupa utilizando el algoritmo *Spicker* que mediante parámetros de convergencia y similitudes estructurales y de secuencia genera cinco ensamblajes de estructuras, dentro de los cuales se escogió aquel con el *C-Score* más alto, este es un estadístico que nos indica un valor entre -5 y 2, siendo un *C-score* cercano a 2 correspondiente a un modelo con una confianza alta (Zhang, 2008). En el caso del servidor de Phyre 2, utiliza una metodología de predicción de estructura mediante plegamiento inverso en base a una búsqueda de una secuencia compatible con un determinado plegamiento, y a proteínas con secuencias homólogas a partir de los cuales se genera una

estructura que se ajusta a la secuencia ingresada (Kelley, Mezulis, Yates, Wass & Sternberg, 2015).

Validación y caracterización de los modelos estructurales 3D obtenidos

Una vez generados los modelos estructurales para nuestra proteína de interés, se validó los mismos con el objetivo de determinar si la estructura obtenida no contiene errores a nivel estructural que afecten los procesos de Dinámica y Acoplamiento Molecular, para ello, se trabajó con cuatro servidores en línea que son usados comúnmente al momento de validar un modelo obtenido de manera *in silico*

ProQ

Consiste en un método de validación que se fundamenta en un proceso de machine learning en base a redes neurales que permiten predecir qué tan bien se ajusta la calidad de un modelo dado (Wallner & Elofsson, 2003). La predicción de calidad utiliza características a nivel estructural para la proteína siendo las más importantes las superficies accesibles hacia el solvente, y los contactos átomo – átomo y residuo – residuo, para luego compararlos con modelos considerados ideales o correctos, finalmente, el análisis cuantitativo de calidad de ProQ se da en base a los valores de LGScore y MaxSub obtenidos en donde valores superiores a 1,5 se consideran como correctos, superiores a 3 buenos, y superiores a 5 muy buenos para LGScore , y en el caso de MaxSub valores mayores a 0,1 como correctos, superiores a 0,5 como buenos, y mayores a 0,8 como muy buenos (Wallner & Elofsson, 2003).

Errat

Es un método de validación de una estructura proteica en base a una función cuadrática de error que permite analizar cuáles son las interacciones a nivel atómico pareadas no covalentes al interior de una estructura proteica, así, esta metodología realiza una comparación estadística de la función de error de la proteína al compararla con funciones de error de una base de 96 proteínas modelo, el análisis cuantitativo considera que las distancias entre las

interacciones de Carbono, Nitrógeno y Oxígeno deben ser menores a 3,5 Å, esto se analiza en base al factor de calidad, valores superiores a 80, indican un buen modelo, y superiores a 90, indican un excelente modelo (Colovos & Yeates, 1993)

QMean4

Consiste en una metodología de validación que permite realizar una medición de la calidad total de la estructura proteica obtenida mediante un cálculo del grado de natividad, para ello, analiza las características del modelo dado y las compara con un conjunto de modelos estructurales obtenidos a nivel experimental con una calidad ideal y analiza la similitud entre ellas, su análisis cuantitativo se da en base a una puntuación normal, la ventaja de este análisis es que no depende del tamaño de la proteína analizada, la métrica de QMean indica que valores superiores a 70 corresponden a un modelo correcto, superiores a 80 un buen modelo, y superiores a 90 un excelente modelo (Bienert et al, 2010)

Para la caracterización de la ADN Topoisomerasa, se ingresó las coordenadas de la estructura predicha en la herramienta de ProtParam, la cual nos permite obtener información importante de su conformación, índices de estabilidad, y características fisicoquímicas. Por otra parte, para la predicción de la función de la proteína, se utilizó la herramienta de COFACTOR del servidor web de I-TASSER, el cual trabaja con múltiples algoritmos de predicción, en este caso, se tomó los resultados obtenidos a partir de un análisis de estructuras análogas a la proteína ingresada y en base a un Score TM que va de 0 a 1 siendo 1 un valor de mayor confianza para la predicción, nos permitió inferir con altos niveles de confianza sobre la posible función de la estructura ingresada (Zhang, Freddolino & Zhang, 2017)

Dinámica Molecular

Una vez analizada la calidad de la proteína obtenida, se realizó un análisis de dinámica molecular con el objetivo de mejorar todos estos parámetros permitiéndonos obtener mejores resultados a futuro en el Acoplamiento Molecular, para esto, se utilizó el software de Gromacs

5.1.4, disponible en la computadora de alto rendimiento HPC-USFQ; se determinó como condiciones de simulación una caja cargada con agua SPC216, límites periódicos, un modelo de agua TIP3P, adición de iones de Sodio y Cloro como un buffer de carga, PME para control electrostático y 0,1M de concentración de Cloruro de Sodio (NaCl) (Bhutani et al, 2015).

Para la dinámica molecular, se comenzó con un proceso de minimización de energía aplicando el algoritmo *Steepest Descent* con una fuerza de convergencia de 10 kJ/mol/nm, a continuación, para el ensamblaje canónico o dinámica de ajuste de temperatura (NVT) se elevó la temperatura hasta 310°K aplicando *V-rescale*, luego, se comenzó con la relajación de la estructura en presencia de agua aplicando limitaciones de movimiento por un tiempo determinado de 500ps. A continuación, para la dinámica de ajuste de presión (NPT), se quitó las restricciones de movimiento y se aplicó *Parinello – Rahman* como un baróstato que permita que el sistema alcance la presión de 1bar, para ello, se determinó un valor de compresibilidad de 4.5×10^{-5} bar, y un tiempo similar al del proceso NVT de 500ps (Bhutani et al, 2015).

Cumplidos con todos estos procesos, se prosiguió con el cálculo esencial del proceso de Dinámica Molecular que consiste en un proceso de dinámica de producción que nos permite analizar la trayectoria que cumplirá el sistema, para ello, se utilizó las mismas condiciones de presión y temperatura aplicando un tiempo de 50ns. Finalmente, se obtuvo diferentes conjuntos o clusters con diferentes ajustes obtenidos para la proteína en cuestión, se continuó descargando cada una de dichas estructuras, y se tomó la primera al ser esta la que cumplió con una mejor trayectoria (Bhutani et al, 2015).

Alineamiento estructural y determinación de similitudes

Una vez obtenida la estructura mejorada de la ADN Topoisomerasa tipo II, se repitió los análisis de calidad realizados previamente, y se verificó que efectivamente dichos valores se ajustaron de mejor manera a los valores esperados de calidad para la estructura proteica. A continuación, para determinar proteínas similares dentro del proteoma humano, se realizó una

búsqueda de proteínas similares, para esto, se ingresó la estructura procesada en el portal web de Phyre 2, en modo experto, en la opción Backphyre, esta función nos permitió transformar nuestra secuencia y el perfil de la estructura en un *Hidden Markov Model* (HMM). Luego, este se escaneó por medio de un sistema de pareo HMM-HMM contra una base de datos compilada previamente de diferentes HMMs validados, constituida por proteínas del genoma humano (Soding, 2005). El algoritmo empleado para realizar fue el *HHsearch*, el cual se ha demostrado en pruebas ciegas de CASP que tiene uno de los mejores desempeños en este tipo de análisis (Moult, Fidelis, Ktyshtafoych, Schweden, Tramontano, 2014). De igual manera, esta metodología ha demostrado ser útil en diferentes tipos de investigaciones relevantes de búsqueda de proteínas con altas similitudes. Una vez listo el output de Backphyre se analizó los scores de confianza y de porcentajes de identidad. El score de confianza nos dice la probabilidad entre 0 y 100% de que las proteínas pareadas realmente representan una estructura sustancialmente similar. Por otra parte, el porcentaje de identidad se refiere a la proporción de los residuos de la estructura ingresada que son equivalentes a la estructura encontrada (Kelley, Mezulis, Yates, Wass, Sternberg, 2015). Este método tiene la ventaja de que no se requiere necesariamente que exista un gran nivel de homología a nivel de secuencia, sino que se enfoca principalmente en la similitud en la estructura de las proteínas pareadas. Esto nos permitió realizar comparaciones entre organismos filogenéticamente no relacionados para los que sabemos que van a compartir poca similitud a nivel de secuencia (Kelley, Mezulis, Yates, Wass, Sternberg, 2015). Sin embargo, pueden adquirir similitud estructural por otros mecanismos evolutivos. Al analizar especialmente el valor de confianza, se seleccionan aquellas estructuras con un nivel alto de confianza y se seleccionó aquellas que muestren un porcentaje de identidad superior al 90% obteniendo 14 estructuras (Moult, Fidelis, Ktyshtafoych, Schweden, Tramontano, 2014).

A continuación, con el objetivo de validar los resultados obtenidos con Backphyre, se utilizó el servidor DALI.v5, que de igual manera nos permite obtener proteínas homólogas a un modelo dado, para ello, se basa en un algoritmo que compara nuestro modelo con diferentes plantillas (templates) cargadas en el servidor. DALI.v5 se basa únicamente en similitudes a nivel estructural, se cargó las coordenadas de nuestro modelo en formato pdb, y se seleccionó del listado únicamente aquellas correspondientes a proteínas humanas con un porcentaje de identidad de igual manera superior al 90%, y finalmente se comparó dichas proteínas con las tomadas a partir del análisis de Backphyre, con lo que se obtuvo únicamente 1 estructura adicional a las encontradas previamente (Holm & Laakso, 2016).

A continuación, se ingresó en el servidor de *Protein Data Bank* y se descargó las estructuras de las proteínas seleccionadas en formato pdb, luego, para el alineamiento de estructuras para determinar similitud estructural en las mismas de manera cuantitativa se utilizó el algoritmo de *Tm-align* del servidor online de I-TASSER. Este algoritmo, consiste en realizar un alineamiento estructural de forma optimizada generando una superposición residuo – residuo, entre proteínas pareadas y analiza su similitud en base a procesos de dinámica molecular independiente, el resultado de este algoritmo se refleja en un valor, el cual puede tomar valores entre 0 y 1. Se sugiere que valores inferiores a 0,2 indican que no existe similitud y que las proteínas analizadas no se encuentran relacionadas y que las posibles similitudes en ciertos residuos pueden ser resultados del azar; por otra parte, en el caso de obtener valores entre 0,5 y 0,6, se considera que las proteínas son considerablemente similares en varios de sus residuos pero aun así pueden ser resultados del azar. Finalmente, en caso de obtener valores superiores a 0,6, se infiere que las proteínas comparadas efectivamente muestran conformaciones estructurales similares (Zhang & Skolnick, 2005). Se realizó este análisis comparando el modelo ADN de Topoisomerasa tipo II con todas las proteínas seleccionadas de Backphyre y DALI.v5

Se aplicó una metodología de alineamiento adicional en base a la desviación de la media cuadrática (RMSD) para ello se empleó el software de PYMOL 1.7.4.5; primero se cargó la proteína del modelo obtenido, y se la superpuso frente a las proteínas obtenidas de los análisis de similitud mediante la función *Align*, generando un alineamiento de las coordenadas a nivel atómico de las estructuras en cuestión; el valor obtenido de RMSD nos indica qué tan distantes están los átomos entre sí, por lo que funciona como un indicador de divergencia entre un par de proteínas (Contreras, 2011)

Acoplamiento (docking) molecular

La acción de un fármaco incluye la interacción específica entre el compuesto químico (ligando) y la proteína blanco (receptor). Esto se puede evaluar *in silico* y la fuerza de la interacción se puede cuantificar, para esto se usa una metodología denominada Acoplamiento molecular. Por tanto, para completar el presente estudio se determinó la existencia o no de interacciones entre el ligando y la proteína de interés mediante acoplamiento proteína – ligando. El objetivo específico de este ensayo fue determinar las interacciones entre los compuestos estudiados experimentalmente por Poveda, 2018, y la proteína del parásito obtenida *in silico* así como con las proteínas humanas ADN Topoisomerasa Tipo II en sus isoformas Alfa y Beta, de tal manera que sea posible afirmar o descartar si existe afinidad entre los blancos y los compuestos de interés (Goodsell, Morris & Olson, 1996).

Usualmente uno de los mecanismos de acción de los fármacos es una inhibición al unirse al sitio activo de la proteína diana. Por tanto, se realizó una búsqueda del sitio activo para la estructura predicha mediante la herramienta COACH de I-TASSER la cual mediante múltiples algoritmos permite predecir el sitio de unión mediante un rango de puntuación C-Score, el resultado usado en este caso fue con el algoritmo de FINDSITE y nos permitió determinar los residuos correspondientes al sitio activo

A continuación, para la realización del Acoplamiento, se definió las coordenadas correspondientes al sitio activo en base a los resultados de FINDSITE, se preparó la proteína, y se realizó una simulación de acoplamiento en base a lo sugerido por (Ashfaq et al, 2016)

RESULTADOS

Detección del gen para la proteína *Leishmania amazonensis*

En la Tabla N°1 se muestra la secuencia nucleotídica obtenida en base a un análisis de secuencia con otras secuencias conocidas para esta misma proteína en otras especies del mismo género. Se muestra también la secuencia de aminoácidos generada a partir de las secuencias de nucleótidos obtenida. Se encontró en la secuencia del gen un total de 3800 nucleótidos que codifican para 1236 aminoácidos

Modelamiento de la proteína

El modelo estructural construido a partir de la secuencia de la proteína ADN Topoisomerasa tipo II de *Leishmania amazonensis*, obtenido a partir de las herramientas de Phyre 2 y I-TASSER se encuentran representados en la Figura N°1 y Figura N°2 respectivamente. El modelo de la proteína a simple vista se muestra considerablemente similar entre ambas herramientas. Por tanto, para la selección del mejor modelo obtenido se realizó una superposición entre la construcción obtenida por Phyre2, y la predicción de I-TASSER, encontrando que en la estructura obtenida a través de I-TASSER muestra mejores índices de calidad al mostrarse como una proteína con una mayor cantidad de residuos y con cadenas mejor estructuradas

Validación y caracterización de los modelos 3D de la proteína ADN

Topoisomerasa tipo II en *Leishmania amazonensis*

Para la caracterización de la estructura proteica predicha, se calcularon diferentes propiedades importantes; en la Tabla N°2 se muestra la composición atómica de la proteína, además de su fórmula química putativa. Por otra parte, se analizó diferentes parámetros adicionales, como los coeficientes de extinción, valores de vida media, índices de inestabilidad, cada uno de ellos se encuentran reflejados en las Tablas N° 3, 4 y 5 respectivamente. El análisis de este tipo de parámetros nos arroja información importante de las características fisicoquímicas de nuestra proteína. La proteína mostró una vida media considerablemente baja en comparación a otras proteínas, además que puede ser catalogada como una proteína inestable, e hidrofílica. Finalmente, los resultados obtenidos para la predicción de función molecular de la estructura predicha se muestran de forma resumida en la Tabla N°6, donde se observa que efectivamente con un 99% de confianza que la función de la estructura es de una ADN Topoisomerasa Tipo II como se esperaba.

Para la evaluación de calidad de la construcción predicha, se empleó diferentes herramientas de análisis de calidad, cada una trabaja con diferentes valores o puntajes asignados para cada estructura ingresada y analizan diferentes parámetros y propiedades del modelo estructural. En la Tabla N° 7, se muestra un resumen de los parámetros de calidad obtenidos para la estructura previo a la realización de la dinámica molecular; también se muestran los parámetros obtenidos tras la aplicación del proceso de dinámica molecular. Este proceso de dinámica molecular se utilizó para mejorar los parámetros de calidad obtenidos inicialmente para nuestra estructura.

Dinámica molecular

Se llevó a cabo un proceso de dinámica molecular completo obteniendo en los análisis de agrupamiento (clusterizado) un total de 32 estructuras conformacionales proteicas prevalentes a lo largo de la dinámica molecular. Se tomó la primera estructura obtenida del primer grupo, y se evaluó la calidad de esta estructura aplicando la misma metodología usada

previamente para la estimación de la calidad de las estructuras 3D. En la Tabla N°7 se muestra un resumen de los valores y parámetros de calidad obtenidos, donde se compara también si los mismos mejoraron en relación con la estructura 3D ingresada originalmente.

En las Figura N°6, 7 8 y 9 se muestra los resultados obtenidos para el método de validación de ERRAT, método ProQ con sus respectivos puntajes de LGScore y MaxSub y para la herramienta de QMean para las dos construcciones obtenidas. En todas las gráficas se observa un notable incremento en la calidad de la proteína, encontramos que, en base a los parámetros y las métricas mencionadas previamente, se determinó que el modelo proteico obtenido tras las dinámica molecular se cataloga como un excelente y muy buen modelo para el resto de los análisis a realizar

Alineamiento estructural y evaluación de estructuras similares

A partir de la estructura de la topoisomerasa II en *Leishmania amazonensis* seleccionada se realizó un análisis de búsqueda, alineamiento y evaluación de estructuras proteicas similares en humano. En la Tabla N°8, se encuentra en resumen de las estructuras de proteínas humanas que mostraron similitudes a nivel estructural con la proteína Topoisomerasa tipo II de *Leishmania amazonensis* encontradas a través de la herramienta de BackPhyre. Se tomó únicamente aquellas estructuras que mostraron un porcentaje de confianza superior al 90%. No fue posible tomar todas las estructuras generadas como resultado ya que muchos de los códigos de RefSeq se habían actualizado a la fecha por lo que no fue posible encontrarlos, en otros casos, se encontró estructuras repetidas, es decir, dos estructuras mostraban número de identificación diferente, al momento de buscarlos en la plataforma de UniprotKB correspondían a estructuras similares, y únicamente divergían en su método de obtención. Se recuperó todas las estructuras de los PDBs encontrando 14 estructuras diferentes; se muestra también el porcentaje de identidad entre las estructuras encontrando en este caso que existe un bajo nivel de homología entre los organismos analizados.

Se realizó una búsqueda similar mediante la herramienta DALI.v5. Se realizó un filtrado de resultados para obtener estructuras similares únicamente en humanos. Los resultados obtenidos para estructuras similares únicamente en *Homo sapiens* se muestra en la Tabla N°9. Se encontró un total de 11 estructuras de las cuales 10 correspondían a estructuras similares a las obtenidas por la herramienta de BackPhyre, y solo 1 de las estructuras fue diferente.

Se realizó un alineamiento a nivel de estructura de la proteína Topoisomerasa tipo II de *Leishmania amazonensis* versus todas las 15 estructuras que se encontró que son sustancialmente similares; para esto se usó la herramienta de *TM-Align* de la plataforma de I-TASSER. En la Tabla N°10 se muestran los valores obtenidos para cada uno de los alineamientos de estructura realizados. Como una validación adicional, se realizó una superposición de las estructuras analizadas versus la proteína del parásito, y se obtuvo los valores de RMSD para cada una de las superposiciones. La Tabla N°11 muestra un resumen de las métricas de RMSD obtenidas para cada alineamiento. El TM score es una métrica que me indica como a nivel global dos proteínas se parecen a nivel estructural, entre más cercano sea el valor a 1 entonces mayor será la identidad. Al comparar la proteína del parásito con las humanas, se encontró un TM Score alto únicamente para dos proteínas humanas, obteniendo valores de 0,90957 y 0,89825 para las proteínas ADN Topoisomerasa tipo II Beta (ID: 5GWJ) y ADN Topoisomerasa tipo II – Alfa (ID: 5GWK) respectivamente, 7 estructuras mostraron valores inferiores a 0.5, adicionalmente, 4 estructuras mostraron valores entre 0.5 y 0.62, por lo que estas últimas podrían ser consideradas para el resto del estudio. La métrica RMSD es más susceptible a diferencia de tamaños y la existencia de una región en particular altamente diferente puede elevar el valor mucho, aún así nos puede decir información en cuanto a la similitud en cuanto a posición de átomos entre dos estructuras. Entre más cercano a cero es RMSD más se superponen los átomos entre dos estructuras. En el caso de los valores RMSD

calculados al alinear la proteína del parásito con las potenciales proteínas similares, se encontró que las dos estructuras que halladas anteriormente como las más similares en base a TM score fueron las únicas en mostrar valores pequeños de RMSD cercanos a 2 Å, específicamente RMSD de 2.36Å y 2.61 Å respectivamente, mientras las demás mostraron valores de RMSD bastante altos, lo cual confirma que la ADN Topoisomerasa tipo II Beta (ID: 5GWJ) y ADN Topoisomerasa tipo II – Alfa (ID: 5GWK) son proteínas humanas de interés en el estudio de acoplamiento molecular. Las Figuras N° 4 y 5 muestran los alineamientos de estructura realizados para la ADN Topoisomerasa tipo II Beta (ID: 5GWJ) y ADN Topoisomerasa tipo II – Alfa (ID: 5GWK) en humano, versus la ADN Topoisomerasa II de *Leishmania amazonensis*.

Acoplamiento molecular

Para la realización de acoplamiento molecular, en primera instancia se determinó los posibles sitios activos para la construcción proteica obtenida debido a que una de las formas de acción más comunes de fármacos es inhibición al unirse al sitio activo. Los resultados para la búsqueda de sitios activos se muestran resumidos en la Tabla N° 12. No se tomó en cuenta los demás resultados obtenidos por la herramienta de COACH ya que mostraron valores de C – Scores demasiado bajos, y todos ellos mostraron valores inferiores a 0,5 a excepción de los resultados de FINDSITE, en este caso, se obtuvo un C – Score de 0,67 para los aminoácidos 440, 466, 467, 468, 521, 525, 683, 729, 730 y 732.

Usando los residuos identificados como parte del sitio activo se fijó el sitio activo para el acoplamiento molecular y las coordenadas de la caja alrededor de este sitio y se realizó el acoplamiento molecular para cada uno de los tres fármacos a evaluar (Goodsell, Morris & Olson, 1996). Se calculó los valores de Energía libre de unión, Constante de inhibición, Energía electrostática, Energía intermolecular total y Frecuencia de Ocurrencia, como los principales parámetros a considerar para evaluar si efectivamente existe interacción o no para cada uno de los fármacos de interés. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla N° 13. En todos los

casos se encontró energías libres de unión negativas, y constantes de inhibición favorables, además de altos valores de frecuencia de ocurrencia para el caso de la ADN Topoisomerasa Tipo II en *Leishmania*. Por otra parte, en el caso de los análisis de acoplamiento molecular para las dos proteínas similares estructuralmente, se encontró de igual manera resultados de una posible unión entre los fármacos y este tipo de proteínas, siendo este un resultado a analizar considerando una posible presencia de reacción cruzada

DISCUSIÓN

La metodología planteada en la presente investigación basada únicamente en ensayos computacionales, nos permitió generar una aproximación adecuada para la identificación y validación de un determinado target, blanco o diana terapéutica en base únicamente a simulaciones; vale destacar que esto es especialmente valioso considerando que no existe una estructura cristalográfica para la ADN Topoisomerasa II en *Leishmania amazonensis*, la proteína que se cree que es una potencial estructura que puede ser inhibida por fármacos ya existentes (Ochoa, Flórez, & Muskus, 2011).

En cuanto a la generación de la estructura tridimensional de la ADN Topoisomerasa Tipo II, se empleó predicciones computacionales y se aplicó una metodología de predicción bastante utilizada hoy en día en base al uso de herramientas y servidores que trabajan con algoritmos que han sido estrictamente evaluados y con altos índices de confianza como es el caso de Phyre 2 y I-TASSER (Contreras, 2011). Este tipo de predicciones se basan principalmente en la construcción de proteínas tridimensionales a partir de una serie de comparaciones de diferentes plantillas de estructuras tridimensionales que muestre similitudes a nivel de secuencia obtenidas del Protein Data Bank de las cuales se tiene conocimiento de su estructura por ensayos de cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear. A partir de esta metodología, se realiza un análisis de homología estructural entre las mismas para la generación de una estructura para la secuencia de aminoácidos dada. Así, para determinar si existe homología o no entre ellas se determina que sean parte de la misma familia de proteínas, que su función sea homóloga y que presenten como mínimo un 30% de similitud a nivel estructural (Melo, 2012).

En el caso de la herramienta de I-TASSER el análisis de los resultados obtenidos se basa en los índices obtenidos de C-Score y TM-Score. Se obtuvo un C – Score de 0,92, además de un TM – Score de $0,60 \pm 0,14$ para la estructura considerada por el software como la mejor

dentro de todas las cinco estructuras posibles que se generaron como resultado. El C-Score, se define como un puntaje entre -5 y 2 que es calculado en base al estadístico de significancia Z para los alineamientos y la homología estructural que se obtuvo (Yang et al, 2015). Se considera que un C-Score que indica una buena predicción además de plegamientos correctos se encuentra sobre el -1.5, en este caso, un valor de 0,92 nos indica que la aproximación estructural es muy buena, que en términos generales los plegamientos obtenidos para el modelo tridimensional predicho son correctos y que la construcción del modelo se ajusta bastante bien a otras estructuras con función semejante (Yang et al, 2015). En cuanto al TM-Score, este es un valor numérico que nos indica qué tan similares son a nivel estructural dos estructuras distintas, se considera que una puntuación por sobre el 0,5 indica que nuestro modelo es considerablemente similar a las estructuras de las plantillas con las que fue comparada, en este caso, el obtenido de 0,6, nos indica que la topología de nuestra proteína es la correcta, y que su similitud no es de origen aleatorio, un valor alto de igual manera nos permite validar la construcción obtenida (Yang et al, 2015).

En cuanto a la caracterización fisicoquímica de la estructura proteica, se obtuvo como resultado una estructura con 20021 átomos, y una secuencia con 1236 residuos, de los cuales 121 se encuentran cargados negativamente, y 178 residuos están cargados positivamente, estos resultados son importantes ya que determinamos que la carga positiva que muestra la proteína nos indica que esta es una proteína nuclear (Karp, 2008). En el caso de las proteínas intracelulares, estas tienden a tener una mayor cantidad de residuos cargados negativamente, mientras que en el caso de proteínas nucleares estas tienen una mayor cantidad de residuos cargados positivamente considerando que esta carga positiva le permite a la proteína unirse al ADN que a su vez se encuentra cargado negativamente (Acosta & Zavala, 1996). Para validar esto, se debe analizar de igual manera el Punto Isoeléctrico teórico obtenido para esta proteína, el cual nos indica el pH en el cual la proteína tendrá una carga neta 0 dado por un igual número

de cargas positivas y negativas, en este caso, el Punto Isoeléctrico obtenido es de 10,15, el cual nos indica que esta proteína es de carácter básico, este tipo de proteínas, se encuentran directamente asociadas a funciones relacionadas al ADN como en el caso de la ADN Topoisomerasa Tipo II (Colovos & Yeates, 1993). Por otra parte, en cuanto al peso molecular de la proteína predicha, este valor calculado es una buena aproximación al peso real, aunque no puede catalogarse como el exacto real ya que la única manera de determinar esto de forma certera es mediante un ensayo de espectroscopía de masas realizado de forma experimental. En este caso, se obtuvo un peso molecular de 141515,26 Dalton (Shuler & Kargi, 2002)

Otro de los aspectos importantes a analizar de nuestra estructura es el Coeficiente de Extinción, este aspecto básicamente nos indica cuánta luz puede ser absorbida por la estructura proteica bajo una longitud de onda de 280nm, el cálculo de este coeficiente se lo realiza a nivel computacional en base a una ecuación que analiza la absorbancia de la cisteína, tirosina, y triptófano en base a la composición de aminoácidos de la estructura (Melo, 2012). En este caso, el coeficiente de extinción está dado en $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ evaluada a una longitud de onda de 280 nm es de 98830 asumiendo que todos los pares de residuos de Cisteína se encuentran como cistinas, siendo este el resultado de la oxidación de dos moléculas de cisteína, generando la construcción de puentes disulfuro que permiten a la proteína tener una mayor estabilidad, y se obtuvo un coeficiente de 96830 en el caso de que todos los residuos de cisteína se encuentren reducidos (Walker, 2005). En ambos casos, el alto valor de coeficiente de extinción obtenido, nos indica que nuestra estructura tiene una alta eficiencia de absorción de luz a 280 nm, por lo que puede ser considerada como detectable en solución a concentraciones bajas mediante absorción (Melo, 2012).

Por otra parte, en cuanto al valor de Vida media estimada de la estructura proteica obtenida, este nos indica una estimación del tiempo necesario para que la mitad de la proteína desaparezca una vez que haya sido sintetizada por la maquinaria celular. Los valores de Vida

media estimada dependen directamente del aminoácido N-Terminal, por lo que es un indicador importante de la estabilidad de la estructura, en este caso, se encontró que el aminoácido N-Terminal es la Histidina, y al ser evaluada en reticuloides de mamíferos, en levadura, y *E. coli*, encontramos que la vida media de la proteína es alta, a excepción del caso de en levaduras (Walker, 2005). En términos de estabilidad de nuestra proteína, se deben analizar también otros dos tipos de parámetros diferentes, indicados por el Índice de inestabilidad e Índice alifático. El primer índice nos da un indicio de la estabilidad de la proteína al interior de un tubo de ensayo, y el segundo nos indica el volumen que ocupan las cadenas alifáticas. En el caso del índice de inestabilidad, se obtuvo un valor de 54.92, en este caso, se considera que valores inferiores a 40 permiten catalogar a la proteína como estable, y en el caso de obtener valores superiores a 40 clasifican a una estructura como inestable, en este caso, el resultado de 54.92 clasifica a nuestra proteína como inestable (Walker, 2005). Por otra parte, en el caso del índice alifático, se obtuvo un valor de 95,76, que es catalogado como alto, esto nos permite inferir que la proteína tiene una alta presencia de cadenas alifáticas que le confieren estabilidad a altas temperaturas y diferentes condiciones (Walker, 2005). Finalmente, el último aspecto físico – químico analizado para nuestra proteína, es el índice *de Grand Average of Hydrophaty*, que nos permite conocer si nuestra estructura es hidrofílica o hidrofóbica, en este caso, se obtuvo un valor de -0.103; un valor negativo de GRAVY nos indica que la estructura analizada es hidrofílica, dicha característica está dada por la presencia de grupos de carácter polar, ubicadas hacia las cadenas laterales en la superficie de este tipo de proteínas, lo cual les confiere una alta solubilidad (Walker, 2005).

En cuanto al análisis funcional que realiza I-TASSER, este se evalúa en base al *C-Score* obtenido por la herramienta de COACH, este índice de confianza nos indica la similitud de la estructura obtenida en la función asignada predicha, en este caso, se considera un buen C-Score para valores cercanos a 1, en este caso, se puede afirmar con un 99% de confianza, que la

función correspondiente a nuestro modelo es efectivamente a la de una ADN Topoisomerasa tipo II (Yang et al, 2015).

Una vez generadas las estructuras fue necesario analizar y evaluar la calidad que muestran los modelos obtenidos. Esta evaluación nos permite tomar únicamente uno de los modelos para la aplicación del resto de la metodología planteada, por lo que es importante determinar en base a diferentes parámetros la confiabilidad y calidad de nuestra predicción; para esto se empleó como herramientas principales los servidores de Errat, ProQ, y QMean 4 para la predicción de la calidad de la proteína ADN Topoisomerasa Tipo II predicha.

En el caso del análisis de Errat, este nos permite evaluar la calidad de una estructura proteica predicha en base a un factor de calidad total; es importante considerar que este análisis toma en cuenta una sensibilidad de 1.5Å en la estructura proteica (Colovos & Yeates, 1993). Se considera que construcciones que muestren un factor de calidad superior al 95% puede ser considerada como una estructura de alta calidad. En este caso, ni la estructura obtenida inicialmente, ni la estructura obtenida tras la dinámica molecular alcanzan el estándar de calidad para un factor de calidad de 95%. Sin embargo, vemos que existe una mejora notable en el factor ERRAT de calidad entre la estructura inicial y la obtenida tras la dinámica molecular, generando una mejora superior al 10%, pasando de 82.36% a 92.92%, siendo esta última bastante cercana al estándar de calidad preestablecido.

En cuanto al método de validación de ProQ, este nos permite obtener dos puntajes de calidad, LGScore y MaxSub. Encontramos que, en el caso de complejos proteicos con un tamaño superior, estas tenderán a obtener métricas de LGScore superiores, por otra parte, en el caso de complejos de tamaño inferior, el estándar de MaxSub tiende a ser superior. Wallner & Elofsson, 2003, establecen que en el caso de MaxSub, valores superiores a 0,1 serán clasificados como modelos bastante buenos, mayores a 0,5, como modelos muy buenos, y superiores a 0.8 podrán ser catalogados como predicciones estructurales extremadamente

buenas. En el caso del estándar LGScore, valores superiores a 1.5 son vistos como modelos bastante buenos, valores mayores a 2.5 son considerados como muy buenos modelos, y de ser superiores a 4 son modelos extremadamente buenos (Wallner & Elofsson, 2003). En este caso, se obtuvo para la construcción proteica inicial valores de -0.452 y -0.604 para MaxSub y LGScore respectivamente, lo cual nos indica que, en base al estándar, nuestro modelo no puede ser catalogado ni si quiera como un modelo bueno. Una vez realizada la optimización estructural mediante dinámica molecular, encontramos que estos valores se elevaron considerablemente, alcanzando valores de 0,191 y 2,448 para MaxSub y LGScore respectivamente, lo cual significa un incremento cualitativo bastante elevado en términos de calidad, dichos valores nos permiten catalogar al modelo obtenido tras el proceso de dinámica molecular como muy buen modelo (Wallner & Elofsson, 2003).

El método de validación de calidad de QMean4, nos brinda una métrica de calidad absoluta para el modelo obtenido en base al grado de natividad que muestra el modelo (Bienert, et al, 2010). La ventaja de este tipo de análisis es que son completamente independientes del tamaño que muestre nuestro modelo, así, esta herramienta toma en cuenta como estándares de calidad a las distancias entre átomos, y las características que se relacionan con la estructura primaria de la proteína (Bienert, et al, 2010). La métrica de calidad utilizada es el valor obtenido de QMeanDisCo que puede adquirir valores entre 0 y 1, en donde valores próximos a 1 nos indican modelos de mayor calidad, así, se considera que valores superiores a 0.6 pueden ser catalogados como modelos de alta calidad, en este caso; el valor de la estructura inicial fue de 0,62, y en el caso de la estructura tras la dinámica se obtuvo un valor de 0,93, lo cual nos indica un incremento notable en la calidad de la proteína (Bienert, et al, 2010).

Considerando que a nivel de proteínas no es necesario altos niveles de similitud a nivel de secuencia para que dos proteínas sean consideradas como similares a nivel de estructura, se realizó un escaneo y exploración de posibles proteínas humanas que sean semejantes a la ADN

Topoisomerasa Tipo II de *Leishmania amazonensis* mediante dos servidores web diferentes, Phyre 2 y DALI.v5. Se obtuvo un total de 15 posibles proteínas que presentan cierto grado de similitud estructural. Para cuantificar su grado de similitud, se realizó análisis de alineamiento estructural mediante las herramientas de I-TASSER, y además se obtuvo los valores de RMSD mediante Pymol 1.7.4.5. En el presente trabajo, se identificó dos proteínas que son estructuralmente similares a nuestra proteína de interés. La ADN Topoisomerasa tipo II Beta (ID: 5GWJ) y ADN Topoisomerasa tipo II – Alfa (ID: 5GWK) al mostrar los valores más cercanos a 1, y valores de RMSD más bajos. Esta elevada similitud a nivel estructural puede estar dada por una elevada cantidad de dominios y motivos conservados en ambas proteínas, los motivos, se definen como secuencias de aminoácidos de carácter conservado que le confieren a la proteína una forma y estabilidad específica y determinada principalmente por la función de la proteína, los dominios, de igual forma son secuencias de carácter conservado, que se organizan de manera independiente al resto de la proteína y la dan cierto nivel de diferenciación a la proteína (Contreras, 2011). Al cumplir las dos proteínas humanas funciones similares, en el caso de la ADN Topoisomerasa Tipo II Alfa, está presente en procesos de replicación retardada, permite procesos de condensación en el cromosoma, además de la separación específica de las cromátidas y sobre todo de dar lugar al inicio de la replicación permitiendo la rotura de las dos hebras de ADN; en el caso de la ADN Topoisomerasa Tipo II Beta, esta actúa como una enzima presente en procesos de reparación del ADN con la capacidad de colocar un nucleótido, además que también tiene capacidades de generar cortes y escisiones en el ADN. Al ser todas estas funciones compartidas entre estas proteínas, se supone un alto nivel de similitud a nivel de estructura considerando que son proteínas de carácter conservado a nivel de motivos y dominios dada la importancia de las funciones que cumplen (Wang, 1996).

En cuanto al análisis de Acoplamiento Molecular, este nos permite determinar si la ADN Topoisomerasa Tipo II de *Leishmania amazonensis*, tiene la capacidad de ser una diana terapéutica gracias a la unión de los fármacos que previamente han sido evaluados a nivel in vivo en promastigotes del parásito, de tal manera que sea posible validar si efectivamente la inhibición encontrada, se da por acción de la inhibición de esta proteína (Goodsell, Morris & Olson, 1996). En base a los resultados para la ADN Topoisomerasa Tipo II, para los 3 fármacos se obtuvo valores de Energía Libre de Unión favorables, al ser valores negativos, esto representa que la reacción de unión o acoplamiento ocurre de forma espontánea, dándose una reacción exergónica. En cuanto a los valores obtenidos para la Constante de Inhibición, se obtuvo valores considerablemente altos en el caso de la enrofloxacin y la glucantime, es decir, se requiere una alta concentración de estos fármacos para ocupar la mitad de los sitios de acoplamiento libres, en el caso de la moxifloxacin, la cantidad requerida es menor a las dos anteriores proteínas. Goodsell, Morris & Olson, 1996 muestran que, en el caso de encontrar una menor concentración inhibitoria, más afín será el fármaco a la proteína en cuestión, siendo en este caso la moxifloxacin el fármaco más afín. Los valores de Energía electrostática, se obtiene en base al potencial de atracción o repulsión de los fármacos y la proteína blanco, se espera que sean valores negativos ya que una carga electrostática negativa se obtiene a gracias una unión del fármaco a la proteína, en los tres casos, la energía electrostática fue negativa. En el caso de la Energía Intermolecular Total, esta corresponde únicamente a la sumatoria de todas las energías involucradas en el proceso de acoplamiento, en este caso, los valores de energía para los tres casos fueron favorables para los tres fármacos al ser valores negativos. Uno de los datos más importantes que arroja un estudio de Acoplamiento Molecular es la Frecuencia de Ocurrencia de acoplamiento, este porcentaje nos indica la probabilidad de que ocurra una interacción entre el fármaco y la proteína, en este caso, el mejor valor obtenido fue para la moxifloxacin que mostró una frecuencia de 100%, siendo este el fármaco más afín a nuestra

proteína de interés. Finalmente, para los valores de Superficie de Interacción, este valor mientras mayor sea, habrá una mayor interacción entre el fármaco y la proteína, en este caso, la superficie mayor fue para la moxifloxacina en relación con los otros dos.

En base a lo expuesto anteriormente y a los datos obtenidos para el acoplamiento molecular la moxifloxacina puede ser considerado como el fármaco más afín entre los evaluados experimentalmente para la unión con la ADN Topoisomerasa Tipo II en *Leishmania amazonensis*, seguida de la enrofloxacina, que mostró los segundos resultados más favorables. Estos resultados coinciden con lo reportado por Tufiño & Poveda, 2017, quienes en base a ensayos in vivo mostraron que los dos fármacos antes mencionados mostraron actividad inhibitoria frente al parásito; los resultados expuestos en el presente validan y confirman los resultados del ensayo experimental realizado previamente, pero le agregan la explicación molecular de lo observado experimentalmente sobre el parásito.

En cuanto al análisis de acoplamiento realizado para los mismos tres fármacos y la ADN Topoisomerasa Tipo II Isoformas Alfa y Beta en humanos, se encontró que efectivamente existe unión entre los fármacos probados y estas proteínas. Estos resultados no representan que necesariamente existe una reacción cruzada entre la proteína blanco y estas proteínas, ya que, en primer lugar, estos fármacos son compuestos ya validados clínicamente y que están presentes en el mercado. Estos resultados de unión de los fármacos a estas dos proteínas fueron reportados ya previamente por otros estudios; Reuveni, Halperin, Shalit, Priel, & Fabian, 2010, además de Wohlkonig et al, 2010, reportan que efectivamente existe un acoplamiento entre estos fármacos y la ADN Topoisomerasa Tipo II humana, en sus isoformas Alfa y Beta, y reportan que la unión entre la proteína del agente infeccioso se da 100 veces más que en el caso de las proteínas humanas. Esto se explica ya que, en el caso de humanos, estas proteínas se encuentran únicamente en células que se encuentran en un proceso de mitosis por lo que no se encuentran disponibles y en alta concentración. En contraste, en agentes bacterianos o

parasitarios, quienes pasan por un rápido y constante proceso de replicación, la presencia en altas concentraciones de esta proteína es crucial. En la base de datos de DrugBank, y PubChem, que son bases de datos y repositorios oficiales, muestran una serie de publicaciones que reportan un posible uso de estos fármacos en casos de tratamientos para cáncer gracias a esta unión a las proteínas humanas que permite la inhibición del crecimiento de células cancerígenas; de igual manera, en estas bases de datos se reporta ausencia de reacciones cruzadas de estos fármacos frente a las proteínas analizadas en este estudio.

CONCLUSIONES

El estudio computacional de interacciones proteína – fármaco es uno de los campos de investigación más amplios y estudiado dado el enorme potencial de diferentes compuestos químicos para ser usados en enfermedades para las cuales no han sido diseñados fármacos específicos; además del posible descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas y proteínas blanco que expliquen posibles efectos. Diferentes herramientas de bioinformática y biología computacional como modelamiento tridimensional de proteínas, análisis de calidad de proteínas, dinámica y acoplamiento molecular nos permiten realizar estudios que a nivel in vivo serían demasiado complejos, y nos permiten obtener información y datos valiosos. En el presente estudio, se mapeó en base a un análisis de secuencia de proteínas homólogas en otras especies de *Leishmania*, el gen que codifica para la proteína ADN Topoisomerasa Tipo II de *Leishmania amazonensis*. Se realizó una predicción de la estructura tridimensional en base a dos algoritmos distintos obteniendo una estructura tridimensional para la ADN Topoisomerasa Tipo II de *Leishmania amazonensis* partiendo de su secuencia. Se validó la estructura obtenida mediante diferentes métricas y parámetros de calidad. Se realizó un protocolo completo de dinámica molecular, y se mejoró la calidad de la estructura construida. Se detectó proteínas en humano que son similares a nivel estructural a la proteína ADN Topoisomerasa Tipo II de *Leishmania amazonensis*, y se cuantificó su nivel de similitud. Se obtuvo resultados favorables de interacción fármaco – proteína, lo cual nos permite inferir que, la enrofloxacin, moxifloxacin, y glucantime, se unen favorablemente al sitio activo de la ADN Topoisomerasa tipo II en *Leishmania amazonensis*, validando y dando el mecanismo molecular de los resultados obtenidos por Poveda, 2018, por lo que puede concluir que las fluoroquinolonas caracterizadas en el presente estudio pueden ser un potencial fármaco de acción contra la leishmaniasis.

RECOMENDACIONES

Se recomienda ampliar la metodología del presente trabajo de investigación a una búsqueda de sitios activos o cavidades compartidas entre las proteínas encontradas como candidatas a presentar reactividad frente a los antibióticos analizados de interés y la ADN Topoisomerasa Tipo II.

Se recomienda continuar con el trabajo de investigación, con una búsqueda y descubrimiento de fármacos y compuestos activos en base a la estructura obtenida mediante diferentes metodologías de escaneo virtual a gran escala considerando para ello una base de datos de librerías que alberguen millones de compuestos frente a la ADN Topoisomerasa II como el receptor de interés. Se recomienda fortalecer las conclusiones encontradas en el presente mediante evidencia y estudios a nivel experimental que validen los resultados para otras especies, en donde se aplique los antibióticos analizados de manera *in vivo* a un cultivo celular de otras especies del género *Leishmania*, a la par de un estudio computacional similar al presente de tal manera que se pueda evaluar de forma cuantitativa la capacidad de inhibición de estos antibióticos frente a la enzima de este parásito extrapolándola incluso a otras especies que causan esta infección a nivel mucocutáneo y visceral, y que las conclusiones no sean únicamente para una especie. En función de los resultados obtenidos, se recomienda realizar un escalamiento a ensayos a nivel preclínico, de tal forma que se pueda obtener evidencia mucho más robusta del funcionamiento de estos antibióticos frente a infecciones por leishmaniasis, al ser compuestos ya validados previamente para otro tipo de infecciones. Al ser este un estudio computacional de predicciones, se recomienda comprobar los resultados obtenidos a partir de la obtención de una estructura cristalográfica de la ADN Topoisomerasa Tipo II de *Leishmania amazonensis*.

Referencias Bibliográficas

- Ashfaq, U. A., Qamar, M. T., Kiran, S., Javed, M. R., Anwar, F., Ali, M. A., & Gilani, A. U. (2016). *Discovery of Novel Dengue NS2B/NS3 Protease Inhibitors Using Pharmacophore Modeling and Molecular Docking Based Virtual Screening of the ZINC Database*. *International Journal of Pharmacology*. 12 (6), 621-632
- Acosta K, Zavala J. (1996). *Proteínas de unión a DNA*. *Rev Biomed*; 7:163-172
- Ampudia, M. J., & Terán, E. (2014). *Prevalencia de Leishmaniasis cutánea en el Cantón de Pedro Vicente Maldonado en el periodo de tiempo 2012 y 2013*. Universidad San Francisco De Quito, Colegio de Ciencia de la Salud. Quito: Universidad San Francisco De Quito
- Aronson, N., Herwaldt, B. L., Libman, M., Pearson, R., Lopez-Velez, R., Weina, P., & Magill, A. (2016). *Diagnosis and treatment of leishmaniasis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH)*. *Clinical infectious diseases*, 63(12), e202-e264.
- Bañuls, A., et al. (1999). *Genetic analysis of Leishmania parasites in Ecuador are Leishmania panamensis and Leishmania guyanensis distinct taxa*. *American society of tropical medicine and hygiene*, Volumen 61, pp. 838-845
- Bhutani, I., Loharch, S., Gupta, P., Madathil, R., & Parkesh, R. (2015). *Structure, dynamics, and interaction of Mycobacterium tuberculosis (Mtb) DprE1 and DprE2 examined by molecular modeling, simulation, and electrostatic studies*. *PloS one*, 10(3), e0119771
- Bikadi, Z., Hazai, E. (2009). *La aplicación del método semi-empírico de PM6 para modelar proteínas mejora la precisión de acoplamiento de AutoDockJ*. *Cheminf*. 1, 15

- Calvopiña et al (2012). *Prevalencia y formas clínicas de las Leishmaniasis en el noroccidente de la provincia de Pichincha – Ecuador*. Rev Fac Cien Med (Quito); 37: 31-38
- Cardona-Arias, J. A., Vélez, I. D., & López-Carvajal, L. (2015). *Efficacy of thermotherapy to treat cutaneous leishmaniasis: a meta-analysis of controlled clinical trials*. *PLoS One*, 10(5), e0122569.
- Contreras, B. (2011). *Modelado comparativo de proteínas Homology modelling*. Zaragoza, España: Fundación ARAID
- Colovos, C., & Yeates, T. O. (1993). *Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions*. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 2(9), 1511–1519
- Delgado, J. (2016). *Detección y caracterización molecular de Leishmania en lesiones cutáneas de pobladores del Cantón Pedro Vicente Maldonado*. Quito, Ecuador: Universidad San Francisco de Quito
- Felix, J et al. (2011). *Leishmaniasis consideraciones generales y epidemiológicas*. Red de sociedades científicas medicas venezolanas. Alerta epidemiológica No 95
- Goodsell, D. S., Morris, G. M., & Olson, A. J. (1996). *Automated docking of flexible ligands: applications of AutoDock*. *Journal of Molecular Recognition: JMR*, 9(1), 1–5.
- Holm, L. & Laakso, L. (2016) *Dali server update*. *Nucleic acids research* 44 (W1), W351-W355.
- Jojoa, S. J. (2012). *Detección molecular de Leishmania spp en lesiones cutáneas del personal del Ejército Nacional de Colombia expuesto en zonas endémicas*. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.

- Karp, G. (2008). *Biología molecular y celular*. 5ta Ed. México DF, México: McGrawHill Educación
- Kato, H., Gomez, E. A., Martini-Robles, L., Muzzio, J., Velez, L., Calvopiña, M., & Hashiguchi, Y. (2016). *Geographic distribution of Leishmania species in Ecuador based on the cytochrome b gene sequence analysis*. PLoS neglected tropical diseases, *10*(7), e0004844.
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. (2015). *The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis*. Nature Protocols, *10*(6), 845-858.
- Lainson, R. S. J., 2002. New World Leishmaniasis: *The Ecology of Leishmaniasis and the Diversity of Leishmanial Species in Central and South America*. World Class Parasites, pp. 11- 31.
- Loayza, M. (2010). *Nueva estrategia terapéutica basada en nanotecnología contra leishmaniasis tegumentaria en Ecuador = New pharmacological strategy based in nanotechnology against cutaneous leishmaniasis in Ecuador*. Quito, Ecuador: Universidad San Francisco de Quito
- Melo, M. (2012). *Predicción in silico de la estructura y función de la proteína hipotética p284 de Trypanosoma cruzi*. Bogotá D.C, Colombia: Pontificia Universidad Javeriana
- Moult, J., Fidelis, K., Kryshchuk, A., Schwede, T., & Tramontano, A. (2014). *Critical assessment of methods of protein structure prediction (CASP) - round x*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, *82*, 1-6.
- Murray, P., Rosenthal, K. & Pfäuer, M. (2007). *Microbiología médica*. Madrid, España: ELSEVIER.

- Nenortas, E., Burri, C., & Shapiro, T. (1999). *Antitrypanosomal activity of fluoroquinolones*. American Society of Microbiology. 43 (8), 2066 - 2068
- Ochoa, R., Flórez, A. & Muskus, C. (2011). *Detección in silico de segundos usos de medicamentos con potencial acción leishmanicida*. Revista Ingeniería Biomédica. Vol 5. N°10. 10-16
- Poveda, A. (2018). *Replicación y reparación en parásitos del género de Leishmania: explotando las diferencias para desarrollar aproximaciones terapéuticas innovativas*. Quito, Ecuador: Centro Internacional de Zoonosis UCE.
- Reguera, R., Perez, Y., Redondo, C., Díaz, R. & Balaña, R. (2007). *La DNA Topoisomerasa tipo I de protozoos patógenos como diana terapéutica de fármacos antitumorales*. León, España: Departamento de Farmacología y Toxicología, Universidad de León
- Reuveni, D., Halperin, D., Shalit, I., Priel, E. & Fabian, I. (2019). *Moxifloxacin enhances etoposide-induced cytotoxic, apoptotic and anti-topoisomerase II effects in a human colon carcinoma cell line*. International Journal of Oncology. 37(2): 463-471
- Romero, I., Saravia, N., & Walker, J. (2005). *Selective action of fluoroquinolones against intracellular amastigotes of Leishmania (Viannia) panamensis In vitro*. American Society of Parasitologist. 91 (6), 1474 - 1479
- Sánchez, J; Serrano, S y Morell, S. (2012). *Actualizaciones. Leishmaniasis cutánea*. Madrid, España: Centro de Salud Virgen de Begoña.
- Shuler, M. & Kargi, F. (2002). *Bioprocess engineering. Basic Concepts*. 2da Ed. United States of America: Prentice Hall PTR.
- Soding, J. (2005). *Protein homology detection by HMM-HMM comparison*. Bioinformatics, 21(7), 951-960

- Tufiño, K. & Poveda, A. (2017). *Evaluación del efecto leishmanicida de drogas (Fluoroquinolonas y base de Schiff N°64 en promastigotes de Leishmania spp)*. Quito, Ecuador: Universidad Central del Ecuador
- Villa, J. (2014). *Nuevas estrategias para el tratamiento de la leishmaniasis: mecanismo de acción de lípidos antitumorales, interacción hospedero-parásito, y su posible utilidad terapéutica*. Centro de Investigación de Cáncer – CSIC. Universidad de Salamanca
- Walker J. (2005). *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*. The Proteomics Protocols Handbook. Humana Press. p607.
- Wallner, B., & Elofsson, A. (2003). *Can correct protein models be identified?* Protein science, 12(5), 1073-1086
- Wang, J. (1996). *DNA Topoisomerasas*. Revisión anual de bioquímica, 65 (1), 635-692.
- Weigel, M et al. (1994) *La leishmaniasis cutánea en la región subtropical del Ecuador: percepciones, conocimientos y tratamientos populares*. Sanit Panam 117 (5)
- Wohlkonig et al. (2010). *Bases estructurales de la inhibición de la quinolona de las topoisomerasas tipo IIA y la resistencia mediada por el objetivo*. Nature Structure and Molecular Biology. 17(9) 1152-1153
- Yang, J., Roy, A. y Zhang, Y. (2013) *Reconocimiento del sitio de unión proteína-ligando, utilizando la comparación de subestructura específica de unión complementaria y el alineamiento del perfil de secuencia*. Bioinformatics, 29: 2588-2595
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J. & Zhang, Y. (2015). *The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction*. Nature Methods, 12: 7-8.

- Zhang, Y. (2008). *I-TASSER server for protein 3D structure prediction*. *BMC Bioinformatics*, 9: 40
- Zhang, C., Freddolino, P. & Zhang, Y. (2017). *COFACTOR: Improved protein function prediction by combining structure, sequence, and protein-protein interaction information*. *Nucleic acids research*, 45: W291-299.
- Zhang, Y. & Skolnick, J. (2005) *TM-align: Un algoritmo de alineación de estructura de proteínas basado en Ácidos nucleicos*. *Research*, 33: 2302-2309
- Zorrilla, Victor et al (2005). *Factores de riesgo que determinan la transmisión de la leishmaniasis en el valle Llaucano, Chota-Cajamarca*. Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Anexos



Figura N° 1: Estructura predicha por el servidor web Phyre 2 para la proteína predicha de ADN Topoisomerasa Tipo II en *Leishmania amazonensis*

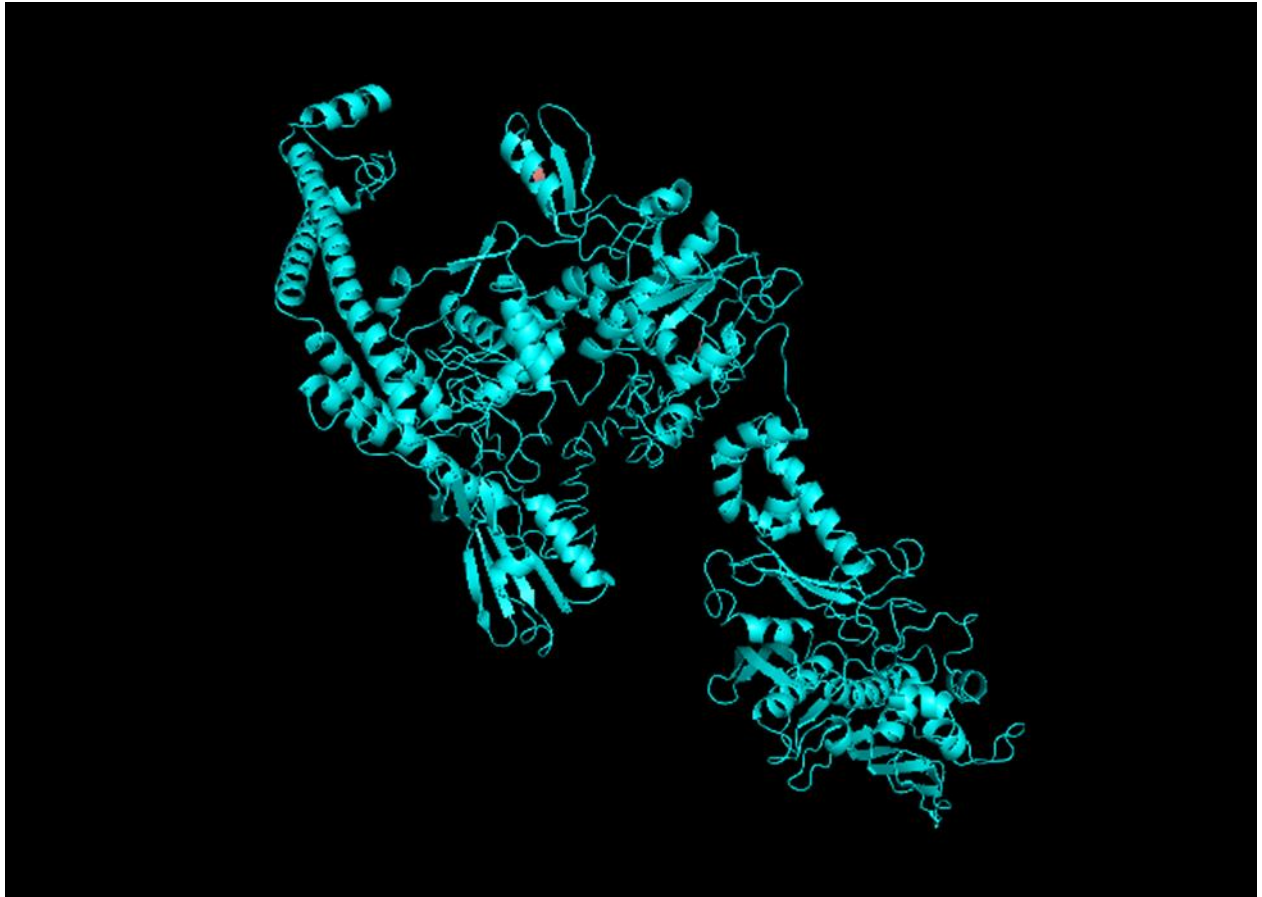


Figura N° 2: Estructura generada por el servidor web I-TASSER. Se muestra la estructura con el C-Score más alto de 0.92

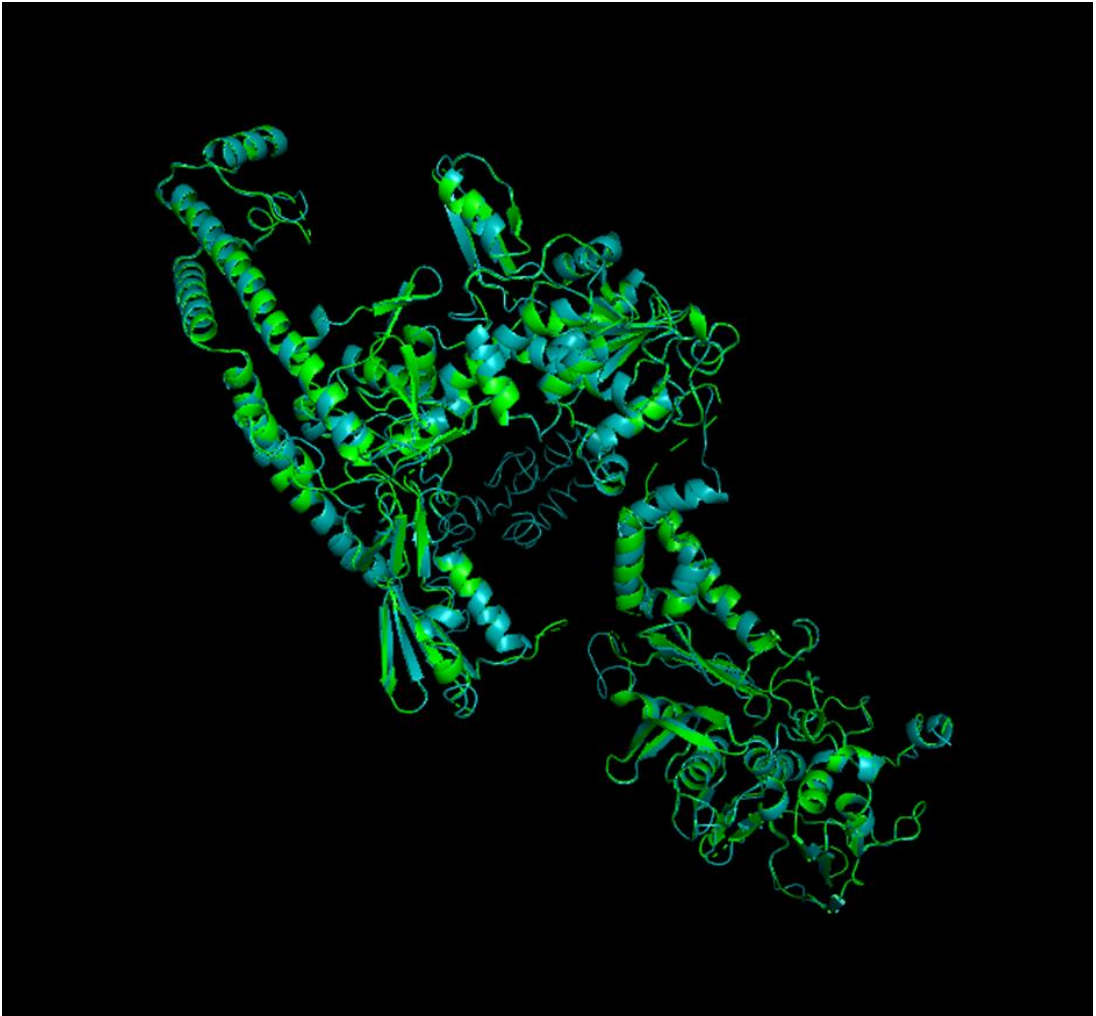


Figura N° 3: Superposición estructural entre la proteína predicha de ADN Topoisomerasa Tipo II en *Leishmania amazonensis* mediante la herramienta Phyre (verde) y TASSER (azul)

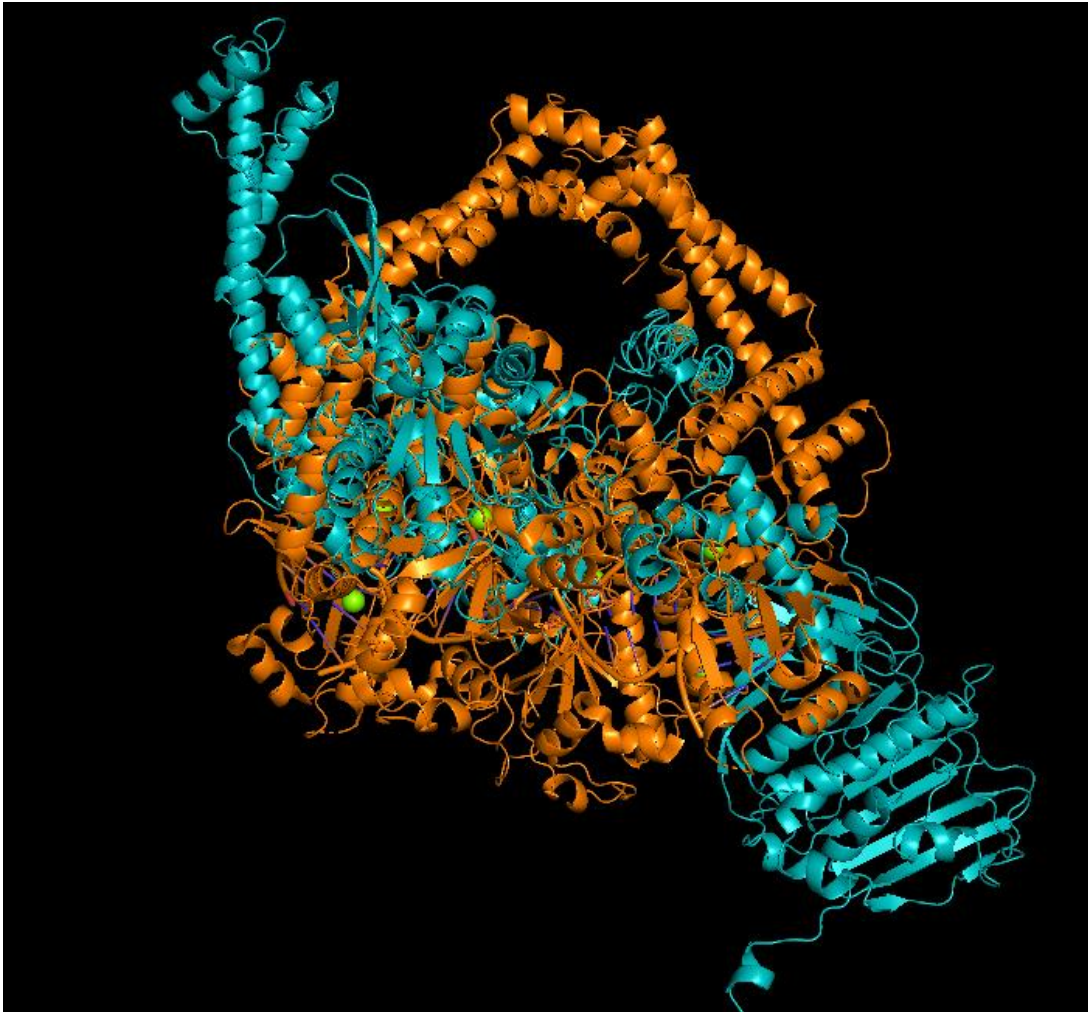


Figura N° 4: Superposición estructural entre la proteína predicha de ADN Topoisomerasa Tipo II en *Leishmania amazonensis* (Azul) con la proteína ADN Topoisomerasa Tipo II – Alfa (Naranja)



Figura N° 5: Superposición estructural entre la proteína predicha de ADN Topoisomerasa Tipo II en *Leishmania amazonensis* (Azul) con la proteína ADN Topoisomerasa Tipo II – Beta (Rosado)

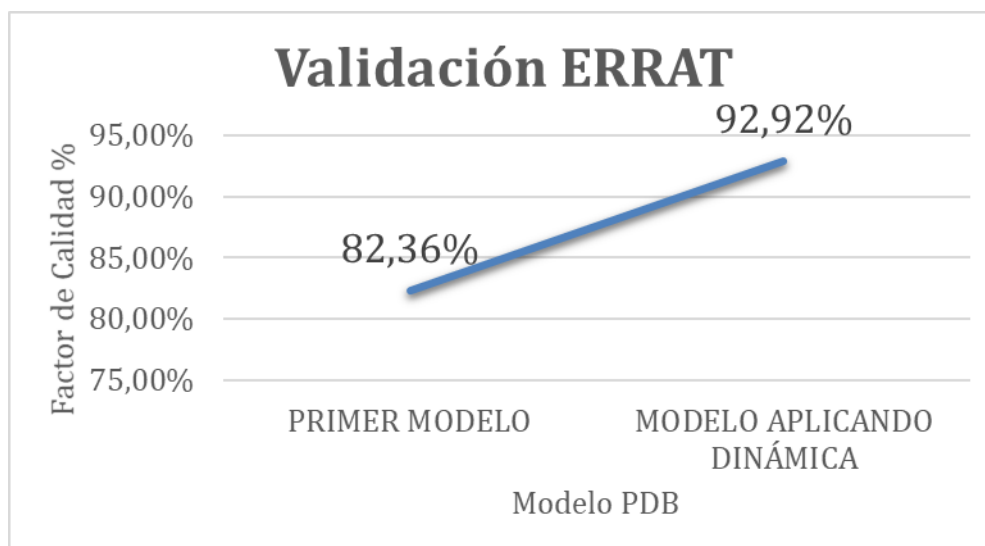


Figura N° 6: Validación cuantitativa para los modelos estructurales obtenidos mediante la herramienta de validación de ERRAT. La figura muestra una comparativa entre los valores de factor de calidad al obtener la estructura inicial y al finalizar el proceso de dinámica

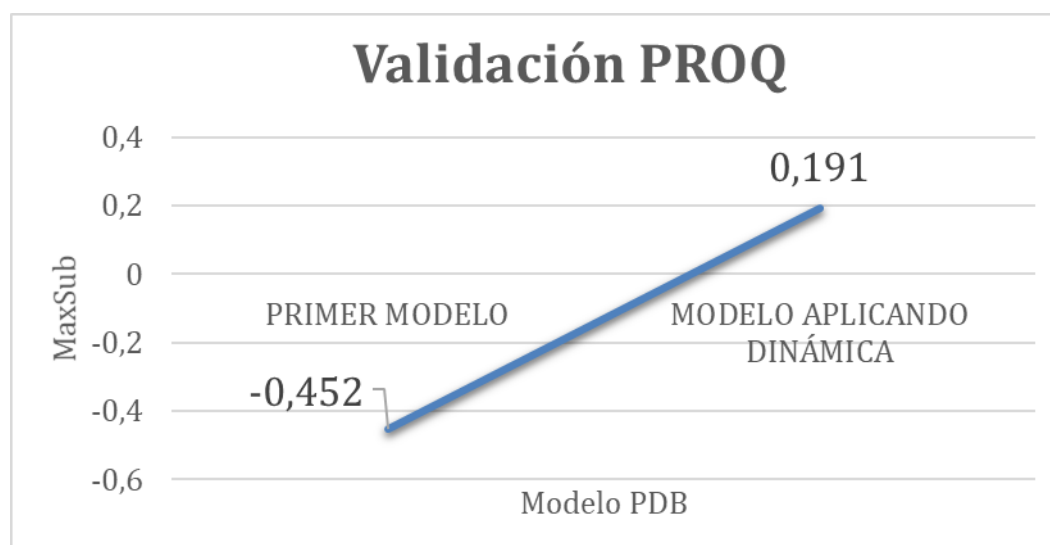


Figura N° 7: Validación cuantitativa para los modelos estructurales obtenidos mediante la herramienta de validación ProQ. La figura muestra una comparativa entre los valores de LGScore al obtener la estructura inicial, y al finalizar el proceso de dinámica molecular

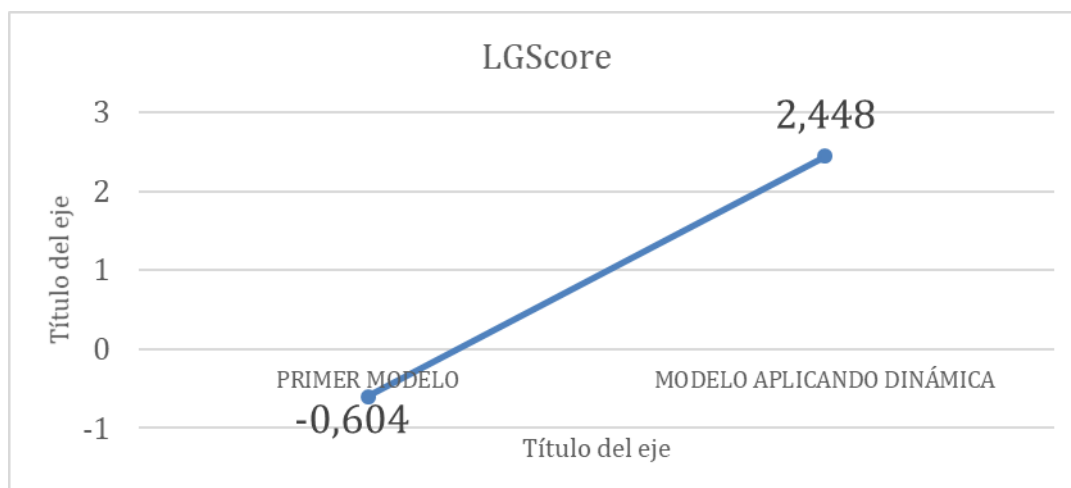


Figura N° 8: Validación cuantitativa para los modelos estructurales obtenidos mediante la herramienta de validación ProQ. La figura muestra una comparativa entre los valores de MaxSub al obtener la estructura inicial, y al finalizar el proceso de dinámica molecular

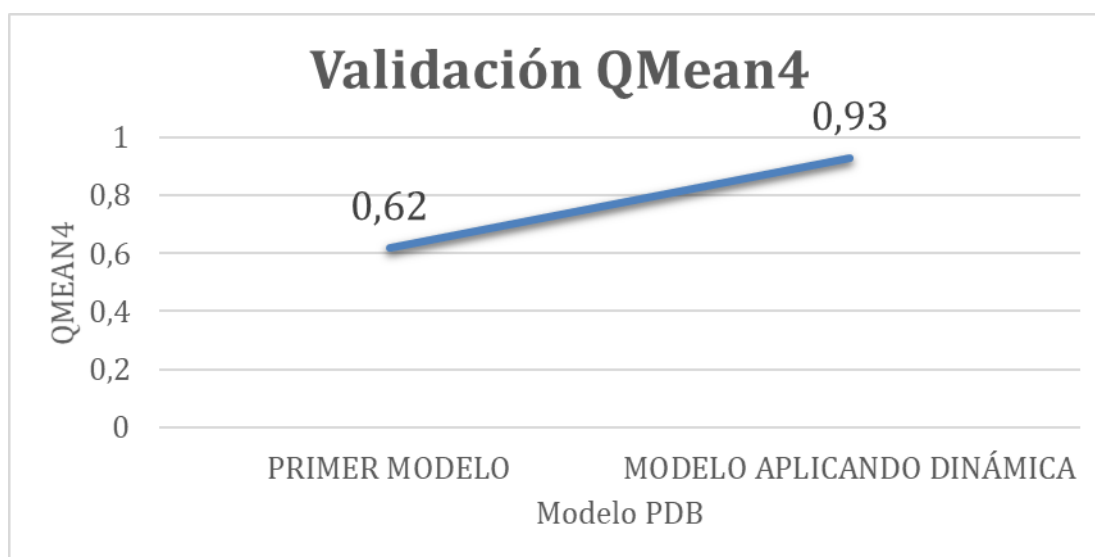


Figura N° 9: Validación cuantitativa para los modelos estructurales obtenidos mediante la herramienta de validación QMean. La figura muestra una comparativa entre los valores de QMeanDisCo al obtener la estructura inicial, y al finalizar el proceso de dinámica molecular

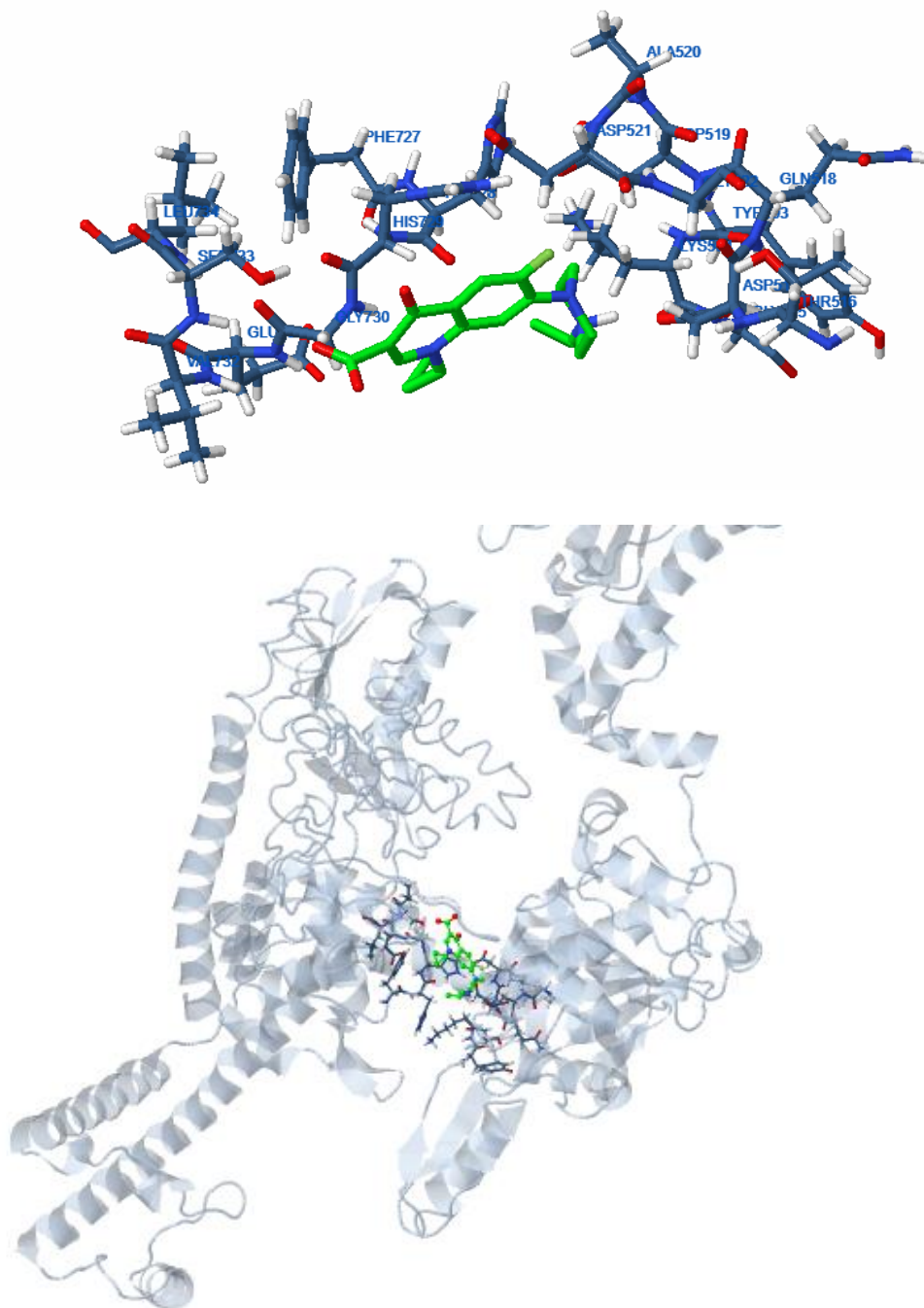


Figura N°10: Acoplamiento molecular entre Enrofloxacina y ADN Topoisomerasa Tipo II en *Leishmania amazonensis* Hacia la parte superior, se muestra la mejor posición obtenida para el acoplamiento de Enrofloxacina como ligando (verde), y el sitio activo (azul). El panel inferior muestra el sistema de acoplamiento completo entre ligando (verde), sitio activo (azul) y la proteína ADN Topoisomerasa Tipo II como receptor (gris)

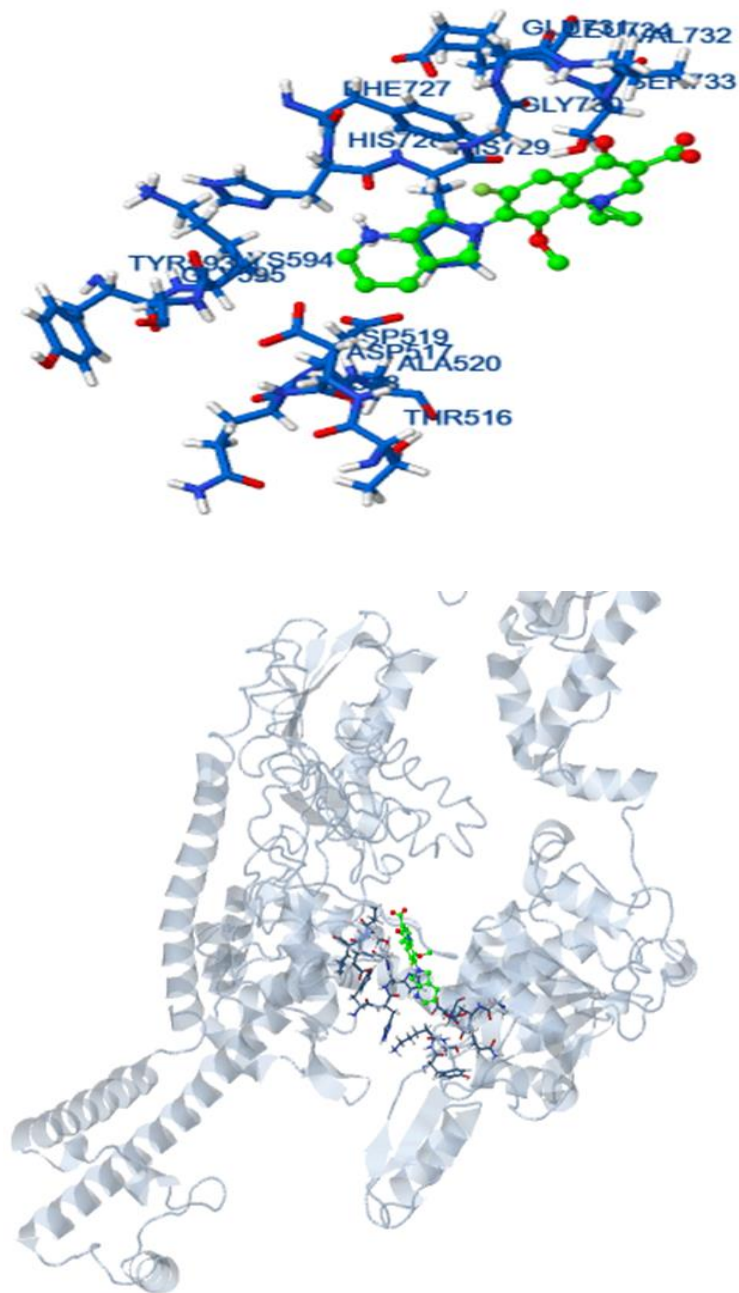


Figura N°11: Acoplamiento molecular entre Moxifloxacina y ADN Topoisomerasa Tipo II en *Leishmania amazonensis*. Hacia la parte superior, se muestra la mejor posición obtenida para el acoplamiento de Moxifloxacina como ligando (verde), y el sitio activo (azul). El panel inferior muestra el sistema de acoplamiento completo entre ligando (verde), sitio activo (azul) y la proteína ADN Topoisomerasa Tipo II como receptor (gris)

Tabla N°1: Secuencia nucleotídica obtenida para el gen de la ADN Topoisomerasa II, y secuencia de aminoácidos correspondiente en *Leishmania amazonensis*

Secuencia nucleotídica para la ADN Topoisomerasa Tipo II en <i>Leishmania amazonensis</i>
<p>CACCGCACGCACTCACTTCGAGTGCTTCCCTTACAGCAAAATGTGGGGCAGCAGACGACCGAGTTGCGCGCCGGCAAAC GCGCCACCCGCGTCGATAGGCTCACCTTGACGTTGCTCTTCTGCTCACCGGCTTCTTGTTCCTCAATACTGCGCGTGAGC CGACCAGCCGTTCCCCACACCGCGCGCAGCGCTATCCGACGACCTAGTGCCGCCGACGGACTCCCCAGGGCGGCGTTG CTCGGCGGCGGCTTCTCGTACTGGCAGGCGTGCACGCGGTACGCCGTCGCGCCCTTTGTAGACGCCTCCAGCATCAGCAG AGGCTGCCAAGCGCCGGCAGCTTACCCCGCCGTCGATGCTAGACGAGCGTTGCTCCTTCTGAATCGAGTTGATGAGCA CGCGCTCGTACTCCTGGAATGTCTTGTGCAACTTGTGAGCTCCGTCAGCCACATCTTACCGGGTCGCTTCTTTCAGTTC CTCGATCTGCGCTTGGCTTGGCTATGTCCGCTGGAGTTTCTCGGTGCTCGTGCAGGTTGAAGAAGGTGATAGGCTTCTT CAAGATGTAGTCGAAGCTCTCGTCCACGCGCAGGAGCCGAGTTTACGCGATGTCTTGTGAGCGTGTGCTGTGTGATT CAGGAAGTCGATCTGGCCCTGCCGGAAGTGTGTCGACGAACTTGCAGCTGACTGCAGACGGGCGAGATCCATCTCCATGA GCCCCATCTTGGGGTGCAGCGGCGCTTGTACAAGTCAAGGCGACGGTCTAGTGCCACTGCAGCACCGGCGAGAGGTCT GAGTCGATCGGGTAAGCGTGCCGGTGGGCGAGAAGACGGTGCCGTTGATGTAGATACGCTGCGCCAGTGCTAGGTCTGT TTCGACTCCGCCATGTGCTGTCAGCGAGCCTTCGCGCACGATGAGGTCGATGTCGATGTGGTTGGCGCCAGAGTAGTCGG CGATGCGTTGCACAACATCCGCGCTGGCGAGGACGAGATGTGCAGGCGAACGCTTCAATGCTCGTCATCCACGGAATT TCCGAAATATGGAAGCGACCATTTGGGTGCGCTGTGTACTTGCCACCGCGATGAACTCGTTGTCGGGGCCGCGCCGAC CGTGCCCTGGAAGCCCACGCCACGGCACGAGGTTGCGCATCACCTGCTTGGCCGACTCGCCGTTGATCATGGCTCGCA CCGCGGCCGAGACGTCGAGCGGGTGAATGCTGGGATCGTCTGGCGAAGCCGAAGCCGATGCCGACCGCACCGTTACA CAGCAGCATCGGCAGGATGGGAACGTAGTGGTGGGCTCCACGAACGTACCCTCTTCGTCATGTAGTCCAGGAGTGGGT CATCTCTCGGGGAACAGCAGGCGGGCAAAGCGGCTGAGCTTCGTAATAAATGTAGCGCGGGGACGCTGGTTCGCTGCC GAGCTGCTGTCGAGAGCCGAACCTGACCCTCTGGCACGAGCAGGTTGATGTTGTTGCCCCAGTGAAGTTCTGCGCCATCT TCACGATGGTCTCCTGCAGCGAGACCTCGCCGTGGTGAACGCCGACGCTCTGAGATGTAGCCCGACAGCTGCGCCACC TTCGACGCTCGGAGCTGTGGCGCCGACGATTGCCACAAAATCTTGGCTGCGACGGCTTACGTCGTCGACGCAATG CGGGATGGCGCGGGCGTTGCCGACGAGCGCAAGTGCACCATCTCCTTGTGCACAAATCCGGAATAGTCAGCGTCTTCT TGCTTCGATCGATATCAATCTCGCCCTGGAAGGCGTTTGCCTTCGTCATCCACTCCTTGCGCCACTCCACCTCGGCCGCGT CGAAGACGCTATCGAGCAGTTGGTGGTCCCTCGCGTCGACAGTGAGCTGCATGATGTTCTTCCATGTCCGAAAAACT CTTTGCCCTCCGCGTGGTTCGACGTGCCGAGACCTTTGTAGTACTTGGCCGTGTAGCGCGCACTCGGGTGGGCCCTGCCA GCGGTGGAAGTCGCGGAAGCTGTGAAGGCGATCACCTCCTTGGACTTGCCATTACCTTGATCTTACAATGGGGGTTG AGAAGAGAGAGATGTAGCCCGGGTGTCTGTCAGCAGCTTTGGCCACAGCGACTCGAAGGCGTTGATGACGAGGCCTTTA ATGTGCGAACCATCCGCGTCTTGTATCCGTCATGACGAGAAGCCGCTGATAGCGCAGCTCAGCCAGCGTTCCGGTACTCCTT ACCCAGCTCCAACCCTAGCGAGAGGAAGAGGCTTGCAGCTCCTTGCACGCTTGTAGCCGCTTACAGATTCTTGTTCGAC GTTACGAGCTTGCCACGACGTGGGAAGACACCACAATACTTCTTCTGCTCGCTGGAGAGCGAGTTGAGGGCGAGCGCCT TCGACAGATCACCTCTGTAATGATGAGCGTGCAGGATGTTCTGCCGCTGACCGCGACGAGGTGGCGTCGACGAGCTTC GTGATGGAGGATATGAGAGTCTTGTGCTCAGCCGCCGGCCGCGCCTATCTCCTTGTTCAGTTCGTTGCTGAGCTGGTGC TCCATGCTGTTACGTCGCGCTCCAGGAACGGCATCCTTCAAGGTACTTCTCCAACGTTTCTCGTACGCGCGGCATC GTTACTGTTGACACGAGCCGCGCCTTACTCTGCGAGTCGAACTTCGGCTGCGCTGCACGAGGAAGACGAGACTGTGAA GTGTGCTGCACCCGGTTTGTGTCCACCACCTTGGCGTTCTTCTTGAAATTCTTGTCTCAGCGAATCAAGGCAGGAGTCTAG GATGTCATGCGCGGCTTGCAGTGCCTGCCGCAATTGTACGTGACGACGCGCTTACGACGCTGACGATGCGCTTCCGGC TCTGCGTCAGCTGCGGCACATACGCGACGCTGCCGTTAGGGCTTGTGTACAAAACGGCTCAGGCGGCATCGACCCGTCC AGGCCGGACAGCGAGTAGAGCCGCGCTAGTCGGTAAATGAGCGGAAGCCGAAGGGTACGTTGTTACGCCGACCTCGA TCTTGAGAACATCGCGGCGAGGTCCATGATGCGCTTGTGACGACCCGCTTATGTCGAGCGAGATGGACGCGCTTGGG AAGCCAAAGTGCAGATAGTCTGGCATGAACTTACGCGTGTACGTTCTTCTCCTTCGGATCGACTCGATTACGCGCGGC GCCGTCGCCATCCGATGTGGTCCGTCAGCTCATGTGAACTTCTCGGCCGTCAGTGCAGGACGACGAGGAACTTCGT GGAGAGAATGTTGTCAGCTTGGCGCCGTAGCCGTGCCACCCGCTGTGCTGACGTCGAGTTCGTTATAGTTGGAGC</p>

TGGTCAGCAGGTGGCCAAACACCATCTCCGGGATGTACATCTTGTGCTCCCTGCTACGCACAATGGGGAGGCCGGCGCCG
 TCGTCTCGACCGTGATCTCCCCGTGTCGGAGATGTTGATGCTGATGTACGTCTGCCGACCGATCCCCTTACTGTTGGTG
 ATGTTGTCGCCCGCGTTGAGCAATATTTCTGCCACGATCTTCAAGAGGCCTTGGTTCACCCGCATCGTCTCCACACCATC
 TTGCCCTTCTCCGGATCGAAAATGTACATGGACGTGGGCTGGGTTTCGATGTGCCACGTACATCTCCGGCCGAAGGAG
 GACATGGTCGATCGGGGTGAGCTTCTTATACTTGAAGCGTCCGTCATCCTCTACCGCTTATATATATATATGAGTGTGG
 GGAAAGGGAGGGGGACGAGCCCGTGCA

Secuencia de aminoácidos para la ADN Topoisomerasa Tipo II en *Leishmania amazonensis*

HRTHSLRVLPLQQNVGQQTTELKLRHPRR*AHL DVALPAHRLVLQYCA*ADQPLPHTARS AIRRPSAADGLPRAALARR
 RLLVLAGVHAVRRRALCRRLQHQR LPKRRQLYPARDARRALLLN RVDEHALVLECLVELVELRQPHLHRRRLQFLDLR
 LRLGYVRLEFLGARAGEEGDRLLQDVVEALVHAHEAEFHACL VQRVCCIQEVDLALPEVLDELARRLQTGEIHLHEPDLA
 AALVQVKATVVVPLQHRREV*VDRAKRAGGREDGAVDVTLRQC*VCFALRPCRQRAFAHDEVDVDVVGARVVDALHNI
 RAGEGRDVQAERFNARHPRNFRNMEATIWVRCVLAHRDELV VGAAPHRALEAHRPRHEVAHLLGRLAVDHGSHRGRDVE
 RVECWDRRGEAEADADRTVTQHRQDGNVVVRLHERTLFVHV VQEWVILLGEQQAGKAAELRKNVARGSVVAEELLSRAE
 LTLWHEQVDVVAPSEVLRHLHDGLLQRDLAVVERRRL*DV ARQLRHLRRLGAVAPQHCPQNLALRRLQSV DAMRDGAGVA
 DEREVHLLVHKLNRNSQRLASIDINLALEGVCLRHPLLAPLHLGRVEDAIEQLV VPRVDSSELHDVLLHVRKILFALRRG RRAE
 TFVVLGRVARTRVGPCQRWKSRLWKAITSLDLPFTLIFTMGVEKREM*PGLFCSSFGHSDSKALMTRPLMCEPSAS*SVMTRS
 R**RSSASVRYSLPSSNPSEKRSKSSLHVLSRFRFLFR TFFSSLPRSGKTPQYFFCSLESELRASAF AESPSVMMSVRMFLPSDRDE
 VASTSFVMEDMRVLLLSRRPAPISLFFSVSWSSMLFTCASRNGILSRYSNVFFGTRGIVTVDTSRALLCESNFGCACTRKTSTV
 KCRC TRFVSTTL PFFLKFLLESERQESRMSMAALQCVPLYVTTPFTLTMRFGLCVSCGTYATLPLGLVYTN GSGGIDPSRPDS
 E*SRA*SVNERKPKGTLFSRTSILENIAARSMMLCSTRFMSSEMDALGKPKCA*SGMNFTRVTFSSFGSTRFTRGAV AIRMWSV
 QLMWNSRPSVRQTTFENFVERMFVSLAP*PCRP AVVDVESLL*LELVSRWPNTISGMYILCSLLRTMGRPAPSFSTVISPVSEMLM
 LMYVCR TDPLLLVMSAALSNISSITIFKRPWFTRIVSH TILPFSGSKMYMDVGVWSMLPTYISGRRRTWSIGVSFLYLEASVILY
 RLYIYMSVGEREGDEPV

Tabla N° 2: Predicción obtenida del software ProtParam sobre la composición a nivel atómico y fórmula química de la proteína predicha de ADN Topoisomerasa Tipo II en *Leishmania amazonensis*

Elemento	N° de átomos	Fórmula química	Peso molecular	Átomos cargados
Carbono C	6223	$C_{6223}H_{10089}N_{1907}O_{1736}S_{66}$	141515,26	Positivos
Hidrógeno H	10089			178
Nitrógeno N	1907			Negativos
Oxígeno	1736			121
Azufre	66			
Total Átomos	200021			

Tabla N° 3: Coeficientes de extinción predichos a partir del software ProtParam para la proteína predicha de ADN Topoisomerasa Tipo II en *Leishmania amazonensis*

Coeficiente de extinción y absorbancia a 280 nm asumiendo que todos los pares de residuos de Cisteína se encuentran como cistinas	98830 M ⁻¹ * cm ⁻¹ Abs. 0,698
Coeficiente de extinción y absorbancia considerando todos los residuos de cisteína reducidos	96830 M ⁻¹ * cm ⁻¹ Abs. 0,684

Tabla N° 4: Valores de vida media predicha a partir del software ProtParam para la proteína ADN Topoisomerasa Tipo II en *Leishmania amazonensis*

Parámetro	Valor
Vida media estimada	3,5 horas (reticulocitos de mamíferos, <i>in vitro</i>)
	10 minutos (levadura, <i>in vivo</i>)
	>10 horas (<i>Escherichia coli</i> , <i>in vivo</i>)

Tabla N° 5: Valores de índice de inestabilidad, índice alifático, y GRAVY a partir del software ProtParam para la proteína predicha de ADN Topoisomerasa Tipo II en *Leishmania amazonensis*

Índice	Valor obtenido
Índice de Inestabilidad	54,92. Catalogada como inestable
GRAVY	-0,103. (hidrofílica)
Índice alifático	95,76

Tabla N° 6: Resultados obtenidos para la predicción de la función molecular para la estructura proteica predicha de ADN Topoisomerasa Tipo II en *Leishmania amazonensis*

GO TERM	C SCORE	NAME
GO:0003918	0.99	DNA topoisomerase type II (ATP-hydrolyzing) activity
GO:1901363	0.83	heterocyclic compound binding
GO:0097159	0.83	organic cyclic compound binding
GO:0000166	0.78	nucleotide binding
GO:0035639	0.52	purine ribonucleoside triphosphate binding
GO:0032555	0.52	purine ribonucleotide binding
GO:0032550	0.52	purine ribonucleoside binding

Tabla N° 7: Resumen de las métricas de calidad mediante las herramientas de Errat, ProQ, y QMean4 para la proteína predicha de ADN Topoisomerasa Tipo II en *Leishmania amazonensis*. Se muestra con (**) aquellas métricas que mostraron una mejora significativa

Método	Métrica	Modelo	
		Primer Modelo	Modelo con Dinámica Molecular
ERRAT	Factor de Calidad	82,36%	92,92%**
PROQ	MaxSub	-0,452	0,191**
	LGScore	-0,604	2,448**
QMEAN4	QMEAN4 Value	0,62	0,93**

Tabla N° 8: Resumen de los principales Hits de proteínas humanas estructuralmente similares a la proteína predicha de ADN Topoisomerasa Tipo II en *Leishmania amazonensis* mediante BackPhyre

N	Proteína	Organismo	Cobertura	% Confianza	% Identidad	PDB ID
1	DNA topoisomerasa 2, beta isozyme	<i>H Sapiens</i>	1 – 1068	100	34	5GWJ
2	DNA topoisomerase 2, alfa isozyme	<i>H Sapiens</i>	1 – 1068	100	34	5GWK
3	Mismatch repair endonuclease PMS2	<i>H Sapiens</i>	49 – 228	99	18	1H7S
4	Protein ITPRID2	<i>H Sapiens</i>	49 – 281	99	17	2CS1
5	DNA mismatch repair protein MIH1	<i>H Sapiens</i>	49 – 281	99	14	3RBN
6	Piruvate dehidrogenase kinase isozyme 1, mitochondrial	<i>H Sapiens</i>	47 – 149	97,9	20	2Q8H
7	Piruvate dehidrogenase kinase isozyme 4, mitochondrial	<i>H Sapiens</i>	47 – 142	97,9	24	2ZDY
8	Heat shock protein 75kDa, mitochondrial	<i>H Sapiens</i>	58 – 233	97,8	16	5Y3O
9	Piruvate dehidrogenase kinase isozyme 3, mitochondrial	<i>H Sapiens</i>	54 – 149	97,6	18	2ONR
10	Piruvate dehidrogenase kinase isozyme 2, mitochondrial	<i>H Sapiens</i>	54 – 149	97,6	24	5M4P
11		<i>H Sapiens</i>	60 – 192	97,1	16	5LRZ

	Heat shock protein HSP. 90kDa. -Alfa. Isoform 1.					
12	Antígeno de rechazo tumoral, gp96 – 1	<i>H Sapiens</i>	60 – 192	97,1	19	4NH9
13	Heat shock protein 90kDa alfa (citosólico) proteína 1, beta	<i>H Sapiens</i>	60 – 213	96,9	13	5FWP
14	MORC family CW-type zinc finger 3	<i>H Sapiens</i>	58 – 278	96,8	16	5SVI

Tabla N° 9: Resumen de los principales Hits de proteínas humanas estructuralmente similares a la proteína predicha de ADN Topoisomerasa Tipo II en *Leishmania amazonensis* mediante DALI.v5

Entrada	Nombre de proteínas	Gen	Organismo	Largo
Q02880	DNA topoisomerase 2-beta (EC 5.99.1.3) (DNA topoisomerase II, beta isozyme)	TOP2B	<i>H sapiens (Human)</i>	1626
P11388	DNA topoisomerase 2-alpha (EC 5.99.1.3) (DNA topoisomerase II, 72lpha isozyme)	TOP2A TOP2	<i>H sapiens (Human)</i>	1531
P40692	DNA mismatch repair protein Mlh1	MLH1 COCA2	<i>H sapiens (Human)</i>	756
P08238	Heat shock protein HSP 90-beta	HSP90AB1 HSP90B HSPC2 HSPCB	<i>H sapiens (Human)</i>	724
P11802	Cyclin-dependent kinase 4	CDK4	<i>H sapiens (Human)</i>	303
Q16543	Hsp90 co-chaperone Cdc37	CDC37 CDC37A	<i>H sapiens (Human)</i>	378
Q12931	Heat shock protein 75kDa, mitochondrial	TRAP1 HSP75	<i>H sapiens (Human)</i>	704
P54278	Mismatch repair endonuclease PMS2	PMS2 PMSL2	<i>H sapiens (Human)</i>	862
Q15119	Piruvate dehidrogenase kinase isozyme 2	PDK2 PDHK2	<i>H sapiens (Human)</i>	407
P10515	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	DLAT DLTA	<i>H sapiens (Human)</i>	647
P07900	Heat shock protein HSP. 90kDa. -Alfa. Isoform 1.	HSP90AA1 HSP90A HSPC1 HSPCA	<i>H sapiens (Human)</i>	732

Tabla N 10: Resumen de los valores de para los Hits de proteínas estructuralmente similares versus la proteína predicha de ADN Topoisomerasa Tipo II en *Leishmania amazonensis* mediante *TM-Align*

PDB	Longitud de la cadena	Longitud de alineamiento	TM-Score
DNA topoisomerase 2, beta isozyme	317	257	0,60952
DNA topoisomerase 2, alfa isozyme	92	74	0,44606
Mismatch repair endonuclease PMS2	374	152	0,31162
Protein ITPRID2	365	172	0,29357
DNA mismatch repair protein MIH1	354	182	0,30543
Piruvate dehidrogenase kinase isozyme 1, mitochondrial	256	129	0,29864
Piruvate dehidrogenase kinase isozyme 4, mitochondrial	214	171	0,6213
Heat shock protein 75kDa, mitochondrial	638	433	0,51291
Piruvate dehidrogenase kinase isozyme 3, mitochondrial	677	649	0,90957
Piruvate dehidrogenase kinase isozyme 2, mitochondrial	724	691	0,89825
Heat shock protein HSP. 90kDa. -Alfa. Isoform 1.	207	169	0,62501
Antígeno de rechazo tumoral, gp96 - 1	343	174	0,32465
Heat shock protein 90kDa alfa (citosólico) proteína 1, beta	46	38	0,33301
MORC family CW-type zinc finger 3	433	303	0,51012
Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase	381	184	0,2985

Tabla N° 11: Resumen de los valores de para los Hits de proteínas estructuralmente similares versus la proteína predicha de ADN Topoisomerasa Tipo II en *Leishmania amazonensis* mediante alineamiento estructural en Pymol 1.7.4.5

PDB	Longitud de cadena	Longitud de alineamiento	Score de Alineamiento	RMSD
DNA topoisomerase 2, beta isozyme	317	257	974.500	4,52
DNA topoisomerase 2, alfa isozyme	92	74	1.111.000	4,06
Mismatch repair endonuclease PMS2	374	152	45.000	4,72
Protein ITPRID2	365	172	44.000	6,55
DNA mismatch repair protein MIH1	354	182	61.000	7
Piruvate dehidrogenase kinase isozyme 1, mitochondrial	256	129	48.000	6,12

Piruvate dehidrogenase kinase isozyme 4, mitochondrial	214	171	74.000	3,68
Heat shock protein 75kDa, mitochondrial	638	433	72.000	6,01
Piruvate dehidrogenase kinase isozyme 3, mitochondrial	677	649	50.000	2,36
Piruvate dehidrogenase kinase isozyme 2, mitochondrial	724	691	56.000	2,61
Heat shock protein HSP. 90kDa. -Alfa. Isoform 1.	207	169	47.000	3,89
Antígeno de rechazo tumoral, gp96 - 1	343	174	67.500	6,22
Heat shock protein 90kDa alfa (citosólico) proteína 1, beta	46	38	128.500	4,13
MORC family CW-type zinc finger 3	433	303	35.000	5,4
Dihydrolipoyllsine-residue acetyltransferase	381	184	42	7,1

Tabla N° 12: Resultados obtenidos para la predicción del sitio activo para la estructura proteica predicha de ADN Topoisomerasa Tipo II en *Leishmania amazonensis* mediante el algoritmo FINDSITE de I-TASSER

C-Score	Residuos del sitio de unión predichos
0,67	440,466,467,468,521,525,683,729,730,732
0,17	440,467,468,521,525,683,684,693,694,695,696,727,729,730,733,740,824,825,826,903,908,912
0,17	715,718,719,731,773

Tabla N°13: Resumen de resultados obtenidos para los análisis de acoplamiento molecular entre los fármacos enrofloxacin, moxifloxacin, y glucantime versus la ADN topoisomerasa tipo II en *Leishmania amazonensis* y las proteínas humanas con alta similitud

Fármaco	Proteína / Organismo	Energía libre de unión estimada kcal/mol	Constante de Inhibición (KI) uM	Energía electrostática Kcal / mol	Energía intermolecular total Kcal / mol	Frecuencia ocurrencia %
Enrofloxacin	Top2 <i>L. amazonensis</i>	-4,56	457,06	-1,24	-5,70	40
	Top 2. <i>H. sapiens</i> IAlfa	-4,49	512,48	+0,25	-5,66	50

	Top 2. <i>H. sapiens</i> Ibeta	-4,59	429,74	+0,08	-5,51	50
Moxifloxacina	Top2 <i>L. amazonensis</i>	-4,86	275,54	-0,68	-6,09	100
	Top 2. <i>H. sapiens</i> IAlfa	-4,50	499,35	-0,44	-5,95	50
	Top 2. <i>H. sapiens</i> Ibeta	-5,00	217,51	-0,36	-6,58	100
Glucantime	Top2 <i>L. amazonensis</i>	-4,25	768,44	-0,89	-3,46	20
	Top 2. <i>H. sapiens</i> IAlfa	-3,93	1,1	-1,22	-3,55	50
	Top 2. <i>H. sapiens</i> Ibeta	-4,5	506,4	-0,4	-3,46	50