

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



**DISEÑO *in silico* DE UNA MOLÉCULA CON PROPIEDADES  
GERMICIDAS INHIBIDORA DE LA ADN GIRASA DE  
*Pseudomonas aeruginosa***

Informe de Tesis

Elena Pacheco Vela

Química Farmacéutica

Guatemala, octubre de 2017

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure of a man in a red and white robe, likely a saint or scholar, holding a book. Above him is a golden crown with a cross on top. To the left and right are golden columns with banners that read 'PLUS' and 'ULTRA' respectively. Below the central figure is a white horse with a rider in blue, holding a spear. The background includes a golden castle and a volcano. The Latin motto 'CETERAS ORBIS CONSPICUA CAROLINA ACADEMIA COACTEMALTIUS INTER' is inscribed around the perimeter of the seal.

**DISEÑO *in silico* DE UNA MOLÉCULA CON PROPIEDADES  
GERMICIDAS INHIBIDORA DE LA ADN GIRASA DE  
*Pseudomonas aeruginosa***

Informe de Tesis

Presentado Por:  
Elena Pacheco Vela

Para optar al título de:  
Química Farmacéutica

Guatemala, octubre de 2017

## Junta Directiva

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	Decano
M.A. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza	Secretaria
MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo	Vocal I
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Andreina Delia Irene López Hernández	Vocal IV
Br. Carol Andrea Betancourt Herrera	Vocal V

## AGRADECIMIENTOS

- A Dios
- Por acompañarme, guardarme, ayudarme y bendecirme durante toda mi vida y por darme la fortaleza para seguir siempre adelante. Todo se lo debo a Él.
- A mi madre
- Por ser mi ejemplo a seguir, mi motor y mi razón de ser. Por tu gran amor y apoyo incondicional. Todo lo que soy es gracias a ti, enseñándome el verdadero significado del amor, fortaleza y humildad. Te amo y nunca terminaré de agradecerte todo lo que has hecho por mí. Sin ti, esto no hubiera sido posible.
- A mi hermana
- Mi cómplice en todo y mi mayor confidente. Mi vida es mejor porque tú estás en ella. No podría haber pedido mejor hermana y amiga, siempre a mi lado y apoyándome en todo, y mi razón por querer ser una mejor persona.
- A mi abuela
- Aunque ya no está con nosotros, le agradezco todo su amor y cuidados durante el tiempo que Dios me permitió estar a su lado.
- Tía Telmita, Mynor, Wendy y Elizabeth
- Gracias por recibirme en su casa como una más de su familia, por todo el apoyo y la ayuda que fue indispensable para poder lograr esta meta.
- Tío René y Dra. Cristy
- Gracias por la paciencia y por siempre estar al pendiente de mí; y por auxiliarme cuando más lo necesité.
- A mi familia (tíos y primos)
- Tía Flory, Miguelito, Susy, Miguel Ángel, Tía Elenita, Andrea, Milly, Tío Maco, Maquito, Alejandro y Jorgito, gracias por las porras, los consejos, el apoyo y por siempre creer en mí.

A Gordo y Mónica

Me enseñaron valiosas lecciones de vida que nunca olvidaré, y aunque ya no estén con nosotros, siempre los llevaré en mi corazón.

A mis amigos

En orden de aparición: Maytté, Michelle, Gaby, Evelyn, Claudia, Marie, Ale, por su apoyo y amistad; Carlos, quien me empujó y me acompañó hasta en los últimos desvelos. A todos, gracias por sus consejos y por nunca dejar que me diera por vencida. Mi vida durante la universidad no hubiera sido la misma sin ustedes.

A Rony Letona

Gracias por ser mi maestro extraoficial, por ayudarme y acompañarme hasta el final.

A mis asesores Omar Velásquez y Delia Arriaza

Gracias por su apoyo, su ayuda, por estar pendientes y por creer en mí.

A mi revisora Licda. Lucrecia Peralta de Madriz

Gracias por su apoyo y entusiasmo durante esta experiencia, y por animarme a seguir adelante.

A la Escuela de Química Farmacéutica y la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

Por formarme cómo profesional tanto académica como moralmente. Prometo siempre poner en alto el nombre de nuestra facultad a donde quiera que vaya.

A la Universidad de San Carlos de Guatemala

Por darme la oportunidad de cumplir esta meta, que más que una meta, es un sueño hecho realidad.

## DEDICATORIA

*“Es, pues, la fe la certeza de lo que se espera, la convicción de lo que no se ve”.* Hebreos 11:1

Este logro está especialmente dedicado a las dos personas más importantes en mi vida: mi madre, Brenda y a mi hermana, Melanie, sin quienes no solo no hubiera sido posible, sino tampoco tuviera sentido. A pesar de los malos momentos, juntas hemos luchado y logrado muchas cosas, encontrando una razón para reír.

Gracias por aceptarme y quererme como soy. Ustedes son mi mayor bendición, las amo y no me alcanzaré la vida para demostrárselo.

*“Reflect upon your present blessings, of which every man has many, not on your past misfortunes, of which all men have some”.* -Charles Dickens

*“Sobre toda cosa guardada, guarda tu corazón;*

*Porque de él mana la vida”.* Proverbios 4:23

# ÍNDICE

1.	RESUMEN .....	1
2.	INTRODUCCIÓN .....	3
3.	ANTECEDENTES .....	5
4.	JUSTIFICACIÓN.....	9
5.	OBJETIVOS .....	11
6.	HIPÓTESIS .....	12
7.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	13
8.	RESULTADOS .....	23
9.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	40
10.	CONCLUSIONES .....	44
11.	RECOMENDACIONES .....	45
12.	REFERENCIAS.....	46
13.	ANEXOS .....	52
13.1.	Marco Teórico.....	52
13.1.1.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	52
13.1.2.	Resistencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	53
13.1.3.	Resistencia a antimicrobianos.....	54
13.1.4.	Resistencia a agentes químicos .....	57
13.1.5.	Estructura tridimensional del ADN girasa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	58
13.1.6.	Las Quinolonas.....	59
13.1.7.	Propiedades Fisicoquímicas y Químicas de las Quinolonas.....	66
13.1.8.	Actividad Fisiológica.....	78
13.1.9.	Mecanismo de resistencia de microorganismos a quinolonas fluoradas .....	81
13.1.10.	Diseño <i>in silico</i> de moléculas.....	84



13.1.11. Diseño <i>de Novo</i> .....	86
13.1.12. Docking .....	89
13.1.13. Pasos para el Docking .....	90
13.1.14. QSAR y ADME/Tox .....	91
13.2. Acoplamiento molecular de las quinolonas de referencia utilizadas .....	95
13.3. Estructura química de los mejores 20 candidatos del diseño <i>de novo</i> .....	105
13.4. Sustituyentes asignados a las posiciones seleccionadas de la estructura base de quinolona para el diseño <i>de novo</i> .....	111
13.4.1. Script utilizado para el diseño <i>de novo</i> .....	112
13.5. Estructuras generadas en el diseño <i>de novo</i> en código SMILE.....	114
13.6. Parámetros de la dinámica molecular para el ADN girasa de <i>P. aeruginosa</i> ...	159

## 1. RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo principal el diseño *in silico* de una molécula con potencial germicida, inhibidora del ADN girasa de *Pseudomonas aeruginosa* por medio de programas computacionales de enlace automatizado.

La *Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno nosocomial común, que causa infecciones con una alta tasa de mortalidad, en parte atribuible a la alta resistencia intrínseca del organismo a muchos antimicrobianos. Dicha resistencia adquirida en este organismo es multifactorial y atribuible a las mutaciones como en las enzimas ADN girasa y topoisomerasa IV. Las quinolonas son un grupo de antimicrobianos cuyo mecanismo de acción se basa en la inhibición ADN girasa, por lo que se utilizó su estructura base para el diseño de la nueva molécula.

Primero, se identificó el sitio activo del ADN girasa y se hizo un acoplamiento molecular (docking molecular) de todas las quinolonas con posible actividad inhibitoria. Luego, se analizaron las energías de enlace y las interacciones proteína-ligando resultantes del acoplamiento molecular para determinar el espacio químico farmacofórico del sitio activo. Se determinó que dicho sitio está conformado por los aminoácidos GLU7, ILE8, VAL28, ARG47, HSD78, PRO79, HSD80, TYR149 y VAL621 y se obtuvo que la quinolona con la mejor energía de enlace fue temafloxacina, con -8.9 Kcal/mol.

A continuación, se llevó a cabo el diseño *de novo* a partir del análisis conformacional y la relación estructura - actividad de las quinolonas previamente acopladas. Para ello se tomó en cuenta únicamente aquellos grupos sustituyentes que aportaran a la actividad germicida y espectro de acción deseado y una energía de enlace lo suficientemente negativa sin sacrificar la seguridad. El diseño se realizó "manualmente", debido a que la falta de disponibilidad de programas que reunieran los criterios necesarios para realizar el diseño *de novo*. Se le asignó un grupo pequeño de posibles sustituyentes a cada posición del anillo de quinolona donde una sustitución fuera posible (posiciones 1, 5, 6, 7 y 8) y se escribió un script en la línea de comando del servidor (Linux) que produjo todas las

combinaciones posibles. Este generó un total de 6, 992 moléculas y se comprobó su eficiencia ligando-receptor por medio del acoplamiento molecular.

Finalmente, la energía de enlace de la molécula seleccionada es de -8.5 Kcal/mol y para su selección se tomó en cuenta energía, la farmacocinética y toxicidad. La molécula cumple con Lipinski y tiene un comportamiento similar al de ciprofloxacina y levofloxacina en cuanto a los parámetros de farmacocinética y toxicidad evaluados *in silico*, por lo que se considera que es un buen candidato con posible actividad germicida inhibitoria del ADN girasa de *Pseudomonas aeruginosa*, cumpliendo así con el objetivo principal de ésta investigación.

## 2. INTRODUCCIÓN

El tratamiento de las infecciones ha cambiado significativamente desde el desarrollo de la penicilina. Sin embargo, aún en la actualidad, existe una batalla contra las bacterias, puesto que el uso de los antibióticos, sobre todo el uso no apropiado, ha causado que existan mutaciones y selección artificial, de manera que existen cada vez más cepas resistentes a antibióticos.

Una bacteria especialmente perniciosa es la *Pseudomonas aeruginosa*, un patógeno nosocomial común que causa infecciones con una alta tasa de mortalidad. Esta bacteria se conoce dentro de los hospitales guatemaltecos, incluyendo el Roosevelt y el San Juan de Dios. Inclusive, en el hospital de Amatitlán ha existido una expansión considerable de la bacteria entre la población infantil, expresada sobre todo de manera cutánea.

La alta tasa de mortalidad causada por la *Pseudomona* es en parte atribuible a la alta resistencia intrínseca del organismo a muchos antimicrobianos, particularmente a múltiples fármacos en los hospitales, lo que complica la quimioterapia anti-pseudomona; razón por la cual el tratamiento de las infecciones nosocomiales causadas por cepas de *P. aeruginosa* es un verdadero desafío en la actualidad. De hecho, varios estudios indican que hay una relación entre la resistencia a múltiples fármacos y un aumento en la morbilidad/mortalidad, así como también un aumento en la estadía en el hospital y por lo tanto los gastos hospitalarios.

La resistencia adquirida en este organismo es multifactorial y atribuible a las mutaciones cromosómicas. Un ejemplo de esto son las mutaciones en las enzimas ADN girasa y topoisomerasa IV. Las quinolonas son de especial interés ya que son medicamentos que tienen su mecanismo de acción en el ADN girasa. Las bacterias gramnegativas, han creado mecanismos de resistencia a las quinolonas, por medio de mutaciones cromosómicas, produciendo un plásmido conjugativo, conocido como qnr (quinolona resistente), que protege tanto el ADN girasa como la topoisomerasa IV de la acción de las quinolonas.

El aumento de la resistencia bacteriana a los antibióticos y germicidas conocidos obliga a la búsqueda de nuevos métodos para el combate de bacterias oportunistas que puedan complicar la vida de un paciente al ingresar a un hospital.

Puesto que el diseño tradicional de nuevos fármacos es un proceso largo y difícil, donde es necesario gastar una cantidad considerable de recursos, sin que necesariamente estos reeditúen. En un país en desarrollo como Guatemala, no existen laboratorios farmacéuticos que se dediquen a la investigación de nuevas moléculas por el tiempo y recursos que se necesita. El diseño *in silico* de una molécula con propiedades germicidas inhibidora del ADN girasa de la *P. aeruginosa* permitiría una simplificación en el abordaje del problema, al desarrollar por medio de metodologías computacionales, una molécula nueva capaz de bloquear el funcionamiento del ADN girasa, disminuyendo así considerablemente los costos en investigación.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1. Estudios Realizados

##### 3.1.1. Estudios Internacionales

A nivel internacional se encuentran varias investigaciones que buscan encontrar por medio del diseño de drogas *in silico* nuevas moléculas con actividad inhibitoria de la ADN girasa de microorganismos como *Escherichia coli*, principalmente, además de otros organismos como *S. aureus*, *H. influenzae*, *E. faecalis*, *M. tuberculosis*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, entre otras; pero no específicamente del ADN girasa de *Pseudomonas aeruginosa* utilizando la estructura base de las quinolonas, aunque si se encuentran investigaciones que buscan nuevos mecanismos de inhibición como proteínas, ligandos o enzimas para la inhibición de *P. aeruginosa*. A continuación, se exponen dichas investigaciones.

- 3.1.1.1. Jayashree, B., Thomas, S. y Nayak, Y. (2009). Utilizaron un enfoque racional para el diseño y síntesis de moléculas líder basadas en la estructura base 2-quinolonas con acción sobre la subunidad A del a ADN girasa de *Escherichia coli* (*Design and synthesis of 2-quinolones as antioxidant and antimicrobials: a rational approach*). Para ello se realizaron simulaciones de docking y análisis de relación estructura actividad cuantitativa (QSAR por sus siglas en ingles) y se realizó ensayos de actividad antibacteriana a los compuestos sintetizados sobre los microorganismos *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.
- 3.1.1.2. Henning, J., Brengel, C., Philipp, M., et. al. (2013). Hicieron una "Combinación de métodos *in silico* y biofísicos para el desarrollo de inhibidores sensibles a cuórum (o autoinducción) de *Pseudomonas aeruginosa* como un abordaje alternativo para el diseño de drogas basado en estructura". En este estudio se realizó la optimización de un inhibidor de PqsD, una enzima esencial para el aparato sensor de cuórum de *P. aeruginosa* por medio de estudios de docking molecular y métodos biofísicos

con los cuales se dilucidó el modo de acción del ácido 5-arilo-ureidotiofeno-2-carboxílico y se obtuvo un inhibidor covalente.

- 3.1.1.3. Adam, J., Zdeněk, K., Prokop, M., Wimmerová, M. y Koča, J. (2008). Realizaron una investigación sobre la "Mutagénesis *in silico* y estudios de docking de la lectina PA-III de *Pseudomonas aeruginosa* para la predicción de mecanismos de unión y energías". Se estudió las interacciones de una lectina bacteriana PA-III dependiente de calcio y sus mutaciones *in silico* con ligandos sacáridos y las estructuras resultantes y las energías de unión proporcionadas fueron evaluadas en términos de exactitud. Los métodos de docking molecular probaron ser eficientes en la identificación de los mecanismos de unión correctos y en la predicción de los cambios de preferencia causados por mutación.
- 3.1.1.4. Ostrov, D., Hernández, J., Corsino, P., et. al. (2007). En su investigación "Discovery of Novel DNA Gyrase Inhibitors by High-Throughput Virtual Screening" utilizaron un docking molecular basado en estructuras para identificar moléculas nuevas que actuaran sobre sitios distintos a aquellos sobre los que actúan las quinolonas. Se realizó un docking molecular de una base de datos de ligandos químicos conteniendo aproximadamente 140, 000 moléculas pequeñas (peso molecular menor a 500) a dos sitios del ADN girasa de *Escherichia coli* actuando sobre un sitio de unión (binding pocket) previamente inexplorado formado en la interfase dimérica de la subunidad A y sobre una pequeña región del sitio de unión del ATP en la subunidad B que se traslapa con el sitio de acción de las cumarinas y las ciclotialidinas. Con este enfoque se identificó varios compuestos moleculares pequeños capaces de inhibir la actividad de superenrollamiento del ADN girasa de *E. coli* y que no se relacionan estructuralmente a otros inhibidores de la girasa previamente identificados.

### 3.1.2. Estudios Nacionales

En Guatemala no se han realizado investigaciones sobre el diseño *in silico* de una molécula con propiedades germicidas inhibidora del ADN girasa de la *Pseudomonas aeruginosa*, ya que el área de química computacional enfocada a fármacos ha sido estudiada sólo hasta en años recientes. Sin embargo, existen ya algunos proyectos que se han realizado sobre el diseño *in silico* de moléculas; más específicamente, se ha estudiado el VIH y cómo inhibir su crecimiento de múltiples maneras, así como también los sitios de acción involucrados para el tratamiento del Alzheimer.

- 3.1.2.1. En el 2012, Vargas, R. realizó la última de las investigaciones en esta vía. Ésta buscó diseñar un nuevo antirretroviral con base a otros 3 ya existentes (Lopinavir, Darunavir y Tipranavir), utilizando de receptor la VIH-proteasa. El conocimiento acumulado en proyectos anteriores se utilizó en este. Este terminó de abrir las puertas al estudio de espacios químicos para la mejor comprensión de los mecanismos de reacción en el cuerpo. Además, se comenzó a trabajar diseño *in silico* de péptidos y moléculas pequeñas con el fin de tratar algunas enfermedades.
- 3.1.2.2. Carrascoza, J., Cobar, O. y Vargas, R. (2010), llevaron a cabo una "Elucidación del sitio de reacción de calyxaminas A y B en la acetilcolinesterasa y diseño de un fármaco derivado de calyxaminas A y B potencialmente activo contra el Alzheimer, por medio de nanotecnología computacional", en la Dirección General de Investigación (DIGI) en la Universidad de San Carlos de Guatemala. El objetivo de este trabajo fue diseñar un nuevo fármaco que inhibiera exitosamente la acetilcolinesterasa, tomando como base para el diseño, las propiedades farmacofóricas de las Calyxaminas A y B y su sitio de enlace a la Acetilcolinesterasa, utilizando la innovadora técnica de la Nanotecnología Computacional para este diseño. Esta alternativa, en cuanto al desarrollo de fármacos activos contra el Alzheimer, ofreció la ventaja de diseñar directamente con base al sitio activo de la enzima que se quiere inhibir en



forma directa, por lo que la eficiencia del candidato líder que se obtuvo por esta técnica, es superior por mucho, en su eficiencia en el tratamiento de esta enfermedad y tiene un impacto económico comercial de escala mundial en el tratamiento de una de las enfermedades más comunes de la tercera edad.

## 4. JUSTIFICACIÓN

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria que representa un problema importante de salud en centros hospitalarios. Una vez que se establece la infección, *P. aeruginosa* produce una serie de compuestos tóxicos que causan no sólo daño tisular extenso, sino adicionalmente interfieren con el funcionamiento del sistema inmune. Esta situación se ve agravada por la dificultad para tratar las infecciones por *P. aeruginosa*, ya que esta bacteria presenta una muy alta resistencia natural a distintos antibióticos, entre ellos las quinolonas y desinfectantes (Vásquez, C., 2012).

Según el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS), de enero a junio del 2015, se han reportado un total de 860 infecciones nosocomiales a nivel de la República, siendo estas registradas en el área de la Unidad de Terapia Intensiva de Adultos con 219 casos, en los departamentos de Alta Verapaz, Chiquimula, Quetzaltenango, Quiché y Santa Rosa. Asimismo, hay 170 casos reportados en el área de Cirugía, en los departamentos de Escuintla, Quetzaltenango y Sacatepéquez. Por último, están las áreas de Pediatría y Neonatología con 158 y 120 casos reportados, respectivamente. Sin embargo, aunque no se conoce la etiología de dichas infecciones se sabe que en el pasado la *Pseudomonas aeruginosa* ha sido uno de los responsables principales de brotes anteriores. Esto es de suma importancia ya que muchas veces la muerte del paciente se debe a una enfermedad nosocomial secundaria a la razón inicial de ingreso al hospital.

La *P. aeruginosa* tiene una gran habilidad para sobrevivir en ambientes acuosos con nutrientes mínimos, y como consecuencia de su gran versatilidad metabólica, estos organismos han llegado a ser problemáticos en los ambientes hospitalarios, donde esta especie ha sido aislada de una elevada variedad de soluciones acuosas, incluyendo desinfectantes, jabones, fluidos de irrigación y de diálisis y, sus equipamientos.

La resistencia adquirida en este organismo es multifactorial y atribuible a las mutaciones cromosómicas. Un ejemplo de esto son las mutaciones en las enzimas ADN girasa y topoisomerasa IV. Las quinolonas son de especial interés ya que son medicamentos que

tienen su mecanismo de acción en el ADN girasa. Las bacterias gramnegativas, han creado mecanismos de resistencia a las quinolonas, por medio de mutaciones cromosómicas, produciendo un plásmido conjugativo, conocido como qnr (quinolona resistente), que protege tanto del ADN girasa como la topoisomerasa IV de la acción de las quinolonas.

El análisis QSAR (por sus siglas en inglés Quantative Structure-Activity Relationship), docking y diseño *de novo* son técnicas novedosas que generan resultados más efectivos, que los métodos de desarrollo de fármacos convencionales y además son respuestas novedosas a los problemas de salud, ciencia, industria y economía de Guatemala. El uso de estos métodos garantiza que, después de cierto tiempo de cálculos, se produzca al menos una molécula con las características deseadas y que sea viable para su utilización, así como establecer sitios conservados en el sitio activo con poca o ninguna mutación.

Las enfermedades nosocomiales causadas por *P. aeruginosa* son un grave problema tanto a nivel mundial como nacional por lo que el diseño de una molécula con acción germicida sobre la *P. aeruginosa* es de suma importancia. Ya que daría la pauta para la síntesis de una molécula con acción germicida sobre *P. aeruginosa* que pudiera ser utilizada como fármaco para disminuir la incidencia de enfermedades causadas por esta bacteria lo que a su vez reduciría gastos intrahospitalarios.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo General

- 5.1.1. Diseñar una nueva molécula que ofrezca propiedades germicidas inhibidora del ADN girasa utilizando métodos asistidos por computadora.

### 5.2. Objetivos Específicos

- 5.2.1. Identificar *in silico* el sitio activo del ADN girasa en el que se acoplan las moléculas activas, basándose en las estructuras químicas de las quinolonas.
- 5.2.2. Realizar un acoplamiento molecular (docking molecular) con las posibles estructuras de quinolonas que posean propiedades germicidas inhibidora del ADN girasa de *Pseudomonas aeruginosa*.
- 5.2.3. Determinar un espacio químico farmacofórico relevante en el sitio activo del ADN girasa de *Pseudomonas aeruginosa*.
- 5.2.4. Comprobar *in silico* la eficiencia ligando-receptor de la molécula diseñada, por medio de programas de enlace automatizado.

## 6. HIPÓTESIS

Es posible diseñar al menos una molécula nueva, utilizando la estructura química base de las quinolonas, que ofrezca propiedades germicidas *in silico*, al inhibir el ADN girasa de *Pseudomonas aeruginosa*.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. Universo

El objeto de estudio de esta investigación fueron todos los antibióticos con actividad sobre el ADN girasa de *la Pseudomonas aeruginosa*.

### 7.2. Muestra

Se estudiaron las quinolonas y todas las moléculas derivadas de estas. De las quinolonas se generaron más de 300 derivados sistemáticamente y posteriormente se sometieron todos estos a ser comparados con las quinolonas. Luego, los derivados fueron ponderados según la energía de interacción más negativa y parámetros de ADMET, con respecto al ADN girasa de la *Pseudomonas aeruginosa*.

### 7.3. Hardware

Para la evaluación de las moléculas se utilizó de cuatro computadoras de alto rendimiento, que son propiedad de la Unidad de Química Computacional de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Las computadoras cuentan con las siguientes especificaciones:

- Procesador de 8 núcleos de 4GHz cada uno.
- 8 GB de memoria RAM
- Sistema operativo: Linux Mint 13 (MATE)/Windows 8 64-bits

### 7.4. Software

El software a utilizado fue:

- Avogadro 1.1.0
- UCSF Chimera 1.7
- AutoDock Tools 4.2
- AutoDock Vina 1.1.2

- KNIME 2.7.2
- Sybyl-X

Bases de datos utilizadas:

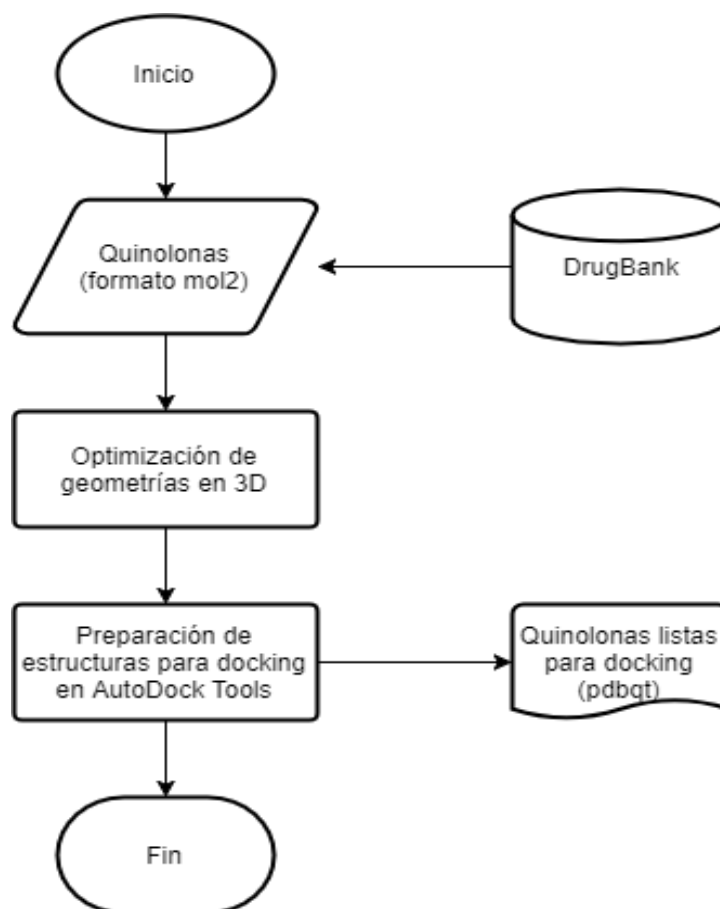
- ADMETSar (Feixiong, C., et al., 2012).
- Chemicalize (Chemicalize.org, 2016).
- ChemSpider (Pence, 2010).
- DrugBank (Law, et al., 2014).
- PubChem (Kim, et al., 2016).
- RCSB Protein Data Bank (PDB) (Berman, et al., 2000).
- UniProt (The UniProt Consortium, 2016).
- SWISS-MODEL (Biasini, et al., 2014).
- NAMM (NIH Center for Macromolecular Modeling & Bioinformatics, 2006).

## 7.5. Procedimiento

### 7.5.1. Obtención de las estructuras químicas de las quinolonas de referencia y el ADN girasa de *Pseudomonas aeruginosa*

Primero, se buscaron y se descargaron las estructuras de los 30 ligandos de referencia (quinolonas) en formato “.mol2” de las base de datos de DrugBank. A partir de éstas, se generaron y optimizaron las estructuras tridimensionales (3D) utilizando el programa Avogadro. Previo al acoplamiento, se prepararon las estructuras utilizando la interfaz gráfica de AutoDock Tools -ADT- y posteriormente se guardaron en formato “.pdbqt”.

**Diagrama 1.** Obtención de las estructuras químicas de las quinolonas de referencia

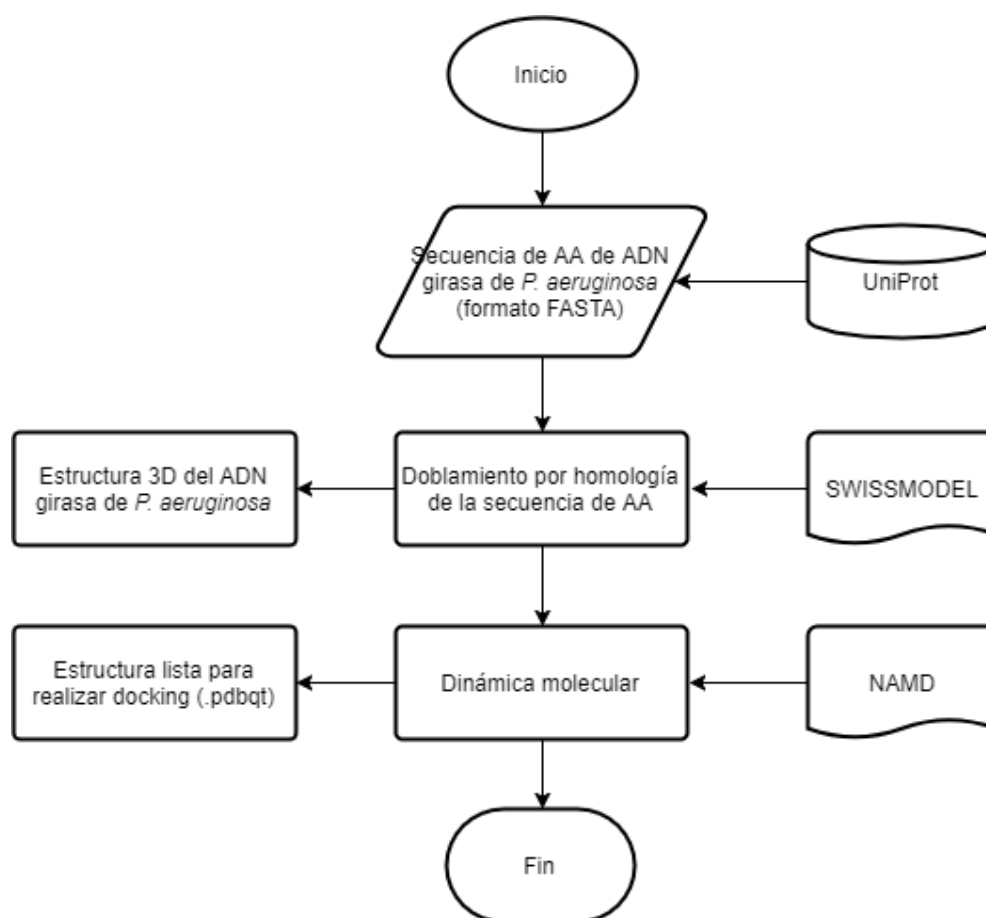


Fuente: Diagrama de elaboración propia.



La estructura tridimensional del ADN girasa no se halló en las bases de datos RCSB Protein Data Bank, ni en PDBe de EMBL-EBI. Por esta razón se comenzó obteniendo la secuencia de aminoácidos de la girasa en formato FASTA de la base de datos UniProt. Posteriormente, se hizo un doblamiento por homología de la secuencia de aminoácidos utilizando el programa SWISS-MODEL. Finalmente, se realizó una dinámica molecular<sup>1</sup> con NAMD de la estructura tridimensional obtenida del paso anterior. Esta estructura ya queda lista para realizar docking sobre ella con AutoDock Vina -ADV-.

**Diagrama 2.** Obtención de la estructura tridimensional del ADN girasa de *P. aeruginosa*



Fuente: Diagrama de elaboración propia.

<sup>1</sup> Los parámetros de la corrida de dinámica molecular se hallan en el archivo gyr\_A\_md.namd en el Anexo 13.6.

### 7.5.2. Identificación del sitio activo del ADN girasa de *P. aeruginosa*

Con la estructura tridimensional optimizada del ADN girasa, se ubicó la región donde estaban localizados los aminoácidos reportados por la literatura como responsables del enlace proteína - ligando (Stover, et. al., 2000) utilizando el programa UCSF Chimera.

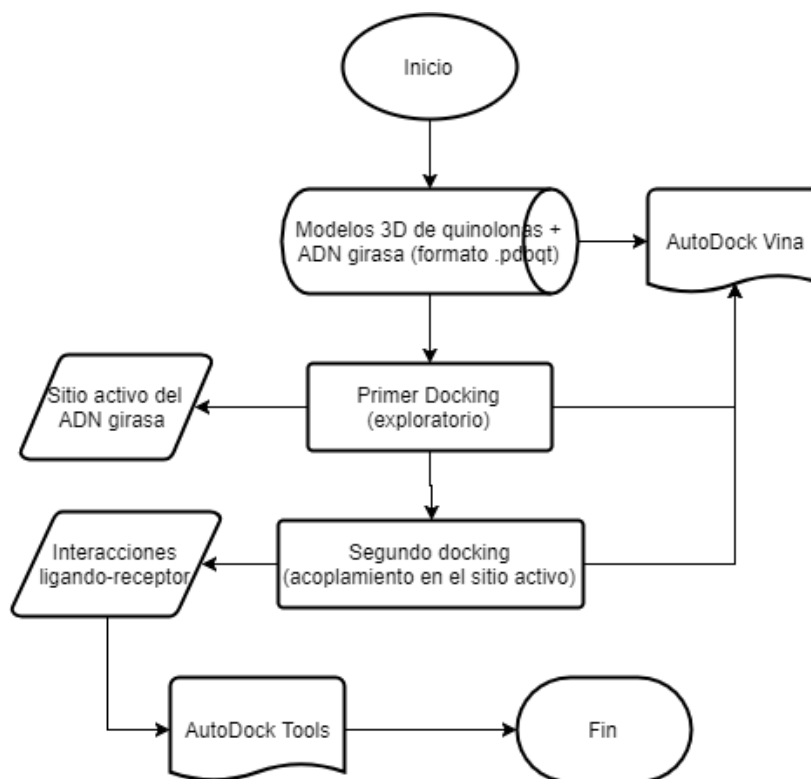
### 7.5.3. Acoplamiento molecular (Docking Molecular).

Con los modelos 3D optimizados de quinolonas se realizó el acoplamiento de las quinolonas en la subunidad A del ADN girasa con el programa de ADV. Utilizando UCSF Chimera se tomó como parámetros de entrada las estructuras de la proteína y los ligandos, ambos en formato “.pdbqt”, dentro del archivo de configuración para ADV. Posteriormente, se realizaron dos acoplamientos, uno exploratorio para hallar la ubicación del sitio activo y un segundo para analizar la eficiencia ligando - receptor de las quinolonas sobre el sitio activo. Esta eficiencia se midió a través de energías de enlace e interacciones moleculares.

7.5.3.1. **Primer docking (exploratorio):** Se escogió un “grid” o caja lo suficientemente grande para que abarcara toda la proteína:  $x = 1000$ ,  $y = 1500$ ,  $z = 1000$ ; altura = 400, ancho = 600, longitud = 800. Se ubicó la región reportada por la literatura como sitio activo.

7.5.3.2. **Segundo docking (acoplamiento en el sitio activo):** Se escogió un grid más pequeño pero lo suficientemente grande para permitir la rotación libre de los ligandos en el espacio químico establecido en el primer docking. Las dimensiones y coordenadas de la caja del mismo fueron establecidas manualmente tomando en cuenta el tamaño de los ligandos:  $x = 100$ ,  $y = 132$ ,  $z = 94$ ; altura = 40, ancho = 40, longitud = 40. Luego, cada resultado de fue analizado para determinar las interacciones ligando-receptor utilizando el programa de ADT.

**Diagrama 3.** Acoplamiento molecular



Fuente: Diagrama de elaboración propia.

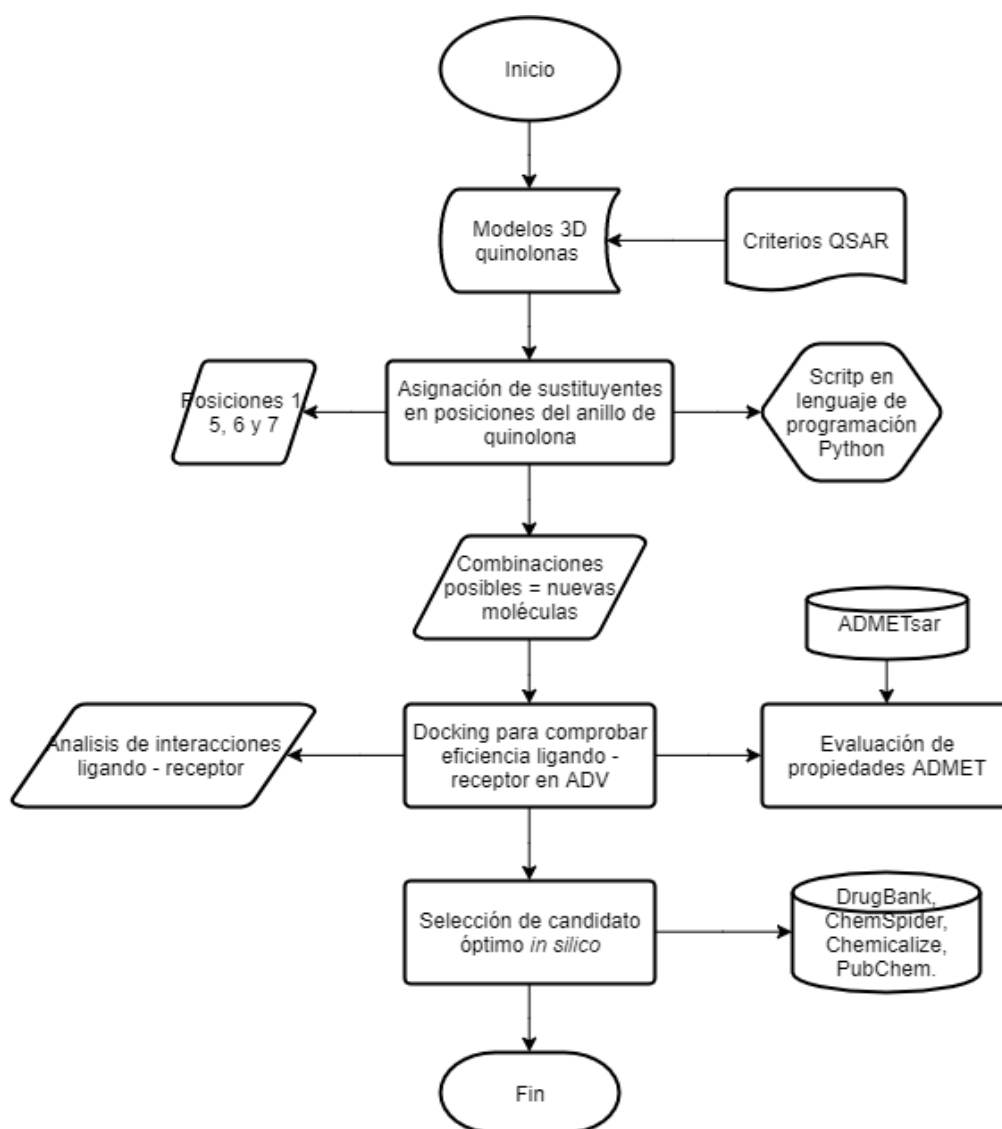
#### 7.5.4. Diseño *de novo* y selección de candidato

Se diseñó un grupo de compuestos derivados de las estructuras químicas de las quinolonas previamente acopladas y tomando en cuenta los criterios de relación estructura actividad encontrados en la literatura. Para ello, se asignó un grupo pequeño de posibles sustituyentes a cada posición del anillo de quinolona donde una sustitución fuera posible: posiciones 1, 5, 6, y 7 (ver anexos, sección 13.1.7, figura 8). Para la combinación de los grupos funcionales por posición se escribió un script en el lenguaje de programación Python que permitió construir las 6992 combinaciones posibles a partir de los grupos funcionales provisto (ver anexo 13.4).

Se comprobó la eficiencia ligando - receptor de las nuevas moléculas por medio de acoplamiento molecular utilizando los mismos parámetros del segundo docking. Se seleccionó las veinte moléculas con mejor energía de enlace (energía más negativa) y

se analizaron sus interacciones con cada aminoácido. Posteriormente se evaluó las propiedades ADMET de cada una. La evaluación ADMET se hizo mediante el software ADMETsar. Como resultado se seleccionó el candidato óptimo, según los resultados *in silico*, para inhibir el ADN girasa de *P. aeruginosa*. Finalmente, se revisó en las bases de datos de DrugBank, ChemSpider, Chemicalize y PubChem para asegurarse que la molécula obtenida es nueva y no ha sido estudiada antes.

Diagrama 4. Diseño *de novo* y selección del candidato



Fuente: Diagrama de elaboración propia.

## 7.6. METODO ESTADÍSTICO

Esta investigación es de naturaleza teórico-experimental, y está basada en el uso de programas computacionales para el diseño *in silico* de una nueva molécula que ofrezca actividad inhibitoria sobre una proteína diana. El concepto bajo el que estos programas fueron construidos son modelos matemáticos y estadísticos validados que permiten predecir estas propiedades en base a unidades fundamentales.

A continuación, se describe brevemente los modelos matemáticos y/o estadísticos de los programas utilizados para el manejo de los datos. Cabe mencionar que la teoría sobre la cual estos programas se desarrollaron es, en esencia, la misma y varían en cuestiones técnicas de programación, diseño de la interface, mejoras entre versiones, capacidad y velocidad de computo, tamaño, optimización en la predicción, variación o combinación de modelos, entre otros.

Existen diferentes enfoques que pueden utilizarse para el modelaje de la interacción ligando-receptor. Entre ellos destacan:

- a) Dinámica molecular con solvente explícito
- b) Dinámica molecular y mecánica molecular con solvente implícito y
- c) Acoplamiento molecular (docking molecular).

Los programas de acoplamiento molecular generalmente utilizan una función de valoración (scoring function<sup>2</sup>), la cual puede tomarse como una forma de aproximación de los potenciales químicos estándar del sistema. Cuando los términos basados en física superficial como las interacciones de van der Waals 1 - 6 y energías de Coulomb se utilizan en estas funciones de valoración, éstos necesitan ser evaluados o "pesados" significativamente y empíricamente, para compensar la diferencia entre energías y energías libres (Trott & Olson, 2010).

---

<sup>2</sup> Esto es en esencia un campo de fuerzas, en mecánica molecular.

### 7.6.1. Función de valoración:

La función general para formar parte conformación-dependiente de la función de valoración con la cual están diseñados los programas de predicción de enlace automatizado utilizados en esta investigación es (Jain, 2006):

$$c = \sum_{i < j} f_{t_i t_j}(r_{ij}),$$

Donde se hace la sumatoria de todos los pares de átomos que pueden moverse en relación al otro, normalmente interacciones 1 - 4, por ejemplo, átomos separados por tres enlaces covalentes consecutivos. En este caso, a cada átomo  $i$  le es asignado un tipo  $t_i$ , y un juego asimétrico de funciones de interacción  $f_{t_i t_j}$  de distancia interatómica  $r_{ij}$  debe ser definido. Este valor puede ser visto como la suma de las contribuciones intermoleculares e intramoleculares (Jain, 2006):

$$c = c_{\text{inter}} + c_{\text{intra}}.$$

El algoritmo de optimización, descrito a continuación, intenta encontrar el mínimo global de  $c$  y otras conformaciones de baja valoración, el cual luego categoriza. La energía libre de enlace predicha se calcula de la parte intermolecular de la conformación de menor valor, designada como 1, donde la función  $g$ , puede ser una función lineal en aumento (Jain, 2006):

$$s_1 = g(c_1 - c_{\text{intra}1}) = g(c_{\text{inter}1}),$$

#### Valores (pesos) y términos para la Función de Valoración

Valor (peso)	Término
-0.0356	gauss <sub>1</sub>
-0.00516	gauss <sub>2</sub>
0.840	Repulsión
-0.0351	Hidrofobicidad
-0.587	Enlaces de hidrógeno
0.0585	$N_{\text{rot}}$

(McGann & Almond, 2003)

### 7.6.2. Algoritmos de optimización

Entre los más utilizados están los algoritmos genéticos, optimización por enjambre de partículas, anillamiento simulado, entre otros, combinados con varios procedimientos de optimización local y atajos especiales para agregar velocidad a la optimización. Todos estos, utilizan no solo el valor de la función de valoración, sino también su gradiente, como, por ejemplo, los derivativos de la función con respecto a sus razonamientos. Estos razonamientos, son la posición y orientación del ligando, así como los valores de las torsiones para los enlaces rotables activos en el ligando y residuos flexibles, si los hubiera.

Estos derivativos tendrían una interpretación mecánica simple, si la función de valoración fuera una energía. Los derivativos con respecto a la posición, orientación y torsiones serían la fuerza total negativa actuando sobre el ligando, el torque total negativo y las proyecciones de torque negativas, respectivamente, donde las proyecciones se refieren al torque aplicado a la cadena "movida" por la torsión, proyectada sobre su eje de rotación.

### 7.6.3. Implementación

Los programas de cómputo (software) científico, especialmente los del tipo "numérico", generalmente pretenden ser:

- a) Un producto de programación exploratoria
- b) Robusto
- c) Rápido
- d) Desarrollado dentro de un marco de tiempo razonable

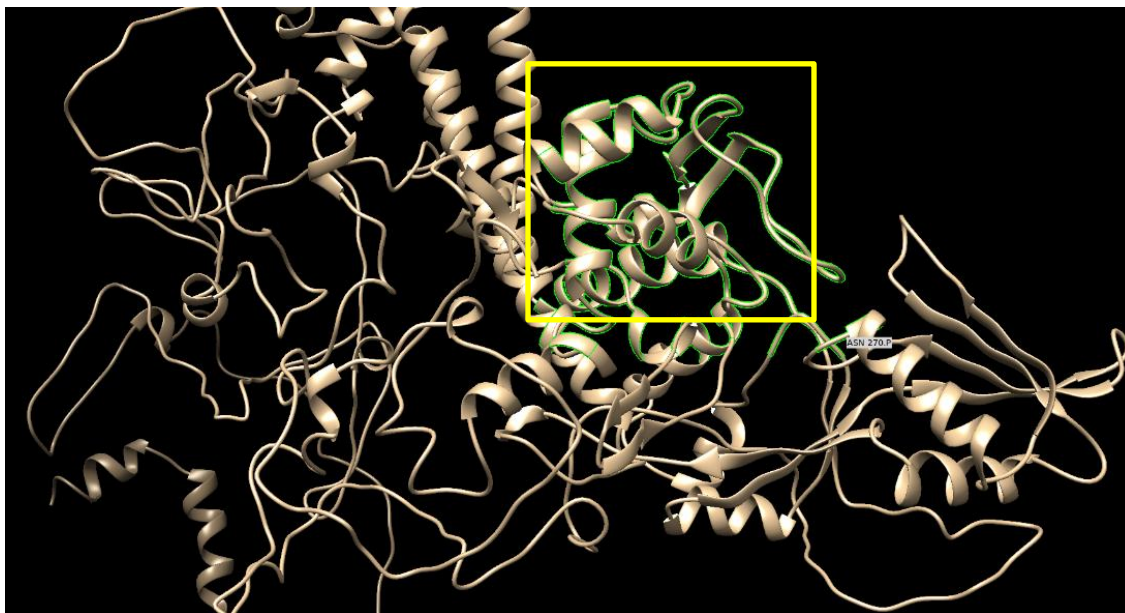
Para alcanzar estos cuatro objetivos, muchos de los programas más recientes utilizan las técnicas de programación de C++. Normalmente, C++ utiliza un espectro de lenguajes: de C, a un lenguaje similar a Java y orientado a objetos, a un lenguaje enfocado en la programación genérica, seguridad de excepción y manejo automático de recursos en C++.

(McGann & Almond, 2003).

## 8. RESULTADOS

A continuación, se ilustra en la figura 1, dentro del recuadro amarillo, la ubicación del sitio activo en el ADN girasa de *Pseudomonas aeruginosa*, con base a lo que la literatura reporta para el ADN girasa de otros microorganismos. Dicho sitio activo está conformado entre los aminoácidos: ARG32, ARG46, ARG47, HSD80, SER83, THR83, ALA84, TYR86, ARG91, SER97, ARG121 y TYR122 (Kumar, Nath & Kumar, 2013), (Cabral, et. al., 1997).

Figura 1. Sitio activo de la gyrA de *Pseudomonas aeruginosa*

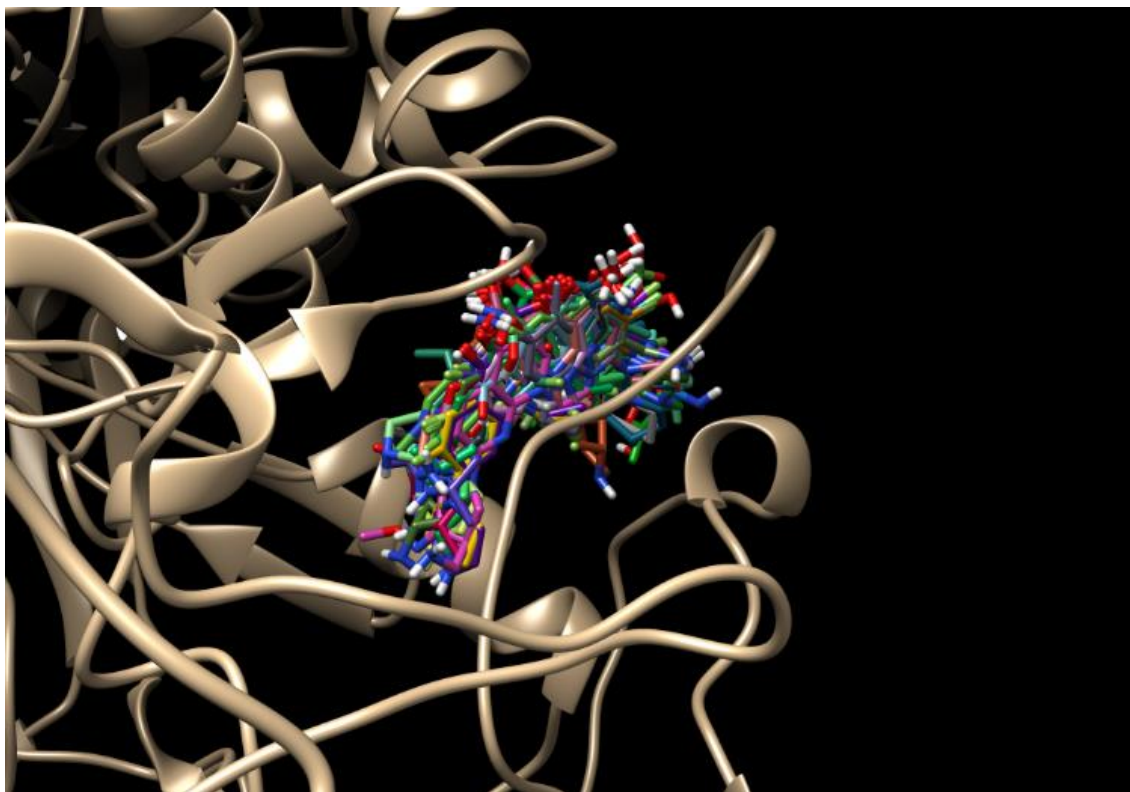


Fuente: Estructura obtenida de la base de datos de UniProt y SWISS-MODEL y optimizada por medio de dinámica molecular en NAMD.



En la figura 2 se muestra el acoplamiento molecular realizado, con las 30 quinolonas de referencia, en el sitio activo identificado del ADN girasa *P. aeruginosa* y se observa como todas se ubican en el mismo lugar.

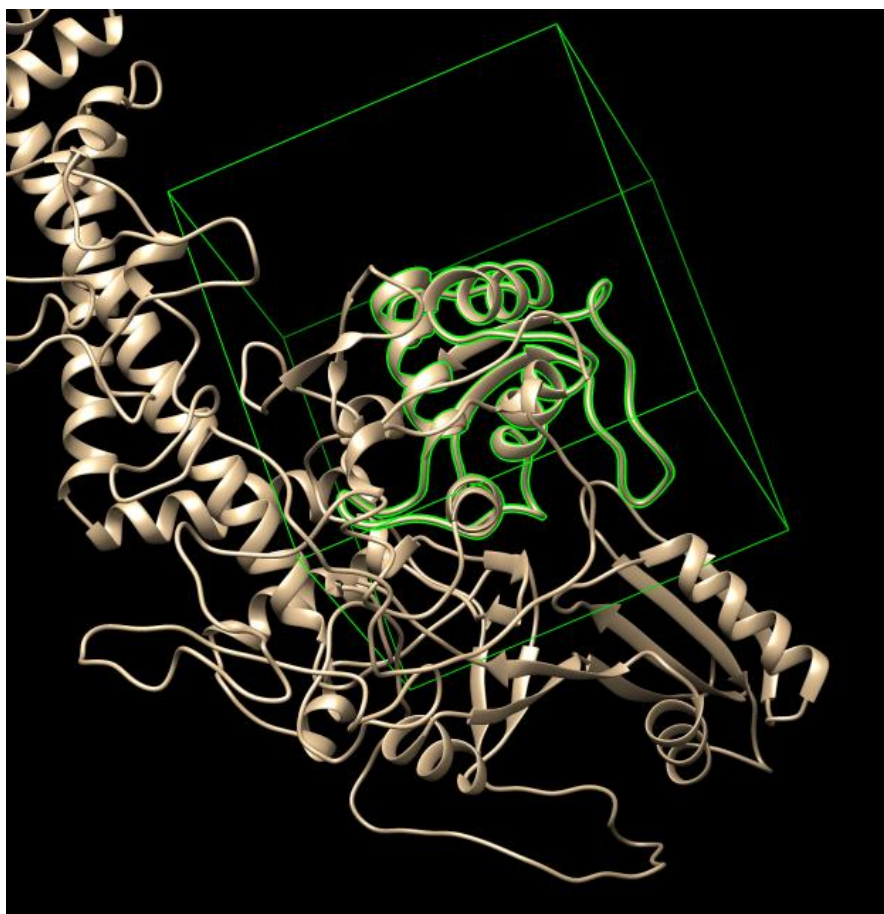
**Figura 2.** Acoplamiento molecular de las quinolonas de referencia.



Fuente: Imagen generada utilizando el programa UCSF Chimera 1.7.

En la figura 3 se observa el espacio (caja o grid) establecido para el acoplamiento molecular de las quinolonas, lo suficientemente grande para permitir el libre movimiento de cada una.

**Figura 3.** Caja establecida para el acoplamiento molecular



Fuente: Imagen generada utilizando el programa UCSF Chimera.

En la tabla 1, se muestra las energías de enlace ( $^{\circ}E$ ) obtenidas del acoplamiento molecular de las 30 quinolonas de referencia, ordenadas de energía más negativa a la energía más positiva, siendo una energía más negativa la deseada para formar un enlace más estable.

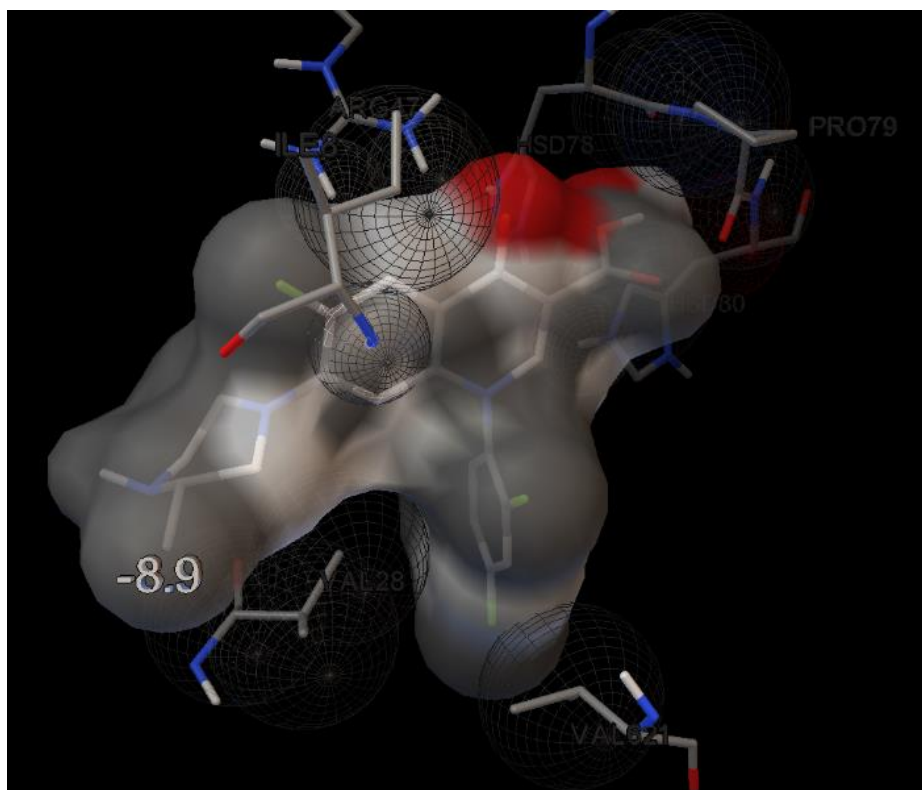
**Tabla 1.** Energías de enlace del acoplamiento molecular de las quinolonas de referencia

No.	Quinolonas	$^{\circ}E$ (Kcal/mol)
1	Temafloxacin	-8.9
2	Plurifloxacin	-8.5
3	Tosufloxacin	-8.5
4	Espafloxacin	-8.2
5	Trovafloxacin	-8.4
6	Nadifloxacin	-8.1
7	Ciprofloxacin	-8.0
8	Grepafloxacin	-8.0
9	Levofloxacin	-8.0
10	Ofloxacin	-8.0
11	Rosoxacin	-7.9
12	Clinafloxacin	-7.8
13	Fleroxacin	-7.8
14	Flumequina	-7.7
15	Lomefloxacin	-7.7
16	Pazufloxacin	-7.7
17	Sitafloxacin	-7.7
18	Enoxacin	-7.6
19	Gemifloxacin	-7.6
20	Moxifloxacin	-7.6
21	Pefloxacin	-7.6
22	Rufloxacin	-7.6
23	Gatifloxacin	-7.5
24	Norfloxacin	-7.5
25	Ácido pipemídico	-7.3
26	Ácido piromídico	-7.2
27	Balofloxacin	-7.2
28	Ácido oxolínico	-6.9
29	Cinoxacin	-6.6
30	Ácido nalidíxico	-6.4

Fuente: Energías de enlace obtenidas al hacer acoplamiento molecular con AutoDock Vina.

La figura 4 muestra las interacciones de la temafloxacin, la quinolona con energía más negativa de todas la quinolonas (para observar las interacciones moleculares de todas las quinolonas, ver anexo 13.2).

**Figura 4.** Interacciones moleculares de temafloxacin

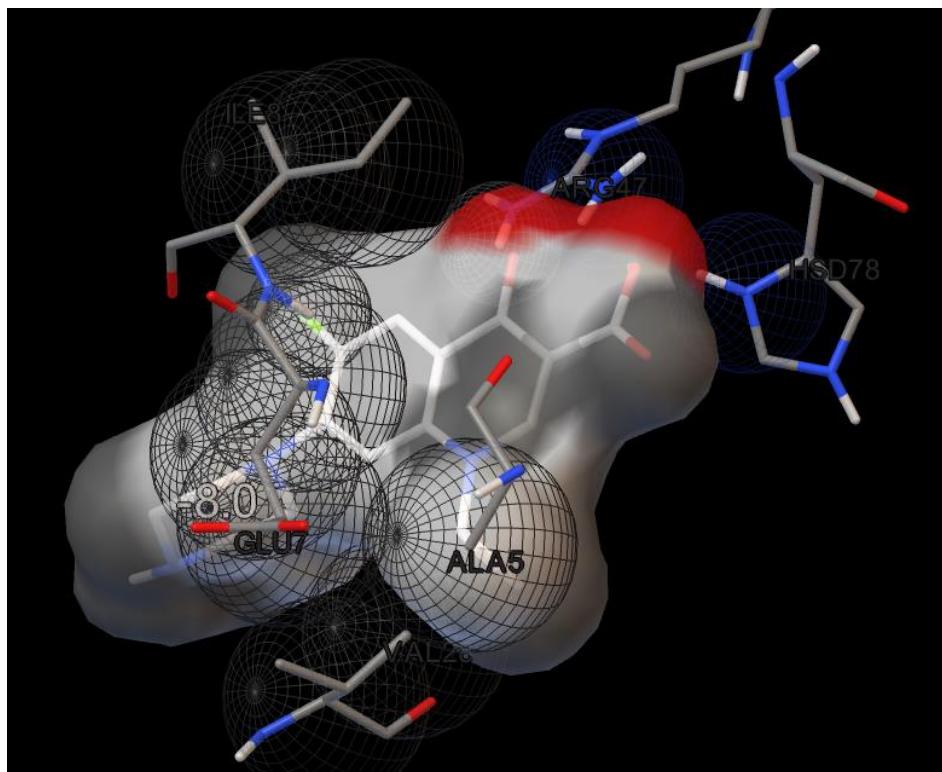


Aminoácidos por posición: (3): PRO79, HSD80, HSD78; (4): ARG47;  
(5): ARG47, ILE8; (7): VAL28; (8): VAL28; (1): VAL621

Fuente: Imagen generada con el programa de AutoDock Tools.

La figura 5 muestra las interacciones moleculares de ciprofloxacina, la cual está dentro de las diez quinolonas con mejor energía de enlace (séptimo lugar) y es una de las quinolonas más representativas (Mella, S., et. al., 2000) y de mayor uso en Guatemala (Alvarado, 2015), (Morataya, 2004). (Para observar las interacciones moleculares de todas las quinolonas, ver anexo 13.2).

**Figura 5.** Interacciones moleculares de ciprofloxacina

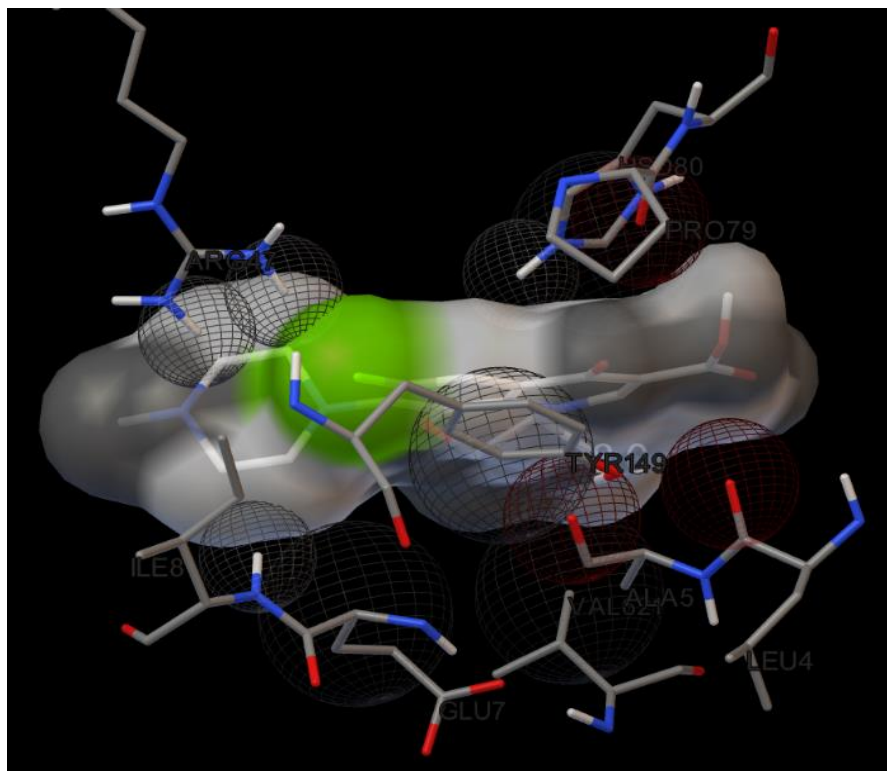


Aminoácidos por posición: (3): HSD78; (4): ARG47; (5): ARG47, ILE8;  
(6 y 7): ILE8; (8): VAL28, GLU7; (1): ALA5

Fuente: Imagen generada con el programa de AutoDock Tools.

La figura 6 muestra las interacciones moleculares de levofloxacin, también se encuentra dentro de las diez quinolonas con mejor energía de enlace (noveno lugar) y es de las quinolonas más representativas (Mella, S., et. al., 2000) y de mayor uso en Guatemala (Alvarado, 2015), (Morataya, 2004). (Para observar las interacciones moleculares de todas las quinolonas, ver anexo 13.2).

**Figura 6.** Interacciones de Levofloxacin



Aminoácidos por posición: (3): LEU4, PRO79, HSD80; (4): ALA5, TYR149; (5): TYR149; (6): ARG47; (7): GLU7, ILE8; (8 y 1): VAL621

Fuente: Imagen generada con el programa de AutoDock Tools.

La tabla 2 muestra la secuencia de aminoácidos que conforman el espacio químico farmacofórico derivado de las 30 quinolonas de referencia acopladas. Dicho espacio se ilustra en la figura 7.

**Tabla 2.** Farmacóforo del sitio activo del ADN girasa de *Pseudomonas aeruginosa*

Posición	Aminoácidos que interactúan
Posiciones 3 y 4	ALA 5 - ARG47 - HSD78 - PRO79 - HSD80 - TYR149
Posición 5	ILE8 - ARG47
Posición 6	ALA5 - ILE8 - ARG47
Posición 7	MET1 - ALA5 - GLU7 - ILE8 - VAL28 - VAL621 - ASN622
Posición 8	GLU7 - VAL28
Posición 1	ALA5 - GLU7 - VAL28 - HSD80 - VAL621
Farmacóforo	MET1 - ALA 5 - GLU7 - ILE8 - VAL28 - ARG47 - HSD78 - PRO79 - HSD80 - TYR149 - VAL621 - ASN622 - PRO625 - LEU626

Fuente: Aminoácidos de interacción obtenidos con el programa de AutoDock Tools.

La tabla 3 muestra la secuencia de aminoácidos que conforman el espacio químico farmacofórico derivado de las diez quinolonas de referencia acopladas con mejor energía de enlace. Dicho espacio se ilustra en la figura 8.

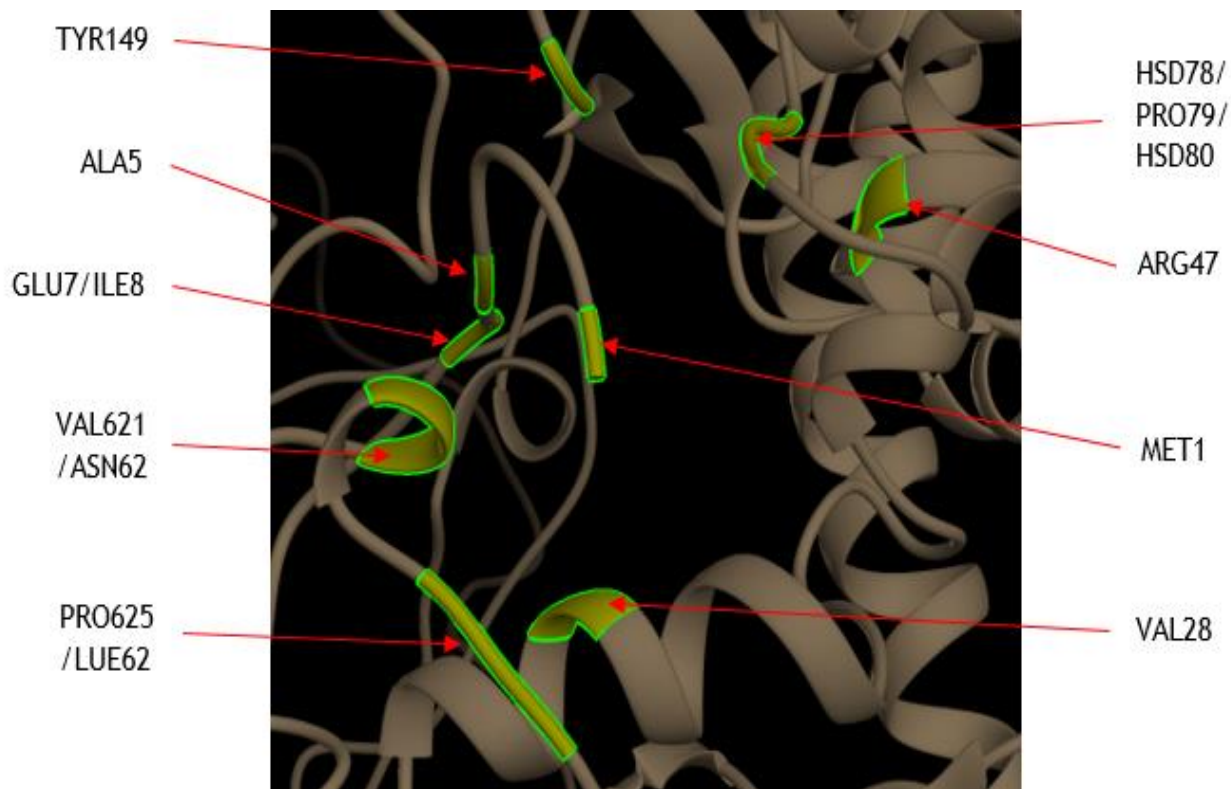
**Tabla 3.** Espacio de las diez quinolonas con mejor energía de enlace.

Posición	Aminoácidos que interactúan
Posiciones 3 y 4	ARG47 - HSD78 - PRO79 - HSD80 - TRY149
Posición 5	ARG47 - TYR149
Posición 6	ARG47
Posición 7	GLU7 - ILE8 - VAL28
Posición 8	VAL28
Posición 1	VAL28 - VAL621
Farmacóforo	GLU7 - ILE8 - VAL28 - ARG47 - HSD78 - PRO79 - HSD80 - TYR149 - VAL621

Fuente: Aminoácidos de interacción obtenidos con el programa de AutoDock Tools.

La figura 7 ilustra el espacio químico o farmacóforo del sitio activo del ADN girasa de *P. aeruginosa* derivado del análisis de interacciones de las 30 quinolonas de referencia acopladas.

**Figura 7.** Farmacóforo del sitio activo del ADN girasa de *P. aeruginosa*

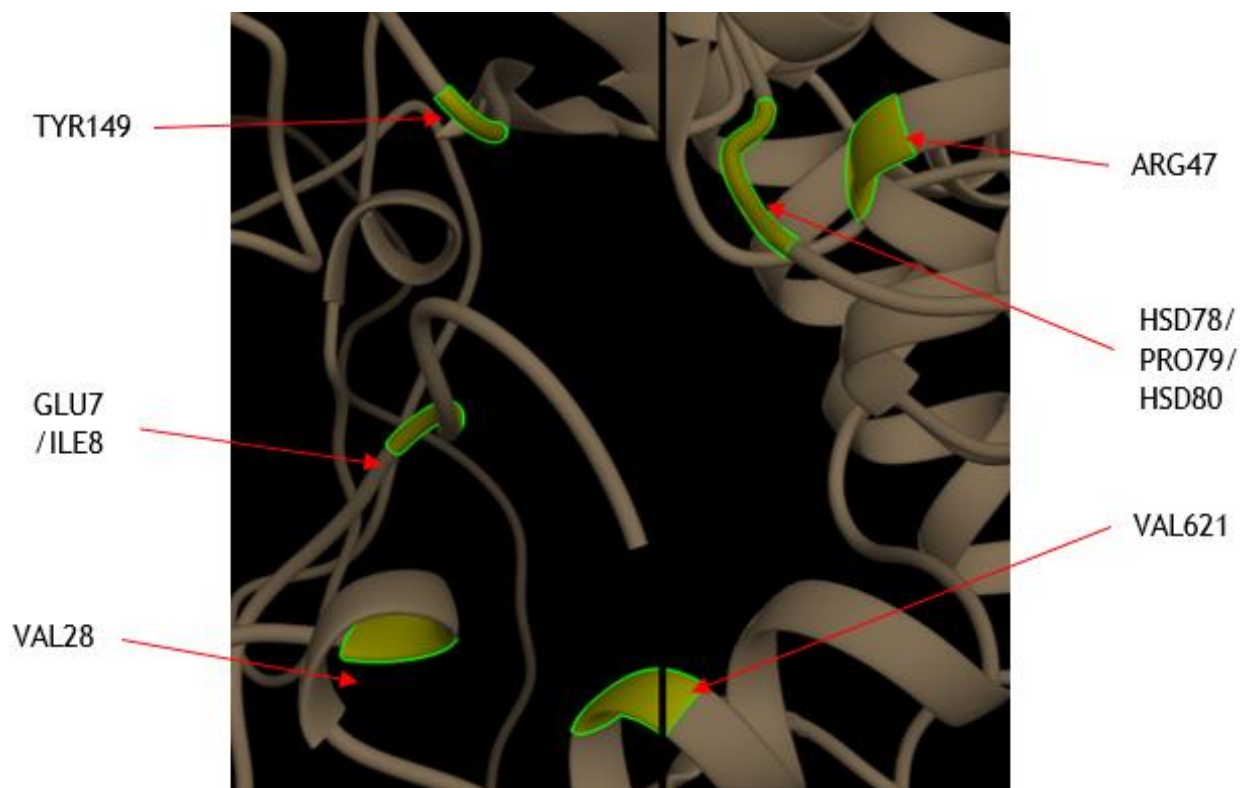


Fuente: Imagen generada utilizando el programa UCSF Chimera.



La figura 8 ilustra el espacio químico o farmacóforo del sitio activo del ADN girasa de *P. aeruginosa* derivado del análisis de interacciones de las diez quinolonas de referencia acopladas con mejor energía de enlace

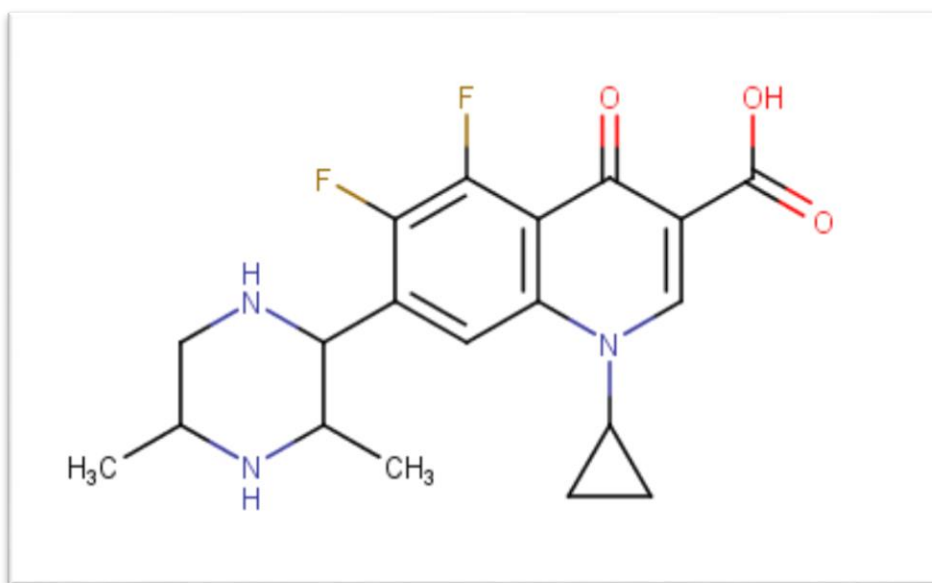
**Figura 8.** Espacio químico del sitio activo del ADN girasa de *P. aeruginosa* derivado de las diez quinolonas con mejor energía de enlace.



Fuente: Imagen generada utilizando el programa UCSF Chimera.

La figura 9 muestra la molécula seleccionada como mejor candidato, resultante del diseño *de novo*, denominada como MCDN, para fines prácticos. Dicha molécula ofrece teóricamente una potencial actividad germicida al inhibir el ADN girasa de *P. aeruginosa* a través de un enlace estable con la misma, al ser comparada con las quinolonas de referencia, ciprofloxacina y levofloxacina, ya que presenta una energía de enlace más negativa e interacciona en el mismo espacio químico que éstas.

**Figura 9.** Estructura 2D de MCDN

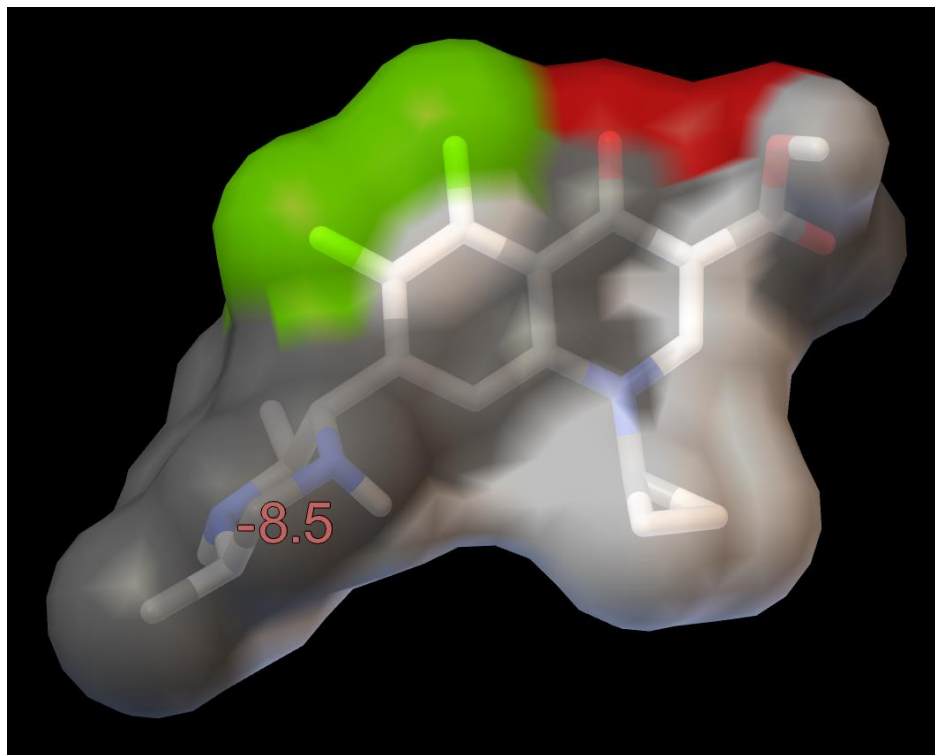


Nombre IUPAC: 1-ciclopropil-7-(3,5-dimetilpiperazin-2-yl)-5,6-difluoruro-4-oxo-1,4-dihidroquinoline-3-acido carboxílico.

Fuente: Estructura química resultante del diseño *de novo*, generada con el programa Avogadro.

La figura 10 muestra la estructura tridimensional de la molécula seleccionada como mejor candidato, resultante del diseño *de novo*.

**Figura 10.** Estructura 3D de MCDN



Fuente: Imagen generada con el programa de AutoDock Tools.

La tabla 4 muestra la secuencia de aminoácidos involucrados en la interacción ligando-receptor de MCDN en el sitio activo del ADN girasa de *P. aeruginosa*.

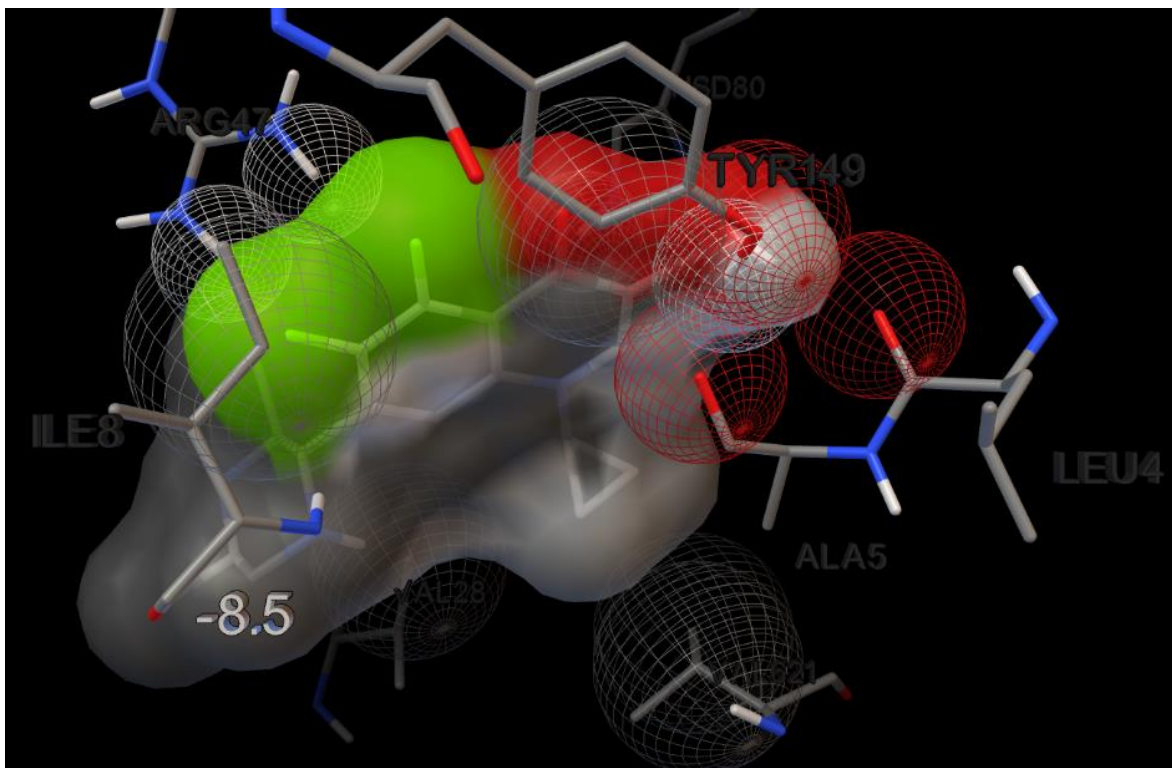
**Tabla 4.** Interacciones MCDN en el sitio activo del ADN girasa de *P. aeruginosa*

Posición	Aminoácidos que interactúan
Posiciones 3 y 4	LEU4 - ALA 5 - HSD80 - TYR149
Posiciones 5 y 6	ILE 8 - ARG47
Posición 7	VAL28
Posición 1	VAL621
Secuencia	LEU4 - ALA5 - ILE8 - VAL28 - ARG47- HSD80 - TYR149 - VAL621

Fuente: Aminoácidos de interacción obtenidos con el programa de AutoDock Tools.

La figura 11 muestra las interacciones moleculares de MCDN en el sitio activo del ADN girasa de *P. aeruginosa*, la cual presenta interacciones moleculares similares a las quinolonas de referencia (ver figuras 5 y 6, y anexo 13.2).

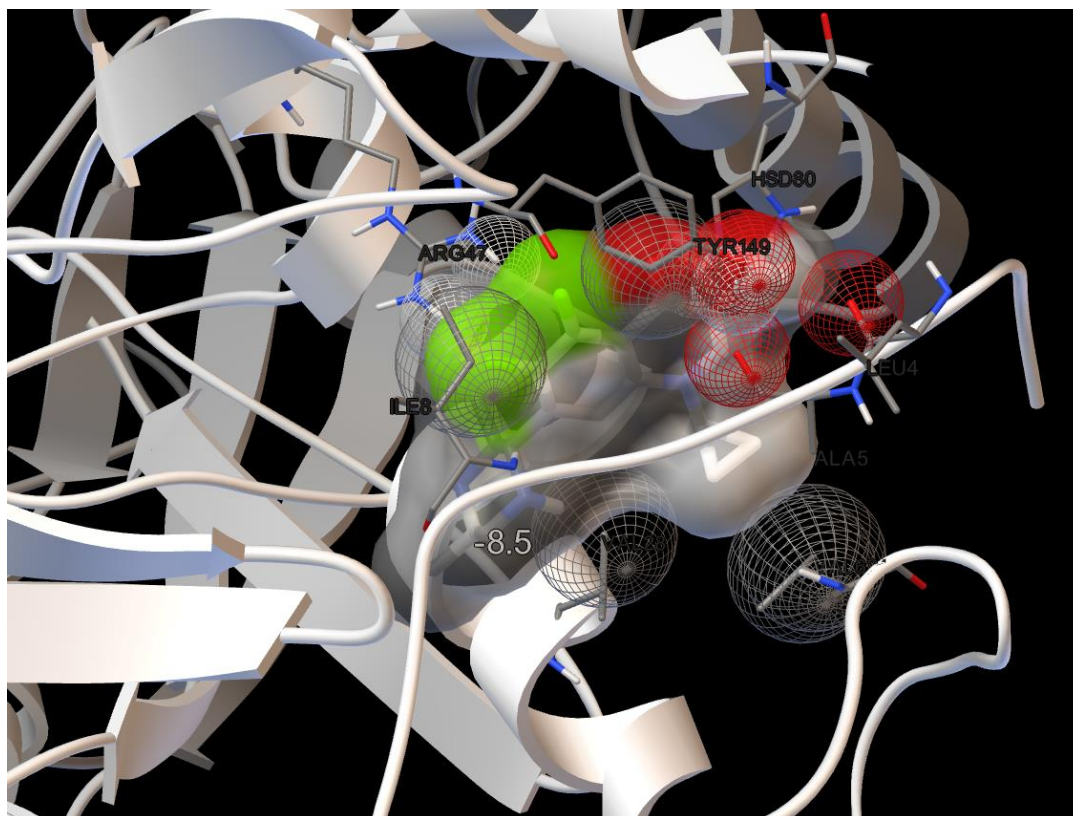
**Figura 11.** Interacciones de MCDN en el sitio activo del ADN girasa de *P. aeruginosa*



Fuente: Imagen generada con el programa de AutoDock Tools.

La figura 12 muestra el acoplamiento molecular y las interacciones moleculares de MCDN en el sitio activo del ADN girasa de *P. aeruginosa*. La molécula toma una posición o acoplamiento y energía de enlace similar al de las quinolonas de referencia previamente acopladas.

**Figura 12.** Acoplamiento molecular e interacciones de MCDN



Fuente: Imagen generada con el programa de AutoDock Tools.

La tabla 5, muestra los resultados del análisis de la Regla de Lipinski *in silico* realizado a MCDN, ciprofloxacina y levofloxacina y su comparación entre ellas. En la tabla se presenta el cumplimiento de la Regla de Lipinski de MCDN con respecto a ciprofloxacina y levofloxacina, valores que indican una buena solubilidad y permeabilidad intestinal.

**Tabla 5.** Regla de Lipinski de MCDN y las quinolonas de referencia.

	PM <sup>1</sup>	LogP <sup>2</sup>	HBA <sup>3</sup>	HBD <sup>4</sup>	Violaciones de la Regla de Lipinski
<b>Regla</b>	<500 Da	≤5	<10	<5	1
<b>Ciprofloxacina</b>	331.34 g/mol	1.10	5	2	0
<b>Levofloxacina</b>	361.37 g/mol	1.10	6	1	0
<b>MCDN</b>	377.39 g/mol	1.73	7	3	0

<sup>1</sup>PM = Peso Molecular;

<sup>2</sup>LogP o/w = Logaritmo de partición octanol/agua;

<sup>3</sup>HBA = Receptores de enlaces por puentes de hidrogeno;

<sup>4</sup>HBD = Donadores de enlaces por puentes de hidrogeno.

Fuente: Datos generados con el programa KNIME.

La tabla 6, muestra los resultados del análisis de farmacocinética y toxicidad (ADMET) *in silico* realizado a MCDN, ciprofloxacina y levofloxacina y su comparación entre ellas; y se observa que teóricamente, MCDN tiene parámetros de farmacocinética y toxicidad aceptables.

**Tabla 6.** Parámetros de ADMET de MCDN y las quinolonas de referencia.

	Modelo <sup>1</sup>	Ciprofloxacina	Levofloxacina	MCDN
Absorción	Barrera hematoencefálica (BBB)	BBB-	BBB-	BBB-
	Absorción intestinal en humanos (HIA) <sup>2</sup>	HIA+	HIA+	HIA+
	Permeabilidad CaCo2 <sup>3</sup>	CaCo2-	CaCo2+	CaCo2+
	Sustrato de la P- glicoproteína	Sustrato+	Sustrato+	Sustrato+
	Inhibidor de la P-glicoproteína	No inhibidor	No inhibidor	No inhibidor
Distribución	Localización subcelular	Lisosoma	Lisosoma	Lisosoma
Metabolismo	Sustrato del CYP450	No sustrato	No sustrato	No sustrato
	Inhibidor del CYP450	No inhibidor	No inhibidor	No inhibidor
Toxicidad	Toxicidad AMES	Tóxico AMES	Tóxico AMES	No tóxico
	Carcinogenicidad	No tóxico	No tóxico	No tóxico
	Clasificación de toxicidad oral aguda <sup>4</sup>	Clase III	Clase III	Clase III
	Toxicidad oral aguda en rata (LD <sub>50</sub> )	2.1882 mol/kg	2.1639 mol/kg	2.3354 mol/kg

<sup>1</sup>Ver paginas 70 - 73 de anexos.

Parámetros de algunos modelos:

<sup>2</sup>Permeabilidad de Caco-2+ de 0.000008 cm/s

<sup>3</sup>Absorción intestinal en humanos (HIA)+ > 30%

<sup>4</sup>Clasificación de toxicidad aguda:

Clase I = LD<sub>50</sub> de 50 mg/kg;

Clase II = LD<sub>50</sub> de 50 - 500 mg/kg;

Clase III: LD<sub>50</sub> de 50 mg/kg

Fuente: Datos generados con la base de datos de ADMETSar (Feixiong, C., et. al., 2012).



## 9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se identificó el sitio activo del ADN girasa buscando la secuencia o grupo de aminoácidos involucrados en la interacción proteína-quinolona con base a lo que la literatura reporta para el ADN girasa de otros microorganismos (Stover, et. al., 2000), y luego se localizó este sitio en la estructura tridimensional de la girasa de *P. aeruginosa*. En la figura 1 se resalta la cavidad que estos aminoácidos conforman y se ubicó un sitio activo aproximadamente entre los aminoácidos ARG32 y TYR122, siendo los aminoácidos más reportados ARG32, ARG46, ARG47, HSD80, SER83, THR83, ALA84, TYR86, ARG91, SER97, ARG121 y TYR122 (ver figura 2) (Kumar, Nath, & Kumar, 2013) (Cabral, et al., 1997). La identificación del sitio activo es importante, ya que sin este no es posible realizar un acoplamiento molecular y predecir la actividad *in silico* de una molécula.

La ubicación del sitio activo previamente identificado se confirmó luego del acoplamiento molecular exploratorio. Este acoplamiento se realizó posicionando una caja o "grid" que abarcó toda la proteína para visualizar en qué sitios se acoplaban las quinolonas. Se observó que las quinolonas se agruparon principalmente en el mismo sitio que coincidía con la misma región reportada por la literatura y comprendida aproximadamente por los mismos aminoácidos.

Con la ubicación exacta del sitio activo se delimitó el espacio tridimensional (figura 3) para realizar el segundo acoplamiento molecular (figura 2) con las 30 quinolonas obtenidas de las bases de datos, y se identificó exactamente cuáles son los aminoácidos involucrados en la interacción girasa-quinolona. De este acoplamiento se obtuvieron dos datos importantes para la predicción de la afinidad y actividad de las moléculas: las energías de enlace y las interacciones girasa-quinolona, respectivamente. La energía de enlace es una manera de comprobar la eficiencia ligando-receptor, donde una energía más negativa indica un sistema (complejo proteína-ligando) estable y por tanto con una posibilidad mayor a que así se dé la interacción (Kitchen, Decornez, Furr, & Bajorath, 2004).

De las 30 quinolonas acopladas (del segundo docking realizado), se seleccionó las diez quinolonas con la mejor energía de enlace, es decir, la más negativa. Según la tabla 1 de

resultados, la quinolona con la mejor energía fue temafloxacina, con  $-8.9$  Kcal/mol, y en la figura 4 se puede observar sus interacciones moleculares. Asimismo, cabe resaltar que las energías de enlace más negativas pertenecen a las quinolonas de tercera y cuarta generación.

Es importante mencionar que de las mejores diez quinolonas, solo tres se utilizan actualmente debido a que la mayoría han sido retiradas del mercado por toxicidad, siendo estas ciprofloxacina, levofloxacina y ofloxacina; todas con una energía de enlace de  $-8.0$  Kcal/mol (las figuras 5 y 6 muestran las interacciones de ciprofloxacina y levofloxacina, respectivamente). Existen dos excepciones, la plurifloxacina, una prodroga relativamente nueva que aún se encuentra en ensayos clínicos y se cree que tiene un perfil de seguridad similar al de ciprofloxacina. La segunda excepción es nadifloxacina, de uso tópico, utilizada en el tratamiento del acné e infecciones dérmicas, pero tiene una absorción significativa a través de la piel y produce reacciones dérmicas.

En la tabla 2 de resultados y figura 7, se muestran los aminoácidos que conforman espacio químico farmacofórico del sitio activo del ADN girasa, según la posición numérica en el anillo de quinolona. Este espacio químico se encuentra entre los aminoácidos MET1, ALA 5, GLU7, ILE8, VAL28, ARG47, HSD78, PRO79, HSD80, TYR149, VAL621, ASN622, PRO625, LEU626. Asimismo, en la tabla 3 y figura 8, se muestran los aminoácidos que interactúan con las mejores diez quinolonas: GLU7, ILE8, VAL28, ARG47, HSD78, PRO79, HSD80, TYR149, VAL621. En ambos casos están presentes los aminoácidos GLU7, ILE8, VAL28, ARG47, HSD78, PRO79, HSD80, TYR149 y VAL621, de manera que es posible que estos nueve aminoácidos sean los principalmente implicados en la interacción ADN girasa-quinolona. También, se determinó que interacciones principales fueron de tipo puente de hidrógeno y electrostáticas; y se observa que se mantienen presentes los aminoácidos arginina 47 e histidina 80, concordando con lo reportado en la literatura, para otros microorganismos.

Las figuras 9 y 10, muestran la estructura en 2D y 3D respectivamente, de la molécula seleccionada como mejor candidato del diseño *de novo*, denominada MCDN (mejor candidato del diseño *de novo*), que ofrece posible actividad germicida a través de la

inhibición del ADN girasa de *Pseudomonas aeruginosa*. Es una molécula difluorada derivada de quinolona y su nombre IUPAC es 1-ciclopropil-7-(3,5-dimetilpiperazin-2-yl)-5,6-difluoruro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-acido carboxílico. Esta molécula se diseñó a partir del análisis conformacional y la relación estructura - actividad de las quinolonas previamente acopladas. Para ello se tomó en cuenta únicamente aquellos grupos sustituyentes que aportaran a la eficacia en cuanto a la actividad germicida sobre el ADN girasa y espectro de acción deseado, es decir, agentes gramnegativos, y una energía de enlace lo suficientemente baja sin sacrificar la seguridad.

El diseño se realizó "manualmente", paso a paso, sin la ayuda de un software computacional automatizado debido a que no se encontró un software que cumpliera con las necesidades para llevar a cabo este diseño *de novo*. Se generaron un total de 6, 992 moléculas y se comprobó su eficiencia ligando-receptor por medio del acoplamiento molecular utilizando una caja de tamaño y dimensiones igual a la utilizada en el acoplamiento de las quinolonas, seleccionando y analizando las interacciones de las mejores veinte.

Finalmente, la energía de enlace del MCDN es de -8.5 Kcal/mol y para su selección se tomó en cuenta energía, la farmacocinética y toxicidad. Se seleccionó a la ciprofloxacina y levofloxacina como las quinolonas de referencia, ya que son las más representativas de su grupo (Mella, S., et. al., 2000) y de mayor uso en Guatemala (Alvarado, 2015), (Morataya, 2004). En la tabla 4 de resultados y figuras 12 y 13, se muestran las interacciones de la nueva molécula y se observa que es similar a las de las quinolonas acopladas, manteniéndose presentes los aminoácidos arginina 47 e histidina 80.

En las tablas 5 y 6 de resultados, se observa que la molécula cumple con la Regla de Lipinski en su totalidad ya que tiene un peso molecular de 377.39 g/mol, un logaritmo de partición octanol/agua de 1.73, siete receptores de enlaces por puentes de hidrógeno y tres donadores de enlaces por puentes de hidrógeno; sin presentar ninguna violación de la regla. Según Mishra, et. al, en su investigación llamada, "In silico ADME, bioactivity and toxicity parameters calculation of some selected anti-tubercular drugs", 2016, el 90% de las drogas activas orales que han pasado los estudios clínicos de fase II cumplen con

Lipinski, ya que estas características fisicoquímicas están asociadas a una solubilidad acuosa aceptable y permeabilidad intestinal. Además, tiene un comportamiento *in silico* similar al de ciprofloxacina y levofloxacina en cuanto a los parámetros de farmacocinética y toxicidad.

Por lo tanto, con base a lo anterior, se considera que la nueva molécula seleccionada es un candidato que promete una actividad germicida potencial, establecido teóricamente a través de los programas de enlace automatizado, ya que muestra una buena afinidad por el sitio activo del ADN girasa de *Pseudomonas aeruginosa* y un perfil de seguridad aceptable.

## 10. CONCLUSIONES

- 10.1. Se diseñó una nueva molécula que promete propiedades germicidas, al inhibir el ADN girasa utilizando métodos asistidos por computadora. De acuerdo a la estructura resultante, el nombre IUPAC de la molécula es 1-ciclopropil-7-(3,5-dimetilpiperazin-2-yl)-5,6-difluoruro-4-oxo-1,4-dihydroquinolina-3-acido carboxílico, con un peso molecular de 377.39 g/mol.
- 10.2. Se identificó *in silico* el sitio activo del AND girasa en el que se acoplan las quinolonas, el cual es una región en la subunidad A comprendida entre arginina 32 y tirosina 122, siendo los aminoácidos principales, ARG32, ARG46, ARG47, HSD80, SER83, THR83, ALA84, TYR86, SER97, ARG91, ARG121 y TYR122.
- 10.3. Se realizó un acoplamiento molecular con las posibles estructuras de quinolonas con propiedades germicidas inhibitoras del ADN girasa del *Pseudomonas aeruginosa*. Se obtuvo la energía de enlace más baja de -8.9 Kcal/mol de temafloxacina, perteneciendo las energías de enlace más bajas a las quinolonas de tercera y cuarta generación.
- 10.4. Se determinó un espacio químico farmacofórico relevante en el sitio activo del ADN girasa de *P. aeruginosa*, el cual está comprendido por los aminoácidos, GLU7, ILE8, VAL28, ARG47, HSD78, PRO79, HSD80, TYR149 y VAL621.
- 10.5. Se comprobó *in silico* la eficiencia ligando-receptor de la nueva molécula por medio de programas de enlace automatizado y predicciones de farmacocinética y toxicidad. La nueva molécula tiene una energía de enlace de -8.5 Kcal/mol, cumple con la Regla de Lipinski y tiene un comportamiento similar al de ciprofloxacina y levofloxacina según los parámetros de farmacocinética y toxicidad (ADMET), por lo que se le considera como un candidato con posible actividad germicida del ADN girasa de *Pseudomonas aeruginosa*.

## 11. RECOMENDACIONES

- 11.1. Se recomienda dar seguimiento a esta investigación realizando la síntesis de la nueva molécula seleccionada como mejor candidato con actividad germicida del ADN girasa de *Pseudomonas aeruginosa* y determinar sus propiedades físicas y químicas.
- 11.2. Llevar a cabo pruebas *in vitro* para evaluar la actividad germicida de la molécula y determinar su concentración de inhibición mínima (CIM) con respecto a las quinolonas de referencia.
- 11.3. Si la actividad germicida de la molécula es demostrada, evaluar la factibilidad para su uso como antibiótico de uso oral, por la conveniencia que representa. Para esto último, se recomienda realizar pruebas *in vivo* que demuestren la eficacia y seguridad del fármaco.

## 12. REFERENCIAS

- Adam, J., Kříž, Z., Prokop, M., Wimmerová, M. y Koča. (2008). *In silico* Mutagenesis and Docking Studies of *Pseudomonas aeruginosa* PA-IIL Lectin Predicting Binding Modes and Energies. *J. Chem. Inf. Model*, 48(11): 2234 - 2242.
- Alvarado, J. (2015). *Resistencia Bacteriana en Infecciones del Tracto Urinario Adquiridas en la Comunidad*. Tesis de Maestría, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Berman, H., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T., Weissing, H., . . . Bourne, P. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28, 235-242. Retrieved from [www.rscb.org](http://www.rscb.org)
- Biasini, M., Biernert, S., Waterhouse, A., Studer, A., Schmidt, T., Kiefer, F., . . . Schwede, T. (2014, July). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), W252-W258.
- Brunton, L., Chabner, B. y Knollman, B. (2012). Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la Terapéutica. (12ª Edición). México: McGrawHill Interamericana Editores, S.A. de C.V. Pp. 1470-1472.
- Cabral, J., Jackson, A., Smith, C., Shikotra, N., Maxwell, A., & Liddington, R. (1997, Agosto). Crystal structure of the breakage-reunion domain of DNA gyrase. *Nature Macmillan Publishers, Ltd*, 388(28), 903-906.
- Campos, A., Martínez, M., & Mendoza, N. (2008). Actualidades farmacológicas: Quinolonas. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*. 51(4); 173-177.
- Carrascosa, F. (2009). *Diseño de un nuevo fármaco inhibidor de la proteasa presente en el Virus de Inmunodeficiencia Humana Tipo 1 a partir de 3 antirretrovirales (Lopinavir, Darunavir, Tipranavir), por medio de nanotecnología computacional*. Guatemala: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología- CONCYT-.
- Chemicalize.org. (2016). *About - Chemicalize.org*. [Página Web]. Extraído durante el mes de abril de 2017 en: <http://www.chemicalize.org/about.php>

- Chen, L., Perlina, A., & Lee, C. (2004). Positive Selection Detection in 40,000 Human Immunodeficiency Virus (HIV) Type 1 Sequences Automatically Identifies Drug Resistance and Positive Fitness Mutations in HIV Protease and Reverse Transcriptase. *Journal of Virology*, 78(7), 3722-3732.
- Feixiong, C., Weihua L., Yadi Z., Jie S., Zengrui W., Guixia L., Philip, L, & Yun T. admetsAR: a comprehensive source and free tool for evaluating chemical ADMET properties. *J. Chem. Inf. Model.*, 2012, 52(11): 3099-3105.
- Felipe, E. (2010). *Determinación de metaloenzimas en aislamientos de Pseudomonas aeruginosa provenientes del Hospital General San Juan de Dios*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Ferreirós, M. (2012). *Modulación de la actividad de la glicoproteína P por los cannabinoides*. Argentina: Universidad de Buenos Aires.
- Grujicic, M., Bell, W., Pandurangan, B. & He, T. (2010). Blast-wave impact-mitigation capability of polyurea when used as helmet suspension-pad material. *Materials & Design, Elsevier*, 31(9): 4050-4065.
- Gutiérrez, N. (2004). Relación entre estructura, actividad y efectos adversos de las quinolonas. *Revista Española de Quimioterapia*. 17(3); 232-243.
- Hansen, K., Mika, S., Schroeter, T., Sutter, A., ter Laak, A., Steger-Hartmann, T., . . . Muller, K. (2009). Benchmark data set for in silico prediction of AMES Mutagenicity. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 49(9), 2077-2081.
- Henning, J., Brengel, C., Philipp, M., Groh, M., Plaza, A., Müller, R., et. al. (2013). Combining *in silico* and Biophysical Methods for the Development of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Inhibitors: An Alternative Approach for Structure-Based Drug Design. *Journal of Medicinal Chemistry*, pp. 1 - 28.
- Hernández, M., Celorrio, J., Lapresta, C. y Solano, V. (2014). Fundamentos de antisepsia, desinfección y esterilización. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 32(10):681-688.
- Jahashree, B., Thomas, S. y Nayak, Y. (2010). Design and synthesis of 2-quinolones as antioxidants and antimicrobials: a rational approach. *Med Chem Res*, 19:193 - 209.



- Jain, A. (2006). Scoring Functions for Protein-Ligand Docking. *Current Protein and Peptide Science*, 7, 407-420.
- Kitchen, D., Decornez, H., Furr, J., & Bajorath, J. (2004). Docking and Scoring in Virtual Screening for Drug Discovery: Methods and Applications. *Nature Reviews: Drug Discovery*, 3, 395-349.
- Kim, S., Thiessen, P., Bolton, E., Chen, J., Fu, G., Gindulyte, A., . . . Bryant, S. (2016, January). PubChem Substance and Compound Databases. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1201 - 1213.
- Kumar, S., Nath, P., & Kumar, P. (2013, Octubre - Diciembre). In-silico identification and molecular docking studies of quinolone resistance determining region (QRDR) of E. coli DNA gyrase-A with n-substituted piperazinyl schiff bases of gatifloxacin. *Int. J. Drug Dev. & Res.*, 5(4), 203 - 210.
- Law, V., Knox, C., Djoumbou, Y., Jewison, T., Guo, A., Liu, Y., . . . Wishart, D. (2014, January). DrugBank 4.0: shedding new light on drug metabolism. *Nucleic Acids Res*, 42(1), 1091 - 1097.
- Leyva, S. y Leyva, E. (2008). Fluoroquinolonas. Mecanismos de acción y resistencia, estructura, síntesis y reacciones fisicoquímicas importantes para propiedades medicinales. *Bol. Soc. Quím. Méx.*, 2(1):1-13.
- Lipinski, C. (2000). Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 44, 235-249.
- Lipinski, C., Lombardo, F., Dominy, B., & Feeney, P. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46, 3-26.
- Loch-Neckel, G., & Koepp, J. (2010). La barrera hematoencefálica y la administración de medicamentos en el sistema nervioso central. *Rev Neurol*, 51(3), 165-174.
- Lombardo, M. (2012). *Nuevas metodologías analíticas para la determinación de quinolonas y otros residuos en muestras alimentarias y ambientales*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada Facultad de Ciencias, España.

- Luzzaro, F. (2008). Fluoroquinolones and Gram-negative bacteria: antimicrobial activity and mechanisms of resistance. *Infez Med*, 16(6): 5-11.
- McGann, M., & Almond, H. N. (2003). Gaussian Docking Functions. *Biopolymers*, 68,, 76-93.
- Mella, S., Acuña, G., Muñoz, M., Pérez, C., Labarca, L, González, G., et. al. (2000). Quinolonas: Aspectos generales sobre su estructura y clasificación. *Rev Chil Infec.* 17(1); 53-66.
- Mishra, S., Sharma, C., Singh, H., Pandiya, H., & Kumar, N. (2016, Diciembre). In silico ADME, bioactivity and toxicity parameters calculation of some selected anti-tubercular drugs. *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research*, 6(6), 77-79.
- Morataya, U. (2004). *Determinación de Resistencia Antimicrobiana en Infección Urinaria de la Comunidad en el Hospital Roosevelt de Guatemala*. Tesis de Licenciatura, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Mouneimné, H., Jerome, R., Jarlier, V. y Cambau, E. (1999). Type II topoisomerase mutations in ciprofloxacin-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 43(1):62-66.
- NIH Center for Macromolecular Modeling & Bioinformatics. (2006, May). Theoretical and Computational Biophysics. Retrieved from <http://www.ks.uiuc.edu/>
- Ostrov, D. (2007). Discovery of Novel DNA gyrase inhibitors by High-Throughput virtual screening. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. *National Journal of Chemistry*, 34(6):3688-3698.
- Ostrov, D., Hernández, J., Corsino, P., Finton, K., Le, N. y Rowe, T. (2007). Discovery of Novel DNA Gyrase Inhibitors by High-Throughput Virtual Screening. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51 (10):3688 - 3698.
- Pence, H. (2010). ChemSpider: An Online Chemical Information Resource. *Journal of Chemical Education*, 87(11), 1123 - 1124.

- Peña, C. (2015). *Estudio computacional de la interacción de antibióticos tipo quinolonas con su enzima blanco ADN girasa y sus implicaciones en la resistencia bacteriana de Pseudomonas aeruginosa*. Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia, Colombia. Pp. 5-75.
- Poole, K. (2011). *Pseudomonas Aeruginosa: Resistance to the Max*. *Frontiers in Microbiology*, 2(65), 1-10.
- Rodríguez J. (2005). Mecanismos de Resistencia a quinolonas mediada por plásmidos. España, *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*, 23(1):25-31.
- Romero, R. (2007). Microbiología y parasitología humana. (3ª edición). Argentina: Editorial Medica Panamericana. Pp. 877-878.
- Ruiz, L. (2007). *Pseudomonas aeruginosa: Aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos*. Tesis Doctoral, Universidad de Barcelona, España. Pp. 7-9.
- Schneider, G., & Fechner, U. (2005). Computer- Based De Novo Design of Drug-Like Molecules. *Nature Reviews: Drug Discovery*, 649-663.
- Sherry, S., Ward, M., Kholodov, M., Baker, J., Phan, L., Smigielski, E., & Sirotkin, K. (2001). dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Research*, 29(1), 308-311.
- Sierra, J. (2005). *Bases moleculares de la resistencia a quinolonas en Staphylococcus aureus, Staphylococcus pneumoniae y Corynebacterium spp*. Tesis de doctorado. Universidad de Barcelona, España.
- Song, C., Lim, S., & Tong, J. (2009). Recent Advances in Computer-Aided Drug Design. *Briefings of Bioinformatics*, 579-591.
- Spitzer, R., and Jain, B. (2012). Surflex-Dock: Docking Benchmarks and Real-World Application. *J Computer-Aided Molecular Design*, 26: 687-699.

- Srinivas, A., Priyadarshini, S., Praveen, P., Pradeep, H., & Narahari, G. (2007). Virtual Screening in Drug Discovery - A Computational Perspective. *Current Protein and Peptide Science*, 331-353.
- Stover, et. al. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406, 959 - 964.
- The, H., González, I., Bermejo, M., Sanjuan, V., Centelles, I., Garrigues, T., & Cabrera, M. (2011). In silico prediction of Caco-2 permeability by a classification QSAR approach. *Molecular Informatics*, 30, 376- 385.
- The UniProt Consortium. (2016, January). UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D158 - D169.
- Trott, O., & Olson, A. (2010). Software News and Update AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *J Comput Chem*, 31:, 455-461.
- Vargas, R. (2012). *Diseño de un nuevo fármaco inhibidor de la proteasa presente en el Virus de Inmunodeficiencia Humana Tipo uno a partir de tres antirretrovirales (Lopinavir, Darunavir, Tipranavir), por medio de nanotecnología computacional*. Guatemala: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.
- Verma, J., Khedkar, V., & Coutinho, E. (2010). 3D-QSAR in Drug Design - A Review. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 95-115.

## 13. ANEXOS

### 13.1. Marco Teórico

#### 13.1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo gram negativo, móvil por flagelo polar único y aerobio perteneciente a la familia *Pseudomonadaceae*. Es relativamente ubicua y comúnmente se le encuentra en polvo, agua, plantas, verduras, animales y ambientes marinos. Puede crecer bien en diferentes medios y soporta gran variedad de condiciones físicas, sin embargo, prefiere los ambientes húmedos (Felipe, E., 2010, p.4).

Como todos los miembros de esta familia, es muy versátil metabólicamente, pudiendo utilizar más de 80 compuestos orgánicos como fuentes de carbono y energía. Es oxidasa positiva y puede crecer a temperaturas superiores a 42 °C.

Debido a su habilidad para sobrevivir en ambientes acuosos con nutrientes mínimos, y como consecuencia de su gran versatilidad metabólica, estos organismos han llegado a ser problemáticos en los ambientes hospitalarios, donde esta especie ha sido aislada de una elevada variedad de soluciones acuosas, incluyendo desinfectantes, jabones, fluidos de irrigación y de diálisis y, sus equipamientos.

La *P. aeruginosa* es el patógeno humano más importante del genero *Pseudomonas*, tanto respecto al número, como al tipo de infecciones causadas y a la morbilidad y mortalidad asociadas. Aunque no es frecuente encontrar a este microorganismo como parte de la flora bacteriana de individuos sanos, el tracto gastrointestinal es el lugar más frecuente de colonización.

El espectro de infecciones que puede causar, va desde una foliculitis, hasta la bacteriemia que puede comprometer la vida de los pacientes. Las infecciones más comunes implican la córnea, la piel y el tracto urinario y respiratorio, aunque en realidad las infecciones por

este patógeno pueden ocurrir en todas las localizaciones anatómicas, y todas ellas pueden derivar en bacteriemia (Ruiz, L., 2007, p. 7-9).

También es particularmente importante en pacientes con infecciones en quemados u otros traumatismos severos que afecten a amplias zonas de la piel o bien en pacientes con fibrosis quística; sin embargo, no es un parásito estricto, sino un oportunista típico, especialmente en medios hospitalarios, iniciando una infección cuando el individuo se encuentra inmunocomprometido; también puede causar infecciones sistémicas, infecciones nosocomiales derivadas de cateterismos, traqueotomías, punciones lumbares y transfusiones; infecciones en pacientes con tratamientos inmunosupresores, corticosteroides, antibióticos o radiaciones; puede contaminar heridas quirúrgicas, abscesos, quemaduras e infecciones de oído (Felipe, E., 2010, p. 4).

Los factores que contribuyen a la patogénesis y virulencia incluyen la capacidad de adherencia, producción de toxinas y producción de glicocálix. La adherencia al epitelio celular es favorecida en procesos tales como la intubación, cateterización urinaria y trauma. Las toxinas pueden causar necrosis; y la producción de glicocálix puede favorecer la formación de un biofilm mucoso alrededor de las colonias de *Pseudomonas aeruginosa*, formando una barrera contra las defensas del huésped, los antibióticos y los desinfectantes (Felipe, E., 2010, p. 9).

### **13.1.2. Resistencia de *Pseudomonas aeruginosa***

Resulta de gran importancia mencionar la resistencia de esta bacteria, no solo a los antibióticos, sino también a los efectos de algunos antisépticos, ya se ha aislado de compuestos cuaternarios de amonio y de algunos jabones que contienen hexaclorofeno. Esta resistencia, que es mayor que la de otras especies en sus formas vegetativas, le permite tener vida libre y puede sobrevivir en amplios nichos ecológicos (Romero, R., 2007, p. 877).

Existen diferentes sustancias son usadas en el área de la salud como agentes desinfectantes. Diferentes factores afectan la acción biocida como la concentración

celular, el tiempo de contacto, pH y temperatura entre otros. Los mecanismos de acción entre los antibióticos y agentes desinfectantes son muy similares, una de ellas es la penetración de agentes cationicos los cuales entran por difusión pasiva. Tal es el caso de la clorhexidina o desinfectantes de amonio cuaternario, en comparación con polimixinas y aminoglucósidos. El daño en la membrana ocasionada por la clorhexidina o antibióticos como la estreptomicina, efectos en la síntesis de ADN donde interviene el mismo desinfectante anteriormente mencionado, así como el caso de las fluoroquinolonas actinomicina (Huerfano, B., 2011, p. 5).

### 13.1.3. Resistencia a antimicrobianos

La resistencia bacteriana a diferentes sustancias como antibióticos y desinfectantes es uno de los principales problemas en cuestión de salud, ya que las infecciones por cepas multirresistentes de *Pseudomonas aeruginosa* han venido en aumento y en contraposición el desarrollo de nuevos productos antimicrobianos en el tiempo es lenta.

La resistencia bacteriana es la capacidad adquirida de un organismo para resistir los efectos de un agente quimioterapéutico al que es susceptible habitualmente. Esta a su vez se clasifica en dos grupos: los que tienen una resistencia natural como es el caso de *Pseudomonas aeruginosa* a algunos antimicrobianos (sulfonamidas) y por otro lado se encuentra el grupo de resistencia adquirida, que se caracteriza por un cambio o mutación puntual en la ADN dada por la presencia de plásmidos; secuencias de ADN que transportan los genes de resistencia, con capacidad de replicarse de manera independiente a la batería genética de la célula (Huerfano, B., 2011, p. 6).

La mayor parte de la resistencia a antibióticos es debida a genes de resistencia que se transfieren por intercambio genético. Dicha resistencia es generada por la aparición de genes de origen cromosómico y extracromosómico cuya diseminación a casi todas las especies bacterianas es debida entre otras causas al uso indiscriminado e inadecuado de todo tipo de antibióticos.

Esta modificación en el genoma es debida a cambios en los procesos evolutivos bacterianos que llevan a mutaciones en los nucleótidos del ADN, así como a fenómenos de mutación, duplicación, deleción o transposición, siendo estos la causa de la dispersión de las cepas resistentes (Felipe, E., 2010, p.11).

Los mecanismos generales de resistencia bacteriana son los siguientes:

- a) Salida incrementada del antibiótico gracias a bombas de expulsión activa, también llamadas bombas de flujo.
- b) Disminución de la permeabilidad de la membrana.
- c) Cambios estructurales de PBP's (Proteínas fijadoras de penicilina)
- d) Inactivación de la droga (reversible o irreversible) debido a la presencia de Beta-lactamasas.

(Felipe, E., 2010, p.12).

#### **13.1.3.1. Bombas de expulsión activa**

Las bombas de expulsión activa son proteínas capaces de eliminar antibióticos, algunas sólo eliminan un tipo de compuestos, pero otras expulsan una amplia variedad de sustratos, con escasa relación química entre sí, por lo que se denominan bombas de expulsión multidroga (Felipe, E., 2010, p.12).

#### **13.1.3.2. Disminución de la permeabilidad de la membrana**

La penetración de los antibióticos a través de la membrana externa de las bacterias ocurre por medio de porinas, que son proteínas transportadoras específicas para compuestos con características fisicoquímicas determinadas. Por lo que la permeabilidad de la membrana bacteriana a los antibióticos está determinada por la presencia y cantidad de porinas. La resistencia bacteriana por este mecanismo se da cuando la bacteria deja de sintetizar las porinas que permiten el ingreso de los antibióticos o cambia su estructura (Felipe, E., 2010, p.12).



Se ha demostrado que *P. aeruginosa* presenta una baja permeabilidad en su membrana externa (aproximadamente un 8% de la de *E. coli*), la cual está determinada por las propiedades de las porinas de este organismo. Esta propiedad surge, probablemente, de la competición por un nicho ecológico, como por ejemplo el suelo, donde muchos microorganismos producen sustancias antibióticas. Por ello, *Pseudomonas*, además de producir sus propias sustancias antimicrobianas, ha desarrollado y mantenido la habilidad intrínseca de resistir los compuestos secretados por otros microorganismos y, uno de los modos consiste en tener una membrana externa impermeable.

Existen básicamente tres tipos de resistencia en *P. aeruginosa*: intrínseca, adaptativa o inducible y mutacional. El elemento que los tres tipos comparten es la baja permeabilidad de la membrana. Está generalmente aceptado el hecho que esta baja permeabilidad es debida a una serie de porinas con una débil efectividad, que hacen que la membrana presente un marcado límite de exclusión, permitiendo el paso de compuestos de unos 3000 Da de peso molecular, comparado con el límite de 500 Da que presenta *E. coli* (Ruiz, L., 2007, p. 22).

#### **13.1.3.3. Cambios estructurales de PBP's (Proteínas fijadoras de Penicilinas)**

Este mecanismo de resistencia consiste en que los microorganismos cambian la estructura de las PBP's presentes en su membrana de tal manera que no permite la unión del antibiótico a éstas. Es efectivo para antibióticos que tienen como objetivo inhibir la síntesis de la pared celular bacteriana y cuyo sitio blanco son las PBP's (Felipe, E., 2010, p.13).

#### **13.1.3.4. Producción de Beta-lactamasas**

Las Beta-lactamasas son proteínas enzimáticas que catalizan la hidrólisis del anillo Beta-lactámico, separando el enlace amida, impidiéndole al antibiótico inhibir la síntesis de la pared celular.

Las Beta-lactamasas en las bacterias gram negativo como *P. aeruginosa* se encuentran en el espacio periplásmico entre la pared celular y la membrana externa. Aunque todas las Beta-lactamasas catalizan la misma reacción, se han aislado y caracterizado numerosos tipos de enzimas que se clasifican en forma diversa de acuerdo, por ejemplo, a su secuencia de aminoácidos, peso molecular o especificidad del sustrato. La localización del gen que codifica la Beta-lactamasa es variable, pudiendo localizarse en el cromosoma o estar codificada por plásmidos. Las Beta-lactamasas cromosómicas son universales en una bacteria específica mientras que la presencia de ellas codificadas por plásmidos es variable y transferible entre las diversas especies bacterianas (Felipe, E., 2010, p.13).

#### 13.1.4. Resistencia a agentes químicos

Germicidas son aquellas sustancias que por medios químicos o bien biológicos pueden destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un efecto de control sobre cualquier organismo nocivo. Recientemente se ha propuesto una definición más simple y clara según la cual un germicida es una molécula química activa en un producto para inhibir o destruir bacterias. La actividad antimicrobiana es el efecto letal o inhibitorio, tanto de un producto germicida como de un antibiótico (Hernández, M., Celorrio, J., Lapresta, C. y Solano, V., 2014, p. 682).

Estas sustancias usadas en el proceso de desinfección pueden atacar al microorganismo en diferentes puntos: daño en la pared celular causando lisis de la célula, alteración de la permeabilidad de la membrana alterando el intercambio de nutrientes vitales para el microorganismo, alteración de las proteínas e inhibición de ácidos nucleicos y enzimas.

La resistencia a desinfectantes puede estar dada por unas propiedades naturales de la célula o por la adquisición de trasposones o plásmidos. Se ha documentado que la resistencia presentada por las bacterias Gram negativas, como lo es la *Pseudomonas aeruginosa*, es mayor que la presentada por las Gram positivas. Dentro de los desinfectantes encontramos a los compuestos de amonio cuaternario los cuales han sido los más estudiados en cuanto a resistencia bacteriana se refiere. Éstos son agentes bactericidas especiales contra bacterias Gram positivas y en menor proporción con las

Gram negativas. Atacan principalmente la membrana celular, ya que se une a los fosfolípidos y proteínas disminuyendo la permeabilidad.

La resistencia presentada por las bacterias frente a éste tipo de desinfectantes está dada por un mecanismo de expulsión del antibiótico mediado por unas bombas que han sido identificadas en bacterias Gram positivas y Gram negativas. Dentro de éste último grupo se encuentran el gen *gacE*, y *gacE-1* (Huerfano, B., 2011, p. 9).

Los fenoles son un grupo de desinfectantes a los cuales se les atribuye la resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* describiéndose una resistencia fenotípica en conjunto con la disminución de nutrientes (Huerfano, B., 2011, p. 10).

#### **13.1.5. Estructura tridimensional del ADN girasa de *Pseudomonas aeruginosa***

Es poca la información sobre la estructura tridimensional específica del ADN girasa de *Pseudomonas aeruginosa*, así como de investigaciones sobre su inhibición. Esto se debe a que pocas girasas son tan eficientes como las de *E. coli* en la formación de superenrollamientos negativos, por lo que el ADN girasa de *E. coli* se ha convertido en el modelo para la realización de estudios de diferentes índoles, que luego son adaptados y extrapolados para diferentes organismos (Stover, et. al., 2000, p. 961).

Sin embargo, debido a la alta tasa de mutación de las topoisomerasas II y, por lo tanto, la alta resistencia a los antibióticos, específicamente a quinolonas, es preferible tener un modelo tridimensional del organismo diana, para obtener un sitio activo más exacto y así comparar los aminoácidos implicados en la acción girasa-quinolona reportado para otros organismos con respecto al de *P. aeruginosa*. Esto con objetivo de conocer los determinantes estructurales de la interacción quinolona-ADN girasa que permitan un diseño *de novo* mejor dirigido con el cual disminuir la resistencia observada en las quinolonas (Peña, 2015, p. 2).

Cuando no se tiene una estructura tridimensional de la proteína diana, es posible predecirla a partir de la estructura primaria y luego adaptarse a un modelo tridimensional

ya conocido, como es el caso de la *E.coli*, a través de dinámica molecular o modelado por homología. A partir de esto, se puede utilizar dicha estructura para predecir las interacciones que se establecen entre proteína-ligando (Peña, 2015, p. 22- 32).

#### 13.1.6. Las Quinolonas

El término quinolona deriva de quinolina, el núcleo aromático presente en los alcaloides de la quina y otros antipalúdicos clásicos, ya que de éste deriva la estructura básica de todas ellas. Las quinolonas constituyen una familia de antibióticos bactericidas contra microorganismos grampositivos y gramnegativos de amplio espectro, son un grupo de agentes sintéticos, numerosos y químicamente muy heterogéneo que bloquean la duplicación bacteriana del ADN, al inhibir la topoisomerasa bacteriana II (DNA-girasa) y la topoisomerasa IV.

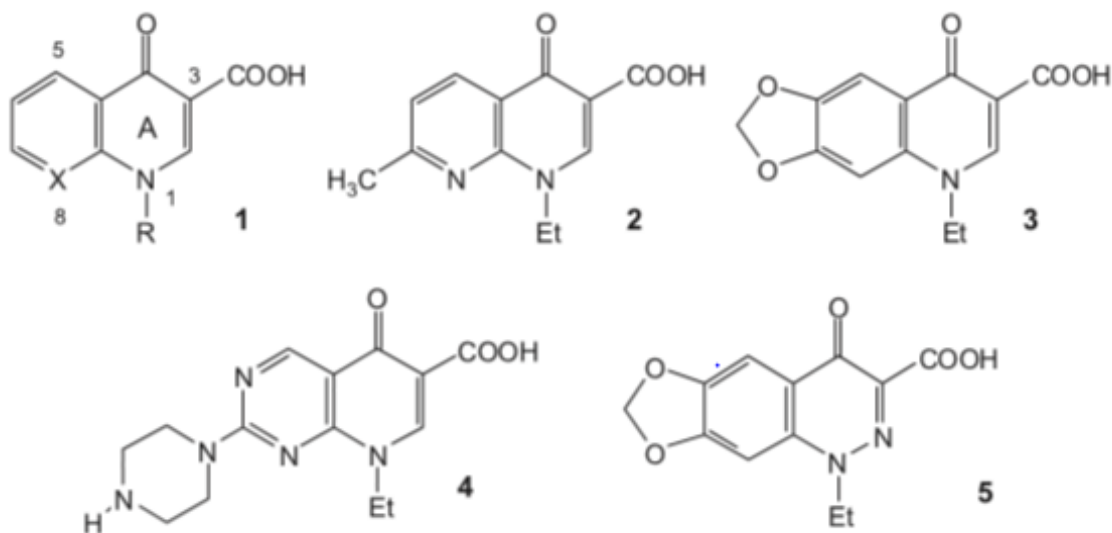
##### 13.1.6.1. Estructura química y clasificación

Las quinolonas son un grupo de agentes antimicrobianos sintéticos, numerosos y químicamente muy heterogéneo. Estructuralmente consisten de una parte A constituida por un ácido 1-sustituido-1,4-dihidro-4-oxopiridin-3-carboxílico (1) combinado con un anillo aromático o heteroaromático B. En conjunto, podemos definirlos como derivados de ácido 3-carboxílico-4-oxo de una naftiridina (2), quinolina (3), piridopirimidina (4) o cinolina (5) (Figura 1). En el caso de quinolonas policíclicas existen posiciones de puente en N-1, C-8; N-1, C-2; C-2, C-3; C-6, C-7; N-1, C-8, C-2 (Figura 2) (Leyva, S. y Lyeva, E., 2008, p. 1).

El ácido nalidíxico (2) fue la primera quinolona utilizada clínicamente, a principios de los años 60, mostrando actividad contra la mayoría de las bacterias Gram negativas causantes de infección urinaria, siendo ligeramente activo contra bacterias Gram positivas y *Pseudomonas*; teniendo una vida útil muy reducida debido al incremento de resistencia. Más tarde, modificaciones en su estructura produjeron compuestos tales como: el ácido oxolínico (3), el ácido pipemídico (4) y la cinoxacina (5), los cuales representan a las quinolonas de la primera generación que, aunque superaban algunas de las limitaciones

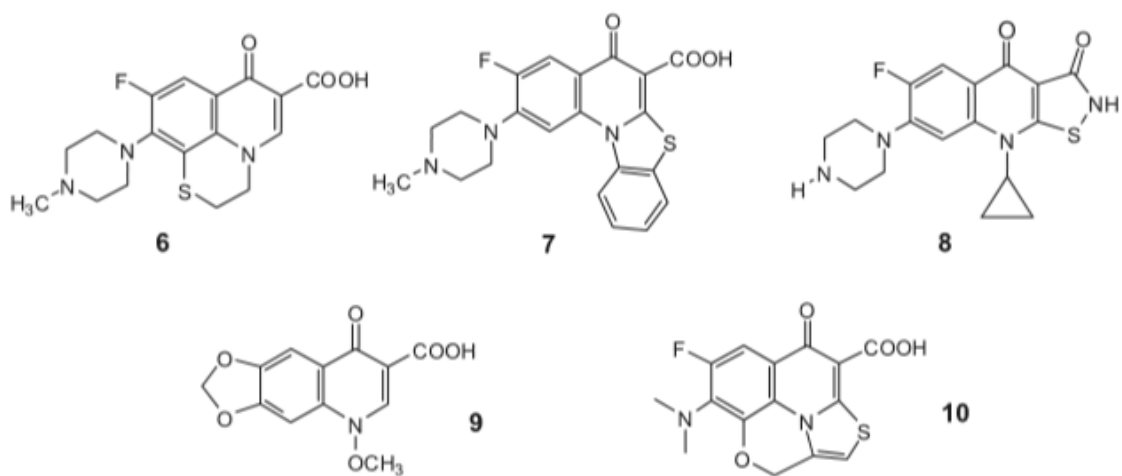
del ácido nalidíxico, seguían siendo antimicrobianos para infecciones de las vías urinarias (Figura 1) (Leyva, S. y Lyeva, E., 2008, p. 1).

**Figura 1.** Estructura general del anillo de las quinolonas



Fuente: Leyva, S. y Lyeva, E., 2008, p. 1

**Figura 2.** Quinolonas policíclicas



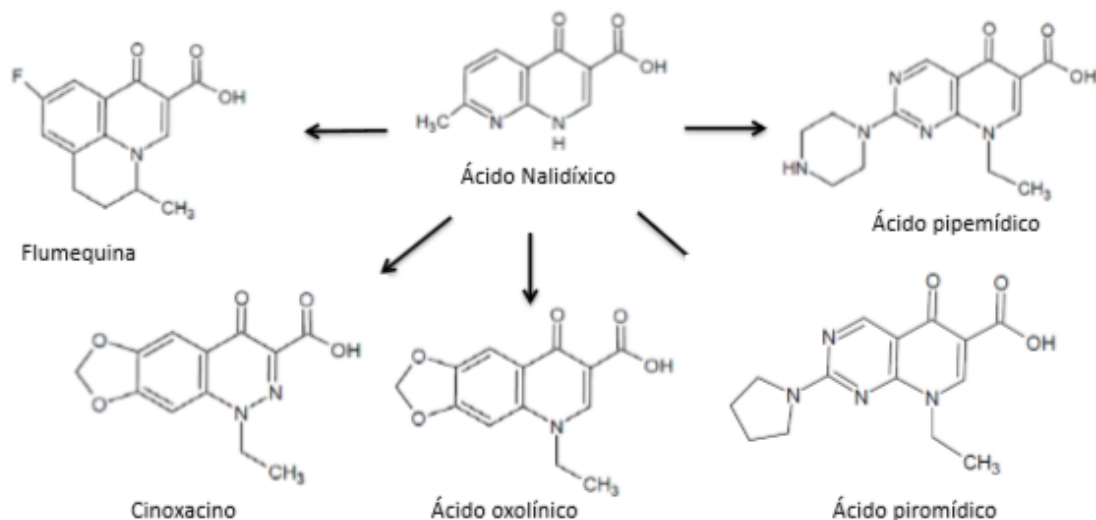
Fuente: Leyva, S. y Lyeva, E., 2008, p. 2

A partir de estas modificaciones experimentadas en el tiempo, uno de los criterios más ampliamente aceptados hoy en día es el de clasificar a las quinolonas en generaciones, dependiendo del momento de su síntesis y de los radicales utilizados:

### 13.1.6.2. Quinolonas de primera generación

Como ya se mencionó, las quinolonas de primera generación son las moléculas más antiguas y que definen los núcleos químicos básicos de estos compuestos. Comprenden al ácido nalidíxico, el ácido oxolínico, cinoxacino, ácido pipemídico, ácido piromídico y flumequina (figura 3), y se caracterizan por la ausencia de un radical 6-fluoro (con la excepción de la flumequina). Estos agentes son útiles sólo en infecciones del tracto urinario (Lombardo, M., 2012, p. 36).

Figura 3. Estructura de las quinolonas de primera generación

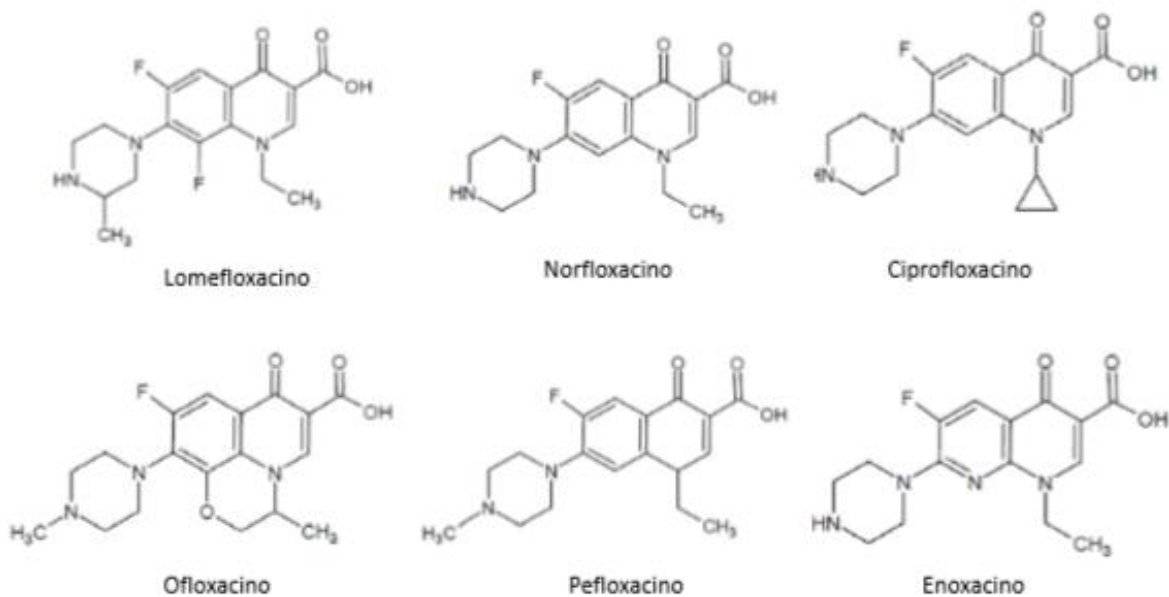


Fuente: Lombardo, M., 2012, p. 37

### 13.1.6.3. Quinolonas de segunda generación

Las quinolonas de segunda generación se caracterizan por la presencia constante del flúor en la posición 6 y la piperazina o metil piperizina en la posición 7 de la molécula. Aparecieron en los años 80 cuando se sintetizó la molécula de norfloxacin, la primera que incluía el átomo de flúor en posición 6, lo cual aumenta su acción contra el ADN girasa y facilita la penetración en la célula bacteriana. La segunda generación, se caracteriza por una excelente actividad contra bacterias gramnegativas y algunos patógenos menos típicos, por una escasa actividad contra gérmenes grampositivos, por una excelente biodisponibilidad oral, una muy buena tolerancia gástrica y con pocos efectos adversos en el paciente. Este grupo es útil en el tratamiento de infecciones graves, respiratorias, digestivas, de tejidos blandos y de transmisión sexual. En esta segunda generación se encuentran ciprofloxacino, norfloxacin, enoxacin, pefloxacino, fleroxacin, lomefloxacino, ofloxacino y rufloxacino (Lombardo, M., 2012, p. 37).

**Figura 5.** Estructura de las quinolonas de segunda generación

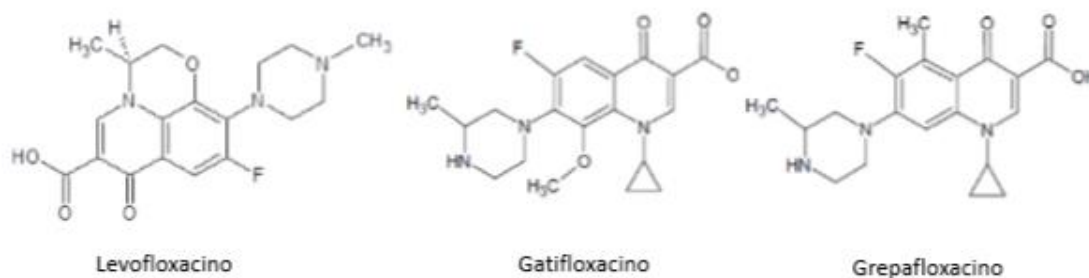


Fuente: Fuente: Lombardo, M., 2012, p. 38

#### 13.1.6.4. Quinolonas de tercera generación

La tercera generación de quinolonas, desarrollada en la década de los 90, comprende compuestos caracterizados por la presencia de grupos cíclicos aminados en la posición 7, son bi o trifluoradas. Comprende a sparfloxacino, levofloxacino, tosufloxacino, gatifloxacino, pazufloxacino y grepafloxacino. En ellas se mejoró la biodisponibilidad oral, la vida media y su acción contra bacterias grampositivas, presentando en general una actividad superior a las de la segunda generación sobre bacterias anaerobias (Lombardo, M., 2012, p. 39).

**Figura 6.** Estructura de las quinolonas de tercera generación

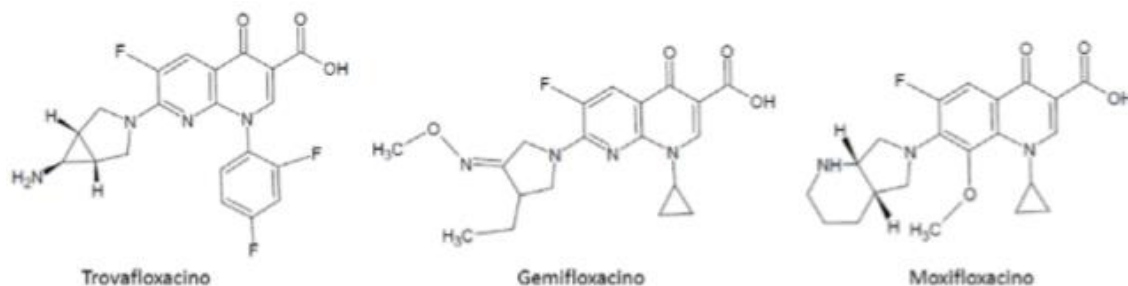


Fuente: Fuente: Lombardo, M., 2012, p. 39

#### 13.1.6.5. Quinolonas de cuarta generación

Finalmente, las quinolonas de cuarta generación muestran mayor actividad frente a organismos grampositivos y buena actividad frente a los anaerobios. Entre ellas están trovafloxacino, clinafloxacino, sitafloxacino, gemifloxacino y moxifloxacino. Por su definitiva actividad antianaerobia, se consideran como quinolonas de cuarta generación (Lombardo, M., 2012, p. 39).



**Figura 7.** Estructura de las quinolonas de cuarta generación

Fuente: Lombardo, M., 2012, p. 39

En la tabla 1 se presenta un resumen de la clasificación de las quinolonas según sus generaciones, probablemente sea el más utilizado en el ámbito hospitalario.

**Tabla 1.** Clasificación de las quinolonas

GENERACIÓN	QUINOLONA	ACTIVIDAD MICROBIOLÓGICA	CARACTERÍSTICAS	INDICACIONES
<b>PRIMERA</b>	Ac. Nalixídico	Gramnegativos: <i>E.coli</i> , <i>Proteus</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>enterobacter</i> , <i>Serratia</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Salmonela</i> , <i>Shigella</i>	Administración oral. Baja concentración en plasma y tejido	Infecciones urinarias.
	Ac. Oxolínico			
	Ac. Pipedímico			
	Ac. piromídico			
	Cinoxacino			
	Flumequina			
<b>SEGUNDA</b> <b>Clase I</b>	Lomefloxacino Enoxacino	Gramnegativos incluyendo <i>Pseudomonas spp.</i>	Administración oral. Baja concentración en plasma y tejido.	Infecciones urinarias.

	Norfloxacin	Grampositivos: <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>M. catarrhalis</i> ,	S. S. M.	
<b>Clase II</b>	Ofloxacin Ciprofloxacino	<i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>maltophilia</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i> y <i>Mycobacterium spp</i>	S. y	Administración oral e intravenosa. Altas concentraciones en plasma y tejidos. Infecciones sistémicas y urinarias.
<b>TERCERA</b>	Esparfloxacin Levofloxacin* Tosufloxacin	Gramnegativos y micobacterias Grampositivos: ( <i>Streptococcus pyogenes</i> y <i>neumococo</i> penicilina sensible a penicilina resistente) anaerobios y patógenos atípicos	y y	Administración oral e intravenosa*. Altas concentraciones en plasma y tejidos Infecciones sistémicas y urinarias
<b>CUARTA</b>	Trovafloxacin Moxifloxacin Gemifloxacin Cinafloxacino* Sitafloxacin* Balofloxacina Gatifloxacin	Bacterias anaerobias: <i>Clostridium</i> ; grampositivos incluyendo cepas de <i>S. pneumoniae</i> penicilina resistente y <i>S. aureus</i> .		Administración oral e intravenosa *. Altas concentraciones en plasma y tejidos. Infecciones sistémicas y urinarias, (infecciones respiratorias)

Fuente: Sierra, J., 2005, p. 38

### 13.1.7. Propiedades Fisicoquímicas y Químicas de las Quinolonas

Las quinolonas son drogas anfóteras, excepto algunas de primera generación que son ácidos, con peso molecular entre 300 y 400 y punto isoeléctrico mayor a 7, puesto que predominan grupos básicos (tabla 2). Al igual que las tetraciclinas, forman quelatos insolubles con cationes divalentes o trivalentes. La capacidad quelante de los metales es, en orden decreciente, el siguiente: cobre, hierro, zinc, magnesio, calcio y aluminio (Sierra, J., 2005, p. 40).

**Tabla 2.** Características Fisicoquímicas de las quinolonas.

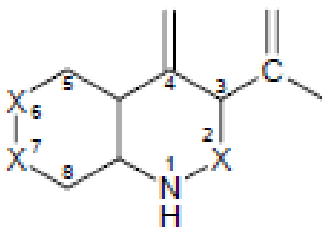
Quinolona	Peso molecular	Tiempo de vida media (horas)	Punto de Fusión (°C)	Solubilidad en agua (mg/ml)	Log P (hidrofobicidad)	Pico de concentración sérica
Ácido nalidixico	232	1.1-2.5	229.5	2.3	-1.9	
Ácido pipemídico	303	3-4	254	0.32	0.85	
Norfloxacin	319	4	227	1.01	0.46	1.5
Ciprofloxacina	331	3-5	256	1.35	0.14	2.4
Levofloxacina	361	5-7	218	1.44	-0.68	5.7
Fleroxacin	369	9-13	270	1.7	-0.66	
Gatifloxacina	375	8	183.5	0.6	0.23	3.4
Lomefloxacina	351	8	240	0.1	-0.01	2.8
Moxifloxacina	401	9-10	240	0.7	-0.02	3.1

Fuente: Sierra, J., 2005, p. 42

### 13.1.7.1. Relación estructura-actividad de las quinolonas

La actividad antibacteriana de la molécula de quinolona depende no solo de que posea el núcleo intacto, sino también de la naturaleza de los radicales periféricos que conforman la molécula, así como también de su relación espacial. Estos sustituyentes ejercen influencia sobre algunos parámetros, como la actividad antibacteriana de la molécula incrementando su afinidad por los enzimas diana, alterando la penetración de la quinolona al interior celular o alterando los parámetros farmacocinéticos. En la Figura 10 se muestra un esquema donde se relacionan los diferentes radicales con las propiedades que pueden modificar (Sierra, J., 2005, p. 166).

**Figura 8.** Estructura básica de las quinolonas.



Fuente: Gutiérrez, N., 2004, p. 233

La relación entre la estructura química y la actividad biológica de estas moléculas han motivado la síntesis de compuestos con diferentes radicales en la estructura química base y así aumentar su eficacia, potencia, espectro y disminuir sus efectos adversos (cuadro 1) (Campos, A., Martínez, M., y Mendoza, N., 2008, p. 173). Las sustituciones en las distintas posiciones podemos clasificarlas en constantes, habituales y variables. Las sustituciones constantes son las que definen al grupo. Son habituales aquellas en que las opciones de cambio son escasas, generalmente dos. Estas son las posiciones X2 y X6, y en ambos casos es un nitrógeno o un carbono unido a un átomo o un radical muy pequeño. En R1, R5, R7 y X8 las posibilidades de sustitución han sido mayores, particularmente en R7; son las sustituciones variables. De todas ellas, las que afectan a N1 y R7 son esenciales, mientras que las del carbono 5 y las del átomo en posición 8 son, aunque importantes, accesorias, particularmente las del carbono 5 (Figura 8) (Gutiérrez, N., 2004, p. 233).

**Cuadro 1.** Relación estructura-actividad de las quinolonas.

Sustituyente	Características
Radical (R <sub>1</sub> )	Amplía el espectro contra gramnegativos y mejora algunos efectos farmacocinéticos
Radical (R <sub>2</sub> )	Se han realizado pocas modificaciones
Radical (R <sub>5</sub> )	Potencia y mejora actividad contra Grampositivos y algunos efectos farmacocinéticos (incrementa la absorción, distribución)
Radical (R <sub>7</sub> )	Aumenta la potencia a bacterias gramnegativas y mejora la biodisponibilidad
Radical (R <sub>8</sub> )	Aumenta la actividad anaerobia y aspectos farmacocinéticos

Fuente: Campos, A., Martínez, M., y Mendoza, N., 2008, p. 173

Por otro lado, las 6 fluoroquinolonas presentan un átomo de flúor en la posición 6 de la molécula, con ello aumenta la capacidad de penetración a la célula bacteriana y se incrementa la afinidad por la girasa, lo que propicia un aumento de la potencia y el espectro antibacterino, además reduce los efectos adversos de manera significativa. La diferencia estructural entre las fluoroquinolonas depende de los sustituyentes en las posiciones 1, 5, 7 y 8. Lo anterior explica las diferencias en actividad antimicrobiana, vida media y la toxicidad de los distintos compuestos de la familia. El desarrollo cronológico de las distintas quinolonas, ha permitido clasificarlas en primera, segunda, tercera y cuarta generación (Campos, A., Martínez, M., y Mendoza, N., 2008, p. 173).

#### 13.1.7.2. Sustituciones en la posición 2

Pocas modificaciones se han realizado en esta posición, fundamentalmente por la cercanía a los grupos carboxilo y ceto presentes en los carbonos 3 y 4, que son fundamentales para la unión a las topoisomerasas bacterianas (Mella, S., Acuña, G., Muñoz, M., Pérez, C., Labarca, L, González, G., et. al., 2000, p. 54). De manera que una sustitución habitual que se produce en la posición 2 es la de un carbono unido a un hidrogeno (C-H), un nitrógeno, o un átomo de azufre, y la presencia de pequeños anillos unidos a R1 o C3 también produce compuestos activos. Sin embargo, ya que la posición 2 está íntimamente ligada al lugar de unión a las topoisomerasas (R3 y R4), por lo que los radicales deben ser

de pequeño volumen, ya que la presencia de radicales voluminosos inhibirá el acceso al lugar de fijación (Gutiérrez, N., 2004, p. 234).

#### 13.1.7.3. Sustituciones en las posiciones 3 y 4

En estas dos posiciones encontramos un grupo carboxilo y un grupo ceto, respectivamente. Estos dos grupos son indispensables que la molécula presente actividad antibacteriana, ya que son esenciales para el transporte al interior de la bacteria porque son parte importante en la formación del complejo Quinolona-Enzima-ADN (permiten una mayor afinidad). Su función es la de unirse al ADN, de manera que fijan el complejo y no dejan que las topoisomerasas ejerzan su función. Si el radical en posición 3 se sustituye la molécula se reduce notablemente su actividad salvo en los casos *in vivo* que este radical se vuelve a convertir en carboxilo (Sierra, J., 2005, p. 10). Es el lugar en que las quinolonas se unen al calcio, magnesio, hierro, etc., y determinan una disminución en su absorción (Gutiérrez, N., 2004, p. 234).

#### 13.1.7.4. Sustituciones en la posición 5

Los sustituyentes R5 posiblemente influyan alterando la configuración estérica de la molécula, afectando a su actividad, aunque está fuertemente influenciada por las sustituciones presentes en el resto de la molécula porque la mayoría de las clásicas (ciprofloxacino, ofloxacino) y nuevas quinolonas (clinafloxacino, gemifloxacino, gatifloxacino, sitafloxacino) presentan un átomo de hidrogeno en esta posición. De mayor a menor actividad, la presencia de un grupo amino (esparfloxacino), hidroxilo o metilo (grefloxacino) incrementa la actividad frente a grampositivos y también frente a *Toxoplasma gondii*; pero no en bacterias gramnegativas. Por el contrario, la presencia de radicales voluminosos (grupo metoxi o átomo halógeno) disminuye notablemente la actividad intrínseca de la molécula, posiblemente por interacción con las posiciones 4 y 3. Sin embargo, no todas las modificaciones que han mostrado eficacia *in vitro* reflejan un aumento de actividad *in vivo* (Gutiérrez, N., 2004, p. 236).

La mayoría de las quinolonas presenta un hidrogeno en esta posición, aunque un grupo amino (esparfloxacino), o un grupo hidroxilo o metilo (grepafloxacino) incrementan la actividad frente a grampositivos y favorece algunas propiedades farmacocinéticas. En estas dos quinolonas anteriormente citadas se han asociado los efectos adversos que producían con el radical en esta posición (Sierra, J., 2005, p. 11).

#### 13.1.7.5. Sustituciones en la posición 6

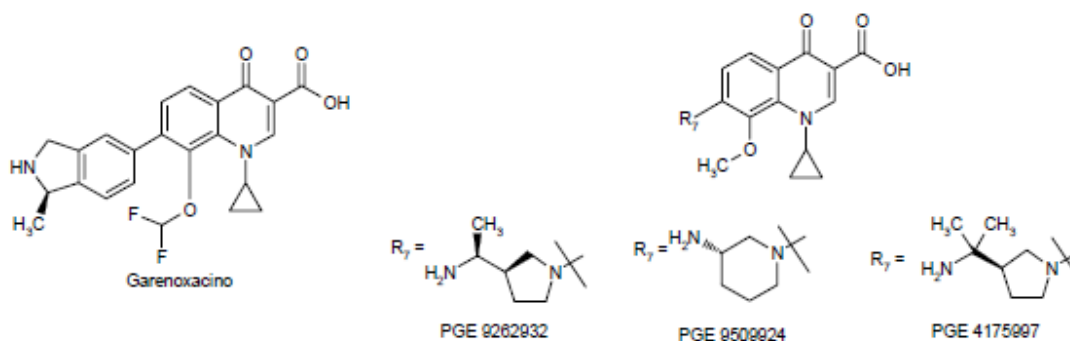
En esta posición puede existir un nitrógeno, que no admite sustitución, o un carbono, que permite la introducción de otro radical, que debe ser pequeño. La presencia de un átomo de flúor unido al carbono de la posición 6 mejora de cinco a cien veces la actividad intrínseca de la molécula comparado con las anteriores moléculas que no poseían esta sustitución (Gutiérrez, N., 2004, p. 234). La incorporación de este átomo de flúor dio lugar a lo que conocemos como 6-fluoroquinolonas. En un principio se relacionaba la posesión de este átomo de flúor con la mayor actividad de la molécula (mayor unión al complejo topoisomerasa-ADN) y con una mayor penetración de la molécula al interior celular (Sierra, J., 2005, p. 11). Estas son, por tanto, derivados fluorados del ácido 3-carboxílico de la 4-quinolona o de la 4-naftiridona, ya que en el caso de las piridopirimidinas el nitrógeno en esta posición impide la fluoración, con la consiguiente disminución de la actividad (Gutiérrez, N., 2004, p. 234).

Actualmente están en desarrollo nuevas quinolonas que presentan un átomo de hidrogeno en posición 6 en lugar del átomo de flúor; son las desfluoroquinolonas (Gutiérrez, N., 2004, p. 234). Estas nuevas quinolonas mantienen o mejoran poco su actividad frente a bacterias gramnegativas y patógenos atípicos, y aumentan mucho su actividad frente a patógenos grampositivos. Este grupo de nuevas moléculas se encuentra actualmente en pleno desarrollo (Sierra, J., 2005, p. 11).

Como en las fluoroquinolonas, los distintos sustituyentes en las posiciones 1, 7 y 8 van a ser los determinantes de su actividad antimicrobiana. Entre ellas, el principal representante, por ser la molécula más desarrollada es BMS-284756 (garenoxacino). Esta quinolona, no obstante, presenta dos átomos de flúor incorporados en un difluorometilo

en el radical 8 (CHF<sub>2</sub>). Tienen el mismo espectro de actividad que las fluoroquinolonas clásicas, aunque son ligeramente menos activas frente a microorganismos gramnegativos. Sin embargo, muestran mayor actividad frente a grampositivos (superior que moxifloxacino), incluido *Streptococcus pneumoniae* resistente al ciprofloxacino y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticiclina. Además, el garenoxacino es activo frente a la mayor parte de los anaerobios, superando la actividad de moxifloxacino, y frente a la mayoría de los microorganismos intracelulares (*Chlamydia* spp., *Mycoplasma* spp., *Ureaplasma* spp.), *Neisseria gonorrhoeae* y *Borrelia burgdorferi*. Otras quinolonas no fluoradas muestran un espectro similar (PGE 9262932, PGE 9509924, PGE 4175997) (figura 9). T-3912 es también una quinolona no fluorada que muestra buena actividad, fundamentalmente frente a grampositivos. Se trata de una 1-ciclopropil-8-metil-7-(5-metil-6-metilamino-3-piridinil)-4-oxo-1,4-dihidro-3-carboxiquinolona que presenta una actividad de 4 a 16 veces superior a otras como levofloxacino u ofloxacino frente a microorganismos grampositivos, como *S. aureus* resistente a la meticilina y *S. pneumoniae* (Gutiérrez, N., 2004, p. 236).

**Figura 9.** Nuevas quinolonas no fluoradas. Su actividad se ve modificada por la presencia de radicales, sobre todo en R<sub>7</sub>.



Fuente: Gutiérrez, N., 2004, p. 236

Otro grupo de agentes con nuevos sustituyentes en esta posición son los 6-amino, 8-metilquinolonas, que aumentan su actividad frente a grampositivos. De todas ellas, la presencia de una tetrahidroisoquinolina en C7 parece ser lo más útil de las 6-aminoquinolonas, con actividad de cuatro a cien veces mayor que ciprofloxacino, y de



igual modo la actividad va a depender también de la presencia de unos u otros radicales en las posiciones C7 y C8.

Por lo tanto, como ocurre con las fluoroquinolonas, la actividad de las desfluoroquinolonas y de las 6-aminoquinolonas va a depender, en gran parte, de los sustituyentes en las posiciones variables, influyendo estas de igual modo que en el caso de las quinolonas clásicas.

En cuanto a las sustituciones variables, podríamos hablar de unas posiciones esenciales en la actividad y las propiedades farmacocinéticas (R1 y R7), y de unas sustituciones accesorias que corresponderían a los radicales R5 y X8 (Gutiérrez, N., 2004, p. 236).

#### **13.1.7.6. Sustituciones en la posición 8**

Las sustituciones en este radical (R8) van a dar lugar a cambios en la configuración estérica de la molécula, lo cual puede implicar un cambio en la afinidad de la quinolona por una u otra topoisomerasa, probablemente debido a que el cambio de configuración afecta al acceso del antimicrobiano a la enzima o a los lugares de unión del ADN (Gutiérrez, N., 2004, p. 236).

Los diferentes sustituyentes en posición 8 van a afectar también a la actividad frente a anaerobios, a la farmacocinética, a la fototoxicidad y a la genotoxicidad de la molécula. En posición X8 puede existir un carbono (4-quinolonas) o bien un nitrógeno (4-naftiridonas) (Gutiérrez, N., 2004, p. 236). Las quinolonas derivadas de las 4-naftiridonas (Figura 3D) no permiten ningún cambio en esta posición, pues todas las valencias del nitrógeno están ocupadas, pero la presencia de este átomo de nitrógeno en posición 8 confiere a estos derivados una gran actividad *in vitro* e *in vivo*. En este grupo podemos encontrar al gemifloxacino o al trovafloxacino (Sierra, J., 2005, p. 12).

En cambio, las moléculas derivadas de las 4-quinolonas, si permiten el modificar este radical, así pues, podemos encontrar un radical halógeno en esta posición, cloro (sitafloraxacino y clinafloraxacino) o flúor (espafloraxacino), que presentan un gran aumento de

actividad frente a anaerobios (Sierra, J., 2005, p. 12), pero aumenta también la fototoxicidad, lo que ha condicionada el abandono o la suspensión de su comercialización (Gutiérrez, N., 2004, p. 237). También podemos encontrar en esta posición un grupo metoxi o metilo (moxifloxacino y gatifloxacino, respectivamente) que mejoran su actividad frente a bacterias grampositivas y anaerobios (Sierra, J., 2005, p. 12), incluso aunque estos sean resistentes a las antiguas fluoroquinolonas, y aumenta el poder bactericida frente a *Escherichia coli* resistente a las quinolonas y *Mycobacterium tuberculosis*. Son radicales habituales el hidrógeno (ciprofloxacino, norfloxacino) o un nitrógeno integrado en el ciclo de las naftiridonas (tosufloxacino, enoxacino, trovafloxacino y gemifloxacino). Estas dos últimas quinolonas van a ser activas frente a grampositivos influidos por los cambios en C7 (Gutiérrez, N., 2004, p. 237). Otro radical que podemos encontrar es un puente entre los radicales 1 y 8, una benzoxacina, como por ejemplo el levofloxacino (Sierra, J., 2005, p. 12).

Además, la presencia de uno u otro radical en C8 parece determinar qué topoisomerasa será la diana principal de cada quinolona, al menos en los grampositivos. La presencia de un hidrógeno (ciprofloxacino) o bien de un puente entre la posición N1 y C8 (benzoxacinas, ofloxacino y levofloxacino) le confiere mayor afinidad por topoisomerasa IV, lo cual se ha estudiado sobre todo en el neumococo. Por el contrario, la presencia de un átomo de cloro o flúor en esta posición va a determinar una mayor afinidad por el ADN girasa (gatifloxacino y moxifloxacino) mejorando la actividad antimicrobiana en general, posiblemente debido a la afinidad tanto por una como por otra topoisomerasa, lo que explicaría que, aunque la cepa mostrase doble cambio en las dos topoisomerasas mantuvieran su eficacia clínica a pesar de que las CMI se elevaran ligeramente.

Por otro lado, tanto la presencia del nitrógeno en X8 como el grupo metoxi o metilo disminuyen notablemente la posibilidad de selección de cepas resistentes a partir de cepas silvestres, no así un átomo halogenado. Recientemente se ha descrito que la presencia de un grupo metoxi junto con un radical voluminoso en C7 previene la aparición de cepas resistentes en *S. aureus*. Otros sustituyentes posibles, como un grupo etilo o radicales de mayor longitud, dan lugar a un descenso en la actividad antimicrobiana de la molécula (Gutiérrez, N., 2004, p. 237).

Se han dejado las posiciones 1 y 7 para el final, debido a que estas posiciones han sido las más modificadas y las más diferentes entre las quinolonas actuales. Además, estas dos posiciones son fundamentales para la unión de las quinolonas con las topoisomerasas y poder formar el complejo Quinolona-Enzima-ADN y poder bloquear la función de dichos enzimas (Sierra, J., 2005, p. 13).

#### 13.1.7.7. Sustitución en la posición 1

Los radicales ubicados en esta posición van a ser los responsables de una de las uniones de la molécula de quinolona con la topoisomerasa, por lo que este radical va a tener un papel importante en la actividad del fármaco. También cabe decir que dependiendo del tipo de radical se puede variar el espectro de acción y la farmacocinética del fármaco. En esta posición encontramos básicamente tres radical es distintos (Sierra, J., 2005, p. 13).

Las primeras quinolonas (ácido nalidíxico, ácido pipemídico) presentaban un grupo etilo, fluorado en el caso de feroxacin. Otras etilquinolonas son norfloxacin, pefloxacin, enoxacin y lomefloxacin. Posteriormente, la adición de grupos más voluminosos dio lugar a un aumento de la actividad antimicrobiana, tanto frente a grampositivos como a gramnegativos (Gutiérrez, N., 2004, p. 237).

El sustituyente de mayor importancia es el grupo de ciclopropil, lo cual la provee de una potente actividad sobre bacilos gramnegativos (Campos, A., Martínez, M., y Mendoza, N., 2008, p. 175). La mayoría de las quinolonas desarrolladas presenta este radical (ciprofloxacino, esparfloxacino, grepafloxacino, clinafloxacino, moxifloxacino, gatifloxacino y gemifloxacino) (Gutiérrez, N., 2004, p. 237) ya que el ciclopropil combina favorables propiedades estéricas, espaciales y de interacción electrónica, así la quinolona de mayor uso clínico, ciprofloxacina, presenta un grupo ciclopropil a nivel N1, exhibiendo una potente actividad sobre enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa* (Mella, S., Acuña, G., Muñoz, M., Pérez, C., Labarca, L, González, G., et. al., 2000, p. 56).

Los sustituyentes bencénicos mono o difluorados, que amplían el espectro de actividad y mejoran las propiedades farmacocinéticas, sin embargo, pueden estar asociados a

fenómenos de toxicidad (Campos, A., Martínez, M., y Mendoza, N., 2008, p. 175). El Tosufloxacino, trovafloxacino y temafloxacino presentan un 2,4-difluorfenilo que aumenta la actividad frente a grampositivos, sobre todo frente a *S. pneumoniae*, debido a que el grupo 2,4-difluorfenilo desempeña un papel importante en la expresión del efecto postantibiótico y el efecto bactericida (Gutiérrez, N., 2004, 237). Por otra parte, este tipo de sustituyentes también favorece las propiedades farmacocinéticas de la molécula (Mella, S., Acuña, G., Muñoz, M., Pérez, C., Labarca, L, González, G., et. al., 2000, p. 56).

Otros radicales en esta posición parecen dar lugar a un descenso de la actividad de la molécula, probablemente por un menor número de enlaces entre la molécula y el enzima (Sierra, J., 2005, p. 13). Finalmente, la presencia de un ciclopropilo, o mejor de un radical *tert*-butilo asociado con un metoxi en C8, aumenta la actividad frente a las micobacterias (Gutiérrez, N., 2004, p. 237).

#### 13.1.7.8. Sustituciones en la posición 7

Las sustituciones en 7, al igual que las realizadas en 1, son variables pero esenciales. Esta posición interactúa directamente con la unión de la quinolona a la ADN girasa o topoisomerasa IV (Gutiérrez, N., 2004, p. 237). Así mismo, son importantes en la de la actividad y espectro de acción, y de algunos parámetros farmacocinéticos como serían la vida media o la solubilidad de la molécula, en relación con las interacciones, controlan la de la teofilina y la fijación a los receptores GABA (Sierra, J., 2005, p. 14).

En general, las quinolonas con sustituyentes pequeños o lineales en esta posición (H, Cl, CH<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) muestran poca actividad bactericida (Sierra, J., 2005, p. 14). Por otro lado, está bien establecido que la presencia de grupos heterocíclicos nitrogenados de cinco (aminopirrolidinas) a seis (piperazinas) átomos se corresponde con una mayor actividad antimicrobiana. Los más comunes son las aminopirrolidinas, piperacinas o los azabiclos derivados de la aminopirrolidina. En general, la presencia de una aminopirrolidina (clinafloxacino, gatifloxacino, sitafloxacino) mejora la actividad frente a grampositivos, mientras que una piperazina (ciprofloxacino, norfloxacino, sitafloxacino) mejora la actividad frente a grampositivos, mientras que una piperazina (clinafloxacino,

garifloxacino, sitafloxacino) mejora la actividad frente a gramnegativos. Los metil derivados (CH<sub>3</sub>-) de piperacinas (esparfloxacino, grepafloxacino, levofloxacino) o aminopirrolidinas (gatifloxacino) también mejoran la actividad frente a grampositivos, aumentan la solubilidad y determinan una semivida de eliminación más prolongada (Gutiérrez, N., 2004, p. 237).

El gemifloxacino presenta un 3-aminometil y una 4-metiloximopirrolidina. La presencia del grupo metilo mejora la actividad frente a grampositivos, aunque la disminuye frente a gramnegativos. Por otro lado, la presencia de un radical tan voluminoso (oximino-) va a afectar negativamente a las propiedades farmacocinéticas de la molécula. La presencia de este anillo de cinco átomos asociado a un grupo metilo en el grupo oximinopirrolidina tiene efecto sinérgico en la actividad antimicrobiana, condiciones que reúne la molécula de gemifloxacino (Gutiérrez, N., 2004, p. 238).

Otra sustitución con actividad frente a grampositivos, en concreto frente a *S. pneumoniae*es la adición de un grupo benzenosulfonamida a la molécula de ciprofloxacino, por lo que esta nueva molécula en posición 7 presenta un grupo 4-(4-amonifenilsulfonyl)-1-piperazinil, esta quinolona presenta una actividad de 4 a 8 veces superior al ciprofloxacino (Sierra, J., 2005, p. 14). La última de las modificaciones en la cadena lateral de C7 es la presencia de un segundo anillo fusionado a la pirrolidina. Este es el caso de moxifloxacino (diazabicyclo) y trovafloxacino (azabicyclo). Ambos mejoran la actividad sobre grampositivos (Gutiérrez, N., 2004, p. 238).

Recientemente se ha observado que la adición de radicales voluminosos en C7 parece conferir protección frente a la resistencia mediada por bombas de flujo externo, posiblemente como resultado del aumento de hidrofobicidad de la molécula, como demuestra el hecho de que moxifloxacino no ve alterada su actividad en presencia de reserpina. También la presencia de estos radicales disminuye la probabilidad de selección de mutaciones en cepas silvestres, junto con los cambios en X8 y además aumenta la actividad frente a anaerobios. Otro fenómeno relacionado con el radical en C7 es que va a influir, como el radical en C8, en determinar la diana principal de la quinolona, al menos

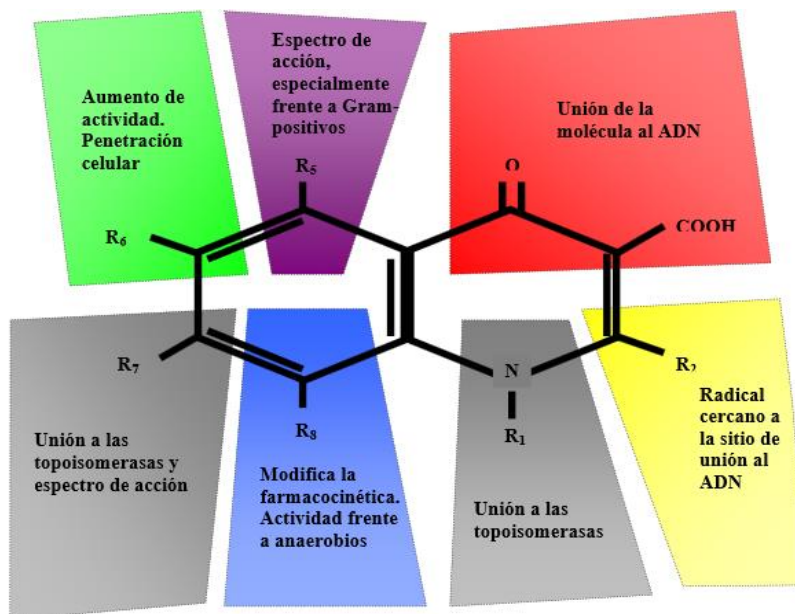
en *S. pneumoniae*, ya que para moxifloxacino la diana principal va a ser el ADN girasa (Gutiérrez, N., 2004, p. 238).

Por tanto, se puede concretar que la mejor sustitución en C7 para aumentar la actividad frente a gramnegativos es la piperacina, después las aminopirrolidinas (\*clinafloxacino), les siguen las amino-metil-oximino-pirrolidinas (gemifloxacino) y los azabiciclos, seguidos de 3-metil-piperacinas (gatifloxacino) y finalmente las dimetilpiperacinas (esparfloxacino).

En los grampositivos, en cambio, la presencia de moléculas cíclicas de cinco átomos, aminometiloximopirrolidinas, mejora la actividad con respecto a la presencia de azabiciclos, y estos mejoran la de las aminopirrolidinas. En cuanto a los sustituyentes cíclicos de seis átomos, el ms activo es el anillo 3-metil-piperacina (gatifloxacino, grepafloxacino, lomefloxacino, temafloxacino), seguido del anillo 3,5-dimetil-piperacina (esparfloxacino) y 4-metil-piperacina (ofloxacino, levofloxacino), y por último el anillo piperacínico (ciprofloxacino, norfloxacino).

Al anillo quinolona se le puede condensar otro anillo entre las posiciones 1 y 8, como es el caso de ofloxacino y levofloxacino. Aparecen así las benzoxacinas. Desde un punto de vista estructural, este anillo puede considerarse como una unión de un metilo en N1 y un grupo metoxi en 8, dando lugar a una oxacina. En este caso la actividad es ligeramente menor que la de un ciclopropilo frente a gramnegativos, aunque la forma L-isómera de ofloxacino (levofloxacino) mejora notablemente la actividad frente a los grampositivos. Es necesario, por tanto, en la relación entre estructura y actividad, valorar la isomería de las moléculas, ya que muchas quinolonas son mezclas racémicas (Gutiérrez, N., 2004, p. 238).

Figura 10. Esquema de la relación estructura-actividad de la molécula de quinolona.



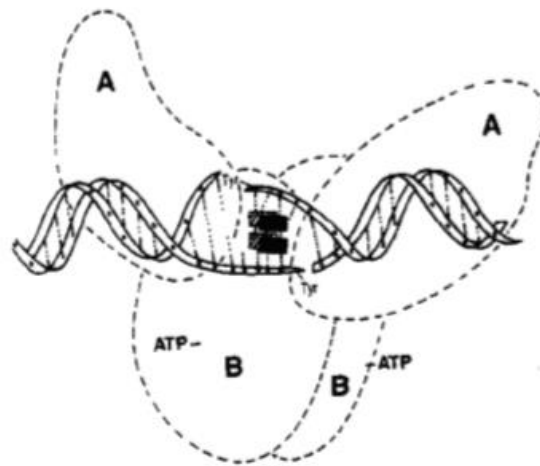
Fuente: Sierra, J., 2005, p. 17

### 13.1.8. Actividad Fisiológica

Los antibióticos de tipo quinolona se dirigen hacia la girasa de ADN y la topoisomerasa IV bacterianas. Para muchas bacterias grampositivas la topoisomerasa IV es la actividad primaria inhibida por las quinolonas. En cambio, para muchas bacterias gramnegativas la girasa de ADN es el blanco primario de la quinolona (Brunton, L., Chabner, B. y Knollman, B., 2012, p. 1472). El ADN girasa es un heterotetrámero A2B2 (Figura 11) con la subunidad A (Gyr A, 97kDa) como responsable del enrollamiento del ADN, ruptura y reunión de ADN; y la subunidad B (Gyr B, 90kDa) como la encargada de la hidrólisis de ATP y de la interacción con Gyr A y ATP. El ADN girasa introduce superenrollamientos negativos en el ADN y libera la tensión torsional acumulada por los procesos de replicación y transcripción; mientras que la topoisomerasa IV presenta una potente actividad decatenante. Ambas enzimas son esenciales para la replicación y transcripción del ADN en donde la inhibición de estas funciones conduce a una muerte celular. La inhibición del ADN girasa puede categorizarse dentro de los cinco tipos siguientes: mecanismo específico basado en la inhibición de la Gyr A, mecanismo específico basado en la inhibición de la

Gyr B, intercalación en el ADN, unión al hueco menor del ADN y quelación no específica (Leyva, S. y Leyva, E., 2008, p. 2).

**Figura 11.** Modelo propuesto de la unión cooperativa entre el ADN y la quinolona en la inhibición del ADN girasa

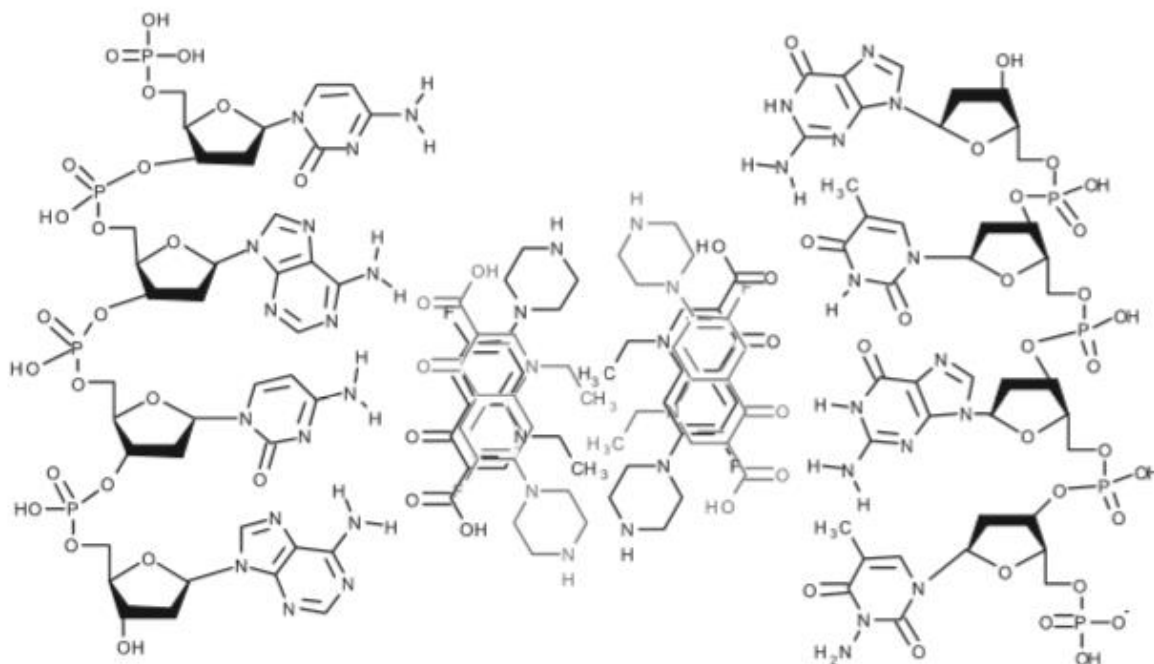


Fuente: Leyva, S. y Leyva, E., 2008, p. 2

La enzima ADN girasa actúa a través del enrollamiento de la doble cadena del ADN alrededor de sí mismo, ruptura del ADN en las dos hebras con la formación de un segmento de apertura a través del cual se pasa el ADN sin cortar y finalmente reunión del ADN. La unión de ATP a Gyr B captura el segmento de ADN sin cortar y lo dirige a través de la apertura, seguido por la hidrólisis de ATP para permitir que la enzima regrese a su conformación inicial. En un ciclo de reacción de superenrollamiento, el ADN girasa une e hidroliza dos moléculas de ATP, con una velocidad intrínseca de hidrólisis de ATP generalmente baja, donde la actividad de ATPasa es estimulada por la presencia de ADN. Las moléculas de quinolona, unidas en complejos tetraméricos (Figura 5), se acoplan a las hebras de ADN y a determinados puntos de las subunidades (A y B) de la girasa y estabilizan el complejo ternario de girasa ADN-fluoroquinolona-ADN, impidiendo su reversión y poniendo en marcha una serie de procesos, incluso hoy todavía desconocidos, que desembocan en la lisis celular (Leyva, S. y Leyva, E., 2008, p. 2).



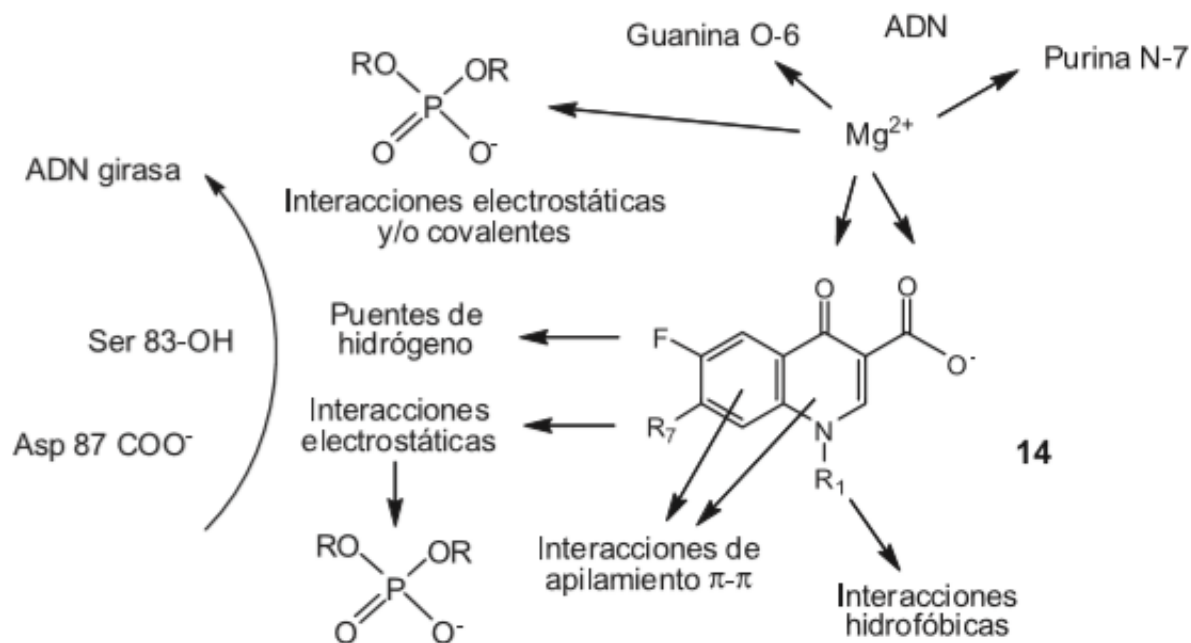
**Figura 12.** Modelo propuesto de la interacción de las quinolonas consigo mismas y con el sitio de unión (ADN).



Fuente: Leyva, S. y Leyva, E., 2008, p. 2

Existen estudios estructurales para explicar la acción de las quinolonas, donde se propone que se requiere una interacción directa entre la quinolona y el ADN de cadena doble o sencilla. Uno de los modelos sugiere que el  $Mg^{2+}$  juega un papel importante en la unión de la quinolona al complejo ADN-girasa, existiendo una interacción electrostática y/o covalente entre el ion  $Mg^{2+}$  y una molécula de quinolona junto con los grupos fosfato y las bases del ADN. En otros estudios, se sugiere también la presencia de puentes de hidrógeno y/o atracciones electrostáticas entre el flúor del C-6 y el sustituyente del C-7 de la quinolona y el receptor o enzima particularmente en algunos aminoácidos como serina 83 y/o ácido aspártico 87. También se propone este tipo de interacciones con los grupos fosfatos del ADN. Además, existen interacciones de apilamiento p-p e interacciones hidrofóbicas entre los núcleos heterocíclicos de las quinolonas (Figura 6) (Leyva, S. y Leyva, E., 2008, p. 2).

**Figura 13.** Representación esquemática de la interacción entre la fluoroquinolona con la enzima ADN girasa y el ADN.



Fuente: Leyva, S. y Leyva, E., 2008, p. 3

En la literatura se reporta que hay una relación entre la constante de asociación del complejo ternario ADN-quinolona- $Mg^{2+}$  y la actividad tóxica de la girasa. Los autores no sugieren un modelo estructural para el complejo ternario, indicando que los datos obtenidos no muestran un mecanismo de acción basado en una intercalación por parte de la fluoroquinolona dentro del ADN. Estos resultados concuerdan con las mediciones de dicroísmo circular y dicroísmo lineal de un sistema constituido por ADN-norfloxacin, donde la quinolona está significativamente inclinada con respecto al eje del ADN (Leyva, S. y Leyva, E., 2008, p. 2).

### 13.1.9. Mecanismo de resistencia de microorganismos a quinolonas fluoradas

Las mejoras tanto en actividad biológica como en propiedades farmacocinéticas aportadas por modificaciones en la estructura del ácido nalidíxico, convirtieron a la segunda generación de quinolonas en fármacos de primera línea frente a numerosas infecciones. Sin embargo, su amplio espectro, gran actividad y buena tolerabilidad propiciaron una

amplia difusión de su uso, originándose la aparición de resistencia tanto en microorganismos Gram negativos, especialmente en *P. aeruginosa* o *E. coli*, y en microorganismos Gram positivos como *S. aureus*. (Leyva, S. y Leyva, E., 2008, p. 4).

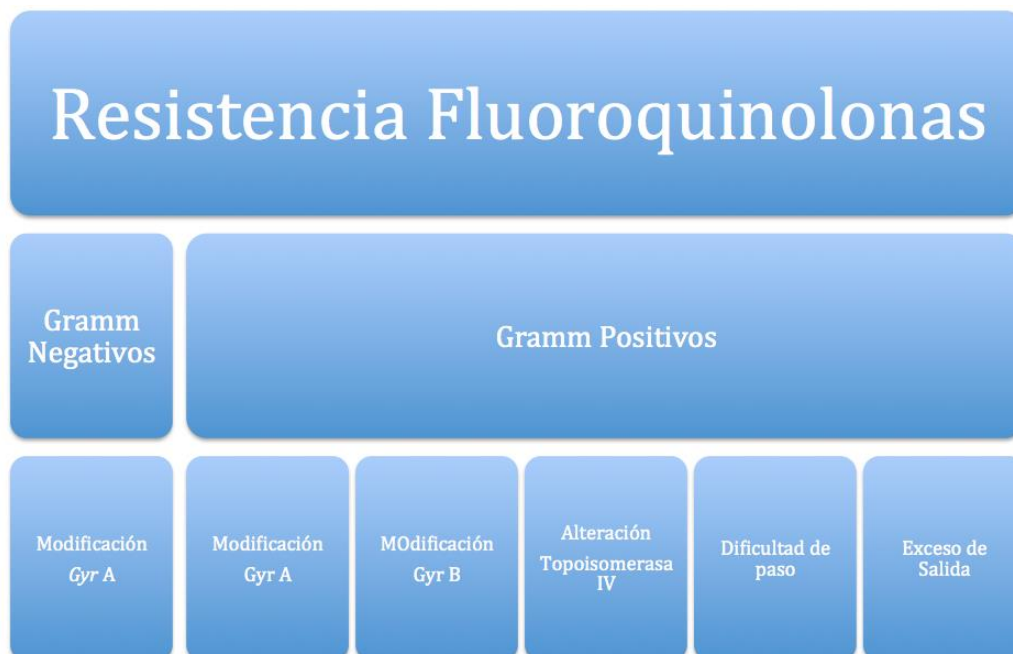
Un punto clave en la resistencia hacia la acción de fluoroquinolonas está relacionado con el ADN girasa, particularmente en su subunidad A. mutaciones en los genes codificadores de las subunidades A de la girasa o, en menor medida, del área clave de unión en las subunidades B, alteran su estructura y disminuyen su afinidad con el fármaco. De este modo, serán necesarias mayores concentraciones de fármaco para conseguir un mismo efecto sobre la bacteria. La resistencia a quinolonas en microorganismos Gram Negativos está básicamente vinculada a determinadas mutaciones en el gen Gyr A, que codifica la subunidad A de la girasa en un área conocida como QRDR (región determinante de resistencia a quinolona). Aunque se han descrito numerosas mutaciones básicas implicadas en la resistencia: serina 83 por triptófano y ácido aspártico 87 por asparagina en *E. coli* o en las posiciones equivalentes en otros microorganismos. En cepas con alto grado de resistencia se ha observado que se tienen mutaciones en otros puntos de Gyr A, adicionales a las mutaciones iniciales en diversas posiciones en la topoisomerasa IV o con frecuencia en ambas localizaciones. Las mutaciones en las subunidades B aparecen con frecuencia relativamente baja en cepas clínicas, originando además incrementos de resistencia moderados (Leyva, S. y Leyva, E., 2008, p. 4).

Una mutación en Gyr B es ácido aspártico 426 por asparagina, confiriendo resistencia tanto a quinolonas ácidas como anfotéricas. Otra mutación es lisina 447 por ácido glutámico, que confiere resistencia a quinolonas ácidas y una ligera hipersensibilidad a quinolonas anfotéricas. Una posible explicación de la sensibilidad hacia la quinolona puede ser que las mutaciones cambian la conformación de QRDR indirectamente a través de la cadena de péptidos o a través de efectos en el ciclo de reacción de la enzima, existiendo también la posibilidad de que estos residuos de Gyr B estén directamente involucrados en la cavidad de unión de la quinolona, incluyendo también la región de QRDR de Gyr A. No obstante, cada vez se da más importancia a la presencia de un mecanismo de flujo activo capaz de expulsar el antimicrobiano de la célula bacteriana, impidiéndose de este modo alcanzar las concentraciones suficientes para dañar irreversiblemente su ADN. Se ha

demostrado como un mecanismo de gran importancia en microorganismos Gram positivos que afecta de forma muy distinta a diversas fluoroquinolonas, en función de su grado de hidrofobicidad o de su estructura molecular. Los principales mecanismos de resistencia en microorganismos son cinco: alteración de la Gyr A, alteración de la Gyr B, alteración de la topoisomerasa IV, dificultad de paso del antibiótico a través de la pared bacteriana y exceso de salida por alteración de los mecanismos de flujo externo. Todos ellos, por mutaciones de los distintos genes que codifican la estructura o función correspondiente, que reciben el nombre de la estructura modificada, o de los selectores con que se han detectado (Leyva, S. y Leyva, E., 2008, p. 4).

La mayoría de las resistencias a ciertos microorganismos, *E. coli*, *Salmonella*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *C. jejuni* y *N. Gonorrhoeae*, se deben a alteraciones de la Gyr A, siendo secundarios los otros mecanismos, aunque pueden coexistir más de uno y ser múltiples. En el caso de *S. aureus* y *S. pneumoniae* son más importantes que las alteraciones en la topoisomerasa IV, mientras que para *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *C. jejuni* también es importante un aumento del flujo externo (Leyva, S. y Leyva, E., 2008, p. 5).

**Esquema 1.** Resistencia a las Fluoroquinolonas



Fuente: (Leyva, S. y Leyva, E., 2008, p. 5).

### 13.1.10. Diseño *in silico* de moléculas

El diseño de nuevas moléculas es un proceso largo y costoso. Se estima que el proceso para el descubrimiento de una nueva molécula líder, desde su identificación hasta los ensayos clínicos puede tomar 14 años con un costo de varios millones de dólares. A través de los años el proceso se ha ido volviendo menos complejo y más sujeto a la estadística. Comenzando con la química combinatoria y llegando al tamizaje molecular de alto rendimiento se ha logrado muchos avances a precios más bajos. Sin embargo, estas técnicas no han sido tan fructíferas como habían prometido produciendo fármacos que fallan principalmente, en un 40-60%, en propiedades farmacocinéticas, absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad (ADME/Tox) (Song, C., Lim, S. y Tong, J., 2009, p. 579).

A partir de esto se empezó el desarrollo de nuevas moléculas utilizando instrumentos capaces de predecir las propiedades ADME/Tox. Uno de ellos es el diseño de fármacos asistido por computadora (Computer Aided Drug Design, o CADD por sus siglas en inglés), el cual es un método que se ha convertido en una rama de la química medicinal actual, y es un término ampliamente utilizado que representa las herramientas computacionales y los recursos para el almacenamiento, manejo, análisis y modelaje de compuestos. Esto incluye el desarrollo de almacenamientos digitales para el estudio de las relaciones de interacciones químicas, programas computacionales para el diseño de compuestos con determinadas características fisicoquímicas, así como herramientas para el manejo sistemático de potenciales candidatos líderes antes de que estos sean sintetizados y ensayados (Song, C., Lim, S. y Tong, J., 2009, p. 580).

#### 13.1.10.1. Modelaje computacional, análisis y optimización

Un potencial blanco terapéutico que sea estructuralmente similar a una proteína cuya función bioquímica sea bien conocida puede ser de utilidad para la identificación de sitios de unión y función molecular. Esto se puede lograr a través de métodos como la comparación de secuencias y comparación proteínica. La comparación de secuencias involucra la investigación de una secuencia de aminoácidos en una base de datos de secuencias proteínicas conocidas con estructuras tridimensionales. Por otro lado, la

comparación proteínica o conformación de cadenas laterales involucra la sustitución de las coordenadas del esqueleto y manejo de la plausibilidad del modelo por medio de un conjunto de potenciales empíricos.

Una vez se ha identificado la estructura de la proteína, se puede construir una modelo tridimensional de la estructura blanco por medio de modelaje comparativo, el cual es la base para el diseño de drogas por estructuras (Song, C., Lim, S. y Tong, J., 2009, p. 581).

#### **13.1.10.2. Selectividad del ligando**

En contraste con el tamizaje de bibliotecas moleculares generadas en base a química combinatoria, el tamizaje molecular virtual, o VS por sus siglas en inglés (Virtual Screening), utiliza bases de datos virtuales de las que hace pruebas de varias maneras para determinar la actividad y efectividad de un fármaco sobre un receptor biológico. Muchas de estas bases de datos, lejos de ser costosas, pueden ser adquiridas gratis. También se cuenta con bases de datos de los receptores biológicos. Fuera de la información, la manera de proceder para seleccionar al candidato líder puede ser de dos formas diferentes: la técnica basada en el receptor y la técnica basada en el ligando (Song, C., Lim, S. y Tong, J., 2009, p. 581).

La técnica basada en el receptor involucra un docking de los ligandos en el receptor para evaluar la actividad y efectividad. Para ello se busca primero la geometría y la región del sitio activo. Posteriormente se busca colocar el ligando en el sitio activo. Finalmente se evalúa qué tan bien se adhiere el ligando al receptor comparado con otros ligandos. Cada uno de estos pasos requiere modelos, algoritmos y técnicas especiales a modo de afinar el cálculo y realizar predicciones cercanas a la realidad (Srinivas, A., Priyadarshini, S., Praveen, P., Pradeep, H., y Narahari, G., 2007, p. 345).

La técnica basada en el ligando encuentra su centro en el Principio de Similaridad de Propiedades. Es decir, que las moléculas similares deben de tener propiedades y características similares. Sin embargo, esta es una técnica que se usa únicamente en casos especiales. Para estas evaluaciones se utilizan redes neurales artificiales, árboles de

decisiones, particionamiento recursivo y máquinas de soporte vectorial. Sin embargo, a pesar de que en la práctica puede parecer una técnica muy buena, esta no se puede generalizar porque depende mucho de datos experimentales (Srinivas, A., Priyadarshini, S., Praveen, P., Pradeep, H., y Narahari, G., 2007, p. 347).

Finalmente, es muy importante que todo estudio computacional de una nueva molécula tenga una fase en la que se estudie su farmacocinética (i.e. sus propiedades de ADME/Tox). En esta fase se busca que cada compuesto cumpla con las 5 reglas de Lipinski u otras reglas más refinadas. La mayoría de las propiedades descritas en las reglas de Lipinski se pueden determinar de manera sencilla por medios computacionales, sin embargo, existen otras como el coeficiente de partición logP para el cual se han desarrollado varios algoritmos (Srinivas, A., Priyadarshini, S., Praveen, P., Pradeep, H., y Narahari, G., 2007, p. 347).

#### **13.1.11. Diseño *de Novo***

El diseño *de novo* es el método que se ha implementado para el desarrollo de nuevas moléculas con las propiedades farmacológicas deseadas. Es importante tener en cuenta tres factores para utilizar el diseño *de novo*: el ensamble del candidato, el muestreo efectivo del espacio químico y la evaluación de su potencial calidad. Para ello se deben tomar en cuenta también las restricciones primarias que se utilizan para el ensamble del candidato y el muestreo del espacio químico, y las restricciones secundarias que se utilizan para evaluar la calidad. Las restricciones primarias se refieren a toda la información relacionada a la interacción entre el ligando y el receptor y las restricciones secundarias se refieren a toda la información relacionada con la ADME/Tox de la molécula diseñada. Por último, se subdivide la búsqueda en dos maneras: basado en el receptor y basado en el ligando. Esta última no se utiliza más que en casos especiales (Schneider, G. y Fechner, U., 2005, p. 652).

Cuando se utiliza una estrategia de ensamble basada en el receptor, se busca en general lugares a los que se pueda enlazar un ligando a un sitio particular del receptor. Algunos programas buscan sitios aceptores o donadores de puentes de hidrogeno, sitios lipofílicos, sitios de interacción con enlaces covalentes o enlaces a iones metálicos. Esto se hace

analizando primero los sitios de interacción del receptor de varias maneras (Schneider, G. y Fechner, U., 2005, p. 652).

Luego de obtener el lugar de enlace se muestrea el espacio químico para empezar con el ensamble de las nuevas moléculas utilizando ya sea átomos o fragmentos para la construcción. La utilización de átomos es superior debido a la variedad estructural obtenida, pero la utilización de fragmentos garantiza no solo un espacio de búsqueda menor, sino una mayor facilidad de síntesis. El método para ensamble puede ser: por crecimiento, por vinculación, por redes, por mutaciones aleatorias de estructura, por dinámica molecular, etc. (Schneider, G. y Fechner, U., 2005, p. 653).

- **Crecimiento:** Se coloca un fragmento de molécula dentro del receptor y se le comienza a añadir partes, a modo de ramas, para así crecer y enlazarse a los demás sitios de enlace del receptor.
- **Vinculación:** Se colocan fragmentos en todos los sitios de interés y luego se intentan construir estructuras, a manera de puentes, entre estos.
- **Redes:** se colocan fragmentos en los sitios de interés y se busca una molécula con la forma de la red que vincula a esos fragmentos dentro del receptor.
- **Mutaciones aleatorias:** Este método se trata de un algoritmo genético en el que se agregan algunos fragmentos a una molécula base y se evalúa su afinidad. Luego, se extrae lo mejor de estos y se crea otra molécula. Este proceso se repite hasta cierto número de pasos o hasta adquirir la afinidad deseada.
- **Dinámica molecular:** En este caso se realizan ciclos en los que se colocan fragmentos aleatoriamente dentro del receptor y se simula el movimiento libre de estos. Posteriormente se aprueban o rechazan y finalmente se van vinculando.

Por último, se evalúa su potencial calidad. Para ello, el programa aproxima la energía de enlace de cada molécula generada con el receptor. Existen tres métodos de evaluar la energía: campos de fuerza, funciones de evaluación empíricas y funciones basadas en conocimiento previo.

- **Campos de fuerza:** Se evalúa la energía del enlace por medio de la física clásica.



- **Funciones de evaluación empíricas:** Se evalúa cada interacción receptor-ligando ponderando cada una con una función de peso y añadiendo términos de penalización.
- **Funciones basadas en conocimiento previo:** Se evalúa las interacciones de las estructuras acomplejadas ligando-receptor por medio de un análisis estadístico. Si la interacción es frecuente se prefiere, de lo contrario no. Como el método se basa en información estructural y no en las interacciones ya conocidas, el análisis estadístico ha probado ser mejor que el empírico (Schneider, G. y Fechner, U., 2005, p. 654).

Cuando no se cuenta con una estructura confiable del receptor, se prefiere utilizar la estrategia basada en el ligando. Para esto se utilizan modelos de ligandos que ya existen para ese receptor y se construye un modelo de ligando farmacóforo. El farmacóforo es el ensamble de contribuciones electrónicas y estéricas necesarias para asegurar las interacciones supramoleculares óptimas con la estructura de un receptor biológico específico para desencadenar su respuesta biológica. A partir de este modelo ya es posible obtener un pseudo-receptor (Schneider, G. y Fechner, U., 2005, p. 655).

Las estrategias más utilizadas para estos ligandos son: aleatoria, a lo ancho, a lo profundo, Monte Carlo con criterio Metrópolis y algoritmo evolutivo. Con la estrategia aleatoria se puede considerar que se cubren todas las posibilidades de estructura posibles si la búsqueda se hace en un periodo muy grande. Si se utiliza la búsqueda a lo ancho, se conserva cada uno de los nodos generados y se analiza los derivados de cada uno, pero es muy costoso a nivel de cómputo. En el caso de la estrategia de búsqueda a profundidad, el programa se enfoca solo en uno de los nodos y parte de allí para seguir generando estructuras nuevas de ligando hasta hallar una estructura satisfactoria. Por otro lado, el método de Monte Carlo es esencialmente aleatorio, sin embargo, el criterio Metrópolis implica que cada nodo es evaluado según un criterio (restricciones primarias) y es aceptado o rechazado dependiendo de si satisface o no ese criterio. Por último, el algoritmo evolutivo aprovecha los principios de reproducción, mutación y recombinación para el desarrollo de nuevos ligandos. Éste toma a dos estructuras, escogidas por la función de evaluación, y las elige como padres. Luego las combina de manera aleatoria para generar una población de descendientes. De esta se vuelven a escoger dos padres y estos

vuelven a combinar. Las mutaciones y recombinaciones son solo fragmentos o estructuras favorables que se introducen directamente dentro del proceso evolutivo. (Schneider, G. y Fechner, U., 2005, p. 655).

### 13.1.12. Docking

En el docking es la parte en la que se determina la interacción de energía entre dos moléculas: un ligando y un receptor. Para dicha determinación es necesario encontrar la orientación del ligando que se une al sitio activo específico de una proteína, con la cual se forma un complejo con una energía mínima. Durante esta unión se calcula la energía de interacción y se analiza con una función de evaluación conocida como “función de evaluación” (o “scoring function”). Esta función calcula la energía de interacción entre el ligando y el receptor para obtener un valor numérico y poder así hallar la conformación más estable del ligando (Srinivas, A., Priyadarshini, S., Praveen, P., Pradeep, H., y Narahari, G., 2007, p. 348).

El docking se divide en dos partes: métodos de búsqueda y función de evaluación. Los métodos de búsqueda es una sección de algoritmos que se utilizan y que son los encargados de determinar todas las conformaciones óptimas posibles para un complejo determinado, es decir la posición y la orientación de ambas moléculas. Se pueden dividir en:

- **Búsqueda del espacio conformacional durante el docking:** Se lleva a cabo la optimización de pequeñas conformaciones y se busca la orientación en el sitio activo del receptor. Se utilizan diferentes algoritmos como el método Monte Carlo y el algoritmo genético. El método de Monte Carlo (MC) utiliza una técnica de muestreo en la cual se busca formar conformaciones con la menor energía y se utiliza la probabilidad de Boltzmann para que cada conformación creada al azar por este método sea aceptada o rechazada. El algoritmo genético (AG) se basa en las ideas de la evolución por selección natural y genética. Simula los procesos en el sistema natural para la evolución que fueron establecidos por Darwin o por Lamarck. Representan una ruta inteligente de una búsqueda aleatoria en un espacio definido para resolver el problema conformacional.

- **Búsqueda del espacio conformacional antes del docking:** Separan la búsqueda conformacional de la pequeña molécula de su sitio de unión en el receptor. Posteriormente, se realiza un análisis conformacional y todas las conformaciones que se obtienen con baja energía son colocadas fijas en el sitio de unión, en donde se consideran únicamente 6 grados de libertad de rotación y traslación restantes. Los programas Slide y Fred utilizan esta metodología.
- **Búsqueda progresiva:** Se rompen los ligandos y se crean fragmentos que son acoplados fijamente a varias posiciones favorables en el sitio de unión empezando con un fragmento base. Generalmente se seleccionan las secciones más grandes para unir las al receptor, se mantiene un set con posibles orientaciones para estos fragmentos y se le agregan otros fragmentos en diferentes orientaciones y son ponderados. Este proceso se repite hasta que se ensamble todo el ligando.

Por otro lado, la función de evaluación es el modelo matemático que se utiliza para predecir la fuerza de las interacciones intramoleculares, e intermoleculares (en este caso, las dos que han sido acopladas). A esto se le conoce como afinidad de unión o energía de acomplejamiento. Se pueden clasificar como:

- Basadas en campos de fuerza
- Empíricas
- Basadas en conocimiento
- Evaluación por consenso

(Kitchen, D., Decornez, H., Furr, J., y Bajorath, J., 2004, p. 397)

### 13.1.13. Pasos para el Docking

- i. **Construcción del receptor:** Se modifica el receptor quitando las moléculas que interfieran con la estructura principal, se estabilizan cargas, se completan los residuos faltantes, etc. Tiene que ser biológicamente activo.
- ii. **Identificación del sitio activo:** identificar el sitio activo de interés ya que muchas veces pueden existir varios sitios activos.

- iii. **Preparación del ligando:** Se pueden obtener de varias bases de datos. Para escoger el ligando a utilizar es importante aplicar las Reglas de Lipinski, ya que son importantes para el desarrollo de nuevos fármacos, especialmente para moléculas de administración oral, sin vehículo.
- iv. **Docking:** El ligando es acoplado al receptor, las funciones de evaluación ponderan cada conformación y después de obtener varias, se ordenan las conformaciones dependiendo de su energía buscando al final la más baja de todas.

(Kitchen, D., Decornez, H., Furr, J., y Bajorath, J., 2004, p. 397)

#### 13.1.14. QSAR y ADME/Tox

La Relación Estructura-Actividad Cuantitativa (Quantative Structure-Activity Relationship, o QSAR por sus siglas en inglés) es un método que busca construir modelos matemáticos o computacionales para establecer una relación, por medio de método estadísticos, entre la estructura de un compuesto químico y su actividad. En el caso del diseño de fármacos, la estructura se refiere a las propiedades o descriptores de las moléculas, sus sustituyentes o sus campos de interacción energética. La función puede relacionar propiedades como afinidad de enlace, actividad, toxicidad, constantes cinéticas, etc. Los métodos estadísticos utilizados pueden ser desde regresiones lineales simples, hasta métodos de mínimos cuadrados parcial, máquinas de soporte vectorial o redes neurales artificiales (Verma, J., Khedkar, V., & Coutinho, E., 2010, p. 101).

Esta técnica busca la correlación cuantitativa y la recopilación de las relaciones entre las tendencias de las alteraciones químicas estructurales, y los respectivos cambios en términos biológicos para comprender qué propiedades químicas determinan la actividad biológica. Así mismo, se pretende optimizar las moléculas líderes existentes para mejorar su actividad biológica y predecir la actividad biológica de moléculas que no han sido probadas o ni siquiera han sido producidas. Esta técnica ha evolucionado con el tiempo, esta evolución se puede observar por medio de las dimensiones con las que se trabajan estos modelos (Verma, J., Khedkar, V., & Coutinho, E., 2010, p. 102).

- 1D-QSAR: Relaciona la actividad con propiedades como  $pK_a$ ,  $\log P$ , etc.

- 2D-QSAR: Relaciona la actividad con patrones de conectividad (estructuras básicas) y farmacóforos 2D.
- 3D-QSAR: Relaciona la actividad con campos de interacción no-covalente alrededor de la molécula.
- 4D-QSAR: Incluye todas las conformaciones posibles de una estructura en 3D-QSAR.
- 5D-QSAR: Representa explícitamente diferentes modelos inducidos en 4D-QSAR.
- 6D-QSAR: Incorpora modelos de solvatación en 5D-QSAR.

Al realizar un análisis QSAR, es importante recordar que el resultado numérico puede ser uno o varios, dependiendo del método utilizado. Generalmente se obtiene un coeficiente de correlación que indica qué tan similar es la estructura probada con las anteriores. Este da una vaga idea de la estructura líder que se puede derivar de la base de datos con la que se construyó el modelo (Verma, J., Khedkar, V., & Coutinho, E., 2010, p. 103).

Al tratarse de propiedades farmacocinéticas, existen una serie de descriptores que hacen el análisis QSAR más fácil. Estos son las reglas de Lipinski. Después de estudiar muchos de los medicamentos producidos por Merck y Pfizer, se notó que había una tendencia en algunas propiedades de estos: peso molecular, lipofilidad, átomos donadores de puentes de hidrógeno y átomos aceptores de puentes de hidrógeno (Lipinski, C., Lombardo, F., Dominy, B., & Feeney, P., 2001, p. 15). Un bajo peso molecular está relacionado a una fácil absorción, difusión y transporte a comparación de aquellas moléculas de pesos moleculares más altos, ya que a medida que éste aumenta, también aumenta tamaño de la molécula. Asimismo, un logaritmo de partición octanol/agua dentro de los rangos aceptables indica la eficiencia lipofílica que mide la potencia de una droga, ya que la hidrofobicidad de una molécula juega un papel importante en la distribución de la misma en el organismo tras la absorción (Mishra, Sharma, Singh, Pandiya, & Kumar, 2016).

Con el aumento del uso de métodos computacionales para la predicción de éstas propiedades han aparecido varios modelos para el modelado de estas. Y si bien las técnicas para la determinación de estas propiedades no son óptimas, proveen una gran ventaja en el desarrollo de medicamentos nuevos. Al poder modelar las propiedades de ADME/Tox de

un compuesto, se resuelve uno de los grandes problemas que tiene el tamizado computacional. Este tiende a generar compuestos más lipofílicos, lo cual, en medicamentos de administración oral, no es conveniente (Lipinski, C., Lombardo, F., Dominy, B., & Feeney, P., 2001, p. 15). Existen varios programas gratis en línea que permiten simular o predecir las propiedades de ADME/Tox, y dentro de los modelos disponibles para predicciones están:

- Transporte a través de la barrera hematoencefálica (BHE o BBB por sus siglas en inglés).
- Ensayo de permeabilidad del adenocarcinoma de colon humano (permeabilidad Caco-2) y absorción intestinal humana.
- Inhibidor/Sustrato de la P-glicoproteína
- Localización subcelular
- Inhibición/Sustrato del CYP450
- Toxicidad AMES
- Toxicidad Oral Aguda
- Carcinogenicidad y su clasificación

La barrera hematoencefálica es una barrera de transporte estructural y bioquímica que impide el paso de ciertas sustancias al intersticio cerebral con criterio selectivo. Cuando la BHE no es la diana terapéutica de un fármaco se prefiere que éste no tenga la capacidad de atravesarla, ya que en estos la permeabilidad de la HBE está asociada a efectos adversos sobre el sistema nervioso central (SNC) (Loch-Neckel & Koepp, 2010).

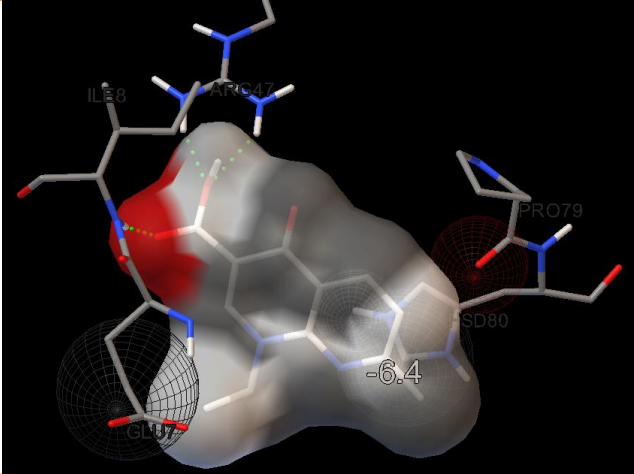
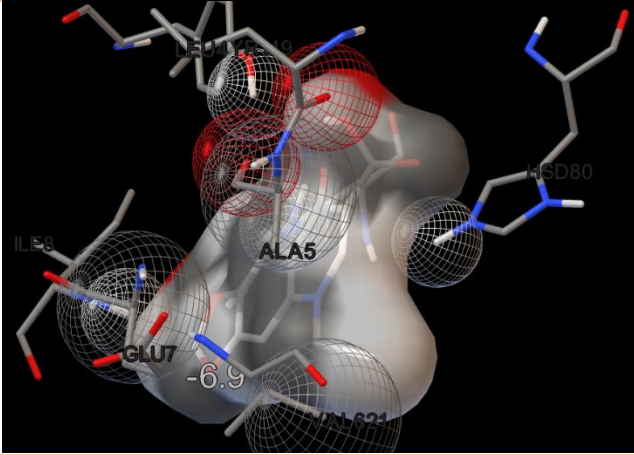
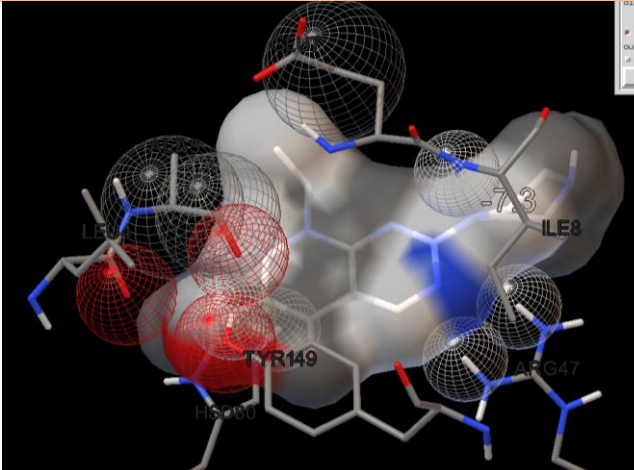
El ensayo de permeabilidad de Caco-2 mide la propiedad de movimiento a través de la barrera epitelial intestinal que determina la velocidad y extensión de la absorción que ultimadamente afecta la biodisponibilidad de un fármaco. Éste modelo se ha vuelto como el "estándar de oro" para la permeabilidad de un fármaco. Es ampliamente utilizado en el diseño de nuevos fármacos para la predicción de la permeabilidad intestinal en humanos y está recomendado por la FDA para la determinación de permeabilidad (The, et al., 2011). Si un compuesto tiene un valor de permeabilidad de Caco-2 (Papp) mayor o igual a  $8 \times 10^{-6}$  cm/s se clasifica como altamente permeable del Caco-2, de lo contrario se clasifica con un fármaco de permeabilidad moderada o pobre.

La P-glicoproteína (glicoproteína de permeabilidad, abreviada como P-gp o Pgp), también conocida como multidrug resistance protein 1 (MDR1), es una proteína ampliamente distribuida y se expresa en las células del epitelio intestinal. Se expresa en animales, hongos y bacterias y en general, su función limita la exposición del organismo a una droga, excretándola hacia la bilis en el hígado, los túbulos renales o hacia la luz intestinal en el intestino. Esta proteína es un miembro de la subfamilia MDR, involucrados en la resistencia a múltiples fármacos. Es responsable de la disminución de la acumulación del fármaco en células resistentes a múltiples fármacos, y a menudo interviene en el desarrollo de resistencia a los fármacos contra el cáncer. Un fármaco puede ser sustrato o inhibidor de ésta proteína, prefiriéndose que sea inhibidor ya que, si un fármaco es clasificado como sustrato, es posible que la bacteria tenga o desarrolle resistencia. Sin embargo, la resistencia está principalmente vinculada a los fármacos contra el cáncer (Ferreirós, 2012).

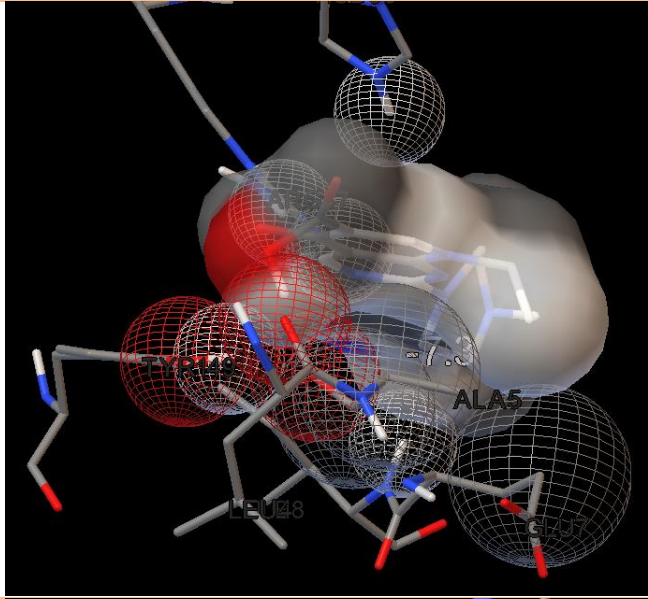
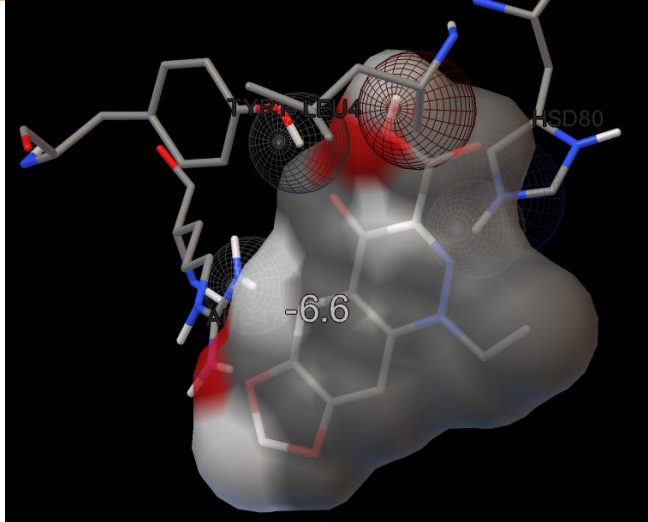
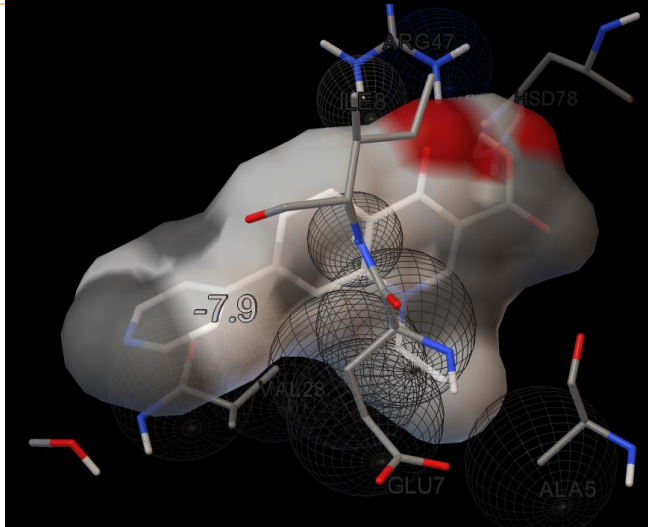
El Test de Ames es un ensayo biológico para evaluar el potencial mutagénico de compuestos químicos. Puesto que el cáncer está vinculado a menudo con el daño del ADN, la evaluación mutagénica, como parte de la evaluación de la genotoxicidad, es uno de los requisitos fundamentales en la caracterización toxicológica de un producto químico. Los nuevos modelos computacionales de éste parámetro utilizan bases de datos de miles de compuestos ya conocidos junto con su actividad biológica y por medio de logaritmos de comparación y predicción de éste parámetro (Hansen, et al., 2009).

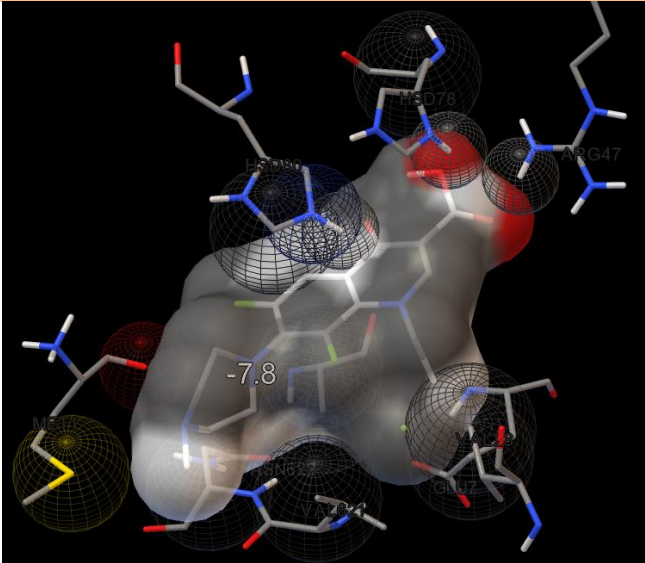
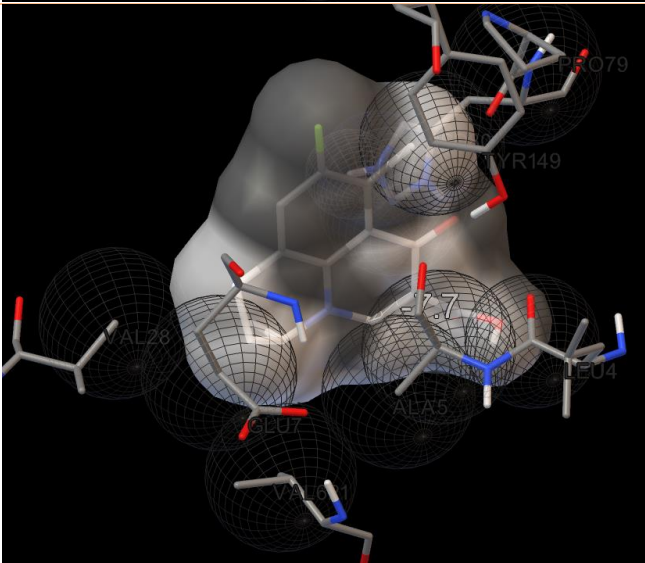
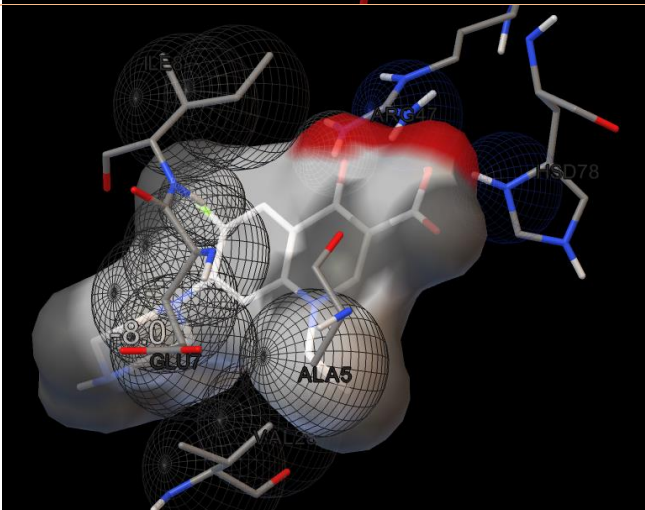
Finalmente, la localización subcelular de predicción es únicamente un indicio de la ubicación exacta de un fármaco dentro de la célula en su distribución por todo el organismo y hasta el momento no es un parámetro indicativo en la predicción de la actividad o toxicidad de un fármaco. En el caso del modelo de predicción de inhibición o sustrato del CYP450, se espera que el comportamiento sea similar al de la mayoría de fármacos donde la combinación con otros fármacos o sustancias puede disminuir o aumentar el metabolismo. Por último, la predicción de la toxicidad oral aguda y carcinogenicidad nos indica qué tan probable es que la sustancia pueda ocasionar una intoxicación o cáncer, respectivamente, por inhalación, ingestión o penetración cutánea, así como la clasificación en base a la dosis teórica.

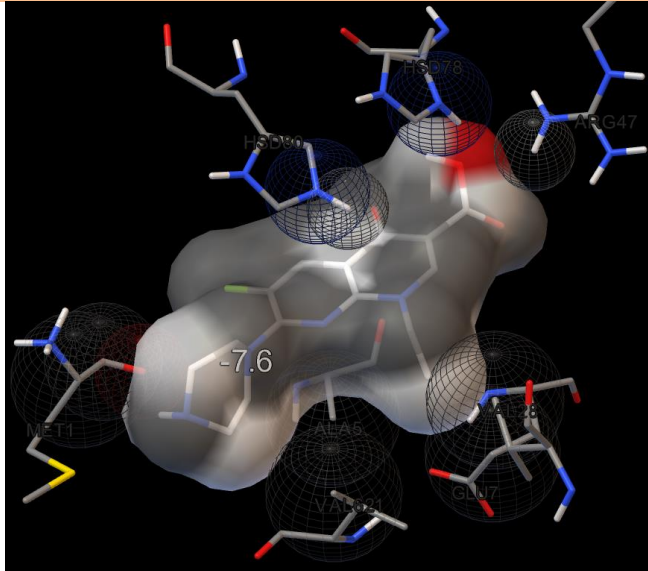
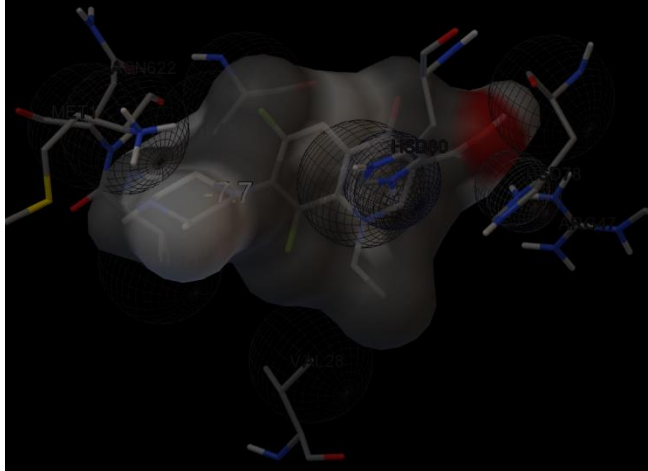
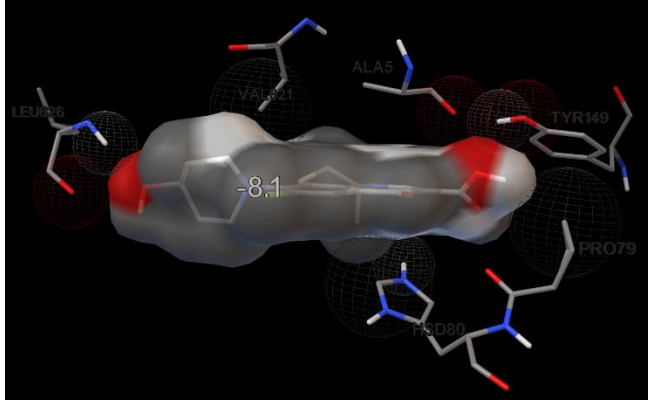
## 13.2. Acoplamiento molecular de las quinolonas de referencia utilizadas

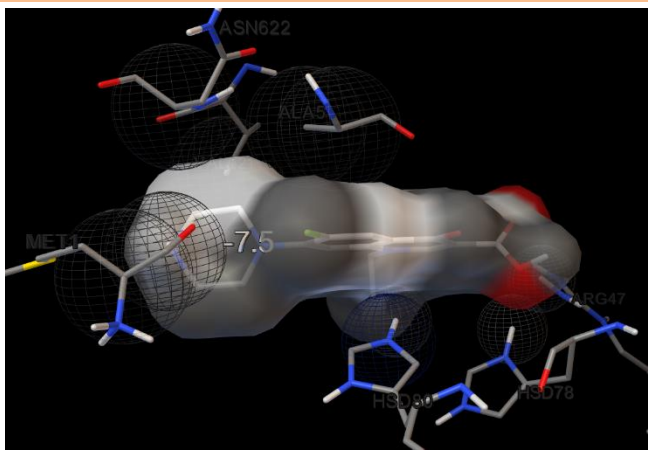
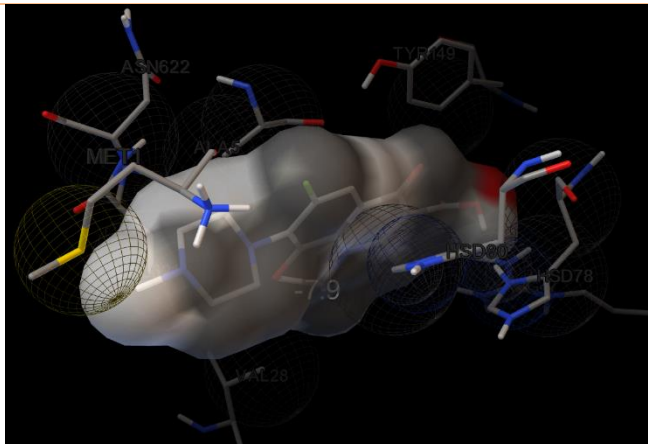
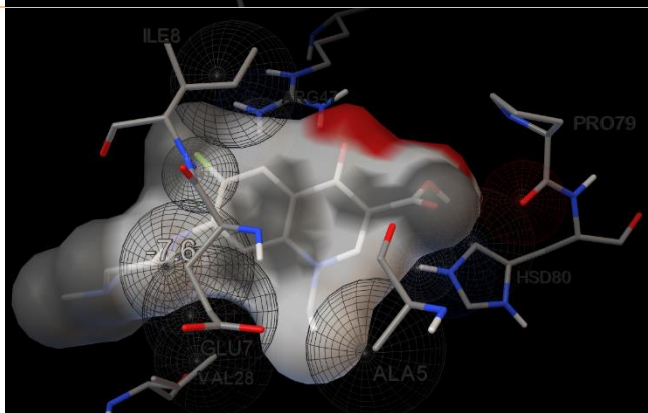
	Quinolona	Acoplamiento molecular (docking)	Aminoácidos con los que interactúa
Primera generación	Ácido nalidíxico		GLU7 - ILE8 - ARG47 - PRO79 - HSD80
	Ácido oxolínico		LEU4 - ALA5 - GLU7 - ILE8 - ARG47 - HSD80 TYR149 - VAL621
	Ácido pipemídico		LEU4 - ALA5 - GLU7 - ILE8 - ARG47 - HSD80 TYR149

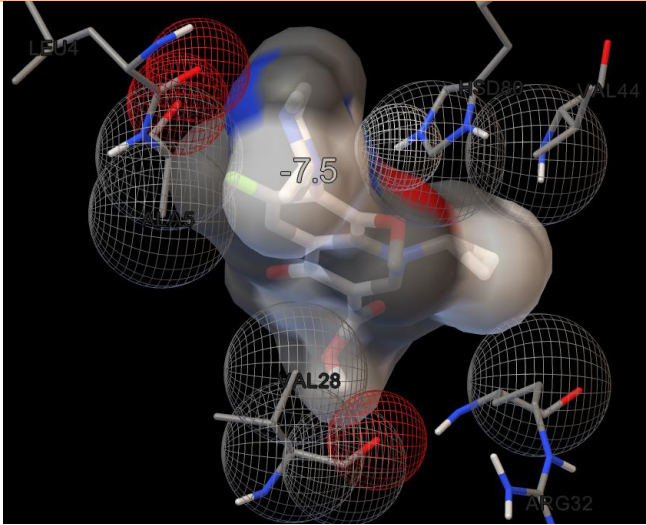
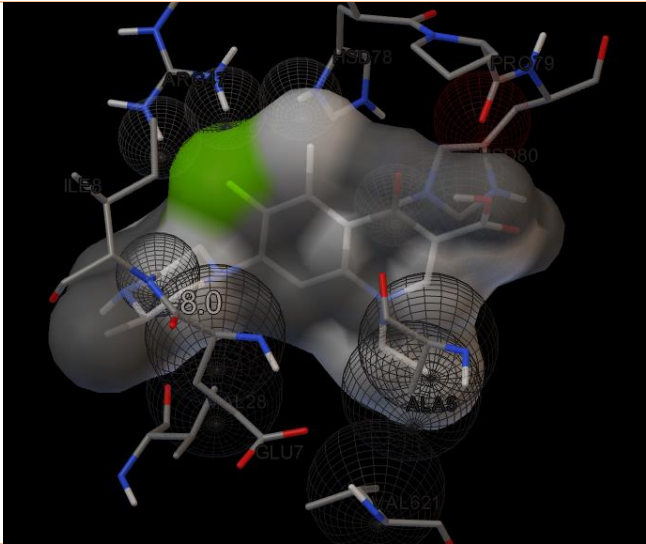
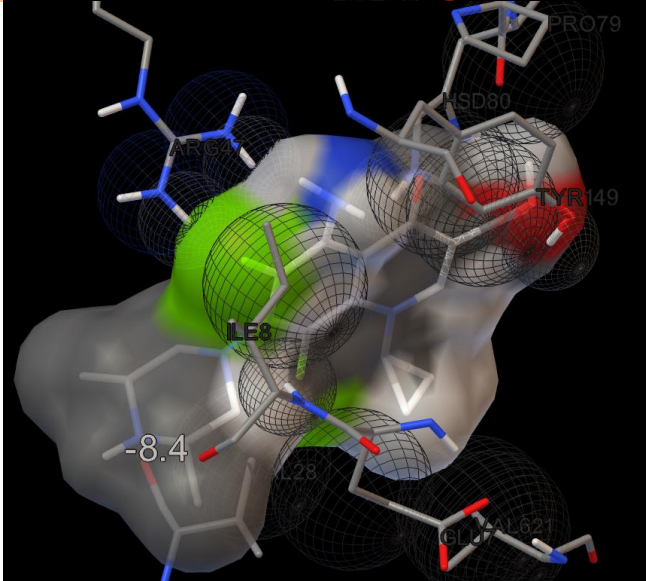


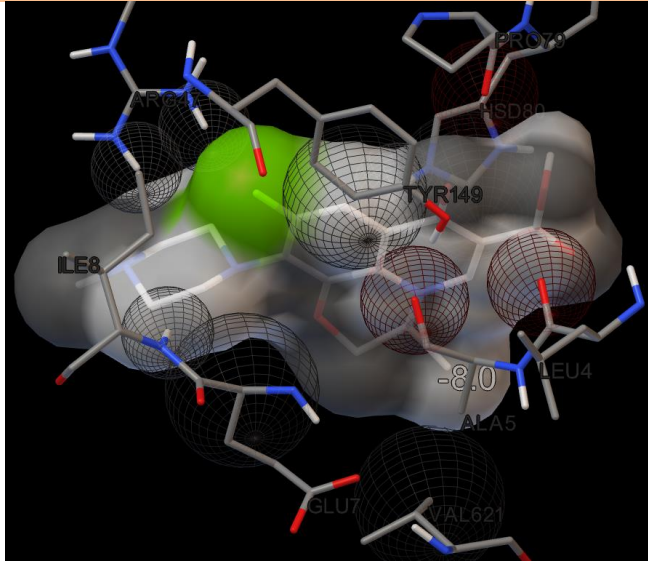
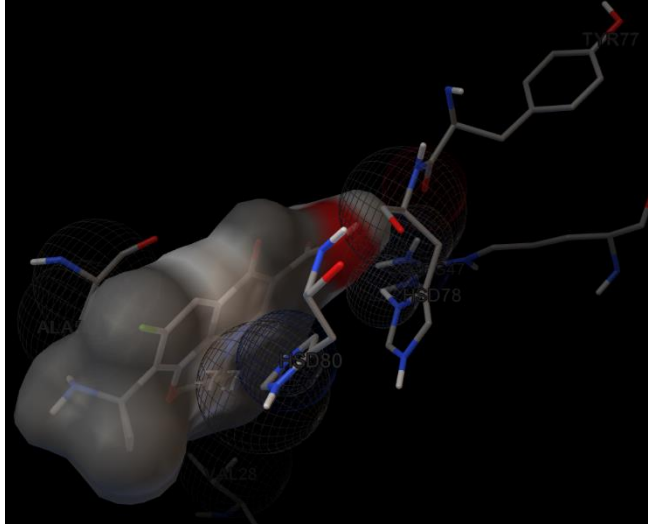
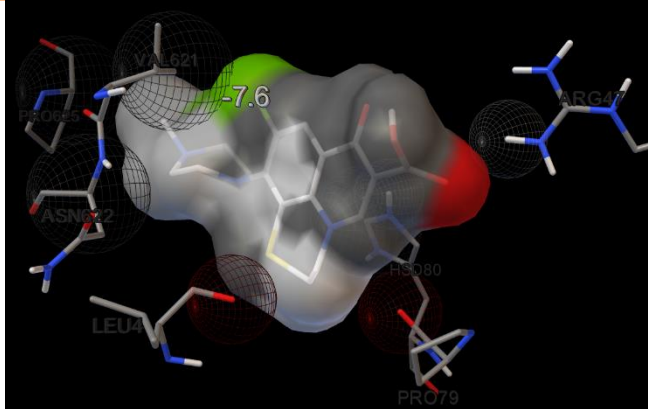
<p>Ácido piromídico</p>		<p>ALA5 - ILE8 - ARG47 - HSD80 - TYR149 - VAL621</p>
<p>Cinoxacino</p>		<p>LEU4 - ARG47 - HSD80 - TYR149</p>
<p>Rosoxacina</p>		<p>ALA5 - GLU7 - ILE8 - VAL28 - ARG47 - HSD78</p>

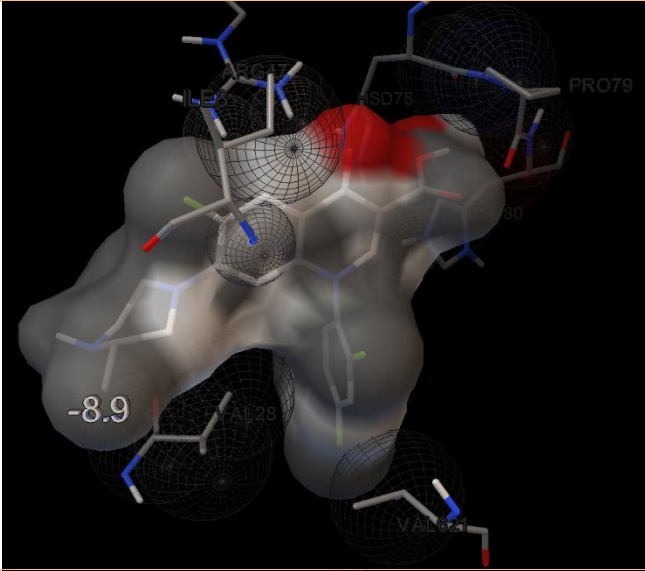
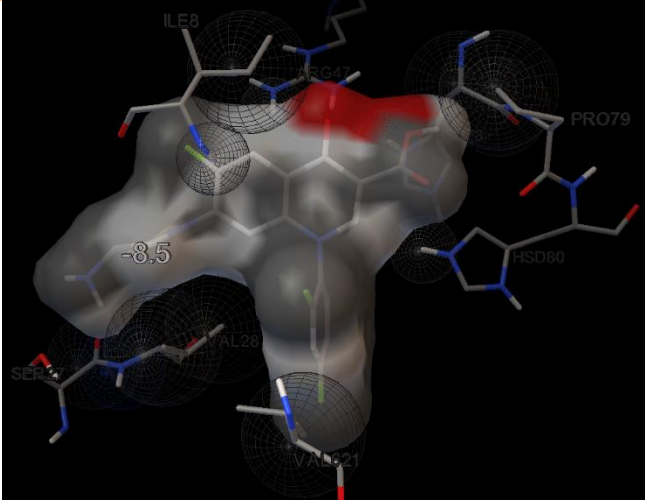
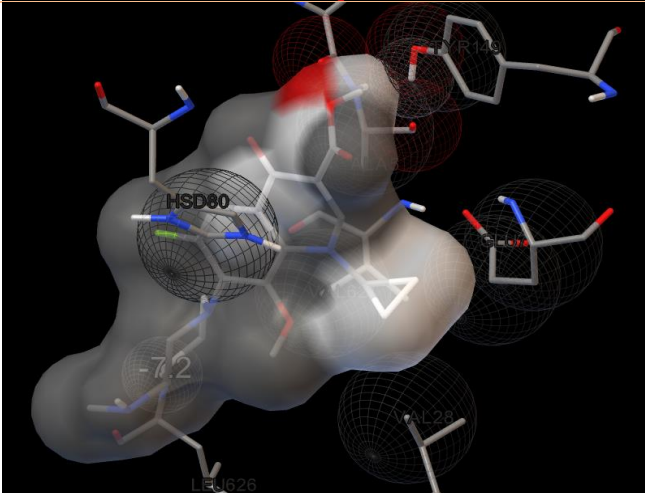
Segunda Generación	Fleroxacina		<p>MET 1 - ALA5 -          GLU7 - VAL28 -          ARG47 - HSD78 -          HSD80 - VAL621 -          ASN622</p>
	Flumequina		<p>LEU4 - ALA5 -          GLU7 - VAL28 -          PRO79 - HSD80 -          TYR149 - VAL621</p>
	Ciprofloxacina		<p>ALA5 - GLU7 -          ILE8 - VAL28 -          ARG47 - HSD78</p>

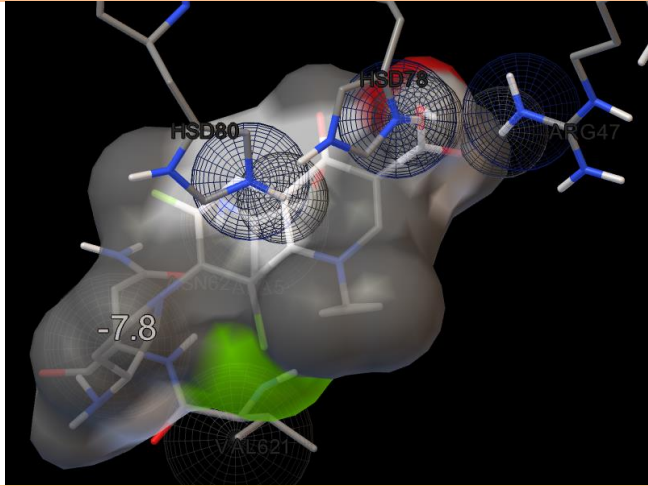
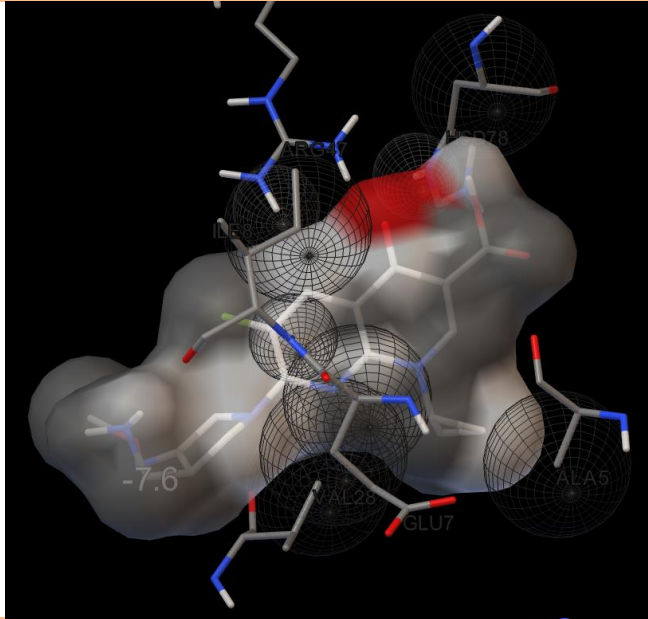
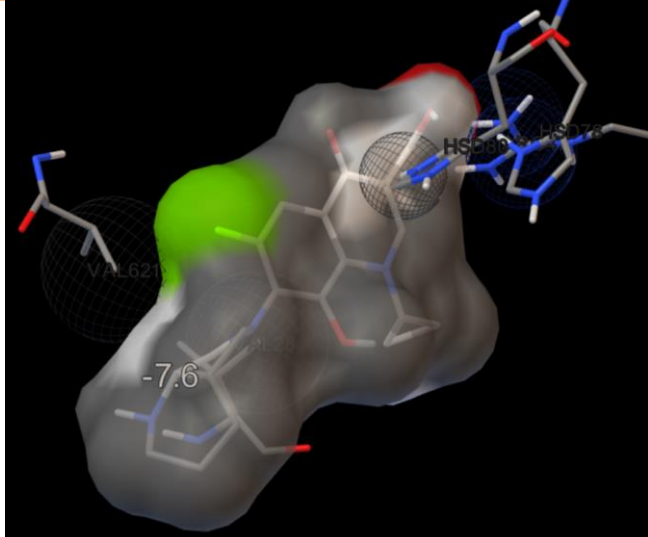
Enoxacina		MET1 - ALA5 - GLU7 - VAL28 - ARG47 - HSD78 - VAL621
Lomefloxacin		MET1 - ALA5 - VAL28 - ARG47 - HSD78 - HSD80 - ASN622
Nadifloxacin		MET1 - ALA5 - ARG47 - HSD78 - HSD80 - VAL621 - ASN622

Norfloxacin		<p>MET1 - ALA5 -          ARG47 - HSD78 -          HSD80 - VAL621 -          ASN622</p>
Ofloxacin		<p>MET1 - ALA5 -          VAL28 - ARG47 -          HSD78 - HSD80          TYR149 - VAL621          - ASN622</p>
Pefloxacin		<p>ALA5 - GLU7 -          ILE8 - VAL28 -          ARG47 - PRO79 -          HSD80</p>

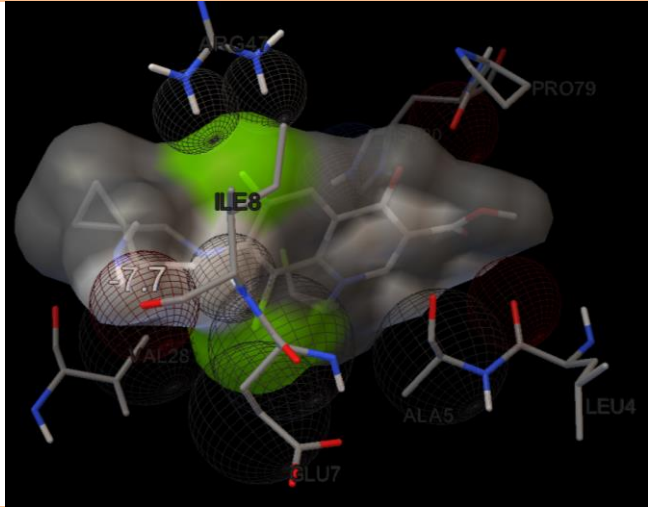
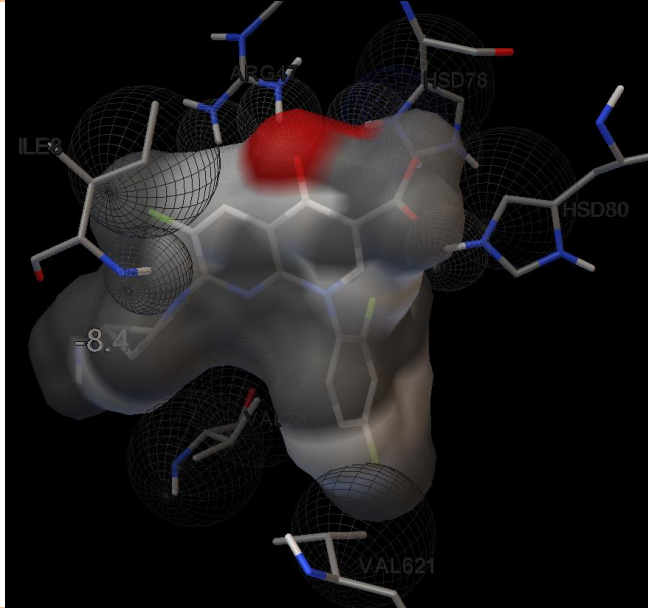
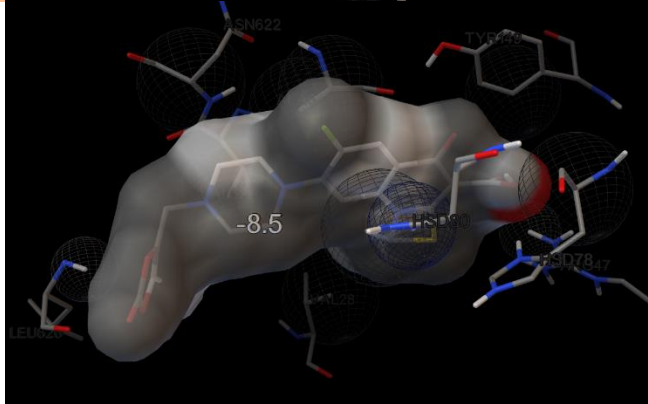
Tercera Generación	Gatifloxacin		<p>LEU4 - ALA5 - VAL28 - ARG32 - VAL44 - HSD80</p>
	Grepafloxacin		<p>ALA5 - GLU7 - ILE8 - VAL28 - HSD78 - PRO79 - HSD80 - VAL621</p>
	Esparfloxacin		<p>GLU7 - ILE8 - VAL28 - ARG47 - PRO79 - HSD80 - TYR149 - VAL621</p>

Levofloxacin		<p>LEU4 - ALA5 -            GLU7 - ILE8 -            ARG47 - PRO79 -            HSD80 -            TYR149 - VAL621</p>
Pazufloxacin		<p>ALA5 - VAL28 -            ARG47 - TYR77 -            HSD78 - HSD80</p>
Rufloxacin		<p>LEU4 - ARG47 -            PRO79 - HSD80 -            VAL621 - ASN622            - PRO625</p>

	Temafloxacin		<p>ILE8 - VAL28 -            ARG47 - HSD78 -            PRO79 - HSD80 -            VAL621</p>
	Tosufloxacin		<p>ILE8 - SER27 -            VAL28 - ARG47 -            HSD78 - PRO79 -            HSD80 - VAL621</p>
<b>Cuarta Generación</b>	Balofloxacin		<p>LEU4 - ALA5 -            GLU7 - VAL28 -            HSD80 - TYR149 -            LEU626</p>

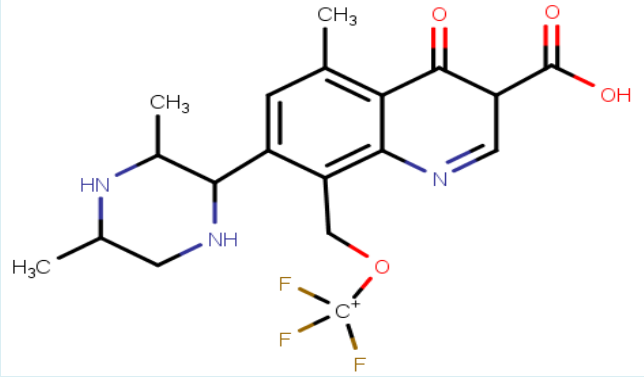
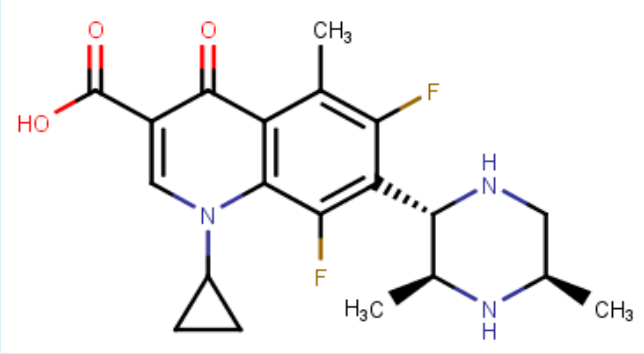
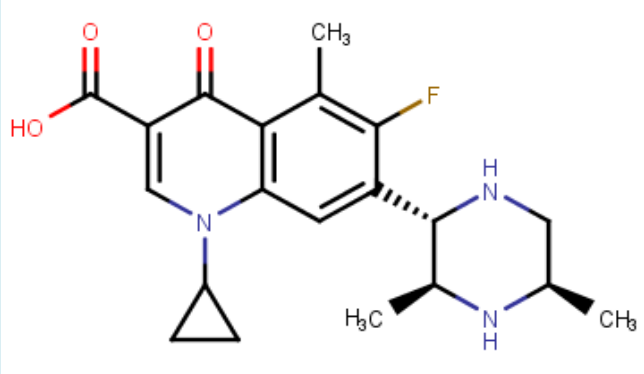
Cinafloxacin		ALA5 - ARG47 - HSD78 - HSD80 - VAL621 - ASN622
Gemifloxacin		ALA5 - GLU7 - ILE8 - VAL28 - ARG47 - HSD78
Moxifloxacin		VAL28 - ARG47 - HSD78 - HSD80 - VAL621

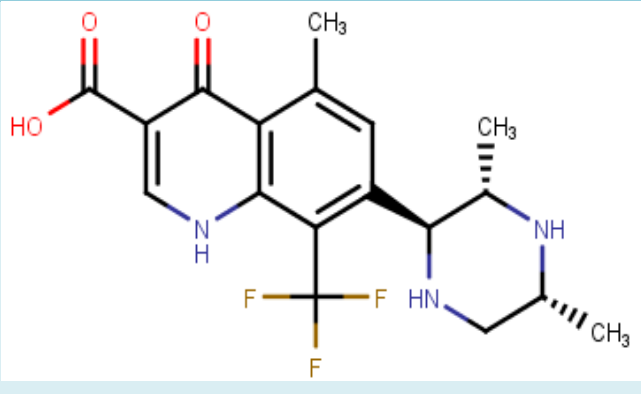
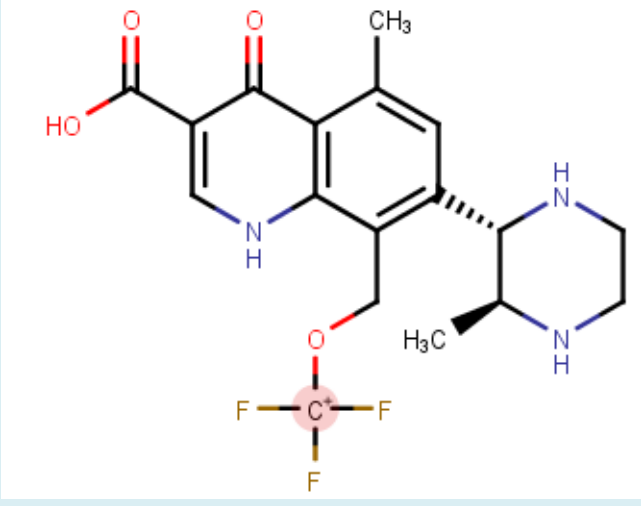
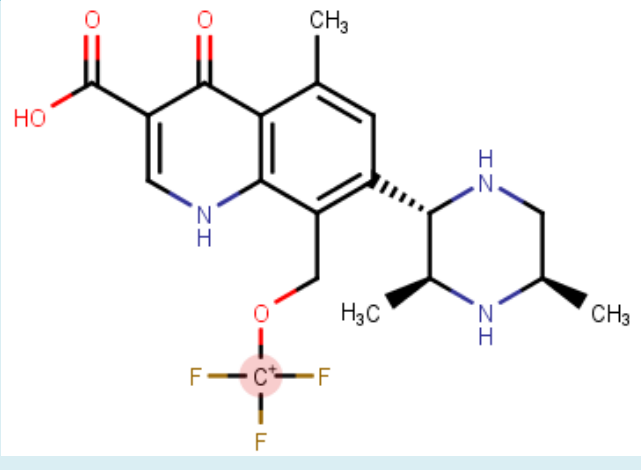


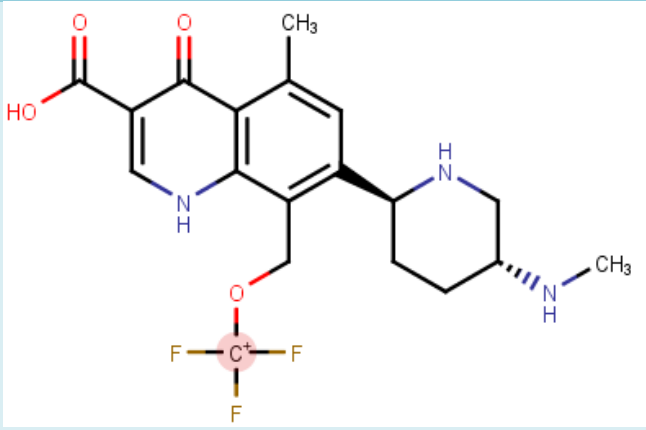
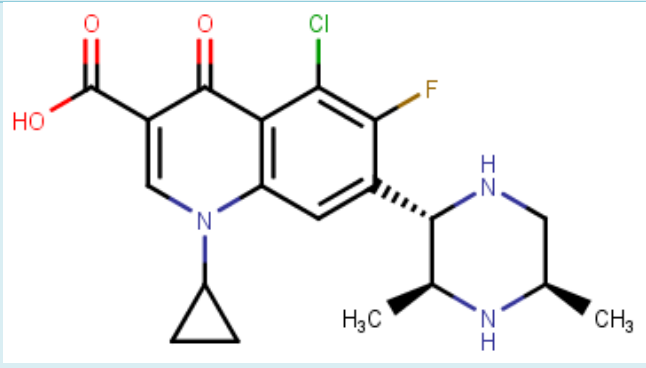
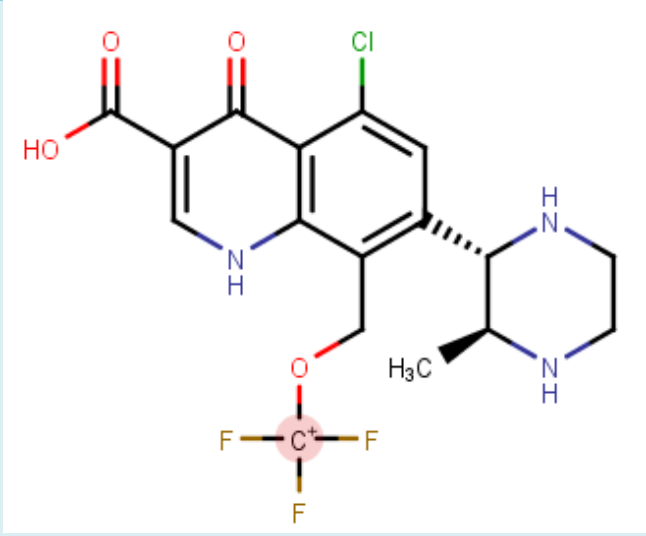
Sitafloracina		<p>LEU4 - ALA5 -          GLU7 - ILE8 -          VAL28 - ARG47 -          PRO79 - HSD80</p>
Trovafloracina		<p>ILE8 - VAL28 -          ARG47 - HSD78 -          HSD80 - VAL621</p>
Plurifloracina		<p>ALA5 - VAL28 -          ARG47 - HSD78 -          TYR149 - VAL621          - ASN622 -          LEU626</p>

Fuente: Datos Experimentales

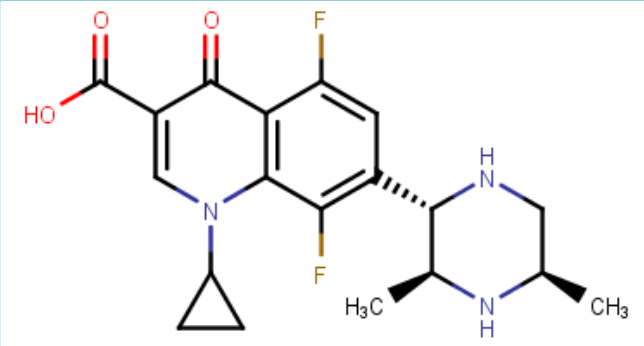
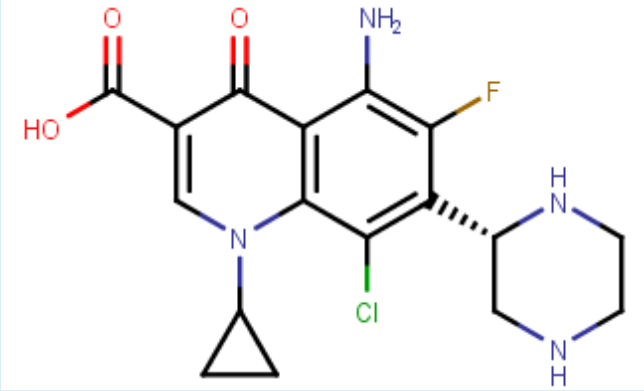
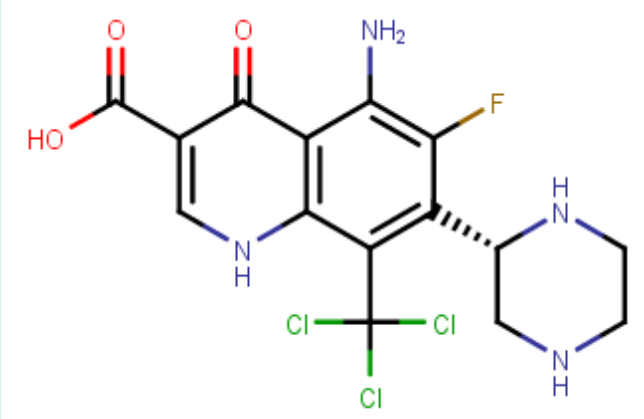
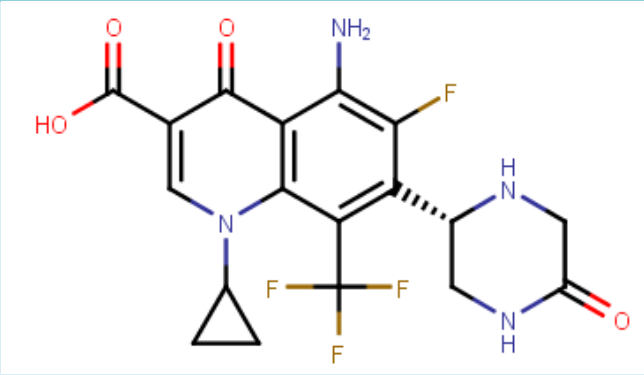
13.3. Estructura química de los mejores 20 candidatos del diseño *de novo*

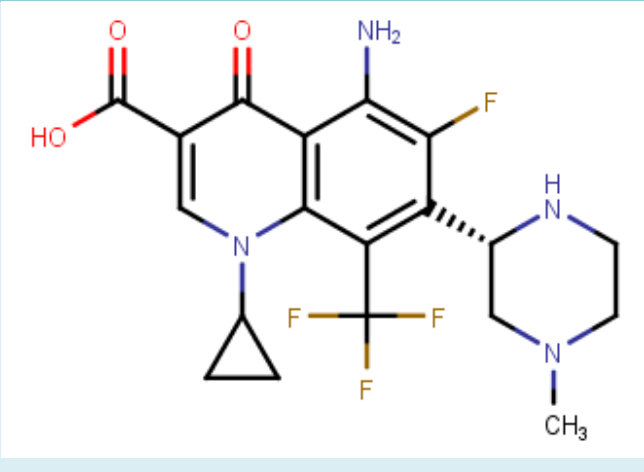
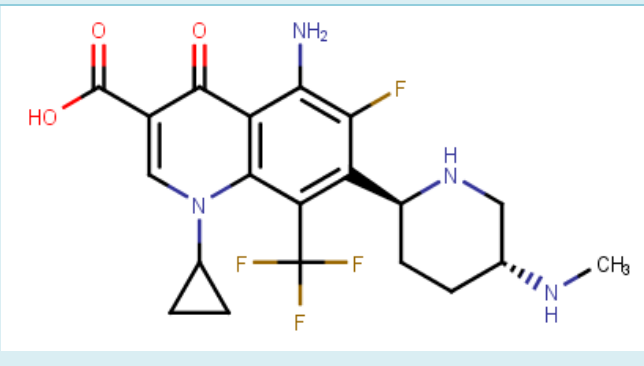
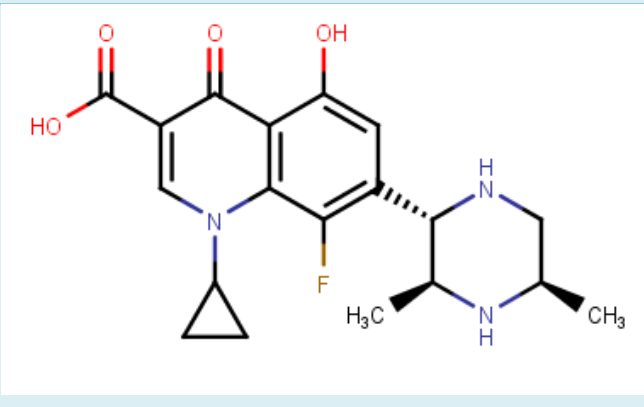
No.	CANDIDATO RESULTANTE	ENERGIA DE ENLACE EN Kcal/mol
1		-8.7
2		-8.5
3		-8.5

4	 <chem>CC1=CC(=C(C=C1)C(F)(F)F)C(=O)N=C1C(=O)C(=O)O=C1C2N(C)CCN(C)C2</chem>	-8.5
5	 <chem>CC1=CC(=C(C=C1)C(F)(F)F)C(=O)N=C1C(=O)C(=O)O=C1C2N(C)CCN(C)C2OC3</chem>	-8.5
6	 <chem>CC1=CC(=C(C=C1)C(F)(F)F)C(=O)N=C1C(=O)C(=O)O=C1C2N(C)CCN(C)C2OC3</chem>	-8.5

7		-8.5
8		-8.5
9		-8.5

10		-8.5
11		-8.5
12		-8.5
13		-8.5

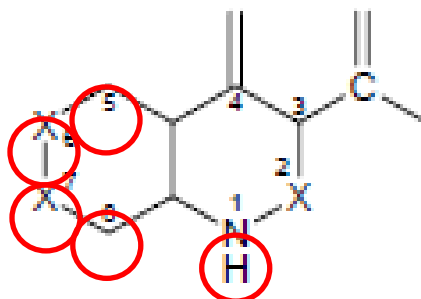
14	 <chem>CC1CN(C1)C2=CC=C(C=C2C3=CC=C(C=C3)F)C(=O)N(C4CC4)C(=O)O</chem>	-8.5
15	 <chem>NC1=CC=C(C=C1C2=CC=C(C=C2)Cl)C(=O)N(C3CC3)C(=O)O</chem>	-8.5
16	 <chem>ClC1(Cl)C(Cl)C1=CC=C(C=C1C2=CC=C(C=C2)Cl)C(=O)N(C3CC3)C(=O)O</chem>	-8.5
17	 <chem>O=C1NCCN1C2=CC=C(C=C2C3=CC=C(C=C3)F)C(=O)N(C4CC4)C(=O)O</chem>	-8.5

18		-8.5
19		-8.5
20		-8.5

Fuente: Datos Experimentales.

### 13.4. Sustituyentes asignados a las posiciones seleccionadas de la estructura base de quinolona para el diseño *de novo*

Figura 14. Posiciones seleccionadas para sustitución



Fuente: Gutiérrez, N., 2004, p. 233

Tabla 3. Grupos funcionales/sustituyentes asignados a cada posición

Posiciones	Grupos funcionales en código SMILES	
Posición 1	C3CC3	
Posición 5	C, N, H, F, Cl, O, OC	
Posición 6	F, H	
Posición 7	C4NCCNC4	C4NCC(=O)NC4
	C4NCCN(C)C4	C4NCC(C)NC4C
	C4NCCNC4C	C4NCCOC4CN
	C4NCC(NC)CC4	
Posición 8	N, F, Cl, C,	COC
	CF	COCF
	C(F)F	COC(F)F
	C(F)(F)F	COC(F)(F)F
	CCl	COCCl
	C(Cl)Cl	COC(Cl)Cl
	C(Cl)(Cl)Cl	COC(Cl)(Cl)Cl

Fuente: Datos experimentales



### 13.4.1. Script utilizado para el diseño *de novo*

El siguiente script fue escrito en la línea de comando del sistema operativo LINUX:

```
with open("quinolona_base","r") as b:
```

```
    base = b.readlines()
```

```
base = base[0][:-1]
```

```
pos = []
```

```
with open("grupos1","r") as a1:
```

```
    pos.append(a1.readlines())
```

```
with open("grupos5","r") as a5:
```

```
    pos.append(a5.readlines())
```

```
with open("grupos6","r") as a6:
```

```
    pos.append(a6.readlines())
```

```
with open("grupos7","r") as a7:
```

```
    pos.append(a7.readlines())
```

```
with open("grupos8","r") as a8:
```

```
    pos.append(a8.readlines())
```

```
pos2 = []
```

```
for p in pos:
```

```
    pos2.append( ["(" + g[:-1] + ")" for g in p] )
```

```
    pos2[-1].append("")
```

```
with open("nuevas","w") as n:
    for i in pos2[0]:
        for j in pos2[1]:
            for k in pos2[2]:
                for l in pos2[3]:
                    for m in pos2[4]:
                        temp = base.format(i,"",j,k,l,m) + "\n"
                        n.write(temp)
```





































































































### 13.6. Parámetros de la dinámica molecular para el ADN girasa de *P. aeruginosa*

```

NOMBRE DEL ARCHIVO NAMD: gyr_A_md.namd

# NAMD Config file - autogenerated by NAMDgui plugin

# input
<<<<<<< HEAD:A/MD/gyr_A_md.namd
coordinates      /home/recinos/GitHub/A/MD/gyr_A_wb.pdb
structure        /home/recinos/GitHub/A/MD/gyr_A_wb.psf
=====
coordinates      /home/ubico/GitHub/A/MD/gyr_A_wb.pdb
structure        /home/ubico/GitHub/A/MD/gyr_A_wb.psf
>>>>>>> fc0a6ece9e63da78d66bfc2c7c8cb77f999f951d:A/MD/gyr_A_md.namd
parameters       /opt/vmd-
1.9.2/plugins/noarch/tcl/readcharmmpar1.2/par_all27_prot_lipid_na.inp
paratypecharmm  on
cellOrigin       99.98775482177734 89.0723648071289 99.21537780761719
cellBasisVector1 133.10399627685547 0 0
cellBasisVector2 0 167.30799913406372 0
cellBasisVector3 0 0 147.3789939880371

wrapWater        on

# output
<<<<<<< HEAD:A/MD/gyr_A_md.namd
set output       /home/recinos/GitHub/A/MD/gyr_A_out
=====
set output       /home/ubico/GitHub/A/MD/gyr_A_out
>>>>>>> fc0a6ece9e63da78d66bfc2c7c8cb77f999f951d:A/MD/gyr_A_md.namd
outputname       $output
dcdfile          ${output}.dcd
xstFile          ${output}.xst
dcdfreq         100
xstFreq         100

binaryoutput     no
binaryrestart    no
outputEnergies  1000
restartfreq     1000

fixedAtoms       off

# Basic dynamics
exclude          scaled1-4
1-4scaling       1
COMmotion       no
dielectric       1.0

# Simulation space partitioning
switching        on
switchdist       9
cutoff           10
pairlistdist     12

```



```
# Multiple timestepping
firsttimestep      0
timestep           1
stepspercycle      20
nonbondedFreq      2
fullElectFrequency 4

# Temperature control

set temperature     298
temperature         $temperature; # initial temperature

# Scripting

minimize           10000
reinitvels        $temperature
run                2500000
```