



**UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO**

FACULTAD DE MEDICINA Y NUTRICIÓN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



**“OBTENCIÓN POR SIMILITUD ESTRUCTURAL Y  
CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE INHIBIDORES DE LA  
SHIKIMATO DESHIDROGENASA DE *Staphylococcus  
aureus* RESISTENTE A METICILINA”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

P R E S E N T A :

**DANIEL ISAAC ENRÍQUEZ MENDIOLA**

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. CLAUDIA ISELA AVITIA DOMÍNGUEZ

VICTORIA DE DURANGO, DGO., JUNIO 2019



**UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO**

FACULTAD DE MEDICINA Y NUTRICIÓN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



**“OBTENCIÓN POR SIMILITUD ESTRUCTURAL Y  
CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE INHIBIDORES DE LA  
SHIKIMATO DESHIDROGENASA DE *Staphylococcus  
aureus* RESISTENTE A METICILINA”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

P R E S E N T A :

**DANIEL ISAAC ENRÍQUEZ MENDIOLA**

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. CLAUDIA ISELA AVITIA DOMÍNGUEZ

CODIRECTOR DE TESIS:

DR. ALFREDO TÉLLEZ VALENCIA

ASESORES:

DR. ERICK SIERRA CAMPOS

DRA. MARÍA ALICIA HERNÁNDEZ CAMPOS

VICTORIA DE DURANGO, DGO., JUNIO 2019



UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO  
FACULTAD DE MEDICINA Y NUTRICIÓN  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS



DR. JUAN HUMBERTO DÍAZ GARCÍA  
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
FACULTAD DE MEDICINA Y NUTRICIÓN  
UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO  
P R E S E N T E

At'n Dra. en C. Martha Angélica Quintanar Escorza  
Coordinadora del Maestría en Ciencias de la Salud

Por medio del presente nos dirigimos a usted de la manera más atenta con la finalidad de informarle que hemos revisado y aprobado el documento de tesis titulado: "OBTENCIÓN POR SIMILITUD ESTRUCTURAL Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE INHIBIDORES DE LA SHIKIMATO DESHIDROGENASA DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA", desarrollado por el alumno Daniel Isaac Enríquez Mendiola, como proyecto para obtener el grado de Maestro en Ciencias de la Salud. Por lo cual los abajo firmantes autorizamos que el interesado inicie sus trámites de titulación.

Sin más por el momento, nos despedimos de usted agradeciendo la atención prestada.

ATENTAMENTE

Victoria de Durango, Dgo., a 29 de Abril de 2019

Dra. en C. Claudia Isela Avitia Domínguez

Director de Tesis

Dr. en C. Alfredo Téllez Valencia

Co-Director de Tesis

Dr. en C. Erick Sierra Campos

Asesor

Dra. en C. Alicia Hernández Campos

Tutor



UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO  
FACULTAD DE MEDICINA Y NUTRICIÓN  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS



**DR. JUAN HUMBERTO DÍAZ GARCÍA**  
**JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**  
**FACULTAD DE MEDICINA Y NUTRICIÓN**  
**UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO**

Me es grato comunicarle que después de revisar cuidadosamente y de discutir mis sugerencias y correcciones al documento de tesis titulado **“OBTENCIÓN POR SIMILITUD ESTRUCTURAL Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE INHIBIDORES DE LA SHIKIMATO DESHIDROGENASA DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA”**, para obtener el grado presenta el alumno **Daniel Isaac Enríquez Mendiola**, inscrito en la Maestría en Ciencias de la Salud, considero que la Tesis reúne los requisitos establecidos y por ello emito mi **VOTO APROBATORIO** para que se proceda a la impresión oficial del documento y se realice la réplica oral.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente,

Victoria de Durango, Dgo., a 20 de Mayo del 2019.

---

Dr. en C. Miguel Arturo Reyes Romero



UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO  
FACULTAD DE MEDICINA Y NUTRICIÓN  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS



**DR. JUAN HUMBERTO DÍAZ GARCÍA**  
**JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**  
**FACULTAD DE MEDICINA Y NUTRICIÓN**  
**UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO**

Me es grato comunicarle que después de revisar cuidadosamente y de discutir mis sugerencias y correcciones al documento de tesis titulado **“OBTENCIÓN POR SIMILITUD ESTRUCTURAL Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE INHIBIDORES DE LA SHIKIMATO DESHIDROGENASA DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA”**, para obtener el grado presenta el alumno **Daniel Isaac Enríquez Mendiola**, inscrito en la Maestría en Ciencias de la Salud, considero que la Tesis reúne los requisitos establecidos y por ello emito mi **VOTO APROBATORIO** para que se proceda a la impresión oficial del documento y se realice la réplica oral.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente,

Victoria de Durango, Dgo., a 20 de Mayo del 2019.

---

Dr. en C. Jorge Alberto Burciaga Nava



UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO  
FACULTAD DE MEDICINA Y NUTRICIÓN  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS



**DR. JUAN HUMBERTO DÍAZ GARCÍA**  
**JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**  
**FACULTAD DE MEDICINA Y NUTRICIÓN**  
**UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO**

Me es grato comunicarle que después de revisar cuidadosamente y de discutir mis sugerencias y correcciones al documento de tesis titulado **“OBTENCIÓN POR SIMILITUD ESTRUCTURAL Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE INHIBIDORES DE LA SHIKIMATO DESHIDROGENASA DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA”**, para obtener el grado presenta el alumno **Daniel Isaac Enríquez Mendiola**, inscrito en la Maestría en Ciencias de la Salud, considero que la Tesis reúne los requisitos establecidos y por ello emito mi **VOTO APROBATORIO** para que se proceda a la impresión oficial del documento y se realice la réplica oral.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente,

Victoria de Durango, Dgo., a 20 de Mayo del 2019.

---

Dra. en C. Martha Angélica Quintanar Escorza

# ÍNDICE GENERAL

		Página
	ÍNDICE GENERAL.....	I
	ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
	ÍNDICE DE TABLAS.....	VI
	ABREVIATURAS.....	VII
	RESUMEN.....	X
	ABSTRACT.....	XI
I	INTRODUCCIÓN.....	1
II	ANTECEDENTES.....	3
2.1	Resistencia a antibióticos.....	3
2.2	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	5
2.2.1	Generalidades.....	5
2.2.2	Prevalencia.....	6
2.2.3	Resistencia.....	6
2.2.4	Patogenicidad.....	9
2.2.5	Tratamiento.....	11
2.3	Ruta del shikimato.....	13
2.3.1	Regulación.....	14

2.4	Shikimato deshidrogenasa.....	14
2.4.1	Estructura tridimensional de la SDH.....	14
2.4.2	Conformación de la SDH.....	15
2.4.3	Mecanismo catalítico.....	16
2.5	Inhibidores de la SaSDH.....	17
2.6	Diseño de fármacos.....	18
2.6.1	Diseño de fármacos asistido por computadora.....	20
2.6.2	Acoplamiento molecular.....	20
2.6.3	Simulación de dinámica molecular.....	21
2.7	Propiedades fisicoquímicas y toxicológicas.....	21
2.8	Determinación de la sensibilidad a antimicrobianos.....	22
III	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	24
IV	JUSTIFICACIÓN.....	25
V	OBJETIVOS.....	26
5.1	Objetivo general.....	26
5.2	Objetivos específicos.....	26
VI	METODOLOGÍA.....	27
6.1	Selección de inhibidores.....	27
6.2	Purificación de la SaSDH.....	27
6.3	Actividad de la SaSDH.....	28
6.4	Ensayos de inhibición.....	28
6.5	Determinación de la IC <sub>50</sub> .....	28
6.6	Caracterización del mecanismo de inhibición.....	29

6.7	Acoplamiento molecular.....	30
6.8	Simulaciones de dinámica molecular.....	30
6.9	Análisis de componentes principales.....	31
6.10	Propiedades fisicoquímicas y toxicológicas.....	32
6.11	Ensayos de actividad biológica.....	32
6.12	Reactivos y sustancias.....	33
VII	RESULTADOS.....	34
7.1	Selección de inhibidores.....	34
7.2	Purificación de la SaSDH.....	34
7.3	Inhibición de la SaSDH.....	34
7.4	Determinación de la IC <sub>50</sub> .....	35
7.5	Caracterización del mecanismo de inhibición.....	37
7.6	Acoplamiento molecular.....	43
7.7	Simulaciones de dinámica molecular.....	46
7.8	Análisis de componentes principales.....	48
7.9	Propiedades fisicoquímicas y toxicológicas.....	51
7.10	Ensayos de actividad biológica.....	53
VIII	DISCUSIÓN.....	54
IX	CONCLUSIÓN.....	58
X	PERSPECTIVAS.....	59
XI	REFERENCIAS.....	60

## INDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1</b> Cómo ocurre y cómo se difunde la resistencia a antibióticos.....	4
<b>Figura 2</b> Línea del tiempo donde se muestra en que año comenzó a usarse y en qué año apareció la resistencia a cada antibiótico.....	5
<b>Figura 3</b> Ruta del Shikimato.....	13
<b>Figura 4</b> Shikimato deshidrogenasa.....	15
<b>Figura 5</b> Mecanismo catalítico de la SDH.....	17
<b>Figura 6</b> Fases de desarrollo de un nuevo fármaco.....	18
<b>Figura 7</b> Inhibidores de la SaSDH.....	34
<b>Figura 8</b> Curvas para la determinación de la IC <sub>50</sub> .....	36
<b>Figura 9</b> Mecanismo de inhibición del compuesto 31 para shikimato.....	39
<b>Figura 10</b> Mecanismo de inhibición del compuesto 31 para NADP+...	40
<b>Figura 11</b> Mecanismo de inhibición del compuesto 37 para shikimato.....	41
<b>Figura 12</b> Mecanismo de inhibición del compuesto 37 para NADP+...	42
<b>Figura 13</b> Interacciones SaSDH-31.....	44
<b>Figura 14</b> Interacciones SaSDH-37.....	44
<b>Figura 15</b> Desviación media cuadrática (RMSD) de los complejos enzima-inhibidor.....	46
<b>Figura 16</b> Interacciones de los complejos SaSDH-inhibidor.....	47
<b>Figura 17</b> Análisis de clúster del desplazamiento de los inhibidores a lo largo de la simulación de dinámica molecular.....	47

<b>Figura 18</b>	Fluctuaciones medias cuadráticas de los átomos de los C $\alpha$ con respecto a su posición en el tiempo.....	48
<b>Figura 19</b>	Comparación de los movimientos esenciales de los dos primeros eigenvectores obtenidos a partir de una proyección en 2D de la apo-SaSDH y los complejos SaSDH-inhibidor y ensamble conformacional del análisis de componentes principales.....	50
<b>Figura 20</b>	Comparación de similitud estructural.....	55

## ÍNDICE DE TABLAS

		Página
<b>Tabla I</b>	Mecanismos de resistencia identificados en <i>S. aureus</i> .....	8
<b>Tabla II</b>	Factores de patogenicidad de <i>S. aureus</i> .....	10
<b>Tabla III</b>	Fármacos utilizados en el tratamiento de infecciones por SARM.....	12
<b>Tabla IV</b>	Porcentajes de inhibición de la SaSDH de los cinco compuestos más potentes seleccionados por similitud estructural.....	35
<b>Tabla V</b>	Constantes cinéticas y mecanismos de inhibición.....	43
<b>Tabla VI</b>	Propiedades fisicoquímicas y toxicológicas.....	52

## ABREVIATURAS

31	Clave Chembridge: 58232223, Nombre: Ácido 5-[4-(1H-imidazol-2-ilcarbonil)fenil]tiofen-2-carboxilico
37	Clave Chembridge: 4030563, Nombre: 6-hidroxi-7-metil-1-benzofuran-3(2H)-ona
238	Clave Maybridge: CC14601, Nombre: Ácido 2,2'-bitiofen-5-carboxilico
766	Clave Maybridge: RH01364, Nombre: 7-hidroxi-2,2,8-trimetil-2,3-dihidro-4H-crom-4-ona
894	Clave Maybridge: SEW02738, Nombre: 6-hidroxi-2H-benzofuran-3-ona
APH	Aceptor de puente de hidrógeno
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
AVAD	Años de vida ajustados por discapacidad
BSA	Albumina de suero bovino
DO	Densidad optica
DPH	Donador de puente de hidrógeno
E4P	Eritrosa 4-fosfato
Gln	Glutamina
HCl	Ácido clorhídrico
hERG	gen human ether-a-go-go related
IC <sub>50</sub>	Concentración de compuesto inhibe el 50% de la actividad enzimática
IN	Infecciones nosocomiales
Ile	Isoleucina
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido

Kcal	Kilocalorías
kDa	Kilodalton
Ki	Constante de inhibición
Kn	Kanamicina
LB	Luria Bertani
Lys	Lisina
MtSDH	Shikimato deshidrogenasa de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
ml	Mililitros
mM	Milimolar
μl	Microlitros
μM	Micromolar
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamida adenin dinucleótido fosfato
NADPH	Nicotinamida adenin dinucleótido fosfato reducido
nm	Nanómetros
PDB	Banco de Datos de Proteínas
PEP	Fosfoenol Piruvato
PMSF	Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo
PpSDH	Shikimato deshidrogenasa de <i>Pseudomonas putida</i>
P/V	Peso / Volumen
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
SARM-AC	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina adquirido en la comunidad
SARM-AH	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina adquirido en el hospital
SDH	Shikimato deshidrogenasa

SaSDH	Shikimato deshidrogenasa de <i>Staphylococcus aureus</i>
SeSDH	Shikimato deshidrogenasa de <i>Staphylococcus epidermidis</i>
Ser	Serina
Thr	Treonina
Tris	2-amino-2-hidroximetil.propano-1,3-diol
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
UV	Ultravioleta
Val	Valina

## RESUMEN

Las infecciones por *Staphylococcus aureus* son un problema de salud pública a nivel mundial debido a su resistencia a diversos antibióticos, lo que crea la urgente necesidad de desarrollar nuevos fármacos con diferentes blancos de acción. En este sentido, una estrategia es buscar inhibidores de enzimas importantes en el metabolismo de este patógeno. Bajo este enfoque, la ruta del shikimato es una vía metabólica importante para la supervivencia de *S. aureus*. Las enzimas involucradas en esta ruta se consideran excelentes blancos para el desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos. Una de estas enzimas es la shikimato deshidrogenasa que cataliza la cuarta reacción de la vía, la cual consiste en la reducción reversible dependiente de NADPH de 3-dehidroshikimato a shikimato. En el presente trabajo, se planteó una estrategia de búsqueda de nuevos inhibidores basados en la similitud estructural de inhibidores de la SaSDH reportados por nuestro grupo de investigación, a partir de la cual se lograron identificar y evaluar *in vitro* 50 compuestos, de los cuales el compuesto **31** (ácido 5-[4-(1H-imidazol-2-ilcarbonil)fenil]thiofen-2-carboxílico) y el compuesto **37** (6-hidroxi-7-metil-1-benzofuran-3(2H)-ona) inhibieron la actividad de la SaSDH en un 98%. La caracterización del mecanismo de inhibición indicó que se trata de inhibidores de tipo incompetivo y mixto. Estudios de acoplamiento y dinámica molecular entre los complejos enzima-inhibidor mostraron interacciones con los residuos His12, Ser13, Leu14, Lys64 y Asp100, importantes para la catálisis de la enzima. Adicionalmente, estos compuestos cumplen con las propiedades fisicoquímicas y toxicológicas para continuar con su estudio. Finalmente, los compuestos identificados en el presente estudio pueden servir como líderes en el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos contra SARM.

**Palabras clave:** shikimato deshidrogenasa; cinética enzimática; SARM.

## ABSTRACT

Infections caused by *Staphylococcus aureus* are a worldwide public health problem due to its resistance to many antibiotics, creating the urgent necessity to develop new drugs with different action mechanisms. In this sense, an approach is to look for inhibitors of important enzymes in the pathogens metabolism. According to this, the shikimate pathway is an important metabolic pathway for *S. aureus* to survive. The enzymes involve in the pathway are considered as great targets for the developing of new antimicrobial drugs. One of this enzymes is the shikimate dehydrogenase that catalyzes the fourth step in the pathway, which is the reversal reduction from 3-dehydroshikimate to shikimate, depending on NADPH as cofactor. In the present work, a structural similarity search strategy was proposed, based on the structures of inhibitors previously reported by our investigation group, 50 compounds were identified and evaluated *in vitro*, from which two compounds **31** (5-[4-(1H-imidazol-2-ylcarbonyl)phenyl]thiophene-2-carboxylic acid) and **37** (6-hydroxy-7-methyl-1-benzofuran-3(2H)-one) inhibited the SaSDH activity in 98%. The characterization of their inhibition mechanism indicated mixed and uncompetitive inhibitors. Molecular docking and molecular dynamic simulations studies between the enzyme-inhibitor complexes showed interactions with residues His12, Ser13, Leu14, Lys64 and Asp100, important for the enzymatic catalysis. Additionally, the compounds comply with the physicochemical and toxicological properties to continue with their study. Finally, the compounds identified in the present work can be considered as leads in the development of new chemotherapeutic agents for MRSA.

**Key words:** shikimate dehydrogenase; enzyme kinetics; MRSA.

## I. INTRODUCCIÓN

La resistencia bacteriana se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial debido a la pérdida de eficacia de los tratamientos, el incremento en su costo y aumento en los tiempos de hospitalización. Todo esto genera un alto impacto en los sistemas de salud y en la sociedad, creando la urgente necesidad de desarrollar nuevos fármacos para el tratamiento de infecciones por bacterias multiresistentes y particularmente nuevos fármacos con diferentes mecanismos de acción (1). Una bacteria de importancia clínica a nivel mundial es *Staphylococcus aureus*, un coco grampositivo comúnmente encontrado como parte de la microbiota humana (2), su impacto radica en las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM), las cuales han desarrollado diferentes mecanismos para evadir la acción de fármacos, tales como  $\beta$ -lactámicos, carbapenémicos y cefalosporinas entre otros (3, 4). Las cepas SARM son responsables de causar diferentes tipos de infecciones, desde infecciones en piel y mucosas como el impétigo bulloso, la celulitis absecificada, entre otras, hasta infecciones graves como, infecciones de la médula ósea, infecciones del torrente sanguíneo o síndrome de shock tóxico (5, 6). Desde su aparición, las cepas de SARM se han extendido a todo el mundo y se han incrementado en más de un 300% convirtiéndose en uno de los patógenos más importantes para los humanos (7). Aunado a lo anterior en la actualidad, la mayoría de los fármacos utilizados para el tratamiento de estas infecciones están perdiendo su eficacia debido a la aparición de nuevas cepas resistentes. Por lo antes mencionado se crea la necesidad de desarrollar nuevos antibióticos con diferentes mecanismos de acción. En este contexto, una estrategia en el diseño de nuevos fármacos es buscar inhibidores de enzimas importantes en el metabolismo del patógeno. En este sentido, una ruta metabólica vital para plantas, hongos, bacterias y algunos parásitos apicomplexos, es la ruta del shikimato que ha sido considerada como un blanco atractivo para desarrollo de nuevos fármacos (8-10).

La ruta del shikimato une el metabolismo de los carbohidratos, por medio de la condensación del fosfoenolpiruvato (PEP) de la ruta de la glucólisis y la D-eritrosa-4-fosfato (E4P) de la ruta de las pentosas fosfato, para formar corismasto, precursor de compuestos aromáticos como vitamina K, folatos, ubiquinona y aminoácidos aromáticos (8). Las enzimas involucradas en esta ruta son consideradas como excelentes blancos para el desarrollo de nuevos antibióticos (11-13). Una de estas enzimas es la shikimato deshidrogenasa (SDH), que cataliza el cuarto paso de la ruta, que es la reducción reversible de 3-dehidroshikimato a shikimato dependiendo de NADPH como cofactor. La familia de las SDH presenta diferencias estructurales entre los diferentes organismos, en bacterias se encuentra como monómero o dímero (11, 14), mientras que en plantas se puede encontrar como un complejo bifuncional conocido como complejo DHQ-SDH el cual cataliza el tercer y cuarto paso en la ruta (15), y en hongos la SDH toma parte del componente pentafuncional AroM (16).

Prácticamente en todas las bacterias donde ha sido estudiada, la SDH presenta una forma monómerica (11, 13, 14, 17-19), mientras que en *Thermus thermophilus* (20) y en *Methanocaldococcus jannasschi* (21) se ha encontrado en forma de dímero. Estructuralmente la enzima está compuesta por dos dominios  $\alpha/\beta$  unidos por dos  $\alpha$  hélices, el dominio N-terminal soporta el sitio de unión a sustrato y el dominio C-terminal que se caracteriza por un plegamiento tipo Rossman donde se localiza el sitio de unión a NADPH (22-24).

A la fecha, se han reportado diferentes tipos de inhibidores para SDH de diferentes bacterias e incluyen compuestos sintéticos y naturales (11, 13, 18, 25). En este sentido, en nuestro grupo de investigación se reportaron tres inhibidores (**238**, **766** y **894**) de la SDH de SARM (SaSDH) (18); cabe señalar que a partir de estos compuestos en el presente trabajo se llevó a cabo un análisis de similitud estructural que permitió encontrar dos nuevos inhibidores de la SaSDH:

## **II. ANTECEDENTES**

### **2.1 Resistencia a Antibióticos**

La resistencia a antibióticos es el resultado de cambios sufridos por los microorganismos para reducir o eliminar los efectos de los fármacos, se considera como una de las mayores amenazas para la salud mundial, la seguridad alimentaria y el desarrollo (26). Cualquier persona, independientemente de su edad, posición económica o país puede verse afectada por la resistencia a antibióticos. Es sabido que este es un fenómeno natural, sin embargo, el uso indebido de fármacos en seres humanos y animales ha acelerado este proceso y cada vez es mayor el número de infecciones causadas por microorganismos resistentes, lo que conduce a un tratamiento más difícil por la pérdida de eficacia de los antibióticos (1).

La resistencia a antibióticos se ha incrementado debido a diferentes factores, tales como la prescripción y venta inapropiada de antibióticos, el mal uso de antibióticos fuera del sector salud, destacando el uso en animales donde existe una fuerte diseminación de la resistencia y otros factores intrínsecos propios de las bacterias por mutaciones genéticas. A esto, se suma el uso indiscriminado de antibióticos en procesos infecciosos virales y no menos importante el abandono de los tratamientos por parte de los pacientes sin concluir lo prescrito (Figura 1) (27).

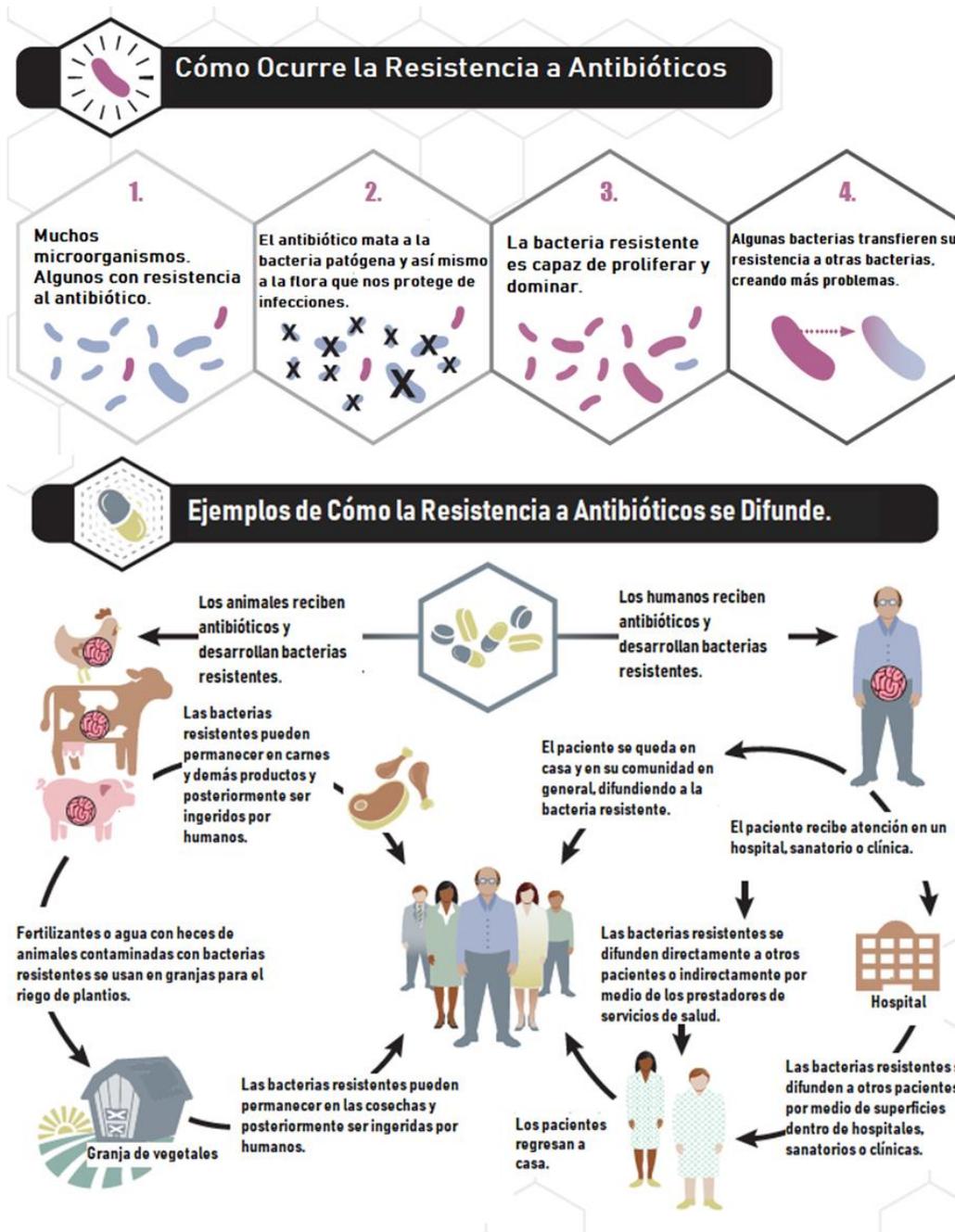
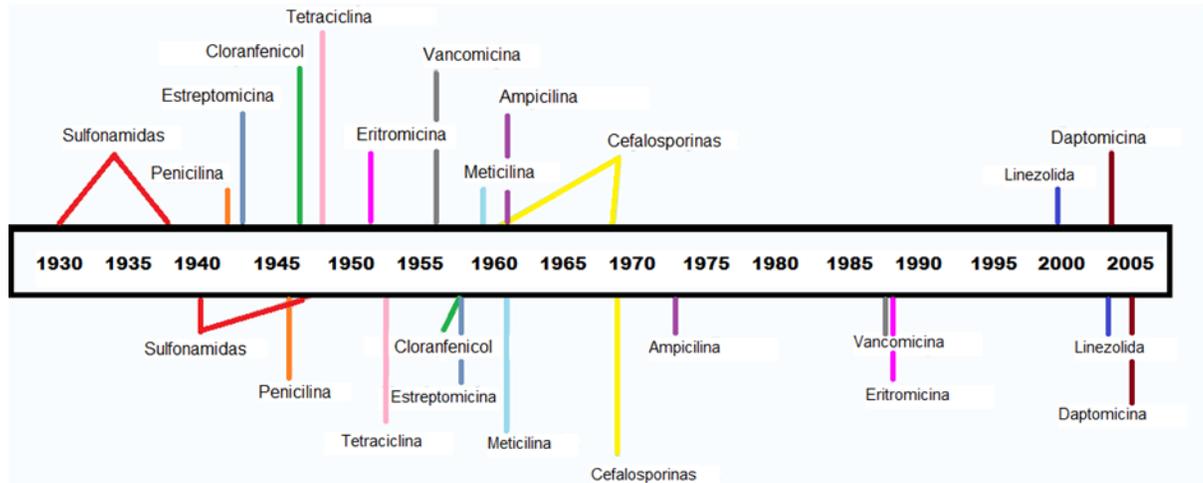


Figura 1. Cómo ocurre y cómo se difunde la resistencia a antibióticos. Tomada de (26).

Las repercusiones observadas debido a la resistencia a antibióticos abarcan desde un aumento en el costo y tiempo de los tratamientos, hasta un aumento en la morbilidad y mortalidad, así como la escasez de alternativas para tratar estas infecciones (1). También se ha observado que el tiempo en el que se

desarrolla la resistencia a los nuevos antibióticos ha disminuido drásticamente (Figura 2) (28), esto crea la necesidad de diseñar nuevos antibióticos para tratar bacterias multirresistentes, pero más importante aún diseñar nuevos fármacos antibióticos, con nuevos mecanismos de acción y así retrasar el tiempo en que se desarrollen estas resistencias (1).



**Figura 2. Línea del tiempo donde se muestra en que año comenzó a usarse y en qué año apareció la resistencia a cada antibiótico. Tomado y modificado de (28).**

Dentro de los principales patógenos resistentes a los tratamientos actuales destaca *Staphylococcus aureus*, este es un patógeno de importancia clínica global debido a sus características estructurales y patogénicas que le permiten provocar diferentes tipos de infecciones y sobrevivir a los efectos de los tratamientos.

## 2.2 *Staphylococcus aureus*

### 2.2.1 Generalidades

El género *Staphylococcus* es un grupo amplio de bacterias Gram-positivas, distribuidas en agrupaciones asemejando racimos de uvas (29). El género *Staphylococcus* cuenta hasta la fecha con 17 subespecies, tienen una alta facilidad de adaptación lo que les permite afectar a las especies de mamíferos. Por su facilidad de propagación es común el contagio entre animales y humanos, y viceversa (30). Dentro de las especies del género destaca *Staphylococcus aureus*, el principal agente causal de infecciones del torrente sanguíneo e

intoxicaciones causadas por alimentos (31). Gran parte de su éxito para generar brotes infecciosos es debido a sus diversos factores de patogenicidad relacionados a diversos componentes presentes en su superficie, tales como proteínas de adhesión, diferentes toxinas y enzimas que secreta (32, 33), y a su facilidad de crear resistencia a los tratamientos. Su importancia clínica radica principalmente en las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM), siendo este el nombre que reciben las cepas con resistencia a diferentes grupos de antibióticos  $\beta$ -lactámicos, así como, tetraciclinas, macrólidos, quinolonas, carbapenémicos y cefalosporinas (33). Los primeros registros de cepas SARM fueron en el año 1961 exclusivas del medio hospitalario, sin embargo; para el año 1990 se dieron los primeros registros de cepas SARM en la comunidad sin factor de riesgo conocido (34). La diferencia entre estos tipos de cepas es principalmente el tipo de infecciones que provocan, las cepas adquiridas en la comunidad tienden a causar infecciones en piel y mucosas como forunculosis o celulitis con mayor facilidad de tratamiento, sin embargo; tienen la misma capacidad de generar brotes epidémicos y resistencia a los antibióticos, esto crea un problema de salud pública de impacto mundial que no solo se limita a hospitales (35).

### **2.2.2 Prevalencia**

Se estima que aproximadamente hasta un 45% de la población mundial es hospedera de alguna cepa de *S. aureus* ya sea de manera temporal o crónica, dando lugar a una alta posibilidad de que si una de estas personas desarrolla alguna infección bacteriana sea a causa de la misma cepa que hospeda (36). Desde su descubrimiento, las cepas de SARM se han extendido por todo el mundo aumentando su prevalencia en aproximadamente un 300%. En México, existe una alta prevalencia de cepas de SARM, de todas las cepas aisladas se observa que entre un 50% y 85% del total son resistentes a meticilina (7).

### **2.2.3 Resistencia**

*Staphylococcus aureus* es la principal especie patógena de su género, es la causa común de diferentes infecciones tales como el síndrome del shock tóxico,

bacteremia, neumonía, impétigo bulloso. En la actualidad el interés del estudio de este patógeno se debe en parte a la alta frecuencia en la que se encuentra tanto en hospitales como en la comunidad pero sobre todo, a las cepas SARM (37).

La facilidad de *S. aureus* para crear resistencia a los tratamientos, apareció a inicios de la década de 1960, cuando se observó que la penicilina perdía eficacia contra infecciones por SARM. La resistencia a las penicilinas por parte de *S. aureus* es debido a la síntesis de una proteína de unión a penicilinas (PBP), conocida como PBP2a o PBP2' (codificada por el gen *mecA*), esta tiene baja afinidad por el anillo  $\beta$ -lactámico que le permite a la bacteria continuar con la síntesis de pared celular (38). Sin embargo, existen otros mecanismos de resistencia que involucran modificaciones del enzima blanco en el metabolismo del patógeno, cambios estructurales de los blancos dentro de la estructura celular, sobreproducción de metabolitos y la implementación de bombas de expulsión (Tabla I).

**Tabla I. Mecanismos de resistencia a los antibióticos identificados en *S. aureus* (39).**

Fármaco	Blanco celular	Gen de resistencia	Mecanismo de resistencia
Amino glucósidos	RNAr 30s	<i>aacA-aphD</i> , <i>aadA</i> , <i>aadD</i> , <i>aphA</i> , <i>aphC</i> , <i>spc</i> , <i>strA</i> .	Modificación por acetiltransferasas, adeniltransferasas o alteración ribosomal de las fosfotransferasas.
Cloranfenicol	RNAr 50s	<i>cat</i>	Modificación por acetiltransferasa
Fluoroquinolonas	DNA girasa	<i>gyrA / gyrB</i> <i>norA</i> <i>griA</i>	Mutaciones en los genes de la DNA girasa, Bombas de expulsión, Mutaciones en el gen de la DNA topoisomerasa IV
Fosfomicina	Síntesis del ácido N-acetil murámico	<i>fosB</i>	Modificación por una glutation-S-transferasa
Ácido fusídico	Factor de elongación G	<i>fusA/fusB</i>	Alteración en el factor de elongación G/disminución de la permeabilidad
Glicopéptidos	Complejos D-Ala-D-Ala		Secuestro por la pared celular
Macrolidos, lincosamidas	RNAr 50s	<i>ermA</i> , <i>ermB</i> , <i>ermC</i> , <i>msrA</i>	Mutilación del RNAr, Bombas de expulsión
Mupirocina	Isoleucil-RNA-t-sintetasa	<i>mupA</i>	Producción de una isoleucil-RNA-t-sintetasa modificada
Rifampicina	Subunidad $\beta$ de la RNA polimerasa	<i>rif</i>	Alteraciones en la RNA polimerasa
Sulfonamidas	Síntesis del ácido tetrahidrofólico	<i>sulA</i>	Sobreproducción de ácido p-aminobenzoico
Tetraciclinas	RNAr 30s	<i>tetA(K)</i> / <i>tetA(L)</i> <i>tetA(M)</i>	Bombas de expulsión Protección ribosomal
Trimetoprim	Síntesis del ácido tetrahidrofólico	<i>drfA</i>	Bypass por una dehidrofolato reductasa

#### 2.2.4 Patogenicidad

Desde el punto de vista clínico, las infecciones por SARM no difieren de las producidas por *S. aureus* sensible a la meticilina y, por tanto, las cepas resistentes tienen la misma capacidad patogénica para colonizar y causar infección. Las infecciones más comunes son las que afectan al tejido cutáneo y subcutáneo (lesiones supuradas o abscesificadas), las infecciones de herida quirúrgica, bacteremia, neumonía, osteomielitis, artritis y la infección asociada al catéter intravascular o sondaje urinario. Entre las complicaciones potencialmente graves de la bacteremia estafilocócica se encuentran el shock séptico y las infecciones metastásicas graves, como la endocarditis aguda, miocarditis, pericarditis, meningitis, artritis, osteomielitis, neumonía y abscesos. La multiresistencia en SARM es un factor clave de transcendencia clínico-terapéutica por la necesidad de tratamientos antibióticos parenterales que prolongan la estancia media de los pacientes afectados e incrementan los costos sanitarios (37).

*S. aureus* tiene la capacidad de sobrevivir en ambientes adversos, aunado a esto, sus múltiples resistencias y sus diferentes factores de patogenicidad le permiten causar diferentes tipos de infecciones. Los factores de patogenicidad con los que cuenta *S. aureus* se pueden dividir en componentes estructurales, tales como cápsula, peptidoglicano, ácido teicoico, proteína A, así como componentes encontrados en su superficie como el polisacárido capsular, el polisacárido extracelular y proteínas superficiales que tienen la función de permitir la unión a diferentes componentes del huésped y finalmente, la producción de diferentes enzimas y toxinas para invadir al huésped y mantener la infección (Tabla II).

**Tabla II. Factores de patogenicidad de *S. aureus*.**

<b>Componentes estructurales</b>	<b>Efectos biológicos</b>
Cápsula	Es una adhesina; además, impide la quimiotaxis, la proliferación de células mononucleares y la fagocitosis.
Peptidoglicano	Peptidoglicano proporciona estabilidad osmótica y estimula la producción de pirógenos endógenos y es quimioatrayente leucocitario
Ácido teicoico	Regula la concentración catiónica de la membrana celular, se une a la fibronectina
Proteína A	Altera la función ciliar, estimula la respuesta inflamatoria, provoca daño tisular por la producción de especies reactivas de oxígeno
<b>Enzimas</b>	
Coagulasa	Convierte el fibrinógeno en fibrina
Catalasa	Cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno
Hialuronidasa	Hidroliza los ácidos hialurónicos en el tejido conectivo, facilitando la diseminación de los estafilococos en los tejidos
Fibrolisina	Disuelve los coágulos de fibrina
Lipasa	Hidroliza los lípidos
Nucleasa	Hidroliza el DNA
Penicilinasas	Hidroliza la penicilina
<b>Toxinas</b>	
Toxinas o hemolisinas $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\sigma$ Leucocidina	Toxinas con actividad sobre membranas
Enterotoxinas, A-E y G-J Toxina del síndrome de shock tóxico 1, TSST-1	Toxinas con actividad de superantígenos
Toxinas epidermolíticas o exfoliativas, A y B	

### 2.2.5 Tratamiento

En la actualidad las infecciones de piel y tejidos blandos causadas por cepas de *S. aureus* adquiridas en el hospital (SARM-AH) no son tratadas diferente a las de pacientes ambulatorios, el tiempo de tratamiento es variado según la respuesta del paciente y la gravedad de la infección. Para la implementación de un tratamiento eficaz es importante tomar en cuenta el tipo de infección, los factores de riesgo que tiene el paciente, y la susceptibilidad de la cepa infectante (7).

SARM-AH generalmente presenta susceptibilidad a vancomicina, daptomicina, linezolid, tigeciclina y quinopristina/dalfopristina. Algunas estirpes de *S. aureus* adquirido en la comunidad (SARM-AC) presentan susceptibilidad a antibióticos anticuados como la clindamicina, trimetoprim/sulfametoxazol, rifampicina y tetraciclina (35). En las Tabla III, se muestran los fármacos más comunes usados para tratar infecciones por SARM, sus mecanismos de acción y las infecciones en los que son utilizados.

Los diferentes efectos adversos que provocan los tratamientos como malestar gastrointestinal, dolor de cabeza, hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, entre otros y sobre todo la aparición de cepas resistentes a estos, crean la necesidad de identificar nuevos blancos moleculares para el desarrollo de nuevos tratamientos contra *S. aureus*, que reduzcan las posibilidades de provocar efectos adversos y que aumenten el tiempo en que la bacteria crea resistencia.

Un enfoque en el diseño de nuevos fármacos es la búsqueda de inhibidores de enzimas clave en el metabolismo de la bacteria, en este sentido una ruta fundamental para la supervivencia de *S. aureus* es la ruta del shikimato.

**Tabla III. Fármacos utilizados en el tratamiento de infecciones por SARM.**

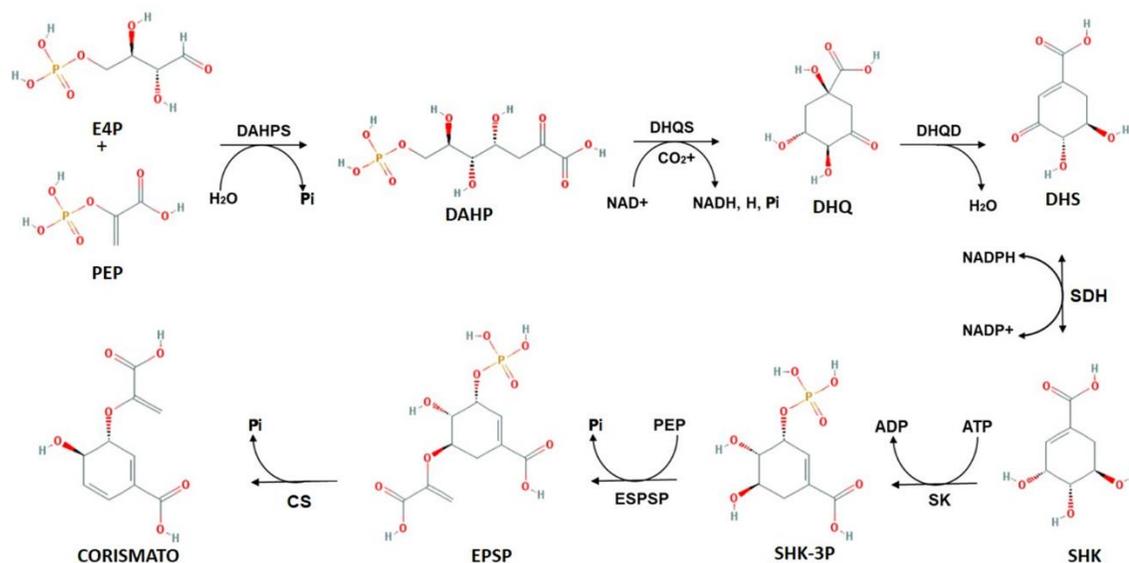
<b>Fármaco</b>	<b>Infección</b>	<b>Mecanismo de Acción</b>
Clindamicina	Celulitis, infecciones de piel y mucosas, neumonía, osteomielitis y artritis séptica.	Inhibición de la síntesis proteica al unirse a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano.
Linezolid	Celulitis, infecciones de piel y mucosas, neumonía, osteomielitis, artritis séptica, meningitis y absceso cerebral.	Inhibición de la síntesis proteica al impedir la formación del complejo de iniciación.
Vancomicina	Infecciones de piel y mucosas, endocarditis, bacteriemia, neumonía, osteomielitis, artritis séptica, meningitis y absceso cerebral.	Inhibición de la síntesis de pared celular uniéndose con alta afinidad a los extremos D- alanil-D-alanina de las unidades precursoras de pared celular.
Daptomicina	Infecciones de piel y mucosas, endocarditis, osteomielitis y artritis séptica.	Unión a membrana bacteriana causando despolarización, conduciendo a una rápida inhibición de síntesis proteica, de DNA y RNA.
Rifampicina	Endocarditis y osteomielitis.	Inhibición de la RNA polimerasa bacteriana mediante su unión a la subunidad Beta de la molécula.
Telavancina	Infecciones graves en piel y mucosas.	Inhibición de la síntesis de peptidoglicano y despolarización de la membrana citoplasmática bacteriana.
Trimetoprim / Sulfametoxazol	Celulitis, osteomielitis, artritis séptica, meningitis y absceso cerebral.	Inhibición de la dihidrofolato reductasa.
Minociclina	Celulitis.	Inhibición de la síntesis proteica bacteriana.

Información tomada de (5).

## 2.3 Ruta del shikimato

La ruta del Shikimato es la ruta biosintética que conduce hacia la síntesis de corismato, el precursor de compuestos aromáticos tales como ubiquinona, vitamina K, aminoácidos aromáticos y otros metabolitos secundarios (naftoquinonas, menaquinonas y micobactinas) (40). Debido a que la ruta del shikimato es esencial en plantas, hongos, bacterias y parásitos apicomplexos pero se encuentra ausente en mamíferos, las enzimas involucradas en la ruta son consideradas blancos potenciales para el desarrollo de agentes antimicrobianos no tóxicos (41), herbicidas (9) y drogas antiparasitarias (42).

La ruta de shikimato involucra la condensación del fosfoenolpiruvato (PEP) de la ruta de la glucólisis y la eritrosa 4-fosfato (E4P) de la ruta de las pentosas fosfato y a través de siete pasos enzimáticos son convertidos a corismato, precursor de compuestos aromáticos (Figura 3).



**Figura 3. Ruta del Shikimato.** DAHPS (3-desoxi-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato sintasa); DHQS (dehidroquinato sintasa); DHQD (3-dehidroquinato deshidratasa); SDH (shikimato deshidrogenasa); SHK (shikimato cinasa); EPSPS (5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa); CS (corismato sintasa); E4P (eritrosa 4-fosfato); PEP (fosfoenol piruvato).

### 2.3.1 Regulación

El control de la actividad enzimática en el metabolismo es de gran importancia para que las células respondan de manera eficiente a condiciones alteradas del ambiente y evitar el mal uso de recursos. Se conocen diferentes estrategias de regular la actividad enzimática, ya sea a nivel genético o de la proteína (43). La ruta del shikimato consta con dos puntos de regulación, uno de estos puntos corresponde al primer paso enzimático de la vía, catalizado por la DAHPS primordialmente por una retroalimentación alostérica, y en menor medida ocurre por la síntesis de isoformas de DAHPS (*AroF*, *AroG* y *AroH*) a nivel transcripcional, regulada por la acción de aminoácidos aromáticos (tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe) y triptófano (Trp)) sobre los reguladores *TyrR* y *TrpR*. El otro punto de regulación se encuentra a nivel del quinto paso de la vía, correspondiente a la SK, a este nivel la regulación ocurre genéticamente por el sinergismo entre *TyrR* y *TrpR* (44). Sin embargo, se ha observado la limitación por acumulación de shikimato en el segundo y quinto paso DHQS (*AroB*) y SK (*AroL* o *AroK*), respectivamente (45).

Una de las enzimas que participan en esta ruta es la shikimato deshidrogenasa (SDH), considerada como un blanco prometedor para el desarrollo de agentes antimicrobianos (11, 13, 18, 25).

### 2.4 Shikimato deshidrogenasa (E. C. 1. 1. 1. 25, SDH)

La cuarta reacción de la Ruta del Shikimato es catalizada por la SDH, una oxidorreductasa que cataliza la reducción reversible dependiente de NADPH de 3-dehidroshikimato a shikimato (Figura 4A).

#### 2.4.1 Estructura tridimensional de la SDH

La estructura tridimensional de las enzimas de la familia de las SDH consta de dos dominios estructurales, el dominio de unión a sustrato y el dominio de unión a cofactor. El dominio N-terminal proporciona la mayoría de los residuos necesarios para la unión con el sustrato y está formado a partir de una lámina  $\beta$  central, con 6 láminas  $\beta$  paralelas y rodeadas cuando mucho por 5  $\alpha$  hélices. El

dominio C-terminal, es el responsable de la unión al cofactor NADPH, forma un plegamiento tipo Rossman con 6 láminas  $\beta$  flanqueadas por 4 o hasta 6  $\alpha$  hélices (Figura 4B). El sitio activo se encuentra en la interface de ambos dominios. La familia de las proteínas SDH muestra similitudes estructurales en sus dominios C-terminal en comparación de otras proteínas dependientes de NADP<sup>+</sup>. Se ha descrito que en solución la SDH puede encontrarse en estado monómero o dímérico dependiendo de la especie, con un peso aproximado de 29 kDa por monómero (23).

Existen aproximadamente 32 registros de estructuras cristalográficas de la SDH depositados en el banco de datos de proteínas (PDB), entre las que se encuentran la de *E. coli* (46), *T. thermophilus* (20), *H. influenzae* (24) y *S. epidermidis* (14).

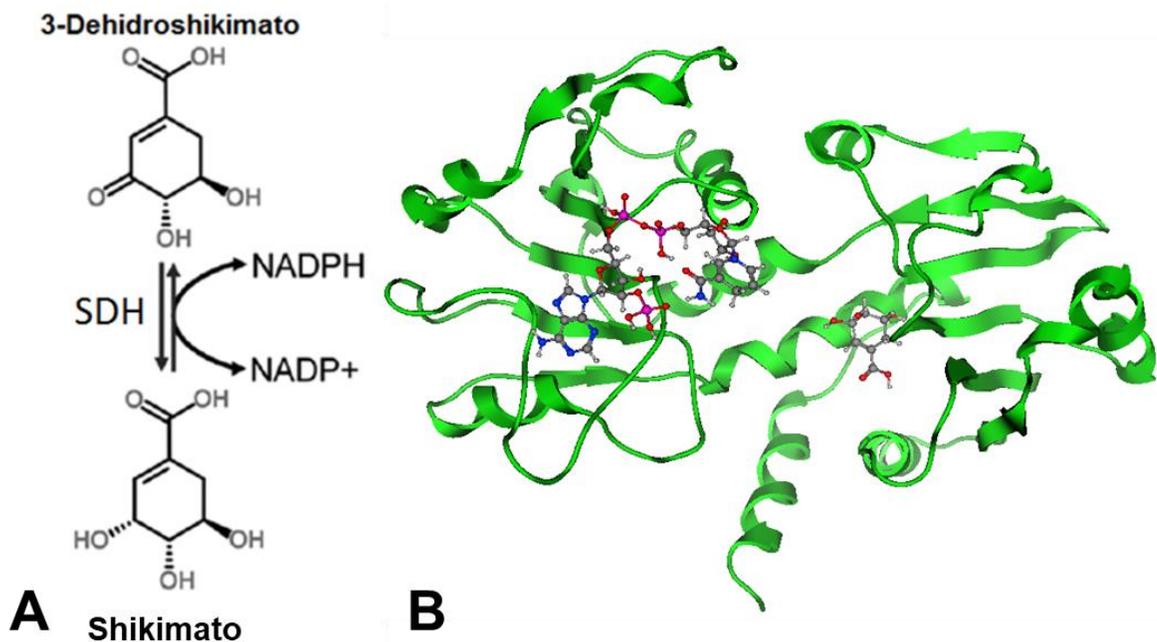


Figura 4. Shikimato deshidrogenasa. (A) Reacción catalizada por la SDH. (B) Estructura tridimensional de la SaSDH en complejo con NADP<sup>+</sup> y shikimato.

## 2.4.2 Conformación de la SDH

La SDH presenta dos tipos de conformaciones una forma abierta y una cerrada, considerándose la cerrada como la forma catalíticamente activa. Han y colaboradores (2009), propusieron que el proceso de catálisis se lleva a cabo por medio de la conformación cerrada, y este cambio conformacional se da probablemente por la interacción del NADP<sup>+</sup> con el Asp100 acercando el cofactor al sustrato para la catálisis, además el dominio C-terminal tiene más facilidad de sufrir un reordenamiento que el dominio N-terminal, esto sugiere que el cambio de conformación estructural de cierre se induce por el NADP<sup>+</sup> y se estabiliza cuando se une el shikimato. Por otro lado, en el año 2007 Bagautdinov y colaboradores proponen que la unión del NADP<sup>+</sup> no genera un cambio conformacional, sugiriendo que la unión del cofactor corresponde al clásico modelo de la “llave-cerradura”, y que al unirse tanto el shikimato como el NADP<sup>+</sup> quedan en una posición los suficientemente cercanos para llevarse a cabo el intercambio del protón en la catálisis. Sin embargo, existen diferentes posturas acerca de cuál sustrato genera el cambio conformacional (14, 19, 20, 46).

## 2.4.3 Mecanismo catalítico

La enzima activa por la deshidrogenación del shikimato contiene una lisina desprotonada (Lys64), un aspartato desprotonado (Asp100), y una tirosina protonada (Tyr211) (según la numeración en la estructura de la SDH de *S. epidermidis*). El grupo hidruro se transfiere y la desprotonación del grupo 3-hidroxil de la SDH ocurre de modo concertado (47). La Lys64 actúa como una base y en la reacción de deshidrogenación se protona. El protón entonces es transferido al solvente mediante el Asp100. En la reacción de oxidorreducción una molécula de agua situada cerca de la Lys64 y el Asp100 facilita la transferencia del protón. La Tyr211 forma interacciones de tipo puente de hidrógeno con el grupo carboxilo del shikimato, y al desprotonarse el grupo fenol de la tirosina, se cree que disminuye considerablemente la afinidad de la enzima por el shikimato (Figura 5) (14).

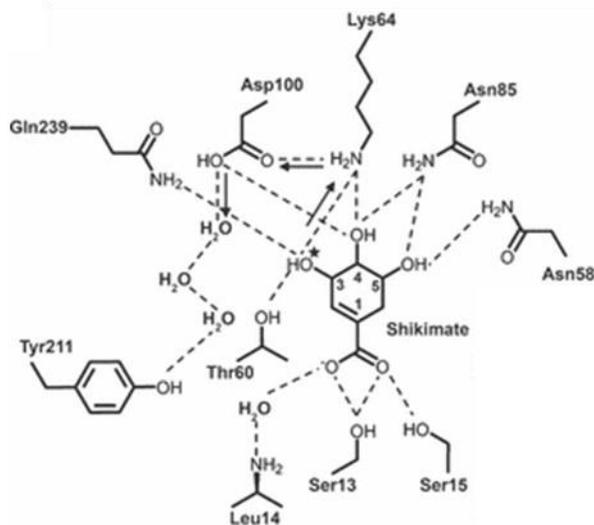


Figura 5. Mecanismo catalítico de la SDH. Modificado de (14).

## 2.5 Inhibidores de la SaSDH

Existen varios trabajos por nuestro grupo de investigación donde se han encontrado inhibidores de la SaSDH, que incluyen compuestos sintéticos y naturales. Dentro de los compuestos sintéticos a partir de una quimioteca de la empresa MAYBRIDGE se reportaron tres inhibidores (**238**, **766** y **894**) los cuales fueron capaces de inhibir la actividad de la enzima entre un 87 y 99% a una concentración de 200  $\mu\text{M}$  mostrándose inhibidores de tipo competitivo o mixto competitivo con respecto a shikimate y incompetitivo o mixto incompetitivo con respecto a  $\text{NADP}^+$ , con valores de  $K_i$  en el rango bajo  $\mu\text{M}$  (18). A partir de las estructuras de estos compuestos, a través de un análisis de RMSD se identificaron cuatro compuestos (**142**, **277**, **609** y **746**) con capacidad de inhibir la actividad de la enzima entre un 75 y 91% a una concentración de 400  $\mu\text{M}$ , mostrando tener características de inhibidores de tipo incompetitivo y mixto, con valores de  $K_i$  en el rango bajo  $\mu\text{M}$  y demostraron tener actividad biológica sobre una cepa de SARM a concentraciones en el rango mM (48). Además, se encontraron bencimidazoles y benzotiazoles (**ARM-D14**, **IVM-1** y **ARM-D11**) capaces de inhibir la actividad de la enzima entre un 74 y 87% a una

concentración de 200  $\mu\text{M}$ , estos son los primeros inhibidores para la SaSDH correspondientes a estos grupos químicos (49).

Finalmente, se encontraron tres inhibidores de naturaleza polifenólica (**luteolina**, **ácido clorogénico** y **quercetina**) presentes en un extracto de *Moringa oleifera*, con capacidad de inhibir la actividad de la enzima entre un 97 y 98% a una concentración de 200  $\mu\text{M}$ , con características de inhibidores de tipo mixto y capaces de inhibir el desarrollo de una cepa de SARM, cabe destacar que no existen otros trabajos de inhibidores de esta naturaleza para la SaSDH (50).

## 2.6 Diseño de fármacos

El diseño de un nuevo fármaco es un proceso largo y costoso que consta de varias etapas con una duración de 15 hasta 25 años, con costos que van de 500 hasta 1000 millones de dólares (Figura 6). Para iniciar con el desarrollo de un nuevo fármaco es importante conocer la enfermedad y buscar un blanco terapéutico que atacar.

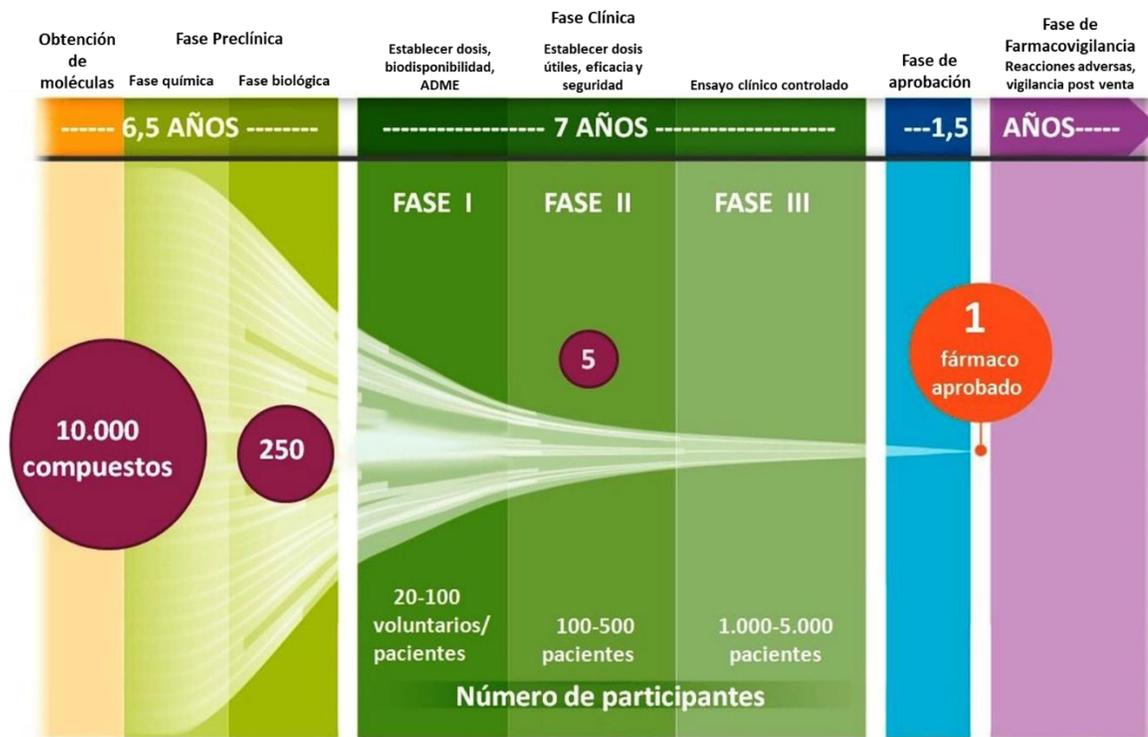


Figura 6. Fases de desarrollo de un nuevo fármaco. Modificado de (51).

Las etapas del diseño de un nuevo fármaco en general son;

**Etapas I Obtención de moléculas:** En esta etapa se utilizan diversos métodos de obtención de moléculas a ensayar en un blanco, dentro de las cuales se encuentran la extracción de un compuesto activo presente en algún producto natural, la modificación de una molécula química ya conocida, la síntesis de una nueva molécula, o la búsqueda de una nueva molécula por medio del diseño de fármacos basado en la relación estructura-actividad y el diseño de fármacos asistido por computadora (DIFAC) (52).

**Etapas II Preclínica:** esta etapa involucra dos fases, la fase química, que se encarga de conocer las propiedades fisicoquímicas de una molécula que permita identificarla y caracterizarla de la mejor manera, y la fase biológica que trata de comprender su perfil farmacocinético y farmacodinámico en diferentes especies animales, está incluye pruebas donde se determina su potencial toxicológico a corto y largo plazo (53).

**Etapas III Clínica:** esta etapa evalúa un nuevo medicamento en el ser humano, se busca poner en manifiesto sus efectos farmacodinámicos o farmacocinéticos, establecer su eficacia para una indicación terapéutica y conocer las reacciones adversas y su seguridad. Dentro de esta fase se desarrollan 4 tipos diferentes de ensayos clínicos.

**Estudios de fase 1:** Estas son las primeras pruebas de investigación en seres humanos, su principal objetivo es conocer acerca de las características propias del producto investigado y establecer el rango de dosis aceptables, sin importar su eficacia son pruebas realizadas en sujetos sanos y voluntarios. Incluye pruebas de biodisponibilidad y pruebas de farmacocinética clínica, donde se establecen sus propiedades de absorción, distribución, metabolismo y los mecanismos por los cuales es excretado del organismo.

**Estudios de fase 2:** Tiene el objetivo de evaluar la eficacia terapéutica del fármaco y conocer el rango de las dosis útiles, la tolerabilidad, así como establecer la

seguridad del producto. Para estos estudios los voluntarios padecen la enfermedad sobre la cual se espera que actúe el fármaco en estudio (54).

Estudios de fase 3. Ensayo Clínico Controlado: Este tipo de ensayo clínico se considera hoy en día como el estándar de oro para establecer y comparar la eficacia de dos o más intervenciones farmacológicas (55).

Etapa IV Farmacovigilancia: En esta etapa se busca conocer las reacciones adversas que no se habían podido conocer en los ensayos clínicos y que tengan muy baja incidencia o que se presenten después de varios años de haber tenido la exposición al fármaco (54).

### **2.6.1 Diseño de fármacos asistido por computadora**

El diseño de fármacos asistido por computadora (DIFAC) tiene como objetivo la optimización y selección de compuestos con actividad biológica. Cobra cada vez más importancia en la industria farmacéutica y puede aplicarse en diversas áreas, como productos naturales, bioquímica, química en alimentos, química orgánica y química teórica. El DIFAC forma parte de un esfuerzo multidisciplinario y se conforma por una serie de disciplinas científicas que abarcan modelado molecular, quimioinformática, química teórica y química computacional (56). Bajo esta estrategia se han obtenido con éxito inhibidores de la anhidrasa carbónica para el tratamiento del glaucoma (Dorzolamida, MERCK), inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina I para tratar la hipertensión y la insuficiencia cardíaca (IECA) (Captopril), inhibidores de la proteasa del VIH para el tratamiento de VIH/SIDA (Nelfinavir, PFIZER; Saquinavir, ROCHE; Indinavir, MERCK; Tripanavir, BOEHRINGER INGELHEIM), inhibidores de la neurominidasa para el tratamiento de la influenza (Oseltamivir, ROCHE) (56).

Dentro de las técnicas más utilizadas en el DIFAC se encuentra el acoplamiento molecular.

### **2.6.2 Acoplamiento molecular**

El acoplamiento molecular es una técnica que permite conocer las energías de unión y analizar las interacciones formadas por la enzima y el ligando (57).

El acoplamiento molecular es un método muy utilizado en el diseño de fármacos por su habilidad de predecir con un alto grado de exactitud la conformación de pequeñas moléculas utilizadas como ligandos dentro el sitio de unión de un blanco específico (58). A partir de 1980, se desarrollaron los primeros algoritmos que hicieron que hasta hoy el acoplamiento molecular sea una herramienta importante en el desarrollo y descubrimiento de nuevos fármacos. Los algoritmos del acoplamiento molecular pueden ejecutar predicciones cuantitativas de las energías de unión, proporcionando valores para los ligandos acoplados a la enzima con base a su afinidad de unión (59, 60).

### **2.6.3 Simulación de dinámica molecular**

El estudio de estructuras macromoleculares es un punto clave para entender la biología. Las funciones biológicas están basadas en interacciones moleculares, y estas son causadas por macromoléculas.

Una técnica útil para el estudio de estos fenómenos biológicos es la simulación de dinámica molecular, esta técnica se empezó a implementar en los años 70s y se basa en el estudio de las trayectorias de los átomos involucrados en un sistema, permite en el caso de las proteínas conocer su comportamiento con respecto al tiempo, saber si la unión de ligandos afectan su flexibilidad alterando su conformación, o entender mejor las interacciones formadas entre en los complejos receptor-ligando.

La simulación de dinámica molecular ha evolucionado hasta convertirse en una técnica madura con la utilidad de permitir comprender las relaciones estructura-función. En la actualidad las simulaciones se acercan a tiempos biológicamente relevantes. Los resultados que se obtienen a partir de las simulaciones de dinámica molecular son de gran importancia para el desarrollo de nuevos fármacos (61).

### **2.7 Propiedades fisicoquímicas y toxicológicas**

En el diseño de fármacos es de importancia tomar en cuenta las propiedades fisicoquímicas y evaluar el potencial toxicológico de las nuevas moléculas,

existen diversas reglas que sirven de guía para la selección de compuestos con propiedades fisicoquímicas ideales para que presenten permeabilidad a través del epitelio gastrointestinal y una buena absorción oral, el seguir estas guías de selección incrementa las probabilidades de éxito durante el desarrollo de nuevos fármacos.

Las reglas de Lipinski son un conjunto de cuatro reglas utilizadas ampliamente en la actualidad como filtro que permite la selección de las moléculas con mejor potencial terapéutico. Estas cuatro reglas establecen las características con las que debe contar una molécula pequeña para ser considerado un fármaco potencial, y establecen los siguientes parámetros, tener un coeficiente de reparto octanol-agua menor o igual a 5 ( $\log P \leq 5$ ), un peso molecular menor o igual a 500 Daltons ( $PM \leq 500 \text{ Da}$ ), cinco o menos grupos donadores de puentes de hidrógeno ( $DPH \leq 5$ ), diez o menos grupos aceptores de puentes de hidrógeno ( $APH \leq 10$ ). Se considera que un fármaco presentará una mala absorción o permeabilidad si dos o más de estos parámetros no se cumplen (62).

Los parámetros toxicológicos son principalmente en términos de carcinogenicidad, mutagenicidad, efectos reproductivos y acidez en el sistema gastrointestinal, en la actualidad se hace uso de bases de datos y algoritmos presentes en programas computacionales que facilitan la predicción de potencial toxicológico de nuevas moléculas en estudio para el diseño de fármacos (63).

## **2.8 Determinación de sensibilidad a antimicrobianos**

Los métodos para evaluar la sensibilidad a antimicrobianos se pueden clasificar en cuantitativos y cualitativos. Los métodos cuantitativos nos permitirán determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM). La CIM se define como la mínima concentración que en un periodo de tiempo determinado es capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* de un inóculo bacteriano previamente estandarizado y la CBM se define como la mínima concentración que en un periodo de tiempo predeterminado es capaz de inducir la muerte *in vitro* del 99.9% de una población bacteriana previamente estandarizada. La determinación de la CIM se realiza por los métodos de micro

o macro dilución en caldo Mueller Hinton, dilución en agar o E-test (kit comercial) (64).

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La resistencia a antimicrobianos es un problema de salud pública con gran impacto en la sociedad y en el sector salud. *Staphylococcus aureus*, ha ganado interés clínico debido a las cepas resistentes a meticilina que causan diversas infecciones tanto en el ambiente hospitalario como en la comunidad. La alta patogenicidad de *S. aureus* y la aparición de cepas SARM con sensibilidad disminuida a los tratamientos de primera línea, aumentan la pérdida de opciones terapéuticas.

*Staphylococcus aureus* se encuentra colonizando hasta el 45% de la población mundial y en México ocupa uno de los primeros lugares entre las bacterias mayormente identificadas como causa de infecciones nosocomiales.

En la actualidad las alternativas para tratar las infecciones provocadas por SARM son limitadas, esto aunado a la aparición constante de resistencia a los nuevos tratamientos genera un impacto de trascendencia mundial.

#### **IV. JUSTIFICACIÓN**

*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina representa un gran problema de salud a nivel mundial, es el agente causal de una gran variedad de infecciones y tiene la capacidad de crear rápida resistencia a los tratamientos.

Los efectos secundarios de los tratamientos, pero sobre todo la aparición constante de cepas resistentes crean la necesidad de desarrollar fármacos con nuevos mecanismos de acción que sirvan para tratar infecciones causadas por SARM.

## V. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo General

Obtener inhibidores de la shikimato deshidrogenasa de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina con similitud estructural a los inhibidores 238, 766 y 894.

### 5.2 Objetivos específicos

1. Buscar compuestos en la base de datos de CHEMBRIDGE estructuralmente similares a los inhibidores 238, 766 y 894.
2. Evaluar su capacidad de inhibición a una concentración 100  $\mu\text{M}$  en la SaSDH.
3. Caracterizar el mecanismo de inhibición de los compuestos más potentes mediante cinética enzimática.
4. Determinar la actividad biológica y concentración mínima inhibitoria en una cepa de SARM.

## VI. METODOLOGÍA

### 6.1 Selección de inhibidores

La búsqueda y selección de potenciales inhibidores fue llevada a cabo mediante una estrategia de búsqueda de similitud estructural tomando en cuenta las estructuras de tres inhibidores de la SaSDH reportados por nuestro grupo de investigación y corresponden a los inhibidores **238** (ácido 2,2'-bitiofen-5-carboxílico), **766** (7-hidroxi-2,2,8-trimetil-2,3-dihidro-4H-crom-4-ona) y **894** (6-hidroxi-2H-benzofuran-3-ona)(18). Para llevar a cabo lo anterior, se utilizó la quimioteca "Hit2lead" de la empresa CHEMBRIDGE ([www.chembridge.com](http://www.chembridge.com)) la cual incluye más de 1'300,000 compuestos. Los compuestos fueron filtrados con base al porcentaje de similitud estructural compartido con las estructuras base (**238**, **766** y **894**), seleccionando todas aquellas moléculas que compartían más del 50% de similitud estructural.

### 6.2 Purificación de la SaSDH

La purificación de la enzima recombinante SaSDH se llevó a cabo mediante el método descrito por Avitia y colaboradores, 2014 (18). Brevemente, la cepa de *E. coli* transformada con el plásmido que sobreexpresa la SaSDH, fue crecida en 500 ml de medio LB líquido suplementado con kanamicina (50 µg/ml) a 37 °C en agitación hasta alcanzar una  $DO_{600nm}$  de 0.6 UA. Inmediatamente, el cultivo fue inducido con 0.4 mM de IPTG e incubado por 3 horas a 37 °C, posteriormente se continuo con la inducción a 25 °C durante 12 horas. Enseguida las células fueron cosechadas por centrifugación (centrifuga Thermo Fisher scientific) y resuspendidas en amortiguador A (50 mM Tris-HCl, 0.5 NaCl, 5% Glicerol (v/v), pH 7.5) suplementado con el inhibidor de proteasas PMSF a una concentración de 250 µM, para ser lisadas por sonicación (sonicador Fisher scientific Q500). La enzima se purificó mediante cromatografía de afinidad, pasando la fracción soluble por una columna de Ni-Agarosa en un equipo Akta pure FPLC 150 general electric, lavando con amortiguador A más diferentes concentraciones de imidazol. La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford utilizando BSA como estándar (65).

### 6.3 Actividad de la SaSDH

La actividad de la enzima fue determinada mediante la siguiente mezcla de reacción que consistió en 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM shikimato y 1 mM NADP<sup>+</sup>. La reacción fue iniciada con la adición de 0.05 mg/ml de SaSDH. La actividad de la enzima se midió espectrofotométricamente a 25 °C siguiendo la generación NADPH midiendo la velocidad inicial a un minuto, a una absorbancia de 340 nm utilizando el coeficiente de extinción molar del NADP<sup>+</sup> ( $\epsilon=6.2 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) en un espectrofotómetro shimadzu UV-1800.

### 6.4 Ensayos de inhibición

El porcentaje de inhibición se determinó midiendo la actividad de la enzima bajo las condiciones anteriormente descritas, adicionando a la mezcla de reacción cada una de las moléculas seleccionadas (previamente disueltas en DMSO) a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ , manteniendo la concentración de DMSO en la mezcla de reacción a un 10% del volumen total. Los ensayos fueron realizados por triplicado. El porcentaje de inhibición fue calculado ajustando los datos a la ecuación 1:

$$(1) \% \text{ de inhibición} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

En donde:

- $A_0$  es la actividad de la enzima en ausencia del inhibidor
- $A_1$  es la actividad de la enzima en presencia del inhibidor

En función de los resultados obtenidos fueron seleccionados los inhibidores más potentes para determinar su  $\text{IC}_{50}$ , mecanismo de inhibición, estudios de dinámica molecular y actividad biológica.

## 6.5 Determinación de la IC<sub>50</sub>

La determinación de la concentración de compuesto que inhibe el 50% la actividad enzimática (IC<sub>50</sub>) se realizó mediante curvas a diferentes concentraciones del inhibidor y concentraciones saturantes de cada uno de los sustratos. Los ensayos fueron realizados por triplicado. La IC<sub>50</sub> se determinó ajustando las medias de los datos a la ecuación 2 en el software Origin versión 8 ([www.originlab.com](http://www.originlab.com)).

$$(2) V_i = \frac{(V_o \times IC_{50}^n)}{(IC_{50}^n + I^n)}$$

En donde:

- Vi: Actividad de la enzima a la concentración dada del compuesto
- Vo: Actividad inicial
- IC<sub>50</sub>: Concentración que induce el 50% de inhibición
- n: Numero de Hill
- I: Concentración del compuesto ensayado

## 6.6 Caracterización del mecanismo de inhibición

Con la finalidad de determinar el mecanismo de inhibición de los mejores inhibidores, se realizaron curvas a diferentes concentraciones de un sustrato, variando las concentraciones del otro sustrato y concentraciones fijas de cada inhibidor. Las concentraciones de sustratos utilizadas para shikimato y NADP<sup>+</sup> fueron en un rango de 10-600 μM y una concentración de 10-50 μM para los inhibidores. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el software Sigmaplot v. 12.3 (66) y ajustados a modelos de inhibición no lineales, inhibidor mixto completo (ecuación 3), inhibidor mixto parcial (ecuación 4) e inhibidor acompetitivo completo (ecuación 5). Los ensayos fueron realizados por cuadruplicado.

$$(3) \text{ Mixto completo: } V_0 = \frac{V_{max}}{\left(\frac{Km}{S}\right) \left(1 + \frac{I}{Ki}\right) + \left(1 + \frac{I}{\alpha * ki}\right)}$$

$$(4) \text{ Mixto parcial: } V_0 = (V_{max}) \left( \frac{\frac{1+\beta\left(\frac{I}{\alpha*Ki}\right)}{I}}{1+\frac{I}{\alpha*Ki}} \right) \left( \frac{1+\frac{I}{Ki}}{\left(1+\frac{Km}{S}\right)\left(\frac{1+\frac{I}{Ki}}{1+\frac{I}{\alpha*Ki}}\right)} \right)$$

$$(5) \text{ Acompetitivo completo: } V_0 = \frac{V_{max}}{1 + \frac{I}{Ki} + \frac{Km}{S}}$$

Donde,  $V_{max}$  es la velocidad máxima,  $Km$  es la constante de Michaelis,  $S$  es la concentración de sustrato,  $I$  es la concentración de inhibidor,  $Ki$  es la constante de inhibición,  $\alpha$  indica cuantas veces es modificada la  $Ks$  cuando la enzima es saturada de inhibidor y  $\beta$  expresa el cambio en la constante catalítica en presencia de concentraciones saturantes de inhibidor.

## 6.7 Acoplamiento molecular

Con la finalidad de conocer la interacción enzima-inhibidor se llevó a cabo un acoplamiento molecular en el software Glide (67), para lo cual las moléculas fueron construidas utilizando el software ChemSketch (68). Para realizar el acoplamiento molecular, debido a la falta de una estructura cristalográfica de la SaSDH se utilizó un modelo previamente reportado por nuestro grupo de investigación (18). En el módulo de preparación de proteínas se agregaron átomos de hidrógeno y cargas parciales. Enseguida, se llevó a cabo la minimización de la energía utilizando el campo de fuerza OPLS3 (69). Finalmente se utilizó el modo de extra precisión y se adicionaron las penalizaciones de estado para ligandos flexibles en el puntaje del acoplamiento usando el software Epik (70).

## 6.8 Simulaciones de dinámica Molecular

Las simulaciones de dinámica molecular para los complejos SaSDH-inhibidor fueron realizadas a través del software GROMACS 5.0.4 (71) utilizando el campo de fuerza CHARMM36 (72), los complejos utilizados fueron obtenidos a partir del

previo acoplamiento molecular de cada inhibidor. En cada caso, el ligando fue extraído y parametrizado con el servidor swissparam (73) ([www.swissparam.com.ch](http://www.swissparam.com.ch)). Una vez parametrizado, el complejo fue solvatado con el modelo de agua de potencial intermolecular transferible con 3 puntos (TIP3) en una celda cubica de 1 nm en condiciones periódicas, las cargas fueron neutralizadas con iones de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> a una concentración de 0.15 mol/L. Los complejos preparados fueron sometidos a una minimización de energía de 500 pasos con un algoritmo de gradiente conjugado. Una vez minimizado, se realizaron simulaciones canónicas (NVT) (74) e isotérmicas-isobáricas (NPT) (75) (con escala de posición isotrópica) a 300 °K y 1 atm de presión, usando una caja cubica. Finalmente, se realizó una simulación de dinámica molecular de 50 ns a 300 °K sin restricciones, obteniendo 10,000 conformaciones guardadas cada 5000 pasos. A las trayectorias obtenidas se les realizó un análisis matricial de desviación media cuadrática (RMSD), fluctuación media cuadrática (RMSF) y un análisis de clustering por tamaño con el método Gromos (76) para elegir las conformaciones más representativas de la simulación.

### **6.9 Análisis de componente principal**

Se realizó un análisis de componente principal para extraer los principales modos involucrados en el movimiento de los complejos enzima-inhibidor (77). La matriz de covarianza fue ensamblada usando una transformación simple del espacio en las coordenadas cartesianas. Una representación vectorial de cada uno de los componentes individuales indicó la dirección del movimiento. Para esto, un conjunto de eigenvectores fueron derivados a través de la diagonalización de la matriz de covarianza. Cada eigenvector tiene un eigenvalor correspondiente que describe la contribución energética de cada componente en el movimiento (78). Las regiones de la proteína encargadas de los movimientos colectivos más significativos pueden ser identificadas a través de un análisis de componente principal. Los comandos propios de GROMACS `g_covar` y `g_aneig` fueron utilizados para realizar el análisis de componente principal.

## 6.10 Propiedades fisicoquímicas y toxicológicas

Con la finalidad de determinar las propiedades fisicoquímicas y toxicológicas de los inhibidores, estas fueron evaluadas en los servidores en línea PRE-ADMET (79), SWISS TARGET PREDICTION (80) y el software DATAWARRIOR 4.07.02 (81). Estas herramientas fueron utilizadas para predecir parámetros importantes como las propiedades “drug like” basadas en las reglas de Lipinski, regla Drug like, regla Drug DB. Así mismo, se realizó una predicción de las propiedades ADME, tales como la absorción en el intestino humano, unión a proteínas plasmáticas, penetración de la barrera hematoencefálica y la permeabilidad en piel. Adicionalmente, es posible la predicción de diferentes propiedades toxicológicas como posibles efectos mutagénicos, carcinogénicos, irritantes, efectos en la reproducción, inhibición de los CYP450 y la inhibición de hERG. Finalmente, se evaluó la probabilidad de los compuestos de unirse a otras proteínas blanco en el organismo, analizando 2547 proteínas diferentes.

## 6.11 Ensayos de actividad biológica

Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los inhibidores más potentes de la SaSDH, se llevaron a cabo ensayos de actividad biológica en una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (ATCC® BAA-1720TM, ATCC®, Manassas, VA, USA) utilizando el método de microdilución en placa (64). Una placa de agar Mueller Hinton (MH) fue inoculada con la cepa SARM (ATCC® BAA-1720TM, ATCC®, Manassas, VA, USA) e incubada por 24 horas a 37°C, se preparó un preinoculó en caldo Mueller Hinton con una turbidez de 0.5 en la escala de Mc Farland y posteriormente se realizó una dilución 1:100, a partir de la cual se inocularon con 50 µl los pocillos de una placa de ELISA de 96 pocillos los cuales contenían 50 µl de caldo Mueller Hinton con las concentraciones al doble de los compuestos a ensayar (desde 10 nM hasta 0.4 mM). Una vez inoculadas las placas de ELISA fueron incubadas a 35°C por 20 horas. La densidad óptica fue medida a 600 nm y se determinó el porcentaje de inhibición tomando como un 100% de desarrollo el control positivo que no

contenía compuesto. La CMI fue definida como la concentración mínima de compuesto a la cual se inhibió el desarrollo bacteriano.

### **6.12 Reactivos y Sustancias**

Los reactivos utilizados en el presente trabajo fueron adquiridos de la empresa SIGMA-ALDRICH ([www.sigmaaldrich.com/mexico](http://www.sigmaaldrich.com/mexico)).

Los compuestos ensayados en el presente trabajo fueron adquiridos de la empresa CHEMBRIDGE ([www.chembridge.com](http://www.chembridge.com)).

## VII. RESULTADOS

### 7.1 Selección de inhibidores potenciales

Debido a que en nuestro grupo de investigación se cuenta con un reporte previo de tres inhibidores de la SaSDH (18) (Figura 7), y con la finalidad de encontrar nuevos inhibidores conservando sus núcleos químicos, en el presente trabajo se realizó una búsqueda por similitud estructural. Para esto se utilizó una quimioteca de la empresa Chembridge la cual consta de más de 1,300,000 moléculas, las cuales se compararon estructuralmente con las estructuras de los inhibidores previamente reportados (**238**, **766** y **894**). A partir de los resultados fueron seleccionadas 50 estructuras con una similitud estructural igual o mayor al 50 % para llevar a cabo los ensayos de inhibición en la SaSDH.

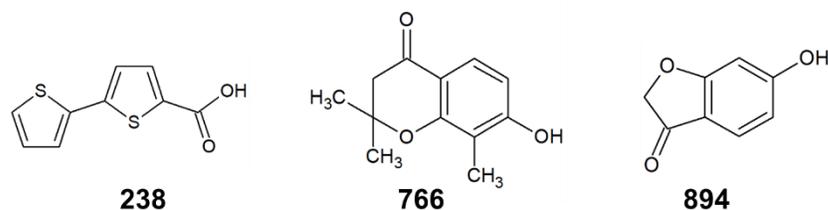


Figura 7. Inhibidores de la SaSDH (18).

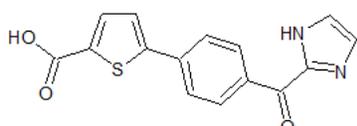
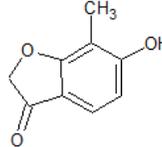
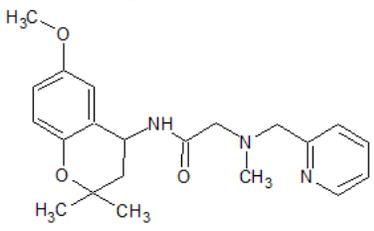
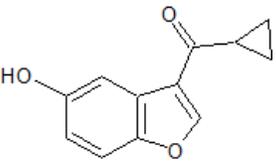
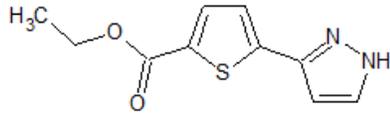
### 7.2 Purificación de la SaSDH

Toda vez que fue purificada la SaSDH, de acuerdo al protocolo descrito en materiales y métodos, partiendo de un cultivo de 500 ml se obtuvieron lotes con pureza mayor al 90% determinada mediante densitometría y 18 mg totales de SaSDH cuantificados por el método de Bradford.

### 7.3 Inhibición de la SaSDH

Se llevaron a cabo los ensayos de inhibición a una concentración de 100  $\mu$ M con las 50 moléculas seleccionadas mediante la búsqueda por similitud estructural. En la Tabla IV se muestran las cinco moléculas más potentes y su porcentaje de inhibición.

**Tabla IV. Porcentaje de inhibición de la SaSDH de los cinco compuestos más potentes seleccionados por medio de similitud estructural.**

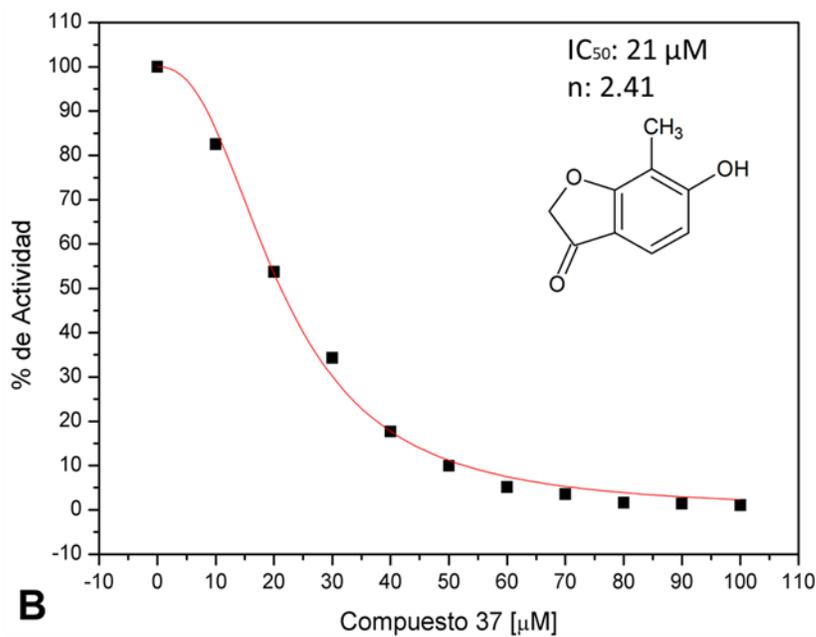
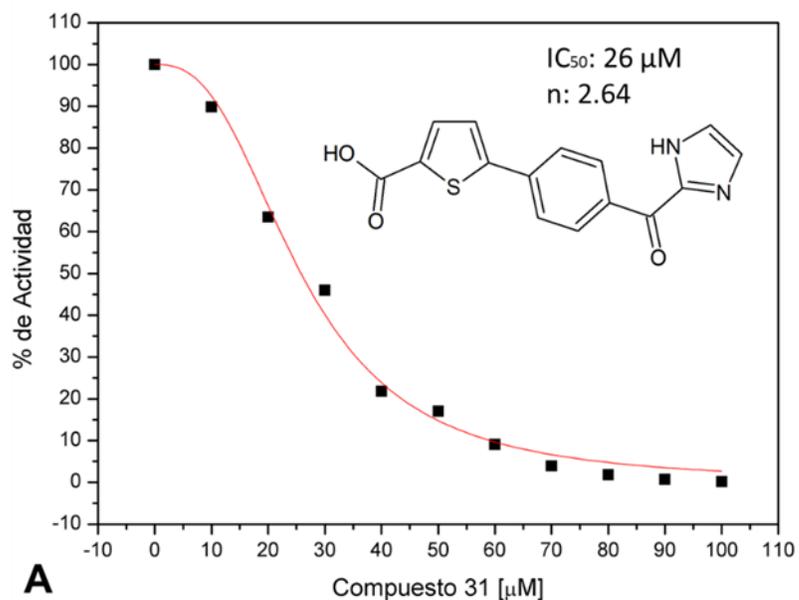
Nombre	Estructura	% de inhibición (100 $\mu$ M)
Acido 5-[4-(1H-imidazol-2-ilcarbonyl)fenil]tiofen-2-carboxilico (compuesto 31)		98
6-hidroxi-7-metil-1-benzofuran-3(2H)-ona (compuesto 37)		98
N~1~-(6-metoxi-2,2-dimetil-3,4-dihidro-2H-cromen-4-yl)-N~2~-metil-N~2~-(piridin-2-ilmetil)glicinamida (compuesto 48)		34
Ciclopropil(5-hidroxi-1-benzofuran-3-yl)metanona (compuesto 28)		32
Etil 5-(1H-pirazol-3-yl)tiofen-2-carboxilato (compuesto 34)		28

Posteriormente con la finalidad de llevar a cabo una caracterización cinética, estructural y biológica de los inhibidores con mejor capacidad de inhibición en la SaSDH, fueron seleccionados los compuestos **31** y **37** los cuales inhibieron un 98% la actividad de la enzima (Tabla IV).

#### 7.4 Determinación de la IC<sub>50</sub>

Los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos para los inhibidores **31** y **37** fueron de 26  $\mu$ M y 21  $\mu$ M respectivamente (Figura 8). Algo interesante que se observó en los gráficos fue el comportamiento sigmoideo de las curvas de inhibición, así como el valor del número de Hill (n) superior a dos para ambos compuestos, lo que sugiere

que se requiere más de una molécula de cada compuesto para inhibir a la enzima.



**Figura 8.** Gráficos para la determinación de la IC<sub>50</sub>. Compuestos (A) 31 y (B) 37. Los puntos muestran la media de los ensayos por triplicado.

## 7.5 Caracterización del mecanismo de inhibición

Durante el proceso de caracterización de un inhibidor, una parte importante es conocer su mecanismo de inhibición; por tanto; en el presente trabajo se determinó el mecanismo de inhibición de los compuestos **31** y **37** a partir de graficar las velocidades iniciales de la SaSDH obtenidas a diferentes concentraciones tanto de sustrato (shikimato y NADP<sup>+</sup>) como de inhibidor. Los datos fueron ajustados al modelo de Lineweaver-Burk ( $1/v$  vs  $1/[S]$ ). Los gráficos de Lineweaver-Burk (82) para las reacciones de inhibición mostraron que el compuesto **31** exhibe las características de un inhibidor acompetitivo con respecto a shikimato (Figura 9A y 9D) y una inhibición de tipo mixta con respecto a NADP<sup>+</sup> (Figura 10A y D). Por otro lado, el compuesto **37** mostró características de un inhibidor de tipo mixto con respecto a shikimato y NADP<sup>+</sup> (Figuras 11A, 11D, 12A y 12D).

Posteriormente, se determinaron las constantes de inhibición al ajustar los datos a las ecuaciones 3, 4 y 5 (ver materiales y métodos). Los resultados indicaron que el inhibidor **31** mostró una  $K_i$  (constante de disociación enzima-inhibidor) de  $83 \pm 11.6 \mu\text{M}$  para shikimato y una  $K_i$  de  $212.9 \pm 15 \mu\text{M}$  para NADP<sup>+</sup>, lo que sugiere que el inhibidor **31** tiene más alta afinidad por el sitio de unión a shikimato que por el sitio de unión a NADP<sup>+</sup>. Además, el valor de  $\alpha$  de 0.45 sugiere que el inhibidor **31** prefiere unirse al complejo ES que a la enzima libre (Figura 9D).

En lo que respecta al inhibidor **37**, éste mostró valores de  $K_i$  de  $8.3 \pm 1.8 \mu\text{M}$  para shikimato y de  $10.3 \pm 2.8 \mu\text{M}$  para NADP<sup>+</sup>, que sugiere una afinidad similar para ambos sitios de unión. El valor de  $\alpha$  de 0.89 sugiere que el compuesto **37** reconoce casi con la misma afinidad a la enzima libre como al complejo ES. El valor de  $\beta$  fue casi el mismo para ambos sustratos indicando que la formación de producto del complejo ESI es un 59 y 52% para shikimato y NADP<sup>+</sup>, respectivamente más baja comparada con la formación de producto en ausencia del inhibidor (Tabla V).

No obstante que los gráficos de Lineweaver-Burk nos permitieron determinar el tipo de inhibición ejercido por el compuesto sobre la SaSDH, este tipo de gráfico no permite conocer si la inhibición es completa o parcial.

Por esta razón, y para tener una caracterización más completa del mecanismo de inhibición de los compuestos **31** y **37**, a partir de los datos obtenidos de los dobles recíprocos se realizaron los gráficos secundarios de pendiente vs [Inhibidor] a partir de los gráficos de los dobles recíprocos. El comportamiento lineal de los gráficos con respecto al inhibidor **31** indicó que se trata de una inhibición de tipo completa con respecto a shikimato y NADP<sup>+</sup> (Figura 9B y 10B). De modo similar los gráficos de  $1/\Delta$  intercepto o  $1/\Delta$  pendiente vs  $1/[\text{Inhibidor}]$ , que interceptan en las abscisas en cero (Figura 9C y 10C), corroboran el resultado, lo que significa que el complejo ESI no es productivo. Por lo tanto, el compuesto **31** muestra las características de un inhibidor acompetitivo completo con respecto a shikimato y un inhibidor mixto completo con respecto a NADP<sup>+</sup>. En lo que respecta al compuesto **37**, el comportamiento hiperbólico del gráfico pendiente vs [Inhibidor], así como los regráficos  $1/\Delta$  intercepto o  $1/\Delta$  pendiente vs  $1/[\text{Inhibidor}]$ , que interceptan en las abscisas en el segundo cuadrante (Figura 11C y 12C), indican que se trata de una inhibición parcial (83); esto sugiere que el compuesto **37** presenta una inhibición mixta parcial con respecto a ambos sustratos.

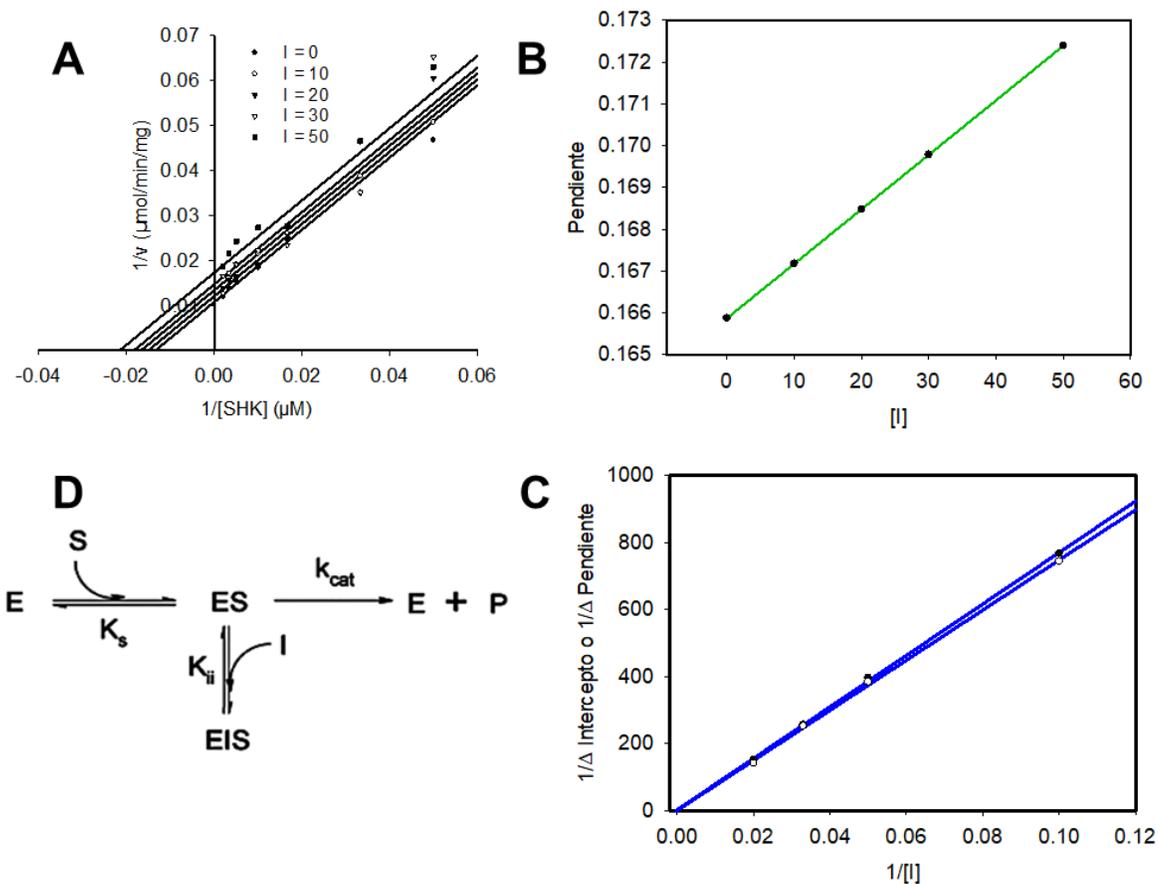


Figura 9. Mecanismo de inhibición del compuesto 31 para shikimato. (A) Gráfico de Lineweaver-Burk; (B) Regráfico Pendiente vs Inhibidor; (C) Regráfico  $1/\Delta$  intercepto o  $1/\Delta$  pendiente vs  $1/\text{Inhibidor}$ ; (D) Modelo cinético de un inhibidor acompetitivo completo. Los puntos muestran la media de los ensayos por cuadruplicado.

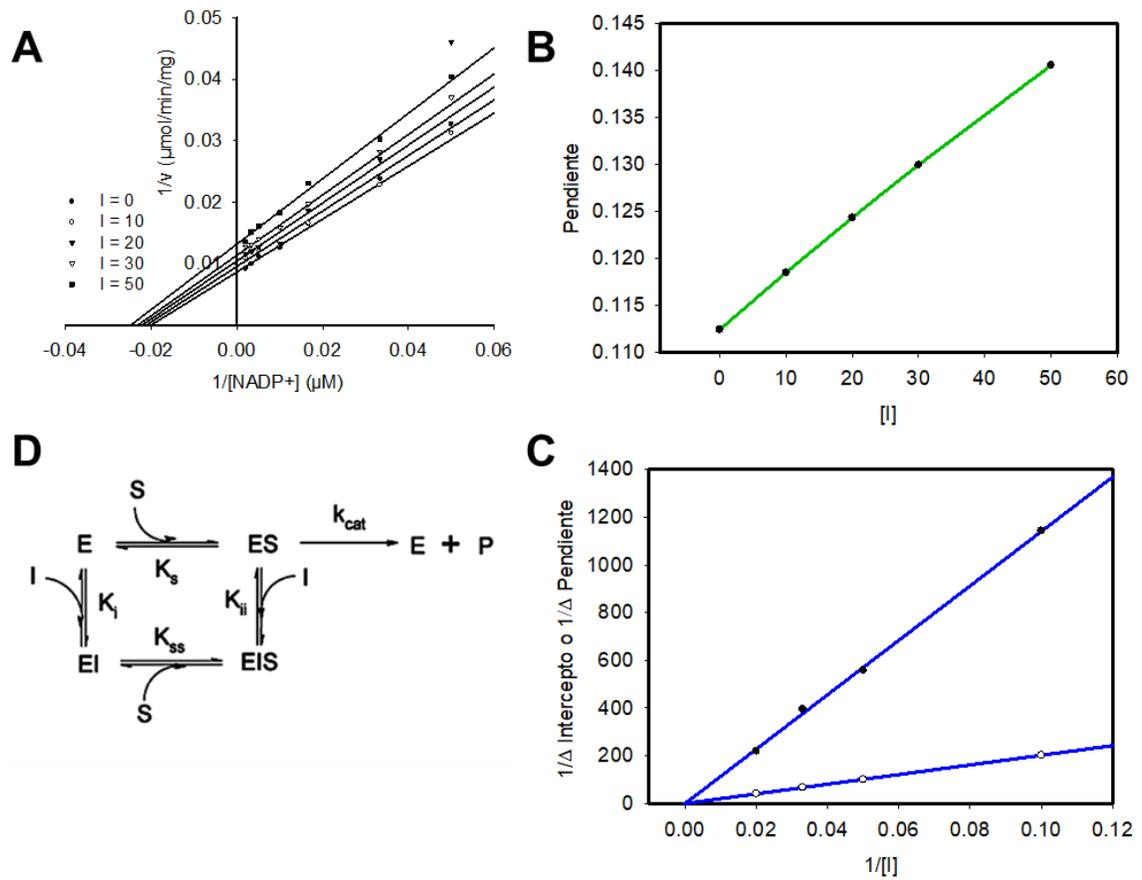


Figura 10. Mecanismo de inhibición del compuesto 31 para  $\text{NADP}^+$ . (A) Gráfico de Lineweaver-Burk; (B) Re gráfico Pendiente vs Inhibidor; (C) Re gráfico  $1/\Delta$  intercepto o  $1/\Delta$  pendiente vs  $1/\text{Inhibidor}$ ; (D) Modelo cinético de un inhibidor mixto completo. Los puntos muestran la media de los ensayos por cuadruplicado.

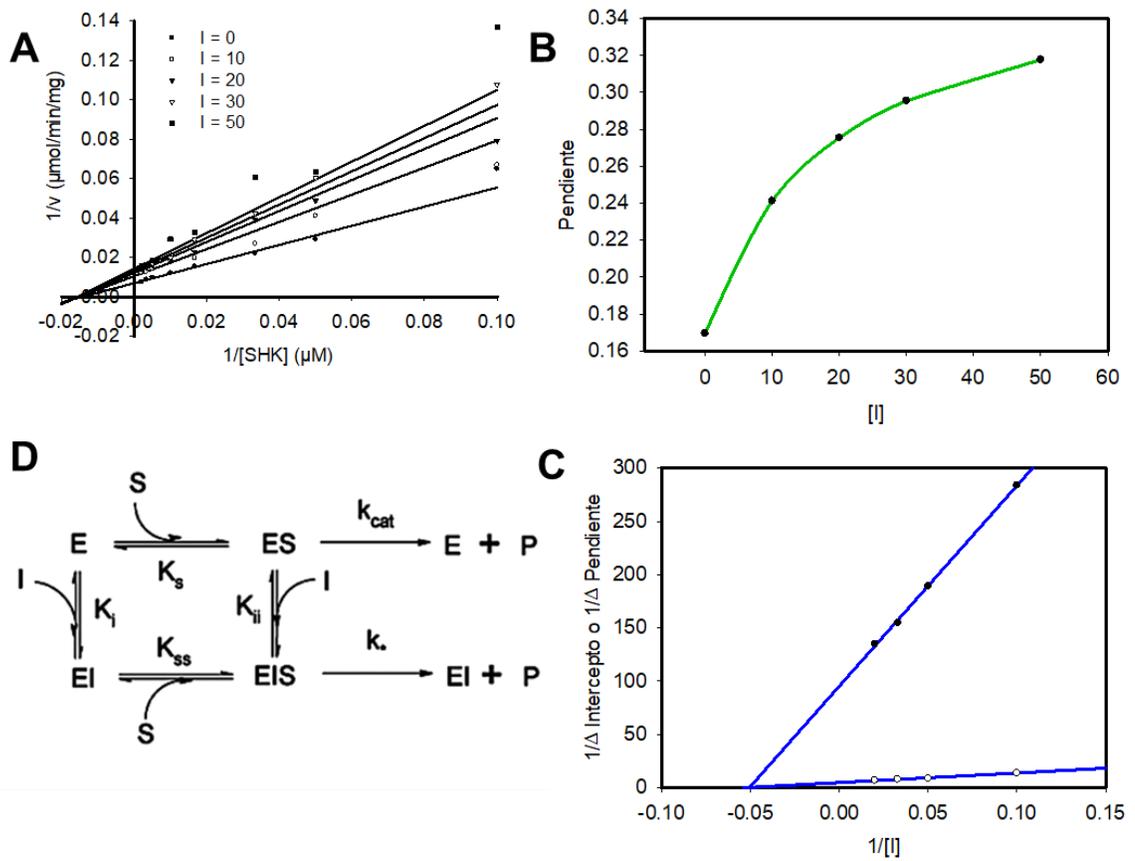


Figura 11. Mecanismo de inhibición del compuesto 37 para shikimato. (A) Gráfico de Lineweaver-Burk; (B) Regráfico Pendiente vs Inhibidor; (C) Regráfico  $1/\Delta$  intercepto o  $1/\Delta$  pendiente vs  $1/\text{Inhibidor}$ ; (D) Modelo cinético de un inhibidor mixto parcial. Los puntos muestran la media de los ensayos por cuadruplicado.

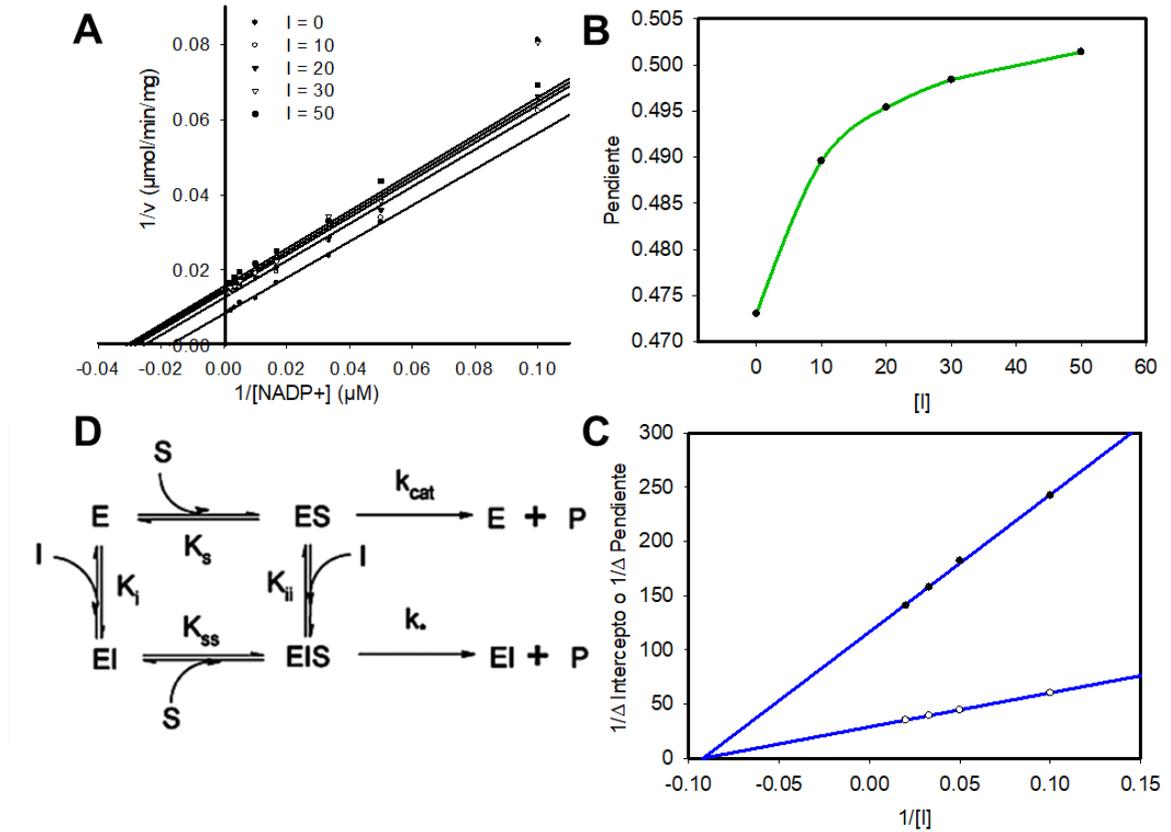


Figura 12. Mecanismo de inhibición del compuesto 37 para NADP<sup>+</sup>. (A) Gráfico de Lineweaver Burk; (B) Re gráfico Pendiente vs Inhibidor; (C) Re gráfico 1/Δ intercepto o 1/Δ pendiente vs 1/ nhibidor; (D) Modelo cinético de un inhibidor mixto parcial. Los puntos muestran la media de los ensayos por cuadruplicado.

**Tabla V. Constantes cinéticas y mecanismos de inhibición**

Inhibidor	<i>K<sub>i</sub></i> (μM)		Valor de $\alpha$		Valor de $\beta$		Tipo de Inhibición	
	Shikimato	NADP <sup>+</sup>	Shikimato	NADP <sup>+</sup>	Shikimato	NADP <sup>+</sup>	Shikimato	NADP <sup>+</sup>
<b>31</b>	83.1 ± 11.63	212.9 ± 15.06	NA	0.45 ± 0.36	NA	NA	Acompetitivo Completo	Mixto Completo
<b>37</b>	8.3 ± 1.8	10.3 ± 2.8	0.89 ± 0.14	0.51 ± 0.007	0.41 ± 0.003	0.48 ± 0.002	Mixto Parcial	Mixto Parcial

(NA) no aplicable

## 7.6 Acoplamiento Molecular

Con la finalidad de obtener información estructural de las interacciones SaSDH-inhibidor, se realizó un acoplamiento molecular entre la SaSDH y los inhibidores **31** y **37**. Los resultados mostraron que el compuesto **31** formó interacciones de tipo puente de hidrógeno entre los residuos His12 y el grupo imidazol, otra interacción se dio entre el residuo Leu14 y el grupo carbonilo de la cetona y finalmente, el residuo Lys64 interaccionó con el grupo carboxilo de la molécula (Figura 13).

Por otro lado, el compuesto **37** formó solo dos interacciones de tipo puente de hidrógeno, una con el residuo Ser13 y el grupo carbonilo de la furanona; la otra interacción se formó entre el residuo Asp100 y el grupo hidroxilo fenólico de la molécula (Figura 14). Es importante destacar las interacciones formadas con los residuos Lys64 y Asp100 ya que estos residuos llevan a cabo el intercambio del electrón en la catálisis de la enzima (14, 47).

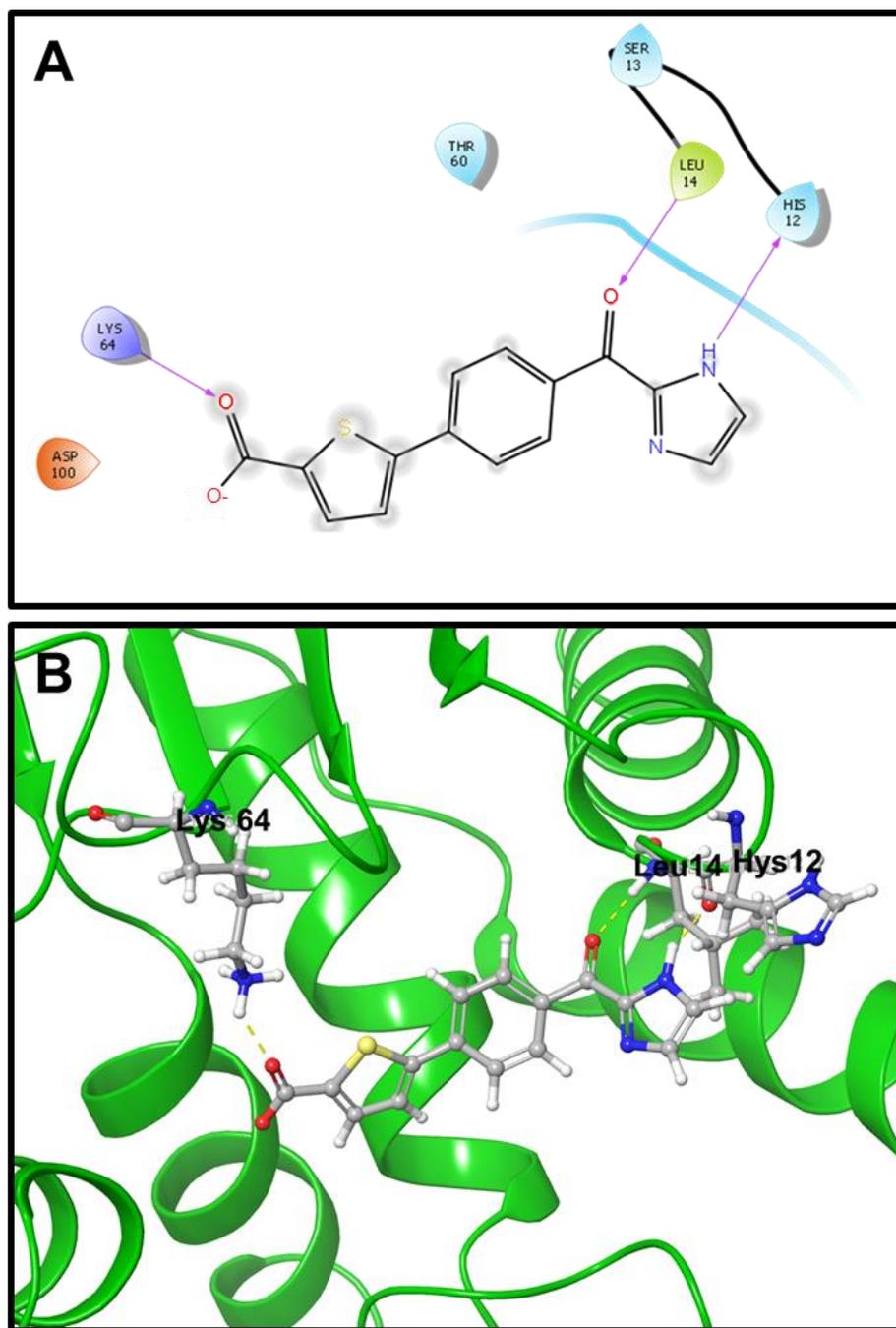


Figura 13. Unión del compuesto 31 en la SaSDH. (A) Mapa en 2D de interacciones SaSDH-31, indicando los enlaces tipo puente de hidrógeno con flechas moradas; (B) Mapa en 3D de interacciones SaSDH-31, indicando los enlaces tipo puente de hidrógeno con líneas punteadas amarillas.

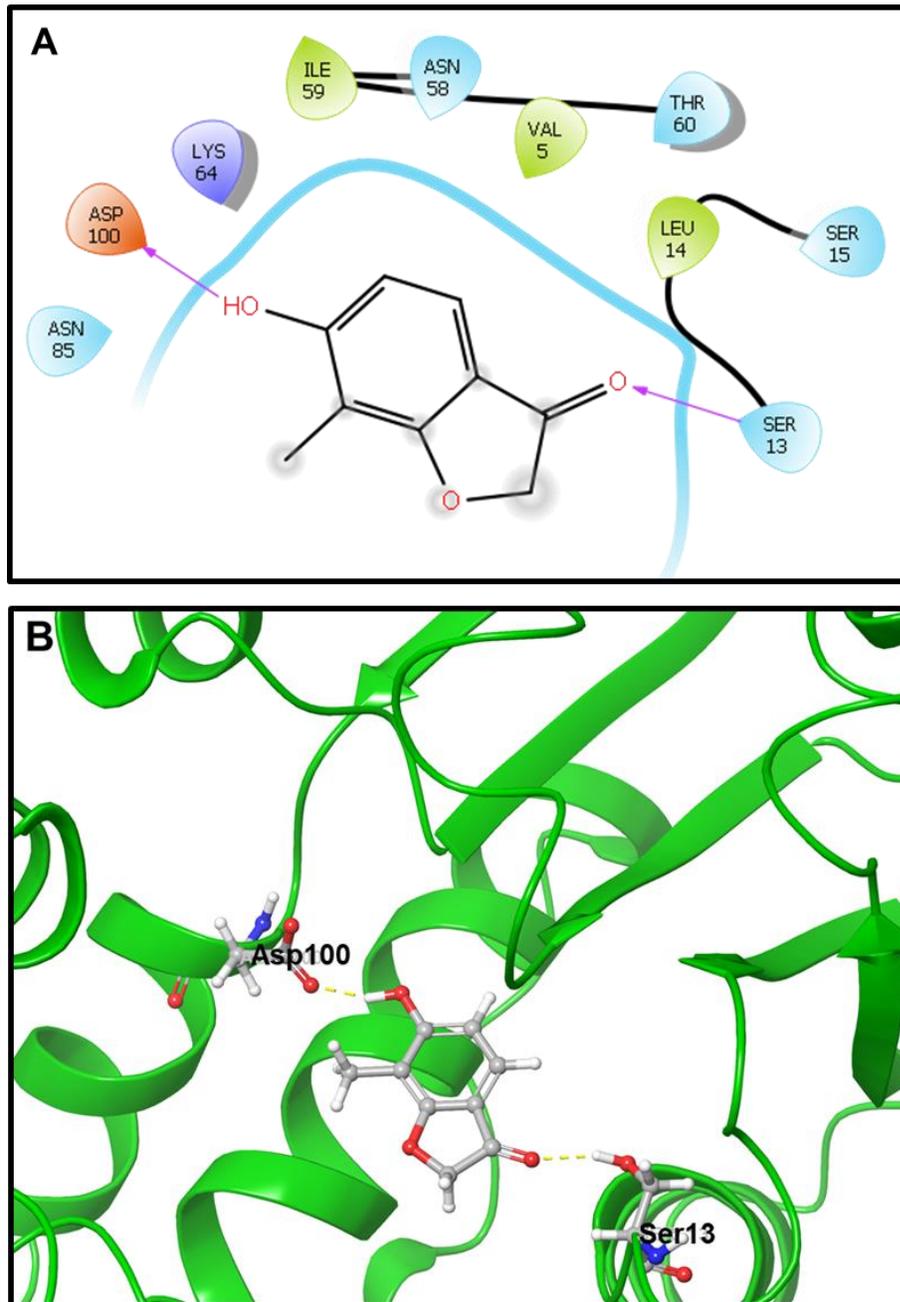


Figura 14. Unión del compuesto 37 en la SaSDH. (A) Mapa en 2D de interacciones SaSDH-37, indicando los enlaces tipo puente de hidrógeno con flechas moradas; (B) Mapa en 3D de interacciones SaSDH-37, indicando los enlaces tipo puente de hidrógeno con líneas punteadas amarillas.

## 7.7 Simulaciones de dinámica molecular

Para continuar con la caracterización estructural de los complejos enzima-inhibidor se realizaron estudios de dinámica molecular con un tiempo de duración de 50 ns. Primero se determinó la desviación media cuadrática (RMSD), este parámetro es crucial para analizar la estabilidad de las trayectorias moleculares, así los valores de RMSD se graficaron en función del tiempo (Figura 15). Los resultados indicaron que el complejo SaSDH-31 fue más estable a partir de los 10 ns hasta el final de las simulaciones, y mostró menos dispersión en su valor de RMSD ( $1.2 \pm 0.4$  nm). En el caso del complejo SaSDH-37 éste mostró mayor dispersión en su valor de RMSD ( $2.7 \pm 0.6$  nm) con menor estabilidad en los primeros 25 ns, después de este tiempo se estabilizó el complejo (Figura 15). Así mismo, también se observó que la estabilidad a través del tiempo fue dada por interacciones de tipo puente de hidrógeno, en el caso del complejo SaSDH-31 éste se estabilizó por la formación de puentes de hidrógeno con los residuos Ala128 y Arg149 (Figura 16A) y complejo SaSDH-37 se estabilizó al formar interacciones de tipo puente de hidrógeno con los residuos Lys64 e Ile209 (Figura 16B).

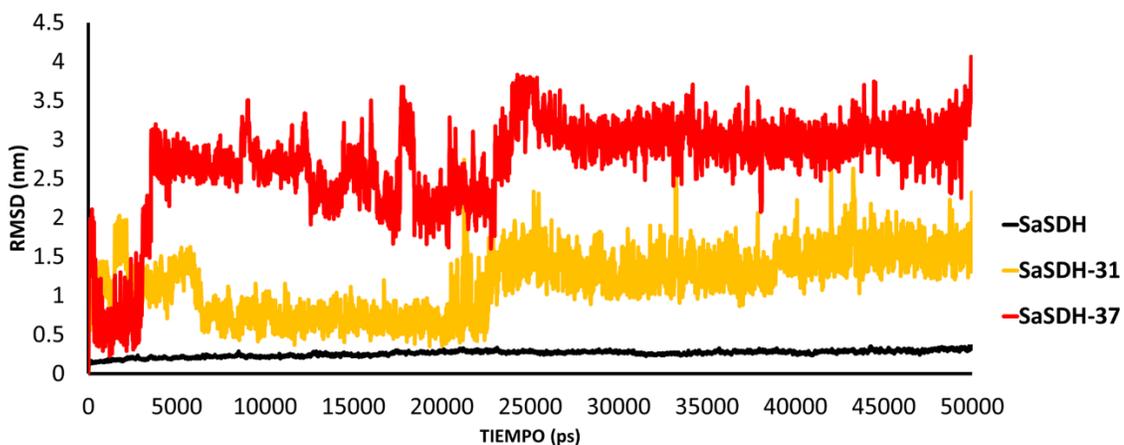
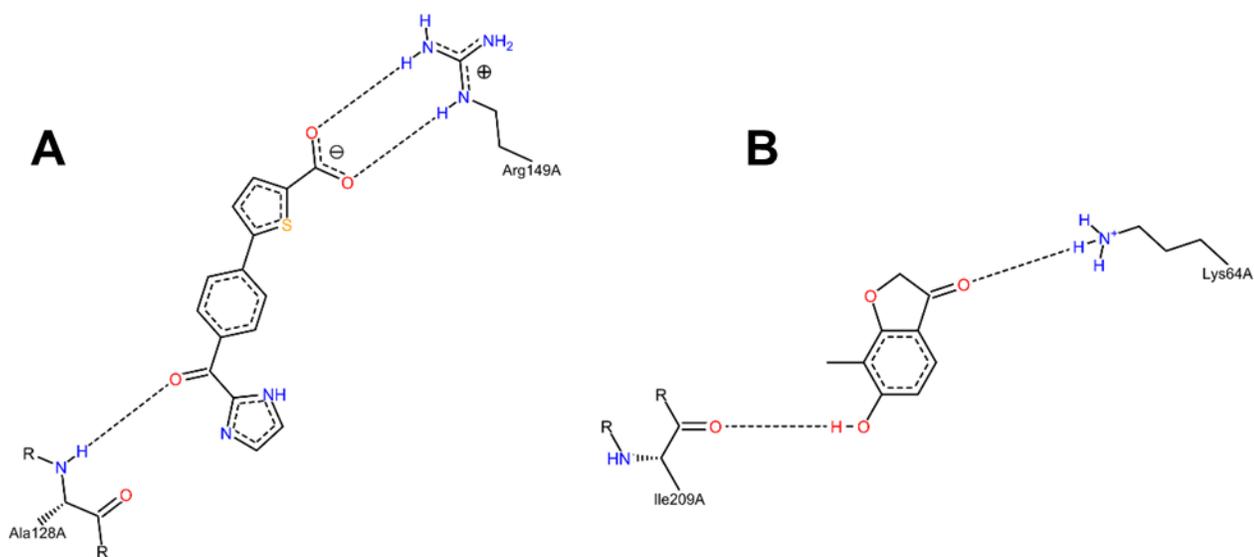
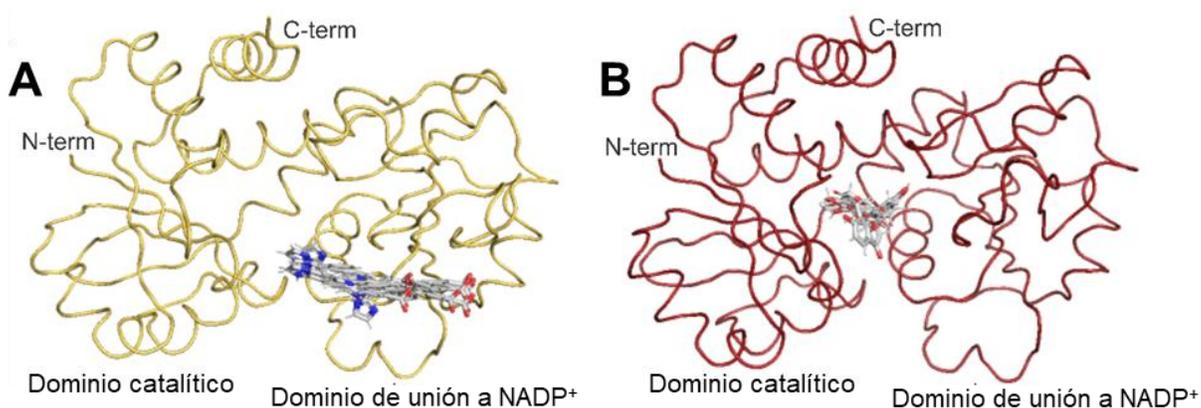


Figura 15. Desviación media cuadrática (RMSD) de los complejos enzima-inhibidor.



**Figura 16. Interacciones de los complejos SaSDH-inhibidor. (A) SaSDH-31 y (B) SaSDH-37.**

Es interesante resaltar que cada inhibidor tuvo un comportamiento diferente, es decir, al comienzo de la simulación los inhibidores se situaron en medio del sitio de unión a shikimato y del sitio de unión a NADP<sup>+</sup>, conforme avanzó la simulación, el inhibidor **31** se ancló cerca del sitio de unión a NADP<sup>+</sup> (Figura 17A); mientras que el inhibidor **37** se mantuvo unido en la interface entre el sitio de unión a shikimato y el sitio de unión a NADP<sup>+</sup> (Figura 17B).



**Figura 17. Análisis de clúster del desplazamiento de los inhibidores a lo largo de la simulación de dinámica molecular. (A) SaSDH-31 y (B) SaSDH-37.**

Para continuar con el análisis estructural, las fluctuaciones medias cuadráticas (RMSF) de los átomos del C $\alpha$  fueron determinadas, este parámetro es útil para entender cómo la unión de estos dos compuestos provoca cambios en la flexibilidad de los dominios de la SaSDH. Los resultados mostraron que la unión de los inhibidores causó una disminución en la flexibilidad de los dominios donde se une el shikimato (Val5, Ser13, Ser15, Asn58, Ile59, Thr60, Lys64, Asn85, Asp100, Phe236 y Gln239) y el NADP<sup>+</sup> (Lys64, Glu65, Ala83, Ala125, Gly126, Gly127, Ala128, Ser129, Lys130, Ile132, Asn148, Arg149, Arg153, Leu166, Thr183, Pro184, Met187, Ile194, Ile209, y Met235); el inhibidor 31 mostró mayor efecto sobre el dominio de unión a NADP<sup>+</sup> (Figura 18).

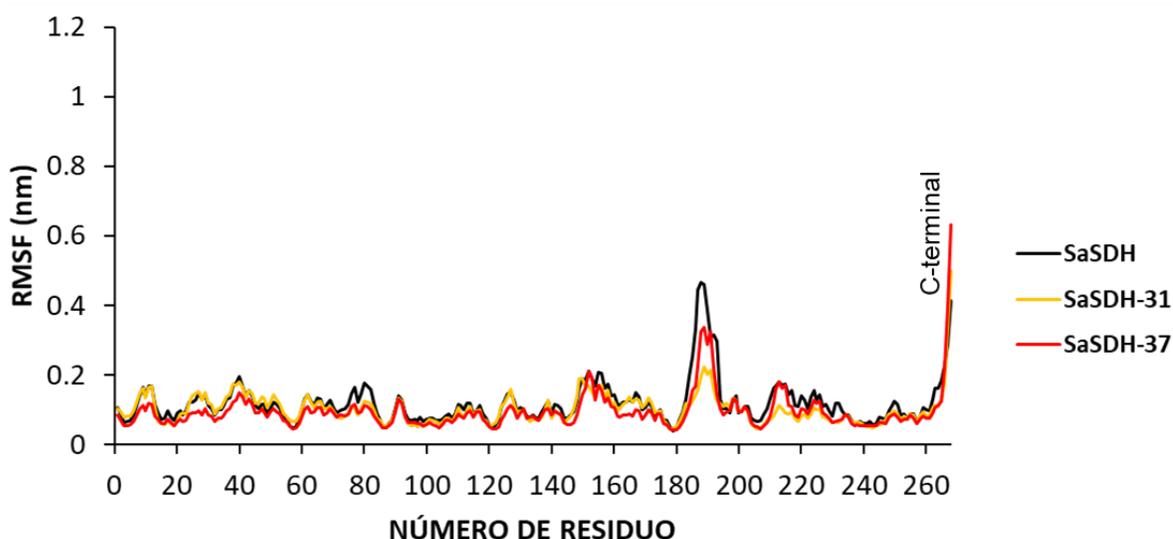


Figura 18. Fluctuaciones medias cuadráticas de los átomos de los C $\alpha$  con respecto a su posición en el tiempo.

## 7.8 Análisis de componentes principales

Con la finalidad de explorar los modos colectivos de movimiento más significativos de la SaSDH, en complejo y libre, a lo largo de las simulaciones se realizó un análisis de componentes principales (PCA). El PCA mostró mayores fluctuaciones en los sistemas correspondientes a los complejos SaSDH-inhibidor, y se observó un incremento en la amplitud del eigenvector 1 de los complejos SaSDH-inhibidor al graficar el eigenvector 2 vs eigenvector 1 (Figura 19A). Estas

diferencias fueron más claras al comparar el movimiento descrito por el eigenvector 1 de las simulaciones de dinámica molecular de cada complejo. El bucle formado por los residuos Pro184, Ala185, Gly186, Met187, Ala188, Gly189, Asn190, Asn191, Glu192, Ser193 e Ile194, es considerado como una región altamente flexible (14, 24), mostró mayor movimiento en el caso del complejo SaSDH-37 (círculo punteado). Adicionalmente, en este complejo el dominio catalítico se mantuvo rígido y el dominio de unión a NADP<sup>+</sup> mostró mayor desplazamiento (Figura 20C). Mientras tanto, el complejo SaSDH-31 no solo presentó mayor movimiento en el dominio catalítico, sino también provocó un desplazamiento general en la estructura (Figura 19B). Por lo tanto, estas perturbaciones podrían explicar estructuralmente el efecto inhibitorio de estas moléculas.

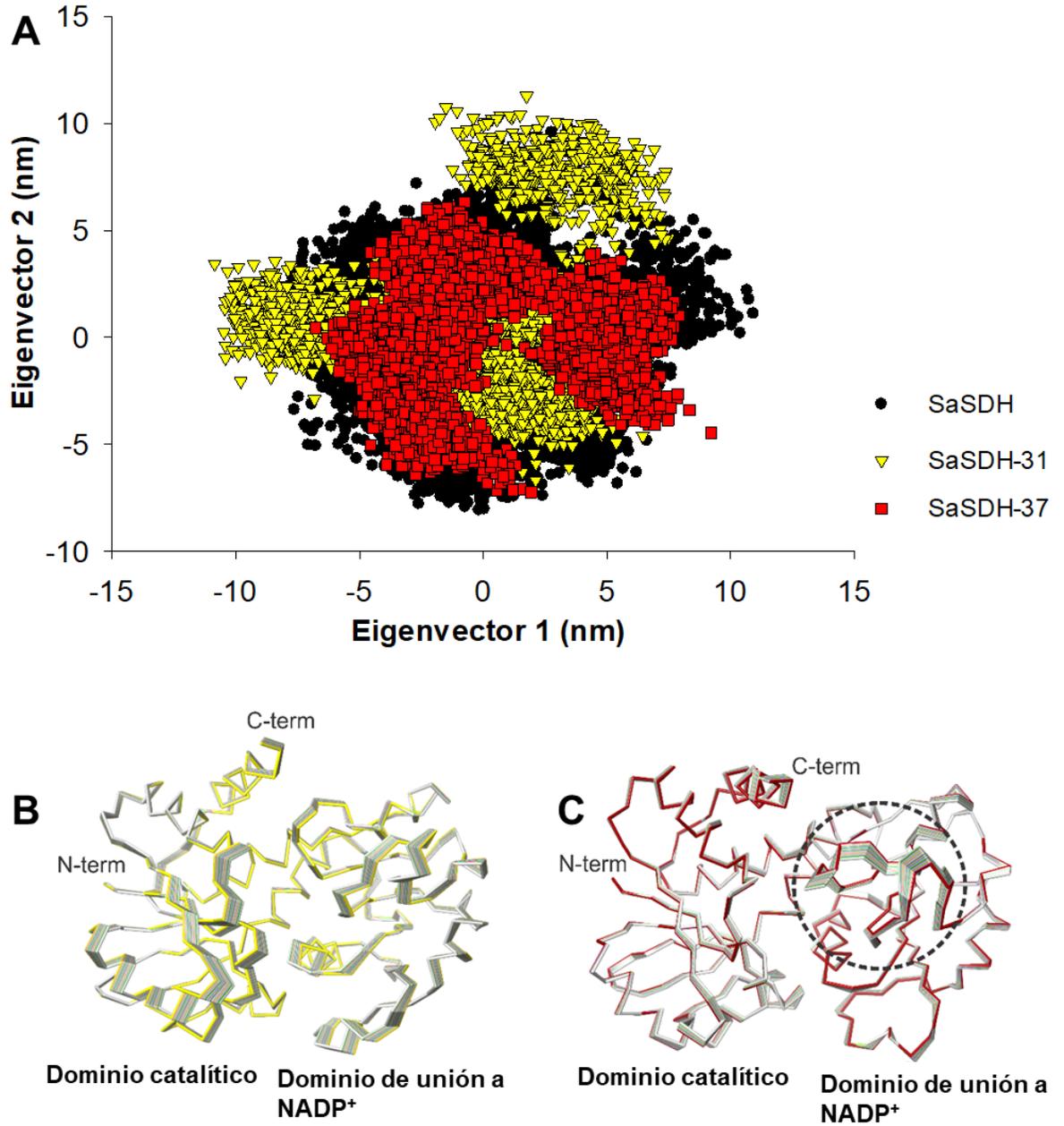


Figura 19. A) Comparación de los movimientos esenciales de los dos primeros eigenectores obtenidos a partir de una proyección en 2D de la apo-SaSDH y los complejos SaSDH-inhibidor; Ensemble conformacional del análisis de componentes principales. B) SaSDH-31 y C) SaSDH-37.

## 7.9 Propiedades fisicoquímicas y toxicológicas

Después de la caracterización cinética y estructural, un punto importante a conocer de estos inhibidores son sus propiedades fisicoquímicas y toxicológicas. Para este fin, los dos compuestos fueron analizados utilizando el software DATAWARRIOR 4.07.02 y los servidores en línea PRE-ADMET (Tabla VI) y SWISS TARGET PREDICTION. Con respecto a los parámetros toxicológicos ninguno presentó potencial toxicológico. En cuanto a las propiedades ADME el inhibidor **37** presentó una fuerte unión a proteínas plasmáticas y en cuanto a las propiedades “Drug- like” cumplen con las características para ser considerados como potenciales fármacos. Incluso con algunas propiedades mejorables estas estructuras demuestran potencial para ser candidatos para seguirse estudiando y desarrollar un nuevo fármaco.

**Tabla VI. Propiedades fisicoquímicas y toxicológicas**

<b>Parámetros</b>	<b>31</b>	<b>37</b>
<b>Toxicológicos</b>		
Irritante*	no	no
Efectos en la reproducción*	no	no
Carcinogénico*	no	no
Mutagénico*	no	no
Inhibición de hERG°	Riesgo Bajo	Riesgo Medio
Inhibición de CYP450°	2C9 y 3A4	2C9
<b>ADME</b>		
Penetración de la barrera hematoencefálica	Baja Absorción	Baja Absorción
Absorción en el intestino humano	Buena Absorción	Buena Absorción
Unión a proteínas plasmáticas	Unión Débil	Unión Fuerte
Permeabilidad Caco2°	Permeabilidad Media	Permeabilidad Media
<b>Drug-like</b>		
Druglikeness Score*	-0.24	3.39
Regla CMC like°	Cumple	Cumple
Regla Lead like°	Cumple	Cumple
Regla de 5 (Lipinski)°	Cumple	Cumple
Regla WDI like°	Cumple	Cumple

(\*) Determinado por DATAWARRIOR v4.07.02

(°) Determinado por PRE-ADMET

Otro aspecto que se evaluó fue la potencial actividad de estas moléculas con respecto a otras proteínas blanco utilizando el servidor SWISS TARGET PREDICTION. Los resultados mostraron que de las 2547 proteínas analizadas, el compuesto **31** presentó probabilidad de actuar sobre la proteína tau asociada a microtúbulos y sobre la sulfidril oxidasa ALR unida a FAD; mientras que para el compuesto **37** la proteína tau asociada a microtúbulos y el receptor de androgénico fueron las proteínas que podrían servir como blanco. La probabilidad de estas potenciales actividades tuvo rangos del 21 al 55%. Sin embargo, aun con la presencia de algunas características negativas todas estas pueden ser mejoradas al seguir estudiando y modificando éstas estructuras para hacerlas menos tóxicas y más potentes.

## 7.10 Actividad Biológica

Finalmente se realizaron ensayos de actividad biológica mediante el método de microdilución en caldo Mueller Hinton. Sin embargo, debido a problemas de solubilidad de los compuestos no fue posible observar una inhibición en el desarrollo bacteriano; se observó precipitación de los compuestos a las concentraciones más altas (hasta 0.4mM) ensayadas y a concentraciones bajas (hasta 10 nM), por lo que **31** y **37** no mostraron el efecto inhibitorio deseado.

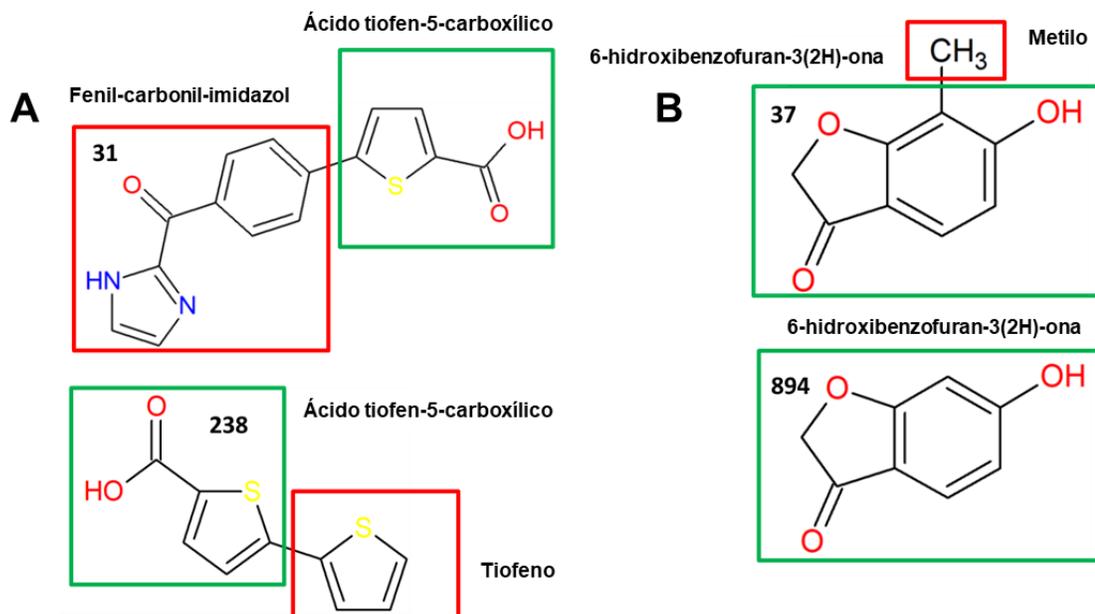
Finalmente se llevaron a cabo ensayos para conocer el efecto de los compuestos **31** y **37** sobre el desarrollo de SARM ATCC® BAA-1720TM, ATCC®, Manassas, VA, USA, mediante el método de microdilución en caldo Mueller Hinton en microplaca. Los compuestos fueron probados a diferentes concentraciones desde 10 nM hasta 4 mM no mostrando un efecto inhibitorio deseado sobre el desarrollo de SARM. El problema principal por el cual no se pudo seguir modificando las condiciones de los ensayos tuvo que ver con la solubilidad de los compuestos, a mayor concentración estos mostraban precipitación y al aumentar el porcentaje de solvente se observaba un efecto inhibitorio en el desarrollo causado por la concentración de DMSO, imposibilitando el aumentar la concentración de solvente para evitar la precipitación de los compuestos a concentraciones superiores a 0.4 mM.

## VIII. DISCUSION

A pesar de que en los últimos años han surgido nuevos antibióticos (Linezolid, Daptomicina, etc.) para el tratamiento de infecciones por SARM, no se ha logrado controlar su incidencia debido a su gran capacidad de crear resistencia a los tratamientos. Es por esto, que es necesario el desarrollo de nuevos fármacos antibacterianos para el tratamiento de infecciones causadas por SARM.

En el presente trabajo se seleccionaron 50 compuestos con un 50% o más de similitud estructural a los inhibidores de la SaSDH ya reportados, una vez realizados los ensayos de inhibición, los compuestos **31** y **37** demostraron capacidad de inhibir en un 98% la actividad de la SaSDH cuando se ensayaron a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  (Tabla IV), presentando una inhibición en el mismo orden de magnitud que otros inhibidores reportados para la SDH de diferentes bacterias (11, 13, 18).

En lo que respecta a las características estructurales de los compuestos **31** y **37**, éstos comparten ciertos grupos químicos con los inhibidores antes reportados (18); en el caso del inhibidor **31**, éste comparte el grupo ácido tiofen-5-carboxílico con el inhibidor **238** (Figura 20A). Por otro lado, el compuesto **37** comparte el núcleo de 6-hidroxi-benzofuran-3(2H)-ona con el inhibidor **894**, la única diferencia es el metilo en posición 7 en el compuesto **37** (Figura 20B).



**Figura 20. Comparación de similitud estructural. (A) 31 vs 238 y (B) 37 vs 894.**

En relación a la caracterización cinética de los inhibidores, los valores de  $IC_{50}$  obtenidos para ambos compuestos (**31** y **37**) estuvieron dentro del rango de los inhibidores reportados para SDH de diferentes bacterias (11, 13, 18). En comparación con las estructuras base los compuestos **31** y **37** mostraron valores de  $IC_{50}$  menores (26  $\mu$ M y 21  $\mu$ M, respectivamente) que los inhibidores **238** y **894** (80  $\mu$ M y 53  $\mu$ M, respectivamente). Con respecto a los mecanismos de inhibición se observó que a pesar de la similitud estructural con los inhibidores previamente reportados (18), los inhibidores **31** y **37** presentaron mecanismos de inhibición diferentes; el compuesto **31** mostró características de un inhibidor acompetitivo completo con respecto a shikimato y mixto completo con respecto a  $NADP^+$ . En el caso del compuesto **37**, éste demostró características de inhibidor mixto parcial para ambos shikimato y  $NADP^+$ , lo que significa que el complejo enzima-inhibidor-sustrato (EIS) es catalítico en menor medida, comparado en el complejo enzima-sustrato (ES) en ausencia del inhibidor (I). Por otra parte, el inhibidor **238** mostró características de un inhibidor de tipo competitivo con respecto a shikimato y un mecanismo de inhibición acompetitivo con respecto a  $NADP^+$ . En el caso del inhibidor **894** éste mostró un mecanismo de inhibición de tipo mixto con respecto a shikimato y  $NADP^+$ . Los compuestos **37** y **894** presentaron un

mecanismo de inhibición mixto para ambos sustratos, lo cual puede explicarse por el alto grado de similitud estructural que comparten; así mismo por las interacciones con la SaSDH observadas en los acoplamientos moleculares para ambos inhibidores siendo de tipo puente de hidrogeno con los residuos Ser13 y Asp100 (Figura 15) en ambos casos. En el caso del par de compuestos **31** y **238**, no comparte una similitud estructural tan alta. Por otro lado, la diferencia en los sustituyentes y las diferentes interacciones mostradas en los acoplamientos moleculares, solo comparten la interacción con el residuo Lys64 (Figura 14). Esto podría explicar la diferencia entre mecanismos de inhibición. El compuesto **37** mostró una  $K_i$  de 8.3  $\mu\text{M}$  con respecto a shikimato y de 10.3  $\mu\text{M}$  con respecto a  $\text{NADP}^+$ , mientras que el compuesto **31** mostró valores de  $K_i$  de 83.1  $\mu\text{M}$  con respecto a shikimato y de 212.9  $\mu\text{M}$  con respecto a  $\text{NADP}^+$ . Estos resultados demuestran que el compuesto **37** es el más potente con respecto a shikimato que los otros inhibidores de la SaSDH (**238**  $K_i$  shikimato: 9.53  $\mu\text{M}$ ; **766**  $K_i$  shikimato: 19.76  $\mu\text{M}$ ; **894**  $K_i$  shikimato: 58.3  $\mu\text{M}$ ) (18); y en el caso del compuesto **31**, éste mostró un valor de  $K_i$  hasta 40 veces mayor con respecto a  $\text{NADP}^+$  comparado a los otros inhibidores de la SaSDH (**238**  $K_i$   $\text{NADP}^+$ : 48.3  $\mu\text{M}$ ; **766**  $K_i$   $\text{NADP}^+$ : 11.35  $\mu\text{M}$ ; **894**  $K_i$   $\text{NADP}^+$ : 5.2  $\mu\text{M}$ ) (18). Esta menor afinidad se debe posiblemente a la diferencia en las interacciones y en el número de las mismas, ya que solo comparten la interacción con el residuo Lys64 observada únicamente en el inhibidor **238**; sin embargo, esta interacción se da a diferente nivel estructural, en el caso del compuesto **31**, interaccionó con el residuo Lys64 al aceptar la formación de un puente de hidrógeno con su grupo ácido carboxílico, mientras que en el caso del inhibidor **238** y el residuo Lys64 es de tipo catión- $\pi$  a nivel del grupo tiofeno.

Algo importante de mencionar es que en el caso de *Helicobacter pylori* se reportaron compuestos con un mecanismo de inhibición competitivo o acompetitivo, sin especificar si se trata de una inhibición completa o parcial; sin embargo, los valores reportados de  $K_i$  (5.9  $\mu\text{M}$ , 3.9  $\mu\text{M}$ , 1.8  $\mu\text{M}$ , 18.2  $\mu\text{M}$  y 15.4  $\mu\text{M}$ ) se encuentran en el mismo orden que los aquí descritos (11). Para

*Pseudomonas putida* no se reportan los mecanismos de inhibición ni valores de constantes de inhibición (13).

Las simulaciones de dinámica molecular mostraron cómo se afecta la estabilidad de la SaSDH al formarse el complejo SaSDH-inhibidor, siendo el compuesto **31** el que forma un complejo más estable. Los *clusters* de las poses más representativas a lo largo de las simulaciones mostraron que el compuesto **31** se mantuvo unido cerca del sitio de unión a NADP<sup>+</sup>, la unión en este

sitio tiene concordancia con el mecanismo de inhibición mostrado por este compuesto; al no acercarse al sitio de unión a shikimate, este no es capaz de competir con el sustrato por unirse al sitio activo demostrando su carácter acompetitivo completo con respecto a shikimate, mientras que al unirse cerca del sitio de unión a NADP<sup>+</sup> permite la unión del cofactor demostrando su carácter mixto con respecto a NADP<sup>+</sup>, mientras que el compuesto **37** se mantuvo unido en la interface entre el dominio de unión a shikimate y el dominio de unión a NADP<sup>+</sup>, lo que se puede relacionar con su mecanismo de inhibición mixto parcial permitiendo la unión del sustrato y cofactor en sus sitios y permitiendo la formación de producto a una menor velocidad.

Finalmente, se llevaron a cabo ensayos de actividad biológica en los cuales debido a problemas de la solubilidad de los compuestos y a las condiciones de ensayo no fue posible observar una inhibición significativa debido a que al aumentar la concentración de los compuestos estos se precipitaban.

Por lo tanto, estos dos nuevos compuestos aumentan el número de inhibidores existentes para la SaSDH y en especial el compuesto **37** demostró ser más potente que los inhibidores previamente reportados por nuestro grupo (18). Sus características estructurales y propiedades fisicoquímicas y toxicológicas los convierten en candidatos atractivos para continuar con su estudio y desarrollar un nuevo fármaco para el tratamiento de infecciones causadas por SARM.

## IX. CONCLUSIONES

1. Mediante una búsqueda por similitud estructural se encontraron dos nuevos inhibidores de la SaSDH (**31** y **37**).
2. Los análisis estructurales demostraron que estos inhibidores interactúan con los residuos Lys64, Ala128, Arg149 e Ile209 y su unión perturba su estructura de la SaSDH.
3. De acuerdo con su estructura química de los inhibidores **31** y **37**, en general cuentan con las características para ser considerados potenciales fármacos.
4. Los inhibidores encontrados servirán como punto de partida para continuar con la optimización de compuestos en la búsqueda de un nuevo fármaco contra SARM.

## X. PERSPECTIVAS

1. Resolver la estructura cristalográfica de la enzima sola y en complejo con los inhibidores **31** y **37**.
2. Llevar a cabo la optimización de los inhibidores.
3. Con las moléculas optimizadas realizar estudios de citotoxicidad.

## XI. REFERENCIAS

1. WHO WHO. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. WHO. 2017.
2. Kloos W, Bannerman T. Staphylococcus and micrococcus Murray, EJ Baron, MA faller, F. C.. Tenover and RH Yolken (eds.), Manual of Clinical Microbiology. ASM Press, Washington. DC; 1995.
3. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). Proceedings of the National Academy of Sciences. 2002;99(11):7687-92.
4. Li J, Liu D, Tian X, Koseki S, Chen S, Ye X, et al. Novel antibacterial modalities against methicillin resistant Staphylococcus aureus derived from plants. Critical reviews in food science and nutrition. 2018:1-9.
5. Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, Fridkin SK, Gorwitz RJ, et al. Clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in adults and children. Clinical infectious diseases. 2011;52(3):e18-e55.
6. Pottinger PS. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections. Medical Clinics. 2013;97(4):601-19.
7. Novales MGM. Resistencia antimicrobiana del Staphylococcus aureus en México. Boletín Médico del Hospital Infantil de México. 2011;68(4):262-70.
8. Bentley R, Haslam E. The shikimate pathway—a metabolic tree with many branches. Critical reviews in biochemistry and molecular biology. 1990;25(5):307-84.
9. Coggins JR. The shikimate pathway as a target for herbicides. Herbicides and plant metabolism. 1989(38):97.
10. Roberts CW, Finnerty J, Johnson JJ, Roberts F, Kyle DE, Krell T, et al. Reply: Shikimate pathway in apicomplexan parasites. Nature. 1999;397(6716):220.
11. Han C, Wang L, Yu K, Chen L, Hu L, Chen K, et al. Biochemical characterization and inhibitor discovery of shikimate dehydrogenase from Helicobacter pylori. The FEBS journal. 2006;273(20):4682-92.
12. Hawkins AR, Lamb HK, Moore JD, Charles IG, Roberts CF. The pre-chorismate (shikimate) and quinate pathways in filamentous fungi: theoretical and practical aspects. Microbiology. 1993;139(12):2891-9.
13. Peek J, Shi T, Christendat D. Identification of novel polyphenolic inhibitors of shikimate dehydrogenase (AroE). Journal of biomolecular screening. 2014;19(7):1090-8.
14. Han C, Hu T, Wu D, Qu S, Zhou J, Ding J, et al. X-ray crystallographic and enzymatic analyses of shikimate dehydrogenase from Staphylococcus epidermidis. The FEBS journal. 2009;276(4):1125-39.
15. Bonner CA, Jensen RA. Cloning of cDNA encoding the bifunctional dehydroquinase. shikimate dehydrogenase of aromatic-amino-acid biosynthesis in Nicotiana tabacum. Biochemical Journal. 1994;302(Pt 1):11.

16. Duncan K, Edwards R, Coggins J. The pentafunctional arom enzyme of *Saccharomyces cerevisiae* is a mosaic of monofunctional domains. *Biochemical journal*. 1987;246(2):375.
17. Anton IA, Coggins JR. Sequencing and overexpression of the *Escherichia coli* *aroE* gene encoding shikimate dehydrogenase. *Biochemical Journal*. 1988;249(2):319-26.
18. Avitia-Domínguez C, Sierra-Campos E, Salas-Pacheco JM, Nájera H, Rojo-Domínguez A, Cisneros-Martínez J, et al. Inhibition and Biochemical Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Shikimate Dehydrogenase: An in Silico and Kinetic Study. *Molecules*. 2014;19(4):4491-509.
19. Gan J, Wu Y, Prabakaran P, Gu Y, Li Y, Andrykovitch M, et al. Structural and biochemical analyses of shikimate dehydrogenase AroE from *Aquifex aeolicus*: implications for the catalytic mechanism. *Biochemistry*. 2007;46(33):9513-22.
20. Bagautdinov B, Kunishima N. Crystal structures of shikimate dehydrogenase AroE from *Thermus thermophilus* HB8 and its cofactor and substrate complexes: insights into the enzymatic mechanism. *Journal of molecular biology*. 2007;373(2):424-38.
21. Padyana AK, Burley SK. Crystal structure of shikimate 5-dehydrogenase (SDH) bound to NADP: insights into function and evolution. *Structure*. 2003;11(8):1005-13.
22. Arcuri HA, Borges JC, Fonseca IO, Pereira JH, Neto JR, Basso LA, et al. Structural studies of shikimate 5-dehydrogenase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2008;72(2):720-30.
23. Peek J, Christendat D. The shikimate dehydrogenase family: functional diversity within a conserved structural and mechanistic framework. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2015;566:85-99.
24. Ye S, von Delft F, Brooun A, Knuth MW, Swanson RV, McRee DE. The crystal structure of shikimate dehydrogenase (AroE) reveals a unique NADPH binding mode. *Journal of bacteriology*. 2003;185(14):4144-51.
25. Díaz-Quiroz DC, Cardona-Félix CS, Viveros-Ceballos JL, Reyes-González MA, Bolívar F, Ordoñez M, et al. Synthesis, biological activity and molecular modelling studies of shikimic acid derivatives as inhibitors of the shikimate dehydrogenase enzyme of *Escherichia coli*. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 2018;33(1):397-404.
26. Active bacterial core surveillance report, emerging infections program network, methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, 2014 [Internet]. CDC. 2014. Available from: [www.cdc.gov/abcs/reports-findings/survreports/mrsa14](http://www.cdc.gov/abcs/reports-findings/survreports/mrsa14).
27. Serra Valdés MÁ. Microbial resistance in the current context and the importance of knowledge and application in antimicrobial policy. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*. 2017;16(3):402-19.
28. Clatworthy AE, Pierson E, Hung DT. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nature chemical biology*. 2007;3(9):541-8.
29. Harris L, Foster S, Richards R. An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. *Eur Cell Mater*. 2002;4(3).

30. Highlander SK, Hultén KG, Qin X, Jiang H, Yerrapragada S, Mason EO, et al. Subtle genetic changes enhance virulence of methicillin resistant and sensitive *Staphylococcus aureus*. *BMC microbiology*. 2007;7(1):1.
31. Rasmussen RV, Høst U, Arpi M, Hassager C, Johansen HK, Korup E, et al. Prevalence of infective endocarditis in patients with *Staphylococcus aureus* bacteraemia: the value of screening with echocardiography. *European Journal of Echocardiography*. 2011;12(6):414-20.
32. Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter M-O, Gauduchon V, et al. Involvement of Panton-Valentine leukocidin—producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clinical infectious diseases*. 1999;29(5):1128-32.
33. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *New England journal of medicine*. 1998;339(8):520-32.
34. Maranan MC, Moreira B, Boyle-Vavra S, Daum RS. Antimicrobial resistance in staphylococci: epidemiology, molecular mechanisms, and clinical relevance. *Infectious Disease Clinics*. 1997;11(4):813-49.
35. Paez A, Skiest D. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: from the hospital to the community. *Current infectious disease reports*. 2008;10(1):14-21.
36. Johnson PD, Howden BP, Bennett CM. *Staphylococcus aureus*: a guide for the perplexed. *Medical journal of Australia*. 2006;184(8):374-5.
37. Camarena J, Sánchez R. Infección por *Staphylococcus aureus* resistente a metilina. Departamento de Microbiología Hospital Universitario Doctor Peset Valencia. 1999.
38. Matthews P, Tomasz A. Molecular aspects of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 1994;33(1):7-24.
39. Velázquez-Meza ME. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* metilinaresistente. *Salud pública de México*. 2005;47:381-7.
40. Dewick PM. The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural product reports*. 1995;12(2):101-33.
41. Davies GM, Barrett-Bee KJ, Jude DA, Lehan M, Nichols WW, Pinder PE, et al. (6S)-6-fluoroshikimic acid, an antibacterial agent acting on the aromatic biosynthetic pathway. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1994;38(2):403-6.
42. McConkey GA. Targeting the shikimate pathway in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1999;43(1):175-7.
43. Munack S, Roderer K, Ökvist M, Kamarauskaite J, Sasso S, van Eerde A, et al. Remote control by inter-enzyme allostery: a novel paradigm for regulation of the shikimate pathway. *Journal of molecular biology*. 2016;428(6):1237-55.
44. Herrmann KM, Weaver LM. The shikimate pathway. *Annual review of plant biology*. 1999;50(1):473-503.
45. Krämer M, Bongaerts J, Bovenberg R, Kremer S, Müller U, Orf S, et al. Metabolic engineering for microbial production of shikimic acid. *Metabolic engineering*. 2003;5(4):277-83.
46. Michel G, Roszak AW, Sauvé V, Maclean J, Matte A, Coggins JR, et al. Structures of shikimate dehydrogenase aroe and its paralog ydib a common

structural framework for different activities. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(21):19463-72.

47. Fonseca IO, Silva RG, Fernandes CL, de Souza ON, Basso LA, Santos DS. Kinetic and chemical mechanisms of shikimate dehydrogenase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2007;457(2):123-33.

48. Enríquez Mendiola DI. Análisis *in silico*, *in vitro* y actividad biológica de inhibidores de la shikimato deshidrogenasa de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Juárez del Estado de Durango. 2016.

49. Urban Martínez JL. Inhibición de la shikimato deshidrogenasa de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina por derivados de bencimidazol y benzotiazol. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Juárez del Estado de Durango. 2016.

50. Rentería Hernández O. Inhibición de la shikimato deshidrogenasa de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina por polifenoles presentes en *Moringa oleifera*. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Juárez del Estado de Durango. 2018.

51. Phrma. Biopharmaceutical Research & Development: The process behind new drugs. PHRMA. 2015:1-24.

52. Bustamante C, Ardila E, Echeverry J, Sánchez R. Fases del desarrollo de un nuevo fármaco. Estrategias de investigación en medicina clínica Bogotá: Manual Moderno. 2001:131.

53. Bakke OM, Carne Cledellas X, García Alonso F. Ensayos clínicos con medicamentos: fundamentos básicos, metodología y práctica: Doyma; 1994.

54. Laurence DR, Carpenter JR. A dictionary of pharmacology and clinical drug evaluation. *Trends in Pharmacological Sciences*. 1994;15(10):391-.

55. Laporte J. El ensayo clínico controlado. Principios básicos de la investigación clínica 2da ed Madrid: AstraZeneca. 2002:27-54.

56. Medina-Franco J. Aplicaciones Exitosas Del Diseño De Fármacos Utilizando Métodos Computacionales. *Ciencia (Mexico)*. 2007;59(1):1-8.

57. Kalyaanamoorthy S, Chen Y-PP. Structure-based drug design to augment hit discovery. *Drug discovery today*. 2011;16(17-18):831-9.

58. Meng X-Y, Zhang H-X, Mezei M, Cui M. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Current computer-aided drug design*. 2011;7(2):146-57.

59. Huang S-Y, Zou X. Advances and challenges in protein-ligand docking. *International journal of molecular sciences*. 2010;11(8):3016-34.

60. López-Vallejo F, Caulfield T, Martínez-Mayorga K, A Giulianotti M, Nefzi A, A Houghten R, et al. Integrating virtual screening and combinatorial chemistry for accelerated drug discovery. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*. 2011;14(6):475-87.

61. Hospital A, Goñi JR, Orozco M, Gelpí JL. Molecular dynamics simulations: advances and applications. *Advances and applications in bioinformatics and chemistry: AABC*. 2015;8:37.

62. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug

- discovery and development settings<sup>1</sup>. *Advanced drug delivery reviews*. 2001;46(1-3):3-26.
63. Contrera JF, MacLaughlin P, Hall LH, Kier LB. QSAR modeling of carcinogenic risk using discriminant analysis and topological molecular descriptors. *Current Drug Discovery Technologies*. 2005;2(2):55-67.
64. Cantón R, Sánchez JE, Gómez-Lus ML, Martínez LM, Rodríguez-Avial C, Vila J. *Procedimientos en microbiología clínica. Métodos Básicos Para el Estudio de la Sensibilidad a los Antimicrobianos en Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* Editor Picazo J J. 2000.
65. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976;72(1-2):248-54.
66. Systat. SigmaPlot 12. SYSTAT Software, Inc. San Jose, California; 2011.
67. Friesner RA, Banks JL, Murphy RB, Halgren TA, Klicic JJ, Mainz DT, et al. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *Journal of medicinal chemistry*. 2004;47(7):1739-49.
68. Spessard GO. ACD Labs/LogP dB 3.5 and ChemSketch 3.5. *Journal of chemical information and computer sciences*. 1998;38(6):1250-3.
69. Harder E, Damm W, Maple J, Wu C, Reboul M, Xiang JY, et al. OPLS3: a force field providing broad coverage of drug-like small molecules and proteins. *Journal of chemical theory and computation*. 2015;12(1):281-96.
70. Shelley JC, Cholleti A, Frye LL, Greenwood JR, Timlin MR, Uchimaya M. Epik: a software program for pK<sub>a</sub> prediction and protonation state generation for drug-like molecules. *Journal of computer-aided molecular design*. 2007;21(12):681-91.
71. Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*. 2015;1:19-25.
72. Vanommeslaeghe K, Hatcher E, Acharya C, Kundu S, Zhong S, Shim J, et al. CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *Journal of computational chemistry*. 2010;31(4):671-90.
73. Bjelkmar P, Larsson P, Cuendet MA, Hess B, Lindahl E. Implementation of the CHARMM force field in GROMACS: Analysis of protein stability effects from correction maps, virtual interaction sites, and water models. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2010;6(2):459-66.
74. Berendsen HJ, Postma Jv, van Gunsteren WF, DiNola A, Haak J. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of chemical physics*. 1984;81(8):3684-90.
75. Pastor RW, Brooks BR, Szabo A. An analysis of the accuracy of Langevin and molecular dynamics algorithms. *Molecular Physics*. 1988;65(6):1409-19.
76. Daura X, Gademann K, Jaun B, Seebach D, Van Gunsteren WF, Mark AE. Peptide folding: when simulation meets experiment. *Angewandte Chemie International Edition*. 1999;38(1-2):236-40.

77. Amadei A, Linssen AB, Berendsen HJ. Essential dynamics of proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 1993;17(4):412-25.
78. Mesentean S, Fischer S, Smith JC. Analyzing large-scale structural change in proteins: Comparison of principal component projection and sammon mapping. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2006;64(1):210-8.
79. Lee S, Park S, Lee I, No K. PreAD-MET Ver. v2. 0, BMDRC: Seoul. Korea. 2007.
80. Gfeller D, Grosdidier A, Wirth M, Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissTargetPrediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules. *Nucleic acids research*. 2014;42(W1):W32-W8.
81. Sander T, Freyss J, von Korff M, Rufener C. DataWarrior: an open-source program for chemistry aware data visualization and analysis. *Journal of chemical information and modeling*. 2015;55(2):460-73.
82. Lineweaver H, Burk D. The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American chemical society*. 1934;56(3):658-66.
83. Segel IH. *Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems*. 1975.

## PRODUCTOS OBTENIDOS

- Artículo titulado “**Kinetic and molecular dynamic studies of inhibitors of shikimate dehydrogenase from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***” en la revista internacional Chemical Biology and Drug Design. Publicado el 22 de abril del 2019.
- Presentación Oral del trabajo titulado “**Structural similarity search and biochemical characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* shikimate dehydrogenase inhibitors**” en el XXXII Congreso Nacional de Bioquímica. Noviembre 2018.
- Presentación Oral y Cartel del trabajo titulado “**Finding inhibitors of shikimate dehydrogenase from methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Kinetic and biological activity studies**” en el 6to Congreso de la rama de fisicoquímica, estructura y diseño de proteínas. Noviembre 2017.
- Artículo de revisión titulado “**La ruta del shikimato como blanco para el diseño de fármacos antibacterianos**” en la Revista Mexicana de Industria y Salud de la Facultad de Ciencias Químicas UJED, campus Gomez Palacio, Durango. Publicado en Octubre 2017.

Research Article

## Kinetic and Molecular Dynamic Studies of inhibitors of Shikimate dehydrogenase from Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Daniel Enríquez-Mendiola, Alfredo Téllez-Valencia, Erick Sierra-Campos, Mara Campos-Almazán, Mónica Valdez-Solana, Marcelo Gómez Palacio-Gastélum, Claudia Avitia-Domínguez

Chemical Biology & Drug Design | Accepted Articles

First published: 22 April 2019

**Abstract** 

### Abstract

Due to its resistance to many antibiotics, methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) have become a worldwide health problem creating the urgent necessity of developing new drugs against this pathogen. In this sense, one approach is to search for inhibitors of important enzymes in its metabolism. According to this, the shikimate pathway is an important metabolic route in bacteria and its enzymes are considered as great targets for the development of new antibiotic drugs. One of these enzymes is the shikimate dehydrogenase, that catalyze the reversal reduction from 3-dehydroshikimate to shikimate using NADPH as cofactor. In this work, four new compounds were found capable of inhibiting the SDH from *S. aureus* (SaSDH) activity. A detailed kinetic characterization showed that the most potent inhibitor presented a  $K_i$  of 8 and 10  $\mu\text{M}$  with respect to shikimate and  $\text{NADP}^+$ , respectively, and a mixed partial inhibition mechanism for both substrates. Molecular dynamics studies revealed that the four inhibitors perturb the structure of SaSDH affecting important domains. Toxicological and physicochemical parameters indicated that these compounds can be considered as potential drugs. Therefore, these compounds are good hits that will help in the process to obtain a new drug against MRSA.

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Otorga la presente

**CONSTANCIA** a:

**Daniel Isaac Enríquez Mendiola**

Quien asistió y presentó el trabajo:

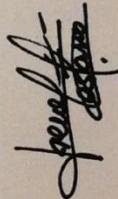
**Structural similarity search and biochemical characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* shikimate dehydrogenase inhibitors**

Por:

Daniel Isaac Enríquez Mendiola; Alfredo Téllez Valencia; Mónica Andrea Valdez Solana,  
Erick Sierra Campos, Claudia Isela Avitia Dominguez

En la modalidad de presentación oral durante el  
XXXII Congreso Nacional de Bioquímica  
4 - 9 de noviembre de 2018, Ixtapa Zihuatanejo, Gro.

Atentamente



**Dra. Irene B. Castaño Navarro**  
Presidente



6<sup>o</sup> CONGRESO DE LA RAMA  
DE FÍSICOQUÍMICA, ESTRUCTURA  
Y DISEÑO DE PROTEÍNAS

DURANGO, MEXICO

November 6-10, 2017

Sociedad Mexicana de Bioquímica certify that

**Daniel Isaac Enríquez Mendiola**

Presented the poster and oral entitled:

**Finding inhibitors of shikimate dehydrogenase from methicillin resistant  
*Staphylococcus aureus*. Kinetic and biological activity studies.**

By:

Enríquez-Mendiola, Daniel; Sierra-Campos, Erick; Valdez- Solana, Monica; Téllez-Valencia, Alfredo; Avitia-Domínguez, Claudia.

At the 6<sup>o</sup> Congreso de la Rama de Físicoquímica, Estructura y Diseño de Proteínas held on  
November 6-10, 2017 in Durango, Durango, Mexico.

Dr. Alfredo Téllez Valencia

On behalf

The organizing Committee

Dra. Mariana Peimbert Torres



## **La ruta del shikimato como blanco para el diseño de fármacos antibacterianos.**

### **Shikimate pathway as target for antibacterial drug design.**

Téllez Valencia Alfredo<sup>1</sup>, Alejandro Favela Candia Alejandro<sup>1</sup>, Enríquez Mendiola Daniel<sup>1</sup>,  
Chaidez Ávila Alondra<sup>1</sup>, Campos Almazán Mara<sup>1</sup>, Betancourt Conde Irene<sup>1</sup>,  
Vázquez Raygoza Alejandra<sup>1</sup>, Sierra Campos Erick<sup>2</sup>, Valdez Solana Mónica<sup>2</sup>,  
Avitia Domínguez Claudia Isela<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Facultad de Medicina y Nutrición, Universidad Juárez del Estado de Durango.  
Av. Universidad y Fanny Anitua S/N, Col. Centro, CP. 34000, Durango,  
Durango, México.

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Químicas, UJED. Av. Artículo 123 S/N, Fracc. Filadelfia, CP. 35010  
Gómez Palacio, Durango, México.

\*Correspondencia: [avitiaclaudia@gmail.com](mailto:avitiaclaudia@gmail.com)