



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Estudio computacional de la
interacción de antibióticos tipo
quinolonas con su enzima blanco
ADN girasa y sus implicaciones en la
resistencia bacteriana de
*Pseudomonas aeruginosa***

CAMILO ANDRÉS PEÑA GONZÁLEZ

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS

ÁREA CURRICULAR DE FARMACIA

BOGOTÁ, COLOMBIA

2015

Estudio computacional de la interacción de antibióticos tipo quinolonas con su enzima blanco ADN girasa y sus implicaciones en la resistencia bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa*

CAMILO ANDRÉS PEÑA GONZÁLEZ

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias - Farmacología

DIRECTOR:

Claudio Gómez Alegría, Bioquímico, Ph.D
Profesor Asociado
Departamento de Farmacia
Universidad Nacional de Colombia

CODIRECTOR:

Fabián López Vallejo, Químico, Ph.D
Profesor Asistente
Departamento de Química
Universidad Nacional de Colombia

Línea de Investigación:

Farmacología molecular y bioquímica

Grupo de Investigación:

UNIMOL

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS

ÁREA CURRICULAR DE FARMACIA

BOGOTÁ, COLOMBIA

2015

En homenaje a Dios todo poderoso,
ya que sin su ayuda no hubiese sido nada de esto posible

A mi familia mi gran amor,
por su apoyo incondicional y sabios consejos en
momentos difíciles

Estudio computacional de la interacción de antibióticos tipo quinolonas con su enzima blanco ADN girasa y sus implicaciones en la resistencia bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa*

Agradecimientos

Quisiera expresar mis más sinceros agradecimientos a Dios quien con sus bendiciones ha marcado el camino de mi vida y guía mis pasos.

A mi madre “Rosita” quien con su cariño, apoyo, amor y comprensión me brindo todo lo necesario para ser la persona que soy ahora y para el desarrollo de la presente investigación. Así como a mi familia, a mi tía Florecita y mis primos quienes desde un principio me apoyaron, comprendieron, aconsejaron e impulsaron.

A Ale mi gran compañera y amiga, quien con sus palabras, cariño y sabiduría me impulsaron a lo largo de este proceso.

Al profesor Claudio Gómez Alegría, quien me brindo no solamente su apoyo como tutor con sus conocimientos y experiencias, sino también por su tiempo, consejos, orientaciones y plena disposición para la elaboración del presente trabajo.

Al profesor Fabián López, quien con su conocimiento, apoyo, comprensión y tiempo permitió que se llevara a cabo el presente trabajo.

A mis compañeros y amigos Norman y Lina quienes con sus consejos, apoyo, tiempo y esfuerzo pusieron un granito de arena para realizar esta investigación. Así como a Caro, quien desde un principio y en su momento estuvo con sus consejos en momentos oportunos

A todos ustedes mil gracias y a aquellos que quizás olvide mencionar pero que también estuvieron allí acompañándome durante este proceso

Muchas gracias.

Resumen

Uno de los mecanismos responsables de resistencia bacteriana a antibióticos tipo quinolonas en *Pseudomonas aeruginosa* es el relacionado con mutaciones en el gen *gyrA* que codifica la subunidad A de la enzima ADN girasa (topoisomerasa II) de la bacteria, diana terapéutica de esta familia de antibióticos.

El objetivo de este trabajo fue realizar un estudio computacional de la interacción de antibióticos tipo quinolonas con la enzima ADN girasa, con el fin de acercarnos a comprender desde un punto vista estructural la resistencia antibiótica observada en cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

En primer lugar se construyó un modelo computacional de la estructura terciaria de la subunidad A nativa de la enzima girasa de *Pseudomonas aeruginosa*, lo que fue llevado a cabo con base en su homología con la proteína de *Escherichia coli* (código de acceso 2Y3P) y mediante el uso de tres plataformas computacionales (SWISS-MODEL, MODELLER y I-TASSER). En segundo lugar se generaron modelos de la estructura terciaria de tres formas mutantes de la proteína (Thr83Ile, Asp87Asn y Asp87Gly) siguiendo el mismo procedimiento. Finalmente, utilizando la técnica de acoplamiento molecular (*docking*) se estudió la interacción de todos los modelos teóricos con antibióticos tipo quinolonas (ácido nalidíxico, ciprofloxacina y levofloxacina).

El acoplamiento molecular mostró que los antibióticos interactúan con todos los modelos de proteínas a través de un sitio de unión común a ellos, con la única excepción de levofloxacina que se une a un bolsillo de unión diferente en el modelo Asp87Asn. Aunque el bolsillo de unión se mantendría en la mayoría de las estructuras estudiadas, los antibióticos se unen con distintas orientaciones ("*poses*") a los distintos modelos estudiados, lo cual genera interacciones con otros aminoácidos de la proteína.

Palabras claves: *Pseudomonas aeruginosa*, quinolonas, estudio computacional, interacciones proteína-ligando, acoplamiento molecular, modelado por homología, ADN girasa, SWISS-MODEL, MODELLER, I-TASSER.

Abstract

One of the mechanisms responsible for bacterial resistance to quinolone antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is the one related to mutations in the *gyrA* gene encoding the A-subunit of bacterial DNA gyrase enzyme (topoisomerase II), a therapeutic target of this family of antibiotics.

The aim of this work was to carry on a computational study of the interaction between quinolone antibiotics and the DNA gyrase enzyme in order to understand from a structural point of view the antibiotic resistance observed in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*.

First a computational model of the tertiary structure of the native subunit-A of gyrase enzyme of *Pseudomonas aeruginosa* was constructed, which was carried out based on its homology to the protein of *Escherichia coli* (access code 2Y3P) and by the use of three computer platforms (SWISS-MODEL, MODELLER and I-TASSER). Secondly, models for the tertiary structure of three mutant forms of the protein (Thr83Ile, Asp87Asn and Asp87Gly) were generated by following the same procedure. Finally, by using the molecular docking technique the interaction between all of these theoretical models and quinolone antibiotics (nalidixic acid, ciprofloxacin and levofloxacin) was studied.

The molecular docking showed that antibiotics interact with all protein models through a common binding site to these, with the only exception of levofloxacin that binds to a different binding pocket in the Asp87Asn model. Although the binding pocket would remain in most structures studied, antibiotics bind with different orientations ("poses") to the different models studied, which generates interactions with other amino acids of the protein.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, quinolones, computational study, protein-ligand interactions, molecular docking, homology modeling, DNA gyrase, SWISS-MODEL, MODELLER, I-TASSER.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Abstract.....	X
Lista de figuras.....	XIII
Lista de tablas	XV
Introducción	1
Objetivos.....	3
1. Marco Teórico.....	5
1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> :	5
1.1.1 Características generales:.....	5
1.1.2 Problemática de <i>P. aeruginosa</i> :	6
1.1.3 Patogenicidad y Virulencia de <i>P. aeruginosa</i> :	7
1.2. Antibióticos del tipo quinolonas:.....	9
1.2.1. Estructura química:	9
1.2.2. Relación estructura actividad:.....	10
1.2.3. Mecanismo de acción de las quinolonas:	12
1.3. Antibióticos del tipo quinolonas:.....	15
1.4. Acoplamiento molecular (<i>Docking</i>):.....	20
1.5. Modelado por homología:	22
1.5.1. Etapa 1: Identificación y selección de la proteína-molde:	23
1.5.2. Etapa 2: Alineamiento de las secuencias de residuos:	24
1.5.3. Etapa 3: Construcción del modelo de coordenadas y refinamiento:	25
1.5.4. Etapa 4: Validación del modelo:	28
2. Materiales y Métodos	31
2.1. Materiales:	31
2.1.1. Equipos:.....	31
2.2. Metodología:.....	31
2.2.1. Modelado de la estructura terciaria de la enzima ADN girasa nativa de <i>P. aeruginosa</i> :	32
2.2.2. Evaluación comparativa de la calidad de los modelos generados con distintas plataformas:	35
2.2.3. Minimización energética del modelo final seleccionado:.....	37
2.2.4. Modelado de la estructura terciaria de versiones mutadas de la subunidad A de la ADN girasa de <i>P. aeruginosa</i> :.....	38

2.2.5.	Preparación de las estructuras de los ligandos “antibióticos”:	38
2.2.6.	Acoplamiento molecular de quinolonas con la subunidad A de la ADN girasa:	39
3.	Resultados	43
3.1.	Búsqueda de estructuras proteicas 3D a utilizar como molde (plantilla):	44
3.2.	Modelado de la estructura 3D de la ADN girasa A de <i>P. aeruginosa</i> :	49
3.2.1.	Modelado por SWISS-MODEL:	50
3.2.2.	Modelado por I-TASSER:	51
3.2.3.	Modelado por MODELLER 9V10:	53
3.3.	Modelado de las versiones mutadas de la subunidad A de la ADN girasa de <i>P. aeruginosa</i> :	61
3.4.	Preparación de las estructuras de los ligandos “antibióticos”:	65
3.5.	Acoplamiento molecular “ <i>Molecular Docking</i> ” de quinolonas:	66
3.5.1.	Interacción de ácido nalidíxico y girasa A de <i>P. aeruginosa</i> :	66
3.5.2.	Interacción de ciprofloxacina y girasa A de <i>P. aeruginosa</i> :	69
3.5.3.	Interacción de levofloxacina y girasa A de <i>P. aeruginosa</i> :	73
4.	Discusión	77
4.1.	Modelado molecular de la estructura 3D de la ADN girasa de <i>P. aeruginosa</i> WT y versiones mutantes:	78
4.2.	Acoplamiento molecular de los modelos 3D propuestos con antibióticos de tipo Quinolona:	80
4.2.1.	ácido nalidíxico:	80
4.2.2.	ciprofloxacina:	81
4.2.3.	levofloxacina:	81
4.3.	Comparación de nuestro estudio con otros similares:	82
5.	Conclusiones y proyecciones	87
5.1.	Conclusiones:	87
5.2.	Proyecciones:	88
A.	Anexo: Nomenclatura de los aminoácidos en códigos de una y tres letras	89
B.	Anexo: Direcciones electrónicas de las plataformas y programas utilizados	90
	Bibliografía	91

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Colonias de <i>P. aeruginosa</i> en aislados clínicos	6
Figura 1-2: Núcleo básico de los antibióticos tipo Quinolonas.	9
Figura 1-3: Relación entre la estructura química y la acción farmacológica de las quinolonas.....	11
Figura 1-4: Composición de la ADN girasa y mecanismo de acción.	13
Figura 1-5: Formación del complejo ADN - quinolona.....	14
Figura 1-6: Mecanismos de resistencia antibiótica presentada por bacterias.....	15
Figura 1-7: Ilustración simplificada del proceso de modelado por homología..	23
Figura 1-8: Definición de ángulos de torsión de la cadena principal (φ y ψ) y cadenas laterales (χ_n)..	27
Figura 2-1: Secuencia metodológica del estudio computacional.....	32
Figura 2-2: Representación del tamaño en angstroms de los ligandos implementados.	40
Figura 2-3: Representación gráfica de las coordenadas del grid centrado en el ligando.41	41
Figura 3-1: Secuencia de aminoácidos de la proteína ADN girasa subunidad A de <i>P. aeruginosa</i> cepa PAO1.	43
Figura 3-2: Visualización de la plataforma computacional BLAST	44
Figura 3-3: Resultados del alineamiento de la secuencia de la proteína ADN girasa A de <i>P. aeruginosa</i> cepa PAO1	45
Figura 3-4: Resultados del alineamiento de la secuencia de 2Y3P y la proteína ADN girasa subunidad A de <i>P. aeruginosa</i> cepa PAO1	46
Figura 3-5: Estructura tridimensional correspondiente al código de acceso 2Y3P.	47
Figura 3-6: Resultados del alineamiento de la secuencia de 1AB4 y la proteína ADN girasa subunidad A de <i>P. aeruginosa</i> cepa PAO1	48
Figura 3-7: Estructura tridimensional correspondiente al código de acceso de 1AB4	49
Figura 3-8: Modelos tridimensionales de la subunidad A de la ADN girasa de <i>P. aeruginosa</i> construidos a partir de la plataforma SWISS-MODEL.	50
Figura 3-9: Modelos de la estructura 3D de la subunidad A de la ADN girasa de <i>P. aeruginosa</i> construidos a partir de la plataforma I-TASSER.	52
Figura 3-10: Modelos de la estructura 3D de la subunidad A de la ADN girasa de <i>P. aeruginosa</i> construidos a partir del programa MODELLER 9v10.	54
Figura 3-11: Gráficos de Ramachandran de los modelos más adecuados según las metodologías implementadas.....	57

Figura 3-12: Visualización de los resultados de la evaluación realizada por ProSA-web para el modelo seleccionado de la subunidad A de la ADN girasa de <i>P. aeruginosa</i>	59
Figura 3-13: Modelo final propuesto para la subunidad A de la ADN girasa de <i>P. aeruginosa</i>	60
Figura 3-14: Representación de la superficie de van der Waals de las estructuras tridimensionales de las versiones nativa (WT) y mutantes de la ADN girasa A de <i>P. aeruginosa</i> construidos a partir de la plataforma SWISS-MODEL.....	62
Figura 3-15: Gráficos de Ramachandran de las versiones mutantes de la subunidad A de la ADN girasa de <i>P. aeruginosa</i>	63
Figura 3-16: Modos de unión establecidos para el ácido nalidíxico en la proteína ADN girasa A de <i>P. aeruginosa</i> WT y mutadas.....	66
Figura 3-17: Representación gráfica del sitio de unión del ácido nalidíxico.....	68
Figura 3-18: Modos de unión establecidos para la ciprofloxacina en la proteína ADN girasa A de <i>P. aeruginosa</i> WT y mutadas.....	69
Figura 3-19: Representación gráfica del sitio de unión de ciprofloxacina.....	72
Figura 3-20: Modos de unión establecidos para la levofloxacina en la proteína ADN girasa A de <i>P. aeruginosa</i> WT y mutadas.....	73
Figura 3-21: Representación gráfica del sitio de unión de levofloxacina.....	75
Figura 3-22: Modos de unión de los diferentes modelos de la ADN girasa A de <i>P. aeruginosa</i> (WT, Thr83Ile, Asp87Gly Y Aps87Asn).....	76

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1: Mutaciones observadas en asilados clínicos de <i>P. aeruginosa</i>	17
Tabla 3-1: Calidad de los modelos obtenidos por SWISS-MODEL.....	51
Tabla 3-2: Calidad de los modelos obtenidos por I-TASSER.	53
Tabla 3-3: Calidad de los modelos obtenidos por Modeller 9v10.....	55
Tabla 3-4: Calidad de los modelos seleccionados según el Servidor QMEAN.	56
Tabla 3-5: Evaluación de la calidad estructural del modelo final.....	58
Tabla 3-6: Calidad de los modelos estructurales de las versiones mutantes.	62
Tabla 3-7: Evaluación de la calidad estructura de los modelos mutantes de la proteína ADN girasa A de <i>P. aeruginosa</i> por los servidores Verify3D y Errat.	64
Tabla 3-8: Estructuras 3D de los ligandos (antibióticos) construidas y optimizadas. ..	65
Tabla 3-9: Energías de unión para la interacción entre ácido nalidíxico y ADN girasa A.....	67
Tabla 3-10: Energías de unión para la interacción entre ciprofloxacina y ADN girasa A.....	70
Tabla 3-11: Energías de unión para la interacción entre levofloxacina y ADN girasa A.....	74

Introducción

A lo largo de los últimos decenios, la mayoría de las bacterias patógenas han desarrollado resistencia a uno o más antibióticos, lo que representa un enorme problema de salud pública a nivel mundial (OMS, 2014). Dentro de los patógenos que generan preocupación por parte de la Organización Mundial de la Salud se encuentra la *Pseudomonas aeruginosa*, una bacteria oportunista que afecta especialmente a pacientes inmunocomprometidos como aquellos que padecen fibrosis quística, quemaduras severas, infecciones urinarias e intra-hospitalarias, entre otras (Elkin y Geddes, 2003; Pier *et al*, 1996).

Nuestro grupo de investigación ha venido trabajando por años con pacientes afectados de fibrosis quística (Malambo *et al*, 2008; Rodríguez-Escobar *et al*, 2009), una enfermedad de origen genético que en muchos casos predispone a infecciones pulmonares recurrentes cuyo resultado fatal ocurre a causa de la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* (Elkin *et al*, 2003).

Entre los antibióticos más utilizados para el tratamiento de las infecciones pulmonares y otras mediadas por *Pseudomonas aeruginosa* (en adelante *P. aeruginosa*) está el grupo de las quinolonas, en especial ciprofloxacina, por su bajo costo, fácil administración, y buena respuesta terapéutica. Esta familia de antibióticos ejerce su acción al inhibir la enzima ADN girasa, una proteína clave en el proceso de replicación del ADN (Gutiérrez y López, 2001).

Pseudomonas aeruginosa y otras bacterias han desarrollado múltiples mecanismos de resistencia a antibióticos, incluyendo sistemas de expulsión del fármaco, hidrólisis del antibiótico, mutaciones en las enzimas diana, entre otros (Hooper, 1998; Van Bambeke *et al*, 2005; Ruiz, 2003). En cuanto a la resistencia a quinolonas, uno de los mecanismos descritos se relaciona con mutaciones en el gen *gyrA*, que codifica la subunidad A de la enzima ADN girasa, existiendo una región conocida como *Región determinante de resistencia a quinolonas* o *Región QDRD* por sus siglas en inglés (aminoácidos 67-106

de la proteína) donde se concentran muchos de los cambios mutagénicos (Heddle y Maxwell, 2002).

En nuestro grupo de investigación hemos observado que los aislados clínicos de *P. aeruginosa* provenientes de pacientes con fibrosis quística muestran un número significativamente mayor de cepas resistentes a ciprofloxacina al compararlos con aislados de pacientes sin fibrosis quística (Gómez y Malambo, 2002; Caldera, 2010; Baena-Del Valle et al, 2014), lo que incrementa la morbimortalidad de la enfermedad y los costos asociados al tratamiento farmacológico que conlleva la recuperación de los pacientes (Henwood et al, 2001).

En un grupo de 30 aislados clínicos de *P. aeruginosa* provenientes de pacientes con fibrosis quística, la resistencia a ciprofloxacina se relacionó con las mutaciones Thr83Ile, Asp87Gly y Asp87Asn en GyrA (Caldera, 2010), lo que coincide con lo descrito por otros autores quienes han descrito cambios mutagénicos en los codones 83 y 87 de *gyrA* (Drlica et al, 2008).

Con base en lo anterior, nos surge la siguiente pregunta: **¿Cuáles son los determinantes estructurales de la interacción Quinolona-Enzima ADN girasa que permitan explicar la resistencia observada con ciprofloxacina?**

Este trabajo representa un primer esfuerzo hacia el intento de responder esta pregunta. En particular, con este trabajo se pretende contribuir al estudio de las bases estructurales que nos permitan explicar la resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* observada frente a ciprofloxacina y, más adelante, frente a otras quinolonas. Este estudio nos permite proyectar trabajos previos de nuestro grupo a partir de lo realizado con pacientes afectados de fibrosis quística, avanzando en el conocimiento básico que se requiere para llegar a desarrollar nuevos fármacos con actividad antibiótica.

El presente proyecto contribuye también a la formación de recurso humano a nivel de maestría, y fortalece los programas de postgrado del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia. Se trata de un trabajo con cierto grado de originalidad e innovación al predecir la estructura tridimensional de una proteína cuya estructura terciaria no se conoce (subunidad A de ADN girasa de *P. aeruginosa*, en adelante también leída como ADN girasa A) y luego utilizar dicha estructura para predecir las interacciones que se establecen con antibióticos de tipo quinolonas.

Objetivos

Objetivo general:

Realizar un estudio computacional de la interacción de antibióticos tipo quinolonas con su enzima blanco ADN girasa de *Pseudomonas aeruginosa*

Objetivos específicos:

- Proponer un modelo teórico de la estructura terciaria de la enzima ADN girasa nativa de *Pseudomonas aeruginosa*.
- Proponer un modelo teórico de la estructura terciaria de versiones mutadas de la enzima ADN girasa de *Pseudomonas aeruginosa*
- Estudiar la interacción molecular entre antibióticos tipo quinolonas y los diferentes modelos estructurales propuestos para la enzima ADN girasa de *Pseudomonas aeruginosa*.

1. Marco Teórico

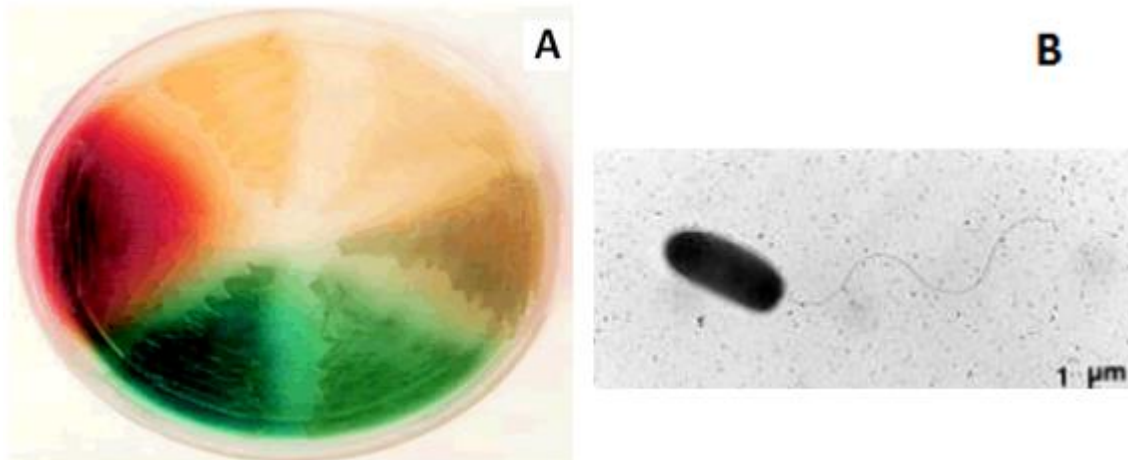
1.1. *Pseudomonas aeruginosa*:

1.1.1 Características generales:

La *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) es una bacteria Gram-negativa, aeróbica, perteneciente a la clase de la γ -proteobacterias y familia *Pseudomonadaceae*, según análisis filogenético basado en homología de secuencia del rARN 16S (Stanley *et al*, 2007); secreta una gran variedad de pigmentos como piocianina (azul verdoso), fluoresceína (amarillo verdoso fluorescente) y piorubina (rojo pardo) (Figura 1-1A) (Merino, 2007; Martínez, 2007). Este patógeno oportunista de individuos inmunocomprometidos posee una notable versatilidad nutricional que le permite utilizar alrededor de 80 compuestos como fuente de energía y carbono (Høiby *et al*, 2008). Tiene además la capacidad de crecer en condiciones aerobias o anaerobias dependiendo del tipo de sustrato que constituya el ambiente en el que se encuentre (Stanley *et al*, 2007). Tiene una temperatura óptima de crecimiento entre 30 y 37°C, pero puede sobrevivir y multiplicarse en casi cualquier ambiente, incluyendo aquellos con elevado contenido de sales, y en un rango de temperaturas comprendido entre 20 - 42 °C o superiores (Martínez, 2007).

La *P. aeruginosa* puede presentar tamaños de 1,5 a 5 μm de largo y un diámetro de 0,5 a 1,0 μm . La mayoría de células de *P. aeruginosa* presentan un único flagelo polar que les permite tener movilidad respondiendo a estímulos químicos (quimiotaxis), así como desplazarse para localizar bajas concentraciones de sustrato (Figura 1-1B) (Stanley *et al*, 2007; Li *et al*, 2007). Por otra parte se ha observado que en algunos aislados este microorganismo puede llegar a tener hasta dos o tres flagelos.

Figura 1-1: Colonias de *P. aeruginosa* en aislados clínicos. **A)** Pigmentaciones producidas por *P. aeruginosa* sobre agar Mueller Hinton, (28 °C y 48 h de incubación). Imagen tomada de Merino (2007). **B)** Electromicrografía en la cual se aprecia el flagelo que presenta.



En lo que respecta a la morfología de la colonia, pigmentos secretados y propiedades de motilidad, pueden existir heterogeneidades entre las diferentes cepas, ya que en general son características que pueden ser alteradas dependiendo de las condiciones bajo las cuales se encuentre la bacteria. Dichas alteraciones pueden llegar a evidenciarse en casos en los cuales hay crecimiento de biopelículas (*biofilm*) (Martínez, 2007), donde generalmente estos cambios morfológicos son acompañados de otros a nivel fenotípico que contribuyen a la persistencia y sucesos patogénicos resultantes, por ejemplo, a la sobreproducción de alginato, que ha sido relacionado con el incremento de la resistencia a antibióticos y adherencia a células epiteliales (Yahr y Parsek, 2006).

1.1.2 Problemática de *P. aeruginosa*:

La *P. aeruginosa* es el patógeno oportunista humano más importante de su género, reconocido a nivel mundial por ser una fuente común en las infecciones adquiridas en la comunidad, por la generación del 50% de las pulmonías bacterianas nosocomiales, así como por la morbilidad asociada por el inicio de respuestas inflamatorias (Van y Iglewski, 1998) especialmente en pacientes inmunocomprometidos, tales como aquellos individuos afectados de fibrosis quística (FQ), SIDA o en aquellos pacientes con

quemaduras severas, ulceraciones o abrasiones mecánicas. (Elkin y Geddes, 2003; Pier *et al*, 1996).

La inmunodeficiencia del huésped permite que las cepas con baja patogenicidad tengan la capacidad de invadir tejidos, incrementando la virulencia de éstas aun cuando son poco patógenas. Esta afectación inmune combinada con la elevada incidencia de cepas resistentes a los antibióticos, hace que el tratamiento de las infecciones causadas por este patógeno se convierta en un serio reto médico (Martínez, 2007; Høiby *et al* 2008).

En el caso de las infecciones respiratorias crónicas asociadas a pacientes con FQ, se presenta una elevada colonización bacteriana en los esputos, sin embargo, los microorganismos son muy poco invasivos, no citotóxicos y raramente progresan a infecciones sistémicas. Por otra parte, debido a que estas infecciones pueden persistir durante décadas, acaban generando un grave deterioro del epitelio pulmonar del paciente (Hirakata, 2003; Lyczak *et al*, 2000).

La cronicidad en este tipo de infecciones se debe principalmente a las adaptaciones que presenta *P. aeruginosa* por lo cual resulta complejo el tratamiento de las infecciones producidas por este microorganismo. Lo anterior sumado al hecho de que se posea una limitada existencia de agentes antimicrobianos efectivos complica aún más el panorama de los pacientes infectados por este patógeno.

1.1.3 Patogenicidad y Virulencia de *P. aeruginosa*:

Este patógeno oportunista se caracteriza por infectar el tracto pulmonar, urinario, tejidos como la córnea, la piel, heridas, e incluso sangre (Kang *et al*, 2005), en la mayoría de los casos aprovechando las condiciones de salud de los individuos, causando dermatitis, altas fiebres, foliculitis, bacteremias y neumonías en pacientes con FQ que pueden comprometer la vida del paciente (Stanley *et al*, 2007; Li *et al*, 2007).

A pesar del gran conocimiento de factores de virulencia asociados con *P. aeruginosa*, esta bacteria rara vez infecta a personas inmunocompetentes o con tejidos intactos. Esto refleja la poca capacidad de esta bacteria de colonizar o dañar epitelios, y explica cómo la pérdida de la integridad epitelial, especialmente con un declive de la función

inmunológica, es normalmente un prerrequisito para las infecciones por este patógeno oportunista (Driscoll y Kollef, 2007).

La cronicidad y severidad de este tipo de infecciones se deben principalmente a las adaptaciones específicas de *P. aeruginosa* a las vías respiratorias de los pacientes con FQ, que incluyen formación de *biofilms*, formación de cápsulas polisacáridas y la pérdida de la expresión de muchos genes asociados a la virulencia, incluyendo flagelos, exotoxinas o el antígeno O, entre otros, como también a las condiciones ambientales y el estado de la respuesta inmune del paciente (Martínez, 2007; Leclerc *et al*, 2000).

La destrucción tisular asociada a *P. aeruginosa* también puede ser atribuida a las elastasas que hidrolizan la elastina, el colágeno e incluso las inmunoglobulinas y algunos componentes del complemento. Además las exoenzimas S y T son toxinas extracelulares que producen daños en las células epiteliales con el objetivo de facilitar la diseminación de las bacterias, la invasión tisular y la necrosis, contribuyendo a la destrucción de los tejidos (Martínez, 2007; Shibuya *et al*, 1991).

Por otra parte las *P. aeruginosa* se caracterizan por producir una gran variedad de toxinas importantes, las cuales pueden en muchas ocasiones inducir la muerte de células, e incluso hidrolizar proteínas estructurales de los tejidos. La toxina más potente es la exotoxina A, la cual además de poseer actividad inmunodepresora, inhibe la síntesis proteica en las células eucariotas una vez se ha unido al receptor presente en ellas; su expresión está inducida por las condiciones limitantes de oxígeno que se encuentran en el huésped y está posiblemente implicada en la dermatonecrosis que tiene lugar en las quemaduras o en el daño tisular en las infecciones pulmonares crónicas (Martínez, 2007; Hamood *et al*, 2004).

Aunque la patogenicidad de *P. aeruginosa* es multifactorial, el sistema de secreción tipo III, es el mayor determinante de virulencia. Este sistema de secreción es común en muchos patógenos Gram-negativos, y funciona transportando toxinas directamente desde la bacteria adherida a la célula eucariota. En las infecciones respiratorias humanas, este sistema de secreción se asocia a un incremento de riesgo de mortalidad de hasta seis veces (Jain *et al*, 2004), aunque en el medio ambiente juega un papel

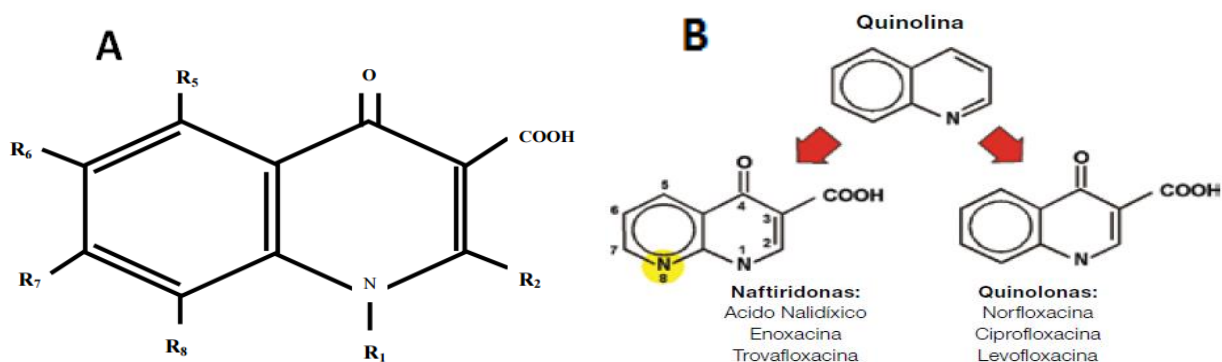
importante en la supervivencia de este microorganismo tanto en el suelo, como en el agua. Este sistema de secreción se expresa en respuesta a diversas señales ambientales (Pukatzki *et al*, 2002), incluyendo bajas concentraciones de Ca^{+2} , las cuales permiten el transporte de cuatro toxinas (Exo S, Exo T, Exo U y Exo Y) implicadas en la inhibición de la fagocitosis, la promoción de destrucción tisular y el retardo de la curación de heridas (Martínez, 2007; Vallis *et al*, 1999).

1.2. Antibióticos del tipo quinolonas:

1.2.1. Estructura química:

El término quinolona deriva de quinolina, el núcleo aromático presente en los alcaloides de la quina y otros antipalúdicos clásicos, ya que de éste deriva la estructura básica de todas ellas. Las quinolonas son un grupo de agentes antimicrobianos sintéticos que surgieron a partir de modificaciones estructurales del núcleo básico del ácido nalidíxico (Figura 1-2A) (Gutiérrez, 2004). Su estructura base es la 3-carboxi- 4-oxo-1,4-dihidropiridina asociada a un benceno u otra piridina para formar los bicíclonaftiridona y quinolona respectivamente (Figura 1-2B) (Zhanel *et al*, 2002).

Figura 1-2: **A)** Núcleo básico de los antibióticos tipo Quinolonas. **B)** Estructura base y bicíclon derivados. Imagen tomada de Estrín *et al* (2002).



Para que la molécula presente actividad bactericida, la piridona debe presentar un nitrógeno en posición 1, un carboxilo en posición 3 y un grupo carbonilo en posición 4.

Estos dos últimos grupos funcionales son necesarios para la interacción con el ADN bacteriano (Gutiérrez, 2004).

Durante la década de los ochenta, ocurrió tal vez la contribución más importante con la introducción de la norfloxacin. Este fármaco contiene cambios estructurales en las posiciones 6 y 7 y con la introducción de átomos de flúor y la presencia de una piperazina respectivamente, lo cual significó un cambio radical en las posibilidades terapéuticas del grupo (Gutiérrez, 2004), dando origen a su vez a fármacos como norfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacina, entre otros, los cuales presentaron mejoras tanto en actividad biológica como en propiedades farmacocinéticas (buena absorción oral y amplia distribución tisular) (Zhanel *et al*, 2002). Por ello, a partir de la década siguiente y hasta la actualidad, la familia de las quinolonas ha crecido en forma importante a expensas de los compuestos 6-fluoderivados (Andersson y MacGowan, 2003; Estrín *et al*, 2002). El sustituyente flúor en el C-6 incrementó tanto la penetración celular (1 a 70 veces) como la inhibición de la enzima blanco ADN girasa (2 a 17 veces) comparado con anteriores moléculas que no poseían esta sustitución. Por otra parte, la integración de un grupo básico en la posición C-7 aumentó la actividad inhibitoria de la ADN girasa, así como la potencia, la solubilidad y otras propiedades fisicoquímicas.

Frente a *P. aeruginosa*, la ciprofloxacina es la más activa de las fluoroquinolonas. Las diferencias en las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) típicas de la ciprofloxacina son de dos a ocho veces menores que las de levofloxacina o de quinolonas más nuevas como moxifloxacina y gatifloxacina (Zhanel *et al*, 2002; Bauernfeind, 1997).

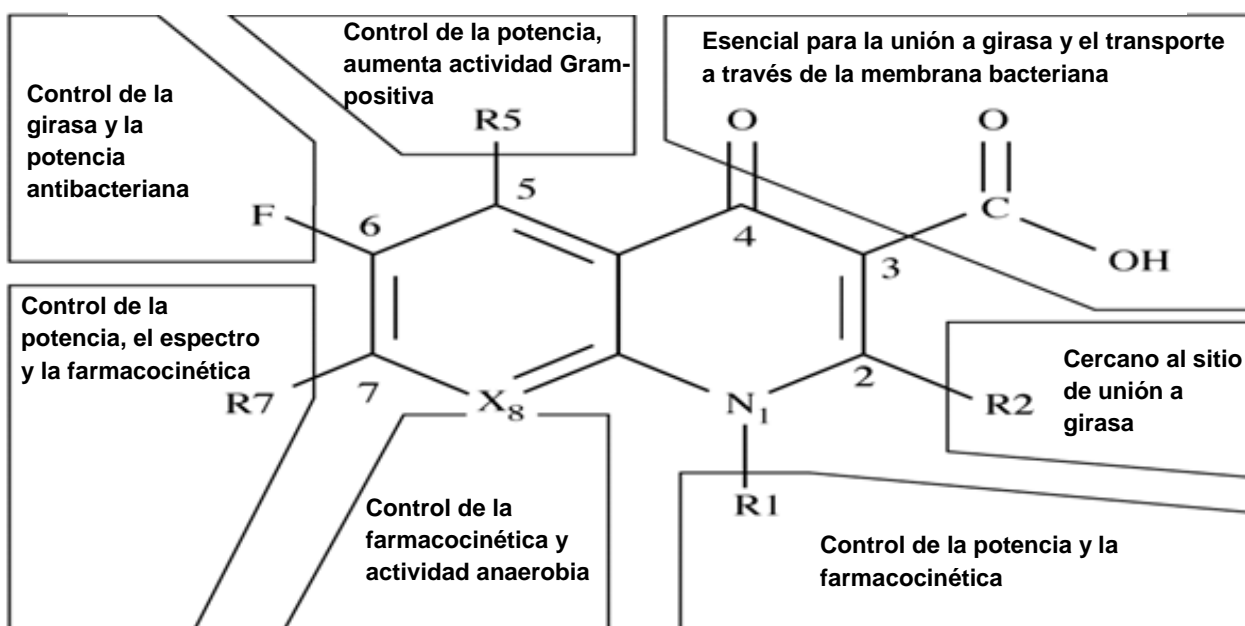
No obstante, a pesar de las grandes expectativas que cada nueva molécula ha generado, varias han quedado en el camino, algunas por desinterés comercial, falta de aplicación terapéutica, aparición de resistencia o debieron ser retiradas del mercado farmacéutico por efectos tóxicos importantes (Emmerson y Jones, 2003).

1.2.2.Relación estructura actividad:

La Relación Estructura-Actividad (SAR) de los antibióticos tipo quinolona muestra además que (Andersson y MacGowan, 2003; Domagala, 1994) (Figura 1-3):

- El anillo de piperazina desempeña un papel en la inhibición de los mecanismos de eflujo, mejorando la potencia del fármaco.
- El agregado alquílico o cicloalquílico en la posición 1 mejora la actividad global de la molécula.
- Los grupos de las posiciones 3 y 4 son esenciales para el paso de las moléculas antibióticas de este tipo al interior bacteriano y para la unión con las topoisomerasas.
- La sustitución con flúor en la posición 6 origina los derivados conocidos como fluoroquinolonas, los cuales son los más eficaces del grupo por su potencia y por su control sobre la ADN girasa.
- Los ciclos en la posición 7 cambian la farmacocinética y mejoran el espectro antibiótico: la piperazina facilita la permeabilidad hacia el interior bacteriano, mientras que las pirrolidinas o grupos más complejos, tipo el azabicyclo, mejoran la actividad contra los gérmenes Gram-positivos. Los agregados éter en la posición 8 son fundamentales para actuar contra gérmenes anaerobios.

Figura 1-3: Relación entre la estructura química y la acción farmacológica de las quinolonas. Imagen tomada y modificada de Andersson y MacGowan (2003).



Una vez en el interior bacteriano, las quinolonas interactúan con los dominios del cónformero activo de las topoisomerasas, es decir, con los dominios generados después de la formación del complejo ADN-Topoisomerasa. El resultado de esta unión es una estructura estable que genera una inhibición de la síntesis de ADN y ARNm y mantiene abierta la estructura del ADN en varios puntos. A partir de este punto, las razones por las cuales que se produce la muerte bacteriana son especulativas (Engelberg *et al*, 2004).

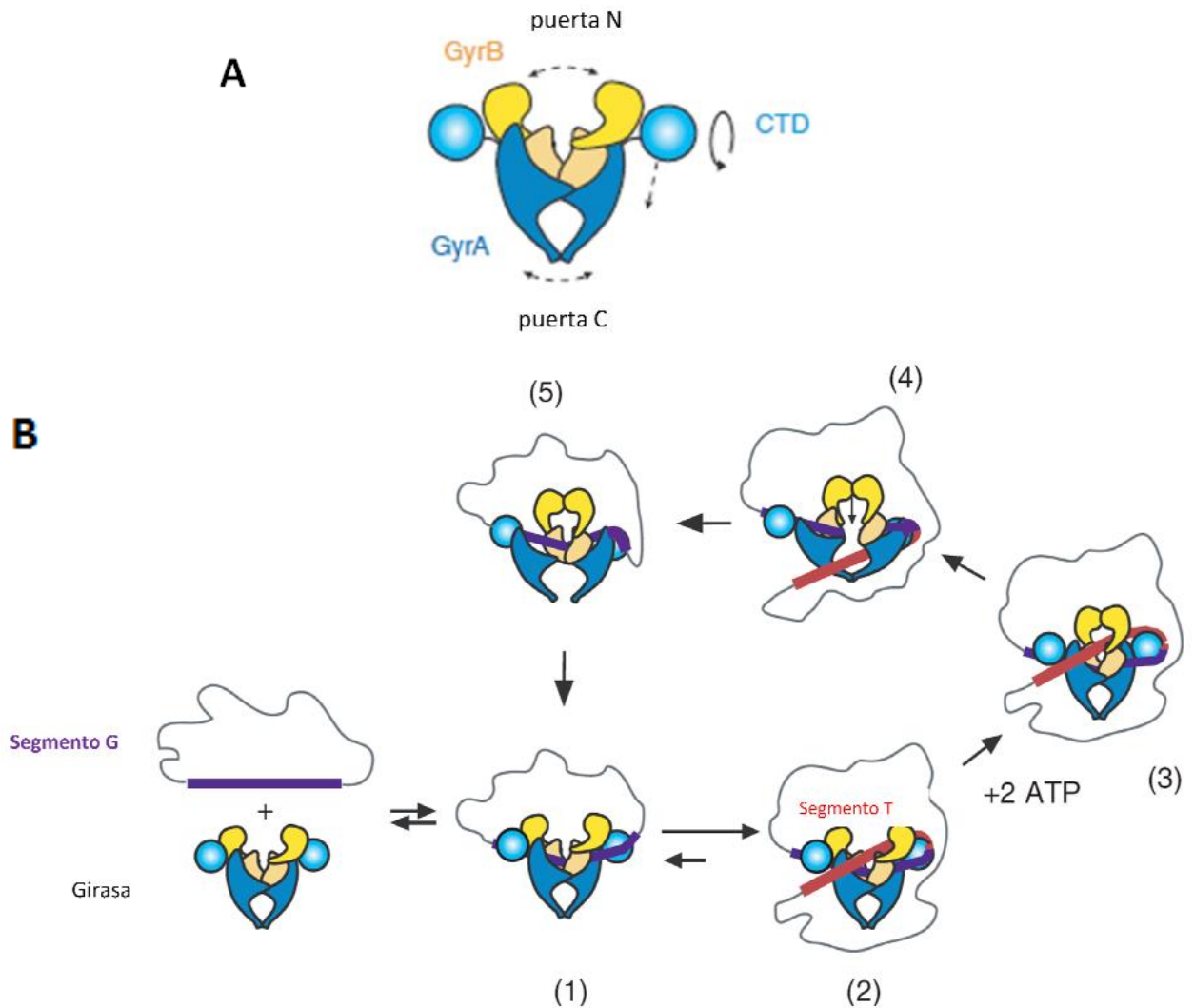
1.2.3. Mecanismo de acción de las quinolonas:

Las quinolonas son antibióticos que actúan inhibiendo su enzima blanco (las topoisomerasas bacterianas). Las topoisomerasas son las enzimas que actúan sobre la topología del ADN ya sea enrollando el ADN con el objetivo de almacenar la información de manera compacta o desenrollándolo para el proceso de replicación. De acuerdo a lo anterior, se agrupan en dos tipos o familias: Las topoisomerasas tipo II (ADN girasa) y las topoisomerasa tipo IV. Las quinolonas inhiben a las topoisomerasas tipo II, encargadas de generar la separación de las dos cadenas de ADN de manera transitoria. Estas enzimas son indispensables en la síntesis del ADN, manteniendo el adecuado estado de superenrollamiento del ácido nucleico e interviniendo en procesos como la transcripción, iniciación y elongación durante la replicación del ADN en las regiones del cromosoma en las que ocurre la replicación (Hawkey, 2003), conservando la topología y funcionalidad de este ácido nucleico. Estas enzimas son ATP-dependientes y catalizan la reacción de relajación, superenrollado, catenación y decatenación de las hebras del ADN. En este sentido las quinolonas interrumpen la reproducción bacteriana y la replicación, bloqueando la actividad de la subunidad A de la ADN girasa bacteriana (Gutiérrez y López, 2001).

La ADN girasa es un heterotetrámero compuesto por dos subunidades A y dos subunidades B (A2-B2), las cuales están codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB*, respectivamente (Figura 1-4A) (Nollmann *et al*, 2007). Esta enzima se caracteriza por ser la única topoisomerasa conocida con la capacidad de generar enrollamientos negativos en ácidos nucleicos, además de catalizar reacciones de desenrollamiento del ADN, sin embargo, su acción como decatenasa es pobre (Figura 1-4B) (Drlica y Zhao, 1997; Hawkey, 2003). Como resultado sus funciones fisiológicas son la separación de las

cadena de ADN hijas posterior al proceso de replicación, además de separar catenenos y nudos resultantes de procesos de recombinación (Drlica y Zhao, 1997).

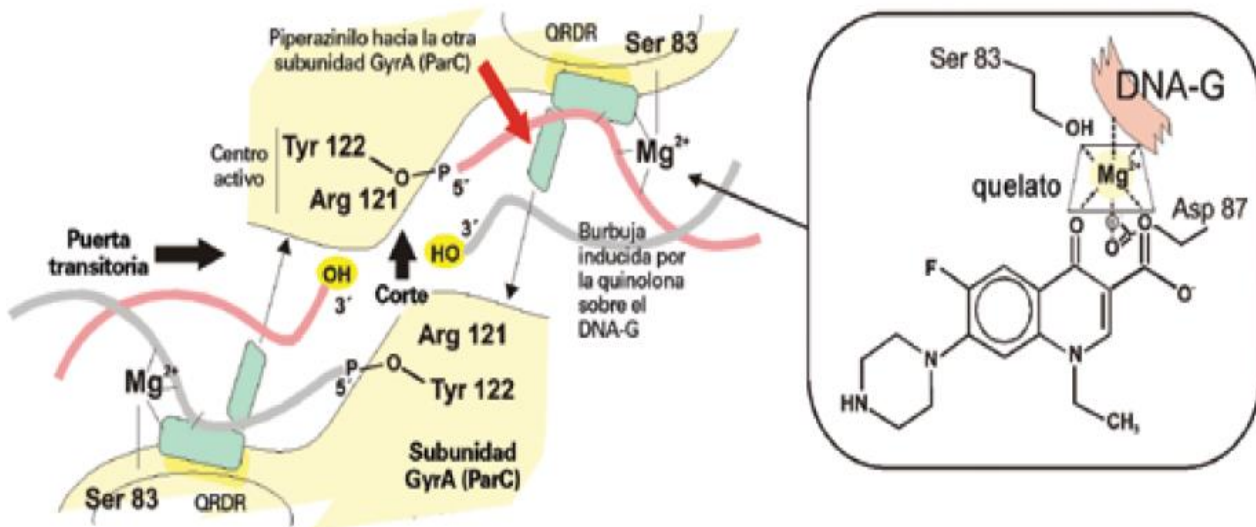
Figura 1-4: Composición de la ADN girasa y mecanismo de acción. (A). La ADN girasa es un heterotetrámero compuesto por dos monómeros de subunidades A (azul) y dos de subunidad B (amarillo). (B) (1) En primer lugar, la ADN girasa se une a un dúplex de ADN por la región denominada fragmento G (del inglés "gate"). (2-3). La unión del ATP a los dos dominios N-terminales los aproxima. El cambio conformacional provoca la incisión del fragmento G en ambas hebras y la unión de otro dúplex de ADN, el fragmento T. (4-5) A continuación el fragmento T atraviesa el hueco en el fragmento G dirigiéndose a la parte inferior de la enzima. La hidrólisis del ATP devuelve a la enzima a su estado inicial con el fragmento G aún unido. Imagen tomada de Nollmann *et al* (2007).



La acción inhibitoria del antibiótico depende de su concentración efectiva en el citosol bacteriano, sin embargo, para alcanzar las dianas terapéuticas las fluoroquinolonas necesitan atravesar la membrana externa en bacterias Gram negativas y posteriormente la membrana citoplasmática, para ello en algunos casos las moléculas más hidrofílicas pueden atravesarla por medio de las porinas y las más hidrófobas lo hacen por difusión a través de las membranas (Rodríguez-Martínez, 2005).

Una vez en el interior de la célula las quinolonas interactúan con los complejos que se forman entre el ADN y las topoisomerasas II y IV, creando alteraciones conformacionales que resultan en la inhibición de la actividad enzimática normal. La enzima queda atrapada en el complejo fármaco-enzima-ADN (Figura 1-5) (Hooper, 2001). Estas interacciones crean un "cerrojo" a las topoisomerasas, las cuales no pueden efectuar el movimiento (impulsado por ATP) para separar las hebras de ADN, inhibiendo la replicación, al desarrollar una barrera física que impide el movimiento de la horquilla de replicación, ARN polimerasa y ADN helicasa (Froelich-Ammon y Osheroff, 1995; Hooper, 2001).

Figura 1-5: Formación del complejo ADN - quinolona. Hipotéticamente, la quinolona forma un quelato con el ion Mg^{2+} , de ese modo se produce un complejo estable. Imagen tomada de Serra (2008).

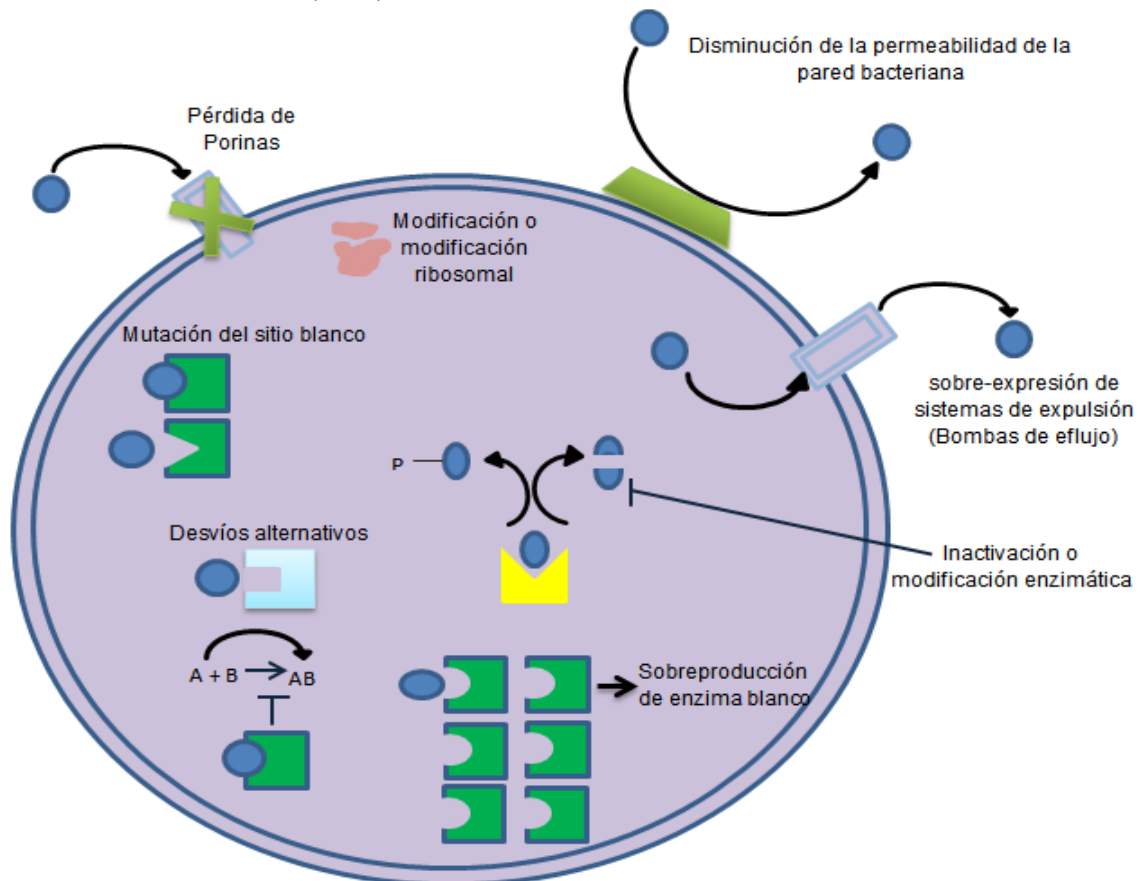


1.3. Antibióticos del tipo quinolonas:

La *P. aeruginosa* es naturalmente resistente a una gran variedad de familias de antibióticos debido principalmente a la presencia de una membrana externa poco permeable, a la presencia de β -lactamasa de amplio espectro inducibles y a un sistema de bombas de expulsión activa de antimicrobianos. Además, este patógeno tiene una elevada capacidad para adquirir resistencia mediante diversos mecanismos a los antibióticos, generando una preocupación a nivel mundial por la aparición de cepas resistentes a múltiples fármacos en aislados de *P. aeruginosa* que complican el tratamiento y la evolución de pacientes infectados (Rodríguez-Martínez, 2005; Lee *et al* 2005).

En la actualidad se conocen ocho mecanismos de resistencia bacteriana, los cuales pueden coexistir en una misma bacteria e interactuar de forma sinérgica, incrementando significativamente los niveles de resistencia antibiótica (Figura 1-6) (Coates *et al*, 2002).

Figura 1-6: Mecanismos de resistencia antibiótica presentada por bacterias. Imagen tomada y modificada de Coates *et al* (2002).



Sin embargo, de todos los mecanismos de resistencia establecidos, se han descrito cuatro para el caso de las quinolonas, de los cuales tres son cromosómicos y uno transmitido por plásmidos (Estrín *et al*, 2002; Hooper, 2001):

1. Mutaciones en los genes que codifican las topoisomerasas bacterianas II y IV.
2. Disminución de la permeabilidad de la pared bacteriana por alteraciones en la expresión de proteínas de la membrana externa (porinas).
3. Excreción activa del antimicrobiano por sobre-expresión de sistemas de expulsión.
4. Resistencia mediada por plásmidos.

En cuanto al primero, es el más importante de resistencia a quinolonas en *P. aeruginosa*. Mutaciones en los genes que codifican para las subunidades A y B de la ADN girasa (Hooper, 1998). Se ha descrito que cambios en los aminoácidos pertenecientes a cualquiera de estas subunidades serian causantes de la resistencia observada. Cambios en la subunidad A de la ADN girasa, en una región conocida como Región Determinante de la resistencia a Quinolonas (QDRD por sus siglas en inglés), localizada entre los aminoácidos 67 y 106 (Heddle y Maxwell, 2002), se han relacionado con un aumento de aproximadamente 20 veces en la resistencia antibiótica. Las mutaciones en los aminoácidos 67, 81, 82, 83, 84, 87 y 106 de la subunidad A han demostrado ser responsables del desarrollo de resistencia a quinolonas en *E. coli* (Ruiz, 2003), mientras que para *P. aeruginosa* se ha podido determinar que la resistencia se presenta con una mayor incidencia y efecto cuando se presentan mutaciones en los aminoácidos Thr83Ile, Asp87Gly y Asp87Asn de la misma subunidad como se muestra en algunos estudios presentados en la tabla 1-1.

Tabla 1-1: Mutaciones observadas en asilados clínicos de *P. aeruginosa*.

Antibiótico(s)	Mutación*	Descripción del estudio	Referencia
ciprofloxacina ofloxacina norfloxacina tosufloxacina	Thr83Ile Asp87Tyr Asp87Asn	Ubicación: Japón; Número de aislados: 160; Mutación más frecuente: Thr83Ile. Se reportaron adicionalmente tres tipos de mutaciones dobles: Thr83Ile y AspGly87; Thr83Ile y Asp87Asn; Thr83Ile y Asp87His.	Yonezawa <i>et al</i> , 1995
ciprofloxacina	Thr83Ile Asp87Gly	Ubicación: Francia; Número de asilados: 30. Mutación más frecuente: Thr83Ile (90%).	Mouneimné <i>et al</i> , 1999
ciprofloxacina levofloxacina clinafloxacina trovafloxacina gatifloxacina	Thr83Ile Asp87Tyr Asp87Gly Asp87His Asp87Asn	Ubicación: Europa; Número de asilados: 58. Mutación más frecuente: Thr83Ile.	Higgins <i>et al</i> , 2003
ciprofloxacina	Thr83Ile Asp87Asn Gln106Leu	Ubicación: Corea; Número de asilados: 102. Mutación más frecuente: Thr83Ile. En este estudio, se reportó una nueva mutación, Gln106Leu.	Lee <i>et al</i> , 2005
ciprofloxacina	Thr83Ile Asp87Asn Asp87Gly	Ubicación: Polonia; Número de asilados: 73, 25 (34,25%) presentaron resistencia a ciprofloxacina. Mutación más frecuente: Thr83Ile (16/25). En este estudio, se reportó una nueva mutación, Gln106Leu.	Wydmuch <i>et al</i> , 2005
ciprofloxacina levofloxacina	Thr83Ile	Ubicación: Canadá; Número de asilados: 150. Mutación más frecuente: Thr83Ile.	Hansen <i>et al</i> , 2006
ciprofloxacina	Thr83Ile	Ubicación: Chile; Número de asilados: 25. Mutación más frecuente: Thr83Ile.	De la Fuente <i>et al</i> , 2007
ciprofloxacina	Thr83Ile Asp87Asn Thr83Val Asp87His Asp87Gly	Ubicación: Alemania; Número de asilados: 22, 12 de pacientes con Fibrosis Quística (FQ) y 10 de pacientes sin FQ. Se encontró que el 91% presentaban mutaciones en GyrA. Se encontró que el mecanismo más frecuente fue la sobreproducción de MexXY-OprM.	Henrichfreise <i>et al</i> , 2007
levofloxacina	Thr83Ile Asp87Tyr Asp87Asn	Ubicación: Japón; Número de asilados: 114, 22 (19.3%) presentaron resistencia a levofloxacina. Mutación más frecuente: Thr83Ile (48/114). Se detectaron adicionalmente tres mutaciones en parC (Ser87Leu, Ser87Trp y Glu91Arg) detectadas solas o en combinaciones.	Matsumoto, 2012
ciprofloxacina	Thr83Ile His80Arg	Ubicación: Libano; Número de asilados: 38. Mutación más frecuente: Thr83Ile (19/38). Uno de ellos presenta una nueva mutación (His80Arg), 8 (21,05%) cepas tenían una mutación adicional en el gen parC (Ser80Leu). Una de estas cepas tenía dos nuevas mutaciones no reportadas anteriormente Gln84Asp, Ala85Gly.	Salma <i>et al</i> , 2013
ciprofloxacina	Thr83Ile Asp87Tyr Asp87Gly Asp87His Asp87Asn	Ubicación: Taiwan; Número de asilados: 232, 178 (76.7%) presentaron resistencia a ciprofloxacina. Mutación más frecuente: Thr83Ile.	Wang <i>et al</i> , 2014

* Mutaciones en la subunidad A de ADN girasa relacionada con resistencia al antibiótico (s) estudiado (s)

En cuanto al segundo mecanismo, se refiere a una forma de resistencia que consiste en la pérdida de porinas por parte de la célula bacteriana; las porinas son proteínas presentes en la membrana externa de las bacterias Gram negativas que se encargan de transportar sustancias al interior de la célula (Peleg y Hooper, 2010). *P. aeruginosa* tiene por lo menos tres porinas: OprB, OprP/O y OprD (Martínez, 2007). La proteína OprD fue identificada inicialmente como la porina que se pierde cuando aislados clínicos de *P. aeruginosa* se hacen resistentes a antibióticos B-lactámicos; se caracteriza por ser el homólogo en *P. aeruginosa* de la porina OmpF de *E. coli*, la ausencia o disminución de la expresión de esta proteína en cepas de *E. coli* mutantes está relacionada con una disminución de la sensibilidad a algunas quinolonas (Van Bambeke *et al*, 2005). Todas las quinolonas pueden cruzar la membrana externa a través de las porinas, pero solamente las más hidrofóbicas pueden atravesar la capa lipídica. Las alteraciones en la expresión de porinas, sobretodo de OmpF, o mutaciones, suponen una disminución en la entrada de la quinolona a la célula, aunque otros antimicrobianos y sustancias puedan ser afectadas (Van Bambeke *et al*, 2005). La porina OmpC en *E. coli* y las Ompk35 y Ompk36 en *Klebsiella pneumoniae*, homólogas de OmpF y OmpC, han sido también descritas como implicadas en la resistencia a quinolonas. Este mecanismo de resistencia generalmente permite el paso de cierta cantidad del antimicrobiano, por lo tanto su entrada no es evitada completamente; por esto, la resistencia resulta de la combinación de fallas en la permeabilidad de la membrana sumado a otros mecanismos de resistencia (Van Bambeke *et al*, 2005).

Con respecto a los sistemas de expulsión activa, conocidos también como mecanismos de extrusión, es un mecanismo común en especies de Gram positivas y Gram negativas (más complejos en las segundas por las características estructurales de la pared celular). Esta forma de resistencia dependiente de energía es debida a la presencia de antiportes acoplados al gradiente de H⁺ que genera la cadena respiratoria; por consiguiente, es propia de bacterias aerobias. Estos sistemas de expulsión activa consisten en transportadores multifármaco codificados por genes cromosómicos endógenos que pueden transportar una amplia variedad de sustratos, incluyendo antimicrobianos como quinolonas, anfenicoles, aminoglucósidos, betalactámicos, macrólidos, tetraciclinas, que a su vez impiden que se alcancen las concentraciones terapéuticas requeridas en el citosol (Poole, 2005; Rodríguez-Martínez, 2005). La resistencia a quinolonas, en especial

a las fluoroquinolonas (fármacos más efectivos dentro del grupo de las quinolonas para el tratamiento de infecciones causadas por *P. aeruginosa* resistentes), también es resultado de la disminución de la acumulación del fármaco al interior de la célula bacteriana. (Ruiz, 2003).

En gérmenes Gram-negativos estos sistemas de expulsión activa pertenecen a la superfamilia RND (resistencia, nodulación y división celular, como el AcrAB-TolC de *E. coli* o el MexABOprM de *P. aeruginosa*) sin equivalentes eucariotas, pero capaces de extruir muchos compuestos tóxicos para las bacterias. Los componentes RND están formados por tres estructuras asociadas que se extienden desde la membrana interna hacia la externa, atravesando ambas y el espacio periplásmico (Rodríguez-Martínez, 2005). El componente interno (bomba) se asemeja a los transportes MFS (facilitadores mayores de la extrusión, como el Pmr de *S. pneumoniae* y NorA de *S. aureus*) ya que tiene 12 segmentos transmembranales pero con extensos dominios extracelulares; en cambio el externo es una proteína trimérica canalicular con estructura en tonel semejante a las porinas. El componente medio no ha sido aún caracterizado pero es necesario para el funcionamiento eficiente del sistema RND. Todas estas proteínas están codificadas por genes organizados en operones bajo el control de los regulones *marAB* y *soxRS*. La diferente cantidad de genes que codifican estos sistemas en las distintas especies es a la vez factor causal e impacto de esta forma de resistencia. Sin embargo, en gérmenes multirresistentes se ve además sobreexpresión de los transportadores por mutaciones de sus promotores que afectan la tasa de transcripción. Por ello, estos mecanismos han cobrado importancia en los últimos años, dado que su expresión en cepas con grados intermedios de resistencia por polimorfismo puede potenciarla notablemente (Van Bambeke *et al*, 2005; Rodríguez-Martínez, 2005).

Con respecto al mecanismo de resistencia mediada por plásmidos, se ha descrito que aumenta la resistencia de 4 a 8 veces (Martínez *et al*, 1998; Rodríguez-Martínez, 2005) y complementa a los otros mecanismos de resistencia ya descritos (Tran y Jacoby, 2002). Actualmente no se han descrito mecanismos de resistencia mediados por plásmidos en bacterias Gram-positivas, pero si se ha observado este mecanismo en bacterias Gramnegativas tales como *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. El mecanismo en si está mediado por un gen plasmídico llamado *qnr* (del inglés “quinolone resistance”) (Martinez *et al*, 1998). El gen *qnr* parece no tener efecto en la acumulación de quinolona

intracelular, ni genera la inactivación del antibiótico. Mediante ensayos de superenrollamiento, se ha estudiado el efecto directo generado por la proteína Qnr; al menos *in vitro*, Qnr protege a la ADN girasa de la inhibición por parte de ciprofloxacina (Robicsek *et al*, 2006) y parece que la Topoisomerasa IV (diana secundaria de las quinolonas) también se protege de la acción de estos antibióticos por Qnr. La proteína Qnr pertenece a la familia de pentapéptidos repetidos, en la cual se encuentran las proteínas McbG y Mfpa que guardan homología con Qnr. McbG protege a la ADN girasa del efecto inhibitorio de algunas quinolonas (Jacoby *et al*, 2003). Por otra parte, la expresión del gen *mfpa* tiene como resultado un incremento de 4 a 8 veces en la CMI a ciprofloxacina en *Mycobacterium segmentatis* mientras que la inactivación del mismo genera un incremento de la susceptibilidad a ciprofloxacina (Montero *et al*, 2001).

1.4. Acoplamiento molecular (*Docking*):

Dentro de los métodos computacionales en el estudio de moléculas con potencial farmacológico se encuentra el acoplamiento molecular, el cual a partir de modelos tridimensionales permiten predecir la conformación que asumiría preferiblemente una molécula al estar unida a otra en la conformación de un complejo estable. Estos métodos pueden estar basados en la estructura de una proteína diana como por ejemplo receptores, y se puede realizar un acople con una molécula prototipo con el fin de determinar y optimizar la unión del ligando a dicha proteína diana (Kontoyianni *et al*, 2004). A partir del complejo generado por el acople de un ligando a un receptor en 3D se puede llegar a conocer la orientación y la conformación preferida del ligando, la cual a su vez puede ser utilizada para predecir la afinidad o fuerza de asociación de la interacción generada en dicho complejo a partir de funciones de puntuación (Lyne, 2002; Oprea y Matter, 2004).

El acoplamiento molecular es un término general que engloba métodos teóricos y técnicas computacionales para modelar, imitar y predecir el comportamiento de moléculas cuando interactúan entre sí. Las técnicas y métodos utilizados se encuentran en un amplio rango de campos de la física incluyendo la termodinámica, mecánica clásica, mecánica estadística, mecánica cuántica, física matemática y ciencia de materiales, la química computacional y la bioquímica para el estudio de sistemas

moleculares (Lui *et al*, 2011).

El modelado de la interacción de un fármaco con su receptor representa un reto complejo debido a dos razones fundamentales:

- La intervención de múltiples fuerzas energéticas involucradas en dicha interacción molecular, incluyendo fuerzas hidrofóbicas, de van der Waals, enlaces de hidrógeno e interacciones de tipo electrostático, entre otras. Sin embargo, es importante tener en cuenta que cada una de éstas interviene generando uniones más o menos fuertes; dentro de las principales fuerzas de unión se encuentran a las interacciones hidrofóbicas (Nadendla, 2004).
- Los múltiples grados de libertad permitidos dentro de la generación de los modelos de interacción, así como de las condiciones de desarrollo de las mismas (Nadendla, 2004).

En el proceso de acoplamiento molecular se requiere:

- Tener la estructura tridimensional del ligando que brinde las características adecuadas para el posterior proceso de acoplamiento molecular.
- Poseer la estructura o el modelo tridimensional de la proteína diana o blanco molecular obtenida por metodologías como RMN, cristalografía de rayos X o métodos computacionales (Kontoyianni, 2004).
- Determinar el sitio de unión del ligando dentro de la proteína definiendo un espacio tridimensional conocido como *grid* o rejilla, en el cual el ligando pueda moverse libremente y tomar las posiciones energéticamente favorables. Este *grid* puede abarcar la proteína completa o una porción específica dependiendo de si se conoce o no el sitio específico de unión del ligando en la proteína diana.
- Generar las diferentes conformaciones tridimensionales que puede tomar el ligando dentro de la proteína diana, con el fin de identificar la geometría correcta (*Pose*) con la cual el ligando se acopla (Kontoyianni, 2004).

- Realizar la predicción de la afinidad de la unión entre el ligando y la proteína diana por medio de funciones de puntuación, las cuales permiten identificar las orientaciones del ligando con mayor afinidad a su blanco molecular (Kontoyianni, 2004).

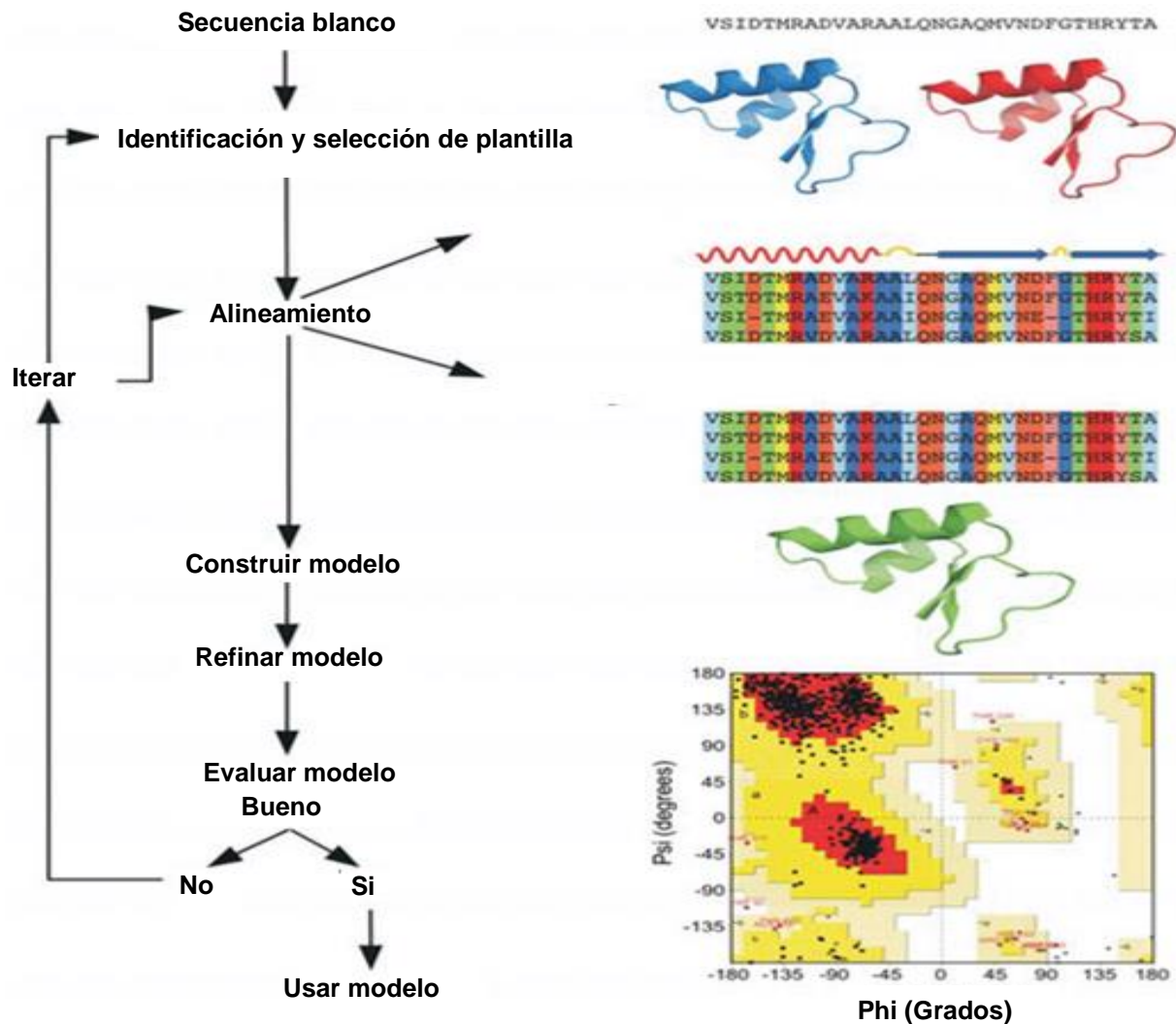
Dentro de los programas computacionales implementados para el modelamiento molecular se pueden encontrar diferentes opciones que presentan una alternativa para el desarrollo y avance investigativo. Sin embargo, el análisis puntual para la determinación del programa adecuado para realizar el proceso depende en su totalidad de los requerimientos establecidos inicialmente en cuanto a los sustratos sobre los que se plantea realizar el proceso. Actualmente, a nivel académico e industrial existen diversos programas para realizar el proceso de *docking*, como por ejemplo *AutoDock*, *DOCK*, *GOLD*, *LigandFit*, *FlexX* y *Glide*, entre otros, los cuales se diferencian principalmente en el tipo de algoritmo que cada uno emplea para explorar la superficie conformacional accesible por el ligando al sitio de unión y las funciones de puntuación para la determinación de la afinidad. (Kontoyianni, 2004).

1.5. Modelado por homología:

El modelado comparativo de proteínas es uno de los más empleados para la obtención de modelos tridimensionales; se fundamenta en la construcción de modelos de la proteína problema a partir de proteínas molde con funciones relacionadas y estructuras 3D determinadas experimentalmente (Zhang *et al*, 2010). Se basa en el concepto de evolución molecular y supone que la similitud entre las estructuras primarias de una proteína con otra (proteínas homólogas) implica una similitud a nivel estructural entre estas cadenas (Santos y Bicca, 2003). Este método considera que las proteínas que comparten el armazón principal de su estructura y la función de esos productos génicos son determinadas fundamentalmente por las cadenas laterales de los diferentes aminoácidos que las componen. De tal manera que un modelado preciso de los residuos de la columna vertebral de la proteína puede generar una información crucial en la evaluación del cálculo de las estructuras de las proteínas a modelar (Ozlem *et al*, 2008).

Los métodos de modelado por homología de proteínas implican básicamente cuatro etapas sucesivas con diversas herramientas computacionales disponibles para cada paso (Figura 1-7), que se describen a continuación:

Figura 1-7: Ilustración simplificada del proceso de modelado por homología. El primer paso involucra la recuperación de secuencias homólogas para la construcción de un alineamiento. Este alineamiento servirá como andamiaje en el cual el modelo se construirá. El siguiente paso implica el ajuste del alineamiento utilizando datos externos tales como información de la estructura secundaria, patrón conocido y las características conservadas. Esto ayuda a crear un alineamiento preciso, seguido por la construcción del modelo mediante un software. Este paso es generalmente muy rápido (unos pocos minutos). Después de que el modelo se ha construido, tiene que ser inspeccionado y refinado, en algunos casos se sigue un proceso iterativo en el que se construye el modelo, es inspeccionado y luego ajustado, seguido por una reconstrucción del mismo. Imagen tomada y modificada de Ozlem *et al* (2008).



El primer paso del método es la identificación de al menos una estructura tridimensional conocida de la proteína que pueda servir como plantilla para la determinación de la estructura de la proteína problema. El método más sencillo es buscar sistemáticamente uno o más moldes adecuados en las bases de datos de estructuras de proteínas almacenadas en formato PDB. Se puede utilizar BLAST como algoritmo de búsqueda. Estos métodos a menudo sugieren varias plantillas de candidatos (Santos y Bicca, 2003). El ideal es identificar la plantilla (s) que tiene el porcentaje de identidad más alto a la diana, la resolución más alta, y estructuras con (o sin) ligandos y / o cofactores apropiados (Ozlem *et al*, 2008).

Si el grado de identidad entre las estructuras primarias de la proteína-molde y la proteína-problema es igual o superior al 25% cuando el número de residuos es mayor que 80, hay una gran probabilidad de que estas proteínas tengan estructuras tridimensionales similares, y por lo tanto construir un modelo adecuado para la proteína problema (Santos y Bicca, 2003). Sin embargo, otros autores como Rost (1999), Anderson (2003) y Levitt (2007), recomiendan que el porcentaje de identidad entre secuencias no debe ser menor a un 50% para realizar modelos apropiados

Cuando la identidad entre secuencias es menos de 25%, la mejor manera de abordar el problema es utilizar métodos de compatibilidad entre secuencia y estructura "*threading*". Estos métodos se basan en la evaluación de la compatibilidad entre las estructuras terciarias de la proteína problema y de potenciales proteínas molde. Es decir, se escoge una proteína molde cuya estructura terciaria sea la "más adecuada" en relación a la secuencia de la proteína problema (Santos y Bicca, 2003).

1.5.2. Etapa 2: Alineamiento de las secuencias de residuos:

Una vez definido el molde, se pasa al alineamiento de la secuencia problema con la secuencia molde o plantilla. El propósito es alinear estructuralmente residuos equivalentes, teniendo en cuenta características estructurales comunes, tales como elementos de estructura secundaria y residuos catalíticos (Ozlem *et al*, 2008).

Este paso implica la creación de un alineamiento de la secuencia diana con la secuencia (s) plantilla (s). Las secuencias de la proteína problema y la plantilla se pueden alinear

con todas las secuencias relevantes recuperadas a través de diversos programas computacionales tales como BLAST, Fasta, CLUSTAL y Muscle, entre otros (Ozlem *et al*, 2008).

El alineamiento puede ser optimizado manualmente. Mediante la inclusión de información biológica como el medio ambiente de solvatación de un aminoácido, los cambios de información en el alineamiento se pueden hacer por el usuario. Este tipo de información no está a menudo disponible para el programa de alineamiento. (Ozlem *et al*, 2008).

1.5.3. Etapa 3: Construcción del modelo de coordenadas y refinamiento:

Aunque la teoría detrás de la construcción de un modelo por homología de proteínas es complicada, usando programas disponibles es relativamente sencillo. Varios programas de modelización están disponibles, utilizando diferentes métodos para construir las estructuras 3D. En los métodos de correspondencia del segmento, el objetivo se divide en segmentos cortos, y el alineamiento se realiza sobre segmentos en lugar de sobre la proteína completa (Ozlem *et al*, 2008).

- Modelado de las regiones estructuralmente conservadas:

La ubicación en el espacio tridimensional del mayor número posible de átomos de la proteína problema depende del alineamiento. La construcción del interior de la proteína problema se basa en la idea de que la conformación de la estructura de la cadena principal de la proteína molde puede ser similar a la de la proteína problema. Hay muchos métodos de modelización de estas regiones conservadas. Los más importantes son el modelado por ensamblaje de cuerpos rígidos ("modeling by rigid-body assembly"), modelado por apareamiento de segmentos ("modeling by segment matching") y modelado por satisfacción de limitaciones espaciales ("modeling by satisfaction of spatial restraints") (Santos y Bicca, 2003).

- Modelado de las regiones asas:

Las diferencias funcionales entre los miembros de la misma familia de proteínas son, en general, una consecuencia de las diferencias estructurales en la superficie exterior de las proteínas. Estas diferencias provienen de sustituciones, deleciones e inserciones de

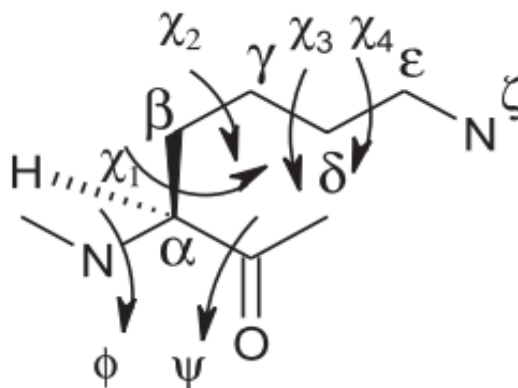
residuos en las cadenas de proteínas homólogas, especialmente las asas, las regiones más expuestas de la proteína. Debido a que son estructuralmente regiones variables, las asas generalmente determinan la especificidad de las proteínas, contribuyendo a la estructura de los sitios de unión. Por lo tanto, el modelado de las regiones asas es un paso esencial en la generación de modelos de proteínas por homología (Santos y Bicca, 2003).

El modelado de las asas puede ser visto como un problema en el plegamiento de proteínas. La conformación de un segmento de la cadena polipeptídica se debe obtener de su secuencia. Las asas, sin embargo, suelen ser pequeñas y esto provoca distorsiones de plegado difíciles de evaluar *a priori*. Por otra parte, la conformación de un segmento dado (asas) está influenciada por el resto de la estructura de la proteína. En otras palabras, la conformación de los bucles debe tener una baja energía interna y no interactuar de manera adversa con el resto de la proteína. Debido a estas complicaciones, la modelización de las asas es sin duda la etapa más difícil de la predicción de los modelos de proteínas. Por lo tanto, es en estas regiones que la probabilidad de errores de modelado es mayor (Santos y Bicca, 2003).

- Modelado de las cadenas laterales:

Como en el caso de las asas, la conformación de las cadenas laterales también se modela a partir de datos estéricos y energéticos de estructuras similares obtenidas experimentalmente. El modelado se realiza con la ayuda de base de datos de rotámeros permitidos de cadenas laterales (χ_n) derivado de estructuras terciarias del PDB de alta resolución. La Figura 1-8 define esquemáticamente el ángulo de torsión de las proteínas implicadas en el análisis (Santos y Bicca, 2003).

Figura 1-8: Definición de ángulos de torsión de la cadena principal (ϕ y ψ) y cadenas laterales (χ_n). Imagen tomada de Santos y Bicca (2003).



El uso de "bibliotecas" de las cadenas laterales de proteínas permite la estimación de la probabilidad de cada cadena lateral para asumir una conformación particular (χ_n) en función de la conformación de los ángulos de la cadena principal (ψ y ϕ) y el tipo de residuo. La precisión aproximada del método es 82% para el ángulo diedro χ_1 y de 72% para los diedros χ_1 y χ_2 , tomados simultáneamente. Esta precisión se consigue, por pares de estructuras que comparten 30 a 90% de identidad. (Santos y Bicca, 2003).

El modelo inicial puede tener ángulos de enlace y longitudes subóptimas. Tales deficiencias pueden ser ajustadas por un procedimiento de minimización de energía, pero una dificultad es que se mueven átomos hacia un mínimo local, que puede no ser el mínimo global sobre todas las conformaciones posibles (Ozlem *et al*, 2008).

- Optimización del modelo generado:

Después de la construcción del modelo de la proteína problema es necesario optimizarlo. Las interacciones desfavorables entre átomos no enlazados, energías de torsión y ángulos de enlace son optimizadas por mecánica molecular. Como regla general, esta optimización no puede ser extensiva, ya que puede desviar el modelo de su proteína-molde. En consecuencia, las medidas de optimización y validación del modelo se deben realizar de forma simultánea (Santos y Bicca, 2003).

1.5.4. Etapa 4: Validación del modelo:

La validación es un paso esencial que se puede realizar en diferentes niveles de organización estructural. Se debe evaluar la calidad de la conformación global de la proteína, posibles errores estructurales en regiones localizadas y parámetros estereoquímicos (Santos y Bicca, 2003).

Como la calidad del modelo depende en gran medida de la estructura de la proteína molde utilizada, es necesario que esta última haya sido obtenida con una buena resolución y un factor-R satisfactorio. Es preferible usar como plantillas estructuras cuya resolución sea igual o menor a 2.0 Å (Santos y Bicca, 2003).

El primer requisito que una proteína correctamente modelada debe cumplir es tener una estructura terciaria satisfactoria. Su calidad depende de la proteína elegida como molde o plantilla y del alineamiento calculado. Es importante comprobar si existen grandes diferencias conformacionales inexplicables entre los elementos de estructura secundaria (regiones conservadas) de la estructura molde y la estructura modelada (Santos y Bicca, 2003).

La calidad estereoquímica del modelo es de fundamental importancia. El programa más utilizado en la evaluación de los parámetros estereoquímicos, PROCHECK, evalúa las longitudes de enlace, ángulos planos, planaridad de las cadenas laterales de los anillos, su quiralidad, conformaciones de las cadenas laterales, planaridad de los enlaces peptídicos, ángulos de torsión de la cadena principal y de la cadena lateral, impedimento estérico entre pares de átomos no ligados y la calidad del gráfico de Ramachandran (El gráfico de Ramachandran es particularmente útil porque define los residuos que se encuentran en las regiones energéticamente más favorables y desfavorables y orienta la evaluación de la calidad de los modelos teóricos o experimentales de proteínas) (Santos y Bicca, 2003).

También es necesario evaluar las interacciones entre la estructura modelada y el medio (esencialmente agua). En este tipo de análisis se puede utilizar el programa WHATCHECK, que da información sobre la formación de regiones hidrofóbicas, accesibilidad de residuos y átomos a moléculas de disolvente (agua), distribución

espacial de grupos iónicos, distribución de las distancias atómicas y enlaces de hidrógeno de la cadena peptídica principal. En el mismo contexto, el programa PROSAIL evalúa el ambiente de cada aminoácido de la proteína modelada (validación localizada), teniendo como referencia al entorno de las proteínas análogas de alta resolución (Santos y Bicca, 2003).

2. Materiales y Métodos

El presente trabajo corresponde a un estudio computacional de tipo descriptivo y analítico.

2.1. Materiales:

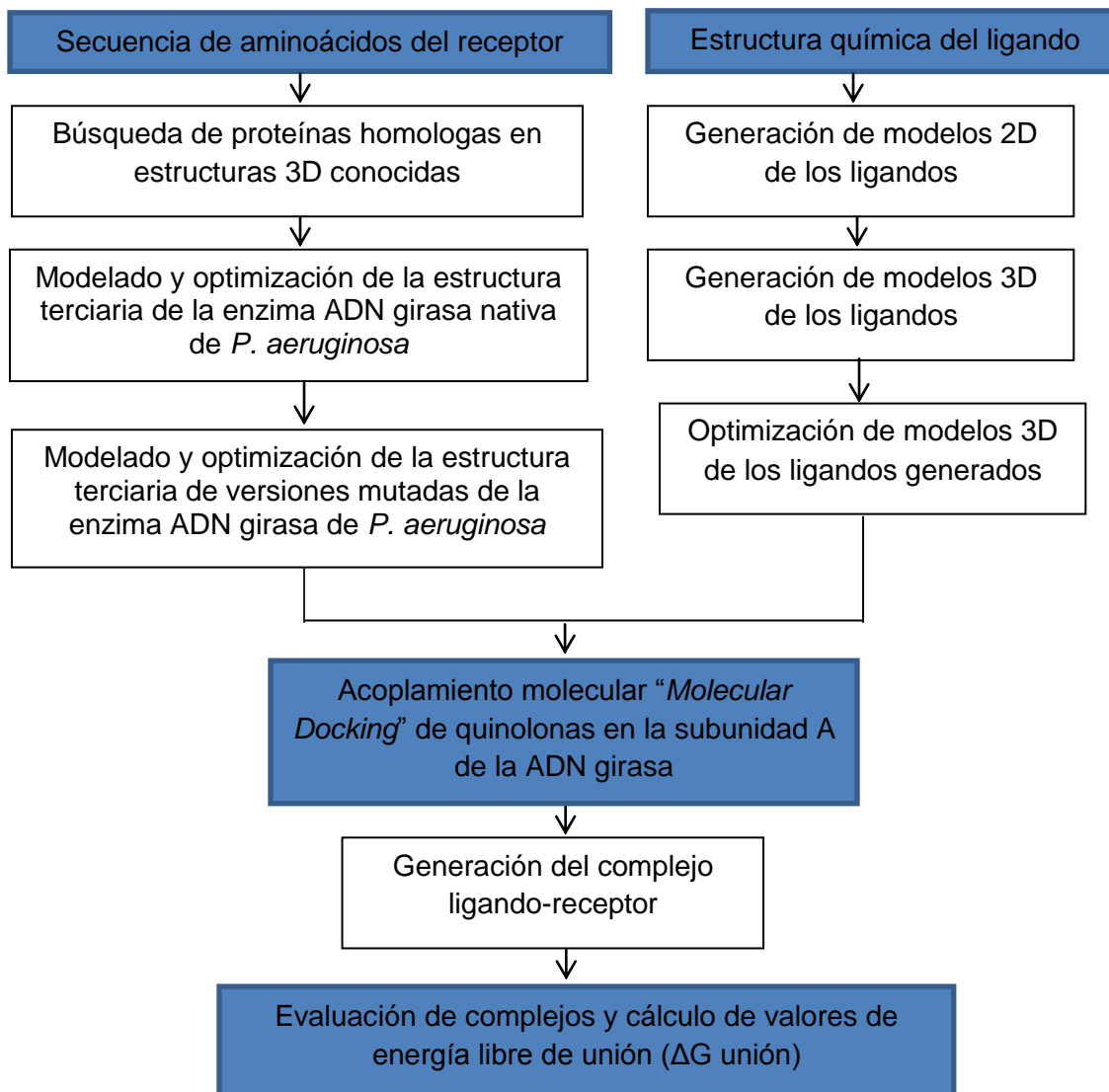
2.1.1. Equipos:

Para el desarrollo del presente proyecto se utilizó un equipo TOSHIBA Satellite S55-A Intel (R) Core (TM) i7-4700MQ CPU @ 2.40 GHz x64. Ram 8,00 GB con sistemas operativos Windows XP, 7, 8 y Linux.

2.2. Metodología:

En el diagrama a continuación (Figura 2-1) se muestra la estrategia general implementada en el presente estudio para la generación de los modelos de interacción molecular entre quinolonas y la enzima ADN girasa A:

Figura 2-1: Secuencia metodológica del estudio computacional



2.2.1. Modelado de la estructura terciaria de la enzima ADN girasa nativa de *P. aeruginosa*:

Para poder modelar la estructura tridimensional de la enzima blanco se tomó la secuencia de aminoácidos de la subunidad A de la enzima ADN girasa de *P. aeruginosa* cepa PAO1 de la base de datos *Pseudomonas Genome Database* (Winsor *et al*, 2011;

Stover *et al*, 2000). Esta secuencia corresponde exclusivamente a la subunidad A de la enzima; se hace claridad que en este trabajo se modeló sólo una de las dos subunidades de la enzima (la subunidad A).

Con base en la secuencia seleccionada se buscaron proteínas homólogas mediante un alineamiento local utilizando el programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) en su modalidad BLASTP (*protein BLAST*) cuyo algoritmo permite para comparar secuencias de aminoácidos (Altschul *et al*, 1990).

Una vez realizado el proceso de alineamiento se seleccionaron las proteínas que presentaron el mayor porcentaje de identidad y cuyas estructuras tridimensionales estuviesen elucidadas y reportadas en la base datos del *Protein Data Bank* (Berman *et al*, 2000).

Las estructuras 3D seleccionadas se descargaron de la base de datos del *Protein Data Bank* y fueron utilizadas luego para la construcción del modelo computacional de la estructura terciaria de la subunidad A de la enzima girasa de *P. aeruginosa*. Este proceso se efectuó mediante programas computacionales de distribución o acceso libre, basados en análisis de homología de secuencias aminoacídicas. Los programas que se utilizaron fueron:

SWISS-MODEL: Es un servidor totalmente automatizado para el desarrollo de modelos proteicos estructurales basados en homología (Schwede *et al*, 2003; Bordoli *et al*, 2009). El servidor se alimentó con la secuencia de aminoácidos de la proteína problema y el archivo de la estructura 3D en formato PDB de la proteína molde. Se utilizaron parámetros por defecto en la plataforma *on line*.

La calidad de los modelos desarrollados con esta plataforma computacional se evaluó mediante la función de puntuación QMEAN4, que es una función compuesta por una combinación lineal de cuatro descriptores estructurales que utilizan potenciales estadísticos (Benkert *et al*, 2008):

- La geometría local, la cual es analizada por un ángulo potencial de torsión que involucra más de tres aminoácidos consecutivos.
- Dos potenciales de interacción dependientes de la distancia son utilizados para evaluar las interacciones de largo alcance:

- El primer potencial a nivel de residuos basada solamente en átomos de C-beta
- Y el segundo potencial a nivel de todos los átomos.
- Un potencial de solvatación analiza el estado de inmersión de los residuos en el modelo.

La comparación de los valores otorgados a los diferentes descriptores permite evaluar y comprender las diferencias en calidad existentes entre los modelos generados (Benkert *et al*, 2011).

Finalmente, el valor generado como “QMEAN4” representa una medida de la calidad absoluta de un modelo, proporcionando una estimación de las características estructurales observadas en un modelo y describiendo la probabilidad de que un determinado modelo sea comparable en términos de calidad a las estructuras experimentales. Para este parámetro, se espera que los modelos de baja calidad posean puntajes QMEAN4 bajos (Benkert *et al*, 2011).

La estimación del valor promedio de calidad oscila entre 0 y 1, donde valores QMEAN4 cercanos al 1 corresponden a los mejores modelos.

I - TASSER: Es una plataforma *on-line* para predecir estructuras proteicas 3D. A diferencia de otras plataformas como *SWISS-MODEL* o *MODELLER 9v10*, este servidor funciona construyendo alineamientos múltiples con la secuencia problema que uno proporciona generando cinco estructuras 3D al comparar la secuencia problema con la de estructuras disponibles en la biblioteca de este servidor (Zhang, 2008; Roy *et al*, 2010). En consecuencia, en nuestro estudio este servidor fue alimentado solo con la secuencia de aminoácidos de la proteína subunidad A de ADN girasa de *P. aeruginosa*.

En este servidor los modelos se evaluaron mediante la función de puntuación *C-score*, un valor de confianza para la estimación de la calidad de los modelos predichos por I-TASSER; su cálculo se basa en el alineamiento con las secuencias molde y en parámetros de convergencia del esqueleto estructural simulado. La función de puntuación *C-score* está fuertemente correlacionada con la similitud del modelo final y las estructuras determinadas experimentalmente; típicamente se encuentra en un rango de -

5 a 2, en el que una puntuación más positiva refleja un modelo de mejor calidad. Cuando el valor de *C-score* es superior a -1,5 corresponde a modelos de topología correcta (Zhang, 2008).

Adicionalmente, esta plataforma computacional otorga como resultado valores experimentales de RMSD (*Root-mean-square-deviation*) y *TM-score* obtenidos en el modelado de las estructuras. El RMSD es una medida de la distancia media entre los átomos de dos estructuras posicionadas en el espacio. *TM-score* es una escala propuesta para la medición de la similitud estructural entre dos estructuras. Un *TM-score* superior a 0,5 indica un modelo correcto, mientras que una topología con un *TM-score* menor a 0,17 significa que el modelo predicho no es adecuado (Zhang, 2008; Roy *et al*, 2010; Yang *et al*, 2015).

MODELLER 9v10: Es un programa computacional de distribución libre. Los datos de entrada para la construcción del modelo fueron: un archivo en formato PDB (*Protein Data Bank*) de la proteína molde (a la cual se le conoce su estructura 3D) y la secuencia de aminoácidos de la proteína problema (Fiser y Šali, 2003; Eswar *et al*, 2007).

En este programa computacional los modelos desarrollados se compararon mediante las funciones de puntuación DOPE (*Discrete Optimized Protein Energy*) y GA341. DOPE es un potencial estadístico optimizado que se encuentra diseñado para evaluar la energía de los modelos generados; el modelo que presenta el menor valor DOPE corresponde al modelo más adecuado con esta plataforma (Fiser y Šali, 2003; Shen y Sali, 2006). MODELLER también evalúa la calidad del modelo mediante la función de puntuación GA341, la cual utiliza el porcentaje de similitud estructural entre la plantilla y el modelo como un parámetro. GA341 se califica en el rango [0,0 - 1,0], donde una puntuación cerca de 0,0 representa un modelo incorrecto y una puntuación de cerca de 1,0 representa un modelo adecuado (Eswar, 2007; Melo *et al* 2002).

2.2.2. Evaluación comparativa de la calidad de los modelos generados con distintas plataformas:

Dado que las plataformas computacionales utilizadas calculan parámetros de calidad para sus propios modelos, esto no permite comparar modelos generados con distintas

plataformas; con el fin de solucionar este problema, se requirió utilizar programas que permitieran evaluar la calidad de los modelos independientemente del programa utilizado para su creación. Se utilizaron los siguientes servidores:

Servidor QMEAN: Es un servidor Web cuya plataforma permite evaluar estructuras proteicas mediante perfiles energéticos (Benkert *et al*, 2009). Este servidor recibe como dato mínimo de entrada la secuencia de aminoácidos de la proteína problema y un archivo del modelo generado en formato PDB.

Este servidor calcula la función de puntuación QMEAN, una función compuesta que evalúa la calidad del modelo tanto a nivel local (residuo) como a nivel global (estructura). La estimación del valor promedio de calidad oscila entre 0 y 1, donde valores de QMEAN Score cercanos al 1 corresponden a los mejores modelos.

MolProbity: Es una plataforma *on-line*, que permite analizar la calidad de un modelo tanto a nivel local como global a partir de gráficos Ramachandran con el fin de validar la estructura 3D del modelo (Chen *et al*, 2010). Un modelo es válido y/o aceptado para estudios biomoleculares cuando el 90% de sus aminoácidos se encuentren en regiones permitidas (Hooft *et al*, 1997)

Con base en los servidor QMEAN y MolProbity se seleccionó un único modelo para representar la estructura tridimensional de la protiena ADN girasa A de *P. aeruginosa*.

El modelo tridimensional propuesto como el más adecuado, se evaluó en términos de calidad a través de los siguientes programas:

Verify3D: Es un método para evaluar las estructuras de proteínas. Este programa analiza la compatibilidad de un modelo atómico (3D) con su propia secuencia de aminoácidos (1D). A cada residuo se le asigna una clase estructural basado en su ubicación y entorno (alfa, beta, lazo, polar, apolar, etc), calificando cada residuo en porcentaje y considerándose valido por encima de 60% (Eisenberg *et al*, 1997).

Errat: Es un algoritmo de verificación que permite evaluar la estructura del modelo 3D de la proteína-problema. El programa trabaja mediante el análisis estadístico de las interacciones entre los diferentes tipos de átomos. De esta forma el programa califica la estructura con un nivel de confianza superior al 95%.

ProSAweb: Es un servidor web que permite realizar un análisis geométrico de la estructura de la proteína, determinando zonas problemáticas de la misma; a su vez permite evidenciar el perfil energético de la proteína. ProSAweb también evalúa la calidad local de la estructura señalando las posibles partes problemáticas del modelo, estas regiones tienden a estar asociadas con zonas de alta energía. El análisis del perfil energético empleando bloques discrimina las regiones problemáticas del modelo (Wiederstein y Sippl, 2007; Sippl, 1993).

2.2.3. Minimización energética del modelo final seleccionado:

El proceso de minimización energética se realizó con el fin de refinar la estructura de los modelos finales obtenidos para los estudios de acoplamiento molecular (Ozlem *et al*, 2008). Para ello se empleó el programa MAESTRO (Schrödinger, 2012), un visualizador gráfico del conjunto de programas de Schrödinger, dentro del cual se encuentran una serie de herramientas que permiten realizar la representación gráfica en un entorno versátil. Adicionalmente, permite realizar el análisis de estructuras. MAESTRO permite cargar la estructura proteica en formato PDB en su interfaz por medio de la opción *Protein Preparation Wizard*, la cual permite realizar preprocesos en estructuras proteicas como asignación de hidrógenos, remoción de moléculas de agua y procesos de minimización energética con el fin de obtener una estructura optimizada geoméricamente (Schrödinger, 2012).

Para el proceso de minimización energética se realizó una optimización geométrica, con el fin de minimizar las interacciones repulsivas y maximizar las atractivas de la estructura de la proteína obtenida. La optimización geométrica de los modelos para la subunidad A de la ADN girasa A de *P. aeruginosa* se realizó por mecánica molecular, utilizando el campo de fuerza OPLS2005 (Stortz *et al*, 2009), en 100 pasos o hasta alcanzar el punto de convergencia energética en el mínimo global. Este proceso permite refinar la proteína haciendo un reordenamiento espacial a su geometría disminuyendo así la energía en su conformación sin generar empaquetamiento de la estructura; lo que finalmente se busca es aumentar el número de aminoácidos de la estructura dentro de las regiones permitidas en la evaluación por gráficos de Ramachandran (Stortz *et al*, 2009).

En las minimizaciones de energía es importante la elección del campo de fuerza, de forma que se generen arreglos geométricos leves; no es recomendable hacer uso excesivo del campo de fuerza ya que esto conlleva a un reordenamiento y posteriormente a un empaquetamiento de las estructuras (Stortz *et al*, 2009). Campos de fuerza tales como AMBER y CHARMM modifican significativamente el modelo generando un empaquetamiento de la estructura final (Stortz *et al*, 2009).

2.2.4. Modelado de la estructura terciaria de versiones mutadas de la subunidad A de la ADN girasa de *P. aeruginosa*:

Con base en resultados previos de nuestro grupo se realizaron las siguientes mutaciones: Thr83Ile, Asp87Gly, y Asp87Asn, ya que estos cambios fueron relacionados con resistencia a ciprofloxacina (Caldera, 2010). Estas mutaciones se realizaron cambiando los aminoácidos específicos en la secuencia aminoacídica original de la proteína.

Posteriormente y siguiendo la misma metodología descrita para el desarrollo del modelo nativo (WT), se generaron y evaluaron las estructuras tridimensionales para cada una de las formas mutantes de la subunidad A de la ADN girasa de *P. aeruginosa*.

2.2.5. Preparación de las estructuras de los ligandos “antibióticos”:

Con base en la fórmula molecular del ácido nalidíxico, ciprofloxacina y levofloxacina, se construyeron las estructuras en formato 2D mediante el programa *MarvinSketch*, un programa computacional de ChemAxon que permite dibujar con rapidez moléculas a través de las funciones básicas de la interfaz gráfica de usuario y funcionalidades avanzadas (ChemAxon, 2014). Para ello se ingresa la fórmula molecular en formato SMILES (.smi) al programa y se exporta en formato “.mol”.

Una vez obtenidas tales estructuras en formato 2D, se generaron las estructuras tridimensionales de las mismas mediante el programa “AVOGADRO”, un avanzado editor

y visualizador molecular diseñado para uso en química computacional, modelado molecular y bioinformática entre otros (Hanwell *et al*, 2012).

Adicionalmente, mediante el programa “AVOGADRO” se realizó un proceso de optimización geométrica y molecular, bajo los parámetros de campo de fuerza MMFF94 o UFF en 5000 pasos. Las estructuras se guardaron en formato “.mol2” antes de proceder al desarrollo del proceso de acoplamiento molecular “*docking*” (Hanwell *et al*, 2012).

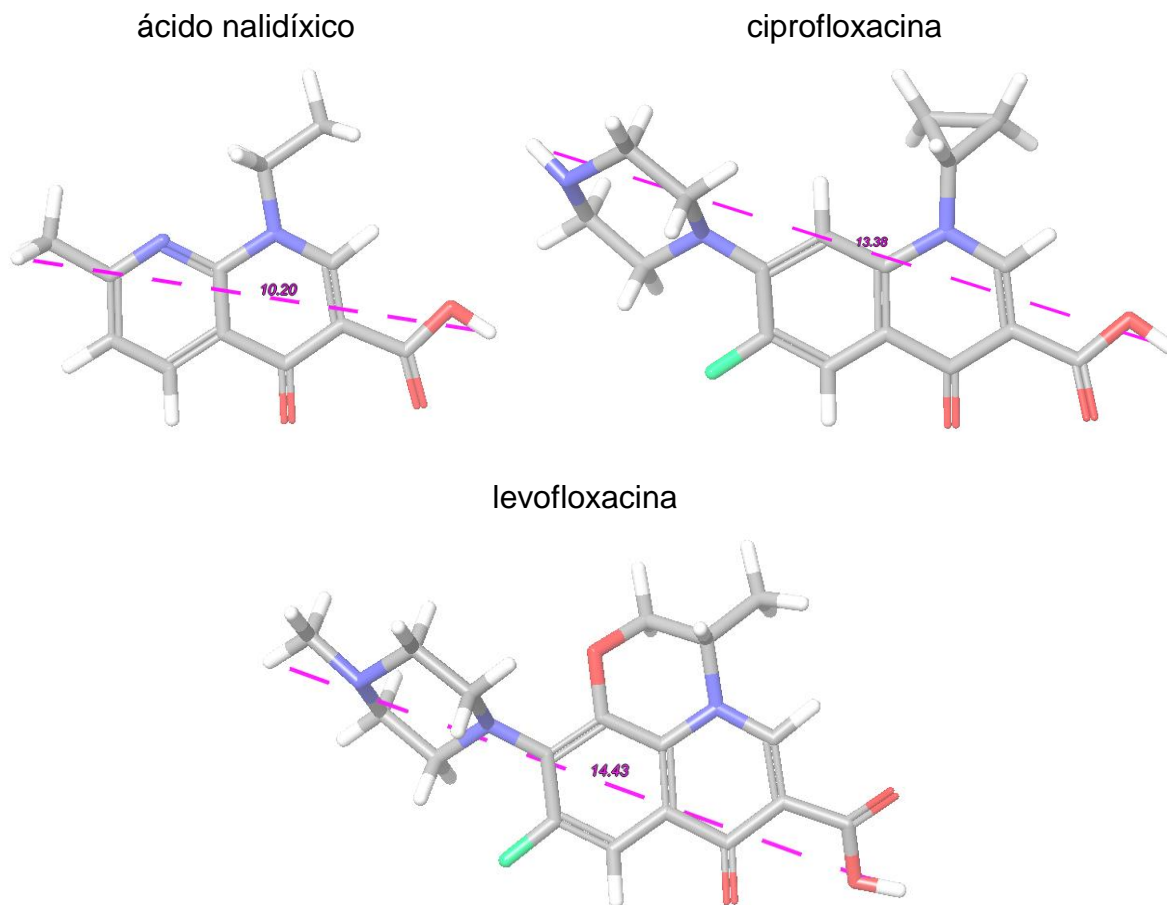
Previo al desarrollo del acoplamiento, se realizó un ajuste de las estructuras tipo ligando dentro del programa AutoDockTools; particularmente se ajustó por defecto el número de enlaces rotables en la estructura de los antibióticos, lo anterior con el fin de generar una estructura óptima y completa que pueda utilizarse en el proceso de acoplamiento. Posteriormente, al igual que las estructuras proteicas, se exportó el ligando en un archivo “.pdbqt”, el cual es requerido por el programa que realiza el acoplamiento molecular.

2.2.6. Acoplamiento molecular de quinolonas con la subunidad A de la ADN girasa:

El proceso de acoplamiento molecular se realizó por medio del programa AutoDock 4.2 (Morris *et al*, 2009). AutoDock es un conjunto de herramientas automatizadas para realizar estudios de acoplamiento molecular; entre otras funciones, permite predecir cómo pequeñas moléculas, tales como sustratos o candidatos a fármacos, pueden acoplarse a un receptor (Goodsell *et al*, 1996). En el programa AutoDock 4.2 se cargaron las estructuras en formato “.pdbqt” tanto de la proteína como del ligando. Posteriormente se procedió a la generación del *grid* o rejilla. Se escogió un *grid* lo suficientemente grande para permitir que el ligando rote libremente. Para establecer las dimensiones del mismo se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros:

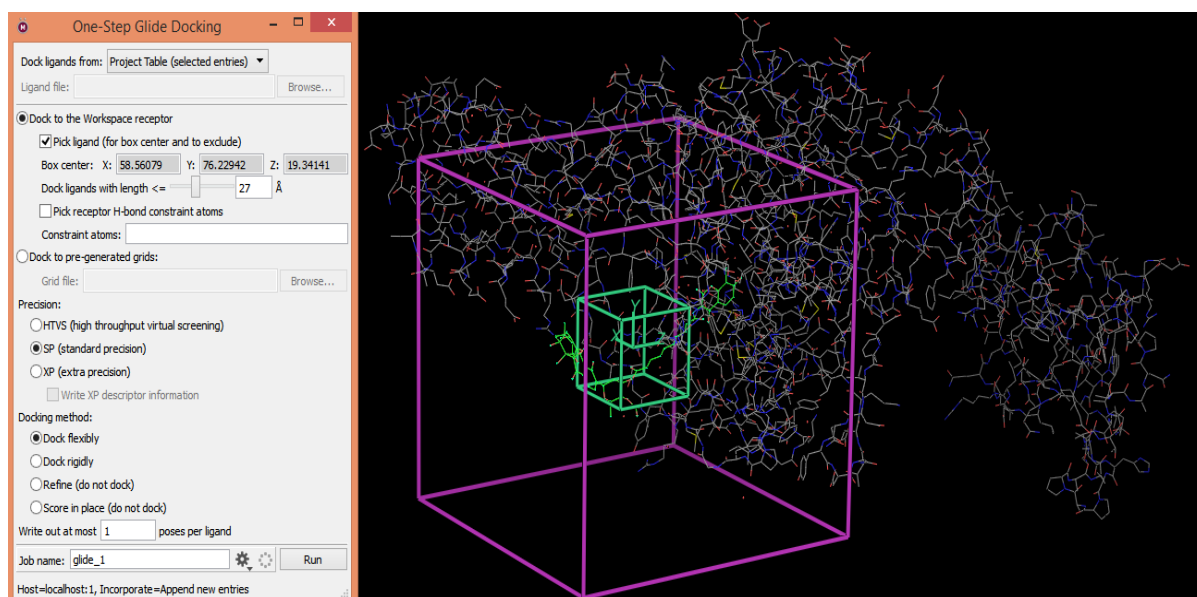
Tamaño del ligando: Es un parámetro crítico para la determinación del tamaño del *grid*. Se tuvo en cuenta el ligando de mayor tamaño, que correspondió a levofloxacin, con 14.43 angstroms de longitud entre los átomos más distantes (Figura 2-2).

Figura 2-2: Representación del tamaño en angstroms de los ligandos implementados para el proceso de acoplamiento molecular.



Ubicación del grid: Teniendo en cuenta que el modelo de la subunidad A de la ADN girasa de *P. aeruginosa* se basó en una proteína cristalizada con su ligando (SIMOCYCLINONE D8), se partió de las coordenadas del ligando en la estructura 2Y3P para definir la ubicación del *grid* (Figura 2-3).

Figura 2-3: Representación gráfica de las coordenadas del *grid* centrado en el ligando (cubo color verde) de la estructura 2Y3P visualizadas en MAESTRO (Schrödinger, 2012). El cubo de color morado representa el tamaño máximo que podría llegar a tener el *grid* en esa región específica



Con base en los parámetros descritos anteriormente, se estableció como dimensiones apropiadas para el *grid* 68 puntos en cada eje de coordenadas, con un espaciado entre puntos de 0.375 Å. Así, el tamaño del *grid* escogido fue de 25.5 Å (68 x 0.375 Å) en cada eje de coordenadas (25.5 Å x 25.5 Å x 25.5 Å), que es un tamaño apropiado para que el ligando pueda rotar libremente. El *grid* se localizó espacialmente en la posición X=58.56, Y=76.23 y Z=19.34.

Para el proceso de acoplamiento molecular, se mantuvo rígida la proteína diana y se permitió que las moléculas de las quinolonas fueran flexibles, de tal manera que pudieran tomar diferentes conformaciones (“*poses*”) dentro del *grid* seleccionado hasta obtener las conformaciones y orientaciones más estables del ligando dentro de la proteína. Se utilizó el algoritmo genético *lamarckiano* para llevar a cabo un método de búsqueda de las posibles conformaciones y se programó a AutoDock 4.2 para realizar 100 iteraciones del proceso de acoplamiento. Como resultado del proceso de acoplamiento molecular, AutoDock presenta el mejor acoplamiento con base en la determinación de la energía libre de unión más baja, la cual representa a la orientación “*pose*” más afín del ligando dentro de la proteína (Morris *et al*, 2009).

Todas las estructuras cristalográficas utilizadas, así como todos los modelos construidos fueron visualizados mediante el programa PyMol, un sistema de visualización de distribución libre mantenido y distribuido por Schrödinger (Schrödinger, 2010).

3. Resultados

La estructura primaria de la proteína ADN girasa subunidad A de *P. aeruginosa* cepa PAO1 se tomó de la base de datos *Pseudomonas Genome Database* (Winsor *et al*, 2011; Stover *et al*, 2000). Esta proteína consta de 923 aminoácidos, cuya secuencia se muestra en la Figura 3-1.

Figura 3-1: Secuencia de aminoácidos de la proteína ADN girasa subunidad A de *P. aeruginosa* cepa PAO1. Tomada de la base de datos *Pubmed del National Center for Biotechnology Information* (NCBI). En anexo 1 se muestra la tabla con la nomenclatura de los aminoácidos.

```
1  mgelakeilp vniedelkqs yldyamsviv gralpdardg lkpvhrrvly amselgndwn
61  kpykksarvv gdvigkyhph gdtavydtiv rmaqpfslry mlvdgqgnfg svdgdnaaam
121 rytevermakl ahelladlek etvdwvpynd gteqipavmp tkipnllvng ssgiavgmat
181 nipphnlgev idgclalmdn pdltvdelmq yipgpdfpta giingragii eayrtgrgri
241 yiraravvee mekgggreqi iitelpyqln karliekiaie lvkekkiegi selrdesdkd
301 gmrvvielrr gevgevvlmn lyaqtqlqsv fginvvalvd gqprtlnlkd mlevfvrhrr
361 evvtrrtvye lrkarerghi legqavalsn idpvieliks sptpaeaker liatawessa
421 veamveraga dacrpelldp qyglrdgkyy lspeqaqail elrlhrltgl eheklseyq
481 eilnligeli riltnparlm evireeleav kaefgdarrt eivasqvdlr iadliteedr
541 vvtishggya ksqplaayqa qrrggkgsa tgmkdedyie hllvanshat lllfsskgkv
601 ywlrftfeipe asrtargrpl vnllpldege ritamlqidl ealqqnggad ddldeaegav
661 legevveaae veevegetae lvaeptgayi fmatafgtvk ktplvqfsrp rssglialkl
721 eegdtliaaa itdgakevml fssagkvirf aesvvrimgn nargvrgmrl gkgqqqlisml
781 ipesgaqilt asergfgkrt plskfprgrg ggggviamvt nerngaliaa vqvqegeeim
841 lisdqgtlvr trvdevslsg rntqgvtlik lasdevlvgl ervqepsggd dedlpegeea
901 aeslgesaes esepaaeaeg nee
```

3.1. Búsqueda de estructuras proteicas 3D a utilizar como molde (plantilla):

Con base en la secuencia de aminoácidos de dicha proteína se procedió a buscar proteínas homólogas que tuviesen estructuras 3D reportadas en la base de proteínas Protein Data Bank (Berman et al, 2000). Esta búsqueda se realizó mediante la herramienta bioinformática BLASTP (Altschul et al, 1990), cuya página de inicio se muestra en la Figura 3-2.

Figura 3-2: Visualización de la plataforma computacional BLAST en sus diferentes opciones de comparación para realizar el proceso de alineamiento. En este caso al realizarse el proceso de comparación de secuencias de aminoácidos de proteínas, se utiliza la opción denominada BLASTP. Imagen tomada de la base de datos de *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*. Disponible en: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

The image shows the NCBI BLAST web interface. At the top, there is a navigation bar with 'Home', 'Recent Results', 'Saved Strategies', and 'Help'. Below this, the page title is 'Standard Protein BLAST'. The main form is divided into several sections:

- Enter Query Sequence:** Contains a text area with a protein sequence: `MGE LAKE I L P V N I E D L K Q S Y L D Y A M S V I V G R A L P D A R D G L K P V H R R V L Y A M S E L G N D W N K P Y K S A R V V G D V I G K Y H P H G D T A V Y D T I V R M A Q P F S L R Y M L V D G Q G N F G S V D G D N A A M R Y T E V R M A K L A H E L L A D L E K E T V D W V P N Y D G T E Q I P A V M P T K I P N L L V N G S S G I A V G M A T N I P P H N L G E V I D G C L A L M D N P D L T V D E L M Q Y I P G P D F P T A G I I N G R A G I I E A Y R T G R G R I Y I R A R A V V E E M E K G G G R E Q I I I T E L P Y Q L N K A R L I E K I A E L V K E K K I E G I S E L R D E S D K D G M R V V I E L R R G E V G E V L N N L Y A Q T L Q S V F G I N V V A L V D G Q P R T L N L K D M L E V F V R H R R E V T R R T V Y E`. There are 'Clear' and 'Query subrange' options.
- Or, upload file:** A button labeled 'Seleccionar archivo' and the text 'Ningún archivo seleccionado'.
- Job Title:** A text input field with the placeholder 'Enter a descriptive title for your BLAST search'.
- Align two or more sequences:** A checkbox that is currently unchecked.
- Choose Search Set:**
 - Database:** A dropdown menu set to 'Non-redundant protein sequences (nr)'.
 - Organism:** A text input field with the placeholder 'Enter organism name or id—completions will be suggested'. There is an 'Exclude' checkbox and a '+' sign.
 - Exclude:** Two checkboxes: 'Models (XM/XP)' and 'Uncultured/environmental sample sequences', both unchecked.
 - Entrez Query:** A text input field with the placeholder 'Enter an Entrez query to limit search'. There is a 'YouTube' icon and a link 'Create custom database'.
- Program Selection:**
 - Algorithm:** A radio button selection where 'blastp (protein-protein BLAST)' is selected and highlighted with a red box. Other options include 'PSI-BLAST (Position-Specific Iterated BLAST)', 'PHI-BLAST (Pattern Hit Initiated BLAST)', and 'DELTA-BLAST (Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST)'. There is a 'Choose a BLAST algorithm' link at the bottom.

El resultado del proceso de búsqueda de homólogos arrojó una serie de potenciales proteínas molde con estructura tridimensional conocida, ordenadas de mayor a menor de acuerdo al porcentaje de identidad que se obtuvo en el alineamiento (Figura 3-3).

Figura 3-3: Resultados del alineamiento de la secuencia de la proteína ADN girasa A de *P. aeruginosa* cepa PAO1 realizado por la plataforma BLASTP con las proteínas disponibles en el *Protein Data Bank*. Imagen tomada de la base datos del NCBI (Altschul *et al* 1997).

Description	Max score	Total score	E value	Ident	Accession
Chain A, Crystal Structure Of N-Terminal Domain Of Gyra With The Antibiotic Simocyclinone D8 >pdb12Y3PIB Chain B, Crystal Structure Of N-Terminal Domain Of Gyra With The Antibiotic Simocyclinone D8 >pdb12Y3PIB	830	830	0.0	76%	2Y3P_A
Chain A, 59kda Fragment Of Gyrase A From E. Coli	784	784	0.0	76%	1AB4_A
Chain A, A Domain Insertion In E. Coli Gyrb Adopts A Novel Fold That Plays A Critical Role In Gyrase Function	798	798	0.0	74%	3NUH_A
Chain A, Crystal Structure Of Gyra >pdb13LPXIB Chain B, Crystal Structure Of Gyra	763	763	0.0	73%	3LPX_A
Chain A, Ccdb:gyra14 Complex >pdb11X75IB Chain B, Ccdb:gyra14 Complex	182	182	5e-53	67%	1X75_A
Chain A, Ccdbvfi:gyra14ec >pdb14ELYIB Chain B, Ccdbvfi:gyra14ec	183	183	6e-53	65%	4ELY_A
Chain A, Ccdbvfi:gyra14vfi >pdb14ELZIB Chain B, Ccdbvfi:gyra14vfi	182	182	2e-52	64%	4ELZ_A
Chain A, Structural Plasticity Of The Bacillus Subtilis Gyra Homodimer >pdb4DDQIB Chain B, Structural Plasticity Of The Bacillus Subtilis Gyra Homodimer >pdb4DDQIB	626	626	0.0	59%	4DDQ_A
Chain A, The 3.1a Crystal Structure Of The Catalytic Core (B'a' Region) Of Staphylococcus Aureus Dna Gyrase >pdb12XCQIA Chain A, The 2.98a Cryst	581	581	0.0	55%	2XCO_A
Chain B, The 2.1a Crystal Structure Of S. Aureus Gyrase Complex With Gsk299423 And Dna >pdb12XCSID Chain D, The 2.1a Crystal Structure Of S.	581	581	0.0	55%	2XCS_B
Chain B, The 3.5a Crystal Structure Of The Catalytic Core (B'a' Region) Of Staphylococcus Aureus Dna Gyrase Complexed With Gsk299423 And Dna	580	580	0.0	55%	2XCR_B
Chain A, A Superhelical Spiral In Escherichia Coli Dna Gyrase A C-Terminal Domain Imparts Unidirectional Supercoiling Bias >pdb17I0IB Chain B, A	345	345	5e-110	50%	17I0_A
Chain A, Crystal Structure Of The First Part Of The Mycobacterium Tuberculosis Dna Gyrase Reaction Core: The Breakage And Reunion Domain At 2	486	486	4e-161	50%	3IFZ_A
Chain A, Structure Of Dna Gyrase Subunit A N-Terminal Domain >pdb3ILWIB Chain B, Structure Of Dna Gyrase Subunit A N-Terminal Domain	459	459	1e-151	49%	3ILW_A
Chain A, Crystal Structure Of A 59 Kda Fragment Of Topoisomerase Iv Subunit A (Grla) From Staphylococcus Aureus	451	451	1e-147	46%	2INR_A
Chain A, Crystal Structure Of The Xanthomonas Campestris Gyrase A C-Terminal Domain >pdb3L6VIB Chain B, Crystal Structure Of The Xanthomon	299	350	6e-92	45%	3L6V_A
Chain A, Breakage-Reunion Domain Of S Pneumoniae Topo Iv, Crystal Structure Of A Gram-Positive Quinolone Target >pdb2NOVIB Chain B, Breakag	427	427	1e-138	42%	2NOV_A

De los resultados presentados en la Figura 3-3, se observa que los aciertos con mayor identidad de secuencia con nuestra proteína (subunidad A de ADN girasa de *P. aeruginosa*) y con estructura 3D conocidas fueron dos proteínas identificadas con los códigos de acceso 2Y3P y 1AB4 en la base de datos del *Protein Data Bank* (PDB).

El código de acceso 2Y3P corresponde a la estructura cristalográfica del dominio N-terminal (aminoácidos 2-523) de la subunidad A de la ADN girasa de *Escherichia coli*, en un complejo con simociclinona D8, un antibiótico bifuncional que inhibe la ADN girasa bacteriana evitando la unión de la enzima al ADN.

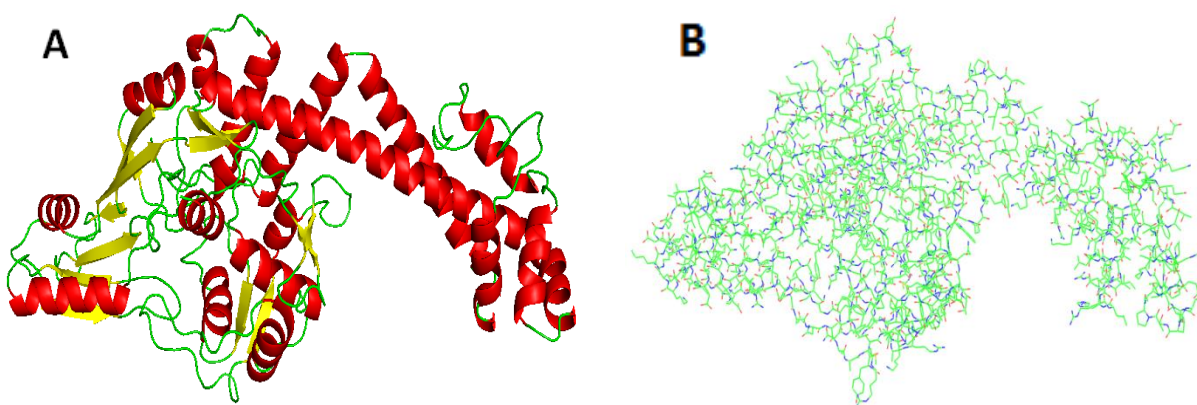
El alineamiento local con esta proteína reveló un 76% de identidad de secuencia y una similitud del 87% (Figura 3-4), valores que permiten catalogar a la estructura 2Y3P como un molde adecuado para el desarrollo de un modelo 3D para la ADN girasa A de *P. aeruginosa*.

Figura 3-4: Resultados del alineamiento de la secuencia de 2Y3P y la proteína ADN girasa subunidad A de *P. aeruginosa* cepa PAO1 utilizando BLASTP. Tomada de la base datos del NCBI (Altschul *et al* 1997).

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
825 bits(2130)	0.0	Compositional matrix adjust.	396/523(76%)	460/523(87%)	1/523(0%)
Query 2		GELAKEILPVNIEDELKQSYLDYAMSVIVGRALPDARDGLKPVHRRVLYAMSELGNDWNK			61
		+LA+EI PVNIE+ELK SYLDYAMSVIVGRALPD RDGLKPVHRRVLYAM+ LGNDWNK			
Sbjct 1		SDLAREITPVNIEEELKSSYLDYAMSVIVGRALPDVDRDGLKPVHRRVLYAMNVLGNDWNK			60
Query 62		PYKKSARVVGDVIGKYHPHGD+AVYDTIVRMAQPFSLRYMLVDGQGNFGSVDGADNAAMR			121
		YKKSARVVGDVIGKYHPHGD+AVYDTIVRMAQPFSLRYMLVDGQGNFGS+DG AAMR			
Sbjct 61		AYKKSARVVGDVIGKYHPHGD+AVYDTIVRMAQPFSLRYMLVDGQGNFGSIDGDSAAAMR			120
Query 122		YTEVRMAKLAHELLADLEKETVDWPNYDGTGEQIPAVMPTKIPNLLVNGSSGIIVGMATN			181
		YTE+R+AK+AHEL+ADLEKETVD+V NYDGTGE+IP VMPTKIPNLLVNGSSGIIVGMATN			
Sbjct 121		YTEIRLAKIAHELMADLEKETVDFVDNYDGTGEKIPDVMPTKIPNLLVNGSSGIIVGMATN			180
Query 182		IPPHNLGEVIDGCLALMDNPDLTVDLMOYIPGPDFPTAGIINGRAGIIEAYRTGRGRIY			241
		IPPHNL EVI+GCLA +D+ D++++ LM++IPGPDFPTA IINGR GI EAYRTGRG++Y			
Sbjct 181		IPPHNLTEVINGCLAYIDDEDISIEGLMEHIPGPDFPTAAIINGRRGIEEAYRTGRGKVVY			240
Query 242		IRARAVVEEMEGGGREQIIITELPYQLNKARLIEKIAELVKEKKIEGISELRDESOKDG			301
		IRARA V E++ GRE II+ E+PYQ+NKARLIEKIAELVKEK++EGIS LRDESOKDG			
Sbjct 241		IRARAEV- EVDKGTGRETIIIVHEIPYQVNKARLIEKIAELVKEKRVEGISALRDESOKDG			299
Query 302		MRVVIELRRGEVGEVVLNLYAQTQLQSVFGINVVALVDGQPRTLNLKDMLEVFVRRHRE			361
		MR+VIE++R VGEVVLNLY+QTQLQ FGIN+VAL GOP+ +NLKD++ FVRRHRE			
Sbjct 300		MRIVIEVKRDVAVGEVVLNLYSQTQLQVSVFGINMVALHHGQPKIMNLKDIIAAFVRRHRE			359
Query 362		VVTRRTVYELRKARERGHILEGQAVALSNIIDPVIELIKSSPTPAEAKERLIATAWESSAV			421
		VVTRRT++ELRKAR+R HILE AVAL+NIDP+IELI+ +PTPAEAK L+A W+ V			
Sbjct 360		VVTRRTIFELRKARDRAHILEALAVLANIDP+IELIRHAPTAEAKTALVANPWQLGNV			419
Query 422		EAMVERAGADACRPEDLPQYGLRDGKYYLSPEQAQAILRLHRLTGLEHEKLLSEYQE			481
		AM+ERAG DA RPE L+P++G+RDG YYL+ +QAQAIL+LRL +LTGLEHEKLL EY+E			
Sbjct 420		AAMLERAGDAAARPEWLEPEFGVRDGLYYL+TEQAQAILDLRLQLTGLEHEKLLDEYKE			479
Query 482		ILNLIGELIRILTNPARLMEVIREELEAVKAEFGDARRTEIVA	524		
		+L+ I EL+RIL + RLMEVIREELE V+ +FGD RRTEI A			
Sbjct 480		LLDQIAELLRILGSADRLMEVIREELELVREQFGDKRRTEITA	522		

La Figura 3-5 muestra la estructura tridimensional del homólogo 2Y3P resuelta a una resolución de 2,62 Å mediante cristalografía de rayos X (Edwards *et al*, 2009).

Figura 3-5: Estructura tridimensional correspondiente al código de acceso 2Y3P. A) Representación de acuerdo a su estructura secundaria. En color rojo se representan las hélices α , en amarillo se representan las hojas β y en color verde los *loops* que presenta la proteína. Tomada y modificada de *RCSB Protein Data Bank* disponible en url: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2y3p>. B) Representación en líneas de la misma estructura.



El código de acceso 1AB4, por su parte, corresponde a la estructura 3D del fragmento N-terminal de 59Kd de 493 residuos de la subunidad A de la ADN girasa de *Escherichia coli*. El alineamiento reveló un 76% de identidad y un 88% de similitud con la secuencia de la subunidad A de la ADN girasa de *P. aeruginosa* cepa PAO1 (Figura 3-6), valores que permiten catalogar a la estructura 1AB4_A como un molde adecuado para el desarrollo de un modelo para la ADN girasa A de *P. aeruginosa*.

Figura 3-6: Resultados del alineamiento de la secuencia de 1AB4 y la proteína ADN girasa subunidad A de *P. aeruginosa* cepa PAO1 utilizando BLAST. Tomada de la base datos del NCBI (Altschul *et al* 1997).

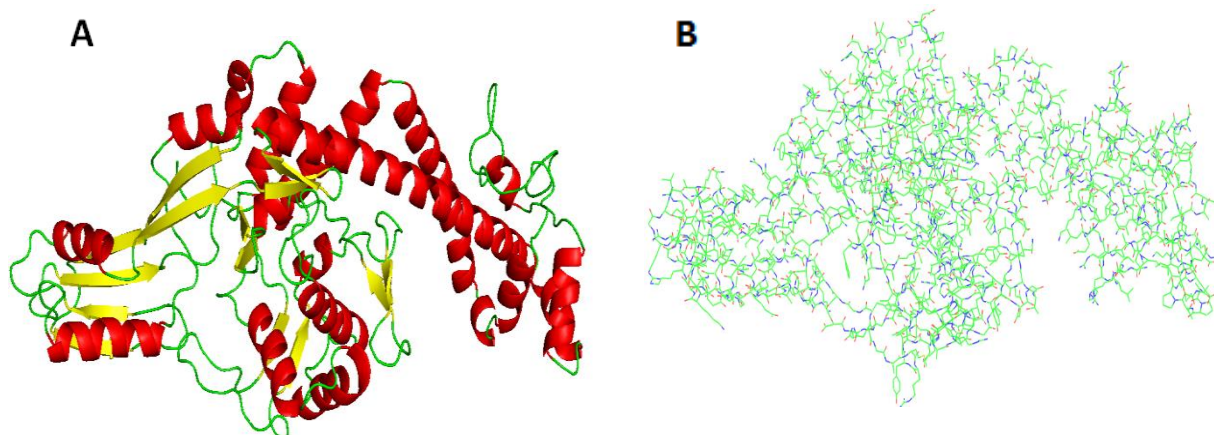
Sequence ID: lc|60153 Length: 493 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 492 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
778 bits(2009)	0.0	Compositional matrix adjust.	373/493(76%)	434/493(88%)	1/493(0%)
Query 30	VGRALPDARDGLKPVHRRVLYAMSELGNDWNKPYKKSARVVGDVIGKYHPHGDTAVYDTI				89
Sbjct 1	VGRALPD RDGLKPVHRRVLYAM+ LGNDWNK YKKSARVVGDVIGKYHPHG+AVYDTI				60
Query 90	VRMAQPFSLRYMLVDGQGNFGSVDGADNAAMRYTEVRMAKLAHELLADLEKETVDWVPNY				149
Sbjct 61	VRMAQPFSLRYMLVDGQGNFGS+DG AAMRYTE+R+AK+AHEL+ADLEKETVD+V NY				120
Query 150	DGTEQIPAVMPTKIPNLLVNGSSGIAVGMATNIPPHNLGEVIDGCLALMDNPDLTVDLMD				209
Sbjct 121	DGTE+IP VMPTKIPNLLVNGSSGIAVGMATNIPPHNL EVI+GCLA +D+ D++++ LM				180
Query 210	QYIPGPDFPTAGIINGRAGIIEAYRTGRGRIYIRARAVEEMEKGGRQIIITELPYQL				269
Sbjct 181	++IPGPDFPTA IINGR GI EAYRTGRG++YIRARA V E++ GRE II+ E+PYQ+				239
Query 270	NKARLIEKIAELVKEKKIEGISELRDESDDKGMRVVIELRRGEVGEVVLNMLYAQTQLQS				329
Sbjct 240	NKARLIEKIAELVKEK++EGIS LRDESDDKGM+VIE++R VGEVVLNMLY+QTQLQ				299
Query 330	VFGINVALVDGQPRTLNLKDMLEVFVRRHREVTRRTVYELRKARERGHILEGQAVALS				389
Sbjct 300	FGIN+VAL GQP+ +NLKD++ FVRHREVTRRT++ELRKAR+R HILE AVAL+				359
Query 390	NIDPVIELIKSSPTPAEAKERLIATAWESSAVEAMVERAGADACRPEDLDPQYGLRDGKY				449
Sbjct 360	NIDP+IELI+ +PTPAEAK L+A W+ V AM+ERAG DA RPE L+P++G+RDG Y				419
Query 450	YLSPEQAQAILELRLHRLTGLEHEKLLSEYQEILNLIGELIRILTNPRLMEVIREELEE				509
Sbjct 420	YL+ +QAQAAIL+LRL +LTGLEHEKLL EY+E+L+ I EL+RIL + RLMEVIREELE				479
Query 510	VKAIEFGDARRTEI 522				
Sbjct 480	V+ +FGD RRTEI 492				

La Figura 3-7 muestra la estructura tridimensional del homólogo 1AB4 resuelta a una resolución de 2,80 Å mediante cristalografía de rayos X (Cabral *et al*, 1997).

Figura 3-7: Estructura tridimensional correspondiente al código de acceso de 1AB4 (Fragmento N-terminal de gir A de *E. coli*. **A**) Representación de la estructura secundaria. En color rojo se representan las hélices α , en amarillo se representan las hojas β y en color verde los *loops* que presenta la proteína. Tomada y modificada de *RCSB Protein Data Bank* disponible en: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1ab4>). **B**) Representación en líneas de la estructura 1AB4.



Las estructuras proteicas 3D de *E. coli* identificadas con los códigos 2Y3P y 1AB4 fueron a continuación utilizadas como proteínas-molde para modelar por homología la estructura tridimensional de la subunidad A de la ADN girasa de *P. aeruginosa*.

3.2. Modelado de la estructura 3D de la ADN girasa A de *P. aeruginosa*:

Para la generación del modelo tridimensional de la proteína ADN girasa A de *P. aeruginosa* se utilizó el programa computacional MODELLER y dos plataformas en línea: SWISS-MODEL y I-TASSER.

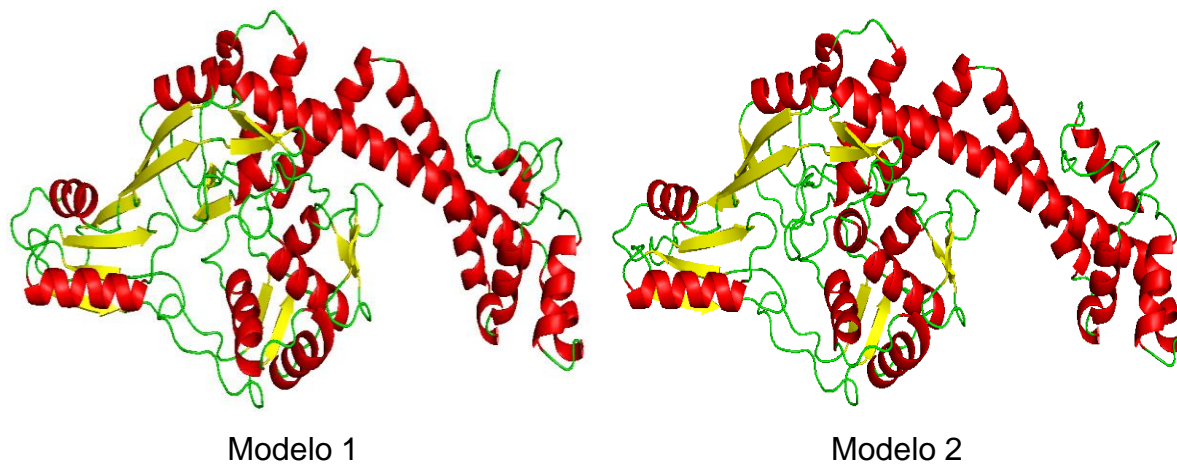
Cada plataforma computacional genera modelos 3D basados en la homología de la proteína que se pretende modelar (proteína problema) con la proteína cuya estructura 3D se conoce (proteína molde). Los modelos posteriormente son calificados de acuerdo a funciones de puntuación específicas que evalúan la calidad del modelo en términos

termodinámicos (estabilidad de la estructura) y en relación a las distancias espaciales con respecto a la estructura molde seleccionada.

3.2.1. Modelado por SWISS-MODEL:

El modelado basado en esta plataforma computacional arrojó los resultados mostrados en la Figura 3-8. El modelo 1 corresponde al modelo generado con base en la estructura proteica 1AB4 y el modelo 2 corresponde al modelo generado con base en la estructura proteica 2Y3P:

Figura 3-8: Modelos tridimensionales de la subunidad A de la ADN girasa de *P. aeruginosa* construidos a partir de la plataforma SWISS-MODEL. En color rojo se representan las hélices α , en amarillo se representan las hojas β y en color verde los *loops* que presenta la proteína.



Puede apreciarse que ambos modelos son muy similares, diferenciándose solo a nivel de ciertos *loops*.

Esta plataforma computacional permitió evaluar la calidad de estos dos modelos a partir de la función QMEAN4, otorgando valores energéticos a la conformación final de cada modelo (Tabla 3-1).

Tabla 3-1: Calidad de los modelos obtenidos por SWISS-MODEL.

Modelo	QMEAN4
Modelo 1	0.761
Modelo 2	0.783

Como se mencionó en metodología, QMEAN4 es una función de puntuación que evalúa la calidad del modelo y cuyo valor promedio oscila entre 0 y 1, donde valores de QMEAN4 cercanos al 1 corresponden a los mejores modelos. Según esto, ambos modelos tienen una calidad similar, impidiendo descartar alguno de los dos.

3.2.2. Modelado por I-TASSER:

El uso de esta plataforma computacional arrojó cinco modelos estructurales para la subunidad A de la ADN girasa de *P. aeruginosa* (Figura 3-9).

Como puede apreciarse en la Figura 3-9, los cinco modelos son muy similares excepto por algunos detalles estructurales, que se enfocan en regiones *loops* (ver por ejemplo porción superior derecha de los modelos 2, 4 y 5) y en el extremo C-terminal al comparar modelo 3 con los demás modelos.

Esta plataforma computacional permite la evaluación de la calidad de sus modelos mediante la función *C-Score* y los resultados se muestran en la Tabla 3-2.

Figura 3-9: Modelos de la estructura 3D de la subunidad A de la ADN girasa de *P. aeruginosa* construidos a partir de la plataforma I-TASSER. En color rojo se representan las hélices α , en amarillo se representan las hojas β y en color verde los *loops* que presenta la proteína.

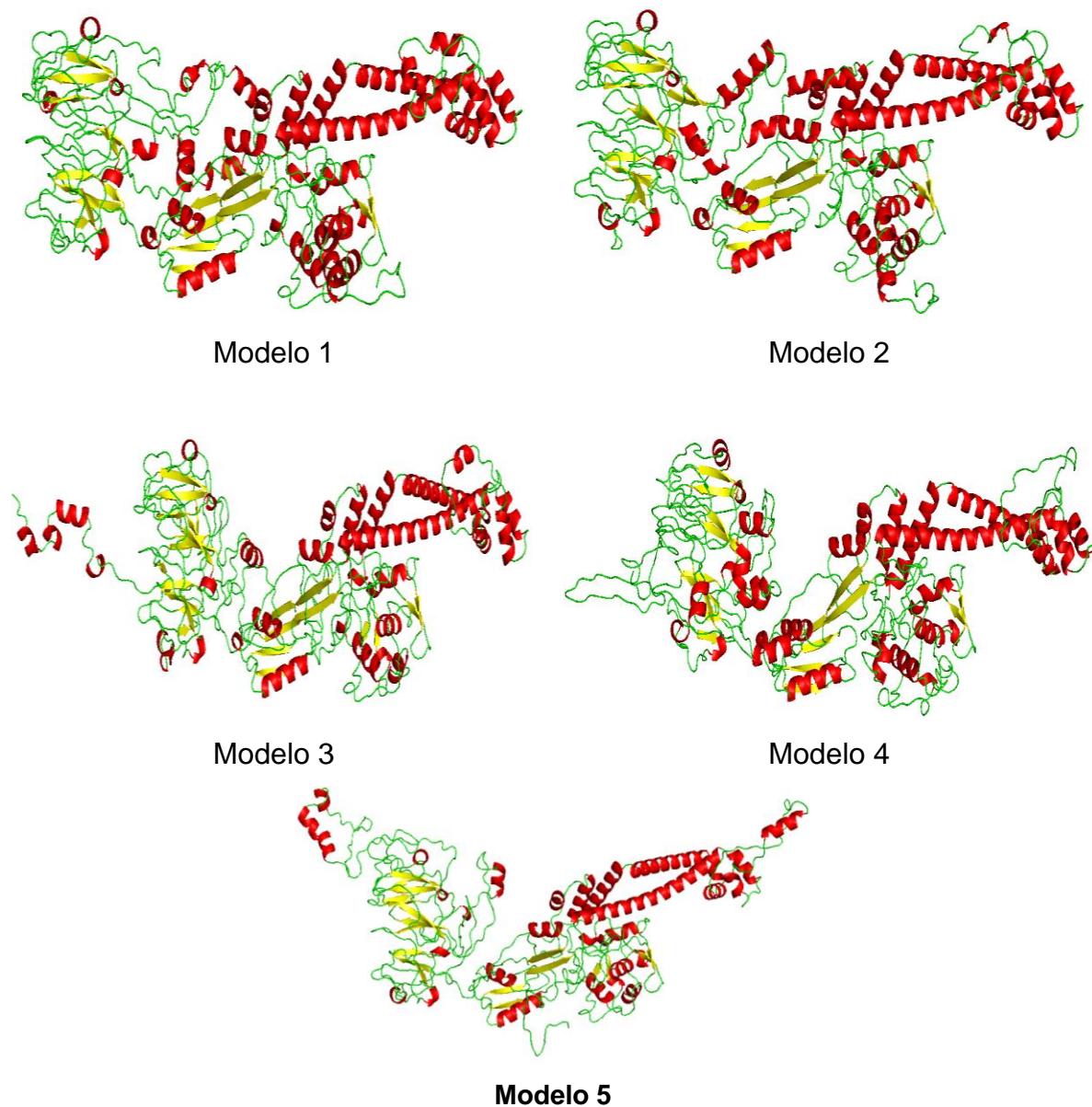


Tabla 3-2: Calidad de los modelos obtenidos por I-TASSER.

Modelo	C-Score
Modelo 1	-1.36
Modelo 2	-1.36
Modelo 3	-1.94
Modelo 4	-2.21
Modelo 5	-2.17

C-score es un valor de la estimación de la calidad de los modelos predichos por I-TASSER; una puntuación más positiva refleja un modelo de mejor calidad. Cuando el valor de C-score es superior a -1,5 corresponde a modelos de topología correcta (Zhang, 2008). En términos de la función de puntuación *C-score*, los modelos 1 y 2 presentan una topología correcta ($C\text{-score} > -1,5$) y tuvieron el mismo valor C-Score, indicando que este término no resulta suficiente para descartar uno u otro modelo. Los restantes modelos serían de topología incorrecta.

Los modelos 1 y 2 I-TASSER son similares en términos de la estructura 3D y solo se diferencian en algunas regiones *loops*.

3.2.3. Modelado por MODELLER 9V10:

Por medio de este programa computacional se obtuvieron 5 modelos estructurales de la subunidad A de la ADN girasa de *P. aeruginosa* (Figura 3-10).

Con este programa computacional se evaluó la calidad de los modelos, a partir de las funciones de puntuación *DOPE score* y *GA341 Score*. Los resultados de dicha evaluación se muestran en la tabla 3-3.

Figura 3-10: Modelos de la estructura 3D de la subunidad A de la ADN girasa de *P. aeruginosa* construidos a partir del programa MODELLER 9v10. En color rojo se representan las hélices α , en amarillo se representan las hojas β y en color verde los *loops* que presenta la proteína.

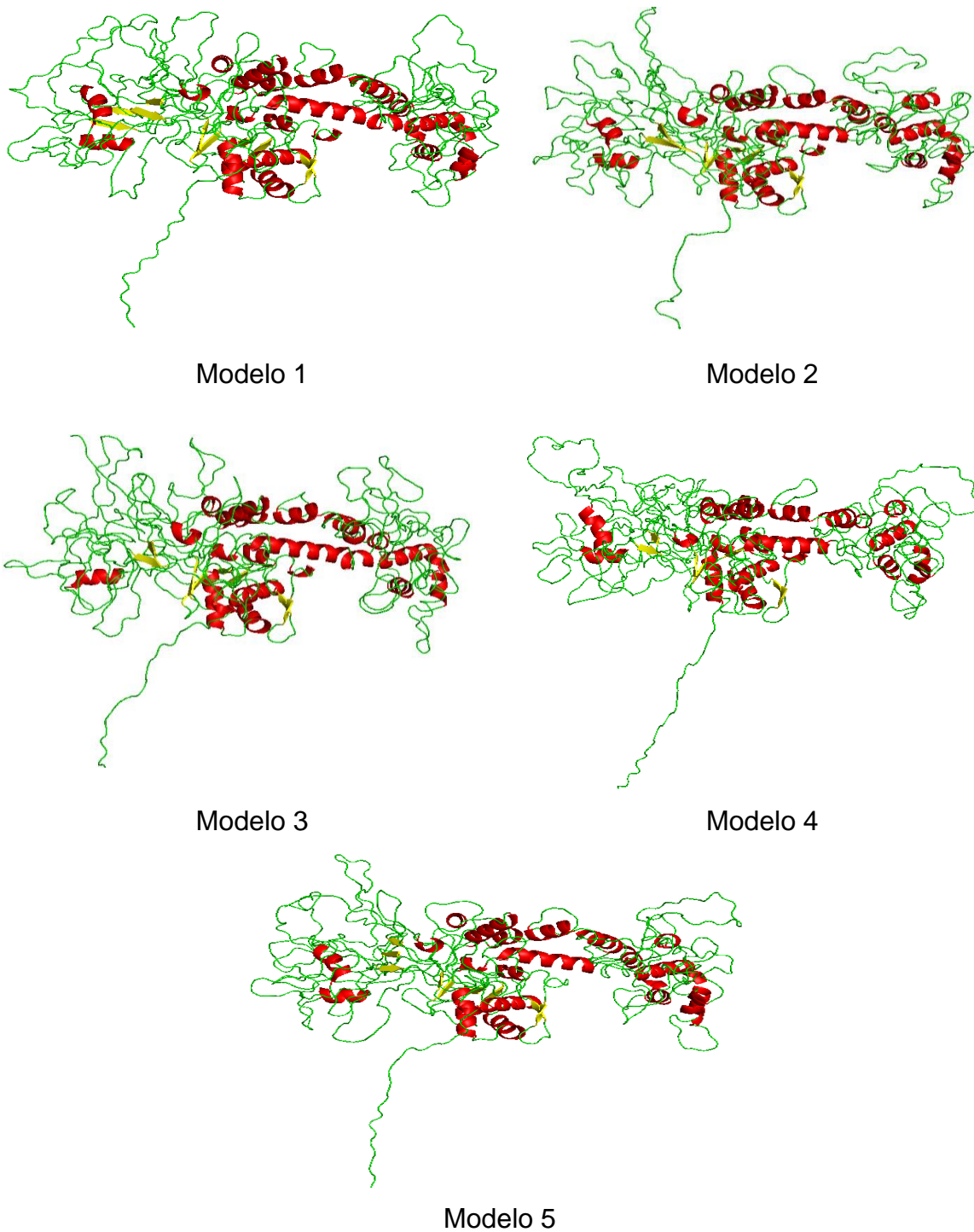


Tabla 3-3: Calidad de los modelos obtenidos por Modeller 9v10.

Modelo	DOPE score	GA341 score
Modelo 1	-62312.14453	0.99873
Modelo 2	-60738.48047	0.89077
Modelo 3	-58749.81641	0.66330
Modelo 4	-58835.12891	0.95589
Modelo 5	-60885.52344	0.98250

Como se mencionó en la metodología, la puntuación DOPE evalúa la energía del modelo generado y selecciona la mejor estructura en términos de calidad energética. El modelo con el menor valor de puntuación de esta función corresponde al modelo más adecuado para esta plataforma (Fiser y Šali, 2003; Shen y Sali, 2006). Por otra parte, la función de puntuación GA341 evalúa el modelo utilizando como parámetro el porcentaje de identidad estructural entre la plantilla y el modelo. El modelo con el valor GA341 más cercano a 1 corresponderá al mejor modelo (Eswar, 2007; Melo *et al* 2002).

En términos de la función de puntuación DOPE y GA341, el modelo 1 obtenido con la plataforma MODELLER presenta la calidad más adecuada dentro de los cinco modelos obtenidos, debido a que presentaría una estructura tridimensional más estable en términos energéticos y la mayor similitud entre las estructuras comparadas. Este modelo se utilizó para la posterior comparación con los resultados de otras plataformas con el fin de obtener el modelo más adecuado de la subunidad A de la ADN girasa de *P. aeruginosa*.

En resumen, la utilización de tres métodos computacionales permitió generar doce modelos teóricos, los cuales fueron evaluados en términos de calidad según la plataforma utilizada. De cada plataforma se seleccionaron los modelos de mejor calidad, lo que dio un total de cinco modelos seleccionados (SWISS-MODEL modelos 1 y 2, I-TASSER modelos 1 y 2, MODELLER v9.10 modelo 1).

A continuación, se comparó la calidad de los cinco modelos seleccionados mediante el servidor QMEAN (Benkert *et al*, 2009), que evalúa la calidad de cada modelo independiente del método o plataforma utilizada para su desarrollo. Este servidor permite obtener por medio de un mismo parámetro 'QMEAN Score' (Benkert *et al*, 2009) una

estimación de la calidad general de los diferentes modelos generados en cada plataforma y seleccionar así el modelo más adecuado para proceder a realizar el estudio de acoplamiento molecular (“*docking*”). Los resultados de dicha comparación se muestran en la Tabla 3-4.

Tabla 3-4: Calidad de los modelos seleccionados según el Servidor QMEAN.

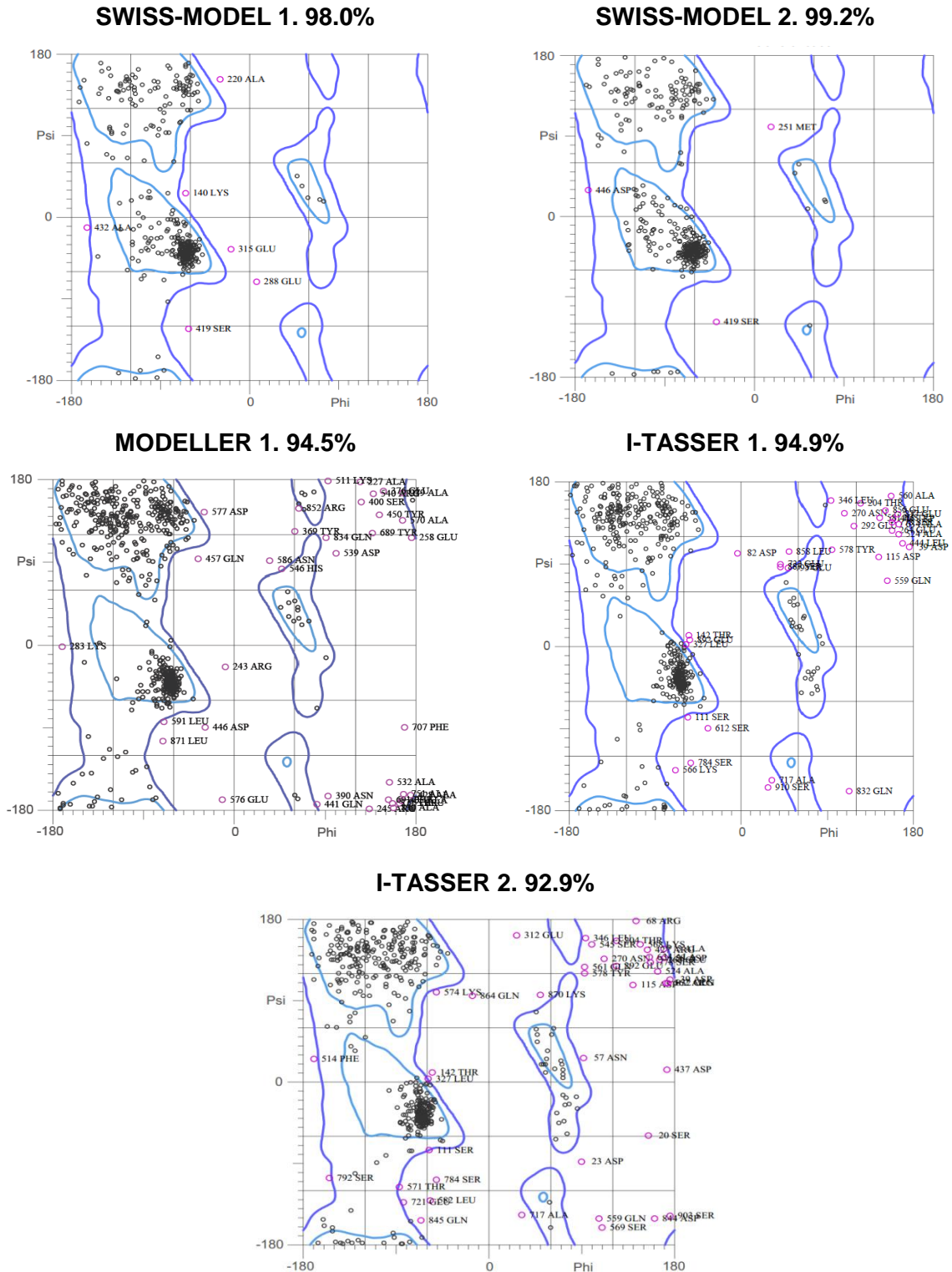
MODELO EVALUADO	QMEAN Score
Modelo 1 SWISS-MODEL	0.708
Modelo 2 SWISS-MODEL	0.707
Modelo 1 I-TASSER	0.483
Modelo 2 I-TASSER	0.487
Modelo 1 MODELLER v9.10	0.157

Los resultados muestran que los modelos generados a partir de I-TASSER y MODELLER v9.10 presentan valores de calidad inferiores a los modelos obtenidos con la plataforma SWISS-MODEL. De los dos modelos SWISS-MODEL, ambos presentan valores muy cercanos, identificando que ambos poseen una calidad estructural muy similar.

Una vez evaluada la calidad por medio del Servidor QMEAN, se procedió a evaluar la calidad estereoquímica de los cinco modelos mediante gráficos de Ramachandran a través del servidor MolProbity (Chen *et al*, 2010). Un modelo es válido y/o aceptado para estudios biomoleculares cuando el 90% de sus aminoácidos se encuentran en regiones permitidas del gráfico de Ramachandran (Hooft *et al*, 1997).

La Figura 3-11 muestra los gráficos de Ramachandran para los modelos seleccionados.

Figura 3-11: Gráficos de Ramachandran de los modelos más adecuados según las metodologías implementadas. Imagen tomada de la plataforma MolProbity (Chen *et al*, 2010).



Los resultados del análisis de Ramachandran muestran que todos los modelos evaluados presentan un porcentaje superior al 90% de sus aminoácidos en regiones permitidas, haciéndolos estereoquímicamente adecuados. De los cinco modelos, el modelo 2 de SWISS-MODEL presenta el porcentaje superior, con un 99,2% de sus aminoácidos dentro de las regiones estereoquímicamente permitidas.

Con base en los resultados obtenidos mediante los servidores QMEAN y MolProbity, se decidió que el modelo 2 de SWISS-MODEL podría ser el más adecuado o representativo de la estructura terciaria de la subunidad A de la ADN girasa de *P. aeruginosa*.

A continuación, este modelo final seleccionado se sometió a procesos adicionales de evaluación. Para esto se empleó la valoración por medio de los programas Verify3D (Eisenberg *et al*, 1997) y Errat (Paital *et al*, 2011). Los resultados se muestran en el tabla 3-5.

Tabla 3-5: Evaluación de la calidad estructural del modelo final.

Estructura proteica evaluada	Verify3D	Errat
Modelo 2 SWISS-MODEL	93.00%	97.55%

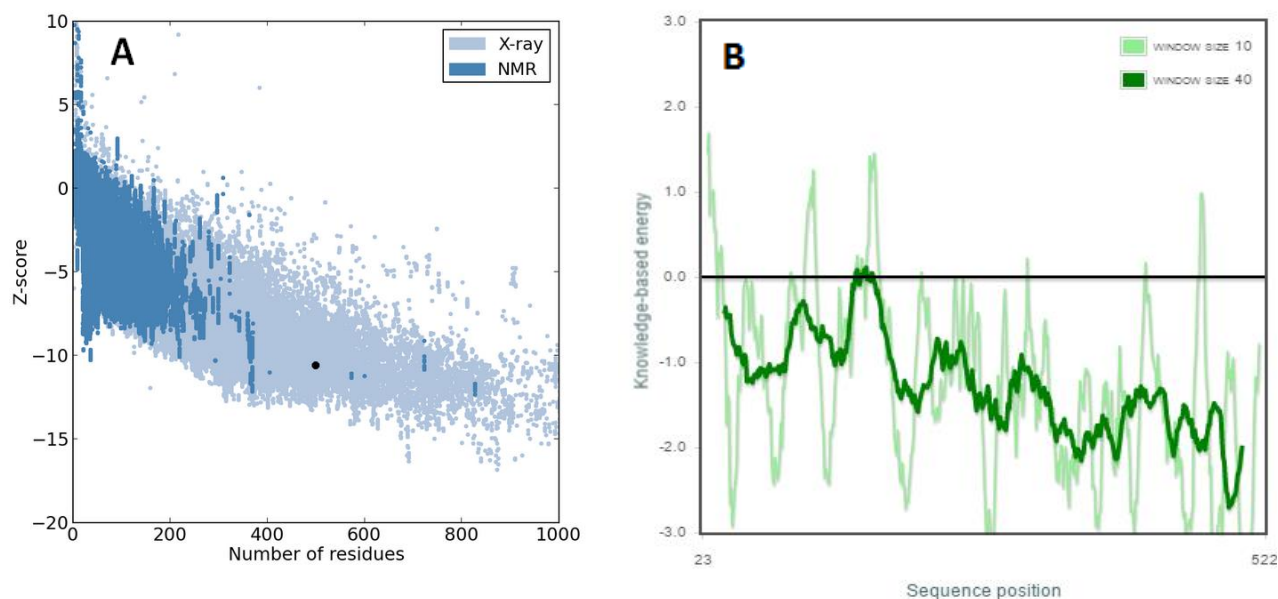
El servidor Verify3D analiza la compatibilidad tridimensional de la estructura proteica modelo con su propia secuencia de aminoácidos (Eisenberg *et al*, 1997). En nuestro caso, un resultado de 93%, indica una relación adecuada entre el modelo tridimensional y su secuencia de aminoácidos.

Con relación al programa Errat, se establece un algoritmo de verificación que permite evaluar la estructura de la proteína problema. El programa trabaja mediante el análisis de las estadísticas de las interacciones entre los diferentes tipos de átomos (Paital *et al*, 2011). En nuestro caso, un resultado del 97,55% representa un nivel de confianza superior al 95%, indicando que el modelo presenta una estructura tridimensional aceptable.

Por último, se procedió a evaluar el modelo seleccionado por medio del servidor ProSAweb. Este servidor web permite realizar un análisis geométrico de la estructura de la proteína y evidenciar su perfil energético (Wiederstein y Sippl, 2007; Sippl, 1993). El resultado de este análisis se muestra en la Figura 3-12, donde se observa que nuestro modelo final propuesto (Punto negro) se ubica dentro del rango de posiciones permitidas y validadas con estructuras tridimensionales conocidas elucidadas a través de cristalografía de rayos X (Zona azul claro) y de resonancia magnética nuclear (RMN) (Zona azul oscuro) obtenidas de las bases de datos (Figura 3-12A). ProSA-web ofrece una interfaz basada en el programa PROSA (Wiederstein y Sippl, 2007; Sippl, 1993), el cual cuantifica la calidad global de la estructura modelo. Cuando el resultado de la evaluación se encuentra fuera de un rango característico de proteínas nativas de similar tamaño, indica que la estructura probablemente contiene errores (Sippl, 1993).

La Figura 3-12B muestra los resultados del análisis del perfil energético del mismo modelo. Se observa que la estructura 3D de nuestro modelo no presenta regiones de alta energía que afecten la calidad del mismo (Grafica color verde oscuro).

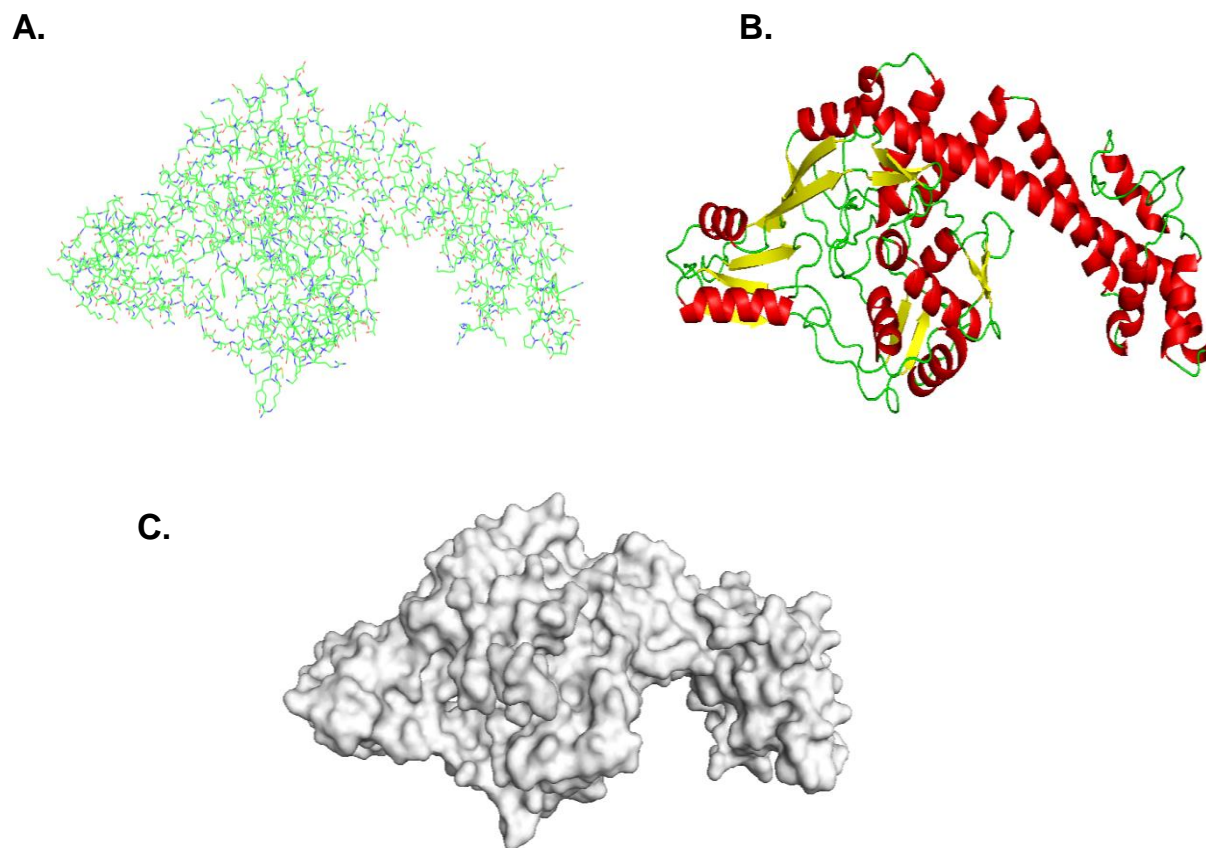
Figura 3-12: Visualización de los resultados de la evaluación realizada por ProSA-web para el modelo seleccionado de la subunidad A de la ADN girasa de *P. aeruginosa*. A) Resultados de la evaluación global del modelo, el punto negro representa nuestro modelo B) Perfil energético local del modelo.



Una vez evaluado el modelo más adecuado, se realizó la minimización energética del modelo final propuesto.

En conjunto, los resultados anteriores nos permiten proponer un modelo final para la estructura terciaria de la subunidad A de la ADN girasa de *P. aeruginosa* que se muestran en la Figura 3-13.

Figura 3-13: Modelo final propuesto para la subunidad A de la ADN girasa de *P. aeruginosa*. (Corresponde al modelo 2 SWISS-MODEL) A. Representación en líneas B. Representación resaltando elementos de estructura secundaria. En color rojo se representan las hélices α , en amarillo se representan las hojas β y en color verde los *loops* que presenta la proteína C. Representación de la superficie de van der Waals de la proteína.



3.3. Modelado de las versiones mutadas de la subunidad A de la ADN girasa de *P. aeruginosa*:

Una vez modelada la estructura terciaria de la subunidad A de la ADN girasa nativa (tipo salvaje o WT), se procedió a modelar también las estructuras tridimensionales de algunas versiones mutantes de la misma proteína. En particular, nos interesaban las mutaciones Thr83Ile, Asp87Gly y Aps87Asn porque diferentes trabajos, incluyendo un trabajo previo de nuestro grupo, han encontrado que estos cambios se relacionan con la resistencia a ciprofloxacina en aislados clínicos de *P. aeruginosa* (Yonezawa *et al*, 1995; Mounéimné *et al*, 1999; Higgins *et al*, 2003; Lee *et al*, 2005; Wydmuch *et al*, 2005; Hansen *et al*, 2006; De la Fuente *et al*, 2007; Henrichfreise *et al*, 2007; Caldera, 2010; Matsumoto, 2012; Salma *et al*, 2013; Wang *et al*, 2014).

Para modelar las proteínas mutantes, primero se procedió a modificar la estructura primaria (secuencia aminoácidos) de la proteína nativa, introduciendo el cambio del aminoácido específico que se necesitaba modificar. Luego se modeló la estructura 3D de cada proteína mutada por medio de la plataforma SWISS-MODEL, siguiendo los mismos procedimientos ya indicados para la proteína nativa o tipo salvaje (WT).

Los resultados de este proceso de modelado se observan en la Figura 3-14, donde se muestra la superficie de vanderWaals para las estructuras tridimensionales de las versiones nativa (WT) y mutantes (Thr83Ile, Asp87Gly y Aps87Asn) de la subunidad A de la ADN girasa de *P. aeruginosa*.

Una vez obtenidos los modelos estructurales de las versiones mutantes de la proteína ADN girasa A de *P. aeruginosa*, se procedió a realizar la evaluación de su calidad mediante procedimientos análogos a los indicados previamente para el modelo de la proteína WT.

Los resultados del análisis por medio del servidor QMEAN se muestran en la tabla 3-6, comparado con el dato respectivo de la proteína WT. Se observa que los parámetros de calidad "QMEAN Score" de las estructuras mutantes presentan valores similares a los observados con el modelo tipo salvaje (WT).

Figura 3-14: Representación de la superficie de van der Waals de las estructuras tridimensionales de las versiones nativa (WT) y mutantes de la ADN girasa A de *P. aeruginosa* construidos a partir de la plataforma SWISS-MODEL y visualizadas en Pymol (Schrödinger, 2010). Se resaltan los aminoácidos 83 (Cian) y 87 (Amarillo).

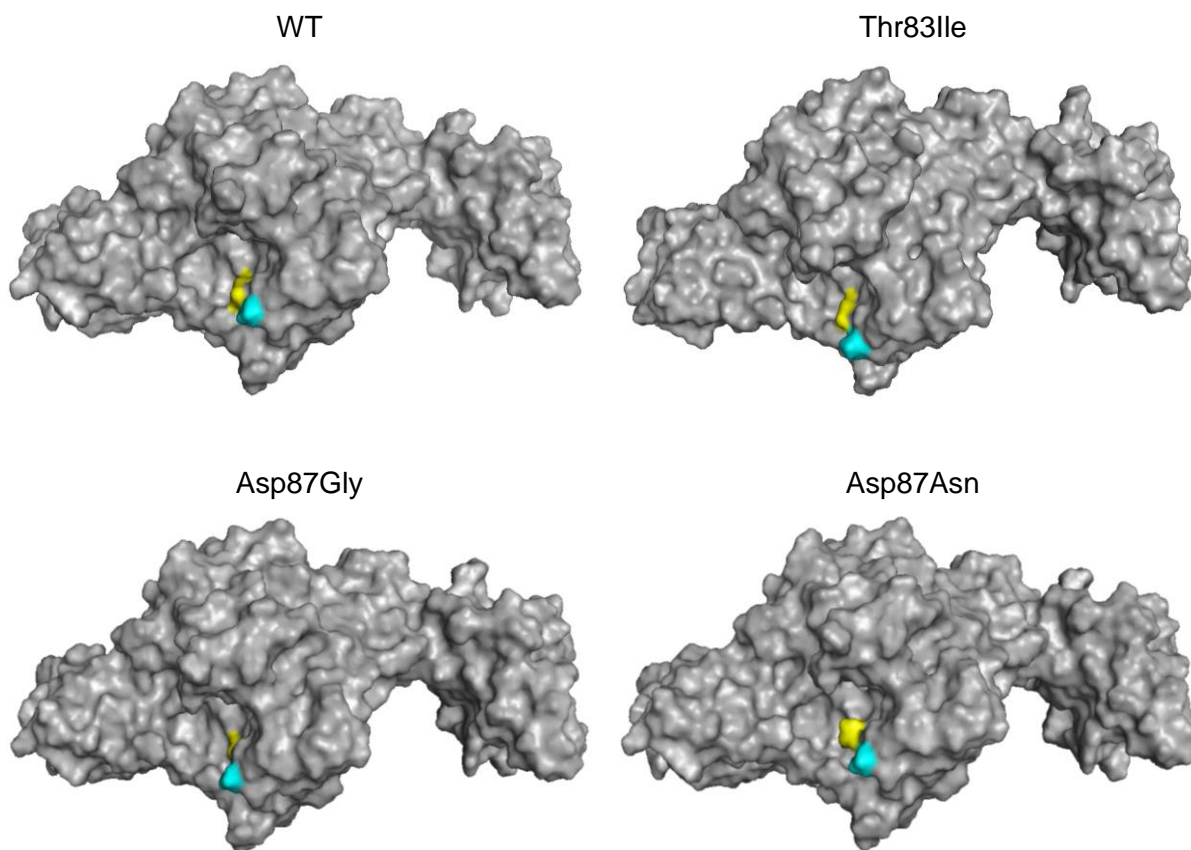


Tabla 3-6: Calidad de los modelos estructurales de las versiones mutantes.

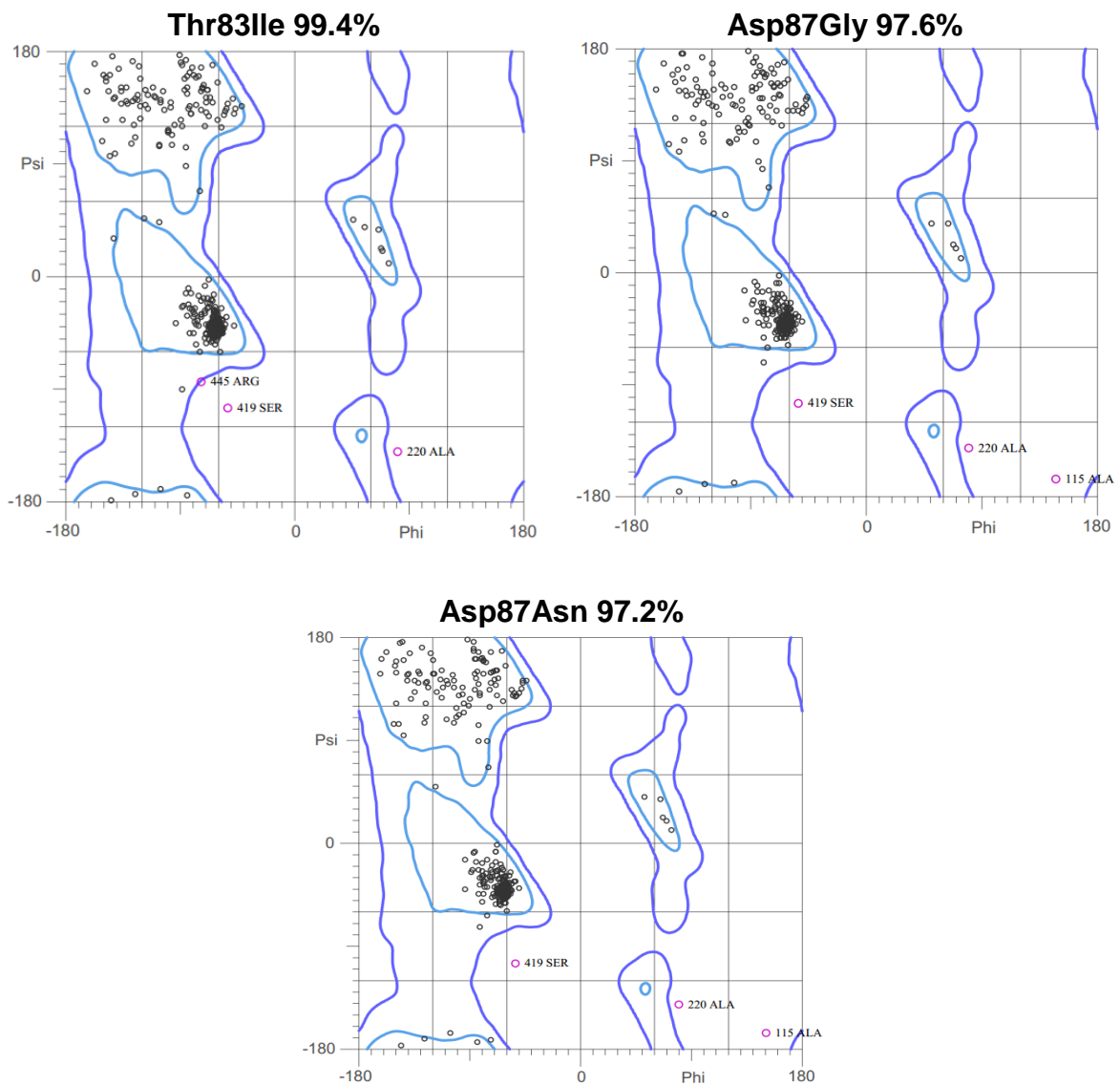
Estructura proteica evaluada	QMEAN Score ^(a,b)
Thr83Ile	0.695
Asp87Gly	0.690
Asp87Asn	0.693
WT	0.707

a) El análisis de calidad se realizó mediante el servidor QMEAN (Benkert *et al*, 2009)

b) El valor QMEAN Score de la versión WT fue tomado de la tabla 4 y corresponde al modelo 2 SWISS-MODEL

Por otra lado, se realizó una evaluación de la calidad de los modelos mediante el análisis de los gráficos de Ramachandran, los resultados se muestran en la Figura 3-15, donde se observa que todos los modelos de las estructuras mutantes presentan un porcentaje superior al 90% de sus aminoácidos en regiones permitidas, haciéndolos modelos estereoquímicamente adecuados.

Figura 3-15: Gráficos de Ramachandran de las versiones mutantes de la subunidad A de la ADN girasa de *P. aeruginosa*. Imagen tomada de la plataforma MolProbity (Chen *et al*, 2010).



En cuanto a la evaluación de la calidad por los programas Verify3D y Errat, los resultados se muestran en la tabla 3-7. Según el análisis por Verify3D se encuentra que los tres modelos de las estructuras mutantes tienen buena calidad porque su valor supera al 60%, sin embargo, los resultados de Errat evidencian que existen porciones estructurales con alta energía (resultados inferiores al 95%), lo cual podría indicar que las mutaciones realizadas a la estructura nativa (WT) pueden estar afectando en cierto grado la conformación del modelo tridimensional, haciéndolo menos favorable energéticamente.

Tabla 3-7: Evaluación de la calidad estructural de los modelos mutantes de la proteína ADN girasa A de *P. aeruginosa* por los servidores Verify3D y Errat.

Estructura proteica evaluada	Verify3D	Errat
Thr83Ile	88.62%	89.25%
Asp87Gly	91.82%	88.64%
Asp87Asn	89.62%	88.44%

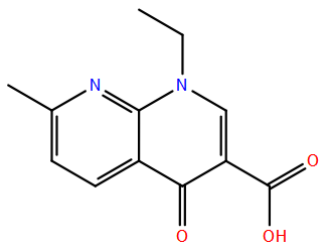
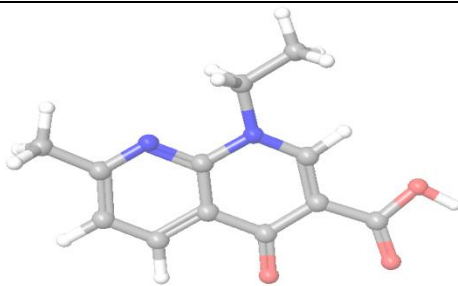
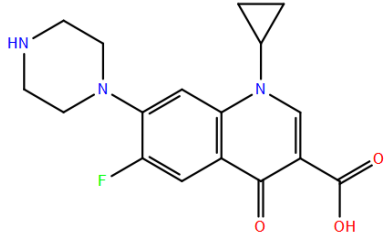
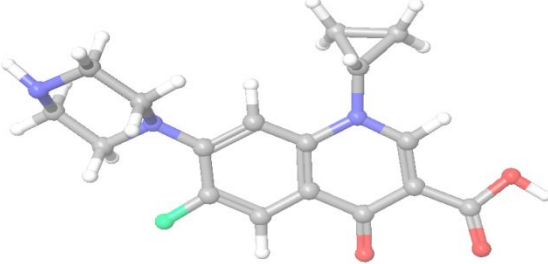
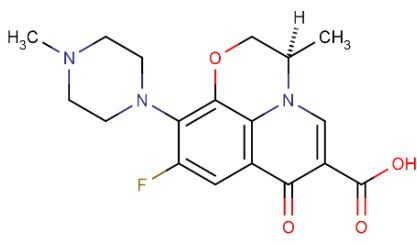
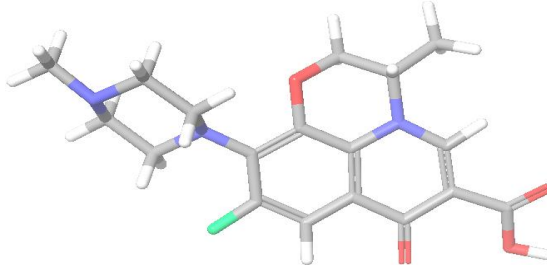
Posteriormente, a los modelos obtenidos se les realizó el proceso de minimización energética de igual forma como se hizo con la estructura nativa.

En conclusión, aun cuando los resultados por Errat con respecto a la calidad energética de los modelos no presenta valores favorables, los resultados de la evaluación de la calidad de los modelos mutantes de la proteína ADN girasa A de *P. aeruginosa* permiten evidenciar que en general todos los modelos presentan una calidad estructural adecuada.

3.4. Preparación de las estructuras de los ligandos “antibióticos”:

Los resultados del proceso de construcción de las estructuras tipo ligando de los antibióticos tipo quinolona se muestran en la tabla 3-8.

Tabla 3-8: Estructuras 3D de los ligandos (antibióticos) construidas y optimizadas.

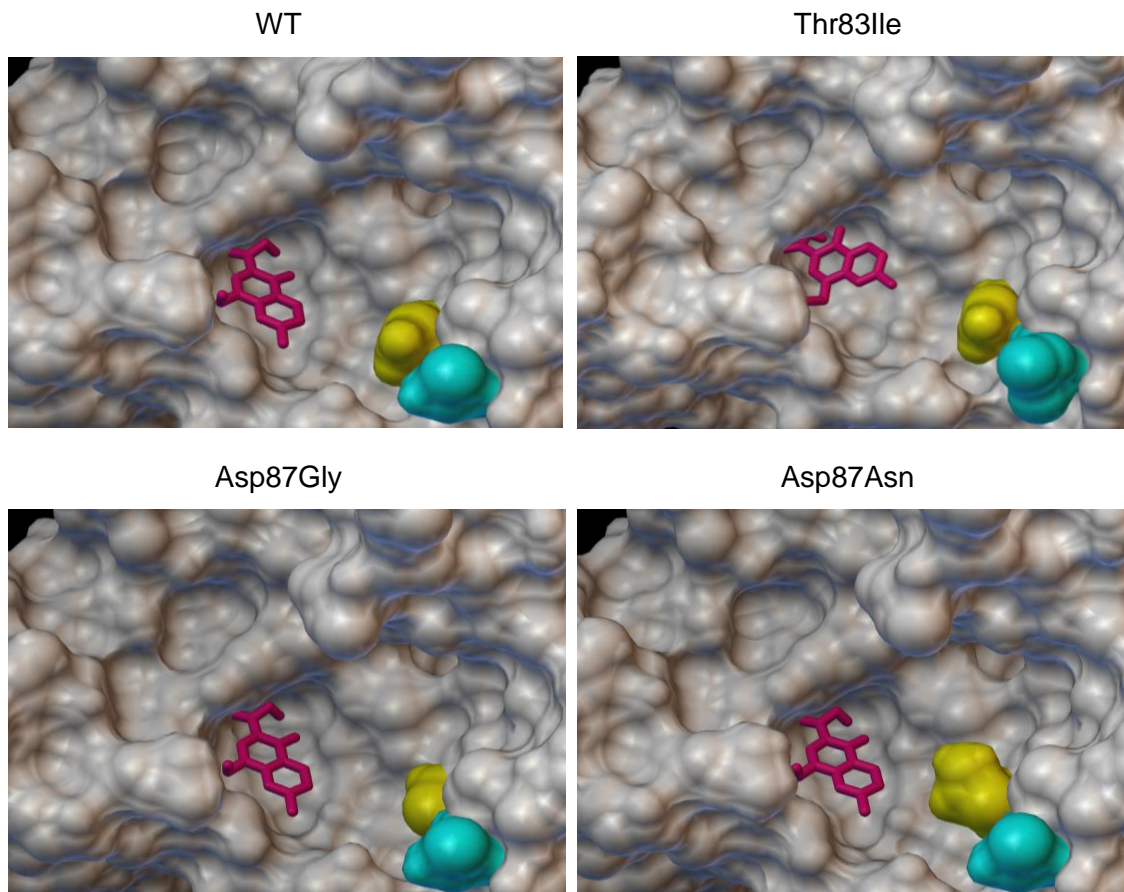
Antibiótico	Formula estructural	Representación 3D
ácido nalidíxico	 <p>Chemical structure of nalidixic acid, showing a quinolone core with an ethyl group on the nitrogen, a methyl group at position 8, and a carboxylic acid group at position 2.</p>	 <p>3D ball-and-stick model of nalidixic acid, showing the spatial arrangement of atoms (carbon in grey, nitrogen in blue, oxygen in red, and hydrogen in white).</p>
ciprofloxacin	 <p>Chemical structure of ciprofloxacin, showing a quinolone core with a piperazine ring at position 4, a cyclopropyl group at position 1, a fluorine atom at position 6, and a carboxylic acid group at position 2.</p>	 <p>3D ball-and-stick model of ciprofloxacin, showing the spatial arrangement of atoms (carbon in grey, nitrogen in blue, oxygen in red, hydrogen in white, and fluorine in green).</p>
levofloxacin	 <p>Chemical structure of levofloxacin, showing a quinolone core with a piperazine ring at position 4, a methyl group at position 1, a fluorine atom at position 6, and a carboxylic acid group at position 2.</p>	 <p>3D ball-and-stick model of levofloxacin, showing the spatial arrangement of atoms (carbon in grey, nitrogen in blue, oxygen in red, hydrogen in white, and fluorine in green).</p>

3.5. Acoplamiento molecular “*Molecular Docking*” de quinolonas:

3.5.1. Interacción de ácido nalidíxico y girasa A de *P. aeruginosa*:

La Figura 3-16 muestra los resultados de la interacción del ácido nalidíxico con los modelos teóricos construidos para la proteína ADN girasa A de *P. aeruginosa*, tanto para la forma WT como para las mutadas. En general se observa que el antibiótico se ubica dentro del mismo sitio de unión en todas las estructuras; y se posiciona en una orientación similar en todas ellas, excepto en el modelo Thr83Ile en donde adquiere una orientación un poco diferente.

Figura 3-16: Modos de unión establecidos para el ácido nalidíxico en la proteína ADN girasa A de *P. aeruginosa* WT y mutadas obtenidos mediante el programa Autodock. El residuo 83 se representa con color cian, el residuo 87 en amarillo, el ácido nalidíxico en púrpura y la superficie de la proteína en gris.



La tabla 3-9 muestra datos específicos acerca de esta interacción.

Tabla 3-9: Energías de unión para la interacción entre ácido nalidíxico y ADN girasa A.

ESTRUCTURA	ENERGÍA LIBRE DE UNIÓN (ΔG unión) Kcal/mol*	PUENTES DE H (RESIDUO INVOLUCRADO)	AMINOÁCIDOS DE CONTACTO A 4 ANGSTROMS
WT	-6,34	Gln268	Gln94, Phe96, Ser97, Val112, Gly114, Tyr267, Leu269, Asn270
Thr83Ile	-6,05	Gln268	Arg91, Phe96, Ser111, Val112, Gly114, Thr219, Tyr267, Leu269
Asp87Gly	-6,29	Gln268	Gln94, Phe96, Ser97, Val112, Gly114, Thr219, Tyr267, Leu269, Asn270
Asp87Asn	-6,19	Gln268	Gln94, Phe96, Ser97, Val112, Thr219, Tyr267, Leu269, Asn270

*Datos obtenidos mediante el programa Autodock.

Aunque la energía libre de unión es menor con la estructura WT no parecieran existir diferencias entre los valores de energía entre los distintos modelos proteicos.

Además, se observa que el antibiótico (ácido nalidíxico) presenta una interacción tipo puente de hidrógeno con el grupo amino del residuo Gln268 en todas las estructuras modelo analizadas. Adicionalmente, en todas las estructuras el antibiótico presenta interacciones con los residuos Phe96, Val112, Tyr267 y Leu269.

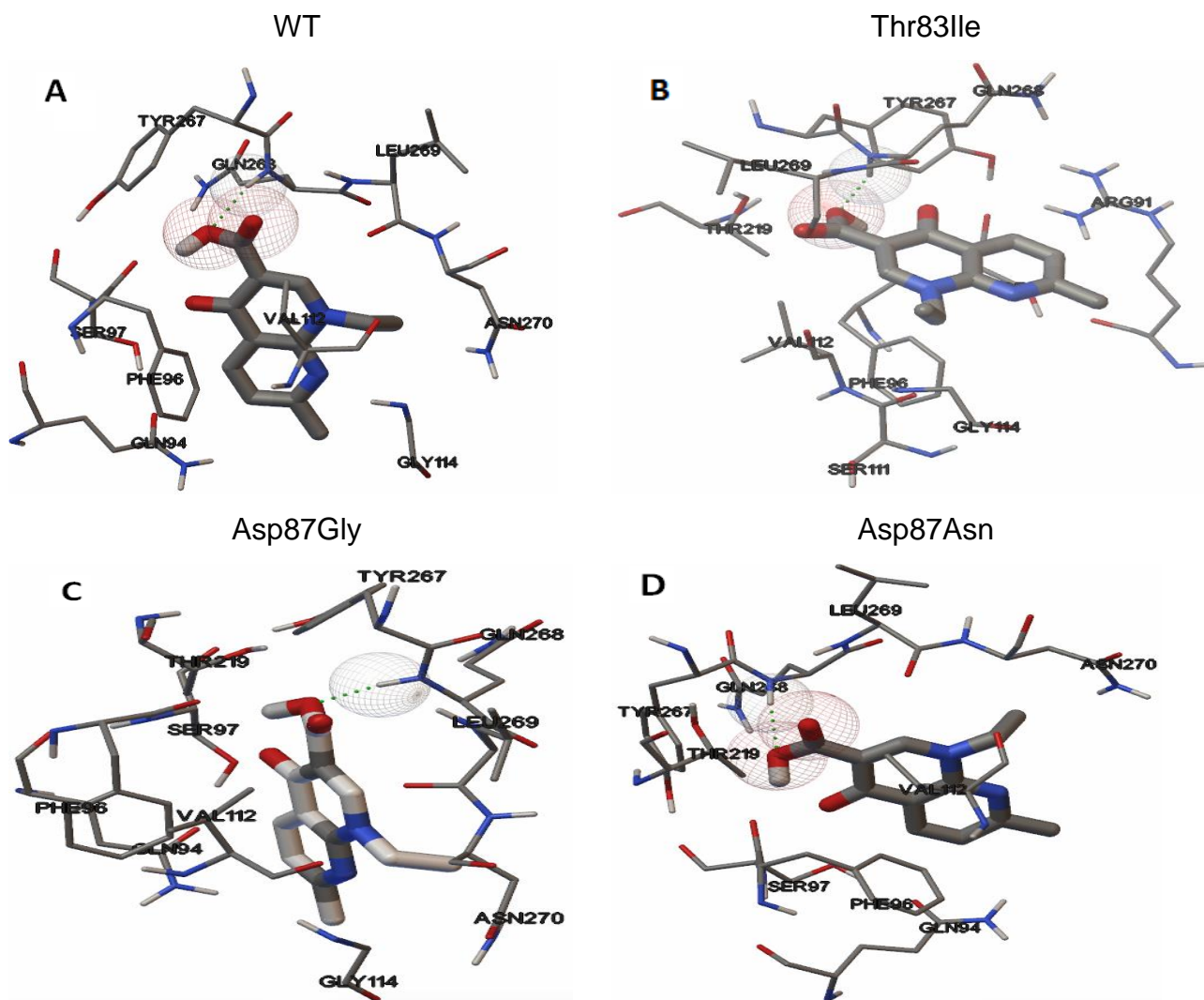
En la estructura nativa (WT), el antibiótico presenta además interacciones con los residuos Gln94, Ser97, Gly114 y Asn270 (Figura 3-17A), las cuales se mantienen en la forma mutante Asp87Gly.

En la forma mutante Thr83Ile el antibiótico presenta interacciones particulares con los aminoácidos Arg91, Ser111 (Figura 3-17B) que no se presentan en las demás estructuras (nativa y mutantes). En esta forma mutante, el antibiótico no presenta interacciones con los residuos de los aminoácidos Gln94, Ser97 y Asn270, como se observó en las estructuras nativa y en las mutantes Asp87Gly (Figura 3-17C) y Asp87Asn (Figura 3-17D).

Con respecto a la estructura mutada Asp87Asn, a diferencia de la estructura nativa y las otras mutantes, el antibiótico no presenta interacción con el residuo Gly114 (Figura 3-17D).

Por otra parte, en las estructuras mutadas (Thr83Ile, Asp87Gly y Asp87Asn) se observa que el ácido nalidíxico genera una interacción adicional con la Thr219, la cual no se presenta en la estructura WT.

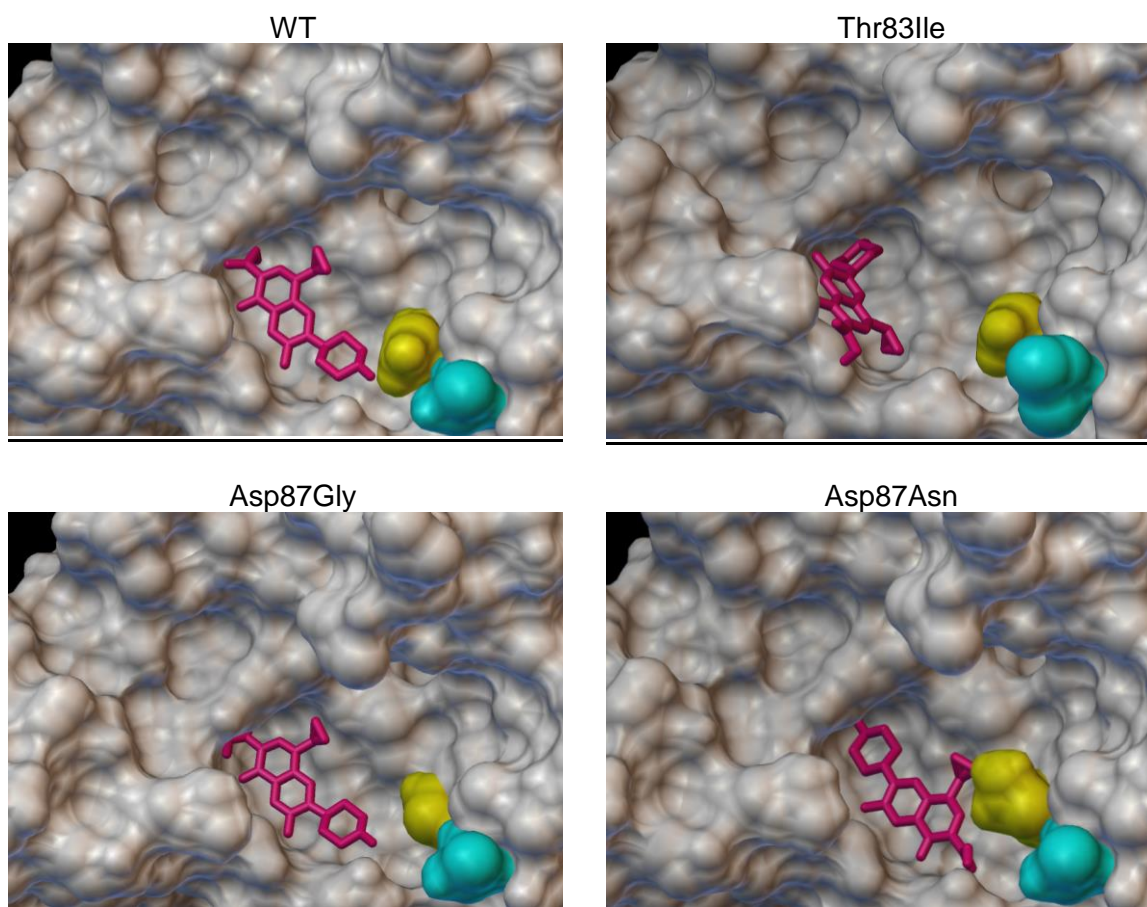
Figura 3-17: Representación gráfica del sitio de unión del ácido nalidíxico, mostrando los residuos de contacto (a 4 Å) con cada uno de los modelos estructurales propuestos para la subunidad A de la ADN girasa de *P. aeruginosa*. Los análisis se hicieron utilizando el programa AutoDockTools (ADT).



3.5.2. Interacción de ciprofloxacina y girasa A de *P. aeruginosa*:

La Figura 3-18 muestra los resultados de la interacción de ciprofloxacina con los modelos teóricos construidos para la proteína ADN girasa A de *P. aeruginosa*. En general se observa que el antibiótico ocupa en el mismo sitio de unión dentro de todas las estructuras. Con los modelos WT y Asp87Gly se observa similitud en la orientación (*pose*) del antibiótico dentro del sitio de unión. En la mutante Thr83Ile el antibiótico se posiciona de una forma diferente en el bolsillo; Asp87Asn pareciera que presentara un modo de unión similar al de las estructuras WT y Asp87Gly, sin embargo, la posición del anillo de ciclopropano es diferente.

Figura 3-18: Modos de unión establecidos para la ciprofloxacina en la proteína ADN girasa A de *P. aeruginosa* WT y mutadas obtenidos mediante el programa Autodock. El residuo 83 se representa con color cian claro, el residuo 87 en amarillo, la ciprofloxacina en purpura y la superficie de la proteína en gris.



La tabla 3-10 muestra algunos parámetros de la interacción con ciprofloxacina.

Tabla 3-10: Energías de unión para la interacción entre ciprofloxacina y ADN girasa A.

ESTRUCTURA	ENERGÍA LIBRE DE UNIÓN (ΔG unión) Kcal/mol*	PUENTES DE H (RESIDUO INVOLUCRADO)	AMINOÁCIDOS DE CONTACTO A 4 ANGSTROMS
WT	-7,01	Asp87; Gln268	Val90, Arg91, Gln94, Phe96, Ser97, Ser111, Val112, Asn116, Tyr267
Thr83Ile	-6,91	Phe96; Asn270	Gln94, Ser111, Val112, Gly114, Asp115, Thr219, Tyr267, Gln268, Leu269, Arg273
Asp87Gly	-6,92	Gln268	Arg91, Gln94, Phe96, Ser97, Ser111, Val112, Gly114, Asp115, Asn116, Thr219, Tyr267, Leu269
Asp87Asn	-6,82	Ala117	Asn87, Arg91, Gln94, Phe96, Ser97, Ser111, Val112, Asp115, Asn116, Gln268

*Datos obtenidos mediante el programa Autodock.

Los resultados indican que la ciprofloxacina pareciera unirse de manera más estable con la estructura WT, ya que la energía libre de unión es menor en la interacción del antibiótico con esta proteína. Sin embargo, al igual que en el caso del ácido nalidíxico, no parecen existir diferencias importantes entre los valores de energía libre de unión.

Además, se observa que el antibiótico ciprofloxacina presenta interacciones de tipo puente de hidrógeno con diferentes residuos dependiendo de la estructura con la cual se una; sin embargo, en todas las estructuras el antibiótico presenta interacciones con los residuos Gln94, Phe96, Ser111 y Val112.

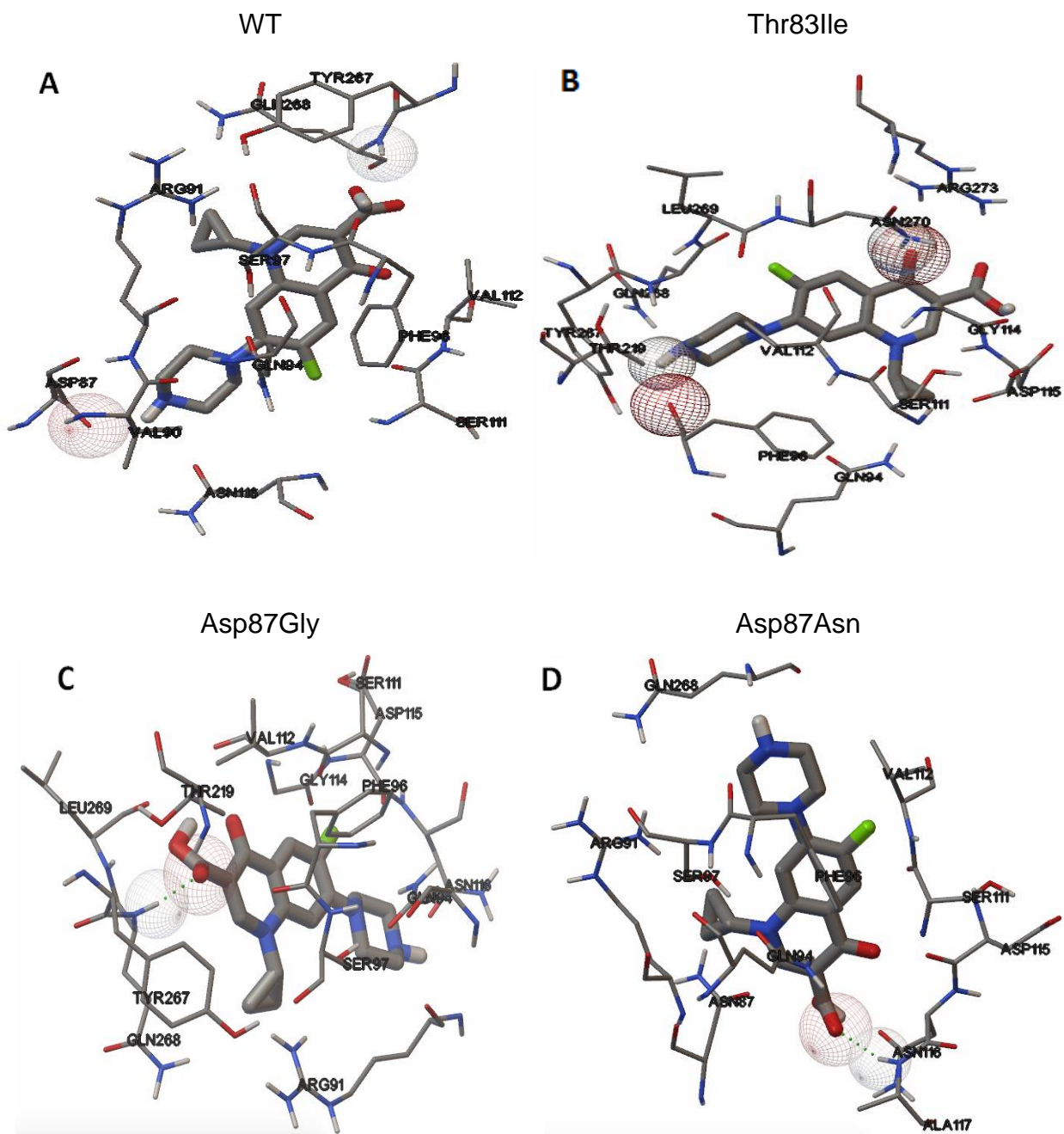
La interacción del antibiótico con la estructura WT presenta un puente de hidrógeno con el residuo Asp87 y otro con Gln268 (Figura 3-19A). Se observa que el antibiótico en la estructura WT genera un contacto con el residuo Val90, el cual no se presenta en las formas mutadas.

En cuanto a la estructura Thr83Ile, la interacción con ciprofloxacina muestra dos puentes de hidrógeno con los residuos Phe96 y Asn270. Comparado con la estructura WT, Thr83Ile no presentó interacciones con los residuos Val90, Arg91, Ser97 y Asn116 pero se generaron nuevas interacciones con los residuos Gly114, Asp115, Thr219, Gln268, Leu269, Arg273 (Figura 3-19B).

En cuanto a la estructura Asp87Gly, se conserva el puente de hidrógeno observado con el residuo Gln268, sin embargo, para esta mutación, no se presenta el puente de hidrógeno con el residuo Asp87 que si se observó en la proteína WT. Otras variaciones con respecto a la estructura WT son: no presenta interacciones con el residuo Val90, pero se observaron nuevas interacciones con Gly114, Asp115, Thr219 y Leu269 (Figura 3-19C).

Por otra parte, la estructura Asp87Asn, presenta un puente de hidrógeno con el residuo Ala117. A diferencia de la estructura WT, Asp87Asn no presenta interacción con Val90 y Tyr267, pero se observan una serie de interacciones adicionales con los residuos Asn87, Asp115 y Gln268 (Figura 3-19D).

Figura 3-19: Representación gráfica del sitio de unión de ciprofloxacina, mostrando los aminoácidos de contacto (a 4 Å) con cada uno de los modelos estructurales propuestos para la subunidad A de ADN girasa de *P. aeruginosa*. Los análisis se hicieron utilizando el programa AutoDockTools (ADT).

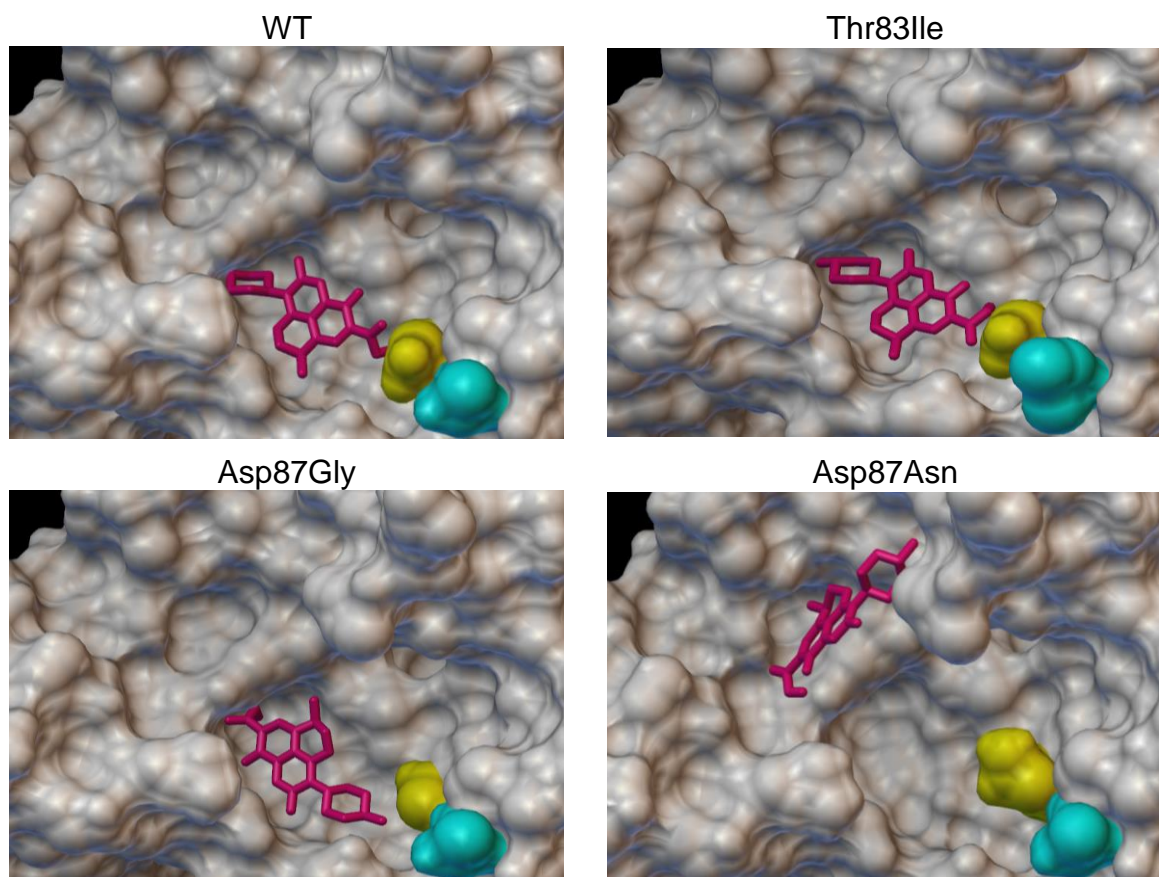


3.5.3. Interacción de levofloxacin y girasa A de *P. aeruginosa*:

La Figura 3-20 muestra los resultados de la interacción de levofloxacin con los modelos teóricos construidos para la proteína ADN girasa A de *P. aeruginosa*. En las estructuras WT, Thr83Ile y Asp87Gly se observa que el antibiótico se posiciona en el mismo bolsillo de unión, mientras que en la estructura Asp87Asn levofloxacin se ubica en un sitio diferente pero próximo al anterior. En cuanto a la orientación que adquiere el antibiótico en el bolsillo de unión, en las estructuras WT y Thr83Ile este se posiciona con la misma orientación en ambos modelos, pero en la forma Asp87Gly se posiciona de manera diferente.

En el modelo Asp87Asn que tiene un bolsillo de unión diferente, la orientación (*pose*) del antibiótico también es diferente.

Figura 3-20: Modos de unión establecidos para la levofloxacin en la proteína ADN girasa A de *P. aeruginosa* WT y mutadas obtenidos mediante el programa Autodock. El residuo 83 se representa con color cian, el residuo 87 en amarillo, levofloxacin en púrpura y la superficie de la proteína en gris.



La tabla 3-11 muestra las interacciones de la levofloxacin con las estructuras modelo. La energía libre de unión es más negativa para la interacción del antibiótico con el modelo Asp87Gly.

Tabla 3-11: Energías de unión para la interacción entre levofloxacin y ADN girasa A.

ESTRUCTURA	ENERGÍA LIBRE DE UNIÓN (ΔG unión) Kcal/mol*	PUENTES DE H (RESIDUO INVOLUCRADO)	AMINOÁCIDOS DE CONTACTO A 4 ANGSTROMS
WT	-6,81	---	Asp87, Arg91, Gln94, Phe96, Ser97, Ser111, Val112, Asp115, Thr219, Pro266, Tyr267, Gln268, Leu269
Thr83Ile	-6,45	---	Asp87, Arg91, Gln94, Phe96, Ser97, Ser111, Val112, Asp115, Thr219, Pro266, Tyr267, Gln268, Leu269
Asp87Gly	-7,13	Gln268	Gly87, Val90, Arg91, Gln94, Phe96, Ser97, Ser111, Val112, Asp115, Asn116, Thr219, Tyr267
Asp87Asn	-5,97	Asn181; Ser329	Gly173, Ile174, Thr180, Ile242, Tyr267, Gln268, Leu269, Val330, Phe331

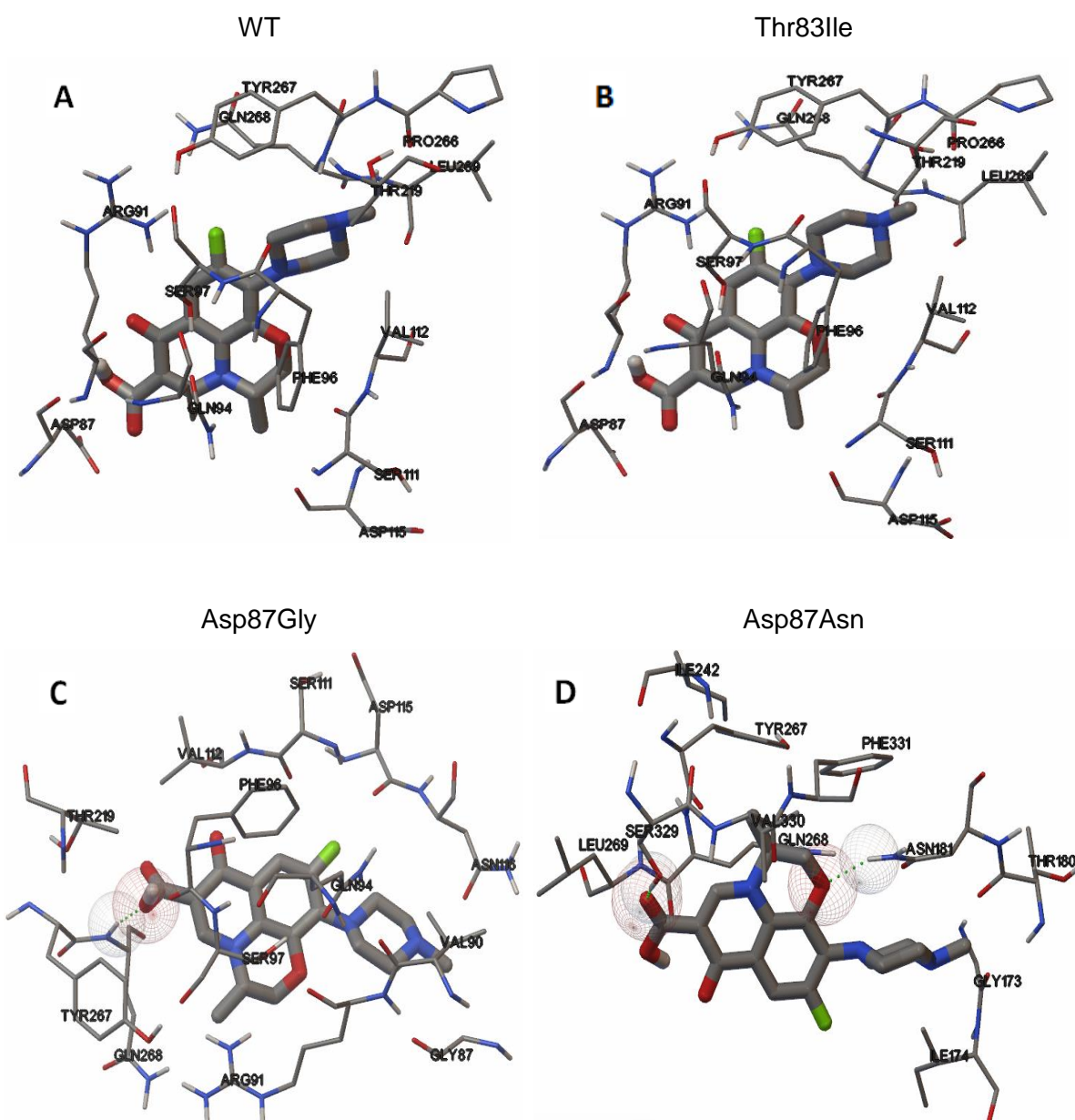
*Datos obtenidos mediante el programa Autodock.

En general, se observa que el antibiótico levofloxacin no presenta interacciones de tipo puente de hidrógeno con las estructuras WT y Thr83Ile. Sin embargo, si existen puentes de hidrogeno en los modelos Asp87Gly y Asp87Asn.

En la proteína nativa (WT) levofloxacin establece interacciones de otro tipo (no puentes de hidrogeno) con otros residuos (Tabla 3-11, Figura 3-21A) muchos de estos residuos también interactúan en las proteínas mutantes Thr83Ile y Asp87Gly (Tabla 3-11, Figura 3-21B y 3-21C)

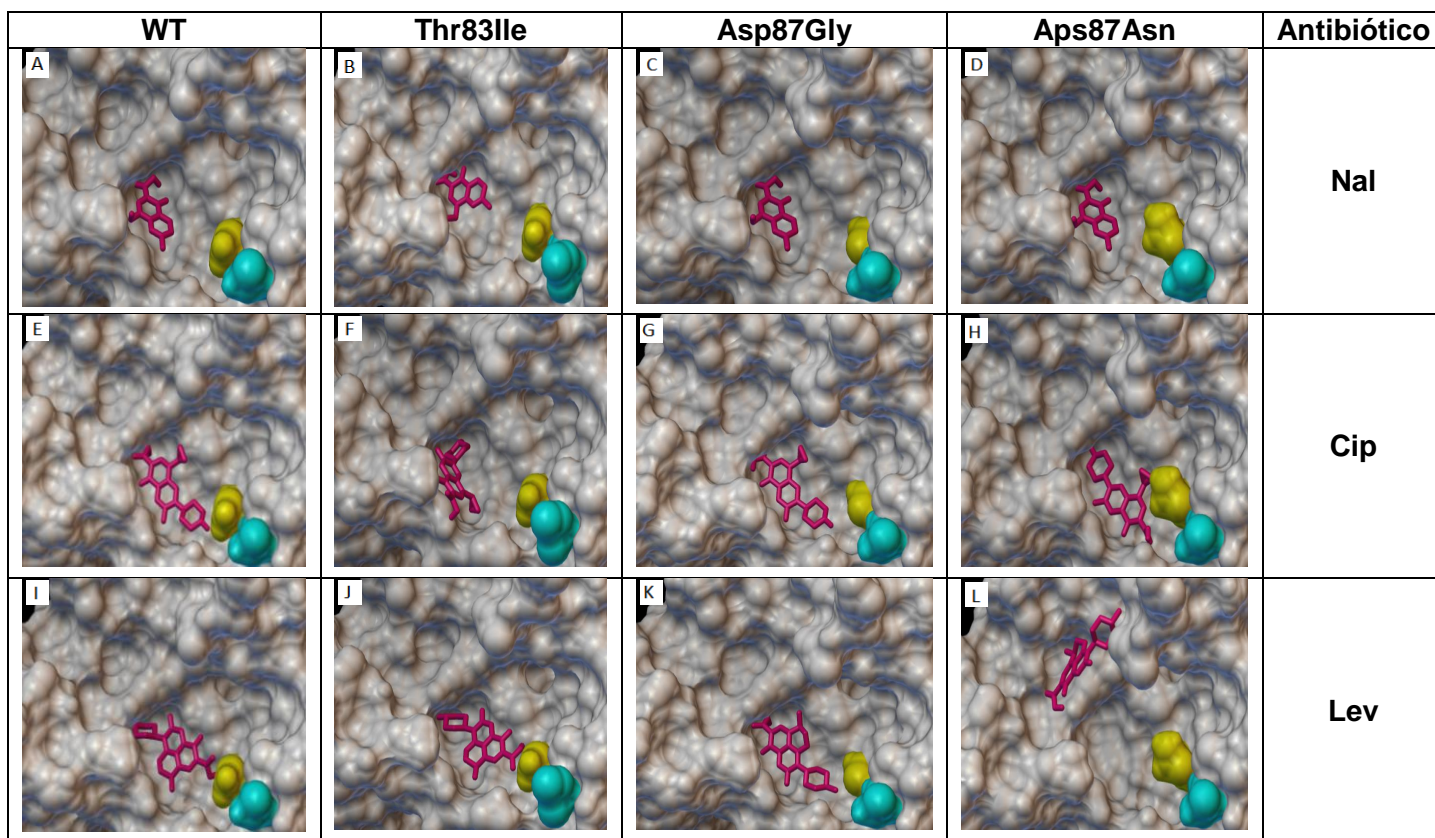
En cuanto al modelo Asp87Asn por el hecho de tener un bolsillo de unión diferente, el antibiótico presenta interacciones con residuos diferentes a los observados en los otros modelos estudiados (Tabla 3-11, Figura 3-21D) a excepción de los residuos Tyr267 y Gln268 los cuales resultan ser comunes en la interacción de levofloxacin con todas las estructuras estudiadas.

Figura 3-21: Representación gráfica del sitio de unión de levofloxacin, mostrando los residuos de contacto (a 4 Å) con cada uno de los modelos estructurales propuestos para la subunidad A de ADN girasa de *P. aeruginosa*. Los análisis se hicieron utilizando el programa AutoDockTools (ADT).



La Figura 3-22 muestra un resumen de la interacción de los distintos antibióticos estudiados con los modelos estructurales propuestos (WT, Thr83Ile, Asp87Gly Y Aps87Asn).

Figura 3-22: Modos de unión de los diferentes modelos de la ADN girasa A de *P. aeruginosa* (WT, Thr83Ile, Asp87Gly Y Aps87Asn) obtenidos mediante el programa Autodock. Los paneles superiores (A-D) representan la interacción con ácido nalidíxico (Nal); Los paneles centrales (E-H) muestran la interacción con ciprofloxacina (Cip), y los paneles inferiores (I-L) con levofloxacina (Lev).



4. Discusión

El presente trabajo se planteó con el fin de continuar trabajos previos de nuestro grupo de investigación, que ha venido trabajando por años con pacientes afectados de fibrosis quística. En aislados clínicos locales de *P. aeruginosa* obtenidos de infecciones pulmonares de estos pacientes, hemos observado un alto porcentaje ($\geq 54\%$) de aislados resistentes a ciprofloxacina, un antibiótico de primera elección para el tratamiento de tales infecciones (Caldera *et al*, 2010; Baena del Valle *et al*, 2014). Adicionalmente, hemos observado que la resistencia a este antibiótico se relacionaría con la presencia de mutaciones en el gen *gyrA* que codifica la subunidad A de la enzima ADN girasa, mutaciones que afectarían la estructura primaria de la proteína al traducirse en los cambios Thr83Ile, Asp87Gly y Asp87Asn (Caldera, 2010). Las observaciones de nuestro grupo coinciden con trabajos de otros grupos internacionales (Tabla 1-1), donde se aprecia que la mutación Thr83Ile se relaciona con resistencia a antibióticos tipo quinolonas en todos los estudios reportados a la fecha, y algo similar ocurriría con el residuo Asp87, que es afectado por los cambios Asp87Gly, Asp87Tyr, Asp87His y Asp87Asn

En particular, con este trabajo se intenta dar una explicación a nivel estructural a la resistencia observada frente a ciprofloxacina en aislados clínicos locales de *P. aeruginosa* provenientes de pacientes con fibrosis quística.

4.1. Modelado molecular de la estructura 3D de la ADN girasa de *P. aeruginosa* WT y versiones mutantes:

Dado que no se conoce la estructura 3D de la enzima ADN girasa de *P. aeruginosa*, primero se planteó modelar por homología dicha estructura para luego realizar un análisis teórico computacional del acoplamiento molecular (interacción) entre el modelo estructural modelado y algunos antibióticos tipo quinolonas (ácido nalidíxico, ciprofloxacina y levofloxacina).

A pesar de que la enzima ADN girasa es una proteína dimérica constituida por dos subunidades diferentes, subunidades A y B, es importante tener presente que en este estudio sólo se trabajó con la subunidad A de la enzima, lo que podría representar una limitación al estudio.

En cuanto al proceso de modelado molecular de la estructura terciaria de la proteína, éste se llevó a cabo a través de tres plataformas computacionales diferentes, lográndose obtener un total de doce modelos teóricos de la subunidad A de la enzima ADN girasa de *P. aeruginosa*, siete de los cuales se construyeron mediante las plataformas SWISS-MODEL y MODELLER tomando como molde dos estructuras proteicas conocidas de *E. coli* reportadas en la base de datos *Protein Data Bank* (2Y3P y 1AB4), y que presentaron la mayor homología con la proteína de *P. aeruginosa*; los otros cinco modelos se generaron a partir de la plataforma I-TASSER, la cual no compara la secuencia de la proteína problema con una proteína molde proporcionada por el investigador, sino con toda una base de datos de estructuras tridimensionales conocidas. Cada plataforma computacional tiene su propio método para evaluar la calidad de los modelos desarrollados por ella misma, y lo hace de acuerdo a funciones o parámetros específicos propios de la plataforma; esto permitió descartar siete de los doce modelos generados, preseleccionando así cinco de los doce modelos originales.

Como los parámetros de calidad propios de cada plataforma no permiten comparar modelos construidos con otras plataformas, fue necesario utilizar otros servidores (QMEAN y MolProbity), los cuales analizan la calidad de los modelos independiente de la plataforma por la cual se hayan construido. Este proceso de evaluación adicional permitió descartar tres de los cinco modelos preseleccionados. De esta manera se determinó que los mejores modelos construidos fueron los dos modelos generados con la plataforma

SWISS-MODEL, pues presentaron los mejores valores de QMEAN total y un mayor porcentaje de aminoácidos en regiones permitidas del gráfico de Ramachandran. Con base a las funciones de calidad anteriores, se seleccionó el modelo 2 de SWISS-MODEL como el mejor modelo de estructura terciaria para la proteína ADN girasa subunidad A de *P. aeruginosa*, el cual adicionalmente presentó un perfil energético que garantizaría su estabilidad y también parámetros estructurales que se encontrarían dentro del rango observado para proteínas con estructura 3D ya conocidas mediante técnicas cristalográficas.

El modelo 2 de SWISS-MODEL fue construido por homología con la estructura homóloga 2Y3P de *E. coli* (Edwards *et al*, 2009) Cabe recordar que la estructura 2Y3P corresponde al dominio N-terminal (aminoácidos 2-523) de la subunidad A de la ADN girasa de *Escherichia coli*, en un complejo con simociclinona D8. En *Pseudomonas aeruginosa* la subunidad A de la ADN girasa consta de 923 aminoácidos y el modelo 3D propuesto aquí para esta proteína contiene sólo 492 aminoácidos del extremo N-terminal (aminoácidos 30-522), esto debido a que la estructura que se tomó como molde o plantilla para la generación del modelo corresponde también a el extremo N-terminal de la proteína de *E. coli*. Consideramos que nuestro modelo es apropiado porque contiene íntegra la Región QDRD determinante de la resistencia a quinolonas localizada entre los aminoácidos 67 y 106 (Hedde y Maxwell, 2002).

Nuestro modelo final propuesto fue evaluado adicionalmente por los programas Verify, Errat y proSAweb, concluyendo que es un modelo adecuado para el proceso de acoplamiento molecular.

Con base en la misma estructura base 2Y3P, se construyeron también los modelos de las versiones mutantes Thr83Ile, Asp87Gly, y Asp87 de la subunidad A de la enzima, lo que se hizo siguiendo la misma metodología empleada para obtener el modelo de la proteína WT o nativa.

Todos los modelos de las versiones mutadas de la proteína fueron evaluados por medio de los parámetros QMEAN score, gráficos de Ramachandran, Verify, Errat y proSAweb con el fin de determinar la calidad de la estructura. En general los resultados evidencian que los modelos construidos presentan una topología adecuada. Estos modelos al igual que en el caso de la estructura nativa se optimizaron con el fin de asegurar que la

estructura no presente repulsiones que afecten posteriormente el proceso de acoplamiento molecular.

A nuestro entender, este es el primer trabajo que propone un modelo 3D para la estructura de la ADN girasa (subunidad A) de *P. aeruginosa*. Todavía más, es el primer trabajo que propone un modelo 3D para algunas versiones mutantes de esta enzima.

4.2. Acoplamiento molecular de los modelos 3D propuestos con antibióticos de tipo Quinolona:

Con respecto al proceso de acoplamiento molecular de las quinolonas evaluadas con las versiones nativa (WT) y mutantes (Thr83Ile, Asp87Gly y Aps87Asn) de la proteína ADN girasa A de *P. aeruginosa*, se evidenció lo siguiente:

4.2.1. ácido nalidíxico:

Los resultados con ácido nalidíxico muestran que este se une al mismo sitio de unión en los cuatro modelos estructurales estudiados (WT, Thr83Ile, Asp87Gly y Aps87Asn), un sitio conformado al menos por los aminoácidos Phe96, Val112, Tyr267 y Leu269 (Figura 3-16). No solamente el sitio de unión se mantiene, sino también las energías libres de unión son prácticamente las mismas con los cuatro modelos (tabla 3-9).

Aunque el sitio de unión para el ácido nalidíxico parece ser el mismo en las cuatro estructuras, se encontró que el antibiótico se une con una orientación diferente a la estructura Thr83Ile, observándose nuevas interacciones con otros residuos (tabla 3-9). Estos resultados coinciden con un leve aumento de la energía de libre de unión, lo cual podría sugerir que cambios en la interacción del antibiótico con la proteína podrían ser importantes para la regulación de la actividad antibiótica y por ende de la generación de resistencia bacteriana observada frente a ácido nalidíxico.

4.2.2. ciprofloxacina:

Los resultados con ciprofloxacina muestran que este antibiótico se liga al mismo sitio de unión en los cuatro modelos estudiados (WT, Thr83Ile, Asp87Gly y Asp87Asn), sitio conformado al menos por los aminoácidos Gln94, Phe96, Ser111 y Val112 (Figura 3-18). Adicionalmente, las energías libres de unión son prácticamente las mismas con los cuatro modelos (tabla 3-10).

Adicionalmente, se encontró que el antibiótico se une con una orientación diferente en las estructuras Thr83Ile y Asp87Asn (Figura 3-18). En ambas estructuras se generan nuevas interacciones con otros residuos (tabla 3-10).

4.2.3. levofloxacina:

Los resultados con levofloxacina fueron algo diferentes a lo observado con los dos antibióticos ya discutidos (ácido nalidíxico y ciprofloxacina) porque en el caso de levofloxacina se encontró que existen variaciones en la forma cómo el antibiótico se une a los diferentes modelos estructurales analizados (Figura 3-20). En efecto, en el modelo Asp87Asn el bolsillo de unión parece ser diferente al encontrado en los otros tres modelos (WT, Thr83Ile, Asp87Gly). Esto es coincidente con los valores de energía libre de unión observados, ya que la interacción de levofloxacina con el modelo Asp87Asn presenta un valor de -5,97 Kcal/mol, superior en poco más de un orden de magnitud al observado con el modelo WT de -6,81 Kcal/mol (Tabla 3-11).

En este punto, es importante destacar que el bolsillo de unión para levofloxacina en los modelos WT, Thr83Ile, y Asp87Gly es el mismo sitio que se encuentra para los otros antibióticos estudiados (ácido nalidíxico y ciprofloxacina).

Por otra parte, nuestros resultados muestran que levofloxacina presentaría mayor afinidad por el modelo Asp87Gly en comparación con la estructura nativa (WT). Esto se debería a que levofloxacina tiene un menor impedimento estérico para adecuarse dentro del sitio de unión de dicho modelo, y podría llevar a pensar que los aislados clínicos con esta mutación en la subunidad A de la ADN girasa de *P. aeruginosa* podrían ser más sensibles a este fármaco y los pacientes llegar a tener un mejor resultado a nivel clínico con levofloxacina comparado con ciprofloxacina.

4.3. Comparación de nuestro estudio con otros similares:

Un estudio computacional similar al nuestro pero enfocado en la interacción de quinolonas (ácido nalidíxico y ciprofloxacina) con la subunidad A de la girasa de *E.coli* fue realizado previamente por otros investigadores (Vashist *et al*, 2009).

Una diferencia a resaltar entre la proteína de *E. coli* y la de *P. aeruginosa* radica en el aminoácido de la posición 83, que en el caso de *E. coli* es una serina (Ser83) y en *P. aeruginosa* es una Treonina (Thr83).

Con respecto al ácido nalidíxico, Vashist *et al* (2009) encuentran que la afinidad del ligando disminuye en el siguiente orden: nativa (WT) > Asp87Tyr/Gly > Ser83Phe/Tyr y que el antibiótico se posicionaría en lugares y orientaciones distintas de la proteína dependiendo de la mutación presentada. De manera similar, nuestros resultados muestran que las orientaciones del antibiótico dentro de la enzima varían dependiendo del modelo estudiado (WT, Thr83Ile, Asp87Gly y Aps87Asn). Sin embargo, a diferencia de Vashist *et al* (2009), nosotros no observamos cambios importantes en las energías de unión entre los diferentes modelos. En efecto, para la unión con el ácido Nalidíxico nuestros resultados arrojaron valores de ΔG de unión muy similares para las cuatro estructuras modelo analizadas (-6.05 a -6.34 Kcal/mol, como se muestra en la tabla 3-9). Estos valores reflejan afinidades de unión muy similares entre el ácido nalidíxico y los diferentes modelos (constantes de disociación (Kd) de 2.2 a 3.6×10^{-5} M).

Con respecto a ciprofloxacina, Vashist *et al* (2009) encuentran que la afinidad del ligando disminuye en el siguiente orden: nativa > Ser83Phe/Tyr > Asp87Tyr/Gly. En su caso, la interacción presentada entre ciprofloxacina y la estructura nativa de ADN girasa de *E. coli*, se estabilizaría a través de tres puentes de hidrógeno: Asp87, Arg121 y Met120. Así, en *E. coli* el residuo Asp87 resultaría ser más importante que la Ser83 para la unión a ciprofloxacina, debido a que un cambio de aminoácido en dicha posición generaría una variación drástica en la interacción de la enzima con ciprofloxacina (Vashist *et al*, 2009). En nuestro caso, los resultados de la estructura WT presentan dos puentes de hidrógeno: Asp87 y Gln268. Cambios en el aminoácido 87 (mutación Asp87Asn) muestran que el antibiótico presentaría una orientación diferente dentro del mismo bolsillo de unión, resultados que concuerdan con los obtenidos por Vashist *et al* (2009). En nuestro caso,

no observamos diferencias en las energías de unión de ciprofloxacina a los diferentes modelos evaluados (tabla 3-10), indicando que las afinidades de este antibiótico por los modelos estructurales analizados serían las mismas (K_d entre 7.2 y 9.9×10^{-6} M).

Además, encontramos que ya existe reportada una estructura cristalográfica para la ADN girasa de *Staphylococcus aureus* en un complejo con ciprofloxacina y ADN, la que se encuentra identificada con el código de acceso 2XCT (Bax *et al*, 2010). Dicha estructura corresponde a un fragmento del extremo N-terminal de 56Kd de 489 residuos (aminoácidos 2-491) de la subunidad A y un fragmento del extremo C-terminal de 27Kd de los residuos 410-543 y 580-644 de la subunidad B de la ADN girasa de *Staphylococcus aureus* (Bax *et al*, 2010). En dicha estructura la ciprofloxacina interactúa con la girasa a través de los residuos Asp437, Arg458, Gly459, Lys460, Glu477, Gly1082, Ser1084, Ser1085 y Glu1088 de la subunidad A, y no se evidencian interacciones con los residuos de la girasa B. Adicionalmente, se observan interacciones entre el antibiótico y las bases nitrogenadas del ADN, interacciones que son mediadas por iones Mg^{+2} .

Lo anterior discrepa con lo observado por nosotros porque ninguno de los residuos implicados en la interacción de la proteína WT (nativa) con ciprofloxacina en nuestro estudio corresponde a lo reportado por Bax *et al* (2010), lo que sugeriría un bolsillo de unión distinto entre las proteínas de *S. aureus* y de *P. aeruginosa*. Estas diferencias quizás pudiesen explicarse por diferentes razones: (i) *S. aureus* es un organismo gram positivo, mientras que *P. aeruginosa* es un gram negativo; la subunidad A de *S. aureus* tiene una homología de $\approx 50\%$ con la de *P. aeruginosa*, mucho menor que la observada con *E. coli* (76%) y que sirvió de plantilla para nuestro modelo. Esa diferencia quizás sea importante. (ii) La subunidad A utilizada por Bax *et al* (2010) corresponde a la proteína de longitud completa (>1000 aminoácidos), mientras que nosotros sólo trabajamos con el extremo N-terminal. Nuestros resultados se asemejan más a los de Vashist *et al* (2009); al menos uno de los residuos en el bolsillo de unión es común al nuestro (Asp87), y otros están próximos en la estructura primaria de la proteína.

El presente trabajo representa un primer esfuerzo de nuestro grupo de investigación por conocer las bases estructurales de la interacción Quinolonas-enzima ADN girasa de *P. aeruginosa* y que nos permitan explicar la resistencia observada frente a quinolonas en aislados clínicos locales de *P. aeruginosa* debida a mutaciones en la subunidad A de la ADN girasa.

Creemos que el presente trabajo avanza algo en este sentido porque nos ha permitido disponer de un modelo de la estructura terciaria de la subunidad A de la enzima ADN girasa nativa de *Pseudomonas aeruginosa* que no se conoce hasta el momento de redacción de este documento. Además, nos ha mostrado los potenciales aminoácidos implicados en la interacción de este modelo proteico con algunos antibióticos tipo quinolona (ácido nalidíxico, ciprofloxacina y levofloxacina). El trabajo no sólo se quedó en el modelo de la proteína nativa (WT), sino también nos adelanta modelos teóricos de la estructura de tres formas mutantes (Thr83Ile, Asp87Gly y Aps87Asn), avanzando incluso hasta el punto de definir potenciales interacciones que se establecerían entre tales modelos y los antibióticos mencionados.

En cuanto a la base estructural de la resistencia observada frente a ciprofloxacina asociada a mutaciones en la subunidad A de la ADN girasa, los resultados del presente trabajo no serían concluyentes. En efecto, si se analizan las energías de unión de ciprofloxacina, no se aprecian grandes diferencias entre los distintos modelos, lo que descartaría cambios en la afinidad por el antibiótico debido a las mutaciones. Sin embargo, este tipo de estudios computacionales tiene limitaciones, y una de estas limitaciones es que el cálculo de los valores de energía libre de unión no siempre se correlaciona con los datos obtenidos a nivel experimental (Warren *et al*, 2006; Chen, 2015), de manera que la información de las energías de unión en el presente estudio no pueden descartar tal posibilidad. Lo ideal sería tener datos experimentales que nos permitan concluir. Por otro lado, si nuestros resultados se analizan desde el punto de vista de la orientación que adquiere el antibiótico en el bolsillo de unión de los distintos modelos estudiados, quizás los resultados pudieran sugerir una explicación a la resistencia observada experimentalmente, porque el presente trabajo muestra que la orientación del antibiótico en los modelos mutantes sería distinta a la orientación observada en el modelo nativo (WT). En la estructura nativa se observan interacciones que no están presentes en las estructuras mutantes, lo que quizás pudiese potencialmente llegar a alterar el efecto terapéutico del antibiótico (Tabla 3-10 y Figura 3-18).

En cuanto a los antibióticos levofloxacina y ácido nalidíxico cuyo acoplamiento molecular también fue estudiado, los pocos datos experimentales existentes en la literatura nos impide hacer una discusión más profunda. Sin embargo, se tienen como adelanto de

estudios futuros que se planifican en nuestro grupo, y para comparar con los que irán apareciendo publicados en el contexto internacional.

Finalmente, creemos que este trabajo abre la posibilidad a nuevos estudios, lo que consideramos muy positivo en términos de las proyecciones del mismo.

5. Conclusiones y proyecciones

5.1. Conclusiones

- Se propone un modelo computacional teórico de la estructura terciaria de la subunidad A de la enzima ADN girasa nativa (WT) de *Pseudomonas aeruginosa*.
- Se proponen modelos computacionales de la estructura terciaria de las versiones mutantes Thr83Ile, Asp87Gly y Asp87Asn de la subunidad A de la enzima ADN Girasa de *P. aeruginosa*.
- Se estudió el acoplamiento molecular de tres antibióticos tipo quinolonas (ciprofloxacina, ácido nalidíxico y levofloxacina) con los diferentes modelos estructurales propuestos para la subunidad A de la enzima girasa.
- Los antibióticos estudiados se fijan a un bolsillo común en los cuatro modelos, con la única excepción de levofloxacina que en el modelo Asp87Asn que se uniría a un bolsillo distinto pero cercano.
- Los antibióticos estudiados se fijan al bolsillo de unión con una orientación (“pose”) que depende del modelo estudiado.
- Los resultados del acoplamiento con ciprofloxacina, aunque no concluyentes, podrían explicar la resistencia observada en relación con la presencia de las mutaciones Thr83Ile, Asp87Gly y Asp87Asn en aislados clínicos de *P. aeruginosa*. Se necesitan estudios adicionales para una conclusión definitiva al respecto.
- Los resultados del acoplamiento molecular con ácido nalidíxico y levofloxacina servirán de insumo para intentar explicar futuros resultados de nuestro grupo de investigación.

5.2. Proyecciones:

- Realizar estudios experimentales bioquímicos y estructurales de la interacción de la subunidad A y del dímero ADN girasa de *P. aeruginosa* con antibióticos tipo quinolona para conocer con precisión las bases estructurales de dicha interacción.
- Corroborar con estudios experimentales lo observado con levofloxacina.
- Enfocar la información teórica y experimental futura hacia el diseño de nuevos fármacos antimicrobianos.
- Realizar estudios de acoplamiento molecular de antibióticos tipo quinolona con estructuras de la enzima girasa de *P. aeruginosa* que presenten más de una mutación con el fin de analizar sus implicaciones en la resistencia antibiótica observada en datos experimentales.

A. Anexo: Nomenclatura de los aminoácidos en códigos de una y tres letras

Aminoácido	Código (una letra)	Código (tres letras)
Alanina	A	Ala
Arginina	R	Arg
Asparagina	N	Asn
Aspartato	D	Asp
Cisteína	C	Cys
Glutamina	Q	Gln
Ácido glutámico	E	Glu
Glicina	G	Gly
Histidina	H	His
Isoleucina	I	Ile
Leucina	L	Leu
Lisina	K	Lys
Metionina	M	Met
Fenilalanina	F	Phe
Prolina	P	Pro
Serina	S	Ser
Treonina	T	Thr
Triptófano	W	Trp
Tirosina	Y	Tyr
Valina	V	Val

B. Anexo: Direcciones electrónicas de las plataformas y programas utilizados

- **BLAST:** <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- **BLASTP:**
http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome
- **SWISSMODEL:** <http://swissmodel.expasy.org/>
- **MODELLER v.9.10:** <https://salilab.org/modeller/>
- **I-TASSER:** <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>
- **Verify3D:** http://services.mbi.ucla.edu/Verify_3D/
- **Prosa:** <https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>
- **QMEANserver:** <http://swissmodel.expasy.org/qmean/cgi/index.cgi>
- **PyMol:** <https://www.pymol.org/>
- **AutoDock:** <http://autodock.scripps.edu/>
- **MarvinSketch:** <http://www.chemaxon.com>
- **Maestro:** <http://www.schrodinger.com/Maestro/>
- **MolProbity:** <http://molprobity.biochem.duke.edu/>

Bibliografía

Altschul, S., Gish W., Miller W., Myers E., Lipman, D, 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215: 403-410.

Altschul S., Madden T., Schäffer A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D, 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. (25): 3389-3402.

Anderson A, 2003. The process of structure-based drug design. *Chemistry & Biology*. (10): 787–797.

Andersson M., MacGowan A, 2003. Development of quinolones. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. (51) suppl S1: 1-11.

Baena-Del Valle J., Gómez-Alegría C., Gómez-Camargo D, 2014. Susceptibilidad antimicrobiana y genotipificación de *Pseudomonas aeruginosa* de pacientes con fibrosis quística y otras patologías en Cartagena (Colombia). *Salud Uninorte*. 30 (2): 104-120.

Bauernfeind A, 1997. Comparison of the antibacterial activities of the quinolones Bay 12-8039, gatifloxacin (AM 1155), trovafloxacin, clinafloxacin, levofloxacin and ciprofloxacin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. (40): 639-651.

Bax B., Chan P., Eggleston D., Fosberry A., Gentry D., Gorrec F., Gwynn M, 2010. Type IIA topoisomerase inhibition by a new class of antibacterial agents. *Nature*. 466 (7309): 935-940.

Benkert P., Tosatto S., Schomburg D, 2008. QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment. *Proteins*. 71 (1): 261-277.

Benkert P., Kuenzli M., Schwede T, 2009. QMEAN Server for Protein Model Quality Estimation. *Nucleic Acids Research*. 37: 510-514.

Benkert P, Biasini M, Schwede T, 2011. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*. 27 (3): 343-350.

Berman H., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T., Weissig H., Shindyalov I., Bourne P, 2000. The protein data bank. *Nucleic Acids Research*. 28 (1): 235-242. <http://www.rcsb.org>

Bordoli L., Kiefer F., Arnold K., Benkert P., Battey J., Schwede T, 2009. Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nature Protocols*. (4) 1–13.

Cabral J., Jackson A., Smith C., Shikotra N., Maxwell A., Liddington R, 1997. Crystal structure of the breakage–reunion domain of DNA gyrase. *Nature*. 388 (6645): 903-906.

Caldera O, 2010. Identificación de polimorfismos en el gen *gyrA* de *Pseudomonas aeruginosa* de pacientes con fibrosis quística y otras patologías en la ciudad de Cartagena (Colombia). Tesis, Maestría en Ciencias-Microbiología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Chen V., Arendall W., Headd J., Keedy D., Immormino R., Kapral G., Murray L., Richardson J., Richardson D., Headd J, 2010. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*. 66: 12-21. <http://molprobity.biochem.duke.edu/>

Chen Y, 2015. Beware of docking!. *Trends in pharmacological sciences*. 36 (2): 78-95.

ChemAxon, 2014. Marvin 6.2.2. <http://www.chemaxon.com>.

Coates A., Hu Y., Bax R., Page C, 2002. The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*. 1 (11), 895-910.

De la Fuente C., Dauros P., Bello H., Domínguez M., Mella S., Sepúlveda M., González G, 2007. Mutaciones en genes *gyrA* y *gyrB* en cepas de bacilos Gram negativos aisladas en hospitales chilenos y su relación con la resistencia a fluoroquinolonas. *Revista médica de Chile*. 135 (9): 1103-1110.

Domagala J, 1994. Structure-activity and structure-side effect relationships for the quinolone antibacterials. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. (33): 685-706.

Driscoll J., Kollef M, 2007. The Epidemiology, Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Drugs*. (67) 351-368.

Drlica K., Zhao X, 1997. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 61 (3): 377-92.

- Drlica K., Malik M., Kerns R., Zhao X, 2008. Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrobial Agents and Chemother.* 52 (2): 385-392.
- Edwards M., Flatman R., Mitchenall L., Stevenson C., Le T., Clarke T., McKay A., Fiedler H., Buttner M., Lawson D., Maxwell A, 2009. A crystal structure of the bifunctional antibiotic simocyclinone D8, bound to DNA gyrase. *Science*, 326 (5958): 1415-1418.
- Eisenberg D., Luthy R., Bowie JU, 1997. VERIFY3D: Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Methods in Enzymology.* 277: 396-404. http://services.mbi.ucla.edu/Verify_3D.
- Elkin S., Geddes D, 2003. «Pseudomonal infection in cystic fibrosis: the battle continues». *Expert review of anti-infective therapy.* 1 (4): 609-18.
- Emmerson A., Jones AM, 2003. The quinolones: Decades of development and use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 51 suppl S1: 13-20.
- Engelberg-Kulka H., Sat B., Reches M., Amitai S., Hazan R, 2004. Bacterial programmed cell death systems as targets for antibiotics. *Trends in Microbiology.* 12 (2): 66-71.
- Estrín M., Fernández JC., Serra HA, 2002. Antibióticos que Actúan sobre los Ácidos Nucleicos: Quinolonas. En Zieher LM, ed. Quimioantibióticoterapia, Colección de Farmacología (2da edición, capítulo 5): 121-133.
- Eswar N., Webb B., Marti-Renom M., Madhusudhan M., Eramian D., Shen M., Pieper U., Sali A, 2007. Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Current protocols in protein science [electronic resource] / editorial board, John E. Coligan ... [et al.]*. Chapter 2: Unit 2.9.
- Fiser A., Šali A, 2003. Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models. *Methods in enzymology.* 374: 461-491.
- Froelich-Ammon S., Osheroff N, 1995. Topoisomerase poisons: Harnessing the dark side of enzyme mechanism. *Journal of Biological Chemistry.* 270: 21429-21432.
- Gómez D., Malambo D, 2002. Comparación de susceptibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* aislada en pacientes con fibrosis quística y *Pseudomonas aeruginosa* de otros aislados clínicos en la ciudad de Cartagena. *Revista Ciencias Médicas.* 5 (1).
- Goodsell D., Morris G., Olson A, 1996. Automated docking of flexible ligands: applications of AutoDock. *Journal of Molecular Recognition.* 9 (1):1-5.
- Gutiérrez J., López R, 2001. Repercusiones en la salud pública de la resistencia a quinolonas en bacterias de origen animal. *Revista Española de Salud Pública.* (75): 313-320.

Gutiérrez N, 2004. Relación entre estructura, actividad y efectos adversos de las quinolonas. *Revista Española de Quimioterapia*. 17 (3) 234-243.

Hamood A., Colmer-hamood J., Carty N, 2004. Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A synthesis. *Virulence and Gene Regulation*. Texas, USA. Springer US, 2: 389-423.

Hansen, G., Zhao X., Drlica K., Blondeau J 2006. Mutant prevention concentration for ciprofloxacin and levofloxacin with *Pseudomonas aeruginosa*. *International journal of antimicrobial agents*. 27(2): 120-124.

Hanwell M., Curtis D., Lonie D, 2012. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminform*. 4 (1):17.

Hawkey P, 2003. Mechanisms of quinolone action and microbial response. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. (51) Suppl 1: 29-35.

Heddle J., Maxwell A, 2002. Quinolone-Binding Pocket of DNA Gyrase: Role of gyrB. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46: 1805-1815.

Henrichfreise B., Wiegand I., Pfister W., Wiedemann B, 2007. Resistance mechanisms of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Germany and correlation with hypermutation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 51(11): 4062-4070.

Henwood C., Livermore D., James D., Warner M., *Pseudomonas* Study Group, 2001. Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*: results of a UK survey and evaluation of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy disc susceptibility test. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. (47): 789–799.

Higgins P., Fluit A., Milatovic D, 2003. Mutations in GyrA, ParC, MexR and NfxB in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 21 (5): 409-413.

Hirakata Y, 2003. Invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa* and Its Role in Diversity of Pseudomonas Infectious Diseases. *Acta medica Nagasakiensia*. 47 (4): 89-96.

Høiby N., Johansen H., Moser C., Ciofu, O, 2008. Clinical relevance of *Pseudomonas aeruginosa*: a master of adaptation and survival strategies. *Pseudomonas: Model Organism, Pathogen, Cell Factory*. (ed B. H. A. Rehm), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany. 1: 25-44.

Hooft R., Sander C., Vriend G, 1997. Objectively judging the quality of a protein structure from a Ramachandran plot. *Oxford Journals Bioinformatics*. 13 (4): 425-430.

- Hooper D, 1998. Bacterial topoisomerases, anti-topoisomerases, and anti-topoisomerase resistance. *Clinical Infectious Diseases*. 27(Suppl 1): S54-63.
- Hooper D, 2001. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerging Infectious Diseases*. 7(2): 337- 341.
- Jacoby G., Chow N., Waites K, 2003. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 47(2): 559-562.
- Jain M., Ramírez D., Seshadri R., Cullina J., Powers C, Schultert G., Bar-Meir M., Sullivan C., McColley S., Hauser R, 2004. Type III secretion phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* strains change during infection of individuals with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 42 (11): 5229 - 5237.
- Kang C., Kim S., Park W., Lee K., Kim H., Kim E., Oh M., Choe K, 2005. Clinical features and outcome of patients with community-acquired *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia. *Clinical Microbiology an Infection*. 11 (5): 415–418.
- Kontoyianni M., McClellan L., Sokol, G, 2004. Evaluation of docking performance: comparative data on docking algorithms. *Journal of medicinal chemistry*. 47(3): 558-565.
- LeClerc, J., Cebula, T, Blázquez J., Oliver A., Baquero F, 2000. *Pseudomonas* survival strategies in cystic fibrosis. *Science*. 5478 (289): 391-392.
- Lee J., Lee Y., Park Y., Kim B, 2005. Alterations in the GyrA and GyrB subunits of topoisomerase II and the ParC and ParE subunits of topoisomerase IV in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 25 (4): 290–295.
- Levitt, M, 2007. Growth of novel protein structural data. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104 (9): 3183–3188.
- Li L., Malone J., Iglewski B, 2007. Regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulator VqsR. *Journal of bacteriology*. 189(12): 4367-74.
- Livermore D, 2002. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare?. *Clinical Infectious Diseases*. 34 (5): 634–640.
- Lui T., Tang G., Capriotti E, 2011. Comparative Modeling: The State of the Art and Protein Drug Target Structure Prediction. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. 14 (6): 532-547.
- Lyczak J., Cannon C., Pier G, 2000. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes and Infection*. 2 (9): 1051–1060

Lyne, P, 2002. Structure-based virtual screening: an overview. *Drug discovery today*. 7 (20): 1047-1055.

Malambo D., Gómez D., Veloza L., Arbeláez J., Gómez C, 2008. Algunos aspectos hereditarios y ambientales en casos de fibrosis quística en la ciudad de Cartagena (Colombia). *Salud Uninorte*. 24 (1): 10-22.

Martinez L., Pacual A., Jacoby A, 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *The Lancet*. 9105 (351): 797-799.

Martinez L, 2007. *Pseudomonas aeruginosa* aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos. Tesis, Universidad de Barcelona. Doctorado en medicina. Barcelona.

Matsumoto, M., Shigemura, K., Shirakawa, T., Nakano, Y., Miyake, H., Tanaka, K., Fujisawa, M, 2012. Mutations in the *gyrA* and *parC* genes and in vitro activities of fluoroquinolones in 114 clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* derived from urinary tract infections and their rapid detection by denaturing high-performance liquid chromatography. *International journal of antimicrobial agents*. 40 (5): 440-444.

Melo F., Sánchez R., Sali A, 2002. Statistical potentials for fold assessment. *Protein Science*. 11(2): 430-48.

Merino L, 2007. *Pseudomonas aeruginosa*: una bacteria con personalidades múltiples. *Revista Argentina de microbiología*. 39 (3): 143.

Montero C., Mateu G., Rodriguez R., Takiff H, 2001. Intrinsic resistance of *Mycobacterium smegmatis* to fluoroquinolones may be influenced by new pentapeptide protein MfpA. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 45 (12): 3387-3392.

Morris G., Huey R., Lindstrom W., Sanner M., Belew R., Goodsell D., Olson A, 2009. Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*. 30 (16): 2785-91.

Mouneimné H., Robert J., Jarlier V., Cambau E, 1999. Type II topoisomerase mutations in ciprofloxacin-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43 (1): 62-66.

Nadendla, R, 2004. Molecular Modeling: A Powerful Tool for Drug Design and Molecular Docking. *Resonance*. 9 (5): 51-60.

Nollmann S., Stone M., Bryant Z., Gore J., Crisona N, 2007. Multiple modes of *Escherichia coli* DNA gyrase activity revealed by force and torque. *Nature Structural & Molecular Biology*. 14 (4). 264-271

OMS, 2014. Tomado de: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/es/>.

Oprea, T., Matter H, 2004. Integrating virtual screening in lead discovery. *Current opinion in chemical biology*. 8 (4): 349-358.

Ozlem, A., Tjaart A., Fourie J, 2008. Protein homology modelling and its use in South Africa. *South African Journal of Science*. 104 (1-2): 2-6.

Paital B., Kumar S., Farmer R., Tripathy N., Chainy G, 2011. In silico prediction and characterization of 3D structure and binding properties of catalase from the commercially important crab, *Scylla serrata*. *Interdisciplinary Science*. 3(2): 110-120. (<http://services.mbi.ucla.edu/ERRAT>)

Peleg A., Hooper D, 2010. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *The New England Journal of Medicine*. 362 (19):1804-1813.

Pier G., Grout M., Zaidi T., Olsen, J., Johnson, L., Yankaskas, J., Goldberg, J, 1996. Role of Mutant CFTR in Hypersusceptibility of Cystic Fibrosis Patients to Lung Infections. *Science*. 271 (5245): 64-67.

Poole K, 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 56(1): 20-51.

Pukatzki S., Kessin R., Mekalanos J, 2002. The human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* utilizes conserved virulence pathways to infect the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99 (5): 3159-3164.

Robicsek A., Jacoby G., Hooper D, 2006. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *The Lancet infectious diseases*. 6(10): 629-640.

Rodriguez-Escobar Z., Veloza-Cabrera L., Baena.-Del Valle J., Ramos E., Gómez-Alegría C y Gómez-Camargo D, 2009. Parámetros hematológicos de pacientes con fibrosis quística de la costa caribe colombiana: análisis y asociación con aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*. *Nova* 7 (11): 92-102.

Rodríguez-Martínez J, 2005. Mecanismos de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 23 (1): 25-31.

Rost B, 1999. Twilight zone of protein sequence alignments. *Protein Engineering*. 12 (2): 85–94.

Roy A., Kucukural A., Zhang Y, 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*. 5 (4): 725–738.

Ruiz J, 2003. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 51(5): 1109-1117.

Salma, R., Dabboussi, F., Kassaa, I., Khudary, R., Hamze M, 2013. gyrA and parC mutations in quinolone-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Nini Hospital in north Lebanon. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 19 (1): 77-81.

Sanchez J, 2008. Implicaciones de diversos mecanismos de resistencia a quinolonas en bacilos Gram-negativos: Diseño de una nueva Fluoroquinolona. Tesis, Universidad de Barcelona. Departamento de Anatomía Patológica, Farmacología y Microbiología Programa 2000-2002-Microbiología Médica. Barcelona.

Santos O., Bicca R, 2003. Modelagem de Proteínas por Homologia. *Química Nova*. 26 (2): 253-259.

Schrödinger LLC, 2010. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1. New York, NY, USA.

Schrödinger LLC. Suite 2012: Maestro, version 9.3. New York, NY, USA. 2012. <http://www.schrodinger.com/Maestro/>

Schwede T., Kopp J., Guex N., Peitsch M, 2003. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research*. 31 (13): 3381–3385.

Serra H, 2008. Quinolonas. *Separata*. (16) N.3.

Shen M., Sali A, 2006. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein Science*. 15 (11): 2507–2524.

Shibuya Y., Yamamoto T., Morimoto T., Nishino N., Kambara T., Okabe H, 1991. *Pseudomonas aeruginosa* alkaline proteinase might share a biological function with plasmin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1077 (3): 316-24.

Sippl M, 1993. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Proteins*. 17(4): 355-62.

Stanley J., Gunsalus R., Lory S., Perry J, 2007. Microbial Life, Second Edition. Sunderland, MA, USA: *Sinauer Associates*. 1066.

Stortz C., Johnson G., French A., Csonka G, 2009. Comparison of different force fields for the study of disaccharides. *Carbohydrate research*. 344 (16): 2217-2228.

- Stover K., Pham X., Erwin A., Mizoguchi S., Warrenner P., Hickey M., Brinkman F., Hufnagle W., Kowalik D., Lagrou M., Garber R., Goltry L., Tolentino E., Westbrook-Wadman S., Yuan Y., Brody L., Coulter S., Folger K., Kas A., Larbig K., Lim R., Smith K., Spencer D., Wong G., Wu Z., Paulsen I., Reizer J., Saier M., Hancock R., Lory S., Olson M, 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: an opportunistic pathogen. *Nature*. 406: 959-964.
- Tran J., Jacoby G, 2002. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99(8): 5638-5642.
- Vallis A., Yahr T., Barbieri J., Frank D, 1999. Regulation of ExoS production and secretion by *Pseudomonas aeruginosa* in response to tissue culture conditions. *Infection and Immunity*. 67(2): 914-920.
- Van Bambeke F., Michot JM., Van Eldere J., Tulkens P, 2005. Quinolones in 2005: an update. *Clinical Microbiology and Infection*. 11(4): 256-280.
- Van D., Iglewski B, 1998. Cell-to-Cell Signaling and *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Emerging Infectious Disease*. 4 (4): 551-560.
- Vashist J., Kapoor R., Kapil A., Yennamalli R., Subbarao N., Rajeswari M, 2009. Interaction of nalidixic acid and ciprofloxacin with wild type and mutated quinolone-resistance-determining region of ADN gyrase A. *Indian Journal of Biochemistry y Biophysics*. 46, 147-153.
- Wang Y., Lee M., Peng C, 2014. Mutations in the quinolone resistance-determining regions associated with ciprofloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Southern Taiwan. *Biomarkers and Genomic Medicine*. 6 (2): 79-83.
- Warren G., Andrews C., Capelli A., Clarke B., LaLonde J., Lambert, M., Head M, 2006. A critical assessment of docking programs and scoring functions. *Journal of medicinal chemistry*. 49 (20): 5912-5931.
- Wiederstein M., Sippl M, 2007. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Research*. 35, 407-410.
- Winsor G., Lam D., Fleming L., Lo R., Whiteside M., Yu N., Hancock R., Brinkman F, 2011. Pseudomonas Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for Pseudomonas genomes. *Nucleic Acids Research*.
- Wydmuch Z., Skowronek O., Cholewa K., Mazurek U., Pacha J., Kepa M., Idzik D., Wojtyczka R, 2005. gyrA Mutation in ciprofloxacin-resistant Clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa* in a Silesian Hospital in Poland. *Polish journal of microbiology*. 54 (3): 201-206.

Yahr T., Parsek M, 2006. "*Pseudomonas aeruginosa*" en Martin Dworkin (Editor-in-Chief). *Prokaryotes The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria*. Third Edition. Stanford, CA, USA. *Springer Science Business Media*. 2: 704–713.

Yang J., Yan R., Roy A., Xu D., Poisson J., Zhang Y, 2015. The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods*. 12 (1): 7-8.

Yonezawa M., Takahata M., Matsubara N., Watanabe Y., Narita H, 1995. DNA gyrase *gyrA* mutations in quinolone-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 39 (9): 1970-1972.

Zhanel G., Ennis K., Vercaigne K., Walkty A., Gin AS., Embil J., Smith H., Hoban D, 2002. A Critical Review of the Fluoroquinolones Focus on Respiratory Tract Infections. *Drugs*. 62 (1): 13- 59.

Zhang J., Ma H, Sang M., Hu Y., Liang Z., Ai, H., Zhang S. 2010. Molecular structure, expression, cell and tissue distribution, immune evolution and cell proliferation of the gene encoding bovine (*Bos taurus*) TNFSF13 (APRIL). *Developmental & Comparative Immunology*. 34 (11): 1199-1208.

Zhang Y, 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*. 9 (1): 40.