



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

“MODELAMIENTO BIOINFORMÁTICO
DEL ACOPLAMIENTO ENTRE LA
ENZIMA PIRAZINAMIDASA Y
COMPLEJOS METÁLICOS DE
PIRAZINAMIDA, EN EL CONTEXTO DE
LA TUBERCULOSIS RESISTENTE A
PIRAZINAMIDA”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN INFORMÁTICA BIOMÉDICA
EN SALUD GLOBAL CON MENCIÓN EN
BIOINFORMÁTICA

JHON PETER MESCCO PUMAYALLI

LIMA – PERÚ

2022

ASESOR

Dr. Zimic Peralta, Mirko J.

JURADO DE TESIS

DR. MIGUEL ÁNGEL CAMPOS SÁNCHEZ\

PRESIDENTE

MG. ANA CECILIA COLAROSSO SALINAS VDA DE BRANIZZA

VOCAL

DR. JUAN CARLOS AGAPITO PANTA

SECRETARIO

DEDICATORIA.

A Dios, a mi querida familia, y a las personas que me acompañaron en todos los aspectos durante esta etapa de mi vida.

AGRADECIMIENTOS.

Al Fondecyt-Concytec por el financiamiento otorgado a mis estudios de Maestría
y al desarrollo del presente trabajo.

A mi asesor Dr. Mirko Zimic por su mentoría, sus observaciones,
recomendaciones, y por la oportunidad de participar dentro del Laboratorio de
Bioinformática y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias y Filosofía de la
UPCH.

Al programa de Maestría en Informática Biomédica en Salud Global de la
Facultad de Salud Pública y Administración (FASPA) por aceptarme y poder
desarrollarme en el ámbito de la informática aplicada a la solución de problemas
de salud. A Paola y Daniel por estar siempre atentos a nuestros progresos y por el
seguimiento a los proyectos.

Al Instituto Geofísico del Perú (IGP) por el acceso a sus recursos del HPC-Linux-
Clúster para los cálculos de docking y dinámica molecular. Al Dr. Juan Dávalos
por el acceso al cluster HYDRA del Instituto de Química y Física Rocasolano-
CSIC de España para los cálculos de química computacional. A mis compañeros
de maestría por su amistad y comprensión.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO.

Financiamiento de beca en el programa de Maestría en Informática Biomédica en Salud Global otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC), a través del Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT).

“MODELAMIENTO BIOINFORMÁTICO DEL ACOPLAMIENTO ENTRE LA ENZIMA PIRAZINAMIDASA Y COMPLEJOS METÁLICOS DE PIRAZINAMIDA, EN EL CONTEXTO DE LA TUBERCULOSIS RESISTENTE A PIRAZINAMIDA”

INFORME DE ORIGINALIDAD

5%	5%	1%	2%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.upch.edu.pe Fuente de Internet	1%
2	Submitted to Universidad Peruana Cayetano Heredia Trabajo del estudiante	1%
3	www.scielo.org.mx Fuente de Internet	<1%
4	repositorio.lamolina.edu.pe Fuente de Internet	<1%
5	repositorio.unsa.edu.pe Fuente de Internet	<1%
6	repositorio.urp.edu.pe Fuente de Internet	<1%
7	hdl.handle.net Fuente de Internet	<1%

repositorio.udec.cl

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN
ABSTRACT

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	Planteamiento del problema	1
1.1.1.	Tuberculosis.....	1
1.1.2.	Pirazinamida	3
1.1.3.	Enzima pirazinamidasa	5
1.1.4.	Resistencia a PZA.....	8
1.1.5.	Complejos metálicos como fármacos	10
1.1.6.	Aportes del trabajo.....	12
1.1.7.	Cargas parciales RESP	13
1.1.8.	Docking molecular.....	14
1.1.9.	Dinámica molecular.....	17
1.2.	Objetivos.....	19
1.2.1.	Objetivos generales.....	19
1.2.2.	Objetivos específicos	19
1.3.	Hipótesis de investigación	20
1.4.	Justificación de la investigación	20
2.	MARCO TEÓRICO	22
2.1.	Antecedentes.....	22
3.	METODOLOGÍA.....	25
3.1.	Diseño del estudio.....	25
3.2.	Población y muestra.....	25
3.3.	Criterios de selección.....	25
3.4.	Operacionalización de las variables.....	26
3.5.	Instrumentos	27
3.5.1.	Programas y bases de datos	27
3.5.2.	Recursos computacionales.....	29
3.6.	Procedimiento	29
3.6.1.	Flujogramas de proceso	29
3.6.2.	Construcción y modelado	32

3.6.2.1.	PZA y complejos metálicos	34
3.6.2.2.	Preparación de las apo-PZasas mutantes	36
3.6.2.3.	Preparación de las metaloenzimas Fe-PZasa y Zn-PZasa	36
3.6.3.	Obtención de cargas parciales	37
3.6.3.1.	En la PZA y complejos metálicos.....	37
3.6.3.2.	En las PZasas mutantes y apo-PZasa (H37Rv).....	38
3.6.3.3.	En las metaloenzimas Fe-PZasa y Zn-PZasa.....	39
3.6.4.	Docking molecular.....	39
3.6.5.	Dinámica molecular.....	40
3.6.5.1.	Parametrización de la PZA y moléculas ligando	40
3.6.5.2.	Parametrización de la Fe-PZasa.....	41
3.6.5.3.	Construcción de los sistemas: apoenzimas en agua.....	42
3.6.5.4.	Construcción de los sistemas: PZA acoplado a apoenzimas en agua .	42
3.6.5.5.	Construcción de los sistemas: complejo acoplado a apoenzima en agua	43
3.6.5.6.	Construcción de los sistemas: Fe-PZasa y moléculas acopladas a ella en agua	43
3.6.6.	Termoquímica de los complejos	44
3.6.7.	Consideraciones éticas.....	45
4.	RESULTADOS	46
4.1.	Optimización geométrica de los compuestos	46
4.2.	Modelamiento de receptores.....	48
4.3.	Docking molecular.....	49
4.3.1.	Obtención de las cargas RESP.....	49
4.3.2.	Energía de acoplamiento.....	51
4.3.3.	Poses de la PZA frente a las enzimas	54
4.3.4.	Poses de los complejos E1WT, E2WT y FEWT frente a las enzimas receptoras	57
4.3.5.	Poses de los complejos E1PL y E2PL frente a las enzimas receptoras	62
4.3.6.	Poses de los complejos frente a la Fe-PZasa	65
4.4.	Dinámica molecular.....	67
4.4.1.	Dinámica de apoenzimas en agua.....	67
4.4.2.	Dinámica de la PZA y complejos sobre las enzimas.....	69
4.5.	Termoquímica de los complejos.....	74

5.	DISCUSIONES	76
5.1.	PZA, complejos metálicos con PZA, y enzimas.....	76
5.2.	PZA y su comportamiento con las enzimas.....	77
5.3.	E1WT y E2WT, comportamiento con las enzimas	79
5.4.	E1PL y E2PL, comportamiento con las enzimas.....	80
6.	CONCLUSIONES	84
7.	RECOMENDACIONES	86
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

RESUMEN

La tuberculosis fármaco-resistente es un problema en el Perú, al ser uno de los países con mayor carga de la enfermedad según la OMS. Cerca del 50\% de cepas multidrogo-resistentes son resistentes a pirazinamida (PZA), fármaco de primera línea cuya importancia radica en su acción frente a bacilos latentes y en la reducción de los tiempos de tratamiento. La PZA es una prodroga que se convierte a su forma activa de ácido pirazinoico por acción de la enzima bacteriana pirazinamidasa (PZasa).

Para evaluar posibles candidatos a drogas frente a la TB, se determinaron y evaluaron con docking molecular los acoplamientos de complejos metálicos de PZA frente a la PZasa de cepa susceptible y de resistente a PZA (D49N, H51R, H57R, H71Y y V139A). Además de observaron la estabilidad estructural mediante dinámica molecular. Nuestros resultados muestran que complejos monodentados son los que mejor se acoplan a las apo-enzimas. Además, se muestra gran estabilidad durante los tiempos de corrida en dinámica molecular, excepto en la D49N. Estos resultados podrían aportar en el desarrollo de metalofármacos mediante técnicas bioinformáticas.

PALABRAS CLAVES

Pirazinamida, pirazinamidasa, complejo de zinc y hierro, docking molecular, dinámica molecular, parametrización.

ABSTRACT

Drug-resistant tuberculosis (MDR-TB) is a problem in Peru, because it is one of the countries with the highest burden of the disease according to the WHO. About 50% of multidrug-resistant strains are resistant to pyrazinamide (PZA), a first-line drug whose importance lies in its activity against latent bacilli and in the reduction of treatment times. PZA is a prodrug that is converted to its active form of pyrazinoic acid by the bacterial enzyme pyrazinamidase (PZase).

In order to evaluate possible drug candidates against TB, the couplings of PZA metal complexes against the PZase of PZA-susceptible and resistant strains (D49N, H51R, H57R, H71Y and V139A) will be determined and evaluated with molecular docking. In addition to observing the structural stability through molecular dynamics. Our results show that monodentate complexes are the ones that best couple to apo-enzymes. In addition, great stability is shown during molecular dynamics run times, except in D49N. These results could contribute to the development of metallopharmaceuticals using bioinformatic techniques.

KEY WORDS

Pyrazinamide, pyrazinamidase, zinc and iron metal complexes, molecular docking, molecular dynamics, parametrization.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Planteamiento del problema

1.1.1. Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa provocada principalmente por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* y afecta principalmente a los pulmones produciendo tos continua y fiebre. Además, está asociado a determinantes sociales como la pobreza, desnutrición y hacinamiento (1, 2). El Reporte global de TB 2021 (3), la OMS informa cerca de 9.9 millones de nuevos casos y 1.3 millones de muertes por TB; además, indica que hay un retroceso de años de progreso en la prestación de servicios esenciales de TB y en la reducción de la enfermedad debido a la pandemia del coronavirus (COVID-19). Desde 1993, se considera como una emergencia global y hasta la pandemia del COVID-19, la TB era la principal causa de muerte por un solo agente infeccioso, por encima del VIH/SIDA (3).

Esta enfermedad es conocida desde tiempos antiguos, pero no representaba un problema sino hasta el surgimiento de la Revolución industrial en el siglo XVIII, en donde condiciones de hacinamiento favorecieron su propagación y no existía un tratamiento efectivo. Sin embargo, debido al desarrollo y la síntesis de fármacos antituberculosos a mediados del siglo XX, contamos actualmente con cuatro drogas principales que permite la recuperación del paciente: rifampicina, isoniacida, etambutol y pirazinamida (4). Estos son los denominados drogas de primera línea

usadas en el tratamiento estándar de la TB y que en conjunto permite la recuperación del paciente. Una de las importantes drogas es la pirazinamida (PZA), que es la única que actúa frente a bacilos en estado de latencia y permite reducir el tratamiento a 6 meses (5,6).

A pesar de contar con drogas antituberculosas, la TB continúa siendo un gran problema de salud mundial, sobre todo por la aparición de bacterias resistentes a fármacos como en la TB multidrogo-resistente (TB-MDR) y extremadamente-resistente (TB-XDR). En estos casos se emplean otras drogas llamadas de segunda línea las cuales reportan mayores reacciones adversas que las de primera línea, por lo que son de uso reservado (3,7,8).

En el Perú, la TB es una de las 10 primeras causas de muerte (2,9) y afecta de manera predominante a las poblaciones de estratos sociales bajos (2,10). Se reportan cerca 39000 nuevos casos al año y cerca de 2400 muertes anuales (10,11). La mayoría de estos casos se encuentra en las regiones de Iquitos, Madre de Dios, Ucayali, Ica y Lima (2,12).

Gracias al tratamiento con fármacos y a otros factores, la incidencia y mortalidad están disminuyendo en el Perú y el mundo; sin embargo, la TB-MDR y TB-XDR representan una emergencia debido al incremento de los casos y al desafío que representa su tratamiento (2,3). La OMS informa que el Perú es uno de los 20 países

con la incidencia más alta de tuberculosis resistente y se reportan cerca de 2500 casos anuales (2,10,11); además, que el 50 % de los casos TB-MDR son resistentes a PZA (13). Esta situación podría llevar a la pérdida del control de la enfermedad en el futuro, lo que motiva a la búsqueda de soluciones para combatir la fármaco-resistencia (14).

1.1.2. Pirazinamida

La PZA es un heterociclo aromático de fórmula $C_5H_5N_3O$ y está constituido por un anillo pirazina con un grupo amida en la posición 2 del anillo (Figura 1.1.2.1). Es un sólido blanco pulverulento y de sabor amargo usado en el tratamiento de la TB en conjunto con el resto de las drogas de primera línea (6,15).

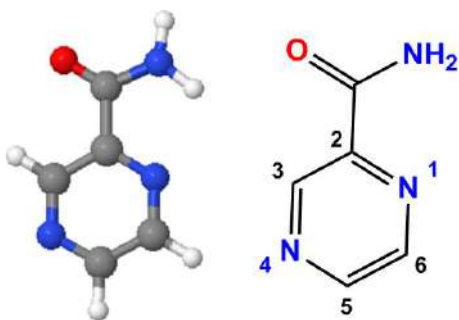


Figura 1.1.2.1 Estructura de la pirazinamida y numeración de sus átomos.

La manera en cómo actúa frente al bacilo es un tema de actual investigación, pero se conocen puntos claves de su acción (4,16,17). Cuando un paciente de TB ingiere una dosis de PZA, el fármaco es absorbido y una parte de ella llega hacia la zona de infección en los pulmones (donde se encuentran los bacilos).

Esta zona se caracteriza por su acidez ($pH \approx 5.0$) debido a la inflamación. La PZA ingresa al interior de la bacteria *M. tuberculosis* ($pH \approx 7.2$) y se convierte a ácido pirazinoico desprotonado $C_5H_3N_2O_2^-$ (POA^-) por la acción de la enzima bacteriana

pirazinamidasas (PZasa) (Figura 1.2). Es el POA^- quien porta la actividad antituberculosa, por lo que la PZA es en realidad una prodroga.

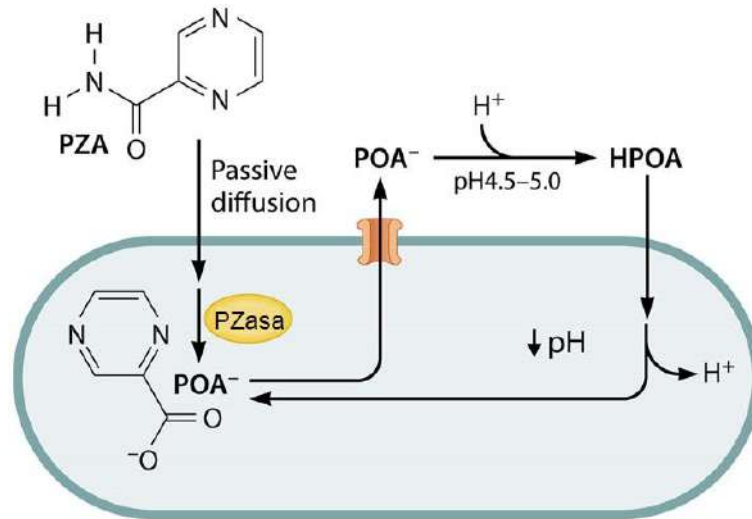


Figura 1.1.2.2 La PZA entra en la célula por difusión y se hidroliza a ácido pirazinoico (POA^-) por la enzima pirazinamidasas (PZasa) en el interior de la micobacteria. Modo de acción del (POA^-) como protonóforo que conduce a la acidificación del citoplasma bacteriano (4).

Se propone que el POA^- actúa como un agente acidificador. El POA^- sale de la micobacteria y se protona (HPOA) debido a la acidez del entorno ($\text{pH} \approx 5.0$); luego retorna al interior de la bacteria, libera el protón y comienza nuevamente el ciclo. Esto disminuye el pH intrabacteriano, desestabiliza las rutas metabólicas de la bacteria y produce su muerte (4). Existen otros modelos que explican el modo de acción del POA^- como inhibidor de ciertas macromoléculas de la bacteria (Figuras 1.3), posiblemente tenga múltiples objetivos; aun así, la hidrólisis de la PZA es uno de los puntos críticos para la expresión de la actividad antituberculosa y su alteración impactaría en la efectividad del fármaco.

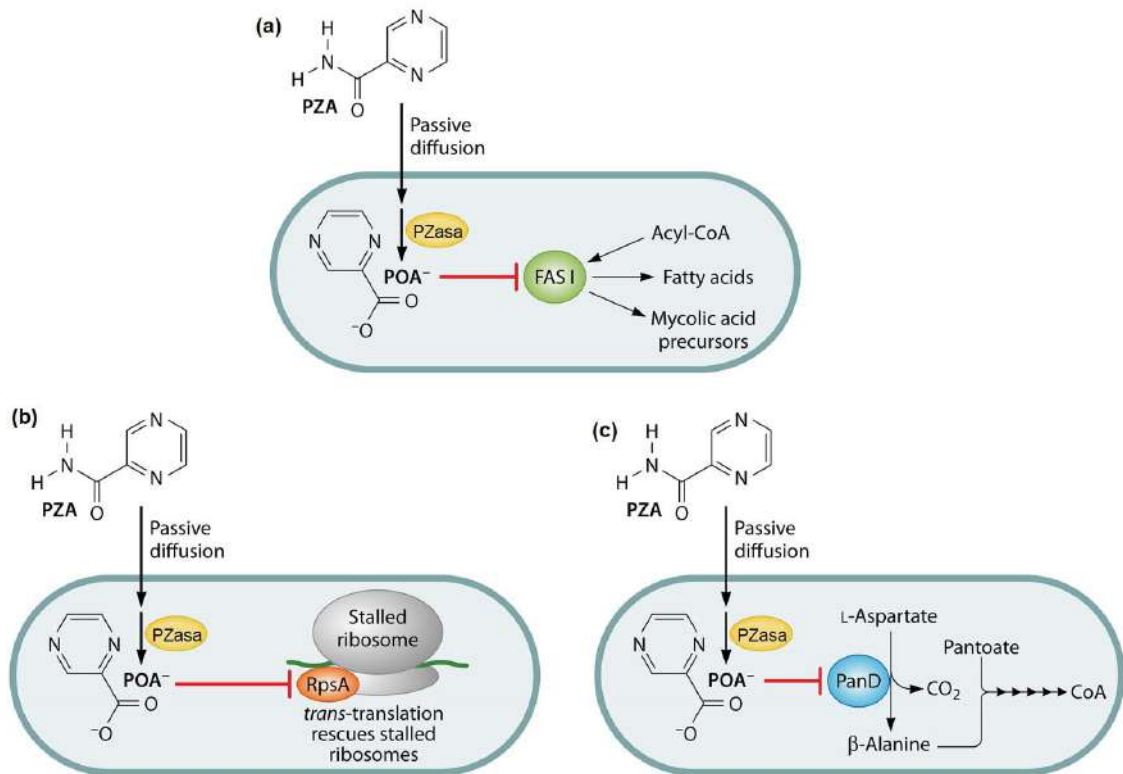


Figura 1.1.2.3 Otros modos de acción antituberculosa propuestos para el ácido pirazinoico. (a) El POA^- como inhibidor de la sintasa de ácidos grasos I. (b) Como un inhibidor de la trans-traducción. (c) Como un inhibidor de la biosíntesis de la coenzima A (4).

1.1.3. Enzima pirazinamidasa

Es la enzima que se encarga de la hidrólisis de la PZA y nicotinamida en el *M. tuberculosis*. Se conocía que sería una metaloenzima por tener una secuencia muy similar a nicotinamidasa con centro metálico (18), lo cual fue confirmado por Pretella y col. (19) al obtener la estructura cristalina para la cepa susceptible H37Rv (Figura 1.4 a). Es un monómero con una secuencia de 186 aminoácidos, 8 hélices

α , 6 hojas β , loops, y presenta un peso molecular de 19.68 kDa aprox. En esta enzima se distinguen dos zonas importantes (Figura 1.4 b):

- El sitio de coordinación metálico (metal binding site, MBS), que está conformado por los residuos histidina H51, H57, H71, aspartato D49 y 2 moléculas de agua; las cuales coordinan a un centro metálico (Fe^{2+} , Zn^{2+} u otros). En la estructura publicada encuentran al Fe^{2+} como metal presente en la PZasa en una geometría octaédrica distorsionada; aunque existe evidencia de que el Zn^{2+} sería el metal presente *in vivo* (19-21).
- El sitio catalítico (catalytic site, CS), que está conformado por los aminoácidos aspartato D8, cisteína C138 y lisina L96, ubicados en un hoyo en donde reciben al sustrato PZA, y donde se lleva a cabo la reacción de hidrólisis mediante ataque nucleofílico de la cisteína 138 al grupo amida de la PZA (19).

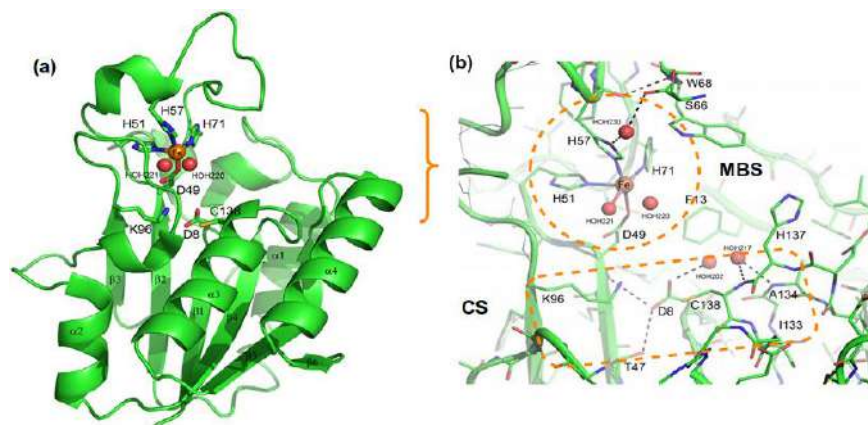


Figura 1.1.3.1 Estructura de la pirazinamidasa (PZasa) del *Mycobacterium tuberculosis*, *pdb:3PL1* (19). (a) Estructura en forma de cintas con el centro metálico. (b) Sitio de coordinación metálico (MBS) y sitio catalítico (CS)

En la conversión de PZA a POA⁻, Du y col. (18) proponen que la PZA se acopla en el CS con el grupo amida orientado hacia la C138. Posteriormente el carbonilo de la PZA es atacado por el S de la cisteína y luego por una de las aguas de coordinación, para luego convertir la amida a grupo carboxilato (Figura 1.5); pero señalan también que la distancia entre un agua de coordinación y el sitio catalítico es larga (6.0 Å aprox.), lo que dificultaría el acercamiento de un agua de coordinación (19). Se reportan estructuras de nicotinamidasa en donde el sustrato (análogos a PZA) coordinan al centro metálico en el MBS (22-25); además, la coordinación del sustrato al centro metálico es propuesto en recientes mecanismos de reacción (22,26) (Figura 1.6). Por lo que la coordinación sería una primera etapa de acople entre el sustrato y la enzima (26).

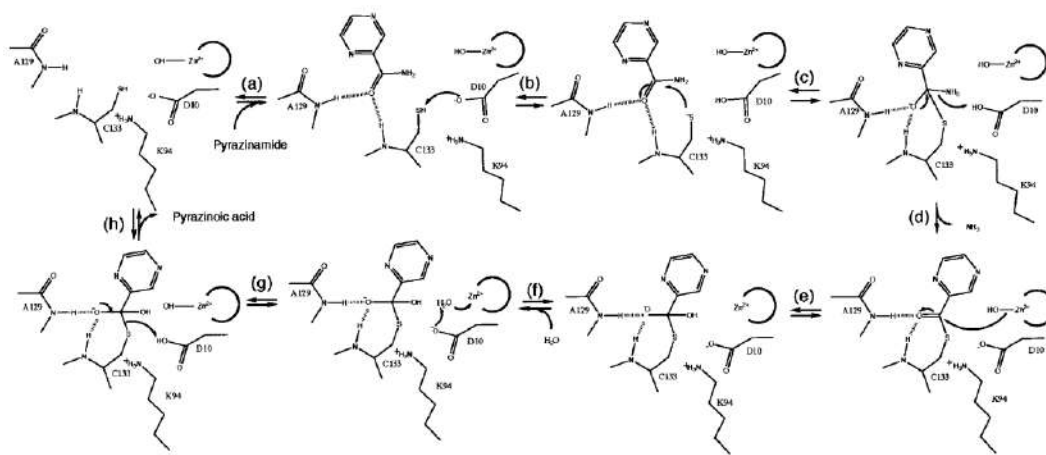


Figura 1.1.3.2 Mecanismo de hidrólisis de la pirazinamidasasa del *P. horikoshii* propuesta por Du. (18).

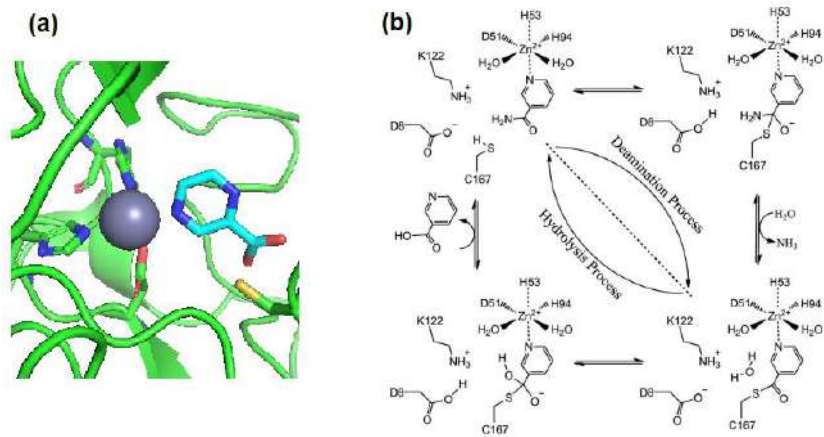


Figura 1.1.3.3 Coordinación del sustrato al MBS. (a) Estructura de pirazinoato (POA^-) que coordina a un centro de zinc de la pirazinamidasa de la *Acinetobacter baumannii*, *pdb: 2wta*. (b) Mecanismo propuesto de hidrólisis de la nicotinamida por la nicotinamidasa del *Saccharomyces cerevisiae*, *pdb: 3v8e* (26).

1.1.4. Resistencia a PZA

Debido al uso indebido de los fármacos de primera línea (presión selectiva) y a mutaciones genéticas de la bacteria, surgen cepas que resisten a la acción de la PZA. Se encuentra que dicha resistencia está relacionada con mutaciones en el gen *PncA* que codifica a la PZasa. Esto produce enzimas con actividad disminuida o anulada para convertir PZA a POA^- . Sin embargo, entre un 5% a 30% de las cepas resistentes a PZA presentan PZasas activas o no presentan mutaciones, lo que indica que existen otros mecanismos de resistencia (4,7).

Entre las cepas resistentes a PZA con mutaciones en el gen *PncA*, resaltan aquellas que afectan a los residuos del MBS y CS (13,21). Se conoce que la apo-PZasa

(enzima sin metal) prácticamente carece de actividad catalítica, pero puede aceptar varios metales de transición como Fe, Zn, Mn y Co, y su actividad puede ser reactivada dependiendo del tipo de metal y su concentración (20,21). Además, *In vitro* se encuentra que PZasas mutantes en el MBS no retienen adecuadamente al metal (7,13,21) e *In silico* se observa que mutaciones cercanas al MBS y CS desestabilizan el entorno coordinación metálico (27-29). Esto muestra que el metal juega un rol importante para la expresión de actividad hidrolítica.

En el Perú, se encuentran cepas resistentes a PZA que en su mayoría poseen PZasas mutantes en el MBS (13,30) como la D49N, H51R, H57R y H71Y. Estas mutaciones reemplazan un aminoácido coordinante (aspartato o histidina) por residuos no coordinantes, lo que altera a la esfera de coordinación (27) y dificulta la captación correcta del cofactor metálico (20,21).

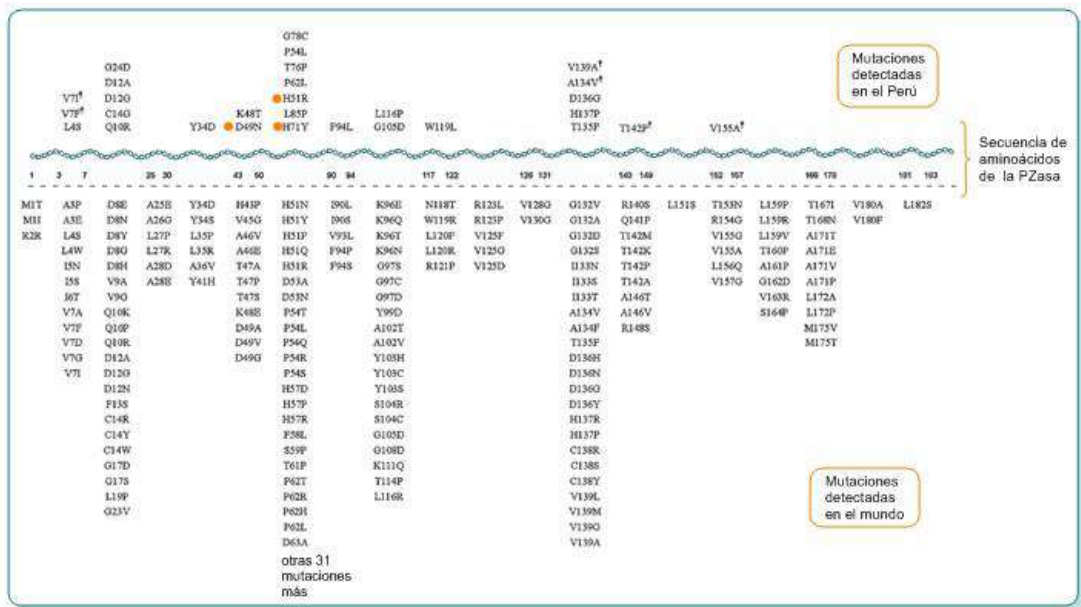


Figura 1.1.4.1 Algunas mutaciones de sustitución de aminoácido a lo largo la secuencia de PZasa. Las resaltadas en naranja son mutaciones encontradas en Perú donde se sustituye un residuo de coordinación (13).

1.1.5. Complejos metálicos como fármacos

En los esfuerzos por la búsqueda de nuevos fármacos contra la TB resistente se han desarrollado estructuras orgánicas como la bedaquilina, pretonamida y delamanida; que se encuentran en etapas finales de los ensayos clínicos (31). Pero también están en desarrollo estructuras con metal (complejos metálicos) que presentan actividad antituberculosa como complejos de rutenio, de oro (auranofina), entre otras (32).

En el ámbito de la resistencia a PZA, planteamos el desarrollo de complejos metálicos de PZA con hierro y zinc. Estos complejos podrían transportar el cofactor metálico junto con el sustrato hacia el MBS y CS de las cepas resistentes a PZA,

pudiendo tentativamente recuperar la actividad. Sin embargo, no se conoce cómo podrían interactuar con las PZasas mutantes. Shirvan y col (33,34). prepararon complejos de zinc y cobalto con pirazinamida en sólido. En ellas se observa que la PZA coordina de tres maneras: monodentado, quelato y mixto (Figura 1.8).

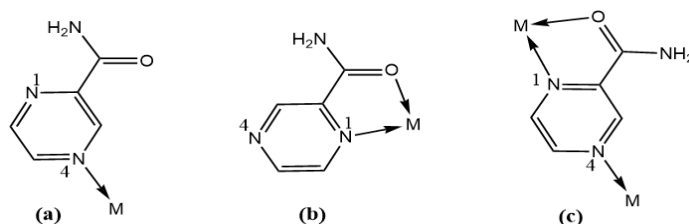


Figura 1.1.5.1 Modos de coordinación de la PZA. (a) Monodentado. (b) Quelato. (c) Mixto

Tomando en cuenta lo anterior, podemos proponer las estructuras de los complejos a trabajar, tomando en cuenta que dichos complejos se encontrarán en medio acuoso y con geometría octaédrica distorsionada $[M(PZA)(H_2O)_5]^{2+}$ y $[M(PZA)(H_2O)_4]^{2+}$. También consideraremos a los acuocomplejos de cada metal $[M(H_2O)_6]^{2+}$, y a los complejos sin moléculas de agua $[M(PZA)]^{2+}$ monodentado y quelato.

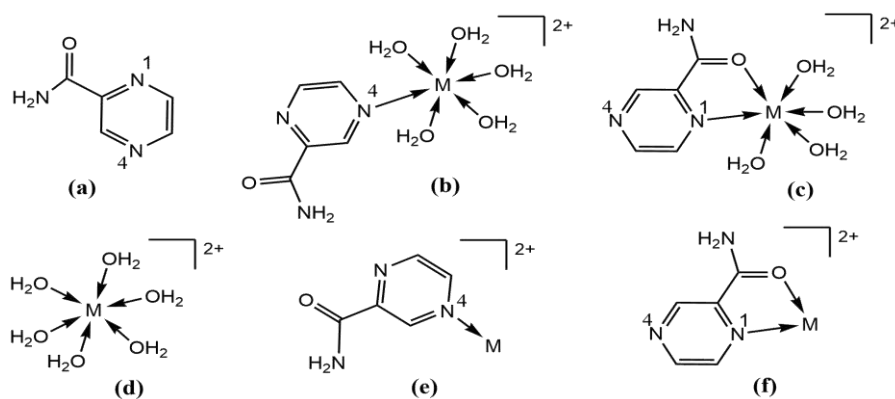


Figura 1.1.5.2 Estructuras de estudio. (a) PZA. (b) $[M(PZA)(H_2O)_5]^{2+}$. (c) $[M(PZA)(H_2O)_4]^{2+}$. (d) $[M(H_2O)_6]^{2+}$. (e) $[M(PZA)]^{2+}$ monodentado. (f) $[M(PZA)]^{2+}$ quelato. M=Fe, Zn.

1.1.6. Aportes del trabajo

En el presente trabajo, se pretende evaluar la interacción entre los complejos metálicos de PZA y las PZasas tanto de cepa susceptible H37Rv (apo-PZasa) como de resistentes a PZA (D49N, H51R, H57R, H71Y, y V139A); esto mediante docking molecular y dinámica molecular. También evaluaremos las metaloenzimas Fe-PZasa y Zn-PZasa construidas en base a la H37Rv.

Son pocos los estudios *In silico* de complejos metálicos frente a biomoléculas y no se han registrado estudios de complejos de PZA frente a macromoléculas de micobacterias resistentes. Esto debido a las limitaciones de los softwares para trabajar con metales (36–38). En nuestro trabajo obtendremos ejecutaremos un protocolo adaptado para obtener parámetros para el Fe y Zn tanto para los complejos metálicos como para las metaloenzimas y trabajar con las herramientas *In silico* de libre acceso.

Observaremos si se obtienen poses que favorezcan la hidrólisis de la PZA o a un mayor tiempo de residencia del complejo en el CS o MBS. Se compararán las diferencias entre las poses de la PZA cuando está acoplada a las apo-enzimas y cuando está acoplada a las PZasas metaladas. Además, se realizaremos cálculos en

química computacional para estudiar la estabilidad del enlace metálico en los complejos de trabajo.

Esto nos permitirá conocer acerca de la importancia del centro metálico en la PZasa y su relación con la actividad de hidrólisis. Además, nos brindará un procedimiento *In silico* para trabajar con metales, e información para el futuro desarrollo de nuevos fármacos contra la tuberculosis resistente.

1.1.7. Cargas parciales RESP

Las cargas parciales son cargas puntuales hipotéticas que posee cada átomo en una molécula, debido a la diferencia de electronegatividades de cada átomo. Nos indica de manera relativa la distribución de densidad electrónica en la molécula e identifica las zonas negativas y positivas. Estas cargas no son estáticas y están en continua variación dependiendo de su entorno. Pero puede ser estimadas mediante cálculos con softwares de QC como Gaussian 16 (39), Gamess, Orca, etc., bajo diferentes métodos y teorías implicadas.

Cargas RESP (Restrained electrostatic potential atomic partial charges) son aquellas obtenidas por AMBER luego de calcularse las cargas por QC (40,41). Esto durante la optimización de una estructura en fase gas bajo el funcional HF (B3LYP si hay metales) con basis set 6-31G(d) y con un análisis de poblaciones basados en el ajuste del potencial electrostático (ESP) (42,43).

1.1.8. Docking molecular

Es una técnica bioinformática que permite analizar el acoplamiento entre moléculas, especialmente, entre una proteína y un fármaco o ligando. Para ello, se utilizan algoritmos que buscan la mejor posición del ligando en una determinada superficie de la proteína, a través del cálculo de la energía libre de unión (función de puntuación). Dicha energía se calcula mediante la suma de diversas contribuciones energéticas las cuales dependen de los átomos que interactúan (Tabla 1.1). Por ejemplo, una función muy usada es la Función puntuación de campo de fuerza o force field $\Delta G_{\text{acoplamiento}}$ (44-46) que considera las interacciones electrostáticas, de Van Der Waals, puentes de hidrógeno y de desolvatación.

Tabla 1.1.8.1 Interacciones moleculares entre el ligando y a superficie de una proteína

$$\Delta G_{\text{binding}} = \Delta H - T\Delta S$$

Tipo de interacción	Geometría óptima	Ejemplo
Electrostática o iónica	distancia: 2.8 Å	$=\text{NH}_2^+ \cdots \text{OOC}^-$
Puente de hidrógeno	distancia: 2.7-3.1 Å ángulo: 120-180°	$\text{R}=\text{O} \cdots \text{H}-\text{C}^{\text{R}}$
Van der Waals	distancia: 3-4 Å	$\text{CH}_3 \cdots \text{H}_3\text{C}^-$
Cambios entrópicos	-	Interacción hidrofóbica Energía conformacional

$$\Delta G_{\text{acoplamiento}} = \Delta E_{\text{Van Der Waals}} + \Delta E_{\text{electrostático}} + \Delta E_{\text{puentes de H}} + \Delta G_{\text{desolvatación}}$$

De esta forma se eligen las posiciones de ligando con menor $\Delta G_{\text{acoplamiento}}$ las cuales serían las de mejor unión posible.

La molécula fármaco puede ser preparada por síntesis química o construida *In silico*. La proteína puede obtenerse a través de la estructura cristalina guardada en repositorios, o modelada (Figura 1.10). Con estas dos informaciones se puede ejecutar el docking molecular, conocer el acoplamiento y evaluar potenciales drogas (47–50) como se muestra en la Figura 1.10.

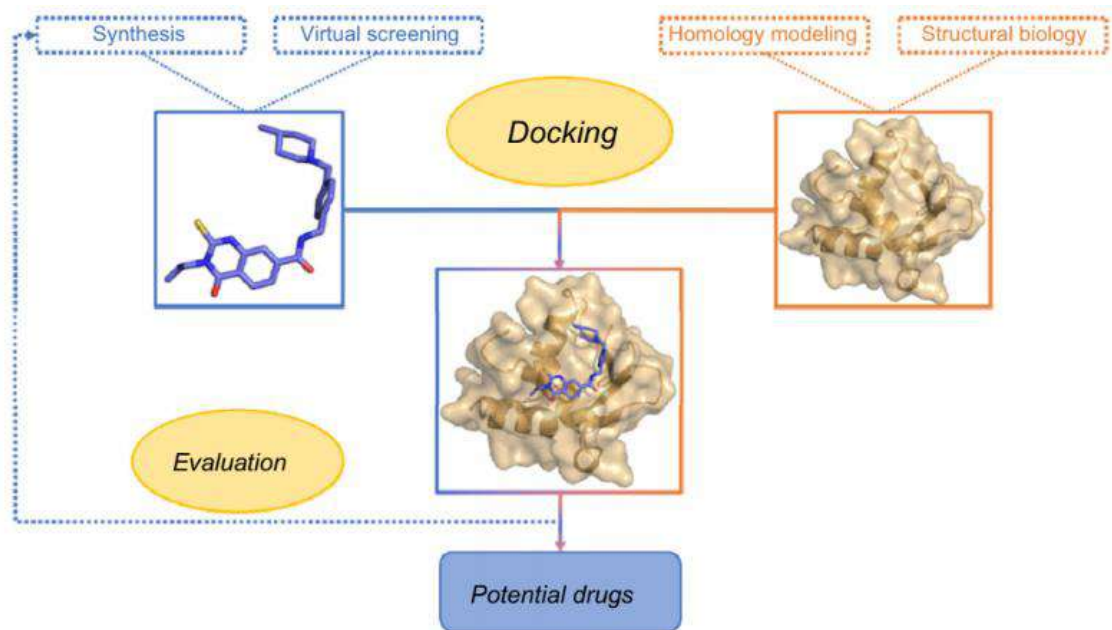


Figura 1.1.8.1 Diagrama sobre el diseño de drogas en base a la estructura, usando docking molecular (47).

Autodock4 (57), es un software usado para la ejecución de docking molecular. Utiliza una función de puntuación basado en una curva de regresión multivariable:

$$\Delta G_{\text{bind}} = W_{\text{vdw}} \times \sum_{i,j} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + W_{\text{H-bond}} \times \sum_{i,j} E(t) \left(\frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right) + W_{\text{estat}} \times \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{\varepsilon(r_{ij} r_{ij})} + W_{\text{desol}} \times \sum_{i,j} (S_i V_j + S_j V_i) \exp(-r_{ij}^2 / 2\sigma^2) + W_{\text{tor}} \times N_{\text{tors}}$$

Donde W son los coeficientes de la curva de regresión correspondiente a cada tipo de interacción y son obtenidas mediante análisis de regresión con datos experimentales. S y V son términos de desolvatación que dependen del tipo de átomo. S es el parámetro de solvatación atómico y se calcula mediante otra curva de regresión:

$$S_i = (\text{ASP}_k + \text{QASP} \times |q_i|), k = \text{C, N, O, S, H}$$

Donde q es la carga parcial del átomo. ASP y QASP son los coeficientes de regresión (51).

Autodock4 trabaja normalmente con cargas parciales tipo Gasteiger y Merz-Kollman (MK), y cuenta con una base de datos con dichas cargas y otros parámetros para los tipos de átomos comunes (C, H, O, N, S, P). Las cargas Gasteiger se basa en cálculos empíricos tomando en cuenta el tipo de átomo y su electronegatividad, mientras que MK se basa en resultados mecánico-cuánticos (51).

Se reportan nuevos coeficientes W de la función de puntuación (Tabla 1.1) para trabajar con cargas parciales tipo RESP en los ligandos (43). Además, brindarían mejores resultados en comparación a las cargas de la base de datos de Autodock4 (43).

Tabla 1.1.8.2 Coeficientes de regresión de la función de scoring de Autodock4

	Parámetros					
	W_{vdW}	W_{H-bond}	W_{estat}	W_{desolv}	W_{tors}	QASP
Autodock4	0.1662	0.1209	0.1406	0.1322	0.2983	0.010000
Autodock4 (cargas RESP)	0.1698	0.1521	0.0661	0.0954	0.3618	0.006393

1.1.9. Dinámica molecular

Es un tipo de simulación molecular computacional que permite analizar la evolución, movimiento y comportamiento de un sistema de átomos (proteínas, lípidos, carbohidratos, etc.) a través del tiempo. Para ello utiliza las constantes de fuerzas entre los átomos que lo conforman (forcefield) y las ecuaciones del movimiento de Newton.

AMBER (52) utiliza un campo de fuerza ff14SB (entre otros) que contiene los tipos de átomos de C, O, H, N, S y P presentes en una proteína; además de las constantes de fuerza que hay entre cada conjunto de átomos enlazados (de enlace, angulares, diédricas e impropias) y de parámetros de Leonard-Jones.:

$$U(\vec{r}) = \sum_l K_l (l - l_0)^2 + \sum_\theta K_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_\rho K_\rho [1 + \cos(n\rho - \gamma)] + \sum_{j>i} \sum_i \left\{ \epsilon_{ij} \left[\left(\frac{R_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{R_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 + \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}} \right] \right\}$$

Donde K son las constantes de fuerza y l_0 , θ_0 , γ son las posiciones de equilibrio. R_{ij} son los parámetros de Van der Waals, y q_i son las cargas parciales. AMBER cuenta con el forcefield Gaff y Gaff2 para la parametrización de ligandos orgánicos y varios comandos en AmberTools20 para el trabajo con compuestos metálicos. Además, cuenta con comandos de conversión de topologías para ser usadas en otros softwares de dinámica como Gromacs 2020-4 (53).

Mediante dinámica molecular, se pueden calcular diferentes propiedades fisicoquímicas del sistema como la energía libre, y en sistemas biológicos permite medir la fuerza de interacción entre posibles fármacos y sus objetivos biomoleculares o receptores. Se puede describir el comportamiento de una proteína y moléculas complejas bajo ciertas condiciones.

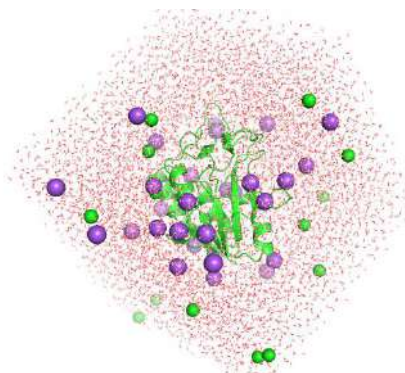


Figura 1.1.9.1 Ilustración de un sistema para dinámica molecular: Proteína en una caja periódica con solvente explícito con iones Na^+ y Cl^-

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivos generales

- Realizar el acoplamiento entre los complejos metálicos de PZA y las enzimas pirazinamidasas mutantes junto con la cepa susceptible H37rv.
- Evaluar las interacciones a través del tiempo entre los complejos metálicos y las pirazinamidasas.

1.2.2. Objetivos específicos

- Modelar y optimizar las estructuras de las 11 moléculas ligando: PZA y complejos metálicos de PZA con hierro y con zinc: $[M(PZA)(H_2O)_5]^{2+}$, $[M(PZA)(H_2O)_4]^{2+}$, $[M(H_2O)_6]^{2+}$, y $[M(PZA)]^{2+}$ monodentado y quelato (M=Fe, Zn.). Obtener cargas parciales tipo RESP.
- Modelar y optimizar las estructuras de los centros metálicos de las PZasas metaladas con Fe^{2+} (Fe-PZasa) y Zn^{2+} (Zn-PZasa) de la cepa susceptible H37rv. Obtener cargas parciales tipo RESP.
- Modelar por homología las secuencias de las apoenzimas mutantes D49N, H51R, H57R, H71Y y V139A, usando a la PZasa de la cepa susceptible H37rv (pdb: 3PL1) como estructura principal. Obtener las cargas parciales del campo de fuerza ff14SB de AMBER (tipo RESP).
- Determinar las poses de acoplamiento y energía de unión entre los complejos metálicos y los receptores D49N, H51R, H57R, H71Y, V139A, apo-PZasa (H37rv), Zn-PZasa y Fe-PZasa.

- Determinar los parámetros para dinámica molecular de los complejos metálicos y el MBS de la Fe-PZasa.
- Realizar la dinámica molecular en base a los acoplamientos encontrados en el docking para la PZA y los compuestos de hierro.

1.3. Hipótesis de investigación

- Los complejos metálicos se acoplarán con una energía de unión menor que la PZA en las PZasas mutantes, además, el metal de los complejos se orientará hacia el MBS de las apoenzimas.
- La PZA interactúa más con el MBS de las PZasas metaladas que con las apo-PZasas.
- Los complejos presentarán un tiempo de retención mayor cuando están acopladas a las apoenzimas mutantes en comparación con la PZA.

1.4. Justificación de la investigación

Nuestro trabajo podrá mostrar los acoplamientos e interacciones entre las PZasas mutantes y las moléculas de trabajo (PZA y complejos metálicos), los cuales nos informará acerca del potencial uso de complejos metálicos para reactivar PZasas mutantes de cepas resistentes a PZA. Nos permitirá apreciar la posible importancia de los metales Fe y Zn para la hidrólisis. Además, constituye un aporte en el desarrollo de nuevos fármacos frente a la tuberculosis resistente a fármacos. Los softwares para docking normalmente trabajan con ligandos orgánicos y no poseen parámetros para tomar en cuenta a centros metálicos. Glide y Gold pueden

trabajar con metales, pero no son de acceso libre. Nosotros realizaremos la parametrización (obtención de las cargas parciales RESP y constantes de fuerza) de estas estructuras y realizaremos docking y dinámica con softwares de libre acceso como Autodock4 y Gromacs 2020.4, usando protocolos publicados. La literatura científica reporta varios complejos con PZA y otros complejos con actividad antituberculosa. Sin embargo, estos estudios emplean metales pesados (Co, Cu, Mn, Cd, Ni y otros) que poseen toxicidad. Nuestro trabajo estudia productos de PZA con metales menos tóxicos como el Zn y el Fe que son más tolerables por el cuerpo humano.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

La química computacional (QC) representa una actual poderosa herramienta que permite predecir propiedades químicas y físicas (geometrías óptimas, cargas parciales, espectros IR y UV, termoquímica, etc.) de compuestos mediante la resolución de la ecuación de Schrödinger. Para ello utiliza métodos como Hartree-Fock (HF) o aproximados como la teoría funcional de la densidad (DFT), además de basis sets que son funciones matemáticas usadas para modelar la nube electrónica de los átomos. Existen numerosos trabajos de modelamiento por DFT de la PZA y la obtención de sus espectros IR, además de la termoquímica de su hidrólisis (54–56). Sin embargo, no hay registro de estudios DFT de complejos con PZA, salvo de su análogo 2-tiocarboxamida-pirazina (57) y el POA^- (58). Las cargas parciales tipo RESP son usadas en el software de dinámica molecular AMBER (40,41). Se obtienen por QC y se caracterizan por representar generalmente bien el campo electrostático alrededor de la molécula, sufre pocas variaciones al cambio de basis set, es relativamente constante para grupos funcionales comunes, y describen bien las interacciones electrostáticas con otras moléculas vía la ley de Coulomb (59). Existen trabajos que exploran el uso de cargas parciales obtenidas por QC. para realizar docking molecular. Wang y col. (43) modificaron parámetros de la función de score de Autodock4 para realizar docking usando cargas RESP, en donde muestran una mayor precisión en el cálculo de la energía de unión. Estas alternativas solo toman en cuenta moléculas orgánicas y cuando se emplea metales usualmente se asigna su carga igual a su estado de

oxidación (60-62); sin embargo, es posible el cálculo de cargas RESP para los metales (63) por lo que se puede utilizar el trabajo de Wang para el docking entre los complejos de PZA y los receptores de trabajo.

Tahir y col. (64) realizaron docking en Autodock4 de la PZA frente a las PZasas mutantes (de cepas resistentes a PZA) V131F, Q141P, R154T, A170P, V180F, y la PZasa (H37Rv) las tres primeras con mutaciones muy cercanas al CS. Obtienen las energías de unión respectivas: -2.6 kcal/mol, -3.9 kcal/mol, -3.2 kcal/mol, -4.7 kcal/mol, -4.5 kcal/mol, y -5.8 kcal/mol; además, que disminuyen las interacciones puente de hidrógeno entre la PZA y el receptor, lo que muestra que mutaciones cercanas al CS pueden alterar la unión con el sustrato PZA. Sheik y col. (27) también realizaron docking de PZA frente a la PZasa (H37Rv) donde obtuvieron -4.48 kcal/mol de energía de unión. Además, determinaron interacciones entre la PZA y los residuos D8, I133, A134 y C138 del CS. No se reportan docking de PZasas con complejos metálicos.

En dinámica molecular se han desarrollado diversos enfoques para el estudio estructural de PZasas mutantes y de la interacción enzima-PZA. En ellas se observa que mutaciones cercanas al MBS en la PZasa generan disturbios en sus residuos de coordinación (64); además, que disminuye la energía de unión entre la PZA y las PZasas mutantes (65,66). Zang y col. (67) muestran que existen procesos de unión y de desvinculación de la PZA que alteran la estructura de las enzimas mutantes. También se muestra que la PZA puede permanecer más tiempo retenido en el receptor dependiendo de la mutación (64).

En dinámica molecular, casi todos los softwares poseen campos de fuerza para estructuras orgánicas específicas como proteínas, membranas, cadenas de ADN o ARN, carbohidratos, y algunos iones del solvente. Sin embargo, no poseen parámetros para compuestos metalados. Complejos metálicos y metaloproteínas pueden ser estudiados por dinámica molecular mediante la parametrización: obtención de cargas parciales, constantes de fuerza y otros coeficientes. La QC permite dicho proceso (37, 62, 68, 69); sin embargo, resulta todo un desafío actual ya que depende mucho de los tipos ligandos enlazados al metal, estado de oxidación, espín electrónico, y otras propiedades inherentes al metal bajo estudio (42).

Existen protocolos para la parametrización de centros metálicos (70,71); además P. Li y col. (42) desarrollaron MCPB.py que es un programa que facilita la ejecución de estos protocolos y brida archivos para ser ejecutados en AMBER. MCPB.py puede trabajar bajo la hipótesis de la formación de enlaces de coordinación estables (bounded model) y utilizan cálculos de QC para obtener las constantes de fuerza relativos al metal y sus cargas parciales tipo RESP, para usarlos junto al campo de fuerza de AMBER (72,73). De esta forma Junaid y col. (65) trabajaron los centros de Fe de PZasas susceptible (H37Rv) y mutantes, sin embargo, se asume que el cofactor metálico permanece enlazado en los residuos de coordinación mutados durante toda la dinámica a pesar de que estos mismos residuos desestabilizan el MBS impidiendo la correcta captación del metal.

3. METODOLOGÍA

3.1. Diseño del estudio

Nuestro trabajo será de tipo observacional analítico, donde la PZA y los complejos serán acoplados con las estructuras de las enzimas de trabajo y se compararán las poses, las interacciones y las energías de unión obtenidas para cada molécula ligando en el sitio activo de las enzimas (docking molecular). Además, se comparan los cambios estructurales de las enzimas, interacciones y el tiempo de liberación de las drogas después del acoplamiento (dinámica molecular).

3.2. Población y muestra

Población.

Se buscarán las secuencias de pirazinamidasa de cepas resistentes a PZA con mutaciones en el gen Pnca, disponibles en la literatura.

Muestra.

Secuencias de PZasas mutantes de cepas resistentes a PZA que presenten cambios en los aminoácidos del sitio de coordinación.

3.3. Criterios de selección

Inclusión Se trabajará con las secuencias de las PZasas mutantes D49N, H51R, H57R y H71Y las cuales son de cepas resistentes a PZA y presentan mutación en los aminoácidos del MBS. Además, se trabajará con la secuencia de V139A que es

una mutación cercana al CS, y con la PZasa de cepa susceptible H37Rv cuya secuencia y estructura está disponible en el Protein Data Bank (PDB: 3pl1).

Exclusión Secuencias incompletas o con mutaciones no pertenecientes al sitio de coordinación.

3.4. Operacionalización de las variables

El acoplamiento entre las enzimas y los complejos, además de las diversas poses formadas, serán visualizadas mediante el programa Pymol y evaluadas a través de la variable función de score del docking.

A partir de las poses encontradas se desarrollarán las dinámicas moleculares obteniendo un RMSD que cuantifica las variaciones de las posiciones atómicas a través del tiempo. Además, se obtienen tiempos de desprendimiento del ligando.

Tabla 3.4.1 Operacionalización de variables. Cuantitativo continuo, dependiente, escala de medición razón.

Variable	Definición	Indicador	Definición operacional
Energía de unión o función de score	Es la energía de acoplamiento y mide la fuerza de la interacción entre el ligando y receptor. Es usado generalmente para predecir la afinidad del enlace e interacción entre un ligando y una proteína en una determinada pose.	$\Delta G_{\text{acoplamiento}}$	Energía potencial en kcal/mol
RMSD proteína	Es la desviación cuadrática media de los átomos del backbone (tipos C, CA y N) de la proteína. Se usa para observar las variaciones de las posiciones de los átomos del backbone durante el transcurso de la dinámica.	RMSD (nm)	Distancia en nm
RMSD ligando	Es la desviación cuadrática media de los átomos de C,N,O y metal del ligando. Se usa para observar las variaciones y desplazamientos de las posiciones de los átomos del ligando o molécula durante el transcurso de la dinámica con respecto al receptor.	RMSD (nm)	Distancia en nm

RMSF proteína	Es la desviación cuadrática media de cada residuo de la proteína. Se usa para observar las variaciones de las posiciones de cada residuo en la dinámica.	RMSF (nm)	Distancia en nm
---------------	--	-----------	-----------------

3.5. Instrumentos

3.5.1. Programas y bases de datos

Se utilizarán bases de datos como Protein Data Bank (www.rcsb.org/) y Pubchem (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pyrazinamide) para obtener las estructuras de la Pzasa y pirazinamida (PZA) respectivamente.

Tabla 3.5.1.1 Programas y paquetes de química computacional y bioinformática

Programa	Descripción	Página web
Gaussian 16	Software comercial para cálculos en química teórica. Resuelve la ecuación de Schrödinger utilizando métodos como Hartree-Fock, teoría del funcional de la densidad (DFT) o semiempíricos. Obtiene funciones de onda moleculares las cuales se usan para calcular algunas propiedades moleculares como densidad electrónica, cargas parciales, energía molecular, posiciones atómicas optimizadas, constantes de fuerza entre átomos, etc.	https://www.gaussian.com/
AmberTools20	Es un conjunto de paquetes y códigos desarrollados de forma independiente. Es utilizado principalmente para la construcción de sistemas para dinámica molecular en AMBER20. También es usado para la parametrización de ligandos orgánicos y de complejos metálicos. Para ello, genera archivos de entrada para programas de QC como Gaussian 16 o GAMESS, y lee los archivos de salida resultantes para generar los parámetros requeridos.	https://www.AMBERmd.org/AmberTools.php
Autodock4.2	Es un software libre desarrollado para la predicción del acoplamiento de moléculas orgánicas sobre una proteína o receptor de estructura conocida. Se utiliza para el desarrollo o elección de potenciales drogas que podrían tener buena afinidad con el receptor.	http://www.autodock.scripps.edu/wiki/AutoDock4

AutodockTools	Es la interfaz gráfica para Autodock4. Contiene las herramientas para la creación, conversión de archivos y un visualizador para la construcción de los sistemas y análisis de resultados.	https://www.ccsb.scripps.edu/mgltools
Modeller	Es un software utilizado para el modelado molecular de proteínas por homología. Trabaja reconociendo una secuencia de aminoácidos de la proteína problema y, a través de un modelo estructural, entrega una estructura tridimensional.	https://www.salilab.org/modeller/
Gromacs 2020.4.0	Software libre para la construcción de sistemas y ejecución de dinámicas moleculares para proteínas. Trabaja con los campos de fuerza Gromos, AMBER, Opls, entre otros.	https://www.manual.gromacs.org/documentation/2020/index.html

Tabla 3.5.1.2 Servidores web

Servidor	Descripción	Página web
H++	Servidor web que calcula las constantes de acidez de los grupos ionizables de las proteínas y añade protones a una estructura. Puede añadir protones según un pH asignado.	www.biophysics.cs.vt.edu/
Protein Plus	Es un servidor con soporte para la visualización y análisis de interacciones entre moléculas orgánicas con proteínas.	https://www.proteins.plus/

Tabla 3.5.1.3 Softwares para la visualización de las estructuras y resultados

Software o visualizador	Descripción	Página web
IQmol	Editor libre de estructuras moleculares y visualizador de resultados de cálculos de QC. Tiene herramientas de minimización molecular, gráfica de frecuencias vibracionales, orbitales y otras superficies. Puede leer resultados de Gaussian 16 y Q-chem.	https://www.iqmol.org/
Pymol	Visualizador muy utilizado para el análisis estructural de moléculas y macromoléculas. Posee herramientas para la edición y construcción molecular y con facilidad de trabajo con códigos en Python.	https://www.pymol.org/2/
Chimera USCF	Visualizador de estructuras moleculares y resultados de QC. Posee herramientas para	https://www.cgl.ucsf.edu/chimera

	el análisis estructural y cálculo de propiedades químicas.	
VMD 1.9.2	Interfaz gráfica muy utilizada para la visualización y análisis de resultados de dinámicas moleculares. Trabaja también con figuras geométricas y puede realizar un análisis específico de resultados al ejecutar códigos o scripts.	https://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/
GNUplot	Programa de interfaz de línea de comandos muy utilizado para generar imágenes de funciones matemáticas. Grafica datos experimentales para el análisis de resultados.	http://www.gnuplot.info/

3.5.2. Recursos computacionales

Para la ejecución del docking y dinámicas moleculares se usarán los recursos computacionales del HPC-Linux- Cluster del Laboratorio de Dinámica de Fluidos Geofísicos Computacionales del Instituto Geofísico del Perú (Subvenciones 101-2014-FONDECYT, SPI-RALES2012 IRD-IGP, Manglares IGP-IDRC, PpR068). Además del apoyo de un computador con 12 procesadores disponible en el Laboratorio de Bioinformática y Biología molecular de la UPCH. Los cálculos de QC en Gaussian 16 fueron realizados en el cluster HIDRA del Laboratorio de Termoquímica del Instituto Rocasolano-CSIC-España del Dr Juan Dávalos.

3.6. Procedimiento

3.6.1. Flujogramas de proceso

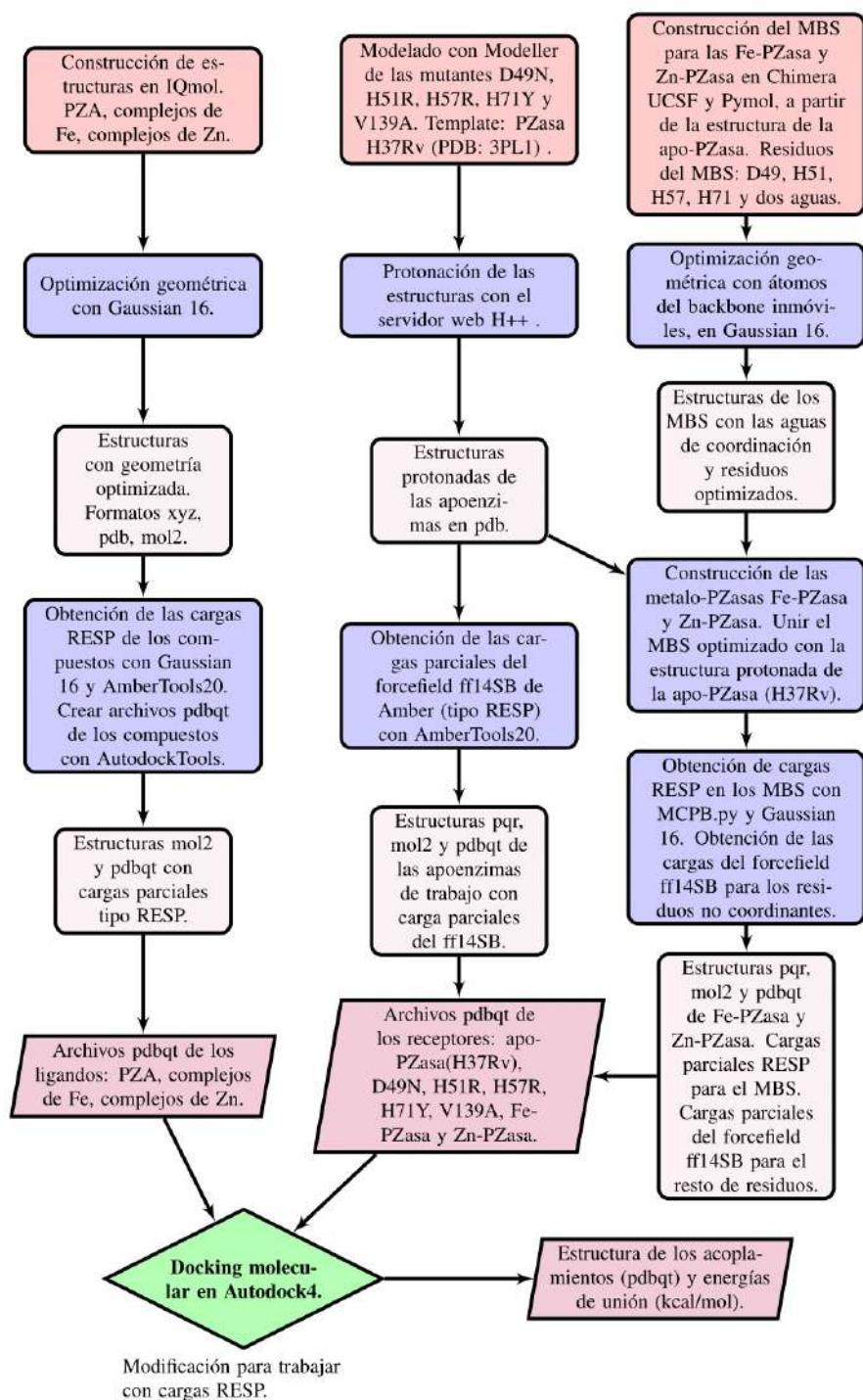


Figura 3.6.1.1 Diagrama de flujo del proceso de construcción y modelado de estructuras para el docking molecular.

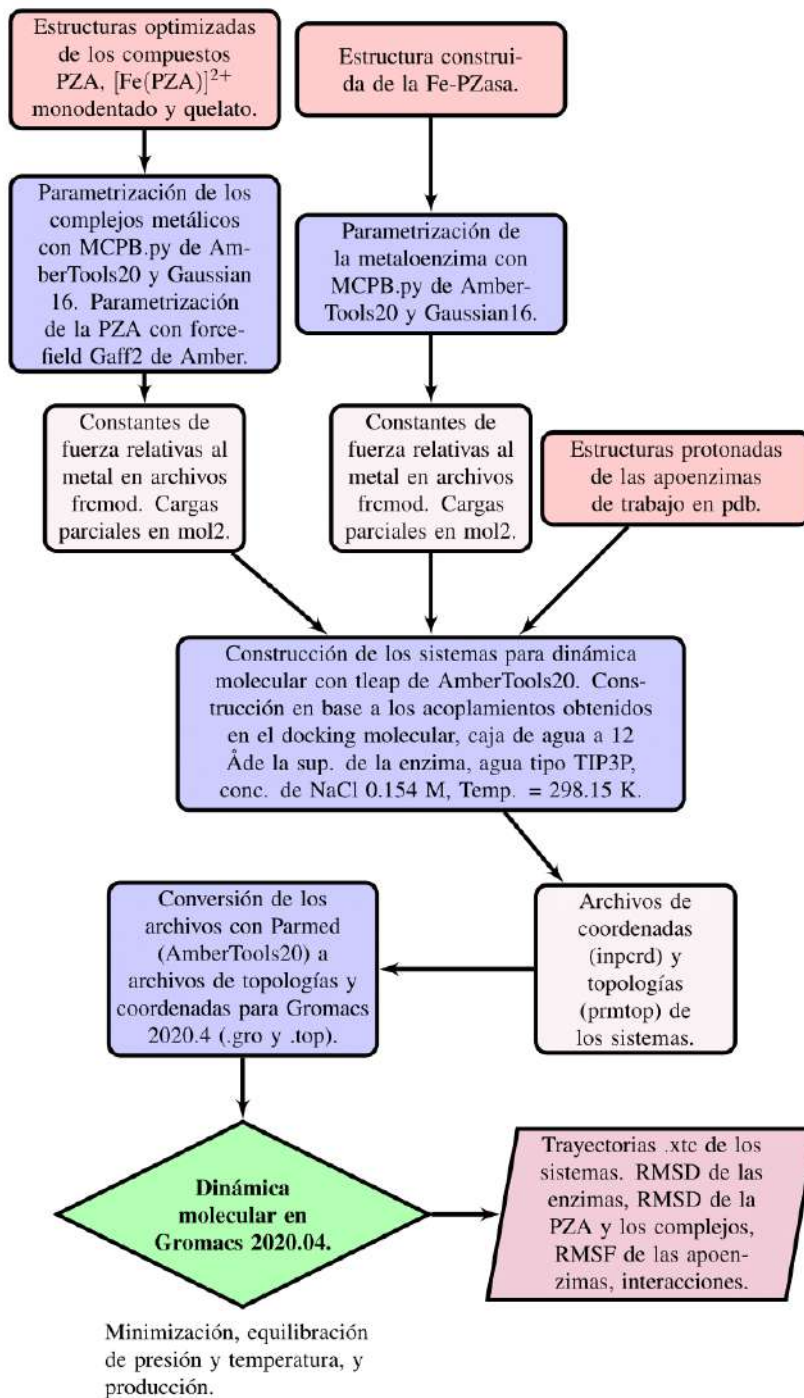


Figura 3.6.1.2 Diagrama de flujo del proceso de parametrización de los compuestos y construcción de los sistemas para la dinámica molecular.

3.6.2. Construcción y modelado

La estructura de la PZA será obtenida de Pubchem y será base para la construcción de las estructuras de los complejos.

Basados en los modos de coordinación reportados para la PZA (figura 1.8), diseñaremos y proponemos los complejos de PZA las cuales se ilustran en figuras 3.3 y 3.4 junto con sus respectivos nombres a usar. Se trabajará con el modo monodentado y quelato, y se completará la geometría octaédrica con aguas de coordinación. Se considerarán también las estructuras sin aguas de coordinación y con los acuocomplejos para la comparación de los resultados.

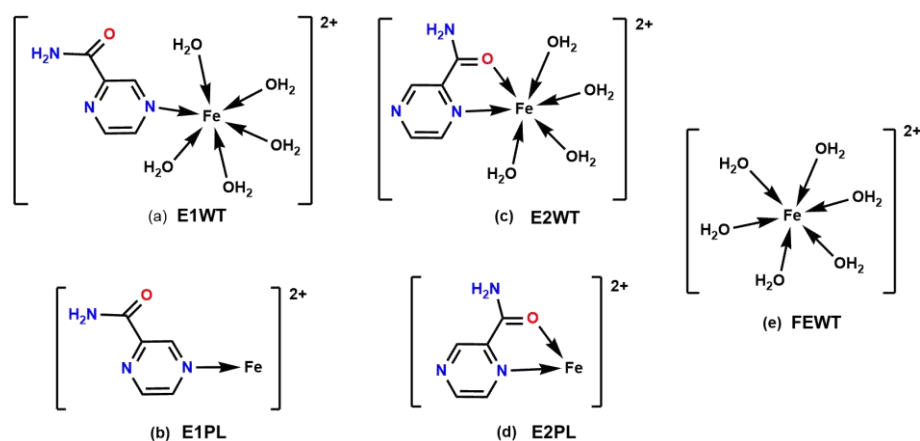


Figura 3.6.2.1 Complejos de Fe para el docking y dinámica molecular

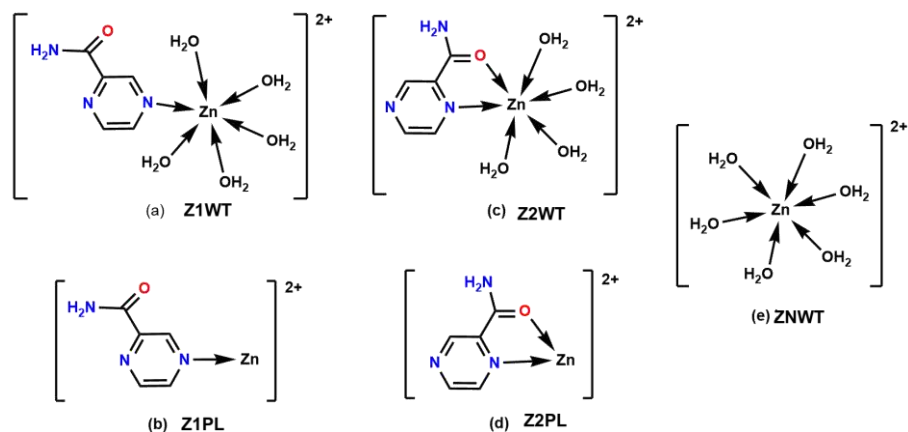


Figura 3.6.2.2 Complejos de Zn para el docking.

Estas estructuras serán construidas en IQmol, y las geometrías serán optimizadas con cálculos de QC en Gaussian 16 y basados en procedimientos publicados en literatura (74). Se usará el método DFT con las siguientes opciones:

- PZA: Funcional B3PW91, basis set 6-31G(d,p), carga = 0, multiplicidad = 1, y agua como solvente implícito con método PCM.
- Complejos de zinc: Funcional B3PW91, basis set LANL2DZ (con ECP¹ para el Zn, basis set 6-31G(d,p) para los átomos CHON, carga = +2, multiplicidad = 1, y agua como solvente implícito con método PCM.
- Complejos de hierro: Funcional UB3PW91, basis set LANL2DZ (con ECP) para el Fe, basis set 6-31G(d,p) para los átomos CHON, carga = +2, multiplicidad = 5, agua como solvente implícito con método PCM, y procedimiento SCF cuadráticamente convergente (scf=qc).

¹ Energy core potential.

3.6.2.1. PZA y complejos metálicos

La estructura de la PZA será obtenida de Pubchem y será base para la construcción de las estructuras de los complejos.

Basados en los modos de coordinación reportados para la PZA (figura 1.8), diseñaremos y proponemos los complejos de PZA las cuales se ilustran en figuras 3.3 y 3.4 junto con sus respectivos nombres a usar. Se trabajará con el modo monodentado y quelato, y se completará la geometría octaédrica con aguas de coordinación. Se considerarán también las estructuras sin aguas de coordinación y con los acuocomplejos para la comparación de los resultados.

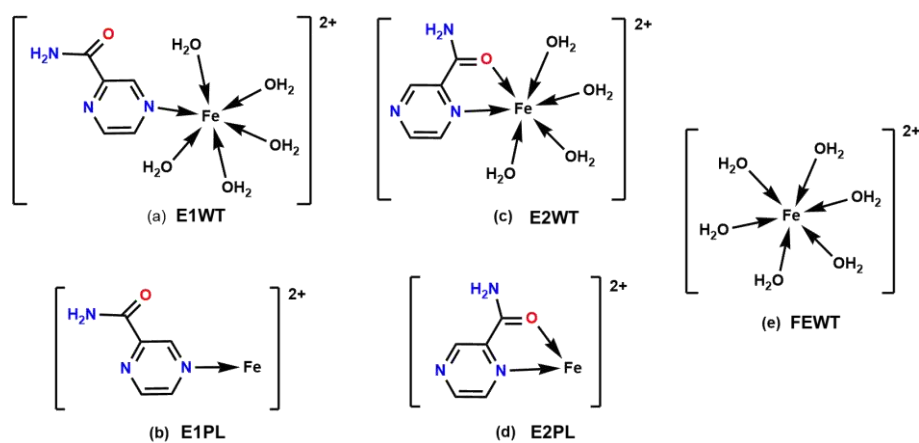


Figura 3.6.2.1.1 Complejos de Fe para el docking y dinámica molecular

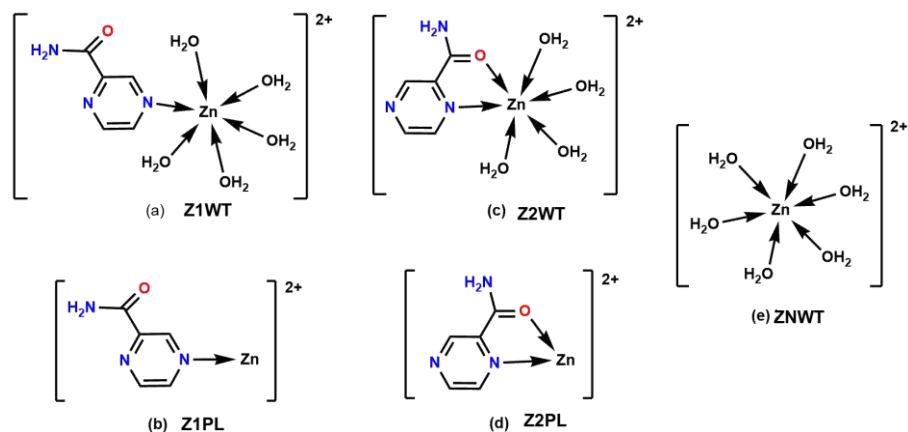


Figura 3.6.2.1.2 Complejos de Zn para el docking.

Estas estructuras serán construidas en IQmol, y las geometrías serán optimizadas con cálculos de QC en Gaussian 16 y basados en procedimientos publicados en literatura (74). Se usará el método DFT con las siguientes opciones:

- PZA: Funcional B3PW91, basis set 6-31G(d,p), carga = 0, multiplicidad = 1, y agua como solvente implícito con método PCM.
- Complejos de zinc: Funcional B3PW91, basis set LANL2DZ (con ECP² para el Zn, basis set 6-31G(d,p) para los átomos CHON, carga = +2, multiplicidad = 1, y agua como solvente implícito con método PCM.
- Complejos de hierro: Funcional UB3PW91, basis set LANL2DZ (con ECP) para el Fe, basis set 6-31G(d,p) para los átomos CHON, carga = +2, multiplicidad = 5, agua como solvente implícito con método PCM, y procedimiento SCF cuadráticamente convergente (scf=qc).

² Energy core potential.

3.6.2.2. Preparación de las apo-PZasas mutantes

La estructura cristalizada (.pdb) de la apo-PZasa de cepa susceptible H37Rv será obtenida del Protein Data Bank con código PDB:3PL1 al eliminar el Fe y moléculas de agua. En base a esta estructura, las secuencias mutantes D49N, H51R, H57R, H71Y y V139A serán modeladas con Modeller y se guardarán en formato .pdb. Las estructuras mutantes modeladas junto con la estructura de apo-PZasa (H37rv) serán protonadas usando el servidor web H++ a pH=7.0 y con el resto de las opciones por defecto. Las estructuras protonadas serán revisadas con Pymol y guardadas en formato .pdb.

3.6.2.3. Preparación de las metaloenzimas Fe-PZasa y Zn-PZasa

La estructura cristalina (.pdb) de la Fe-PZasa correspondiente a la cepa susceptible H37Rv será obtenida también del PDB:3PL1. Se eliminan las moléculas de agua y posteriormente se completará la geometría octaédrica del metal al añadir dos aguas de coordinación a 2 Å del Fe con el software Chimera UCSF. Para la construcción del Zn-PZasa, se reemplazará el Fe por Zn en la estructura anterior.

Se optimizará la geometría del centro metálico. Para ello primero se construirá la porción a modelar al extraer la posición del metal, de las aguas de coordinación, los residuos coordinantes (MBS) D49, H51, H57 y H71, y completando los átomos faltantes con átomos de hidrógeno. Luego, la optimización se realizará en Gaussian

16 con el método DFT bajo las mismas condiciones que los complejos metálicos (sec. [3.6.2.1](#)) pero manteniendo los átomos del backbone inmóviles.

- Centro de Fe-PZasa: Funcional UB3PW91, basis set LANL2DZ (con ECP) para el Fe, basis set 6-31G(d,p) para los átomos CHON, carga = +1, multiplicidad = 5, agua como solvente implícito con método PCM, y procedimiento SCF cuadráticamente convergente (scf=qc).
- Centro de Zn-PZasa: Funcional B3PW91, basis set LANL2DZ (con ECP) para el Zn, basis set 6-31G(d,p) para los átomos CHON, carga = +1, multiplicidad = 1, y agua como solvente implícito con método PCM.

Después de la optimización, las estructuras resultantes serán insertados en la estructura protonada de la apo-PZasa H37rv (sec. [3.6.2.2](#)) y se generará las nuevas estructuras Fe-PZasa y Zn-PZasa en .pdb.

3.6.3. Obtención de cargas parciales

3.6.3.1. En la PZA y complejos metálicos

Las cargas parciales RESP se obtendrán con Gaussian 16 y basados en protocolos publicados en la literatura (42,43). Primero se creará el archivo de entrada (.com) para Gaussian usando el comando antechamber del paquete AmberTools20 partiendo de las estructuras .pdb o .mol2 ya optimizadas en la sec [3.6.2.1](#). Se trabajará con las siguientes opciones según la molécula:

- PZA: Funcional B3LYP, basis set 6-31G(d), carga = 0, multiplicidad = 1, sin optimización geométrica y el resto de las opciones de antechamber por defecto.
- Complejos de zinc: Funcional B3LYP, basis set 6-31G(d), sin optimización geométrica, carga = +2, multiplicidad = 1, Zn radii de 1.395, y el resto de las opciones de antechamber por defecto.
- Complejos de hierro: Funcional UB3LYP, basis set 6-31G(d), sin optimización geométrica, carga = +2, multiplicidad = 5, Fe radii de 1.409, y el resto de opciones de antechamber por defecto.

Los archivos de entrada se ejecutarán en Gaussian 16 para obtener un archivo final .gesp. Con antechamber se convertirá estos archivos .gesp a .mol2 con las cargas RESP. Se revisará la correcta escritura en los archivos .mol2 y se leerán en AutodockTools para convertirlos finalmente a archivos .pdbqt que conservarán las cargas RESP.

3.6.3.2. En las PZasas mutantes y apo-PZasa (H37Rv)

Con comandos de tleap de AmberTools20, se obtendrán los archivos .prmtop y .inpcrd para cada apoenzima protonada. Con el comando ambpdb de AmberTools20, los archivos generados en tleap se convertirán a estructuras con carga parcial del campo de fuerza ff14SB de AMBER (tipo RESP) en formato .pqr. Estos archivos serán convertidos a .mol2 con Openbabel y después convertidas a .pdbqt en AutodockTools conservando las cargas parciales de AMBER.

3.6.3.3. En las metaloenzimas Fe-PZasa y Zn-PZasa

Se utilizará MCPB.py de AmberTools20 solo para obtener las cargas RESP del MBS y el metal a partir de las estructuras Fe-PZasa y Zn-PZasa obtenidas en sec. 3.6.2.3. MCPB.py creará los inputs .com para Gaussian, se tomará solo los inputs que sirven para el cálculo de las cargas y se trabajará en condiciones similares a los complejos metálicos.

- Centro Zn-PZasa: Funcional B3LYP, basis set 6-31G(d), sin optimización geométrica, carga = +1, multiplicidad = 1, Zn radii de 1.395, y el resto de opciones de antechamber por defecto.
- Centro Fe-PZasa: Funcional UB3LYP, basis set 6-31G(d), sin optimización geométrica, carga = +1, multiplicidad = 5, Fe radii de 1.409, y el resto de las opciones de antechamber por defecto.

Después, con tleap y ambpdb se obtendrán los archivos .pqr con las cargas parciales en toda la metaloenzima. Estos archivos serán convertidos a .mol2 con Openbabel y luego a .pdbqt usando AutodockTools conservando las cargas parciales de AMBER y las calculadas por MCPB.py.

3.6.4. Docking molecular

Se instalará Autodock4 y Autogrid4 con los parámetros correspondientes cambiados según la tabla 1.1. El grid box será establecido como un paralelepípedo que cubre los residuos del centro de coordinación y el sitio catalítico, con un spacing de 0.158 y de dimensiones 106, 80 y 72. Con Autogrid4 se crearán los grid maps en base a los archivos .pdbqt del ligando y receptor determinados en 3.6.3. Las

poses de acoplamiento y energía de unión serán determinados con Autodock4 y se trabajará con el algoritmo genético, 280 seed runs y con la opción bound del estado de ligando no enlazado. Los resultados se obtendrán en formato .pdbqt y serán observados y analizados en Pymol y Chimera USCF.

3.6.5. Dinámica molecular

3.6.5.1. Parametrización de la PZA y moléculas ligando

Se parametrizará la PZA a partir de la estructura optimizada en [3.6.2.1](#). Se obtendrán las cargas parciales con Gaussian y basados en protocolos publicados (71). Primero se creará el archivo de entrada (.com) para Gaussian usando el comando antechamber. Se trabajará con el funcional B3LYP, basis set 6-311++G(3df,3pd), carga = 0, multiplicidad = 1, sin optimización geométrica y el resto de las opciones de antechamber por defecto. Se obtendrá un archivo .gesp que servirá para crear en AmberTools20 los archivos .mol2 y .frcmod con las cargas y parámetros del campo de fuerza GAFF2 de AMBER.

Se parametrizarán los complejos $[M(PZA)]^{2+}$ monodentado y quelato (E1PL y E2PL) con el script MCPB.py de AmberTools20 a partir de las estructuras optimizadas en [3.6.2.1](#) y basados en protocolos (71). En MCPB.py se utilizará el campo de fuerza GAFF2 para los átomos CHONS, carga = +2, multiplicidad = 5, factor de escala de 0.9613; y se generará los archivos de entrada (.com) para Gaussian tanto para el cálculo de constantes de fuerza relativas al metal como para las cargas parciales de la molécula.

- **Constante de fuerza relativa al metal.** Se optimizará primero la geometría con el funcional UB3LYP, basis set SDD para el Fe, basis set 6-31G(d,p) para los átomos CHON, scf=qc, y el resto de opciones MCPB.py por defecto. Después se calculará las constantes de fuerza con estas mismas opciones sin optimizar.
- **Cargas parciales.** Funcional UB3LYP, basis set 6-311++G(3df,3pd), Fe radii de 1.408, scf=qc, sin optimización, y el resto de opciones MCPB.py por defecto.

Con el mismo script se tomará los resultados de Gaussian y crearán archivos .pdb, .mol2 y .frcmod con las cargas parciales y las constantes de fuerza de enlace y angulares para el complejo.

3.6.5.2. Parametrización de la Fe-PZasa

La metaloenzima será parametrizada también con MCPB.py, basado en la estructura modelada en [3.6.2.3](#) y basados en protocolos. MCPB.py seleccionará el centro metálico y los residuos enlazados a él. Se utilizará el campo de fuerza ff14SB para la parte proteica, carga = +1, multiplicidad = 5, factor de escala de 0.9613; y se generará los archivos de entrada (.com) para Gaussian tanto para el cálculo de constantes de fuerza relativas al metal como para las cargas parciales del centro de coordinación.

- **Constante de fuerza relativa al metal.** Se optimizará primero la geometría con el funcional UB3LYP, basis set SDD para el Fe, basis set 6-31G(d,p) para los átomos CHON, scf=qc, y el resto de opciones de MCPB.py por

defecto. Después se calculará las constantes de fuerza con estas mismas opciones sin optimizar.

- **Cargas parciales.** Funcional UB3LYP, basis set 6-311++G(3df,3pd), Fe radii de 1.408, scf=qc, sin optimización, y el resto de las opciones de MCPB.py por defecto.

Se tomará los resultados de Gaussian con MCPB.py y se crearán archivos .pdb, .mol2 y .frcmod con las cargas parciales y las constantes de fuerza de enlace y angulares para el centro metálico.

3.6.5.3. Construcción de los sistemas: apoenzimas en agua

Las estructuras protonadas del paso [3.6.2.2](#) serán usadas para preparar el sistema apoenzima en agua. Con el comando `tleap` de AmberTools20, se asignará el campo de fuerza `ff14SB`, se solvatará la apoenzima con agua tipo TIP3P con una caja periódica de 12 Å de la superficie proteica, y se añadirá iones de NaCl a una concentración de 0.154 M con el método `split` (65). Se guardarán los archivos de coordenadas `.inpcrd` y de topologías `.prmtop`, y con el comando `parmed` de AmberTools20 se convertirán a coordenadas y topologías para ser corridas en Gromacs 2020.4 (`.gro` y `.top`).

3.6.5.4. Construcción de los sistemas: PZA acoplado a apoenzimas en agua

Basados en los resultados del docking molecular para la PZA, se armarán los acoplamientos. Se usará `tleap` para asignar el campo de fuerza `ff14SB` a la apoenzima

y usar los archivos de la parametrización de la PZA. Se solvatará el sistema con agua tipo TIP3P con una caja periódica de 12 Å de la superficie de la proteína, y se añadirá iones de NaCl a una concentración de 0.154 M con el método split. Se guardarán los archivos de coordenadas .inpcrd y de topologías .prmtop y serán convertidas con el comando parmed a coordenadas y topologías para ser corridas en Gromacs 2020.4 (.gro y .top).

3.6.5.5. Construcción de los sistemas: complejo acoplado a apoenzima en agua

Se armará los acoplamientos basados en los resultados del docking molecular para los complejos (E1PL y E2P2), y se usará tleap para asignar el campo de fuerza ff14SB a la apoenzima y usar los archivos generados por MCPB.py del complejo. Se solvatará el sistema con agua tipo TIP3P con una caja periódica de 12 Å de la superficie de la proteína, y añadirá iones de NaCl a una concentración de 0.154 M con el método split. Se guardarán los archivos de coordenadas .inpcrd y de topologías .prmtop, y con el comando parmed de AmberTools20 se convertirán a coordenadas y topologías para ser corridas en Gromacs 2020.4 (.gro y .top).

3.6.5.6. Construcción de los sistemas: Fe-PZasa y moléculas acopladas a ella en agua

El sistema Fe-PZasa en agua será construida usando los archivos obtenidos de la parametrización de la sec. [3.6.5.2](#). Se usará tleap para asignar el campo de fuerza ff14SB a la parte proteica y usar los archivos de la parametrización del MCPB.py. Se solvatará el sistema con agua tipo TIP3P con una caja periódica de 12 Å de la

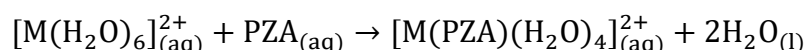
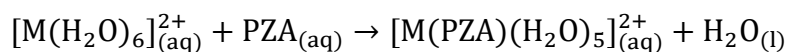
superficie de la metaloenzima, y se añadirá iones de NaCl a una concentración de 0.154 M con el método split. Se guardarán los archivos de coordenadas .inpcrd y de topologías .prmtop y serán convertidas con el comando parmed a coordenadas y topologías para ser corridas en Gromacs 2020.4 (.gro y .top).

Los sistemas Fe-PZasa acoplado a moléculas será construida en base a los resultados del docking molecular y usando los archivos de la parametrización tanto de la metaloenzima como de los ligandos (sección [3.6.5.1](#) y [3.6.5.2](#)). Se usará tleap para y asignar el campo de fuerza ff14SB a la parte proteica y usar los archivos de la parametrización de cada molécula ligando. Se solvatará el sistema con agua tipo TIP3P con una caja periódica de 12 Å de la superficie de la metaloenzima, y se añadirá iones de NaCl a una concentración de 0.154 M con el método split. Se guardarán los archivos de coordenadas .inpcrd y de topologías .prmtop y serán convertidas con el comando parmed a coordenadas y topologías para ser corridas en Gromacs 2020.4 (.gro y .top).

3.6.6. Termoquímica de los complejos

Las energías de enlace del metal en los complejos se obtendrán a partir de la diferencia entre la energía de los complejos y la suma de las energías de cada componente del complejo (74). Las energías serán calculadas con las mismas condiciones que en [3.6.2.1](#), pero en fase gas y considerando las correcciones de energía de punto cero (ZPE), error por superposición de basis set (BSSE) y Grimme dispersion (GD3).

Las energías libre de formación de los complejos $[M(PZA)(H_2O)_5]^{2+}$ y $[M(PZA)(H_2O)_4]^{2+}$ (M=Fe, Zn.) se obtendrán a partir de la diferencia entre las energías libre entre los reactantes y productos de las siguientes reacciones en solución acuosa (76):



Las energías libres de cada compuesto serán tomada de los resultados de la sección 3.6.2.1. Consideraremos las correcciones de energía de punto cero (ZPE).

3.6.7. Consideraciones éticas

El protocolo fue registrado en el Sistema Descentralizado de Información y Seguimiento a la Investigación (SIDISI), y aprobado por Dirección Universitaria de Investigación, Ciencia y Tecnología (DUICT). El trabajo consta del modelado computacional de la interacción de moléculas y proteínas, por lo que no contempla un contacto alguno con sujetos humanos ni con animales ni muestras. Por tal razón, no se requirió la evaluación del Comité de ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (CIE-UPCH).

4. RESULTADOS

4.1. Optimización geométrica de los compuestos

La estructura optimizada de la PZA resulta plana con los átomos de hidrógeno del grupo amida interactuando con el N1 del anillo pirazina a través de un puente de hidrógeno (figura 4.1a). Las cargas parciales negativas se localizan en los átomos O9, N1, N4 y N8.

En los complejos (figuras 4.1 y 4.2), predomina la carga positiva +2 siendo el metal el que porta la mayor carga parcial positiva. El complejo E1WT muestra el centro de Fe en una geometría octaédrica distorsionada y la distancia de enlace entre Fe-N1 es de 2.18 Å. El E1PL resulta una molécula plana con una distancia Fe-N1 de 2.20 Å. El E2WT muestra también un centro metálico con geometría octaédrica distorsionada con distancias Fe-O9 de 2.06 Å y Fe-N1 de 2.20 Å, con un ángulo de enlace O9-Fe-N1 de 75.67°. El E2PL resulta en una geometría plana con distancias Fe-O9 de 2.02 Å y Fe-N1 de 2.18 Å, con un ángulo de enlace O9-Fe-N1 de 76.75°. El FEWT resulta en una estructura octaédrica distorsionada con una distancia Fe-O promedio de 2.13 Å. En las moléculas que contienen Zn muestran estructuras similares a sus análogos de Fe.

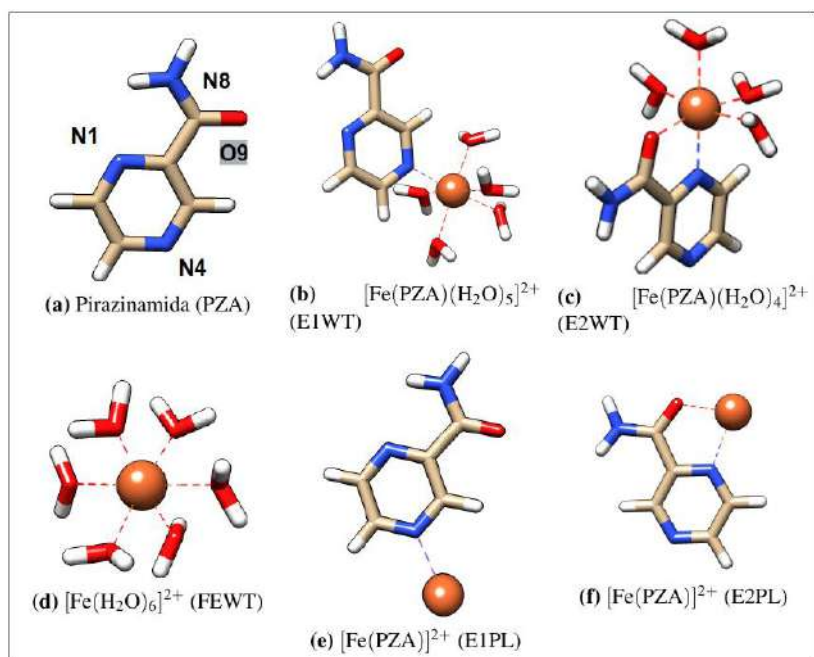


Figura 4.1.1 Estructuras resultantes para la PZA y los complejos de hierro

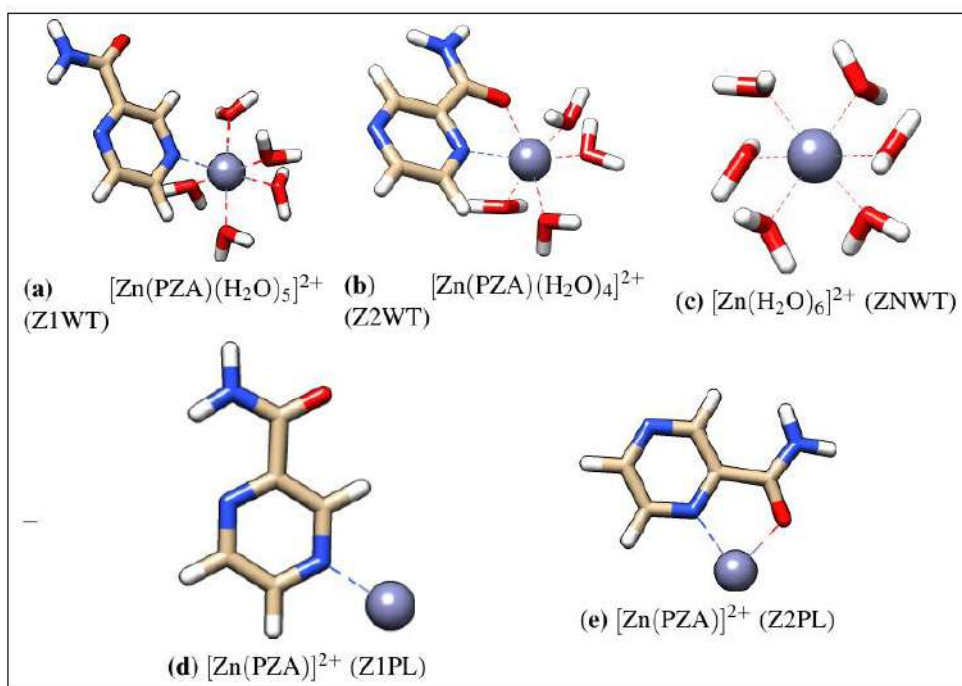


Figura 4.1.2 Estructuras resultantes para los complejos de zinc

4.2. Modelamiento de receptores

Con Modeller construimos las estructuras .pdb de las mutantes D49N, H51R, H57R, H71Y y V139A en base a la PZasa (H37rv). Se observan los cambios de residuos respectivos en el MBS sin una alteración profunda en el resto de la estructura proteica. El Fe-PZasa se construyó también en base al MBS de la PZasa (H37rv). Presenta un centro metálico con geometría octaédrica distorsionada. En ella, una de las aguas de coordinación interactúa con el D49 mediante un puente de hidrógeno mientras que la otra se encuentra solo enlazada al metal. Las distancias Fe-O1 y Fe-O2 resultan 2.20 Å y 2.23 Å. El Zn-PZasa presenta también un centro metálico con geometría octaédrica distorsionada. Una de las aguas de coordinación interactúa con el D49 y la otra interactúa solo con el metal. Las distancias Zn-O1 y Zn-O2 resultan 2.18 Å y 2.21 Å.

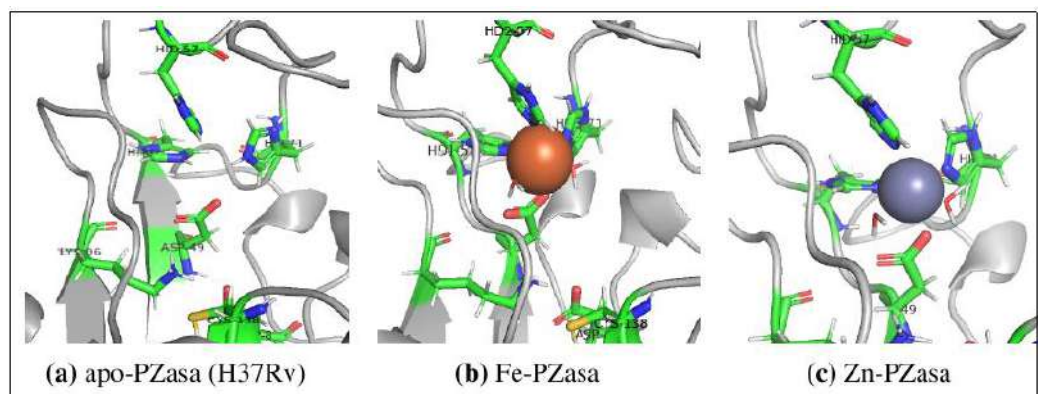


Figura 4.2.1 Modelos resultantes para las pirazinamidasas no mutantes obtenidas con

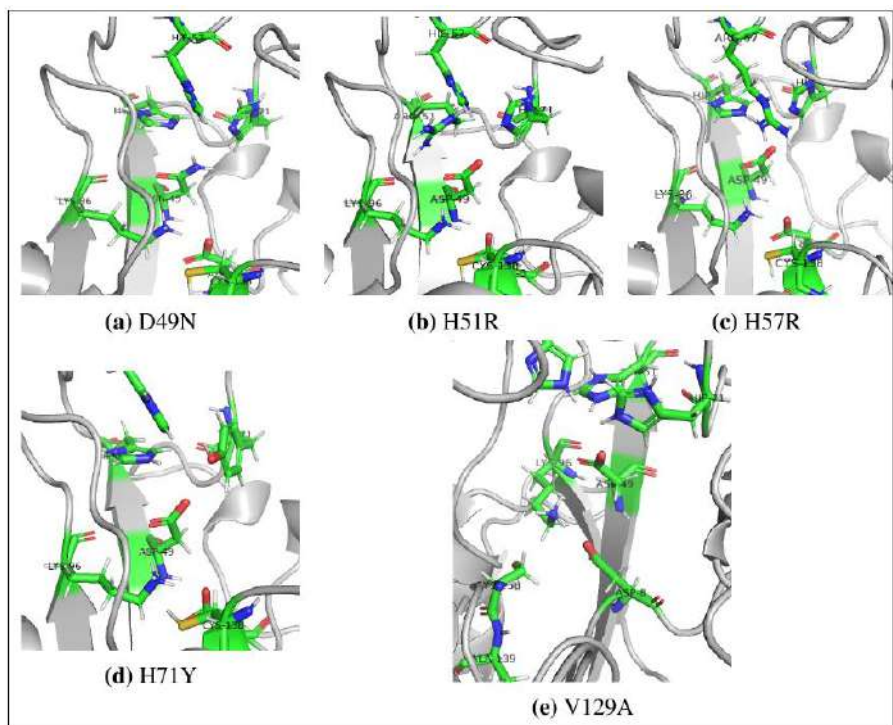


Figura 4.2.2 Modelos resultantes para las pirazinamidases mutantes

4.3. Docking molecular

Los coeficientes de la función de puntuación de Autodock4 fueron modificados según Wang (43) para trabajar con cargas RESP en los compuestos y cargas ff14SB (tipo RESP) de AMBER para los receptores.

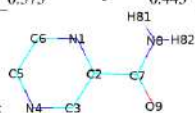
4.3.1. Obtención de las cargas RESP

Las cargas parciales tipo RESP obtenidas en la PZA muestran concordancia con las cargas Gasteiger (base de datos de Autodock4), pero las cargas RESP indican una mayor polarización en la molécula. En los complejos, las cargas RESP muestran

que la carga total +2 se distribuye por toda la estructura de acuerdo a las propiedades atómicas consideradas en el cálculo computacional. Además, el metal es el centro de mayor carga positiva, como lo muestra la tabla [4.1](#).

Tabla 4.3.1.1 Cargas parciales obtenidas por Gaussian 16 y AmberTools20.

Tipo de átomo(*)	Cargas parciales (unidades relativas)													
	Gasteiger		RESP											
	Agua libre	PZA	Agua libre	PZA	E1WT	E2WT	FEWT	EIPL	E2PL	Z1WT	Z2WT	ZNWT	ZIPL	Z2PL
O9	-	-0.266	-	-0.480	-0.454	-0.564	-	-0.247	-0.581	-0.452	-0.498	-	-0.275	-0.537
N8	-	-0.365	-	-0.700	-0.772	-0.777	-	-0.651	-0.822	-0.770	-0.763	-	-0.670	-0.838
C7	-	0.269	-	0.457	0.486	0.640	-	0.404	0.700	0.489	0.546	-	0.431	0.664
H81	-	0.159	-	0.351	0.410	0.453	-	0.423	0.498	0.410	0.448	-	0.429	0.503
H82	-	0.159	-	0.351	0.41	0.453	-	0.423	0.498	0.410	0.448	-	0.429	0.503
C2	-	0.141	-	0.193	0.467	-0.360	-	0.381	-0.055	0.443	-0.258	-	0.416	0.046
N1	-	-0.253	-	-0.437	-0.567	0.023	-	-0.441	-0.539	-0.553	0.028	-	-0.447	-0.609
C6	-	0.136	-	0.194	0.551	-0.043	-	0.478	0.234	0.536	-0.028	-	0.551	0.313
C5	-	0.135	-	0.235	-0.258	0.487	-	0.231	0.461	-0.234	0.475	-	0.12	0.43
N4	-	-0.269	-	-0.440	0.253	-0.471	-	-0.628	-0.376	0.260	-0.451	-	-0.346	-0.330
C3	-	0.153	-	0.275	-0.177	0.536	-	0.236	0.475	-0.150	0.492	-	0.172	0.431
Fe/Zn	-	-	-	-	0.784	1.058	0.835	1.392	1.507	0.656	0.914	0.796	1.192	1.425
O	-0.411	-	-0.746	-	-0.712	-0.782	-0.678	-	-	-0.688	-0.736	-0.672	-	-
H	0.205	-	0.373	-	0.443	0.461	0.436	-	-	0.439	0.449	0.436	-	-
H	0.205	-	0.373	-	0.443	0.461	0.436	-	-	0.439	0.449	0.436	-	-

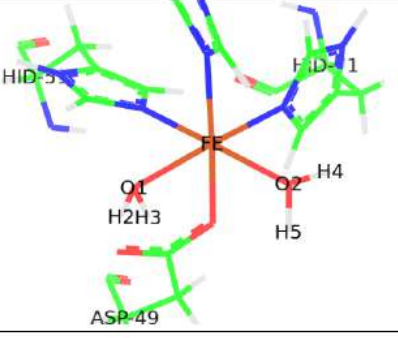


(*)Tipos de átomo para los compuestos:

En las apoenzimas receptores solamente se tomaron las cargas del forfield ff14SB de AMBER. En los Fe-PZasa y Zn-PZasa, se calcularon las carga RESP para el metal y el MBS. En ellas la carga +2 del metal se distribuye hacia los 4 residuos coordinantes y las aguas de coordinación, como lo muestra la tabla [4.2](#). Cargas RESP del metal y aguas de coordinación en las metalo-PZasas obtenidas en Gaussian 16 y AmberTools20.

Tabla 4.3.1.2 Cargas RESP del metal y aguas de coordinación en las metalo-PZasas obtenidas en Gaussian 16 y AmberTools20.

Átomo	Cargas parciales (unidades relativas)		
	Agua libre	Fe-PZasa	Zn-PZasa
Fe/Zn	-	0.768	0.574
O1	-0.746	-0.860	-0.834
H2	0.373	0.439	0.431
H3	0.373	0.452	0.449
O2	-	-0.793	-0.771
H4	-	0.421	0.407
H5	-	0.442	0.409



4.3.2. Energía de acoplamiento

Obtuvimos con Autodock4 las energías de unión de los acoplamientos resultantes, las cuales se muestran en las tablas 4.3 y 4.4. Todos son de magnitud negativa por lo que existe la tendencia al acople. Se observa que la PZA se une con la apo-PZasa y mutantes casi con la misma energía. Los complejos con aguas de coordinación E1WT, E2WT, Z1WT y Z2WT presentan energías menores a la PZA, por lo que presentan un mejor acople o mejores interacciones. Los E1PL y Z1PL son las que presentan las menores energías, posiblemente debido a la ausencia de aguas que dificulta el acople y a la interacción electrostática del metal hacia residuos con carga parcial negativa. Los iones acuosos FEWT y ZNWT son las que presentan las mayores energías, por lo que muestran poca afinidad a los receptores. Las figuras 4.1 y 4.2 ilustran estas energías mediante gráfico de listones.

Tabla 4.3.2.1 Energía de unión entre los complejos de hierro y los receptores obtenidos por Autodock4-Resp determinado para la pose predominante.

Proteína	Energía de unión o dock-score (kcal/mol)					
	PZA	E1WT	E2WT	FEWT	E1PL	E2PL
D49N	-5.67	-5.71	-5.83	-3.69	-6.67	-5.58
H51R	-5.69	-6.1	-6.22	-4.31	-7.14	-5.73
H57R	-6.09	-6.88	-6.95	-4.44	-7.43	-5.71
H71R	-5.97	-7.08	-6.34	-5.24	-8.11	-6.26
V139A	-5.75	-6.02	-5.98	-4.19	-6.95	-5.64
Apo-Pzasa	-5.78	-6.08	-6.19	-4.35	-7.18	-5.68
Fe-PZasa	-6.33	-5.84	-5.06	-3.08	-6.11	-5.47
Zn-PZasa	-5.53	-6.15	-5.33	-3.04	-6.12	-5.55

Tabla 4.3.2.2 Energía de unión entre los complejos de zinc y los receptores obtenidos por Autodock4-Resp determinado para la pose predominante.

Proteína	Energía de unión o dock-score (kcal/mol)					
	PZA	Z1WT	Z2WT	ZNWT	Z1PL	Z2PL
D49N	-5.67	-5.86	-6.42	-3.54	-6.17	-5.81
H51R	-5.69	-6.37	-7.05	-4.35	-6.18	-5.82
H57R	-6.09	-7.14	-6.92	-4.56	-7.01	-5.81
H71R	-5.97	-7.26	-6.73	-5.4	-7.94	-5.77
V139A	-5.75	-6.32	-6.94	-4.24	-5.98	-5.51
Apo-Pzasa	-5.78	-6.26	-6.8	-4.37	-6.88	-5.53
Fe-PZasa	-6.33	-6.09	-5.94	-3.21	-6.34	-5.51
Zn-PZasa	-5.53	-6.4	-5.58	-3.21	-6.35	-5.49

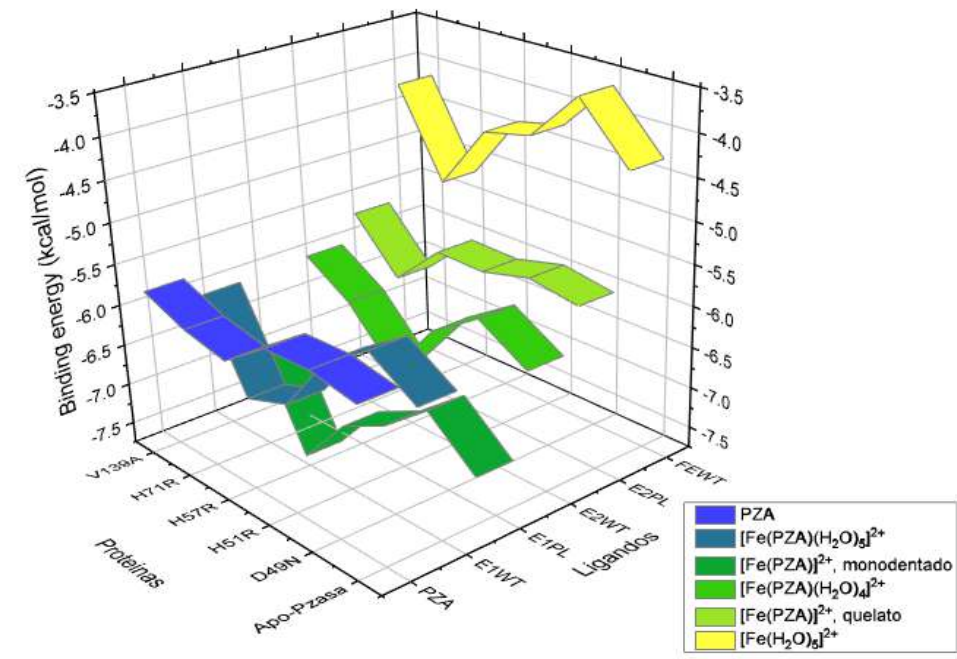


Figura 4.3.2.1 Gráfica de las energías de unión o dock-scores (kcal/mol) obtenidos en el docking molecular entre complejos de hierro y las enzimas

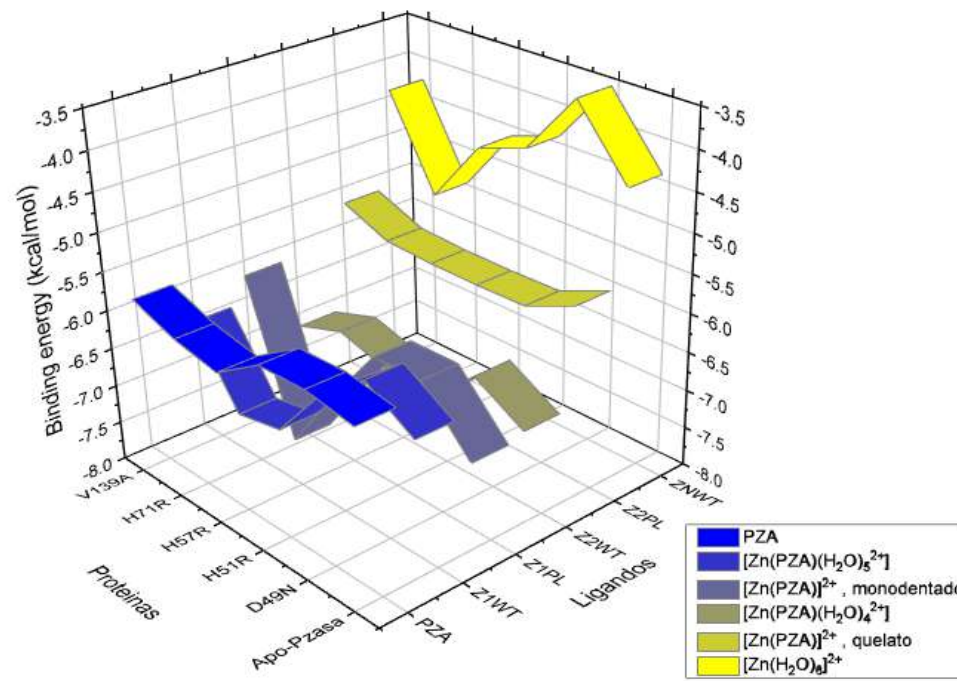


Figura 4.3.2.2 Gráfica de las energías de unión o dock-scores (kcal/mol) obtenidos en el docking molecular entre complejos de zinc y las enzimas

4.3.3. Poses de la PZA frente a las enzimas

La PZA fue acoplada frente a la apo-PZasa (figura 4.3). Se observa la interacción entre el grupo $-\text{CONH}_2$ con el residuo D8, una interacción hidrofóbica con el F13, e interacciones con los átomos del backbone de los residuos C138, H137, I133 y ALA134. Estas interacciones ocurren en el sitio catalítico (CS). Las interacciones puente de hidrógeno se conservan también en las mutantes de trabajo, y no hay una distinción significativa entre de las energías de unión. La figura 4.8 muestra las poses con las apoenzimas.

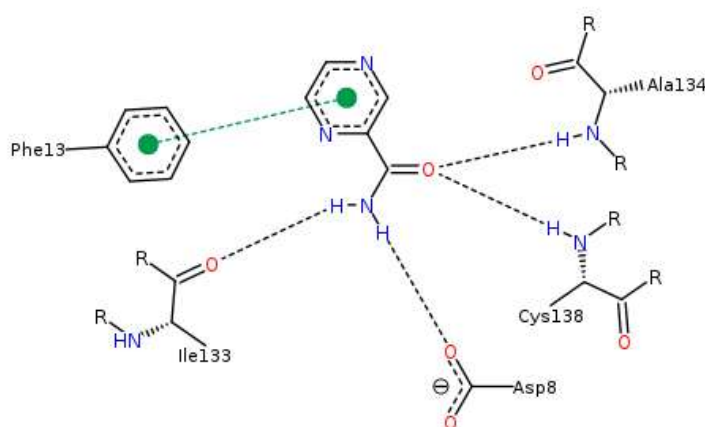


Figura 4.3.3.1 Interacciones entre la PZA y la apo-PZasa (H37rv) obtenidas en el docking. Interacciones de la PZA en la enzima apo-PZasa(H37Rv). Los puentes de hidrógeno se representan por líneas punteadas. Las líneas verdes representan interacciones hidrofóbicas

La PZA fue acoplada frente a la Fe-PZasa y Zn-PZasa y las poses se muestran en la figura 4.9. Se observa que la presencia del MBS con metal atrae ligeramente al

anillo de la PZA. El anillo pirazina siente la atracción de los protones de las aguas de coordinación mediante un puente de hidrógeno en el Fe-PZasa, lo que disminuye la energía de unión. La energía de unión con el Zn-PZasa es comparable con los del acople con apo-PZasa (tabla [4.3](#)).

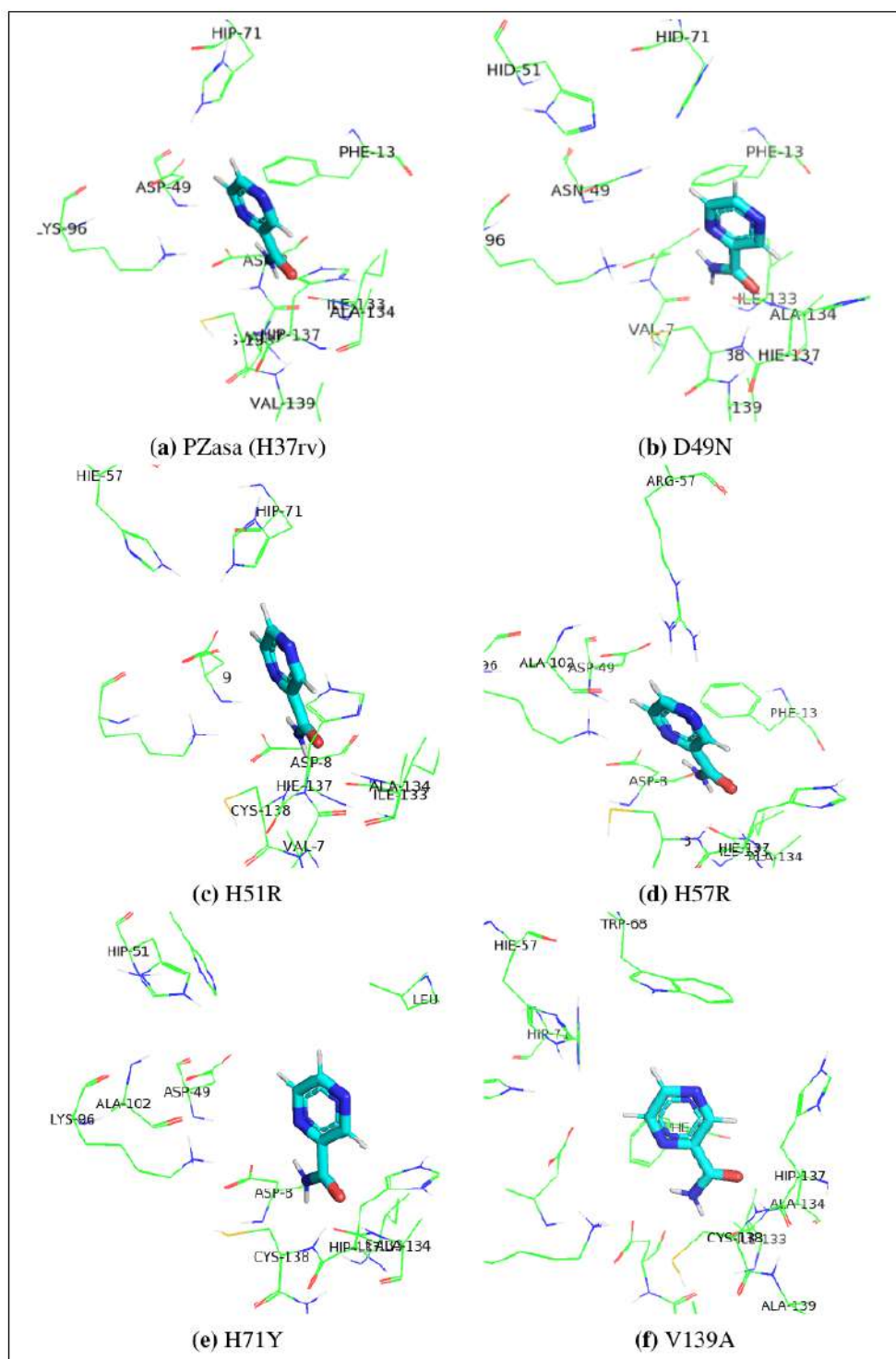


Figura 4.3.3.2 Poses obtenidas en el docking molecular para la PZa frente a las apoenzimas.

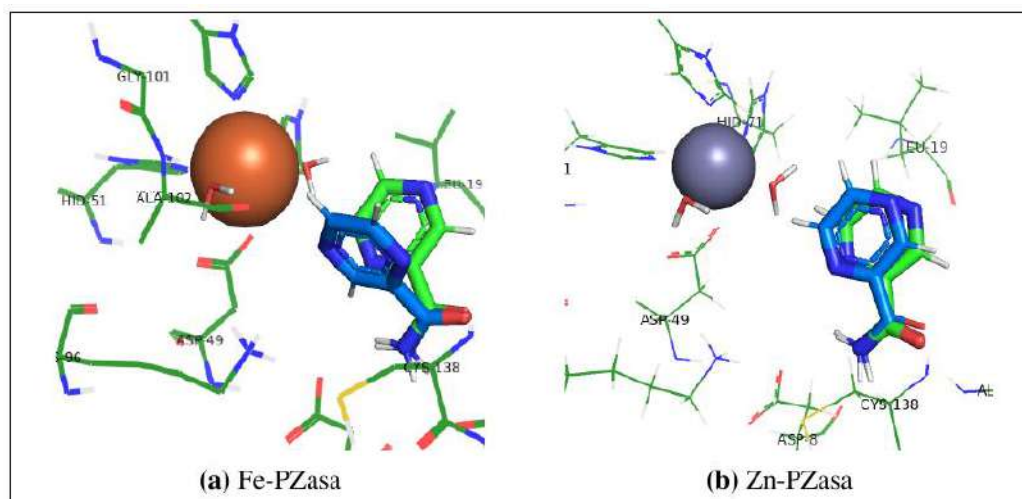


Figura 4.3.3.3 Poses de la PZA (azul) en el docking frente a las metaloenzimas. La PZA de color verde representa la pose frente a la apo-PZasa. Se nota el giro del anillo en el acople con Fe-PZasa.

4.3.4. Poses de los complejos E1WT, E2WT y FEWT frente a las enzimas receptoras

En las tres estructuras se observa que el metal y las aguas de coordinación se acoplan cerca de los residuos del MBS formando algunos puentes de hidrógeno (figuras 4.10, 4.11 y 4.12). En el E1WT y E2WT las energías de unión son hasta algo menores que la PZA, sin embargo, la parte orgánica (grupo amida) se

encuentra alejada del sitio catalítico (CS). Se registraron las mismas observaciones para los complejos de zinc.

Los FEWT y ZNWT muestran una energía de unión mayor al resto, es decir, tienen una menor afinidad para unirse a las enzimas. Esto se corrobora con el hecho que se necesita soluciones concentradas de metal (en relación con la concentración de apoenzima) para reactivar a la apo-PZasa.

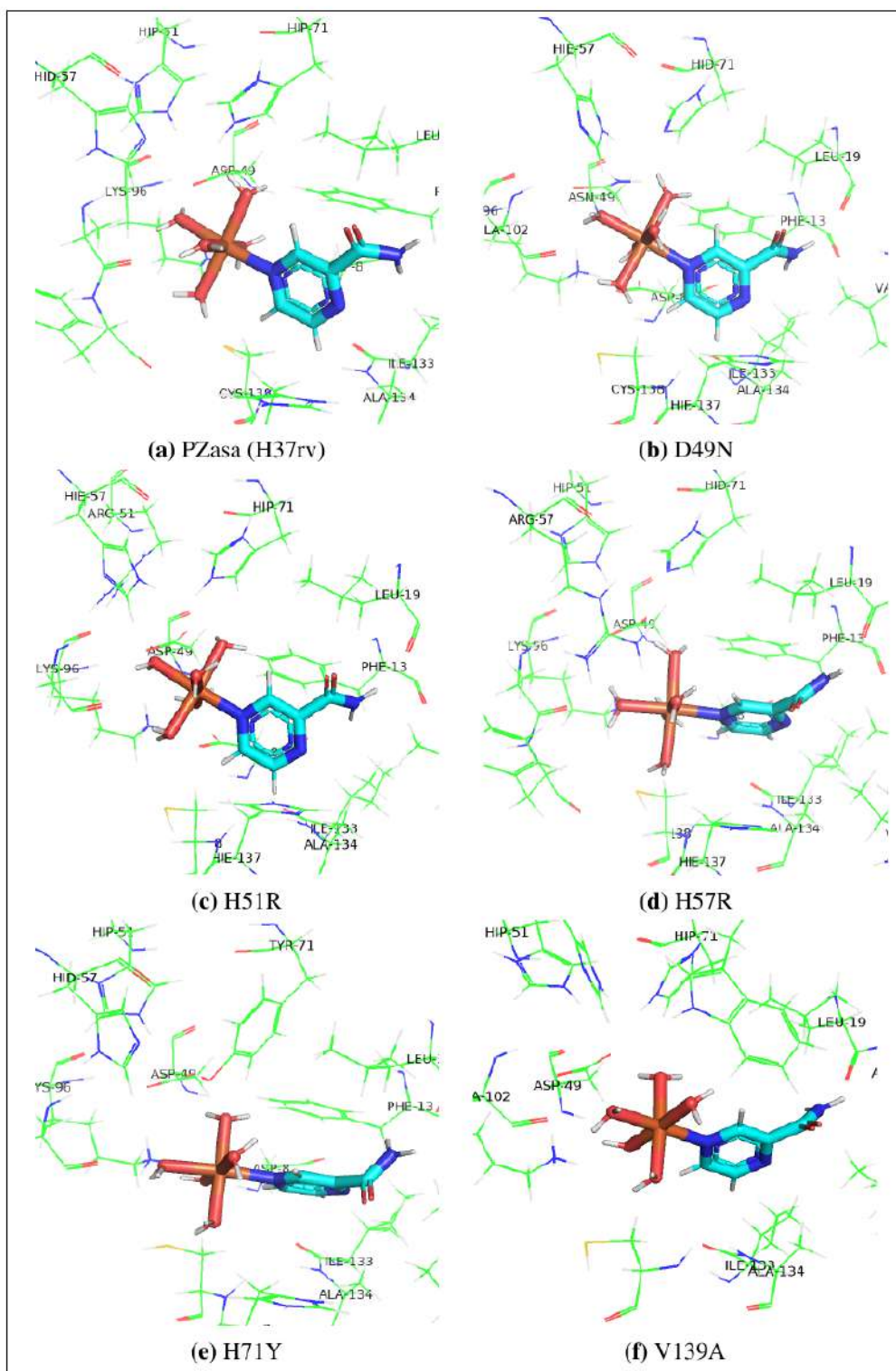


Figura 4.3.4.1 Poses del $[Fe(PZA)(H_2O)_5]^{2+}$ (E1WT) en el docking frente a las apoenzimas.

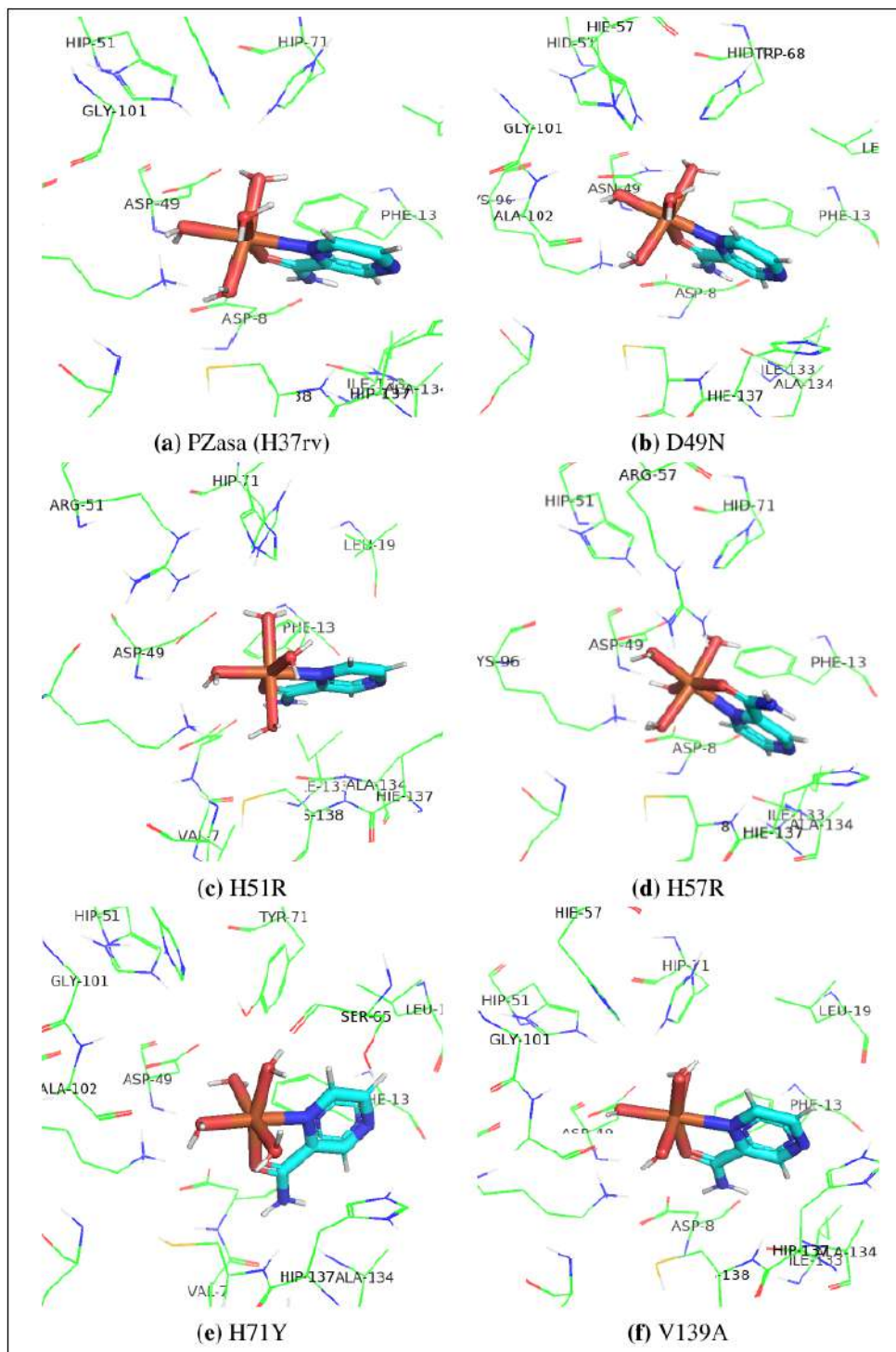


Figura 4.3.4.2 Poses del $[Fe(PZA)(H_2O)_4]^{2+}$ (E1WT) en el docking frente a las apoenzimas

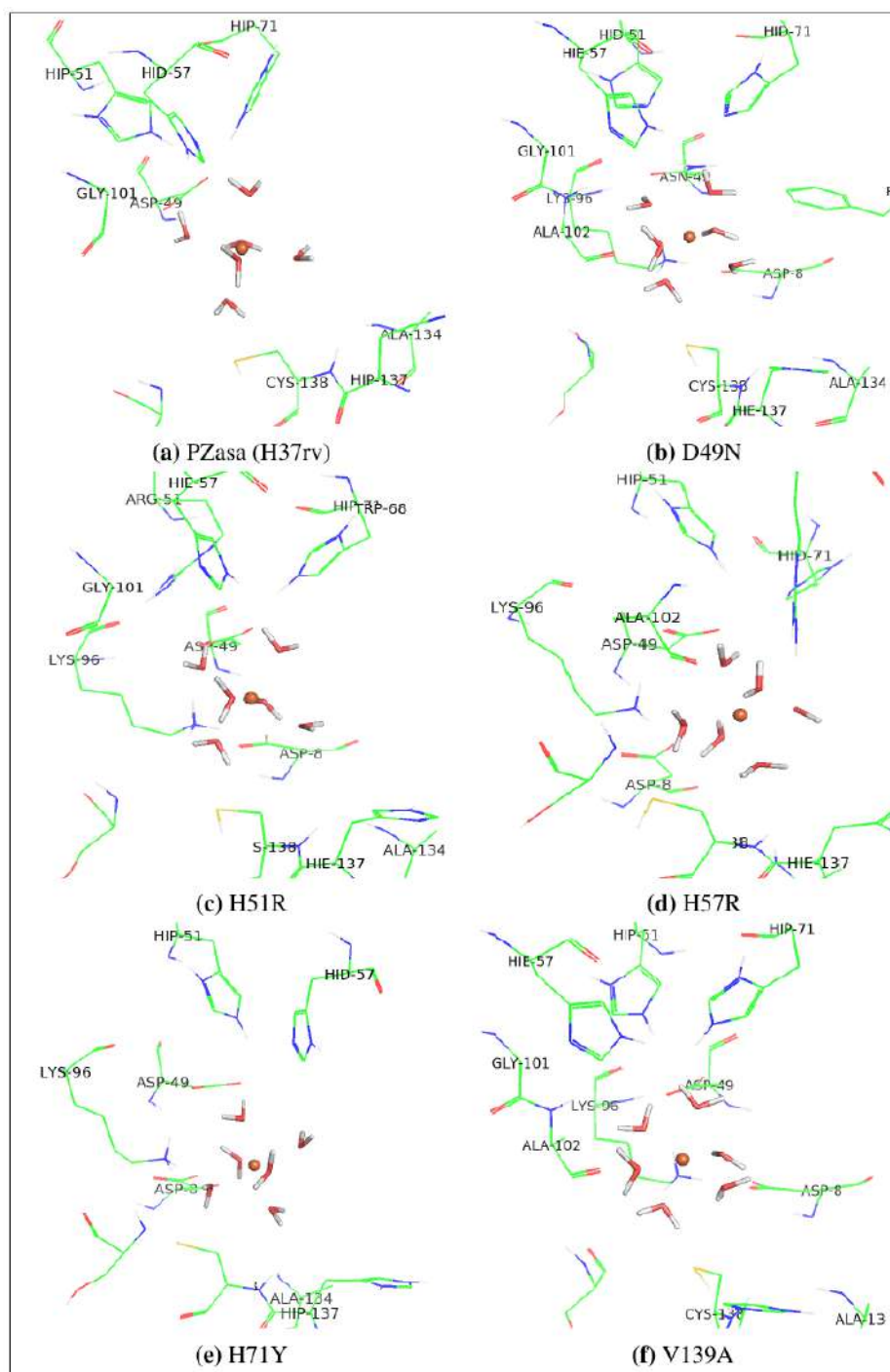


Figura 4.3.4.3 Poses del $[Fe(H_2O)_6]^{2+}$ (FEWT) en el docking frente a las apoenzimas

4.3.5. Poses de los complejos E1PL y E2PL frente a las enzimas receptoras

En estos complejos notamos la fuerte interacción electrostática entre el metal y residuos con carga negativas (figuras 4.13 y 4.14), y el software determina bajas energía de unión. En la apo-PZasa H37R, el metal del E1PL interactúa directamente con el D49 del MBS, y el grupo amida interactúa con los residuos del CS, por lo que sería una pose ideal para la captación del metal y la hidrólisis. En H51R, H57R, H71Y y V139A se observa la misma tendencia, Autodock4 encuentra que la menor energía se da también en la interacción con el MBS, pero ocurren también otras poses que no cuentan con dicha interacción (menos predominantes). Sin embargo, el E1PL no interactúa con el MBS en el D49N. El E2PL interactúa con el D8 de las enzimas de trabajo que no pertenece al MBS, además que el grupo amida queda fuera de CS. En el caso de las estructuras con Zn, las poses y energías de unión son similares a sus análogos de Fe.

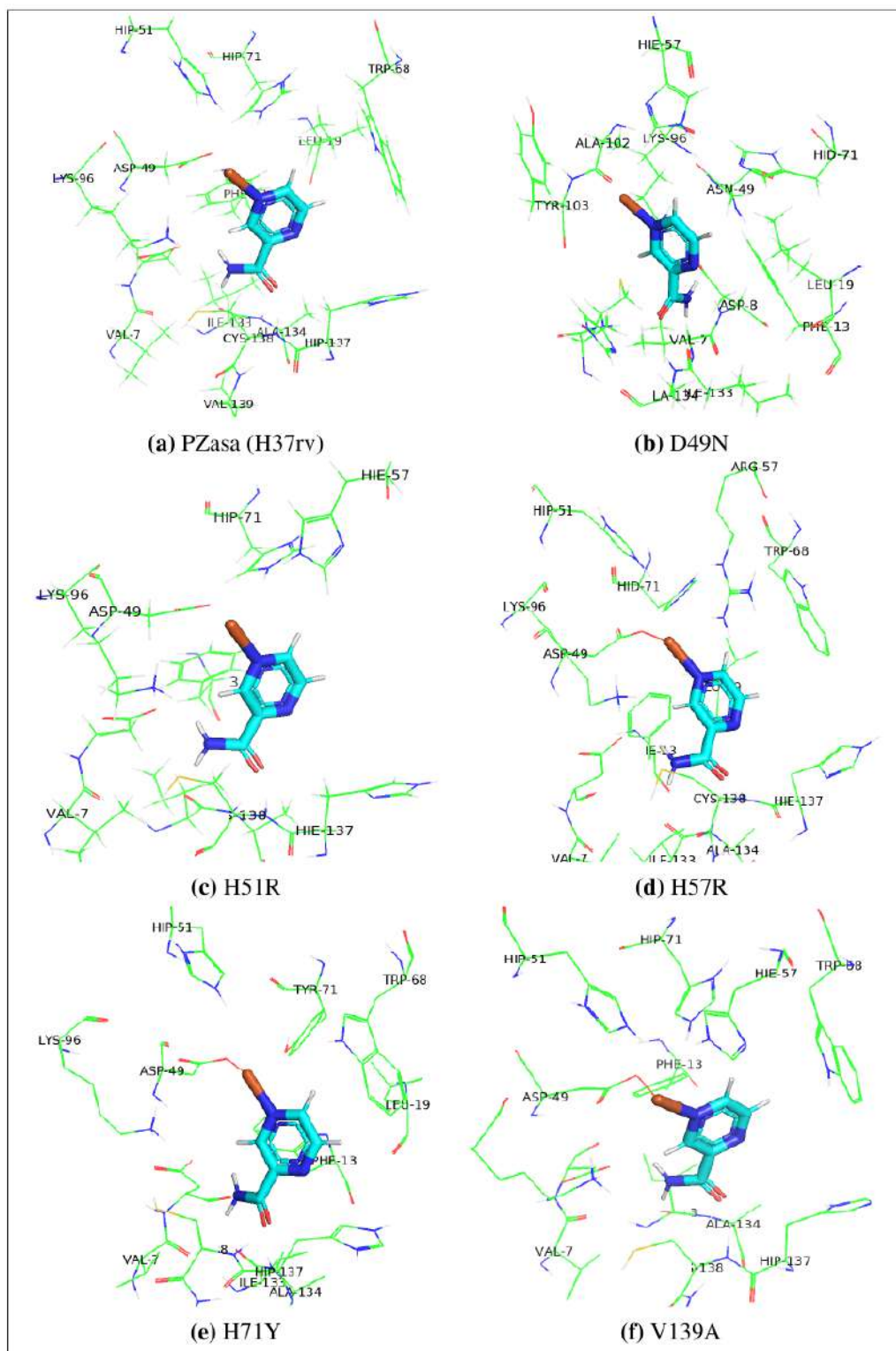


Figura 4.3.5.1 Poses del $[\text{Fe}(\text{PZA})]^{2+}$ monodentado (E1PL) en el docking frente a las apoenzimas

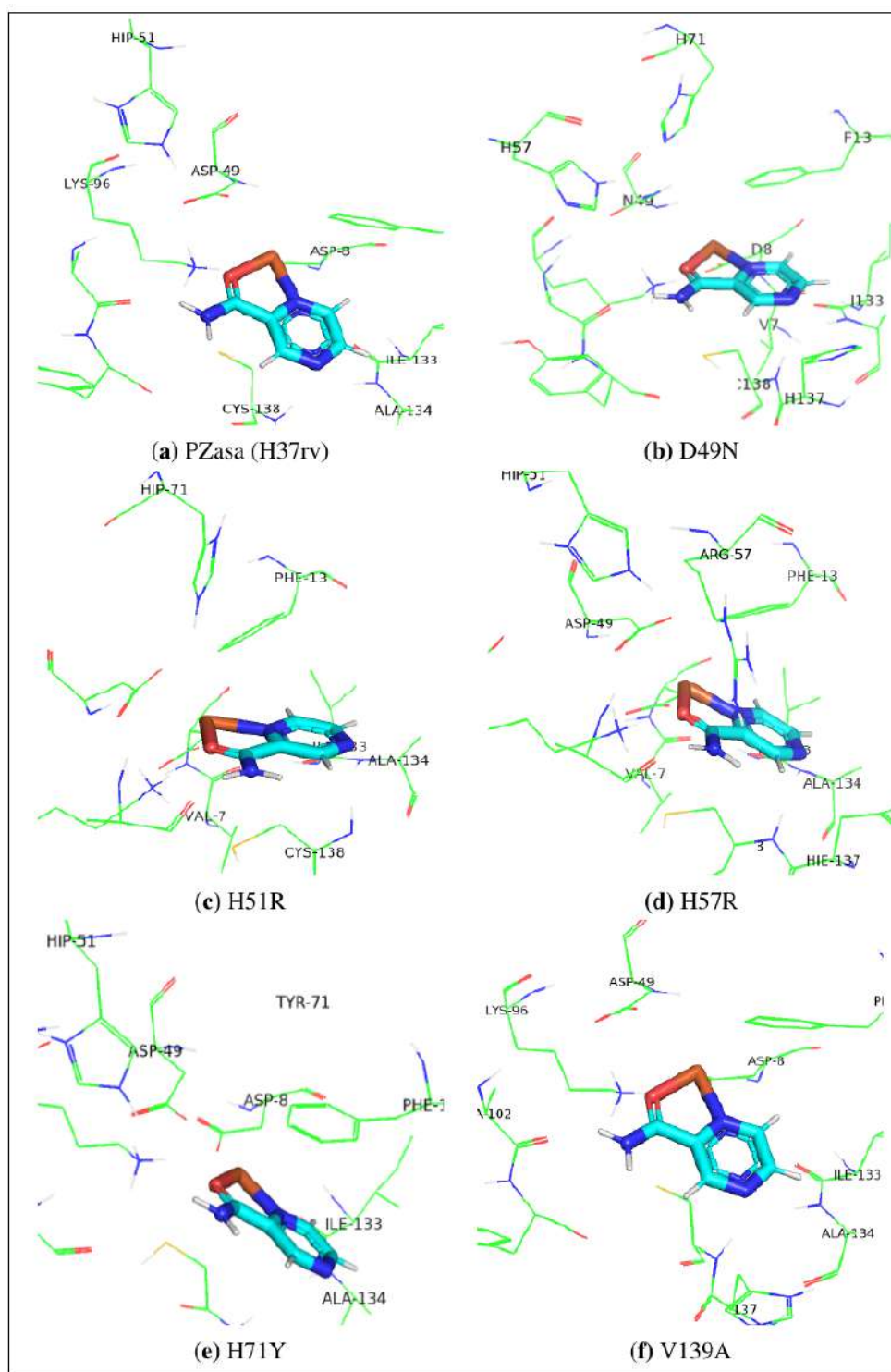


Figura 4.3.5.2 Poses del $[Fe(PZA)]^{2+}$ quelato (E2PL) en el docking frente a las apoenzimas

4.3.6. Poses de los complejos frente a la Fe-PZasa

Se observa que el anillo de la PZA interactúa con un puente de hidrógeno con uno de los hidrógenos del agua de coordinación. Este acoplamiento representa la energía de unión más negativa (mayor estabilidad) en comparación con las otras estructuras. Los complejos E1WT, E2WT y FEWT se acoplan con el metal orientado hacia el CS debido a que el MBS ya está ocupado por un Fe. El complejo E1PL siente la repulsión del Fe del el MBS y se acopla interactuando con el LEU19 ajeno al MBS. El E2PL mantiene su pose en las apoenzimas mutantes e interactúa con el D8. En el caso del Zn-PZasa se observan poses similares a excepción con el acople con PZA, en ella se mantiene las interacciones como en la apo-PZasa (H37rv).

4.4. Dinámica molecular

4.4.1. Dinámica de apoenzimas en agua

Los valores de RMSD (root-mean-square deviation of atomic positions) son medidas que se usan para medir la variabilidad de una estructura a través del tiempo. En general, no se observaron grandes cambios estructurales en las apo-enzimas (figura 4.4). Esto debido a que el tiempo de corrida de 200 ns son usuales para el estudio de acoplamiento con fármacos, pero no son suficientes para observar cambios conformacionales de proteínas.

El RMSF (root mean square fluctuation) es una medida de la fluctuación de determinados residuos durante todo el tiempo de la dinámica. En la apo-PZasa se observa gran variabilidad en el conjunto de residuos conformados entre H51 y H71, las cuales conforman un loop (figura 4.5). Estas variaciones podrían corresponder a los movimientos que realiza los residuos coordinantes de la apo-PZasa para poder captar o recibir el cofactor metálico. Se observa también que en la Fe-PZasa dichas fluctuaciones disminuyen, lo cual es de esperarse debido a la presencia de enlaces de coordinación que estabiliza dichos movimientos. En el caso de la mutante D49N, esta variación del loop es reducida. Esto tiene gran implicancia ya que se reduce los movimientos del loop y podría no favorecer a la captación de metal. El mismo efecto se observa en las mutantes H57R, H71Y y V139A, sin embargo, la variabilidad crece en H51R.

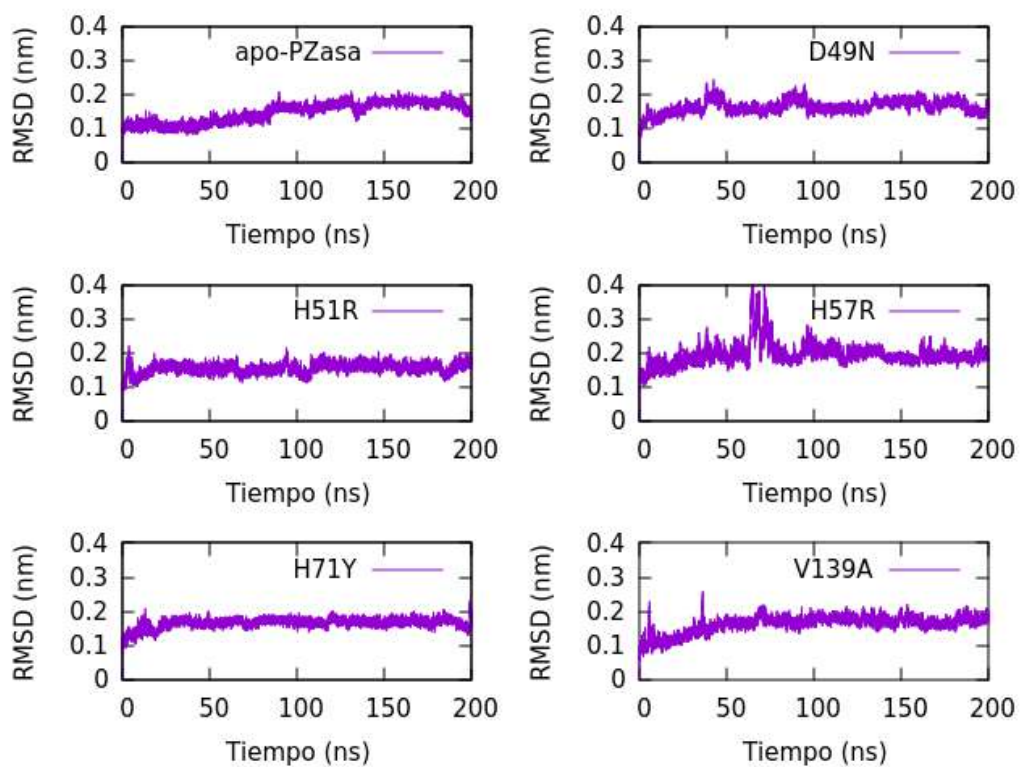


Figura 4.4.1.1 RMSD comparativo entre las enzimas de estudio. Se observa cierta estabilidad durante el transcurso de la dinámica.

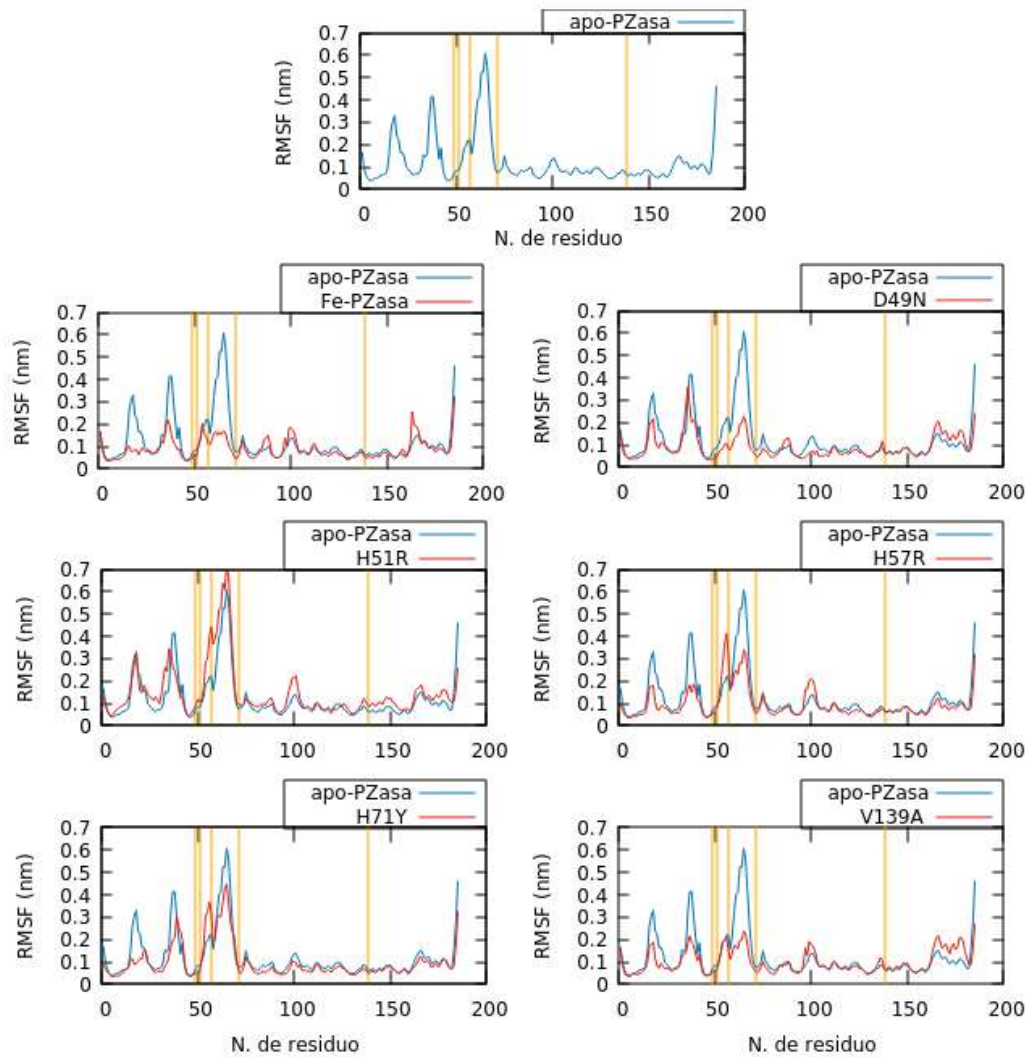


Figura 4.4.1.2 RMSF comparativo entre las enzimas de estudio. Se resalta con naranja los residuos 49, 51, 57, 71 y 138.

4.4.2. Dinámica de la PZA y complejos sobre las enzimas

Los acoplamiento obtenidos con PZA fueron llevados a dinámica molecular con 200 ns. Se observa que en la apo-PZasa, la PZA es retenida hasta los 100 ns aprox. Sin embargo, en las mutantes se aprecia que la PZA abandona en menos tiempo salvo en la H71Y, en donde se retiene en casi toda la dinámica (figura 4.6). Podemos

ver que las mutaciones pueden afectar al tiempo de retención del sustrato a pesar de obtener casi las mismas energías de unión comparando con la apo-PZasa. En el caso del acoplamiento PZA con Fe-PZasa se observa gran estabilidad del acople hasta los 60 ns aprox. donde se desplaza hacia otros residuos.

En las dinámicas de la E1PL sobre las H51R, H57R, H71Y y V139A, la interacción entre el Fe del complejo y el residuo D49 se mantiene durante toda la dinámica. El grupo amida mantiene su orientación hacia el CS, pero luego se desorienta para finalmente mantenerse en dirección externa al CS. Sin embargo, en D49N, el complejo se libera los 20 ns aprox. En el E2PL, la interacción del Fe del complejo con el D8 del receptor se mantiene, por lo que no favorecería a la hidrólisis. En las dinámicas con receptor Fe-PZasa, se observa que el complejo E1PL se libera a los 10 ns aprox. y el E2PL se libera a los 40 ns aprox. para luego alojarse en otros residuos. Esto puede deberse a la repulsión entre dos centros metálicos.

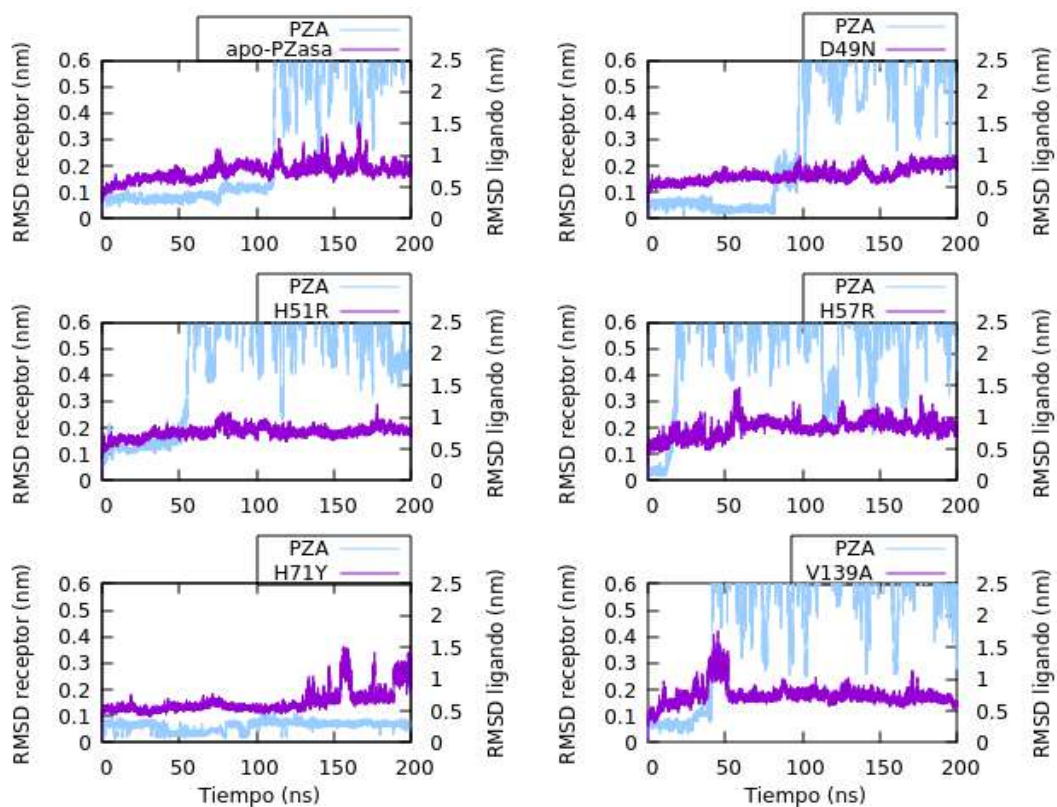


Figura 4.4.2.1 RMSD de las enzimas (violeta) y RMSD del ligando PZA (celeste) en los acoplamientos enzima-PZA. Ocurren ciertas variaciones en las enzimas. El sustrato PZA parece estable en los primeros tiempos de dinámica, pero después se desestabiliza y es liberada fuera de la enzima (incremento de RMSD).

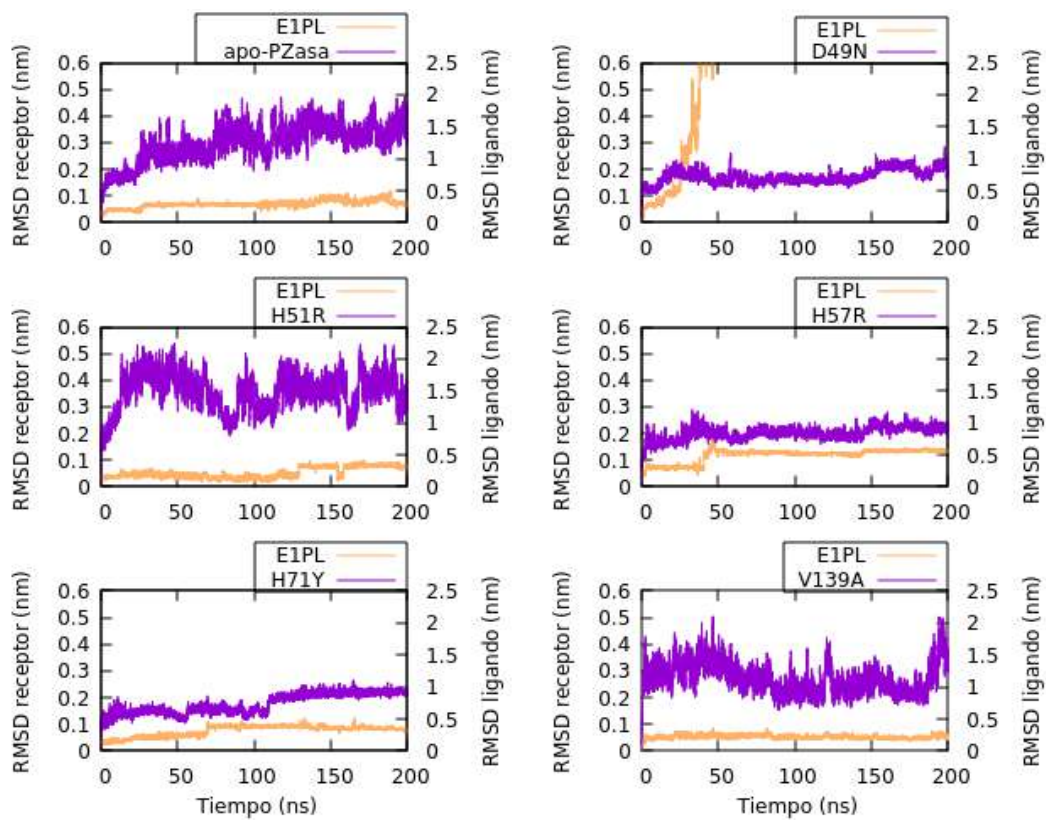


Figura 4.4.2.2 RMSD de las enzimas (violeta) y RMSD del ligando E1PL (naranja) en los acoplamientos E1PL-enzima. En D49N se libera el complejo.

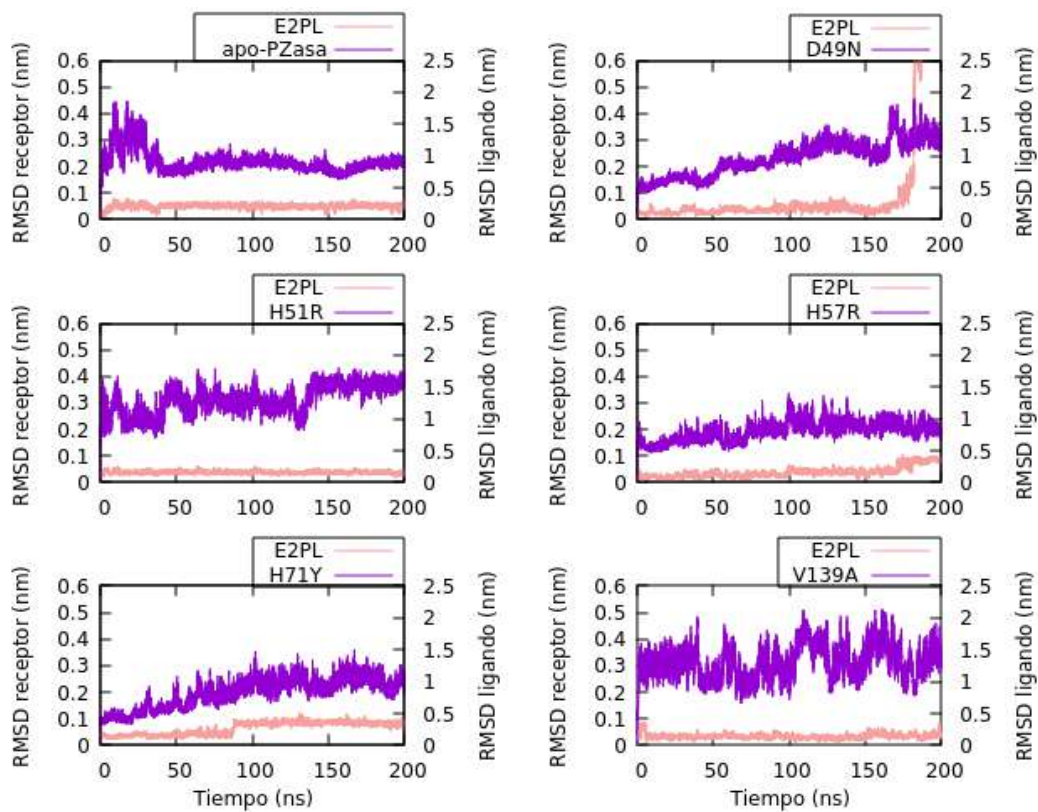


Figura 4.4.2.3 RMSD de las enzimas (violeta) y RMSD del ligando E2PL (rosa) en los acoplamientos E2PL-enzima. El complejo interactúa con D8 y se mantiene estable

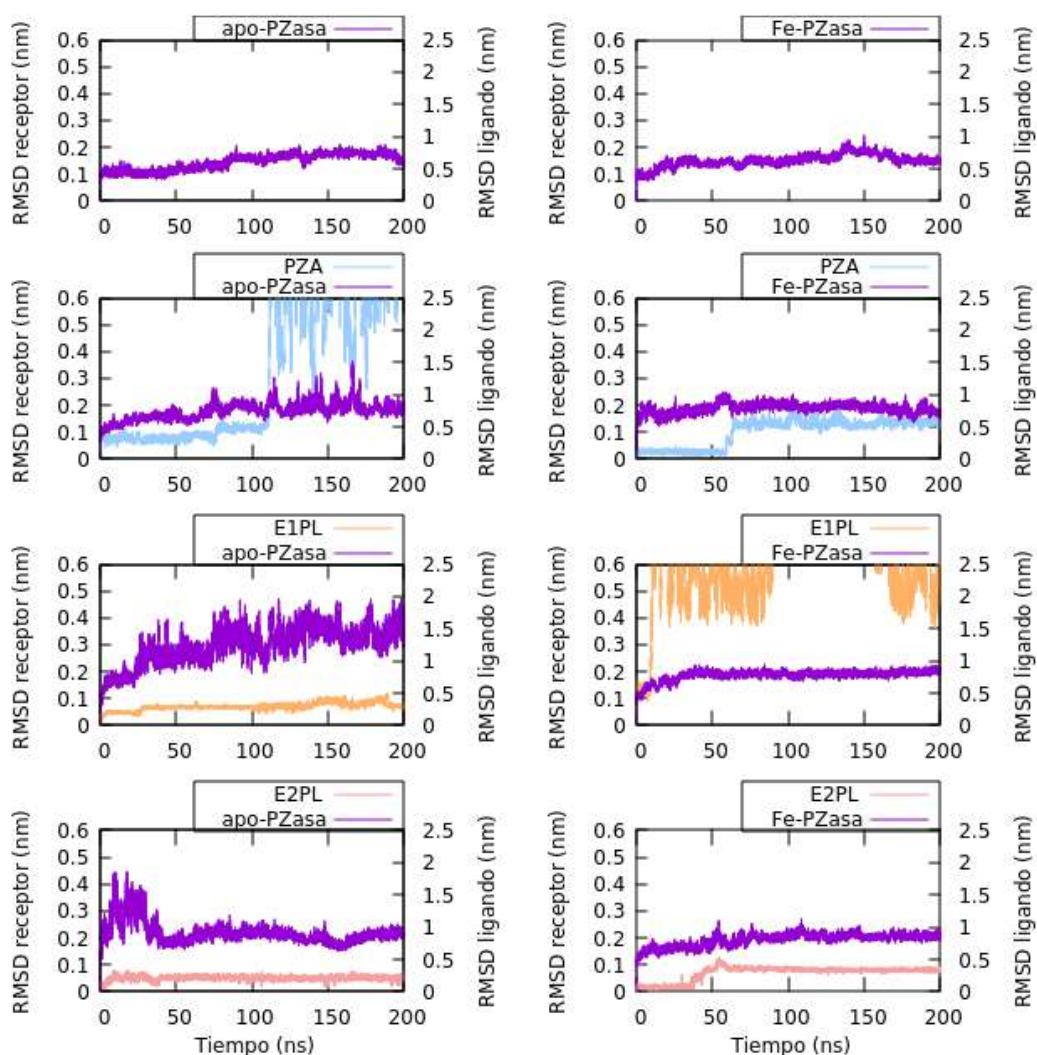


Figura 4.4.2.4 RMSD de la apo-PZasa y Fe-PZasa H37Rv (violeta) en los acoplamientos con los compuestos de estudio

4.5. Termoquímica de los complejos

Los complejos E1WT y E2WT muestran energías de enlace más negativas que el FEWT, lo que muestra la posibilidad de la formación del complejo. Además, la forma quelato sería la geometría más favorable. Esto ocurre de manera similar con los complejos de Zn. En las energías de complejación en medio acuoso, la

formación del complejo quelato es preferida por sobre el monodentado en el Fe y Zn. Existe cierta mayor estabilidad (resistencia a liberar la PZA) en los complejos de Fe que en los de Zn.

Tabla 4.5.1 Energías de enlace metálico de los complejos en fase gas, obtenidas por DFT (298.15 K, 1 atm)

Compuesto	Fórmula	Energía de enlace (kcal/mol)
FEWT	$[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$	-381.03
E1WT	$[\text{Fe}(\text{PZA})(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$	-386.90
E2WT	$[\text{Fe}(\text{PZA})(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$	-394.10
E1PL	$[\text{Fe}(\text{PZA})]^{2+}$ monodentado	-156.09
E2PL	$[\text{Fe}(\text{PZA})]^{2+}$ quelato	-215.57
ZNWT	$[\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$	-389.33
Z1WT	$[\text{Zn}(\text{PZA})(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$	-394.38
Z2WT	$[\text{Zn}(\text{PZA})(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$	-400.11
Z1PL	$[\text{Zn}(\text{PZA})]^{2+}$ monodentado	-153.65
Z2PL	$[\text{Zn}(\text{PZA})]^{2+}$ quelato	-215.41

Tabla 4.5.2 Energía libre de complejación en medio acuoso, obtenidas por DFT (298.15 K, 1 atm)

Reacción	Entalpía ΔH (kcal/mol)	Energía libre ΔG (kcal/mol)
$[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+} + \text{PZA} \rightarrow [\text{Fe}(\text{PZA})(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+} + \text{H}_2\text{O}$	5.52	7.04
$[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+} + \text{PZA} \rightarrow [\text{Fe}(\text{PZA})(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+} + 2\text{H}_2\text{O}$	7.73	1.12
$[\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+} + \text{PZA} \rightarrow [\text{Zn}(\text{PZA})(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+} + \text{H}_2\text{O}$	5.49	8.29
$[\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+} + \text{PZA} \rightarrow [\text{Zn}(\text{PZA})(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+} + 2\text{H}_2\text{O}$	8.13	2.00

5. DISCUSIONES

5.1. PZA, complejos metálicos con PZA, y enzimas

Las cargas RESP para la PZA muestra una mayor polarización en comparación con las cargas Gasteiger, debido a la naturaleza matemática de su cálculo. Hay casos en donde dicha polarización sobreestima la distribución de las cargas, además, AMBER ajusta para que los átomos del mismo tipo en una molécula tengan cargas iguales en concordancia con su forcefield. Por ello actualmente se está trabajando en mejoras para el cálculo de estas cargas para usarlas en dinámica molecular. En los complejos monodentados se observa una mayor distribución de la carga +2 del metal que en los quelatos. Esto posiblemente a que el par libre de electrones del N4 del anillo están mejor direccionados al metal y favorece a la distribución de la carga positiva. En el quelato existe un anillo de 5 miembros que hace que el N1 no esté correctamente direccionado al metal.

En la termoquímica, las energías de enlace metálico (fase gas) muestran que los complejos con PZA y aguas coordinadas son ligeramente más estables que los acuocomplejos, por lo que favorece a la estabilidad de E1WT y E2WT por sobre el FEWT. Observamos también que los quelatos poseen mayor energía de enlace (más estables) que los monodentados, debido a que el anillo de cinco miembros otorga estabilidad estructural y entrópica. La energía libre de complejación del E2WT es menos positiva que el de E1WT, esto muestra la tendencia de la PZA en formar complejos quelatos en medio acuoso, y la labilidad de los complejos monodentados. Sin embargo, dicha formación requiere el giro del grupo amida para poder

coordinar, por lo que la formación de complejos monodentados sería posible bajo condiciones más favorables.

Las estructuras de las apoenzimas de trabajo obtenidas por Modeller presentan MBS con histidinas cuya protonación depende del pH del medio, además que se encuentran en constante equilibrio dinámico. Al trabajar con pH=7, algunas de ellas presentan histidinas con protones en dirección al sitio metálico (estado épsilon), lo que puede desfavorecer la interacción con el metal en el docking. Al elegir las mutantes D49N, H51R, H57R, H71Y y V139A, nuestros resultados se limitan a dichas estructuras y no son extrapolables a otros tipos de mutaciones.

En los MBS de las metaloenzimas Fe-PZasa y Zn-PZasa, las cargas +2 se distribuyen hacia los residuos de coordinación. Las aguas de coordinación son moléculas en gran movimiento y son desplazadas constantemente por otras aguas del solvente. Nuestro modelo contempla aguas de coordinación estáticas cuyas posiciones podría afectar a las interacciones con la PZA y su pose final.

5.2. PZA y su comportamiento con las enzimas

Los resultados del docking muestran que la PZA se acopla a la apo-PZasa con los residuos del sitio catalítico 138, 133, 134 y 8 mediante puentes de hidrógeno. Esto ya ha sido reportado con Autodock4 no modificado. Por lo que nuestros resultados de docking con cargas RESP están en concordancia. En la Fe-PZasa, se observa que

la PZA se acopla a través de un enlace de puente de hidrógeno entre el anillo pirazina y una de las aguas de coordinación. Se muestra también la correcta orientación del grupo amida (-CONH₂) hacia el sitio catalítico. En el Zn-PZasa, la PZA se acerca al centro metálico (MBS), sin embargo, se encuentra orientado de manera similar a la apo-PZasa. Podemos observar que las posiciones de las aguas de coordinación es un factor importante que afecta a la pose de la PZA. Los protones de dichas aguas pueden formar puentes de hidrógeno que atrae al anillo pirazina del sustrato. Estas aguas de coordinación se encuentran en constante movimiento, además que son desplazadas fácilmente por otras aguas de solvente. Por lo que nuestras poses encontradas en las metaloenzimas corresponden solo para un momento determinado y la PZA acoplada al Zn-PZasa puede orientarse de manera similar al Fe-PZasa.

Se conoce que la apo-PZasa no posee actividad catalítica, por lo que no sería suficiente el acercamiento de la PZA hacia el sitio catalítico para desarrollar la reacción de hidrólisis. Se reportan estructuras donde moléculas análogas a PZA entran en coordinación con centros metálicos de metaloenzimas. En el caso de la metaloenzimas de trabajo, el anillo pirazina puede interactuar con el MBS, lo que sería un primer paso importante para la hidrólisis. Es posible que la PZA desplace una de las aguas de coordinación para enlazarse al metal a través del nitrógeno N4. La dinámica de la PZA con apo-PZasa muestra que el sustrato se mantiene estable en el sitio catalítico hasta los 75 ns aprox. para luego interactuar con otros residuos hasta que se libera a los 100 ns aprox. Además, se observa que crece las variaciones (RMSD) de la enzima durante la corrida y especialmente después de la liberación

de la PZA. En Fe-PZasa, las interacciones se mantienen hasta los 70 ns aprox. en donde comienza a interactuar con otros residuos y se mantiene así durante la dinámica. En dinámica no es posible modelar correctamente las aguas de coordinación ya que éstas se encuentran en constante intercambio con el solvente e implica rompimiento de enlaces, pero observamos que las interacciones con la PZA se mantienen casi en el mismo tiempo que la apo-PZasa.

En la D49N, la PZA se libera a 80 ns aprox. y la enzima presenta ligeros aumentos de RMSD. La mutante H51R libera la PZA a 50 ns aprox., la H57R lo hace a 12 ns aprox. y la V139A lo hace a 45 ns aprox. Además, durante la dinámica se aprecia también ligeros incrementos de RMSD. En el caso de H71Y, la PZA parece ser estable durante el tiempo de dinámica, sin embargo, deja de interactuar con el CS y lo hace con otros residuos lo que genera cambios de RMSD de la proteína. En general, se aprecia que las enzimas mutantes de trabajo pueden afectar la estabilidad de las interacciones entre PZA y el sitio catalítico. Existen trabajos que reportan cambios en los movimientos de las apoenzimas mutantes y en los eventos de desvinculación de sustrato en comparación con la apo-PZasa (H37Rv), lo que sería una de las maneras para desarrollar resistencia.

5.3. E1WT y E2WT, comportamiento con las enzimas

Estos complejos presentan energías de unión un poco más negativas que la PZA y sus poses en el docking podrían ser un primer contacto antes de perder sus aguas de coordinación. Sin embargo, no se distinguen las poses en apo-PZasa y mutantes,

por lo que dichos complejos tendrían las mismas posibilidades de acoplarse a sus receptores. La presencia de aguas de coordinación podría explicar la tendencia al acople por los puentes de hidrógeno, sin embargo, los FEWT y ZNWT son los que poseen los valores más altos de dock-score (menor afinidad) Esto muestra que un complejo metálico puede transportar un metal hacia el MBS mejor que el metal solo, tal como lo hacen algunos sideróforos y chaperonas.

No fue posible la parametrización de E2WT y E1WT debido a que presentan más de tres aguas de coordinación que distorsiona la estructura durante la dinámica. Este problema es reportado en varios trabajos y recomiendan trabajar con hasta dos aguas de coordinación.

5.4. E1PL y E2PL, comportamiento con las enzimas

Los complejos E2PL y Z2PL también presentan dock-scores menores a la PZA. Sin embargo, las poses muestran que el Fe se acopla a residuos ajenos al MBS, además, el grupo amida no está orientado hacia el residuo C138. Esto lo desfavorece como posible transportador del metal o favorecedor de la reacción de hidrólisis. No se ha observado diferencias sustanciales al comparar los complejos de Fe con los de Zn.

Las gráficas de los dock-scores muestran que, en general, los complejos E1PL y Z1PL son las que tienen una mejor interacción con las enzimas mutantes. Al analizar estas poses, se observa que en la apo-PZasa (H37rv) solo se presenta una pose predominante (figura 4.7) que consiste en la adecuada orientación del Fe hacia

los residuos del sitio de coordinación (MBS). Pero en las mutantes, aparecen otras poses menos predominantes donde el Fe no se orienta correctamente al MBS. Esto se corrobora con resultados experimentales que indican que estas mutaciones impiden la adecuada captación del metal hacia el MBS de las apoenzimas. Además, la mutación D49N es el que posee los dock-scores más altos, por lo que el residuo D49 cumpliría una función importante en la estabilidad del MBS y retención del metal. Según nuestros resultados, la mutación D49N es la que más desestabiliza al MBS impidiendo la correcta captación del metal. Sin embargo, Autodock4 no contempla energías por formación de enlaces de coordinación, por lo que solo estas conclusiones son en base a la interacción electrostática.

En las dinámicas, se observa estabilidad de los acoplamientos entre el complejo E1PL y las apoenzimas. Esto se debe a la fuerte interacción del Fe del compuesto E1PL y el residuo D49. Al inicio de la dinámica, el grupo amida se encuentra orientado hacia el residuo C138, sin embargo, durante la corrida, el grupo amida se desorienta y se desplaza fuera del C138. Estos cambios no muy observados en los RMSD pero sí durante la visualización de las trayectorias de la dinámica. Esto ocurre para la apo-PZasa, H51R, H57R, H71Y y V139A. En el caso de la D49N, debido al reemplazo de un residuo de carga neta -1 (aspartato) por un ligando asparragina no coordinante, se pierde la interacción electrostática con el Fe y por ende, se libera el E1PL a 25 ns aprox.

Estas dinámicas revelan la importancia del residuo 49, el cual como posee un grupo carboxilato, es capaz de atraer al metal y poder retornarlo al MBS. La mutación del

D49 tendría un mayor impacto en la capacidad de retención del metal. Notamos también que el grupo amida puede moverse durante la dinámica perdiendo la orientación hacia el C138. En el Fe-PZasa, E1PL siente repulsión debido a dos centros de Fe, lo que produce la liberación rápida del E1PL a los 10 ns aprox. E2PL se estabiliza tanto en la apo como en Fe-PZasa debido a que interactúa con el D8. Esto es desfavorable para la hidrólisis. Es más, al ser estable durante el tiempo, podría inhibir el sitio catalítico impidiendo el acercamiento de otra PZA del medio.

Estos resultados muestran a E1PL como principal compuesto con la posibilidad de acoplarse a las apo-PZasas con el Fe orientado al MBS y la amida al CS. Es decir, podría transportar el metal y sustrato para desencadenar la hidrólisis, según los mecanismos recientes. Sin embargo, la termodinámica muestra que es menos estable que el E2PL, y por su labilidad, el enlace metal-PZA puede romperse durante su trayectoria hacia las apo-PZasas.

Contribuciones

El presente trabajo contribuye en la evaluación y desarrollo de complejos metálicos como potenciales drogas frente a tuberculosis resistente a PZA. Se desarrolló un protocolo para realizar docking dinámica molecular en complejos metálicos. La PZA siente la atracción de las aguas de coordinación del MBS de la Fe-PZasa, podría ser una primera etapa de interacción. Las mutantes afectan las interacciones de la PZA en el sitio catalítico durante la dinámica, además de su tiempo de liberación.

El complejo $[\text{Fe}(\text{PZA})]^{2+}$ monodentado es el que posee una pose ideal para una posterior hidrólisis del sustrato en apo-PZasa y mutantes. Posiblemente se acerque a las enzimas en su forma hidratada $[\text{Fe}(\text{PZA})(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$, sin embargo, es menos estable y lábil que el $[\text{Fe}(\text{PZA})]^{2+}$ quelato. Con las técnicas usadas podemos decir que la mutante D49N tiene el mayor impacto ya que impide un acoplamiento adecuado del $[\text{Fe}(\text{PZA})]^{2+}$ monodentado.

6. CONCLUSIONES

- Se determinaron las energías de enlace metálico de cada complejo y se identificó que los complejos quelato son más estables que los monodentados, y que los complejos de zinc son ligeramente más estables que las de hierro.
- Se determinó que los complejos E1WT y E2WT presentan energías de unión un poco menor a la PZA en relación con el docking molecular. Además, los E1PL y Z1PL son los que presentan menor energía de enlace por la interacción electrostática del metal hacia residuos negativos de las enzimas receptoras.
- Se determinó en el docking que E1PL presenta una pose favorable para la hidrólisis en base a los nuevos mecanismos de reacción propuestos para nicotinamidasas. Sin embargo, las poses son menos predominantes en las enzimas mutantes, en especial en D49N, E2PL no se acopla en el MBS.
- Se determinó en el docking con Fe-PZasa que la PZA interactúa con las aguas de coordinación del MBS a través de un puente de hidrógeno, lo que apoyaría con las propuestas de mecanismos a través de un enlace de coordinación como primer paso de la hidrólisis.
- Se determinó en las dinámicas que las mutaciones desestabilizan las interacciones de la PZA en el sitio catalítico en comparación con la apo-PZasa (H37Rv). Además, el E1PL puede cumplir la labor de transporte de metal al acoplar al Fe hacia el sitio de coordinación, excepto en el D49N. El E2PL es el que no podría favorecer ni al transporte del metal ni a la hidrólisis.

- Las energías libre de formación de E1WT y E2WT revelaron que los complejos quelatos son más estables que los monodentados. Además, las energías libres de formación muestran que hay preferencia en la formación del quelato en solución acuosa. Esto sería desfavorable para el transporte del metal y sustrato hacia el MBS y CS, ya que se necesita que la PZA coordine de modo monodentado.

7. RECOMENDACIONES

La estructura cristalizada de la PZasa (pdb:3pl1) muestra una geometría octaédrica distorsionada para el Fe, pero existen estructuras de hidrolasas donde el centro de Zn está en estructura tetraédrica y con mecanismos catalíticos propuesto bajo dicho modelo. Se pueden modelar y estudiar estructuras tetraédricas, además de la termodinámica de enlace entre la PZA con el metal ya en el MBS.

Nuestro docking y dinámica molecular se realiza considerando que todos los enlaces se mantienen durante el tiempo de trabajo. Para profundizar en el estudio del mecanismo de hidrólisis se podría usar técnicas más avanzadas como QM/MM que une la parte cuántica para el centro activo y mecánica molecular para el resto de la proteína.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fitzgerald DW, Sterling TR, Haas DW. 251 - Mycobacterium tuberculosis. In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, editors. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 8th ed. Philadelphia: Elsevier; 2015. p. 2787. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978145574801300254>.
2. Alarcón V, Alarcón E, Figueroa C, Mendoza Ticona A. Tuberculosis en el Perú: situación epidemiológica, avances y desafíos para su control. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. 2017;34(2):299–310. Available from: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S172646342017000200021&lng=en&nrm=iso&tlng=en.
3. WHO. Global tuberculosis report 2021. World Health Organization; 2021. Available from: https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/.
4. Lamont EA, Dillon NA, Baughn AD. The Bewildering Antitubercular Action of Pyrazinamide. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2020;84(2). Available from: <https://mmbbr.asm.org/content/84/2/e00070-19>.
5. Global Alliance for TB Drug Development. Pyrazinamide. Tuberculosis. 2008;88(2):141 – 144. Available from:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1472979208700210>.

6. Wallace Jr RJ, Philley JV, Griffith DE. 38 - Antimycobacterial Agents. In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, editors. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 8th ed. Philadelphia: Elsevier; 2015. p. 463 – 478. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781455748013000382>.
7. Njire M, Tan Y, Mugweru J, Wang C, Guo J, Yew W, et al. Pyrazinamide resistance in Mycobacterium tuberculosis: Review and update. *Advances in Medical Sciences*. 2016;61(1):63 – 71. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1896112615000565>.
8. Pai MA Madhukarand Behr, Dowdy D, Dheda K, Divangahi M, Boehme CC, Ginsberg A, et al. Tuberculosis. *Nature Reviews Disease Primers*. 2016 Oct;2. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2016.76>.
9. Primeras causas de mortalidad en el Perú;. Accedido: 2022-07-27. <https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiOWIxYzdjZTMtMGJhMy00NzNhLWI4ZGEtNjEwOTIiNmI0OTEyIiwidCI6IjE3OWJkZGE4LWQ5NjQtNDNmZi1hZDNiLTUyMDE4NmEyZmEyOCIsImMiOiR9>.

10. Tuberculosis en las Américas. Informe regional 2020. Pan American Health Organization; 2021. Available from:
<https://iris.paho.org/handle/10665.2/55047>.
11. TB profile;. Available from: https://worldhealthorg.shinyapps.io/tb_profiles/?_inputs_&entity_type=%22country%22&lan=%22ES%22&iso2=%22PE%22.
12. MINSA. Análisis de la situación epidemiológica de la Tuberculosis en el Perú, 2015. Ministerio de Salud del Perú, Dirección General de Epidemiología; 2016. Available from:
www.dge.gob.pe/portal/docs/tools/tbc/asistbc.pdf.
13. Zimic M, Sheen P, Quiliano M, Gutierrez A, Gilman RH. Peruvian and globally reported amino acid substitutions on the Mycobacterium tuberculosis pyrazinamidase suggest a conserved pattern of mutations associated to pyrazinamide resistance. *Infection, Genetics and Evolution*. 2010;10(2):346–349. Available from:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134809002688>.
14. Laborde J, Deraeve C, de Mesquita Vieira FG, Sournia-Saquet A, Rechinat L, Villela AD, et al. Synthesis and mechanistic investigation of iron(II) complexes of isoniazid and derivatives as a redox-

mediated activation strategy for anti-tuberculosis therapy. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2018;179:71 –81. Available from:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0162013417305196>.

15. Felder E, Pitre D. Pyrazinamide. In: Florey K, editor. *Analytical Profiles of Drug Substances*. vol. 12 of *Analytical Profiles of Drug Substances*. Academic Press; 1983. p. 433 – 462. Available from:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0099542808601732>.

16. Miotto P, Cirillo DM, Migliori GB. Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Molecular Mechanisms Challenging Fluoroquinolones and Pyrazinamide Effectiveness. *Chest*. 2015;147(4):1135 – 1143. Available from:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012369215389649>.

17. Gopal P, Grüber G, Dartois V, Dick T. Pharmacological and Molecular Mechanisms Behind the Sterilizing Activity of Pyrazinamide. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2019;40(12):930–940. Available from:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165614719302317>

18. Du X, Wang W, Kim R, Yakota H, Nguyen H, Kim SH. Crystal Structure and Mechanism of Catalysis of a Pyrazinamidase from *Pyrococcus horikoshii*. *Biochemistry*. 2001;40(47):14166–14172. PMID: 11714269.
19. Petrella S, Gelus-Ziental N, Maudry A, Laurans C, Boudjelloul R, Sougakoff W. Crystal Structure of the Pyrazinamidase of *Mycobacterium tuberculosis*: Insights into Natural and Acquired Resistance to Pyrazinamide. *Plos One*. 2011 01;6(1):1–8. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015785>.
20. Sheen P, Ferrer P, Gilman RH, Christiansen G, Moreno-Román P, Gutiérrez AH, et al. Role of Metal Ions on the Activity of *Mycobacterium tuberculosis* Pyrazinamidase. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2012;87(1):153–161. Available from: <http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.2012.10-0565>.
21. Zhang H, Deng JY, Bi LJ, Zhou YF, Zhang ZP, Zhang CG, et al. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* nicotinamidase/pyrazinamidase. *The FEBS Journal*. 2008;275(4):753–762. Available from: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.17424658.2007.06241.x>.

22. Fyfe P, Rao V, Zemla A, Cameron S, Hunter W. Specificity and Mechanism of *Acinetobacter baumannii* Nicotinamidase: Implications for Activation of the Front-Line Tuberculosis Drug Pyrazinamide. *Angewandte Chemie International Edition*. 2009;48(48):9176–9179. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/anie.200903407>
23. Smith BC, Anderson MA, Hoadley KA, Keck JL, Cleland WW, Denu JM. Structural and Kinetic Isotope Effect Studies of Nicotinamidase (Pnc1) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*. 2012;51(1):243–256. PMID: 22229411.
24. Ion BF, Kazim E, Gauld JW. A Multi-Scale Computational Study on the Mechanism of *Streptococcus pneumoniae* Nicotinamidase (SpNic). *Molecules*. 2014;19(10):15735–15753. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/19/10/15735>.
25. Juhás M, Zitko J. Molecular Interactions of Pyrazine-Based Compounds to Proteins. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2020;63(17):8901–8916. PMID: 32275822.
26. Sheng X, Liu Y. A QM/MM study of the catalytic mechanism of nicotinamidase. *Organic Biomolecular Chemistry*. 2014;12:1265–1277. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C3OB42182A>.
27. Sheik Amamuddy O, Musyoka TM, Boateng RA, Zabo S, Özlem Tastan Bishop. Determining the unbinding events and conserved motions associated with the pyrazinamide release due to resistance

mutations of *Mycobacterium tuberculosis* pyrazinamidase.

Computational and Structural Biotechnology Journal. 2020;18:1103–

1120. Available from:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2001037020302725>

28. Nangraj AS, Khan A, Umbreen S, Sahar S, Arshad M, Younas S, et al. Insights Into Mutations Induced Conformational Changes and Rearrangement of Fe²⁺ Ion in pncA Gene of *Mycobacterium tuberculosis* to Decipher the Mechanism of Resistance to Pyrazinamide. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2021;8. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2021.633365>.
29. Khan T, Khan A, Ali SS, Ali S, Wei DQ. A computational perspective on the dynamic behaviour of recurrent drug resistance mutations in the pncA gene from *Mycobacterium tuberculosis*. *RSC Adv*. 2021;11:2476–2486. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/D0RA09326B>.
30. Sheen P, Lozano K, Gilman RH, Valencia HJ, Loli S, Fuentes P, et al. pncA gene expression and prediction factors on pyrazinamide resistance in *Myco- bacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*. 2013;93(5):515 – 522. Available from:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S147297921300084X>

- .
31. Tiberi S, du Plessis N, Walzl G, Vjecha MJ, Rao M, Ntoumi F, et al. Tuberculosis: progress and advances in development of new drugs, treatment regimens, and host-directed therapies. *The Lancet Infectious Diseases*. 2018- 07-01;18(7):e183–e198. Available from: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30110-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30110-5).

 32. Viganor L, Skerry C, McCann M, Devereux M. Tuberculosis: An Inorganic Medicinal Chemistry Perspective. *Current Medicinal Chemistry*. 2015;22(18):2199–2224. Available from: <http://www.eurekaselect.com/node/130184/article>.

 33. Shirvan S, Haydari S. Dichloridobis(pyrazine-2-carboxamide- κ N4)zinc(II). *Acta Crystallographica Section E*. 2012-05;68(5):m546. Available from: <https://doi.org/10.1107/S1600536812013888>.

 34. Pannu APS, Lee S, Lee Y. Diaquabis(pyrazine-2-carboxamide- κ 2N1,O)cobalt(II) dinitrate. *Acta Crystallographica Section E*. 2012

Apr;68(4):m512–m513. Available from: <https://doi.org/10.1107/S1600536812012573>.

35. Shirvan S, Haydari S. catena-Poly[[[aqua(pyrazine-2-carboxamide- κ 2N1,O)zinc]- μ -pyrazine-2-carboxamide- κ 3N1,O:N4] dinitrate]. *Acta Crystallographica Section E*. 2012-05;68(5):m627–m628. Available from: <https://doi.org/10.1107/S1600536812016017>.
36. Sciortino G, Sanna D, Ugone V, Lledós A, Maréchal JD, Garribba E. Decoding Surface Interaction of VIVO Metallodrug Candidates with Lysozyme. *Inorganic Chemistry*. 2018;57(8):4456–4469. PMID: 29613772. Available from: <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b00134>.
37. Chowdhury T, Bera K, Samanta D, Dolui S, Maity S, Maiti NC, et al. Unveiling the binding interaction of zinc (II) complexes of homologous Schiff-base ligands on the surface of BSA protein: A combined experimental and theoretical approach. *Applied Organometallic Chemistry*. 2020;34(4):e5556. E5556 AOC-19-1541.R1. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/aoc.5556>.

38. Sciortino G, Rodríguez-Guerra Pedregal J, Lledós A, Garribba E, Maréchal JD. Prediction of the interaction of metallic moieties with proteins: An update for protein-ligand docking techniques. *Journal of Computational Chemistry*. 2018;39(1):42–51. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcc.25080>.
39. Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, et al.. *Gaussian~16*; 2016. Gaussian Inc. Wallingford CT.
40. Bayly CI, Cieplak P, Cornell W, Kollman PA. A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model. *The Journal of Physical Chemistry*. 1993;97(40):10269– 10280. Available from: <https://doi.org/10.1021/j100142a004>.
41. Janec̣ek M, Kührová P, Mlýnský V, Otyepka M, Šponer J, Banáš P. W-RESP: Well-Restrained Electrostatic Potential-Derived Charges. Revisiting the Charge Derivation Model. *Journal of Chemical*

Theory and Computation. 2021;17(6):3495–3509. PMID: 33999623.

Available from: <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.0c00976>.

42. Li P, Merz KM. MCPB.py: A Python Based Metal Center Parameter Builder. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2016;56(4):599–604. PMID: 26913476. Available from: <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.5b006>

43. Wang JC, Lin JH, Chen CM, Perryman AL, Olson AJ. Robust Scoring Functions for Protein–Ligand Interactions with Quantum Chemical Charge Models. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2011;51(10):2528–2537. PMID: 21932857.

44. Liu R Jie; Wang. Classification of Current Scoring Functions. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2015 03;55. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ci500731a>.

45. Meng XY, Zhang HX, Mezei M, Cui M. Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. *Current Computer-Aided Drug Design*. 2011;7(2):146–157. Available from: <http://www.eurekaselect.com/node/74117/article>.

46. Pinzi L, Rastelli G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(18). Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/18/4331>.
47. de Ruyck J, Brysbaert G, Blossey R, Lensink M. Molecular docking as a popular tool in drug design, an in silico travel. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry*. 2016 06;Volume 9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27390530>.
48. Höltje HD. *Molecular Modeling: Basic Principles and Applications*. 3rd ed. Wiley-VCH Verlag GmbH; 2008. Available from: <https://www.wiley.com/en-us/Molecular+Modeling%3A+Basic+Principles+and+Applications-p-9783527614769>.
49. Velázquez M, Drosos J, Gueto C, Márquez J, VivasReyes R. Método acoplado Autodock–PM6 para seleccionar la mejor pose en estudios de acoplamiento molecular. *Revista Colombiana de Química*. 2013 04;42:101 – 124. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S012028042013000100007&nrm=iso.
50. Saldívar González F, Prieto Martínez FD, Medina-Franco JL. Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional. *Educación Química*. 2016 9. Available from: <http://revistas.unam.mx/index.php/req/article/view/63892>.

51. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of computational chemistry*. 2009 Dec;30(16):2785–2791. 19399780[pmid]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19399780>.
52. Case DA, Aktulga HM, Belfon K, Ben-Shalom IY, Brozell SR, Cerutti DS, et al.. *Amber 2020*. San Francisco;. Available from: <https://ambermd.org/>.
53. Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, et al. GRO- MACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*. 2015;1-2:19–25. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352711015000059>.
54. Kabanda MM, Tran VT, Tran QT, Ebenso EE. A computational study of pyrazinamide: Tautomerism, acid–base properties, micro-solvation effects and acid hydrolysis mechanism. *Computational and Theoretical Chemistry*. 2014;1046:30 – 41. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2210271X14003260>.

55. Cherukuvada S, Thakuria R, Nangia A. Pyrazinamide Polymorphs: Relative Stability and Vibrational Spectroscopy. *Crystal Growth & Design*. 2010;10(9):3931–3941. Available from: <https://doi.org/10.1021/cg1004424>.
56. Chis, V, Pîrnaşu A, Jurcaş T, Vasilescu M, Simon S, Cozar O, et al. Experimental and DFT study of pyrazinamide. *Chemical Physics*. 2005;316(1):153 – 163. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301010405001977>.
57. Sumczynski P, Wieczorek R, Makowski M. On the acid-base properties of pyrazine-2-thiocarboxamide and its complexes with Fe(II), Cu(II), Zn(II) and Ni(II) in polar solvents. *Journal of Molecular Liquids*. 2020;311:113349. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167732220313301>.
58. Szwiderski G, Lewandowska H, Świsłocka R, Wojtulewski S, Siergiejczyk L, Wilczewska A. Thermal, spectroscopic (IR, Raman, NMR) and theoretical (DFT) studies of alkali metal complexes with pyrazinecarboxylate and 2,3-pyrazinedicarboxylate ligands. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2016 Oct;126(1):205–224. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10973-016-5695-0>.
59. Schauerl M, Nerenberg PS, Jang H, Wang LP, Bayly CI, Mobley DL, et al. Non-bonded force field model with advanced restrained

electrostatic potential charges (RESP2). *Communications Chemistry*. 2020 Apr;3(1):44. Available from: <https://doi.org/10.1038/s42004-020-0291-4>.

60. Mallela R, Konakanchi R, Guda R, Munirathinam N, Gandamalla D, Yellu NR, et al. Zn(II), Cd(II) and Hg(II) metal complexes of 2-aminonicotinaldehyde: Synthesis, crystal structure, biological evaluation and molecular docking study. *Inorganica Chimica Acta*. 2018;469:66–75. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020169317307211>.
61. Chen J, Ye Y, Ran M, Li Q, Ruan Z, Jin N. Inhibition of Tyrosinase by Mercury Chloride: Spectroscopic and Docking Studies. *Frontiers in Pharmacology*. 2020;11:81. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2020.00081>.
62. Coimbra JTS, Brás NF, Fernandes PA, Rangel M, Ramos MJ. Membrane partition of bis-(3-hydroxy-4-pyridinonato) zinc(ii) complexes revealed by molecular dynamics simulations. *RSC Adv*. 2018;8:27081–27090. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C8RA03602K>.

63. Li P, Merz KM. Metal Ion Modeling Using Classical Mechanics. *Chemical Reviews*. 2017;117(3):1564–1686. PMID: 28045509.
64. Khan MT, Malik SI. Structural dynamics behind variants in pyrazinamidase and pyrazinamide resistance. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2020;38(10):3003–3017. PMID: 31357912. Available from: <https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1650113>.
65. Junaid M, Li CD, Li J, Khan A, Ali SS, Jamal SB, et al. Structural insights of catalytic mechanism in mutant pyrazinamidase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2021;39(9):3172–3185. PMID: 32340563.
66. Esmaeeli R, Mehrnejad F, Mir-Derikvand M, Gopalpoor N. Computational insights into pH-dependence of structure and dynamics of pyrazinamidase: A comparison of wild type and mutants. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2019;120(2):2502–2514. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcb.27543>.

67. Zhang JL, Zheng QC, Li ZQ, Zhang HX. Molecular Dynamics Simulations Suggest Ligand's Binding to Nicotinamidase/Pyrazinamidase. PLOS ONE. 2012-06;7(6):1–12. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039546>.
68. Rodríguez-Santiago L, Alí-Torres J, Vidossich P, Sodupe M. Coordination properties of a metal chelator clioquinol to Zn²⁺ studied by static DFT and ab initio molecular dynamics. Phys Chem Chem Phys. 2015;17:13582–13589. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C5CP01615K>.
69. Coimbra JTS, Brás NF, Fernandes PA, Rangel M, Ramos MJ. Membrane partition of bis-(3-hydroxy-4-pyridinonato) zinc(ii) complexes revealed by molecular dynamics simulations. RSC Adv. 2018;8:27081–27090. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C8RA03602K>
70. Haghshenas H, Tavakol H, Kaviani B, Mohammadnezhad G. AMBER Force Field Parameters for Cobalt-Containing Biological Systems: A Systematic Derivation Study. The Journal of Physical Chemistry B. 2020;124(5):777–787. PMID: 31912730. Available from: <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b10739>.

71. Neves RPP, Sousa SF, Fernandes PA, Ramos MJ. Parameters for Molecular Dynamics Simulations of Manganese-Containing Metalloproteins. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2013;9(6):2718–2732. PMID: 26583865.
72. Dong M, Li H, Hu D, Zhao W, Zhu X, Ai H. Molecular Dynamics Study on the Inhibition Mechanisms of Drugs CQ1–3 for Alzheimer Amyloid- β 40 Aggregation Induced by Cu²⁺. *ACS Chemical Neuroscience*. 2016;7(5):599–614. PMID: 26871000.
73. Ngo ST, Phan HN, Le CN, Ngo NCT, Vu KB, Tung NT, et al. Fine Tuning of the Copper Active Site in Polysaccharide Monooxygenases. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2020;124(10):1859–1865. PMID: 31990550.
74. Salazar-Salinas K, Baldera-Aguayo PA, Encomendero-Risco JJ, Orihuela M, Sheen P, Seminario JM, et al. Metal-Ion Effects on the Polarization of Metal-Bound Water and Infrared Vibrational Modes of the Coordinated Metal Center of Mycobacterium tuberculosis Pyrazinamidase via Quantum Mechanical Calculations. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2014;118(34):10065–10075. PMID: 25055049.
75. Machado MR, Pantano S. Split the Charge Difference in Two! A Rule of Thumb for Adding Proper Amounts of Ions in MD Simulations.

- Jour- nal of Chemical Theory and Computation. 2020;16(3):1367–1372. PMID: 31999456. Available from: <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.9b00953>.
76. Franklin LM, Walker SM, Hill G. A DFT study of isolated histidine inter-actions with metal ions (Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺) in a six-coordinated octahedral complex. Journal of Molecular Modeling. 2020 May;26(6):116. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00894-020-04389-2>.
77. Juhás M, Zitko J. Molecular Interactions of Pyrazine-Based Compounds to Proteins. Journal of Medicinal Chemistry. 2020;63(17):8901–8916. PMID:32275822. Available from: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b02021>.
78. Li Z, Lazaridis T. The Effect of Water Displacement on Binding Ther-modynamics: Concanavalin A. The Journal of Physical Chemistry B. 2005;109(1):662–670. PMID: 16851059. Available from: <https://doi.org/10.1021/jp0477912>.

