

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades



DISEÑO Y EVALUACIÓN *IN SILICO* DE UN NUEVO  
INHIBIDOR DE GILATOXINA A PARTIR DE INHIBIDORES  
DE ENZIMAS PROVENIENTES DE LA FAMILIA  
CALICREÍNA.

Trabajo de graduación presentado por  
Daniel Andrés González López  
para optar al grado académico de Licenciado en Química

Guatemala,  
2022



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades

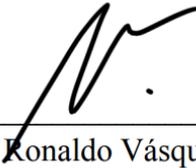


DISEÑO Y EVALUACIÓN *IN SILICO* DE UN NUEVO  
INHIBIDOR DE GILATOXINA A PARTIR DE INHIBIDORES  
DE ENZIMAS PROVENIENTES DE LA FAMILIA  
CALICREÍNA.

Trabajo de graduación presentado por  
Daniel Andrés González López  
para optar al grado académico de Licenciado en Química

Guatemala,  
2022

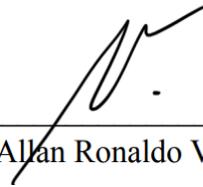
Vo. Bo.



---

Lic. Allan Ronaldo Vásquez Bolaños

Tribunal Examinador:



---

Lic. Allan Ronaldo Vásquez Bolaños



---

Lic. Irma Patricia Orellana Catalán



---

Lic. Angelika Rebecca Hasselmann Arana

Fecha de aprobación: Guatemala, 22 de junio del 2022

## PREFACIO

Este estudio me ayudó a darme cuenta de muchas cosas. Primero que nada, obtuve la experiencia de trabajar bajo mi propia planificación, lo que me enseñó la importancia de la disciplina. También aprendí que la voluntad es muy importante y no debe perderse a lo largo de un proyecto. Finalmente, aprendí a valorar más la investigación de otras personas, ya que es un trabajo duro y largo.

Quiero agradecer en el ámbito universitario a mi asesor, Lic. Allan Vásquez, por estar presente a lo largo del camino y apoyarme hasta el final. También quiero agradecer al Lic. Luis Aguilar, Lic. Sandra Bocalleti y Lic. Jose Carlos Chiquín, por su apoyo y por darme la oportunidad de trabajar a su lado en la docencia. Finalmente, agradezco a Vilma Álvarez, Lic. Irma Orellan y Lic Ángel Ramírez por su apoyo a la carrera y sus constantes recordatorios para seguir adelante.

Quiero agradecer a mis amigos por ser un punto de soporte, siempre me dieron ánimos y me ayudaron a recobrar las fuerzas perdidas. Por acompañarme en muchas aventuras y enseñarme valiosas lecciones.

Agradezco a mi familia. A mis padres por poner su confianza en mí. Agradezco a mis hermanas por darme el ejemplo a seguir y cuidarme siempre. No puedo enumerar todo lo que han hecho por mí, ya que no cabría en una página, pero nada de esto sería posible sin ustedes.

Por último, agradezco a la vida, por permitirme recorrer este trayecto y maravillarme con las personas increíbles que me acompañan, y también por las que alguna vez me acompañaron y ya no están.

## CONTENIDO

PREFACIO	i
RESUMEN	iv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	2
III. JUSTIFICACIÓN	3
IV. MARCO TEORICO	4
A. Especie endemica	4
B. Antecedentes de mordeduras de Heloderma	5
C. Antecedentes inhibidores	6
D. Toxinas caliceínas	6
1. Gilatoxina	6
2. Helodermatina.	7
3. Toxina Horridum	7
E. Propiedades Farmacológicas	8
1. Regla de Lipinski	8
2. Permeabilidad Caco-2	8
3. Clearance y Vida media	8
V. METODOLOGÍA	9
VI. RESULTADOS	20
VII. DISCUSIÓN	32
VIII. CONCLUSIONES	35
IX. RECOMENDACIONES	36
X. BIBLIOGRAFÍA	37
XI. ANEXOS	39

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Heloderma h. charlesbogerti</i>	4
Figura 2. Mapa de distribución del Heloderma en Guatemala	5
Figura 3. Estructura homóloga de gilatoxina, activador de proteína C en veneno de serpiente	7
Figura 4. A) Modelo 1 obtenido por I-Tasser utilizado en este estudio. B) Modelo 2 obtenido por I-Tasser. C) Modelo 3 obtenido por Tasser	40

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Estructuras obtenidas a partir de la literatura como inhibidores de calicreína	9
Cuadro 2. Propuestas de inhibidores a partir de los mejores candidatos encontrados	14
Cuadro 3. Parámetros de confianza de la Molécula 3D predicha	20
Cuadro 4. Interacciones de los inhibidores con el sitio activo de la gilatoxina	21
Cuadro 5. Parámetros farmacológicos de Regla de Lipinski, permeabilidad Caco-2, Clearance, Vida media	30
Cuadro 6. Códigos Smiles de las moléculas evaluadas	39

## RESUMEN

El *Heloderma horridum charlesbogerti* es un lagarto endémico de Guatemala. La familia de esta especie presenta la característica de ser la única de los lagartos que posee veneno en su mordedura. El veneno a pesar de no ser una sustancia con alta toxicidad es efectivo debido a la tendencia de los Helodermas de sujetarse al morder. Esto ocasiona que el veneno en su saliva continúe infectando el área mordida. Se ha encontrado que las toxinas dentro del veneno presentan actividad tipo calicreína. Desafortunadamente, no se cuentan con antidotos o inhibidores del veneno debido a la falta de estudio del mismo. Previamente la literatura reporta la estructura primaria de uno de las toxinas del veneno, siendo esta la gilatoxina. Con el fin de identificar y proponer nuevos inhibidores de la gilatoxina se realizó un estudio de anclaje molecular a partir de inhibidores de calicreínas con una predicción de la estructura terciaria de la gilatoxina. También se evaluó sus proyecciones como fármacos para seleccionar al mejor candidato. Se validó exitosamente el modelo 3D predicho a partir de sus valores C-Score de 1.09 y TM-Score  $0.86 \pm 0.07$ , mostrando que la estructura predicha se asemeja la estructura desconocida. Se determinó que el candidato IG2 presenta energías de unión negativas de  $-8.8 \text{ kcal/mol}$ . Cumplió con la regla de Lipinski, y obtuvo los valores más altos en clearance. Por lo que se seleccionó IG2 como el mejor candidato para inhibir la gilatoxina

# I. INTRODUCCIÓN

Los Helodermas son una especie de reptiles conocidos como Lagartos con Cuentas por sus escamas que tienen forma de cuentas. Esta familia de reptiles habita desde Estados Unidos, México y parte de Centroamérica, en Guatemala. Esta familia es famosa debido a que es una familia de lagartos venenosos. Sus glándulas salivares cumplen la función de glándulas de veneno. Estos se alimentan de pequeños mamíferos, aves y huevos de aves. Se conocen 2 especies dentro del género Heloderma, las cuales son: *horridum* y *suspectum*. Dentro de la especie *horridum* existen 3 subespecies, mientras que *suspectum* posee 2 subespecies. La subespecie *Heloderma horridum charlesbogerti* es endémica a Guatemala. Habita principalmente en el valle de Motagua. Anteriormente, ejemplares de esta especie habitaban en las costas sur de Guatemala, sin embargo desaparecieron debido al cambio extremo de su hábitat. Por eso únicamente se encuentran en el este del país (Wever, 2019). Actualmente se tiene programas para la conservación de la especie, así bien como la reserva de Heloderma busca mantener la especie con vida (Conap, 2020).

Los Helodermas son la única especie de lagartos venenosos. Presentan un posible riesgo a la salud humana. A pesar de esto, los Helodermas no han sido estudiados y presentan una amplia rama de investigación. Muchas veces, la población humana cercana al hábitat del Heloderma suele eliminar a los individuos de esta especie, ya que les tienen miedo. Sin embargo, ambas poblaciones pueden vivir en paz, no es necesario atentar contra la población de Helodermas si se tienen las precauciones necesarias. En 1994, un herpetologista trabajaba con un espécimen del monstruo Gila, *Heloderma suspectum*, cuando fue mordido por dicho lagarto (Strimple, 1997). El caso descrito por Strimple coincide con los síntomas registrados de una mordida de *H. charlesbogerti* en 2008, en Guatemala. La mordida tuvo una duración de 15 segundos y el paciente sufrió diversos síntomas, como dolor, mareo, diaforesis, parálisis del área mordida, entre otros. El paciente sobrevivió, sin embargo no se le recetó medicamentos específicos para el veneno (Ariano, 2008).

El veneno del Heloderma está constituido por varias toxinas, sin embargo el estudio se centrará en las toxinas caliceínicas: Helodermatina, Gilatoxina y Toxina horridum. El término caliceínicas hace referencias a enzimas y tejidos encontrados en el páncreas, fueron descubiertas en 1930 cuando se analizaba tejido de dicho órgano. caliceínicas es una palabra en griego que significa páncreas. Las toxinas del Heloderma: Gilatoxina, Helodermatina y Toxina Horridum presentan actividad de tipo caliceína por la forma en que actúan. Estas toxinas también son las más mortales del veneno, ya que suelen trabajar en conjunto para potenciar los efectos del veneno (Kalinska, 2015).

## II. OBJETIVOS

### A. Objetivo general:

- Evaluar la inhibición de la gilatoxina con inhibidores de calicreínas.

### B. Objetivos específicos:

- Modelar una estructura 3D a partir de la estructura primaria de la gilatoxina.
- Evaluar la interacción de inhibidores de calicreínas con la gilatoxina.
- Determinar las fuerzas intermoleculares entre toxinas e inhibidores que causan la inhibición de las toxinas.
- Determinar el mejor inhibidor existente de gilatoxina a partir del puntaje obtenido de autodock vina.
- Diseñar una nueva molécula inhibitoria de gilatoxina a partir del esqueleto base del mejor inhibidor para la gilatoxina.

### III. JUSTIFICACIÓN

El *Heloderma charlesbogerti* es una especie nativa de Guatemala. Esta especie posee un veneno compuesto de distintas toxinas, entre las cuales destacan 4 toxinas tipo calicreína. Estas 4 toxinas son: Gilatoxina, toxina horridum, Helodermatina, y una toxina no identificada. Estas toxinas tienen distintos efectos como baja presión arterial y la contracción de músculo liso en el caso de la gilatoxina; hipertensión, hemorragia en órganos internos e inflamación de ojos en el caso de la toxina horridum. La toxina Helodermatina decrece la presión arterial y la toxina no nombrada causa supresión de la contracción del músculo del diafragma. Este veneno ha sido muy poco explorado y actualmente no existen antisueros ni inhibidores capaces de disminuir el efecto del veneno o eliminarlo por completo. Por lo que se propone encontrar inhibidores de las toxinas calicreína que contiene el veneno para proponerlos como posibles medicamentos (Ariano, 2008). Además, las toxinas calicreína del *Heloderma* pueden ser letales, dependiendo del tiempo de mordedura del animal ya que con tan solo 15 segundos puede causar efectos severos como dolor local intenso, mareos, diaforesis, vómitos, parestesia intensa en la mano y el brazo izquierdos e hipotensión (70/52 mm / Hg) y leucocitosis (Ariano, 2008).

Por otra parte, la química computacional ha ido mejorando conforme al avance tecnológico y computacional. Gracias a esto se obtienen resultados más confiables y mejores predicciones. Los estudios computacionales son el primer paso en el diseño de nuevos fármacos gracias a su precisión y bajo riesgo. Por estas razones, el estudio aportará un predecesor para un nuevo fármaco que puede ser útil no solamente para la gilatoxina, sino para otras toxinas y enzimas tipo calicreína.

## IV. MARCO TEÓRICO

Los Helodermas, también conocidos como Lagartos con Cuentas por la forma de sus escamas, es una familia de reptiles que habitan en Estados Unidos, alrededor de Arizona, siguiendo las costas del Pacífico de México hasta parte de Centroamérica, en la región de Guatemala. Esta familia de lagartos es conocida por ser los únicos lagartos venenosos. Cuentan con glándulas de veneno como una modificación a las glándulas salivares. Se alimentan de pequeños mamíferos y huevos de aves. Existe un solo género, *Heloderma*, dentro del cual hay 2 especies, *horridum* y *suspectum*. La especie *horridum* tiene 3 subespecies, mientras que el *suspectum* tiene 2 subespecies. La subespecie *Heloderma horridum charlesbogerti* es endémica de Guatemala, siendo una de las razones del trabajo promover la información de la especie endémica se enfocará la investigación de esta especie (Wever, 2019).



Fig 1. *Heloderma horridum charlesbogerti*

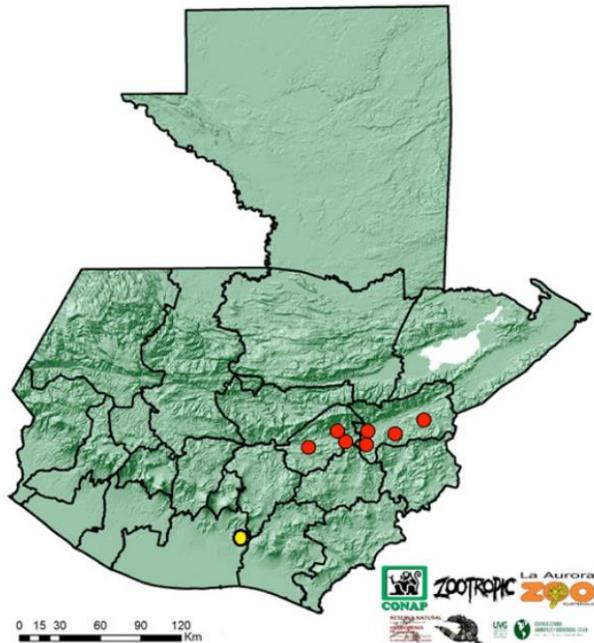
(Ariano, 2008)

### A. Especie endémica

*Heloderma horridum charlesbogerti* es la subespecie de *Heloderma* endémica de Guatemala. Se ha determinado que *H. charlesbogerti* se alimenta principalmente de huevos de aves, pichones de aves, huevos de iguana del género *Ctenosaura* y huevos de otros reptiles así como crías de pequeños mamíferos como conejos y ratas. Este *Heloderma* puede encontrarse en un área reducida de Guatemala, el bosque seco del Valle de Motagua específicamente. Se encuentra distribuido en la zona este y central de Guatemala en los municipios de El Rancho y Gualán de los departamentos El Progreso y Zacapa respectivamente. Anteriormente los *Helodermas* se encontraban también en la parte sur de Guatemala, entre los departamentos de Guatemala, Escuintla y Santa Rosa, sin embargo, sus poblaciones se consideran actualmente extintas por la pérdida de su hábitat natural.

Actualmente se prioriza conservar los hábitats del *Heloderma* en Guatemala, principalmente los cerros entre El Rosario y El Arenal del municipio de Cabañas, Zacapa; el área montañosa entre La Cartuchera, Los Jutes y El Volcán del municipio Gualán, Zacapa; el área de sierras entre El Júcaro, El Paso de los Jalapas y Santa Rita, en El Progreso y por último los bosques de la Planta San Miguel de Cementos Progreso en Sanarate, El Progreso. En 2006, se estimó que existen al menos 500 ejemplares adultos vivos en la zona. Esta es la única subespecie alopátrica de la familia *Helodermatidae*. Es la especie de menor tamaño y con una coloración distinta al resto de especies. Esta especie se encuentra en peligro de extinción debido al cambio de uso del suelo,

tráfico ilegal y matanza de Heloderma por temor de la población de los alrededores. Desde el 2007 se fundó la Reserva Natural Privada del Heloderma, con fines científicos y de conservación, que es propiedad de la Asociación Zootropic. La especie se encuentra en el apéndice I de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES) debido a su estado de amenaza. No se ha logrado reproducir la especie en cautiverio hasta el momento (CONAP, 2020).



*Figura 2. Mapa de distribución del Heloderma (CONAP, 2020).*

#### B. Antecedentes de mordeduras de Heloderma

Los Helodermas, al ser la única especie de lagartos venenosos, representan un posible riesgo para la salud humana. Es por esto que muchas veces la población vecina de humanos tiende a matar a los Helodermas vistos de la región. Sin embargo, no es necesario atentar contra la población de Helodermas, media vez se tengan los cuidados necesarios (Peter, 1997). Se ha registrado una mordida de *H. bogerti* en Guatemala en 2008 donde un investigador de 24 años fue mordido en su mano izquierda. El Heloderma estuvo alrededor de 15 segundos sujetado de la mano del investigador. Los síntomas detectados en el paciente fueron dolor severo, mareos y diaforesis. Luego de 1 minuto, el paciente desarrolló parestesia en su brazo izquierdo y dificultad para mover los dedos de la mano mordida. Luego de 3 minutos, el paciente experimentó dificultad para mover los dedos de la mano derecha la cual no fue mordida, además de parálisis del brazo izquierdo. El dolor del brazo izquierdo se extendió desde la punta de sus dedos hasta el hombro. Se hinchó la lengua del paciente lo que dificulta la comunicación. Luego de 15 minutos, el paciente ingresó al hospital con síntomas de hipotensión, 70/52 mmHg. Su ritmo cardiaco fue de 102 latidos por minuto. Estudios de sangre revelaron leucocitosis 12600,mm<sup>3</sup>. El tratamiento administrado fue ketorolaco, clorfeniramina, metilprednisolona, antibióticos, ondansetrón y solución salina normal.

### C. Antecedentes inhibidores

Anteriormente, la gilatoxina fue estudiada con el fin de determinar su estructura primaria y algunas de sus propiedades bioquímicas. En 1993, Utaisincharoen obtuvo la estructura primaria:

IIGGQECDETGHPWLALLHRSEGSTCSGVLLNQDWIVTAAHCFYLGELRIGLGVH  
NRRVLRGNEQVRVSARKKCYPATASIITNSSCSEYTDIMLIKLDSSVEYTERVRP  
LSLPTSPASEGAECTVMGWGTTTTPPDVTYPAPVPCVRIEMLNNAVCELARDLWN  
ITDSVLCAGTWFGGKDSCKGDSGGPLICRGQLTGIVSWGFGFPCEQPLEYGVYTK

VISFLFWIQSI. En este estudio se buscó si la gilatoxina era inhibida por alguna molécula como EDTA o diisopropilfluorofosfato (DFP). Se encontró únicamente que el DFP inhibe la gilatoxina. Sin embargo, aunque se conoce una molécula que puede inhibir la toxina, se desconoce el funcionamiento de su inhibición así bien si hay otros inhibidores que presenten un mejor resultado (Utaisincharoen, 1993). No se han realizado más estudios acerca de su inhibición desde Utaisincharoen.

### D. Toxinas calicreínas

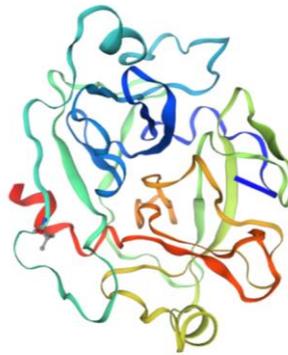
Las calicreínas es un grupo de enzimas serinas proteasas con especificidad trypsin o chymotrypsin. Esta familia fue descubierta en 1930 cuando se analizaba extractos de tejido del páncreas y se encontró una proteasa que tenía un papel fundamental en la señalización de los receptores de bradykinin B1 y B2. Debido a que se encontró esta enzima y tejidos similares con gran abundancia en el páncreas se les llamó a la familia calicreínas, que significa “páncreas” en griego. Desde entonces, el término calicreínas se utiliza para describir dos cosas: Tejidos calicreínas y plasma calicreínas. El plasma calicreína se produce en el hígado y circula por la sangre, mientras que el tejido calicreína consta de 15 proteasas codificadas por genes encontradas en el cromosoma 19q13.4. El plasma calicreína no pertenece a la familia de las proteasa del tejido calicreína, aunque su nombre sigue en uso. La familia de proteasas calicreínas comparten varias características, como parte de su secuenciación es similar, organización de la triada catalítica, organización estructural y su mecanismo de activación que involucra remover un pequeño fragmento N-terminal (Kalinska, 2015).

#### 1. Gilatoxina

La gilatoxina es una glicoproteína encontrada en el veneno de la familia Helodermatidae. Se ha secuenciado esta toxina y se ha determinado que contiene 245 residuos de aminoácidos. Se ha determinado la proporción molar de aminoglucósidos y la toxina siendo de 8 moles de monoglucósidos por cada mol de toxina (8:1). Esta toxina muestra actividad similar a calicreínas, debido a que libera bradykinin de kininogen. El Kininogen tratado con gilatoxina produce presión arterial baja en ratas. También se encontró que la gilatoxina puede hidrolizar varios sustratos de otras enzimas como trypsin y thrombin como ésteres de arginina; la toxina puede degradar angiotensina I y II por el corte del péptido del NH<sub>2</sub> terminal. Por último se ha encontrado que la toxina puede degradar Fibrinogen, pero no libera un coágulo de fibrina. La ausencia del coágulo de fibrina muestra que la gilatoxina tiene especificidades distintas a la de thrombin y las toxinas tipo-thrombin del veneno de las serpientes. La comparación de la estructura primaria de la gilatoxina

con la toxina horridum muestra una significativa homología. También muestra similitud con la Helodermatina, una toxina hipotensiva, sin embargo la Helodermatina es aproximadamente el doble de pesada que la gilatoxina. La actividad calicreína de la toxina muestra que el kininogen tratado con gilatoxina produce contracciones del músculo liso del útero de las ratas. El efecto hipotensivo de la gilatoxina se debe a la liberación de bradykinin causado por la toxina. Por último, la gilatoxina puede degradar la fibrinogen, pero no produce el coágulo de fibrino que es producido por thrombin y enzimas del veneno de serpiente. La gilatoxina es capaz de hidrolizar las cadenas alfa, beta y gamma del fibrinogen. Las cadenas alfa y beta son hidrolizadas en 12 horas, sin embargo la hidrólisis de la cadena gamma toma hasta 18 horas de incubación en gilatoxina. Otras enzimas pueden degradar las cadenas alfa y beta de fibrinogen pero no pueden hidrolizar la cadena gamma (Utaisincharoen, 1993).

La gilatoxina representa un 3%-5% del volumen del veneno. Esta toxina está presente únicamente en el veneno de estos lagartos. Y tiene una dosis letal ( $LD_{50}$ ) de 2.6-2.9 microgramos/gramo. Sin embargo, esta toxina se torna más tóxica cuando se administra en conjunto de otras toxinas como Helodermatina y toxina horridum, por lo que la toxina tiene sinergia con otros componentes del veneno (Beck, 2005).



*Figura 3. Estructura de activador de proteína C del veneno de la serpiente cabeza de cobre Agkistrodon contortrix contortrix homologa a la gilatoxina.  
(Swissmodel, 2020)*

## 2. Helodermatina.

La Helodermatina es una toxina presente en el veneno del Heloderma. Esta toxina ha sido purificada, sin embargo, se desconoce la estructura primaria de la misma. Se conoce que es una arginina esterasa. Es también una glicoproteína, es decir que contiene azúcares, como el resto de toxinas calicreínas. Sin embargo, esta es mucho más masiva, con una masa de 66 kDa, teniendo una masa de aproximadamente el doble de la gilatoxina. Se ha encontrado una similitud con la toxina crotalasa encontrada en el veneno de la serpiente de cascabel espalda de diamante. Los estudios han demostrado que presenta actividad hipotensiva, disminuyendo la presión arterial (Alagon, 1986 & Beck, 2005).

## 3. Toxina Horridum

La toxina Horridum es otra toxina con actividad calicreína presente en el veneno del Heloderma. Ha sido la única toxina hemorrágica aislada hasta la actualidad. Al igual que la

gilatoxina y la Helodermatina es una glicoproteína. Es muy similar a la gilatoxina. A parte de sus efectos hemorrágicos, esta también presenta efectos hipotensivos como la Helodermatina. Es una de las toxinas más letales del veneno, siendo su LD<sub>50</sub> de 0.38 µg/g. Uno de los efectos más notorios de la toxina horridum, es que produce exoftalmos (ojos saltones) un trastorno único de este veneno. Por último cabe mencionar que la toxina horridum puede degradar fibrinógeno en fibrina al igual que la enzima thrombin, sin embargo no libera coágulos durante este proceso por lo que no presenta actividad tipo thrombin (Toshiaki, 1988; Beck, 2005 & Nikai, 1988).

#### E. Propiedades farmacológicas

La farmacología es el estudio de medicamentos y sus efectos en las personas. Actualmente, la farmacología permite predecir si una molécula será adecuada para el consumo humano sin necesidad de pruebas físicas. Para esto se evalúan características de la molécula como su peso, donadores de protones, aceptores de protones, acidez, entre otras cualidades. Hay muchos tipos de propiedades farmacológicas, debido a la naturaleza del estudio se escogió únicamente 4 de estas que fueron la regla de Lipinski, permeabilidad Caco-2, clearance y vida media. Se escogieron estos factores debido a que informan principalmente de la absorción y excreción de los inhibidores (Xiong *et al*, 2021).

##### 1. Regla de Lipinski

La regla de Lipinski evalúa 5 aspectos de la molécula siendo estos su peso molecular, sus donadores de protones, aceptores de protones, y coeficiente de reparto octanol-agua (log P). Para ser aceptada debe cumplir con al menos 3 de las siguientes condiciones: Peso molecular menor a 500 umas, contener menos de 5 donadores de protones, contener menos de 10 aceptores de protones y un log P menor a 5. Esta regla también es conocida como la regla de 5, debido a que todas sus condiciones son múltiplos de 5. Cuando la regla es aceptada, se infiere que el fármaco tendrá una buena absorción y permeabilidad (Xiong *et al*, 2021).

##### 2. Permeabilidad caco-2

Los fármacos ingeridos por vía oral deben ser transportados por células intestinales hacia el sistema por medio de transporte activo. Esta propiedad es estudiada con células de adenocarcinoma por su similitud en el transporte del fármaco. Estas células también son llamadas caco-2. Un valor adecuado para esta propiedad está en un rango mayor a  $-5.15 \log_{10} \text{cm/s}$  (Xiong *et al*, 2021).

##### 3. Clearance y vida media

Estas propiedades describen la excreción de los fármacos. Clearance indica la facilidad con la que el organismo puede limpiarse del medicamento. Esta propiedad se relaciona con la vida media, ya que a partir del clearance se puede calcular la vida media del fármaco que será el tiempo en el que el organismo desecha la mitad de la concentración original del fármaco. Los valores esperados para CL deben estar entre 15 y 5ml /min /kg y para T<sub>1/2</sub> debe ser menor a 0.3 (Xiong *et al*, 2021).

## V. METODOLOGÍA

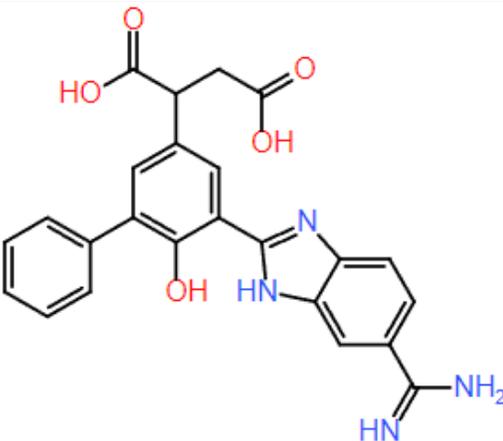
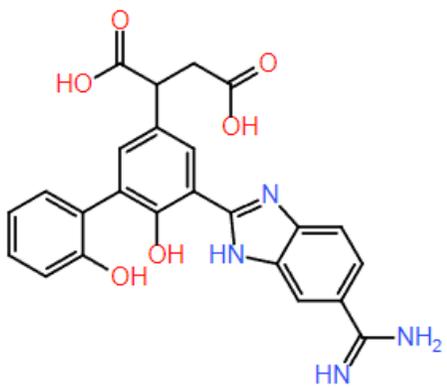
### A. Hipótesis

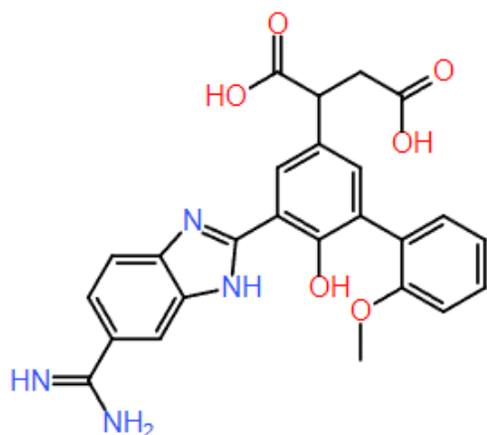
Los inhibidores de calicreínas presentan interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno con la gilatoxina que dan lugar a energías de unión negativas en el acoplamiento molecular computacional.

Los inhibidores de calicreínas no presentan interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno con la gilatoxina por lo que las energías de unión son más positivas en el acoplamiento molecular

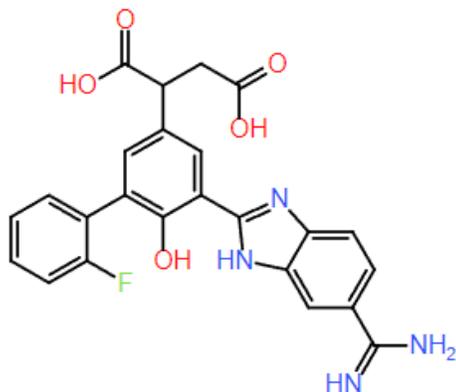
### B. Muestra

Cuadro 1. Estructuras obtenidas a partir de la literatura como inhibidores de calicreína.

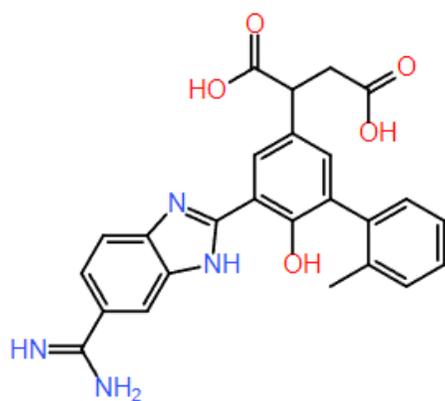
No.	Estructura
1 (Young, 2006)	
2 (Young, 2006)	



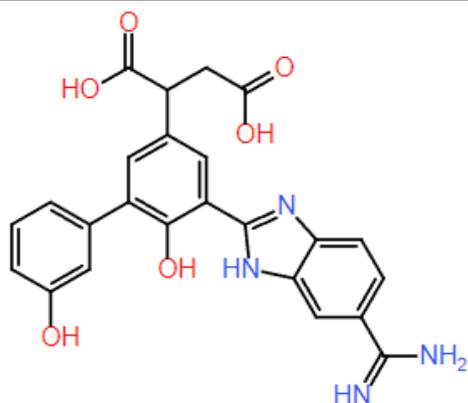
3 (Young, 2006)



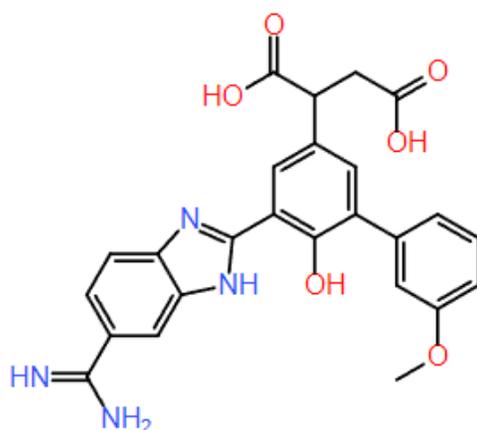
4 (Young, 2006)



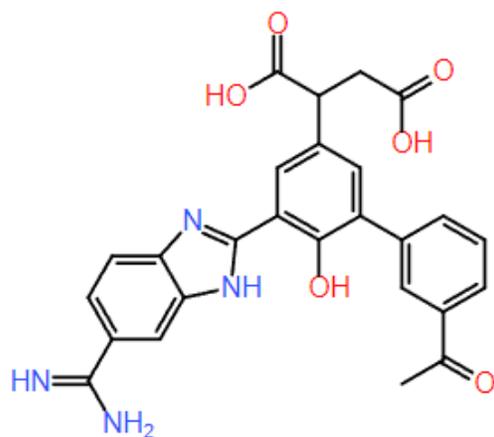
5 (Young, 2006)



6 (Young, 2006)

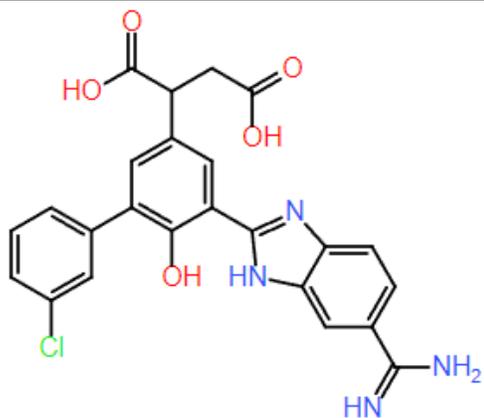


7 (Young, 2006)

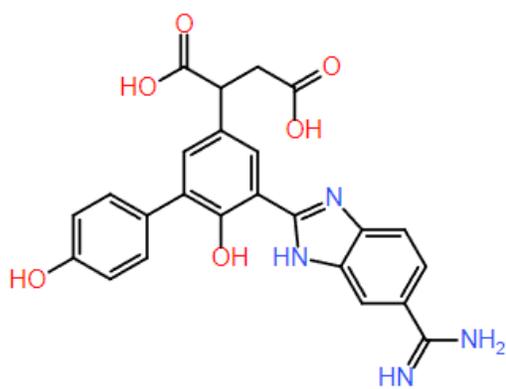


8 (Young, 2006)

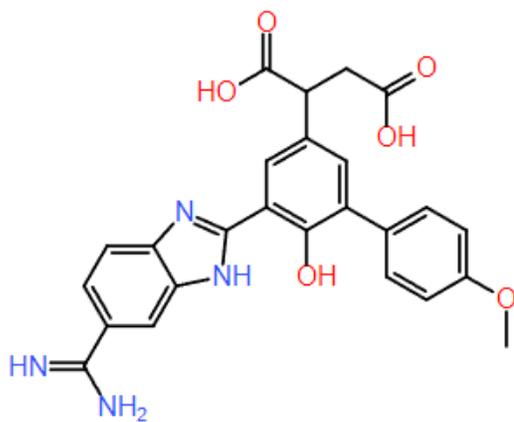




12 (Young, 2006)



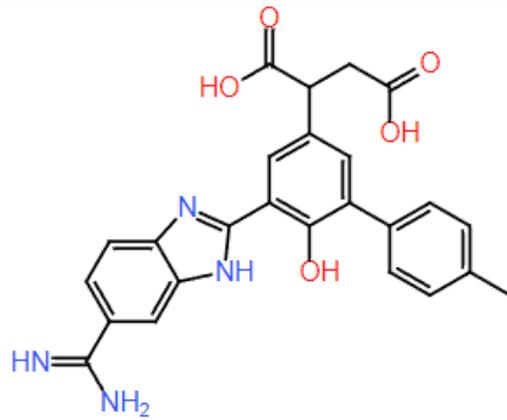
13 (Young, 2006)



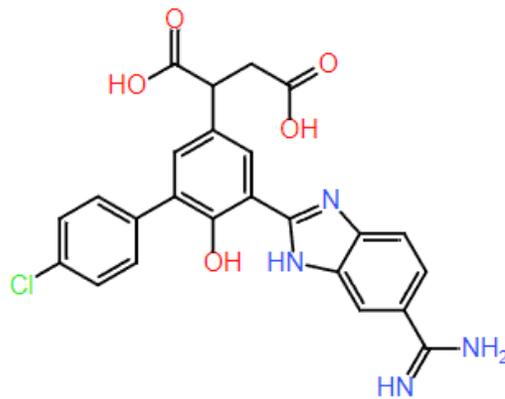
14 (Young, 2006)

Continuación Cuadro 1

No. Estructura



15 (Young, 2006)



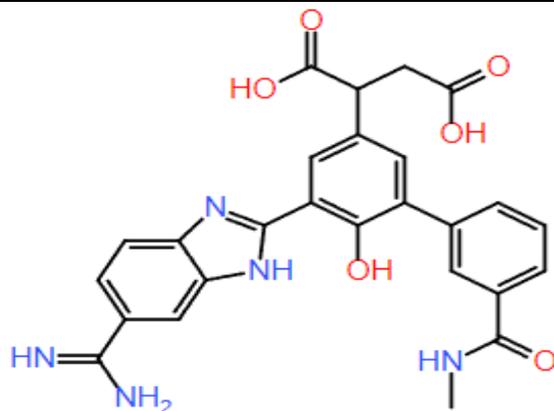
16 (Young, 2006)

Cuadro 2. Propuestas de inhibidores a partir de los mejores candidatos encontrados

No.

Nombre

Estructura



1 IG1

Continuación Cuadro 2

No.	Nombre	Estructura
2	IG2	
3	IG3	
4	IG4	

Continuación Cuadro 2

No.	Nombre	Estructura
6	IG6	
7	IG7	
8	IG8	

Continuación Cuadro 2

No.	Nombre	Estructura
9	IG9	
10	IG10	
11	IG11	

No.	Nombre	Estructura
12	IG12	
13	IG13	

### C. Recursos materiales

1. **HARDWARE:** Computadora con procesador ryzen 3 3200G, 16GB de memoria RAM y sistema operativo windows 11.
2. **Software:** I-TASSER, Avogadro 1.2.0, AutoDock Vina 1.1.2, ADMETlab 2.0, PLIP 2021 y UCSF Chimera (Yang, 2015), (Yang, 2015), (Zheng 2021, & Kufareva & Abagyan, 2011), (Hanwell *et al*, 2012), (Trott & Olson, 2010), (Eberhardt *et al*, 2021), (Xiong *et al*, 2021), (Adasme *et al*, 2021) y (Pettersen, *et al*, 2004).

### D. Métodos

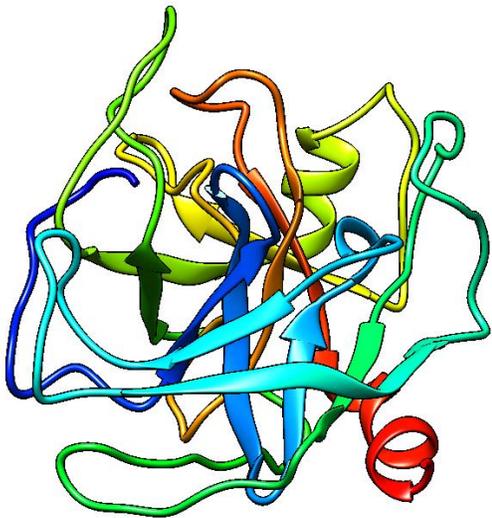
1. **Preparación de la muestra:** La estructura terciaria de la gilatoxina no se encuentra en la base de datos pdb, sin embargo se cuenta con la estructura primaria, se utilizará el programa I TASSER para predecir la estructura terciaria de la gilatoxina. Los parámetros a utilizar serán los predeterminados por el sistema, ya que se desconoce mucho de la estructura de esta toxina.
2. **Evaluación computacional de los inhibidores**

- a. Se evaluó los mejores 5 inhibidores existentes utilizando autodock vina, como ligandos. Los resultados obtenidos muestran las energías de unión, por lo que la menor energía de unión será el inhibidor con mejor posibilidad de inhibir las toxinas.
- b. A partir de los inhibidores seleccionados se propusieron nuevas estructuras y se analizaron como potenciales inhibidores de la misma forma que las moléculas originales.
- c. Evaluación farmacológica de los inhibidores: se utilizó el sitio web <https://admetmesh.scbdd.com/> para analizar las propiedades farmacológicas de los inhibidores. Se evaluó la regla de Lipinski, permeabilidad Caco-2 y Clearance. De esta forma se selecciona el inhibidor con mejores características farmacológicas.

## VI. RESULTADOS

Se predijo el modelo 3D de la gilatoxina a partir de su estructura primaria utilizando I-Tasser. Se generaron 5 modelos 3D para esta estructura. Se seleccionó el modelo 1, debido a que este presenta los mejores valores de confianza para su validación.

Cuadro 3. Parámetros de confianza de la Molécula 3D predicha

Modelo 3D	Aminoácidos en el sitio activo	C-score	TM-score	RMSD
	41,88,89,90,164, 181,182,183,184, 187,201,202,203, 204,205,206,208, 215	1.09	0.86±0.07	3.5±2.4

*Los valores del C-score están comprendidos entre [-5,2], El TM-Score entre [0,1]*

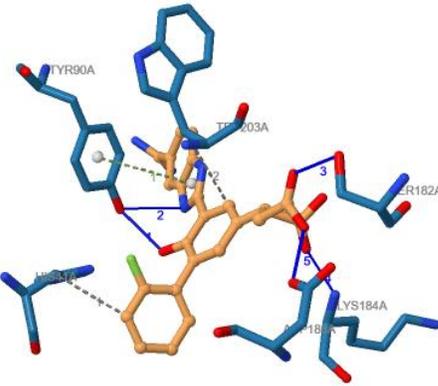
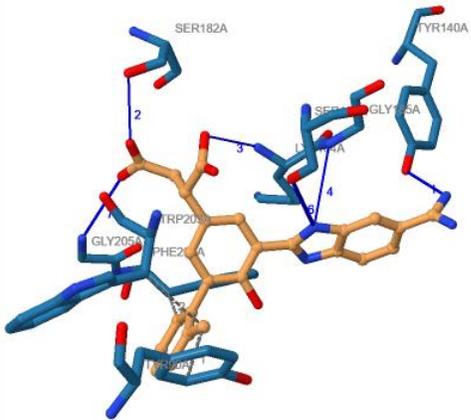
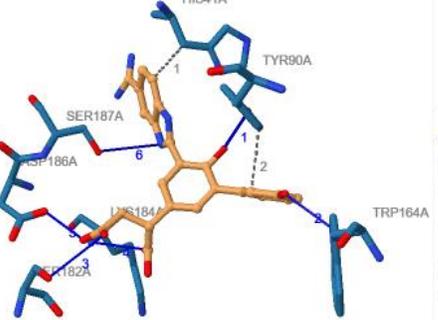
Se realizó el anclaje molecular de las 16 moléculas obtenidas de la literatura. Se encontró que todas las moléculas presentan energías de unión negativas en un rango de -8.3kcal/mol a -9.0kcal/mol. Esto demuestra que los inhibidores de las calicreínas pueden inhibir también al modelo predicho de la gilatoxina. Tras encontrar las energías de unión, se seleccionó a los 8 mejores candidatos y se realizaron pequeñas modificaciones a su estructura. Las nuevas moléculas se nombraron IG1 al IG13. Se encontró que algunas modificaciones mejoraron las energía de unión demostrando así la capacidad de inhibir la gilatoxina por parte de las nuevas moléculas.

Los anclajes obtenidos se analizaron en el software Protein-Ligand Interaction Profile (PLIP). Las interacciones encontradas en el anclaje con el sitio activo fueron puentes de hidrógeno (PH) e interacciones hidrofóbicas (IH) en los siguientes aminoácidos: SER24A, THR25A, HIS41A, CYS42A, TYR90A, TYR140A, TRP164A, ASP181A, SER182A, CYS183A, LYS184A, GLY185A, ASP186A, SER187A, TRP203A, GLY204A, GLY205A y PHE206A. Se encontraron además interacciones de puentes de halógenos, Pi-Stacking y PI-Cation,

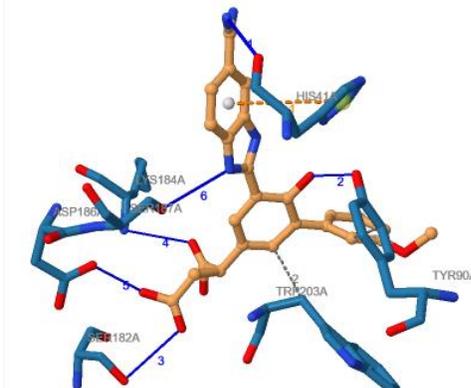
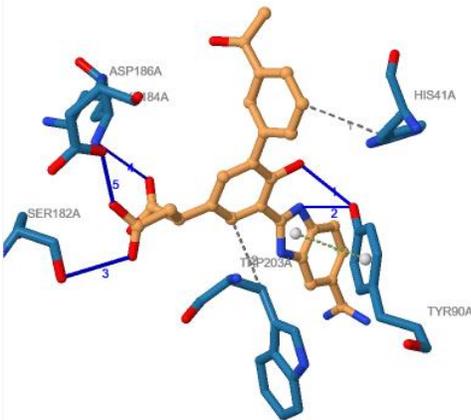
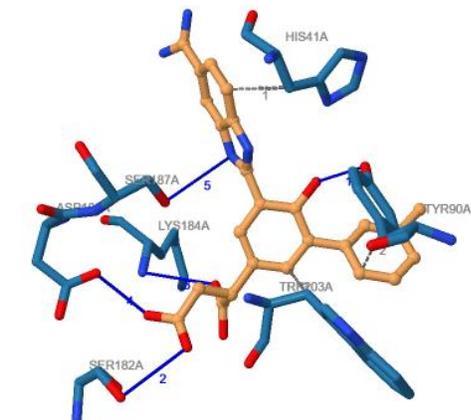
Cuadro 4. Interacciones de los inhibidores con el sitio activo de la gilatoxina

Molécula	Estructura	Energía de unión (kcal/mol)			
		IH	PH	Otras	
1	<p>Image generated with PLIP web service. Provided by TU Dresden/PharmBioSmol</p>	-8.8	06A	HIS41 SER182A, A, LYS184A, SER187A, GLY205A	N/A
2		-8.7	0A	SER24A, TYR90A, SER182A, LYS184A, GLY185A, SER187A, GLY205A	N/A
3		-8.5	A	TYR90A, TYR90A, SER182A, LYS184A, HIS41 ASP186A, SER187A	N/A

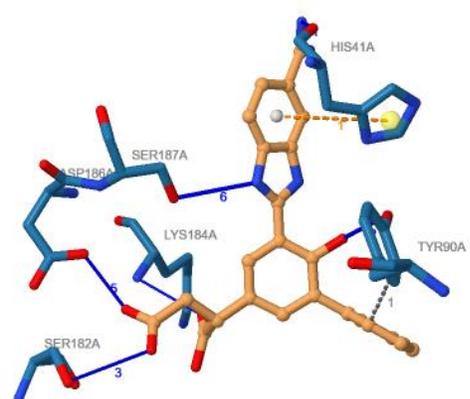
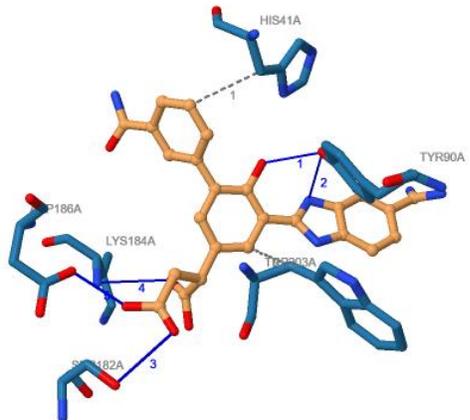
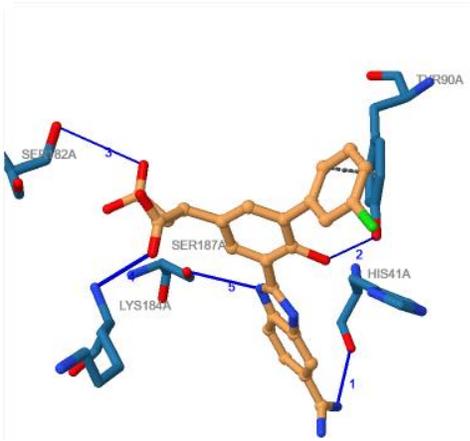
Continuación Cuadro 4

Molécula Estructura	Energía de unión (kcal/mol)	IH	PH	Otras
<p>4</p> 	-8.5	03A	TYR90A, HIS41 TYR90A, A, SER182A, TRP2 LYS184A, ASP186A	TYR90A PI STACKING
<p>5</p> 	-8.5	06A	TYR140A, TYR90A, SER182A, 0A, LYS184A, TRP2 GLY185A, 03A, SER187A, PHE2 SER187A, GLY205A	N/A
<p>6</p> 	-8.5	0A	TYR90A, TRP164A, HIS41 SER182A, A, LYS184A, TYR90 ASP186A, SER187A	N/A

Continuación Cuadro 4

Molécula Estructura	Energía de unión (kcal/mol)			
	IH	PH	Otras	
 <p>7</p>	-8.5	03A	HIS41A, TYR90A, SER182A, LYS184A, TRP203A, ASP186A, SER187A	HIS41A PI CATION
 <p>8</p>	-8.5	03A	TYR90A, TYR90A, SER182A, LYS184A, ASP186A	TYR90A PI STACKING
 <p>9</p>	-8.8	03A	HIS41A, TYR90A, SER182A, LYS184A, ASP186A, SER187A	N/A

Continuación Cuadro 4

Molécula Estructura	Energía de unión (kcal/mol)			Otras
	IH	PH		
 <p>10</p>	-8.3	0A	HIS41A, TYR90A, SER182A, LYS184A, TYR9 ASP186A, SER187A	HIS41A PI CATION
 <p>11</p>	-8.6	03A	TYR90A, HIS41 A, TRP2 LYS184A, ASP186A	N/A
 <p>12</p>	-8.5	0A	HIS41A, TYR90A, SER182A, LYS184A, TYR9 SER187A	N/A

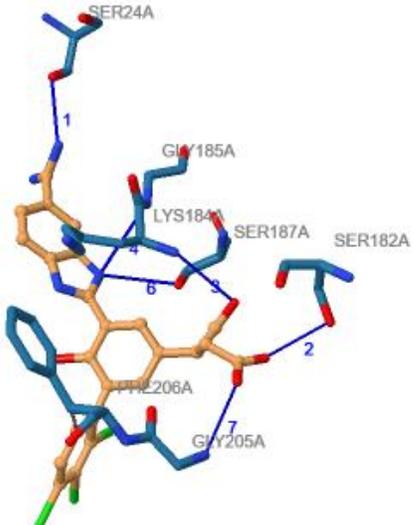
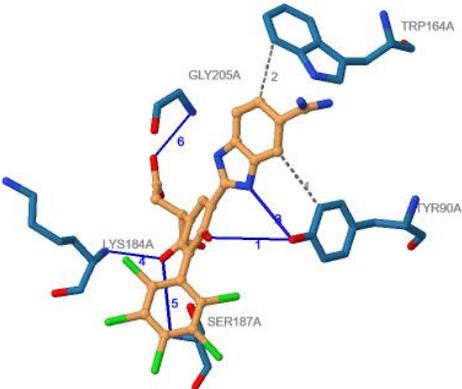
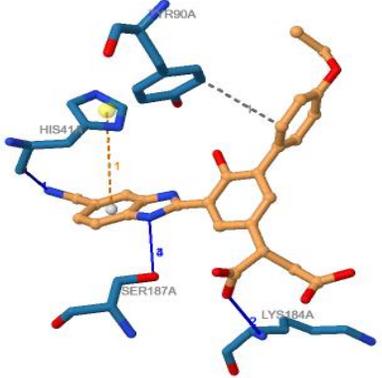
Continuación Cuadro 4

Molécula Estructura	Energía de unión (kcal/mol)			Otras
	IH	PH		
<p>13</p>	-8.6	84A	SER24A, TRP164A, SER182A, LYS184A, TYR90A, GLY185A, SER187A, LYS182A, GLY205A	N/A
<p>14</p>	-9.0	03A	HIS41A, TYR90A, SER182A, CYS183A, LYS184A, TRP203A, SER187A	N/A
<p>15</p>	-8.9	0A	HIS41A, CYS42A, TYR90A, SER182A, SER182A, LYS184A, ASP186A, TYR90A, SER187A	N/A

Continuación Cuadro 4

Molécula Estructura	Energía de unión (kcal/mol)			Otras
	IH	PH		
<p>16</p>	-8.7	0A	CYS42A, TYR90A, SER182A, LYS184A, TYR9 ASP186A, SER187A	N/A
<p>IG1</p>	-8.7	03A	TYR90A, HIS41 A, TRP2 LYS184A, ASP186A	N/A
<p>IG2</p>	-8.8	0A	HIS41A, TYR90A, TRP164A, SER182A, CYS183A, TYR9 LYS184A, SER187A	N/A

Continuación Cuadro 4

Molécula	Estructura	Energía de unión (kcal/mol)			Otras
		IH	PH		
IG3		PHE2 -9.0	SER24A, SER182A, LYS184A, GLY185A, SER187A, SER187A, GLY205A	N/A	
IG4		TYR9 TRP1 -9.0	TYR90A, TYR90A, TYR90A, LYS184A, SER187A, GLY205A	N/A	
IG5		TYR9 -8.6	HIS41A, LYS184A, SER187A, SER187A	HIS41A PI CATION	

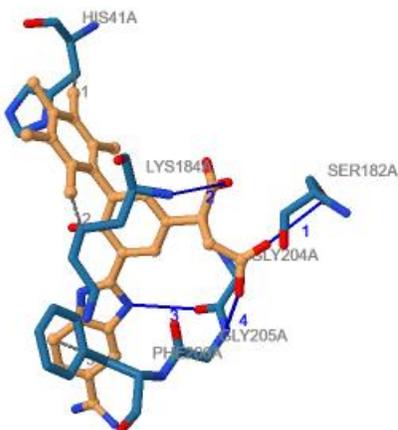
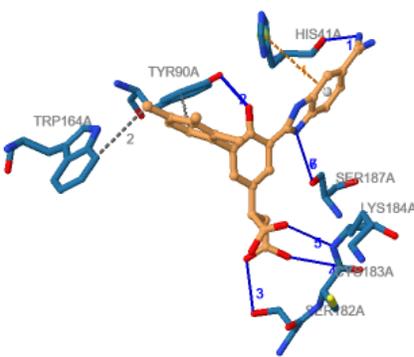
Continuación Cuadro 4

Molécula	Estructura	Energía de unión (kcal/mol)			
		IH	PH	Otras	
IG6		-8.3	0A	TYR90A, HIS41A, SER182A, LYS184A, ASP186A, SER187A	N/A
IG7		-8.6	0A	HIS41A, CYS42A, TYR90A, SER182A, LYS184A, ASP186A, SER187A	N/A
IG8		-8.9	0A	HIS41A, TYR90A, SER182A, LYS184A, ASP186A, SER187A	N/A

Continuación Cuadro 4

Molécula	Estructura	Energía de unión (kcal/mol)			Otras
		IH	PH		
IG9		-8.8		TYR90A, TYR90A, TYR90A, SER182A, CYS183A, LYS184A	HIS41A PI CATION, SER202A PUENTES DE HALOGEN OS
IG10		-8.3		THR25A, HIS41A, TYR90A, ASP181A, SER182A, ASP186A, SER187A, SER187A	N/A
IG11		-8.7		SER24A, ASP181A, SER182A, SER182A, SER182A, GLY185A, ASP186A, ASP186A, GLY204A, GLY205A, GLY205A	N/A

Continuación Cuadro 4

Molécula	Estructura	Energía de unión (kcal/mol)			Otras
		IH	PH		
IG12		-9.0	06A		N/A
IG13		-8.7	64A		N/A

Por último, se analizaron los inhibidores en ADMETMESH. Se evaluó la regla de Lipinski, la permeabilidad Caco-2, Clearance (CL) y la vida media ( $T_{1/2}$ ). Se compararon los valores obtenidos y se observó que todos los inhibidores tienen poca permeabilidad Caco-2, baja Clearance y alta vida media. La mayoría de los compuestos cumplen con la regla de Lipinski. A partir de los valores observados se seleccionó la mejor molécula inhibidora.

Cuadro 5. Parámetros farmacológicos de Regla de Lipinski, permeabilidad Caco-2, Clearance y Vida media

Molécula	Regla de lipinski	Permeabilidad Caco-2 (log cm/s)	Clearance (ml/min/kg)	Vida media ( $T_{1/2}$ )
1	aceptada	-6.618	0.357	0.838
2	aceptada	-6.657	0.367	0.863
3	aceptada	-6.665	0.489	0.828
4	aceptada	-6.585	0.355	0.781

Continuation Cuadro 5

	Regla de Molecula lipinski	Permeabilidad Caco- 2 (log cm/s)	Clearance (ml/min/kg)	Vida media (T <sub>1/2</sub> )
	5 aceptada	-6.58	0.333	0.818
	6 aceptada	-6.655	0.507	0.882
	7 aceptada	-6.646	0.417	0.825
	8 aceptada	-6.618	0.474	0.847
	9 aceptada	-6.566	0.337	0.833
	10 aceptada	-6.634	0.74	0.889
	11 rechazada	-6.669	0.595	0.702
	12 aceptada	-6.542	0.256	0.861
	13 aceptada	-6.669	0.502	0.89
	14 aceptada	-6.644	0.409	0.805
	15 aceptada	-6.558	0.315	0.826
	16 aceptada	-6.535	0.236	0.847
IG1	rechazada	-6.702	1.044	0.871
IG2	aceptada	-6.617	1.018	0.855
IG3	rechazada	-6.252	0.476	0.663
IG4	rechazada	-6.42	0.312	0.796
IG5	aceptada	-6.601	0.241	0.793
IG6	rechazada	-6.775	0.815	0.797
IG7	aceptada	-6.594	0.526	0.832
IG8	aceptada	-6.452	0.252	0.815
IG9	rechazada	-6.594	0.409	0.772
IG10	rechazada	-6.734	0.703	0.929
IG11	rechazada	-6.761	0.866	0.921
IG12	rechazada	-6.497	0.45	0.656
IG13	aceptada	-6.545	0.351	0.761

## VII. DISCUSIÓN

El *Heloderma h. charlesbogerti* es una especie endémica de Guatemala. Su saliva contiene toxinas que pueden causar aumento de presión, parálisis, entre otras. Se conoce muy poco de las toxinas involucradas y su estudio no se ha desarrollado. Se conoce por la literatura varias toxinas como la: Helodermatina, toxina horridum y la gilatoxina (Beck, 2005). Se ha estudiado previamente algunas toxinas del veneno como exendin 3 y exendin 4 como medicamentos para la diabetes mellitus (Warrell, 2014). Sin embargo, se desconoce mucho de la gilatoxina, ya que únicamente se cuenta con la estructura primaria de esta toxina (Utaiincharoen, 1993). Previos estudios han demostrado que la gilatoxina puede inhibirse con DFP, sin embargo se desconoce mucho de la toxina. Se conoce por la literatura que su mecanismo de acción es similar al de las enzimas calicreínas (Utaiincharoen, 1993). El presente estudio tiene como fin analizar de manera *in silico* moléculas inhibidoras de calicreínas como inhibidores de gilatoxina.

Utaiincharoen, obtuvo la estructura primaria de la gilatoxina. Sin embargo, para analizar los inhibidores se necesita de un modelo tridimensional. El modelo 3D fue obtenido a partir de Tasser. El software presentó 5 conformaciones distintas y se trabajó únicamente con la primera predicción, ya que esta contaba con valores de predicción más altos. El modelo utilizado se validó a partir de los parámetros de C-Score, TM-Score y RMSD (ver Cuadro 3) cuyos valores fueron de 1.09, 0.86+- 0.07 y 3.5 +- 2.4. El parámetro C-Score oscila entre [-5,2], siendo 2 el resultado óptimo. Al obtener un valor de 1.09, se muestra que la predicción se asimila bastante a la estructura desconocida. Los valores de TM-Score y de RMSD se obtienen a partir de correlaciones provenientes de C-Score. El RMSD obtenido, a pesar de ser un valor alto, no determina que la predicción sea imprecisa. Esto se debe a que el RMSD se ve afectado por pequeños errores locales. Por último, un TM-Score mayor a 0.5 representa que la topología de la molécula se acerca a la de la estructura desconocida (Yang, 2015), (Yang, 2015) y (Zheng 2021, & Kufareva & Abagyan, 2011).

Young, presenta 16 moléculas inhibitorias de calicreínas. Estas 16 moléculas son variaciones de una molécula base realizando sustituciones en un anillo aromático de la molécula (Young, 2006). Las 16 moléculas se tomaron como candidatos para anclaje molecular buscando determinar su energía de unión con el modelo 3D generado. Como se observa en el Cuadro 4 las moléculas con energías de unión más negativas fueron las moléculas 1,2,9,11,13,14,15 y 16. Estas moléculas tienen grupos funcionales como el éter de metilo cuya energía fue la más alta (-9.0kcal/mol), también grupos metilo en posición para y orto (-8.9kcal/mol y -8.8kcal/mol), así como la falta de sustituyentes (-8.8kcal/mol). Otros grupos como amidas, aminas, alcoholes y el cloro también tuvieron energías mayores a 8.6Kcal/mol (Trott & Olson, 2010 & Eberhardt *et al*, 2021).

Tomando en cuenta los resultados de las moléculas propuestas por la literatura, se propusieron distintos cambios a las mejores moléculas para analizar posibles derivados como inhibidores. Por ejemplo, la molécula clorada no 16, como ya se había analizado las posiciones orto, para y meta, se decidió agregar más cloros en todo el anillo aromático del inhibidor y agregar cloros únicamente en las primeras 3 posiciones del anillo aromático como en las moléculas IG3 e

IG4. Este cambio generó un mejor inhibidor ya que su energía de unión cambió de -8.7kcal/mol a -9.0kcal/mol, lo cual demuestra que mejoró su afinidad al sitio activo. Se observó que la energía de unión aumentó al aumentar la cantidad de sustituyentes con los metilos e hidróxidos donde su energía aumentó de -8.9kcal/mol y -8.6kcal/mol a -9.0kcal/mol y -8.7kcal/mol respectivamente. El cambio de sustituyente metilo de la molécula 15 por un etil(IG8) resultó dar un sustituyente igual de efectivo, por lo que los alcanos en posición para muestra ser una opción viable para el inhibidor. El cambio de éter en la molécula 14 por una amina (IG2) mostró una disminución en la energía de unión que pasó de -9.0kcal/mol a -8.8kcal/mol que es un valor aceptable para la inhibición. Se puede notar que todas las propuestas, a excepción del IG6 e IG10, tienen energías de unión aceptables, siendo estas más negativas que -8.6kcal/mol. Se pueden destacar las moléculas con amina sustituida (IG2), las halogenadas (IG3, IG4, IG9), y la etilada (IG8) que obtuvieron las energías de unión más negativas siendo estas de -8.8kcal/Mol a -9.0kcal/mol. Por lo que las propuestas cumplen también con ser posibles inhibidores de la gilatoxina (Trott & Olson, 2010 & Eberhardt *et al*, 2021)..

Es de interés también notar que todos los anclajes presentan las moléculas alrededor del mismo sitio en la toxina. Se puede notar que distintos ligandos quedan con anillos aromáticos sobrepuestos. Esto es un indicador de que los ligandos se unieron en el sitio activo. Esto también puede observarse al comparar los aminoácidos predichos en el sitio activo (ver Cuadro 3) con los aminoácidos encontrados por el anclaje molecular (ver Cuadro 4). Los aminoácidos en común de ambos grupos (predichos por el modelo 3D y encontrados por anclaje con alguno de los candidatos) son: HIS41A, TYR90A, TRP164A, ASP181A, SER182A, CYS183A, LYS184A, SER187A, TRP203A, GLY204A, GLY205A, PHE206A. Entre estos llaman la atención HIS41A, TYR90A, SER182A, LYS184A, ASP186A, SER187A debido a que estuvieron presentes en la mayoría de los posibles inhibidores, donde SER182A y LYS184A estuvieron presentes en más del 90% de las interacciones de las moléculas. La coincidencia de aminoácidos en el anclaje molecular demuestra que la predicción del sitio activo fue correcta (Adasme *et al*, 2021).

Se puede observar que los mejores inhibidores comparten interacciones con los mismos aminoácidos. Por ejemplo, la molécula IG2 y el inhibidor 14 presentan interacciones similares, siendo 1 interacción hidrofóbica con TYR90A y puentes de hidrógeno con HIS41A, TYR90A, SER182A, CYS183A, LYS184A, y SER187A, cumpliendo así con lo esperado, ya que los grupos funcionales en estos inhibidores (la amina con sustituyente metilo y el éter son atractores de electrones). La molécula IG9 presentó un puente de halógeno, lo que no sucedió en las estructuras cloradas de IG3 e IG4. Por otra parte, la molécula IG11, fue la que obtuvo más puentes de hidrógeno, teniendo 11 interacciones de este tipo, lo cual coincide con lo esperado ya que esta molécula se le agregó 5 grupos hidroxilo por lo que tiene más posibilidades de formar puentes de hidrógeno. Los aminoácidos HIS41A y TYR90A son de interés ya que estos mostraron su capacidad para interacciones PI-catión y PI-Stacking respectivamente. Las interacciones PI-catión fueron vistas en la molécula 7, molécula 10, IG5 e IG9. Mientras que las interacciones PI-stacking fueron vistas en las moléculas 4 y 8, ambas de estas moléculas presentan un grupo atractor de electrones (flúor y cetona) por lo que este factor podría ser de interés para generar interacciones de este tipo (Adasme *et al*, 2021).

Al observar las propiedades farmacológicas, se comparan los valores de la regla de Lipinski, la permeabilidad de Caco-2<sub>3</sub>, la vida media ( $T_{1/2}$ ) y el valor de clearance (CL) de los fármacos. Puede notarse que la mayoría de los fármacos aceptan la regla de lipinski, que indica la buena absorción o permeabilidad del fármaco. Otro factor de interés es la permeabilidad de Caco-2, indica la permeabilidad que tendrá el fármaco en la línea celular del colon humano, donde un valor mayor a  $-5.15 \log \text{cm/s}$  es aceptable. Por último, el valor CL indica la distribución, vida media y frecuencia de dosis de un medicamento, ya que el factor indica que tan fácilmente el cuerpo puede limpiarse del medicamento, esto también puede verse reflejado en el valor de la vida media del fármaco. Los criterios para CL son  $15 \text{ml/min/kg} > \text{CL} > 5 \text{ml/min/kg}$  y para  $T_{1/2} < 0.3$ . Se puede notar que la permeabilidad Caco-2 no se cumple para ninguna molécula, sin embargo se tienen valores cercanos como  $-6.2 \log \text{cm/s}$  para la molécula IG3 (Ver Cuadro 5). Aunque esta molécula tiene la puntuación más alta para la permeabilidad Caco-2, esta molécula no cumple con la regla de Lipinski por lo que se debe buscar otro candidato con los mejores valores. La IG2 será entonces una buena opción ya que, aunque tiene una permeabilidad Caco-2 de  $-6.617 \log \text{cm/s}$ , la regla de lipinski es aceptada y es la molécula que tiene un mayor puntaje en CL, siendo esta de  $1.018 \text{ml/min/kg}$  con un valor  $T_{1/2}$  de  $0.855$ . Se puede comparar IG2 con la molécula 14 que presenta resultados similares al ser una molécula con un grupo funcional similar. La molécula 14 cumple con la regla de Lipinski y presenta valores de  $-6.644 \log \text{cm/s}$  para Caco-2,  $0.409 \text{ml/min/kg}$  para CL y  $T_{1/2}$  de  $0.805$ . Se puede observar que sus puntuaciones son similares en permeabilidad Caco-2, sin embargo IG2 tiene un valor CL de más del doble que el de la molécula 14, a pesar de tener una vida media similar. Otra opción por sus propiedades farmacológicas es la molécula 10 que presenta un valor de CL de  $0.74 \text{ml/min/kg}$ , regla de lipinski aceptada y una permeabilidad de Caco-2 de  $-6.634 \log \text{cm/s}$ . Sin embargo, la molécula 10 no destacó por su capacidad de inhibir a la toxina, aunque por sus valores farmacológicos puede tomarse en cuenta para futuros estudios. Dados los resultados del anclaje molécula y sus propiedades farmacológicas que resultaron ser las mejores se selecciona IG2 como el mejor candidato analizado de los inhibidores de la gilatoxina (Xiong *et al*, 2021).

## VIII. CONCLUSIONES

Se predijo exitosamente el modelo 3D de la gilatoxina a partir de su estructura primaria. Esto se validó a partir de los valores de confianza obtenidos. El C-Score obtenido fue de 1.09, el TM-Score fue de  $0.86 \pm 0.07$ , y RMSD de  $3.5 \pm 2.4$ . A pesar de tener un valor alto para el RMSD, este factor no determina por completo si el modelo se acerca a la estructura desconocida ya que este parámetro se ve afectado por pequeños errores locales en la molécula. El valor alto de C-Score y de TM-Score demuestran que la topología de la molécula se asemeja a la estructura 3D real de la gilatoxina.

Se comprobó por medio de las interacciones de los distintos anclajes moleculares que los aminoácidos predichos en el sitio activo son correctos. Estos aminoácidos son: SER24A, THR25A, HIS41A, CYS42A, TYR90A, TYR140A, TRP164A, ASP181A, SER182A, CYS183A, LYS184A, GLY185A, ASP186A, SER187A, TRP203A, GLY204A, GLY205A, PHE206A. Entre estos aminoácidos cabe destacar a HIS41A, TYR90A, SER182A, SER184A y SER187A tienen altos índices de presencia entre los inhibidores analizados, donde SER182A y SER184A se encontraron presentes en más del 90% de los aminoácidos.

La molécula IG2 es la mejor opción de inhibidor de la gilatoxina gracias a su energía de unión  $-8.8 \text{ kcal/mol}$ . Se encontraron interacciones hidrofóbicas con los aminoácidos TYR90A y puentes de hidrógeno con los aminoácidos HIS41A, TYR90A, TRP164A, SER182A, CYS183A, LYS184A, SER187A. Además de la energía de unión, los valores obtenidos para los parámetros farmacológicos también fueron tomados en cuenta para seleccionar el mejor inhibidor. En el caso de IG2, la regla de Lipinski fue aceptada, su permeabilidad Caco-2 fue de  $-6.617$ , clearance de  $1.018$ . Aunque algunos de los parámetros no cumplieron con los valores esperados, como lo fue la permeabilidad Caco-2 y el clearance, esta molécula presentó los mejores resultados entre todo el grupo de inhibidores.

## IX. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar un estudio para obtener la estructura terciaria de la gilatoxina para comparar con la estructura predicha. De esta forma se podrá determinar de una mejor manera si los inhibidores analizados son efectivos.

Se recomienda dar seguimiento a la investigación realizando la síntesis de IG2 y realizar un análisis in vitro que permita determinar su potencial farmacéutico.

## X. BIBLIOGRAFÍA

- Adasme, M. F., Linnemann, K. L., Bolz, S. N., Kaiser, F., Salentin, S., Haupt, V. J., & Schroeder, M. (2021). *PLIP 2021: expanding the scope of the protein–ligand interaction profiler to DNA and RNA*. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W530–W534. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB294>
- Alagon, A. (1986). *Helodermatine, a kallikrein-like, hypotensive enzyme from the venom of Heloderma horridum horridum (Mexican beaded lizard)*. *Journal of Experimental Medicine*, 164(6), 1835–1845. doi:10.1084/jem.164.6.1835
- Ariano-Sánchez, D. (2008). *Envenomation by a wild Guatemalan Beaded Lizard Heloderma horridum charlesbogerti*. *Clinical Toxicology*, 46(9), 897–899. doi: 10.1080/15563650701733031
- Beck, D. (2005). *Biology of Gila Monsters and Beaded Lizards, Chapter 3: The Venom System*.
- CONAP *et al.* (2020). *Estrategia Nacional de Conservación del Heloderma y su Hábitat 2020-2025*. Publicación técnica No. 8-2020 extraído de: <https://conap.gob.gt/wp-content/uploads/2020/10/Estrategia-de-Conservacio%CC%81n-del-Heloderma.pdf>
- Eberhardt, J., Santos-Martins, D., Tillack, A.F., Forli, S. (2021). *AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings*. *Journal of Chemical Information and Modeling*.
- Hanwell, M., Curtis, D., Lonie, D.C., Vandermeersch, T., Zurek, E., & Hutchison, G. (2012). *Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform*. *Journal of Cheminformatics*, 4, 17 - 17.
- Kalinska M.; Meyer-hoffert, U.; Kantyka, T; Potempa, J. (2015). *Kallikreins - the melting pot of activity and function*. doi:10.1016/j.biochi.2015.09.023
- Kufareva, I., & Abagyan, R. (2011). *Methods of Protein Structure Comparison. Homology Modeling*, 231–257. doi:10.1007/978-1-61779-588-6\_10
- Nguyen NT, Nguyen TH, Pham TNH, Huy NT, Bay MV, Pham MQ, Nam PC, Vu VV, Ngo ST. (2020) *Autodock Vina Adopts More Accurate Binding Poses but Autodock4 Forms Better Binding Affinity*. *J Chem Inf Model*. 2020 Jan 27;60(1):204-211. doi: 10.1021/acs.jcim.9b00778. Epub 2020 Jan 7. PMID: 31887035.
- Nikai, T.;Imai, K; Sugihara, H.; Tu, A. (1988). *Isolation and characterization of horridum toxin with arginine ester hydrolase activity from Heloderma horridum (beaded lizard) venom*. , 264(1), 0–280. doi:10.1016/0003-9861(88)90594-2
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). *UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis*. *Journal of computational chemistry*, 25(13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Strimple, P; Tomassoni, A; Otten; E; Bahner, d. (1997). *Report on envenomation by a Gila monster (Heloderma suspectum) with a discussion of venom apparatus, clinical findings, and treatment*. , 8(2), 111–116. doi:10.1580/1080-6032(1997)008[0111:roebag]2.3.co;2
- Swissmodel (2020). P43685 (GILX\_HELHO) *Heloderma horridum horridum (Mexican beaded lizard)*, [versión electrónica]

- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). *AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading*. *Journal of computational chemistry*, 31(2), 455-461.
- Utaisinchaoen P, Mackessy SP, Miller RA, Tu AT. (1993). *Complete primary structure and biochemical properties of gilatoxin, a serine protease with kallikrein-like and angiotensin-degrading activities*. *J Biol Chem*. 268(29):21975-83. PMID: 8408054.
- Warrell, D. A. (2014). *Venomous and Poisonous Animals*. Manson's Tropical Infectious Diseases (Twenty-Third Edition). <https://doi.org/10.1016/c2010-0-66223-7>
- Wever, E. (2019). *The Reptile Ear* || Chapter 11. The Varanidae and Helodermatidae: Monitors and Beaded Lizards. , 10.1515/9780691196664(), 396–420. doi:10.1515/9780691196664-013
- Xiong, G., Wu, Z., Yi, J., Fu, L., Yang, Z., Hsieh, C., Yin, M., Zeng, X., Wu, C., Lu, A., Chen, X., Hou, T., & Cao, D. (2021). *ADMETlab 2.0: an integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties*. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W5– W14. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB255>
- Yang J., Yan R., Roy A., Xu D., Poisson J., Zhan Y. (2015). *The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction*. *Nature Methods*, 12, 7-8.
- Yang J., Zhang Y. (2015). *I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions*. *Nucleic Acids Research*, 43, W174-W181.
- Young, W. B., Rai, R., Shrader, W. D., Burgess-Henry, J., Hu, H., Elrod, K. C., ... Mordenti, J. (2006). *Small molecule inhibitors of plasma kallikrein*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16(7), 2034–2036. doi:10.1016/j.bmcl.2005.12.060
- Zheng W., Zhang C., Li Y., Pearce R., Bell EW., Zhang Y. (2021). *Folding non-homology proteins by coupling deep-learning contact maps with I-TASSER assembly simulations*. *Cell Reports Methods*, 1. 100014.

## XI. ANEXOS

Cuadro 6. Códigos Smiles de las moléculas evaluadas

Molecula	Codigo Smiles
1	<chem>N=C(N)c4ccc3nc(c2cc(C(CC(=O)O)C(=O)O)cc(c1cccc1)c2O)[nH]c3c4</chem>
2	<chem>N=C(N)c4ccc3nc(c2cc(C(CC(=O)O)C(=O)O)cc(c1cccc1O)c2O)[nH]c3c4</chem>
3	<chem>COc1cccc1c4cc(C(CC(=O)O)C(=O)O)cc(c3nc2ccc(C(=N)N)cc2[nH]3)c4O</chem>
4	<chem>N=C(N)c4ccc3nc(c2cc(C(CC(=O)O)C(=O)O)cc(c1cccc1F)c2O)[nH]c3c4</chem>
5	<chem>Cc1cccc1c4cc(C(CC(=O)O)C(=O)O)cc(c3nc2ccc(C(=N)N)cc2[nH]3)c4O</chem>
6	<chem>N=C(N)c4ccc3nc(c2cc(C(CC(=O)O)C(=O)O)cc(c1cccc(O)c1)c2O)[nH]c3c4</chem>
7	<chem>COc4cccc(c3cc(C(CC(=O)O)C(=O)O)cc(c2nc1ccc(C(=N)N)cc1[nH]2)c3O)c4</chem>
8	<chem>CC(=O)c4cccc(c3cc(C(CC(=O)O)C(=O)O)cc(c2nc1ccc(C(=N)N)cc1[nH]2)c3O)c4</chem>
9	<chem>Cc4cccc(c3cc(C(CC(=O)O)C(=O)O)cc(c2nc1ccc(C(=N)N)cc1[nH]2)c3O)c4</chem>
10	<chem>N#Cc4cccc(c3cc(C(CC(=O)O)C(=O)O)cc(c2nc1ccc(C(=N)N)cc1[nH]2)c3O)c4</chem>
11	<chem>N=C(N)c4ccc3nc(c2cc(C(CC(=O)O)C(=O)O)cc(c1cccc(C(N)=O)c1)c2O)[nH]c3c4</chem>
12	<chem>N=C(N)c4ccc3nc(c2cc(C(CC(=O)O)C(=O)O)cc(c1cccc(Cl)c1)c2O)[nH]c3c4</chem>
13	<chem>N=C(N)c4ccc3nc(c2cc(C(CC(=O)O)C(=O)O)cc(c1ccc(O)cc1)c2O)[nH]c3c4</chem>
14	<chem>COc4cccc(c3cc(C(CC(=O)O)C(=O)O)cc(c2nc1ccc(C(=N)N)cc1[nH]2)c3O)cc4</chem>
15	<chem>Cc4ccc(c3cc(C(CC(=O)O)C(=O)O)cc(c2nc1ccc(C(=N)N)cc1[nH]2)c3O)cc4</chem>
16	<chem>N=C(N)c4ccc3nc(c2cc(C(CC(=O)O)C(=O)O)cc(c1ccc(Cl)cc1)c2O)[nH]c3c4</chem>
IG1	<chem>CNC(=O)c4cccc(c3cc(C(CC(=O)O)C(=O)O)cc(c2nc1ccc(C(=N)N)cc1[nH]2)c3O)c4</chem>
IG2	<chem>CNc4ccc(c3cc(C(CC(=O)O)C(=O)O)cc(c2nc1ccc(C(=N)N)cc1[nH]2)c3O)cc4</chem>
IG3	<chem>N=C(N)c4ccc3nc(c2cc(C(CC(=O)O)C(=O)O)cc(c1ccc(Cl)c(Cl)c1Cl)c2O)[nH]c3c4</chem>
IG4	<chem>N=C(N)c4ccc3nc(c2cc(C(CC(=O)O)C(=O)O)cc(c1c(Cl)c(Cl)c(Cl)c(Cl)c1Cl)c2O)[nH]c3c4</chem>
IG5	<chem>CCOc4cccc(c3cc(C(CC(=O)O)C(=O)O)cc(c2nc1ccc(C(=N)N)cc1[nH]2)c3O)cc4</chem>
IG6	<chem>COc4cccc(c3cc(C(CC(=O)O)C(=O)O)cc(c2nc1ccc(C(=N)N)cc1[nH]2)c3O)c(OC)c4OC</chem>
IG7	<chem>COCc4cccc(c3cc(C(CC(=O)O)C(=O)O)cc(c2nc1ccc(C(=N)N)cc1[nH]2)c3O)cc4</chem>
IG8	<chem>CCc4cccc(c3cc(C(CC(=O)O)C(=O)O)cc(c2nc1ccc(C(=N)N)cc1[nH]2)c3O)cc4</chem>
IG9	<chem>N=C(N)c4ccc3nc(c2cc(C(CC(=O)O)C(=O)O)cc(c1c(F)c(F)c(F)c(F)c1F)c2O)[nH]c3c4</chem>
IG10	<chem>N=C(N)c4ccc3nc(c2cc(C(CC(=O)O)C(=O)O)cc(c1ccc(O)c(O)c1O)c2O)[nH]c3c4</chem>
IG11	<chem>N=C(N)c4ccc3nc(c2cc(C(CC(=O)O)C(=O)O)cc(c1c(O)c(O)c(O)c(O)c1O)c2O)[nH]c3c4</chem>
IG12	<chem>Cc4c(C)c(C)c(c3cc(C(CC(=O)O)C(=O)O)cc(c2nc1ccc(C(=N)N)cc1[nH]2)c3O)c(C)c4C</chem>
IG13	<chem>Cc4ccc(c3cc(C(CC(=O)O)C(=O)O)cc(c2nc1ccc(C(=N)N)cc1[nH]2)c3O)c(C)c4C</chem>

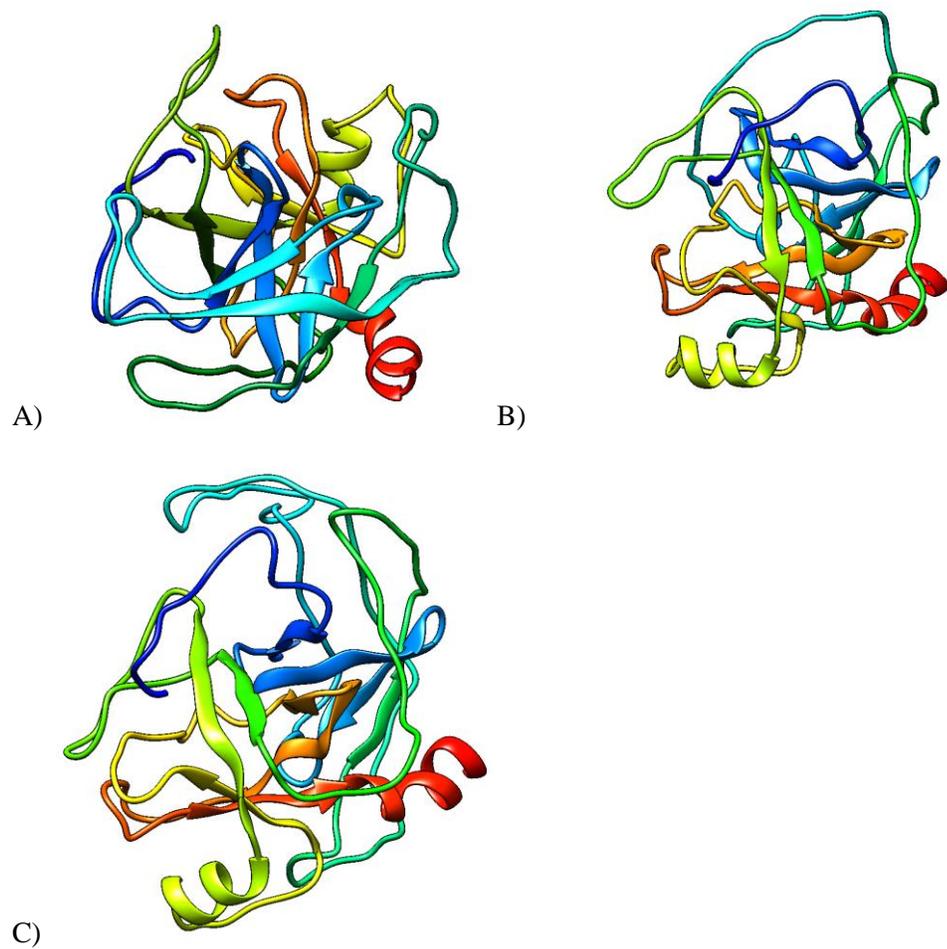


Figura 4. A) Modelo 1 obtenido por I-Tasser utilizado en este estudio. B) Modelo 2 obtenido por I-Tasser. C) Modelo 3 obtenido por Tasser