

TRABAJO DE FIN DE GRADO
GRADO EN BIOTECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE POTENCIALES INHIBIDORES DE
LA ACTIVIDAD FERREDOXINA REDUCTASA EN *Xanthomonas*
axonopodis pv *citri*, QUE ACTÚA COMO PATÓGENO EN
CULTIVOS DE CÍTRICOS

Autor: Sergio Javier Carrazana Villalba

Directora: Dra. Marta Martínez Júlvez
Directora: Dra. Milagros Medina Trullenque



Universidad
Zaragoza



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 FPRs: oxidoreductasas bacterianas	3
1.2 El fitopatógeno <i>Xanthomonas</i> y el cáncer de cítricos.....	7
1.3 Selección de compuestos líderes para el desarrollo de fármacos.....	9
1.4 Antecedentes	10
2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1 Medición de la actividad diaforasa de la <i>XacFPR</i>	13
3.2 Medida de los IC50 de los compuestos.....	14
3.3 Ajustes de los datos cinéticos	14
3.4 Estudios de Acoplamiento Molecular enzima-compuesto (" <i>Docking</i> ").....	16
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
4.1 Actividad diaforasa de <i>XacFPR</i>	16
4.2 Estudio del efecto del DMSO sobre la actividad diaforasa de <i>XacFPR</i>	17
4.3 IC50 de los compuestos con acción inhibidora	17
4.4 Estudio cinético entre la <i>XacFPR</i> en presencia del compuesto 12 (C12).....	20
4.5 Interacción simulada entre <i>XacFPR</i> y el compuesto 12	26
5. CONCLUSIONES	27
5. CONCLUSIONS	27
6. BIBLIOGRAFÍA	29
7. ANEXOS	A.I

RESUMEN

Este trabajo se incluye dentro de un proyecto de búsqueda de compuestos que presenten acción bactericida contra el microorganismo patógeno *Xanthomonas axonopodis* pv citri (*Xac*), una bacteria que causa la enfermedad del cáncer de cítricos.

Xanthomonas es una bacteria Gram negativa que posee una enzima, la NADPH-flavodoxina (ferredoxina) reductasa (*XacFPR*), que se ha utilizado en este proyecto como diana terapéutica, debido a sus diferencias estructurales y funcionales con sus homólogas en las células eucariotas vegetales, las FNRs plastídicas. De este modo se busca inhibir la enzima del fitopatógeno sin ocasionar daño a la planta hospedadora mediante el descubrimiento de un bactericida eficaz.

El objetivo supone todo un reto, ya que existe un método efectivo para evitar los efectos de *Xanthomonas*, que incluyen graves daños en los cítricos de diferentes países del mundo, incluyendo España, reduciendo enormemente la producción, lo que conlleva grandes pérdidas económicas sin que existan métodos efectivos para frenar su avance.

Los potenciales inhibidores de la *XacFPR* estudiados en esta memoria, 43 compuestos, fueron seleccionados con anterioridad mediante cribado masivo a partir de una quimioteca formada por 11.120 compuestos. En este trabajo se ha medido el valor IC50 de estos compuestos mediante la actividad diaforasa de la *XacFPR* y se han realizado ajustes globales de los datos cinéticos obtenidos en presencia de un compuesto con alta eficacia de inhibición, a las funciones de Michaelis-Menten y sus inversos modificadas por el factor de inhibición para determinar el tipo de inhibición.

En este trabajo se ha concluido que dicho compuesto produce una inhibición efectiva de un 94,6 % de la actividad reductasa de la *XacFPR* y con un IC50 de 9.7 μ M mediante un posible mecanismo de inhibición no competitiva, con un valor de K_i de 5 μ M. Los experimentos preliminares de acoplamiento molecular, "*docking*", muestran que dicho compuesto se une a *XacFPR* en el sitio donde se encuentra el cofactor FAD.

Con este compuesto seleccionado se podrán realizar pruebas de inhibición *in vivo* donde se comprobará la efectividad del bactericida y su inocuidad en las plantas hospedadoras.

ABSTRACT

This work forms part of a search for compounds which exhibit bactericidal action against the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* (*Xac*), a bacterium that causes citrus canker.

Xanthomonas is a gram-negative bacterium that has an enzyme, NADPH-flavodoxin (ferredoxin) reductase (FPR), which has been used in this project as a therapeutic target because of its structural and functional differences with its counterpart in eukaryotic plant cells, plastidic FNRs. Thus we seek to inhibit the phytopathogen enzyme without causing damage to the host plant, this is, finding an effective bactericide.

The goal is a significant challenge, as there are not effective ways to stop the effects of *Xac*, which includes serious damage in different countries, including Spain, where there is a significant reduction of production, leading to huge economic losses with no existence of effective methods to stop its advance.

Potential inhibitors of *Xac*FPR analyzed in this project, 43 compounds, were previously selected by high throughput screening of a chemical library consisted of 11,120 compounds. In this study it has been measured the IC₅₀ value of these potential inhibitors in the reductase activity of *Xac*FPR and a kinetic characterization in the presence of one of them, which showed high inhibitory action, was performed.

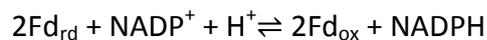
It was concluded that compound 12 produces an effective inhibition of the reductase activity of *Xac*FPR showing an IC₅₀ of 9.7 μ M acting through a non-competitive inhibition mechanism, with a K_i value of 5 μ M. First docking studies suggest that the compound binds to *Xac*FPR on the FAD binding site.

This compound and others that are promising for inhibiting the activity of the *Xac*FPR will be later tested for *in vivo* inhibition assays in where true bactericidal effectiveness and safety to the host plants will be checked.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 FPRs: oxidoreductasas bacterianas

Las ferredoxina-NADP⁺ oxidorreductasas (FNRs) son un grupo de flavoproteínas encargadas de catalizar la transferencia de electrones entre el coenzima NADP⁺/H y proteínas transportadoras de un solo electrón como las ferredoxinas (Fd) o las flavodoxinas (Fld) [1]. Este grupo de enzimas se encuentra tanto en cloroplastos de plantas, como en cianobacterias y algas e incluso en mitocondrias o bacterias no fotosintéticas. Su función consiste en catalizar la siguiente reacción reversible:



La estructura general de las FNRs se compone de dos módulos de plegamiento independientes: uno de unión a FAD, formado por un barril β antiparalelo con 6 hebras organizadas en dos hojas ortogonales y separadas por una hélice α , y otro de unión a NADP⁺/H, compuesto por una lámina de cinco hebras β paralelas rodeada por 6 hélices α , que es una modificación del motivo Rossman de unión a nucleótidos [2].

Las FNRs presentan como cofactor una molécula de mononucleótido de flavina y adenina (FAD) por molécula de apoproteína, unida de forma no covalente. El FAD (Figura 1) se sintetiza a partir de la riboflavina o vitamina B2 a través de dos reacciones consecutivas de fosforilación y adenililación. Este proceso es llevado a cabo por dos enzimas independientes en células eucariotas, y por una enzima bifuncional en células procariontas: la FAD sintetasa [3].

La molécula de FAD contiene un triple anillo de isoaloxacina que puede encontrarse en tres estados de óxido-reducción diferentes en el interior de las flavoproteínas: totalmente oxidado o quinona (ox), reducido por un solo electrón o semiquinona (sq), y reducido por dos electrones o hidroquinona (hq). Esta propiedad de estabilizar tres estados de óxido-reducción diferentes hace de las flavoproteínas importantes conectores biológicos entre donadores/aceptores obligados de uno y dos electrones.

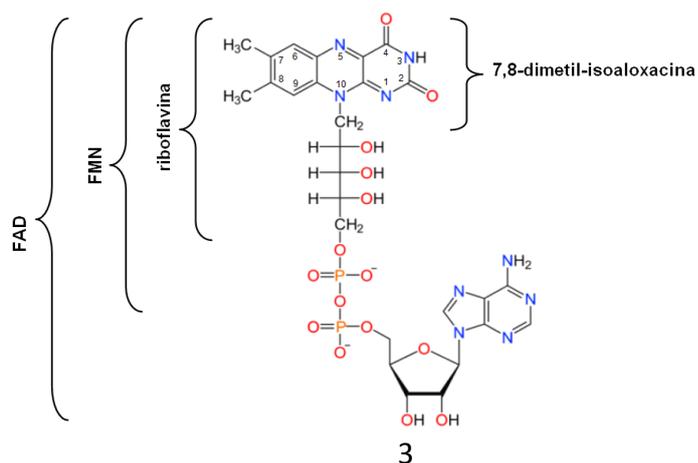


Figura 1: Estructura de los derivados de la 7,8-dimetil-isoaloxacina: riboflavina, FMN y FAD.

Las FNRs actúan con un coenzima, el NAD(P)⁺/H. Estos nucleótidos de piridina, NAD⁺ y NADP⁺, junto con sus formas reducidas NADH y NADPH, se sintetizan a partir de la niacina o vitamina B3. Constan de una adenosina (fosforilada en posición 2' de la ribosa en el caso del NADP (2'-P-AMP)), un grupo pirofosfato (PP_i), una ribosa y un anillo de nicotinamida unido en β (NMN) (Figura 2). Este anillo de nicotinamida pasa de estado oxidado a reducido mediante la captación o cesión de dos electrones y un protón, o lo que es lo mismo, la transferencia de un ion hidruro en un único paso.

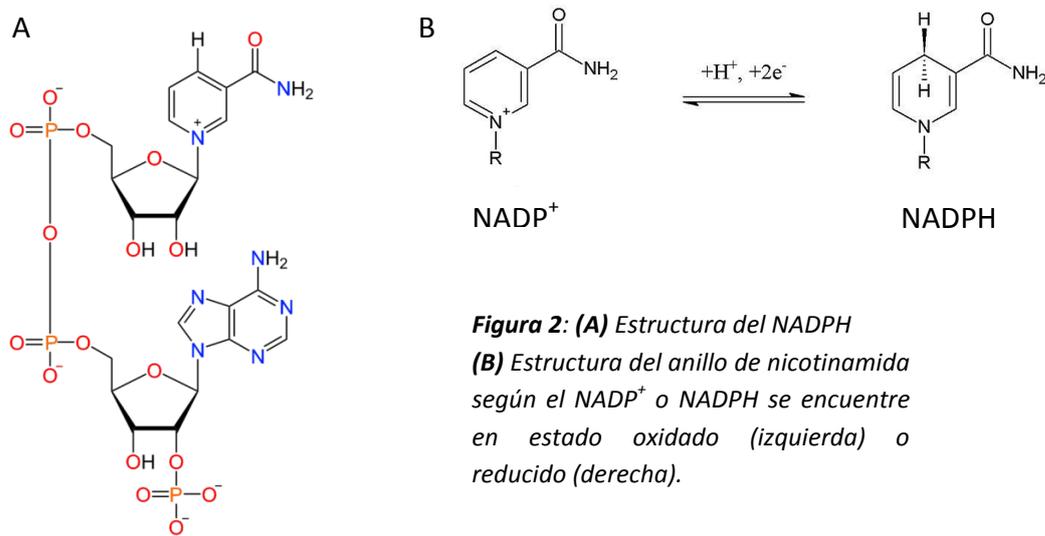


Figura 2: (A) Estructura del NADPH
(B) Estructura del anillo de nicotinamida según el NADP⁺ o NADPH se encuentre en estado oxidado (izquierda) o reducido (derecha).

Las FNRs se dividen en dos clases: las de tipo planta y las de tipo glutatión reductasa (GR) (Figura 3). El primer grupo comprende a las oxidorreductasas presentes en cloroplastos, plástidos no fotosintéticos, cianobacterias y proteobacterias, mientras que las del segundo grupo se han encontrado en mitocondrias de animales y levaduras, así como en algunas bacterias. Las reductasas de tipo planta a su vez se subdividen en plastídicas y bacterianas (que se conocen como FPRs).

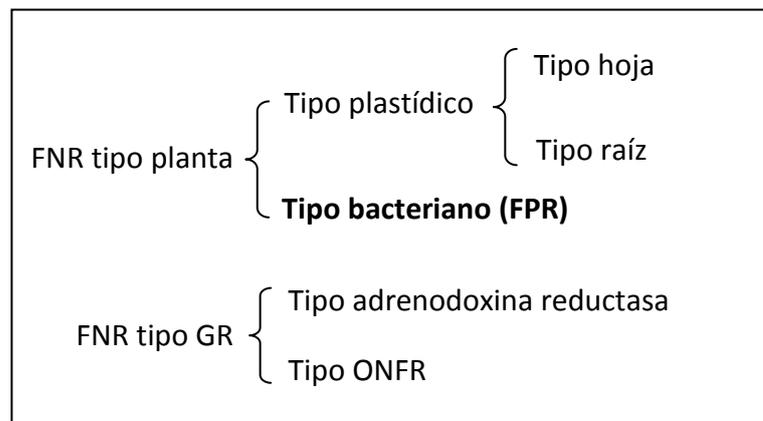


Figura 3: Clasificación de las FNRs.

Las FPRs bacterianas están presentes en α - y γ -proteobacterias con metabolismos heterótrofos como *E. coli*, *Xanthomonas* y *Pseudomonas*, o que realizan la fotosíntesis anoxigénica como *Rhodobacter*, donde participan en procesos de detoxificación y eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS) [4]. Su síntesis se induce en presencia del ion superóxido, y está controlada por diversos mecanismos de respuesta a estrés oxidativo. Cuando no se dan estas condiciones de estrés oxidativo, la FPR tiene una cierta expresión basal y participa en diversos procesos metabólicos, como la donación de electrones a la nitrogenasa en el proceso de fijación del nitrógeno en géneros como *Azotobacter* y *Rhodobacter*.

Las FNR plastídicas y las FPRs bacterianas presentan diferencias en su estructura, siendo las más importantes las que se refieren a la zona de unión de la adenina del FAD, ya que las enzimas bacterianas carecen del motivo Yxx de unión a adenosina. También son destacables las diferencias en su extremo carboxilo terminal, pues las FPRs presentan una extensión de entre 1 y 6 residuos de longitud, que no se encuentra en las FNR plastídicas (Figura 4 y Figura A.1 en Anexos).

Por otro lado las FNRs plastídicas unen el cofactor FAD en conformación extendida, mientras que sus homólogas en bacterias lo unen en conformación plegada (Figura 4). En ambos casos las uniones se producen mediante interacciones de apilamiento, contactos de Van der Waals y puentes de hidrógeno en el extremo carboxilo terminal de la proteína.

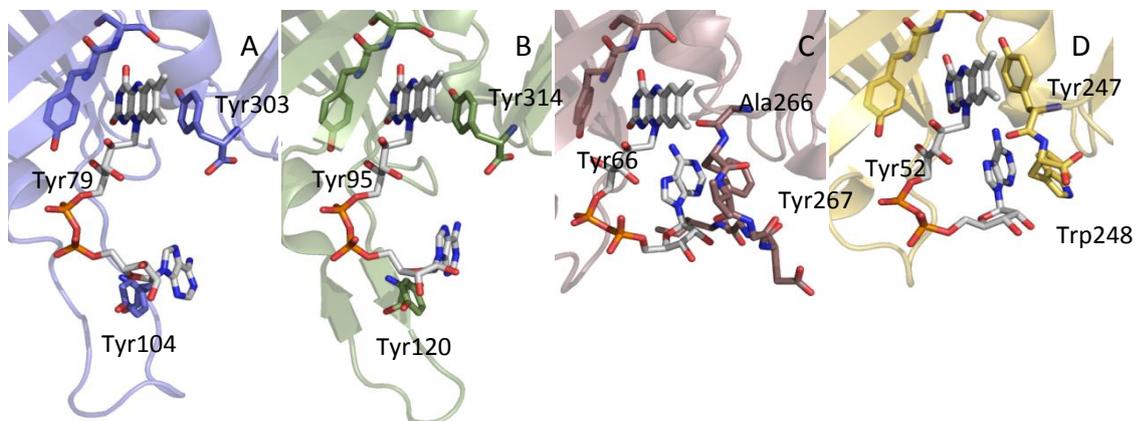


Figura 4: Conformación del cofactor FAD en las **(A)** FNR de *Anabaena* PCC 7119, **(B)** FNR de hoja de maíz, **(C)** FPR de *R. capsulatus* y **(D)** FPR de *E. coli*.

Cabe destacar que las FNRs presentan un residuo terminal de tirosina (Y308 en FNR de guisante) clave para su eficiencia y que se apila contra el FAD. La parte que queda enterrada en la proteína es el anillo de isoaloxacina (Figura 4 y Figura 5). Por el contrario, algunas FPRs carecen de este residuo, presentando todas ellas una secuencia C-terminal adicional. Las

FPRs se dividen a su vez en dos tipos: de clase I ó II, según la naturaleza del residuo enfrenteado con el anillo de adenina del FAD (Figura 5).

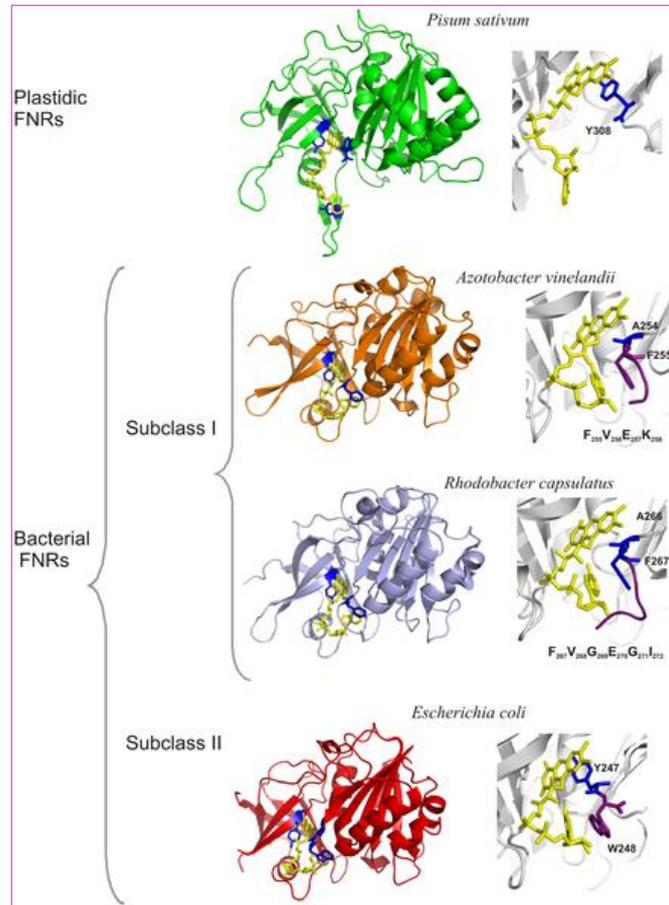


Figura 5: Clasificación de las FNRs según sus motivos estructurales. En las FPRs, si la adenina queda enfrenteada a un residuo alifático o a uno aromático las FPRs son de clase I o II, respectivamente.

Otra diferencia entre las FNRs plastídicas y las FPRs bacterianas es la función que desempeñan en la célula y, por lo tanto, la dirección de la reacción que catalizan (de carácter reductor u oxidativo) (Figura 6).

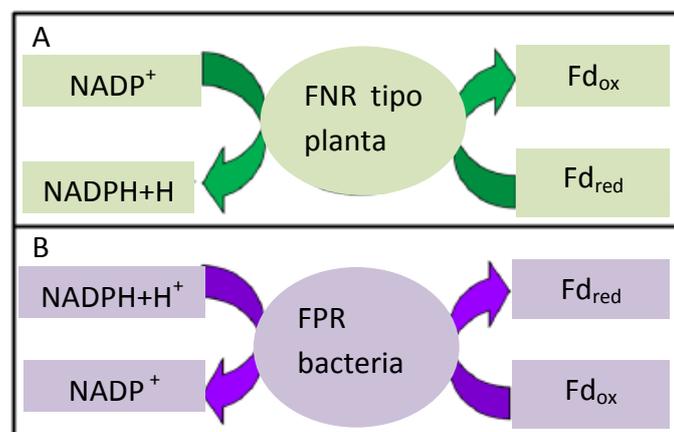


Figura 6: Reacciones de las FNRs según sean plastídicas (A) o bacterianas(B).

En plantas, la FNR desempeña una actividad crucial en la fase luminosa de la fotosíntesis, catalizando la transferencia electrónica entre dos moléculas reducidas de Fd o Fld y una de NADP^+ en el último paso de la cadena de transporte de electrones. Aquí, los electrones procedentes de la luz reducen la proteína ferredoxina y, después, son transferidos a través de la FNR al NADP^+ . El NADPH producido es importante después en rutas metabólicas como la fijación del CO_2 en el ciclo de Calvin. En bacterias, sin embargo, la FPR cataliza la reacción contraria (Figura 6), en la que la enzima transfiere 2 electrones procedentes del NADPH a la ferredoxina (transportador de un solo electrón), que puede así actuar como elemento reductor en los procesos de respuesta a estrés oxidativo. Este estrés es normalmente provocado por las plantas como mecanismo de respuesta a bacterias patógenas como *Xanthomonas axonopodis*.

La flavodoxina oxidorreductasa bacteriana de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* (*XacFPR*) es una FNR de tipo planta, bacteriana y de clase I. Cuenta con una cadena de 262 aminoácidos y tiene un peso molecular aproximado de 30 KDa. Su estructura consta de dos dominios (Figura 7). El dominio N terminal, que abarca los residuos 4-98, se pliega en seis hebras β antiparalelas seguidas de una hélice α . En este dominio se produce la unión del FAD, cerca de la hélice α y las hebras β_4 y β_5 . El otro dominio, el C terminal (residuos 99-259) consta de cinco hebras β paralelas rodeadas por nueve hélices α [7].

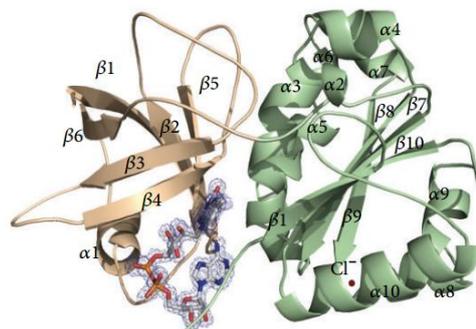


Figura 7: Representación de la estructura tridimensional de la *XacFPR*. Dominio N terminal (dorado), dominio C terminal (verde). El cofactor FAD se muestra en varillas coloreadas con el código CPK. Código PDB: 4B4D.

1.2 El fitopatógeno *Xanthomonas* y el cáncer de cítricos

El género *Xanthomonas* se incluye en el grupo de las γ -proteobacterias, y se compone de bacterias Gram negativas, aerobias estrictas, con forma de bacilos redondeados y con flagelo polar monótrico o único [8]. En cultivo, este género es reconocible por el color amarillo que presentan sus colonias no mucosas debido a un determinado pigmento carotenoide que contiene bromo. Un buen medio para visualizar bien el color indicativo de este género es el YDC agar (*Yeast Extract Dextrose Calcium Carbonate Agar*) [9].

La mayoría de los miembros del género *Xanthomonas* suelen presentar actividad como importantes patógenos en plantas ya que, junto a los hongos, las bacterias son los fitopatógenos más comunes. Aunque los primeros son responsables de muchas de las enfermedades en plantas debido a su prevalencia hay un número significativo de enfermedades bacterianas que se consideran extremadamente destructivas y por lo tanto una amenaza para los cultivos en todo el mundo.

La bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* es la responsable de la enfermedad infecciosa llamada cancrrosis o cancro, que afecta a la mayoría de las variedades comerciales de cítricos, lo que le otorga una relevancia mundial y proporciones epidémicas. Cuenta con una alta diversidad patogénica y, a la vez, bastante uniformidad fenotípica.

La bacteria infecta a la planta a través de los estomas o heridas tisulares y la infección de la bacteria en los cítricos se identifica por sus lesiones en forma de manchas protuberantes de color marrón en las hojas y zonas redondeadas con un halo amarillo y necrótico en frutos, que a su vez presentan un aspecto aceitoso (Figura 8). Las áreas afectadas en las hojas suelen desprenderse con el tiempo dejando unos agujeros característicos [11].



Figura 8: Síntomas del cáncer de cítricos en frutos y hojas infectados por la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*.

Estas lesiones necróticas provocan una caída prematura del fruto y defoliación severa afectando así tanto a la cantidad como a la calidad de la fruta cosechada, lo que provoca graves pérdidas económicas debido al descenso de la producción. Cabe destacar que los frutos infectados no suponen ningún peligro para el ser humano pero, evidentemente, las cicatrices de la infección producen las ya mencionadas pérdidas en la producción agrícola.

El sureste de Asia parece ser donde se originó el cáncer de cítricos pero se ha extendido ampliamente hacia zonas más húmedas y de más altas temperaturas, entre ellas regiones costeras con cultivos de cítricos [12]. Especialmente dañinos son los ataques en áreas que presentan estas condiciones tan favorables para el desarrollo del patógeno y, en consecuencia, de la enfermedad asociada. Estas zonas se encuentran principalmente en Australia, Japón, el Oriente Medio, África, Papúa Nueva Guinea, Sudamérica o el estado

de Florida. Un ejemplo de los cultivos más afectados son la lima mexicana, la uva y la naranja trifoliada. El principal medio por el cual parece haberse expandido es el transporte de frutas, plantas o equipamiento, además de por el hombre, por fenómenos meteorológicos como el viento y la lluvia. Los sistemas de riego por aspersión también facilitan la expansión de la infección, así como los agujeros de *Phyllocnistis citrella*, una larva que produce heridas profundas en los brotes más tiernos de los cítricos (minado). Los adultos realizan la puesta de huevos en estos brotes, donde las larvas que nacen penetran en la hoja y producen los daños tisulares que propician la infección de *Xanthomonas*.

Xanthomonas axonopodis pv *citri* sobrevive en restos orgánicos de plantas y en semillas, lo que provoca una continua infección cíclica difícil de interrumpir o atenuar, por lo que actualmente, no hay un método efectivo para el control de las bacterias en las plantas, siendo la prevención la única alternativa. Los bactericidas o antibióticos vegetales o los tratamientos con cobre desarrollados hasta la fecha no son demasiado eficaces. Se ha investigado en bacteriófagos que inhiban a *X. axonopodis* pero no han demostrado ser aplicables en un extenso número de cepas.

Por eso, en la actualidad estas enfermedades se controlan mediante técnicas biológicas y químicas de prevención. Sin embargo, un control total y erradicación de estas enfermedades bacterianas infecciosas sigue siendo un desafío para agricultores e investigadores. Se debe estudiar a fondo la biología del agente causante, (*X. axonopodis* pv *citri*), la susceptibilidad de cada planta y el efecto de los factores ambientales en la interacción huésped-patógeno (prevención de zonas de posible expansión).

1.3 Selección de compuestos líderes para el desarrollo de fármacos

La forma propuesta de combatir la proliferación de *Xanthomonas* es la identificación de agentes o compuestos que impidan alguna de sus funciones metabólicas vitales. Esto se puede lograr inactivando alguna enzima de una ruta metabólica esencial o que suministre al resto de la célula un componente clave para la realización de sus funciones sin afectar a las enzimas homólogas presentes en la planta hospedadora. En el caso de la *XacFPR* se ha demostrado su implicación en los procesos de respuesta a estrés oxidativo, y por tanto en la supervivencia del patógeno [13]. Esto hace que se pueda considerar una interesante diana terapéutica.

La estrategia seguida en la búsqueda de compuestos con acción inhibidora de la *XacFPR* se ha basado en un primer cribado aleatorio que selecciona compuestos analizando con baja precisión una gran cantidad de moléculas, seguido de un cribado exhaustivo con un número reducido de compuestos seleccionados del amplio grupo de partida.

Una vez se seleccionados los compuestos más prometedores, se observan las características (grupos funcionales, estructura, enlaces...) que tienen en común este grupo de compuestos, para, mediante pequeñas modificaciones, conseguir optimizar la molécula elegida agregando estructuras que favorezcan su actividad o eliminando aquellas que la entorpecen. Esto implicará una segunda fase de desarrollo racional del inhibidor.

El desarrollo racional de inhibidores enzimáticos de alta potencia requiere además un conocimiento profundo de la estructura y función de la molécula diana, obtenido a través de estudios físico-químicos de estabilidad y unión de ligandos, así como de una caracterización enzimática y un análisis estructural y energético mediante la resolución a nivel atómico de interacciones moleculares.

1.4 Antecedentes

Previo al trabajo reflejado en esta memoria se realizó un cribado de alto rendimiento o masivo (*highthroughput screening*) con dos quimiotecas de 1.120 y 10.000 compuestos cada una, disponibles en el Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos (BIFI). A partir de dicho cribado se seleccionaron 43 compuestos que inhibían de forma clara, aunque con distinto rango, la actividad reductasa *in vitro* denominada actividad diaforasa de la *XacFPR*.

Se conoce como actividad diaforasa a la capacidad de algunas enzimas de catalizar la transferencia desde β -NADH o β -NADPH a diversos aceptores artificiales. El aceptor utilizado en este trabajo ha sido el 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP), que recibe dos electrones en un único paso (Figura 9). Aprovechando esta transferencia de electrones, el DCPIP sustituye a la ferredoxina en la reacción proporcionando un grado de color azul medible, ya que en su estado oxidado su pico máximo de absorción se sitúa a 600 nm, y cuando capta los electrones del NADPH disminuye esa absorción tornando a incoloro. Se utiliza esta pérdida de absorbancia para calcular a qué velocidad transcurre la reacción en cada caso.

A pesar de no ser una actividad fisiológica, la actividad diaforasa se utiliza habitualmente para la caracterización de estas enzimas ya que proporciona información muy valiosa acerca de la interacción de la FPR con los nucleótidos de piridina como el NADP⁺ en nuestro caso [13].

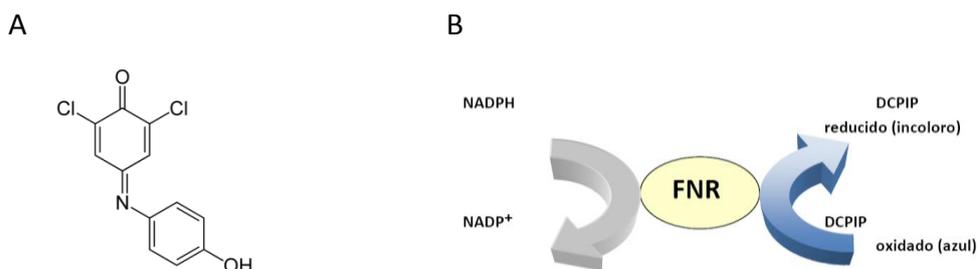
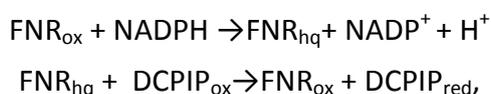


Figura 9: (A) Fórmula química del DCPIP (2,6-diclorofenol-indofenol); (B) Sentido de oxido-reducción durante la actividad diaforasa mediada por FNR. Cambio de color del DCPIP según su estado de oxidación.

La reacción general que se produce es la siguiente:



donde "hq" es "hidroquinona", el estado completamente reducido por 2 electrones del anillo de isoaloxacina del FAD.

Es necesario conocer también las características químicas de los compuestos que muestran acción inhibitoria, con vistas al diseño racional del bactericida. Analizando la composición química de los 43 compuestos de partida (Figura 10) se observó qué grupos funcionales son los que más se repiten: el grupo bencilo sustituido por cloro (33%) y el bencilo sustituido por flúor (19%).

Grupos funcionales de los 43 compuestos de la quimioteca

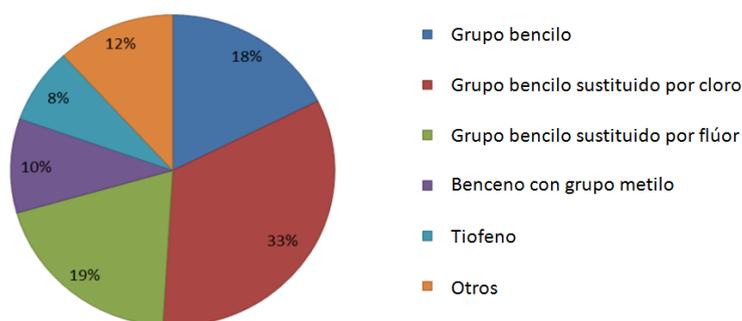


Figura 10: Presencia en porcentajes de los grupos funcionales en los 43 compuestos seleccionados como potenciales inhibidores de la actividad diaforasa de la XacFPR. Se observa que el grupo que más aparece en las estructuras químicas de los compuestos es el bencilo con un H sustituido por un átomo de cloro.

En este trabajo se ha avanzado en el estudio de la acción inhibitoria *in vitro* de 35 de estos 43 compuestos seleccionados de las quimiotecas, y se ha estudiado un compuesto en

profundidad por su alto potencial inhibidor. En posteriores trabajos se evaluará el efecto de los compuestos sobre el crecimiento del patógeno y sobre plantas hospedadoras previamente infectadas con el correspondiente patógeno. La fase final consistirá en ensayos *in vivo* en cultivos afectados para probar su eficacia real.

2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

El objetivo principal de este trabajo es la evaluación de la acción inhibidora de compuestos seleccionados previamente en el grupo de investigación para el diseño de inhibidores de la enzima FPR del fitopatógeno *Xanthomona saxonopodis* pv *citri*.

Las tareas que se van a realizar para alcanzar dicho objetivo son:

- Seleccionar los mejores compuestos inhibidores de la actividad de la *XacFPR* de entre los 43 compuestos seleccionados previamente de una quimioteca de 11.120 compuestos a partir de los valores de IC50.
- Caracterización cinética de la enzima en presencia de un compuesto con acción inhibidora y estudio de su tipo de inhibición.
- Predicción mediante "*docking*" del sitio de unión de dicho compuesto en la *XacFPR*.

Durante la realización de este trabajo se han adquirido las siguientes competencias:

- Conocimiento teórico y práctico de un método de ensayo enzimático en presencia y ausencia de un agente con acción inhibidora.
- Avance en el manejo de un espectrofotómetro en la modalidad de medida de la absorbancia a diferentes longitudes de onda (espectros de absorción) y a diferentes tiempos (cinéticas enzimáticas).
- Conocimiento y manejo de los programas gráficos Sigma Plot y Origin 8.0 para el procesamiento de los datos cinéticos y obtención de los valores de las constantes cinéticas (k_{cat} , K_m , K_i , ...).
- Avance en el manejo de las herramientas y servidores informáticos necesarios para realizar estudios de "*docking*" o acoplamiento molecular (Chimera 1.7, SwissDock).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Medición de la actividad diaforasa de la *XacFPR*

Los ensayos cinéticos se realizaron en tampón Tris/HCl 50 mM, pH 8,0 a 25 °C. Se utilizaron concentraciones catalíticas de la enzima (~4 nM), y se partió de un stock de NADPH a una concentración aproximadamente 100 veces superior al valor de K_m (~ 500 μ M) de forma que las adiciones de este coenzima en la mezcla de reacción fueran entre 1 y 50 μ l. Las concentraciones de DCPIP utilizadas garantizan condiciones de saturación de este sustrato durante el ensayo. Estas actividades fueron ensayadas tanto en ausencia como en presencia de compuestos de la quimioteca (Tabla 1). El espectrofotómetro utilizado fue un UV-Visible Cary 100.

Tabla 1: Concentraciones de las soluciones y volúmenes de las mismas en las mezclas realizadas durante los ensayos cinéticos.

Soluciones	Volúmenes (μ l)	
	Cubeta referencia	Cubeta muestra
DCPIP (0.19 mM)	200	500
FPR ^a (20 μ M)	-	5
NADPH (500 μ M)	-	x
Tris/HCl 50 mM, pH 8,0	800	495-(x+y)
Compuesto ^b (1 ó 10mM)	-	y

^a en Tris/HCl 50 mM, pH 8,0

^b en 100% DMSO

Para medir la actividad diaforasa de *XacFPR* se registró en el espectrofotómetro el descenso de la medida de la absorbancia (Abs) a 600 nm durante un periodo de 30 s. La pendiente en el tramo inicial de la curva de la absorbancia frente al tiempo corresponde a la velocidad inicial de la reacción que está teniendo lugar en la cubeta. Esta medición se realiza a diferentes concentraciones de sustrato (NADPH) para obtener datos cinéticos que se ajustan a la función de Michaelis-Menten (M-M).

Las medidas registradas en la cubeta de referencia son restadas por el espectrofotómetro de las medidas de las cubetas de muestra consiguiendo de esta manera que los valores de absorbancia registrados se encuentren entre 0.5 y 1 y así aplicar la ley de Beer-Lambert (Ecuación 1).

$$\Delta \text{Abs} = \Delta c \times \Delta \epsilon \times l, (\text{Ecuación 1})$$

donde “c” es la concentración de DCPIP, “ε” es el coeficiente de extinción molar del DCPIP a 620 nm (21 mM⁻¹ cm⁻¹) y “l” la longitud del paso de luz de la cubeta (1 cm).

La actividad diaforasa de la XacFPR se midió también en presencia de 10% de DMSO (disolvente de los compuestos) para comprobar que no afecta a los parámetros cinéticos de la enzima. Los volúmenes de los reactivos en las cubetas fueron los mismos que los mostrados en la tabla 1 pero añadiendo en todas las medidas a la cubeta de muestra 100 μL de DMSO al 100%, que se restaron del volumen para añadir del tampón Tris/HCl 50 mM, pH 8,0.

3.2 Medida de los IC50 de los compuestos

Para conocer el grado de inhibición de los compuestos seleccionados de las quimiotecas se calculó el valor de sus IC50, que es la concentración de compuesto necesaria para inhibir la actividad enzimática a la mitad del valor que presenta la enzima en ausencia de dicho compuesto. En las ocasiones en las que la actividad de la enzima no es inhibida completamente se toma como valor de IC50 la concentración necesaria para reducir el valor de la actividad a la mitad del intervalo de inhibición del compuesto.

Todas las medidas se realizaron a una concentración final de NADPH de 25 μM (x = 50 μl en Tabla 1). Esta concentración asegura que el NADPH se encuentra a saturación y por tanto que los valores calculados de V₀ a cualquier concentración de compuesto equivalen al valor de V_{máx} aparente.

3.3 Ajustes de los datos cinéticos

Los datos obtenidos en los ensayos para medir IC50 se ajustaron a la expresión de la función sigmoide mostrada en la ecuación 2,

$$y = \frac{1}{1+e^{-x}} , \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde “x” es el logaritmo decimal de la concentración de compuesto e “y” es el valor de la constante catalítica obtenida a esa concentración de compuesto que denominamos k^{app}.

El ajuste de los valores experimentales de V₀ frente a la concentración de NADPH a la ecuación de Michaelis-Menten [14] (Ecuación 3) permite calcular la constante de Michaelis-Menten (K_m), en las unidades de concentración utilizadas para el sustrato, es decir μM, y la velocidad máxima (V_{max}) en unidades de μM de sustrato/s. La constante catalítica (k_{cat}) se obtiene a partir de la V_{max} según la ecuación 4, teniendo en cuenta que el coeficiente de extinción de la forma oxidada del DCPIP es de ε₆₂₀ = 21 mM⁻¹cm⁻¹.

$$v = \frac{k_{cat} E [S]}{K_m + [S]} \rightarrow \frac{\Delta Abs}{t} = \frac{v_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Ecuación 3})$$

$$k_{cat} S^{-1} = \frac{\Delta Abs \text{ min}^{-1}}{\epsilon \text{ m M}^{-1} \text{ cm}^{-1}} \frac{1}{1 \text{ cm}} \frac{1}{XacFPR \text{ nM}} \frac{10^6 \text{ nM}}{1 \text{ mM}} \frac{1 \text{ min}}{60 \text{ s}} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Los valores de V_o a concentraciones crecientes de sustrato NADPH fueron procesados por el programa informático OriginPro8.0, y se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten (M-M) (ecuación 3). Como las concentraciones iniciales de enzima no fueron siempre las mismas ya que estos experimentos se realizaron durante varias semanas y partiendo de concentraciones iniciales de enzima no idénticas, los valores de V_o se dividieron por la concentración de enzima ($V_o/[E]$), dando el parámetro cinético que denominaremos k^{app} . Los valores de k^{app} obtenidos a concentraciones de NADPH crecientes se ajustaron a la ecuación de M-M.

La caracterización del tipo de inhibición de la actividad de la XacFPR por un compuesto seleccionado de la quimioteca se llevó a cabo mediante medidas de actividad enzimática a distintas concentraciones del compuesto. Estos datos cinéticos se ajustaron a curvas de M-M y, posteriormente, a las ecuaciones lineales de Lineweaver-Burk (L-B), Eadie-Hofstee (E-H) y Hanes-Woolf (H-W). Estas linealizaciones de la ecuación de M-M mejoran el ajuste de los datos cinéticos, ya que una recta tiene un manejo matemático más sencillo que una hipérbola (caso de M-M). Para estos ajustes se utilizó también el programa OriginPro 8.0.

Existen tres mecanismos básicos de inhibición distintos y cada uno de ellos se asocia a una ecuación modificada de M-M, donde el factor de inhibición $(1 + \frac{[I]}{K_I})$ afecta o bien a la K_m (inhibición competitiva), a la V_{max} (inhibición no competitiva) o a ambas (inhibición acompetitiva) (Tabla A.1 en Anexos). La constante K_I es la constante de disociación del complejo enzima-inhibidor o enzima-sustrato-inhibidor (según el tipo de inhibición), por lo que a mayor valor de K_I , menor acción inhibidora y mayor actividad enzimática. Un buen inhibidor presentará, por tanto, un valor bajo de K_I .

Para conocer el tipo de inhibición que ejerce un compuesto sobre la actividad de la enzima, se realizó un ajuste global de medidas de la actividad de XacFPR a distintas concentraciones del compuesto a las tres ecuaciones de M-M con inhibición y a sus correspondientes inversos (Tabla A.1 en Anexos) utilizando OriginPro 8.0. Con estos ajustes se calcularon los valores de la K_m , la V_{max} y la k_i , para cada tipo de inhibición.

3.4 Estudios de Acoplamiento Molecular enzima-compuesto ("*Docking*")

Se realizaron simulaciones de acoplamiento molecular sobre la estructura de la *XacFPR* de uno de los compuestos utilizando el servidor en red "SwissDock" [15]. Las predicciones de interacción, dadas en coordenadas y obtenidas de dicho servidor, se visualizaron con los programas Chimera 1.7 [16] y Pymol [17].

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Actividad diaforasa de *XacFPR*

Como punto de partida de nuestros estudios cinéticos, se caracterizó cinéticamente a *XacFPR* en ausencia de inhibición. Mediante el programa OriginPro8.0 se representaron los valores de la constante catalítica k^{app} ($V_o/[E]$) a concentraciones crecientes del sustrato NADPH que se ajustaron a la ecuación de M-M, obteniendo de esta manera los valores de K_m ($3,1 \mu\text{M}$) y k_{cat} ($14,6 \text{ s}^{-1}$) (Figura 11).

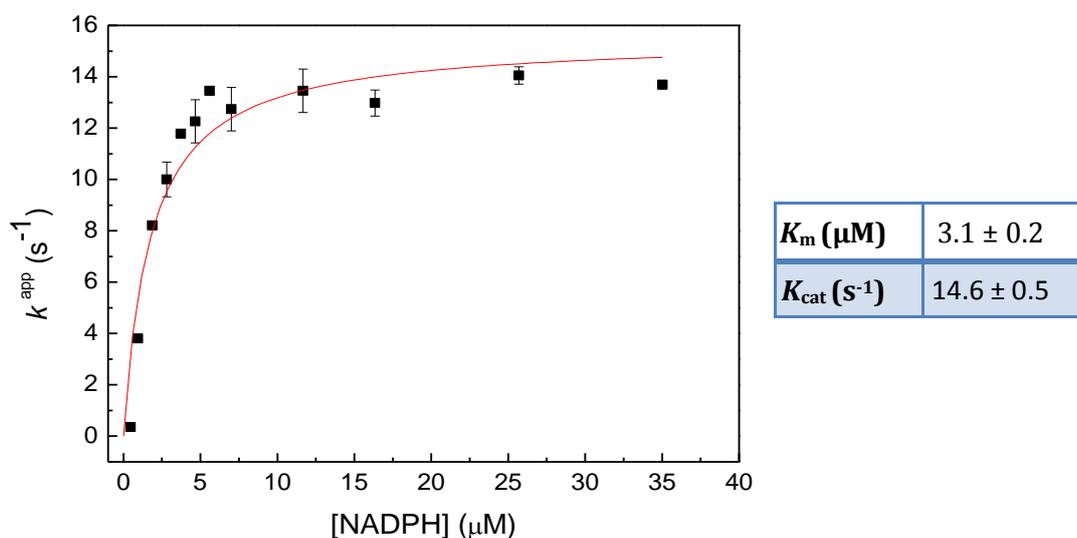


Figura 11: Ajuste de los datos cinéticos de la actividad diaforasa de *XacFPR* a la ecuación de Michaelis-Menten.

4.2 Estudio del efecto del DMSO sobre la actividad diaforasa de *XacFPR*

Para comprobar si la presencia de DMSO (disolvente de los compuestos) afectaba o no a la actividad diaforasa de la enzima *XacFPR* se ensayó dicha actividad a concentraciones crecientes de NADPH y en presencia de DMSO al 10 % (Figura 12).

Los resultados de los ensayos control del efecto del DMSO demostraron que incluso a altas concentraciones de este disolvente, 10 veces mayores de la máxima concentración presente en los ensayos cinéticos, éste no afecta a la velocidad de la reacción de *XacFPR*.

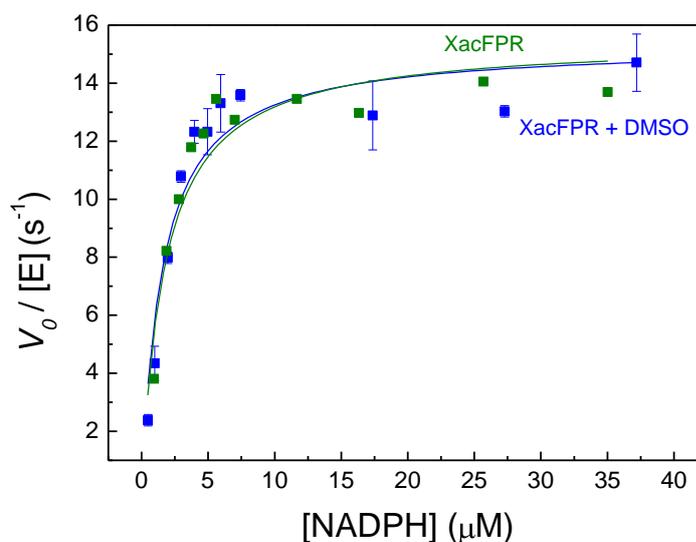


Figura 12: Representación gráfica de los datos cinéticos de la actividad diaforasa de *XacFPR* ajustados a la ecuación de M-M en presencia de 10% de DMSO (azul) y en ausencia de DMSO (verde).

4.3 IC50 de los compuestos con acción inhibidora

De los 43 compuestos del cribado anterior se analizaron 35. Los otros 8 restantes estaban descatalogados y no fue posible disponer de ellos durante el tiempo de duración del trabajo.

La figura 13.A muestra 14 representaciones gráficas de medidas de IC50 ajustadas a la función sigmoide y en la Figura 13.B se muestran dos compuestos muy diferentes en cuanto a IC50 y efecto inhibidor.

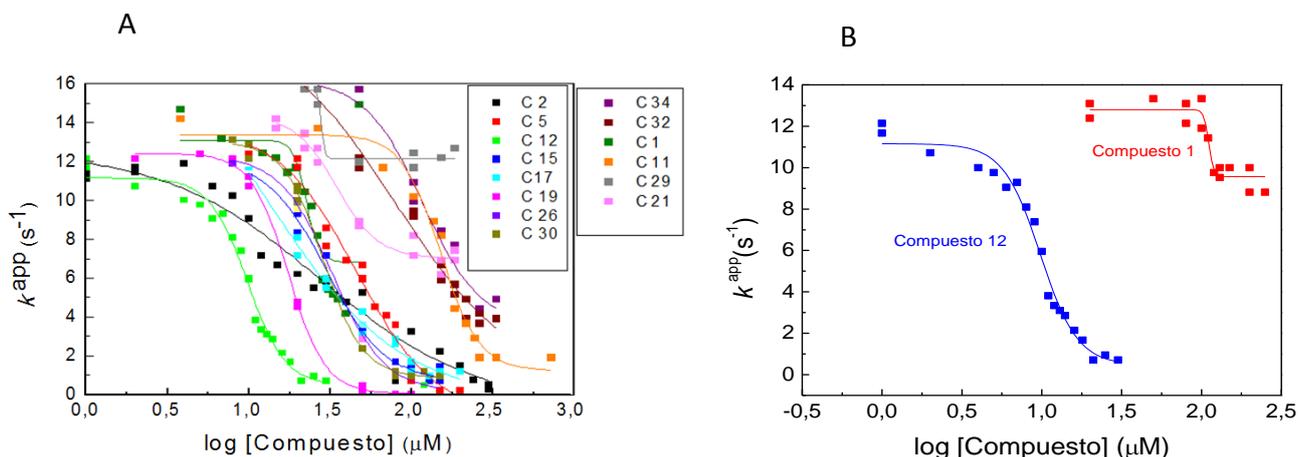


Figura 13: (A) Ajustes a la función sigmoide de los valores de k^{app} (s⁻¹) frente al logaritmo de la concentración de compuesto. (B) Representación de los valores IC₅₀ del compuesto con mayor actividad inhibitora (C12) y de un compuesto con una baja actividad de inhibición (C1).

Como muestra la figura 13.B el compuesto 1 no parece ser un buen inhibidor, ya que no inhibe totalmente a la enzima y además necesita una alta concentración para comenzar a mostrar acción inhibitora. En cambio, el compuesto 12 (C12) sí que consigue inhibir casi por completo a la enzima (94,6%) a una concentración relativamente baja del mismo (IC₅₀=9,7 μM).

Los valores IC₅₀ de todos los compuestos se recogen en la tabla 2. También se muestra en ella los datos de la actividad enzimática mínima (k^{app} a IC máximo) que se alcanza con el compuesto y el porcentaje de esa actividad mínima respecto a la actividad enzimática en ausencia de inhibición (% inhibición a IC máximo). IC₅₀ (μM)

Tabla 2: Valores de los IC₅₀ de los compuestos ensayados.

Nº compuesto	IC ₅₀ (μM)	k^{app} a IC _{max} (s ⁻¹)	% inhibición a IC _{max}	Nº compuesto	IC ₅₀ (μM)	k^{app} a IC _{max} (s ⁻¹)	% inhibición a IC _{max}
1	111,0	8,8	32,2	21	13,8	5,2	60,0
2	27,2	0,2	98,2	22	15,3	0,2	98,5
3	191,4	9,5	27,0	24	34,6	6,9	46,9
5	42,7	0,2	98,2	25	25,5	0,9	93,1
6	605,6	3,3	73,1	26	32,5	0,7	94,6
7	85,2	0,2	98,2	29	10,6	10,2	21,5
8	79,2	0,7	94,6	30	28,7	0,95	92,7
9	147,4	4,9	62,3	31	89,8	2,1	83,8
10	97,7	5,9	54,2	32	36,4	1,9	85,4
11	63,09	0,3	97,7	34	58,0	2,9	77,7
12	9,7	0,7	94,6	36	602,6	3,3	74,6
13	94,9	2,4	81,7	38	4045,8	0,7	94,6
14	127,1	11,4	12,1	39	521,2	2,3	82,3
15	30,0	1,4	89,7	40	2721,2	5,4	58,5
17	13,1	1,2	90,8	41	1918,7	0,1	99,2
18	24,6	0,01	99,9	42	209,9	1,6	87,7
19	17,4	0,02	99,9	43	61,66	0,1	99,2
20	53,2	0,01	99,9				

Los valores obtenidos muestran que el 31% de los compuestos (11 compuestos) consigue inhibir la actividad de la enzima casi por completo ($\geq 95\%$ de inhibición a IC máximo) y que el 63% (22 compuestos) tiene un valor IC₅₀ inferior a 100 μM .

A partir de los valores IC₅₀ de la tabla 2, se seleccionaron los 13 compuestos que mostraban un IC₅₀ menor que 80 μM (Tabla 3).

Tabla 3: Los mejores compuestos ordenados según el valor IC₅₀.

Compuesto	IC ₅₀ (μM)	k^{app} a IC _{max} (s^{-1})	% inhibición a IC _{max}
12	9,7	0,7	94,6
29	10,6	10,2	21,5
17	13,1	1,2	90,8
21	13,7	5,2	60
19	17,4	0,02	99,9
2	27,1	0,2	98,2
30	28,7	0,9	92,7
15	30,0	1,4	89,7
26	32,4	0,7	94,6
32	36,4	1,9	85,4
5	46,0	0,24	98,2
34	58,0	2,9	77,7
11	78,0	0	100

Se deduce a partir de la tabla 3 que 7 compuestos (C12, C19, C12, C2, C26, C5 y C11) logran reducir la actividad enzimática hasta valores cercanos al 0%, o lo que es lo mismo, consiguen una inhibición de la enzima cercana al 100%.

Analizando la fórmula química de los compuestos de la tabla 4 se observa que los grupos funcionales más conservados son el bencilo y el bencilo sustituido por Cloro (Figura 14). Cabe destacar que el grupo benceno con un grupo metilo no aparece en la fórmula de estos compuestos, indicando que probablemente no sea este grupo relevante o imprescindible en el proceso de inhibición.

Grupos funcionales de los potenciales inhibidores

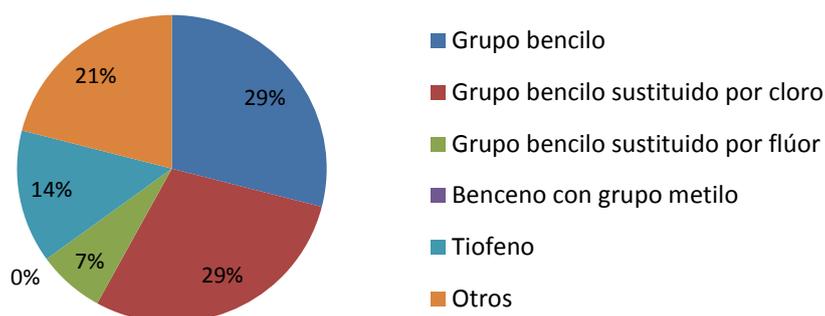


Figura 14: Presencia en porcentajes de los grupos funcionales en los 9 compuestos seleccionados como potenciales inhibidores de la actividad diaforasa de la XacFPR (tabla 4). Se observa que los grupos más conservados en los compuestos son el grupo bencilo y el grupo bencilo con un H sustituido por un átomo de cloro.

4.4 Estudio cinético de la XacFPR en presencia del compuesto 12 (C12)

Según la tabla 3, el C12 es el compuesto que muestra menor valor IC₅₀ (9,5 M) e inhibe casi al 100% la actividad de la enzima (94,6%). Esto hace que se presente como un buen candidato de partida para el diseño de un compuesto bactericida contra el patógeno *Xanthomonas axonopodi* pv *citri*. Se abordó, entonces un estudio detallado de la cinética de la XacFPR en presencia de dicho compuesto.

En presencia de varias concentraciones del compuesto 12 (0, 2, 5, 8, 11 y 15 μM) se ensayó la actividad diaforasa de la XacFPR variando la concentración de NADPH. Los datos cinéticos se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten (Figura 15) con el programa OriginPro 8.0.

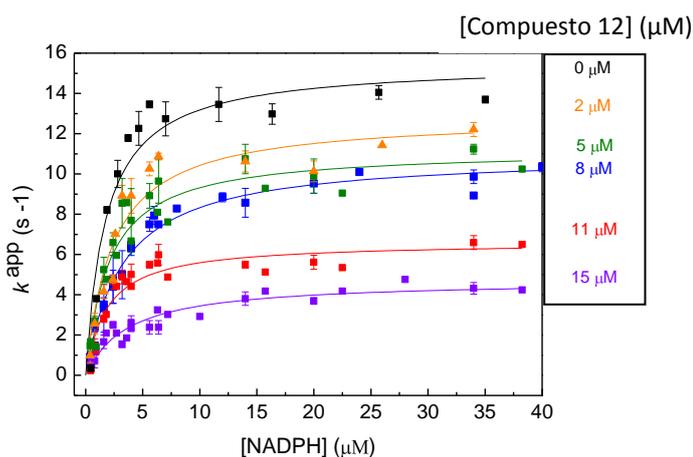


Figura 15: Datos cinéticos de la actividad diaforasa de la XacFPR ajustados a curvas de Michaelis-Menten obtenidas a varias concentraciones del C12.

Los valores de K_m y k^{app} deducidos de los ajustes se muestran en la tabla 4.

Tabla 4: Valores de K_m y k^{app} de la actividad diaforasa de la *XacFPR* a distintas concentraciones del C12.

[C 12] (μM)	K_m (μM)	k^{app} (s^{-1})
0	$2,0 \pm 0,3$	$14,6 \pm 0,9$
2	$2,3 \pm 0,4$	$12,9 \pm 0,7$
5	$2,1 \pm 0,3$	$11,2 \pm 0,5$
8	$3,1 \pm 0,7$	$10,9 \pm 0,2$
11	$1,9 \pm 0,3$	$6,6 \pm 0,3$
15	$3,7 \pm 0,2$	$4,7 \pm 0,6$

En la tabla 4 se observa que conforme aumenta la concentración del compuesto, si bien el valor de K_m permanece sin apenas cambios, el valor de estos valores de k^{app} ($V_{max}/[E]$), y por tanto, también la V_{max} , disminuye. Este comportamiento de los parámetros cinéticos con la concentración del compuesto sugiere una inhibición de tipo no competitivo.

Los resultados de las linealizaciones de Lineweaver-Burk, de Eadie-Hofstee y de Hanes-Woolf de las curvas M-M de *XacFPR* en presencia de varias concentraciones de C12 se muestran en la Figura 16. Las gráficas de la parte inferior de los paneles A, B y C muestran las linealizaciones ideales de unos datos cinéticos afectados por un tipo de inhibición no competitiva. La comparativa de las linealizaciones de los datos experimentales con las ideales nos permite predecir una inhibición de la actividad de la *XacFPR* de tipo no competitivo por parte del compuesto C12.

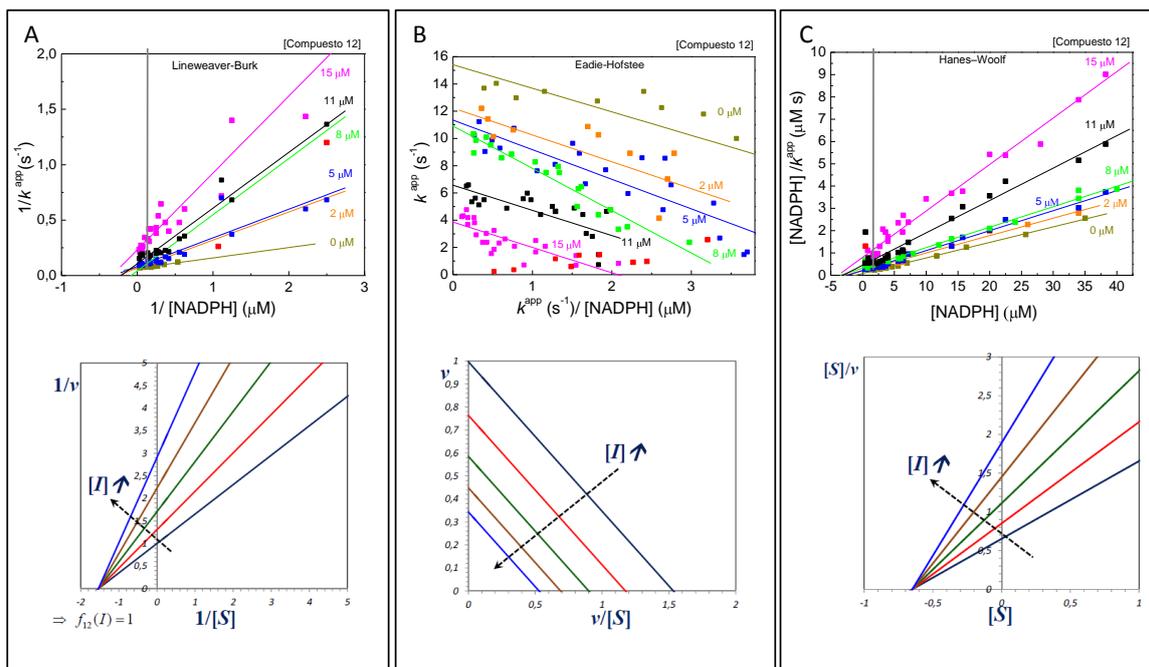


Figura 16: (Zona superior) Linealización de los datos cinéticos en presencia de C12; A: Lineweaver-Burk. B: Eddie-Hofstee. C: Hanes-Woolf . **(Zona inferior)** Linealizaciones teóricas para la inhibición no competitiva; A: Lineweaver-Burk. B: Eddie-Hofstee. C: Hanes-Woolf.

Con el OriginPro 8.0 se realizó un ajuste global tanto de las funciones de M-M con factor de inhibición $(1 + \frac{[I]}{K_I})$ como de los inversos de éstas (Tabla A.1 en Anexos) y se confirmó el tipo de inhibición no competitiva que mostraban las primeras linealizaciones de la figura 16.

Las representaciones gráficas de estos ajustes globales se muestran en la figura 17 (ajustes a inhibición no competitiva), y en las figuras A.2 y A.3 (en Anexos), se muestra el ajuste de los datos cinéticos a los otros tipos de inhibición competitiva y anticompensiva.

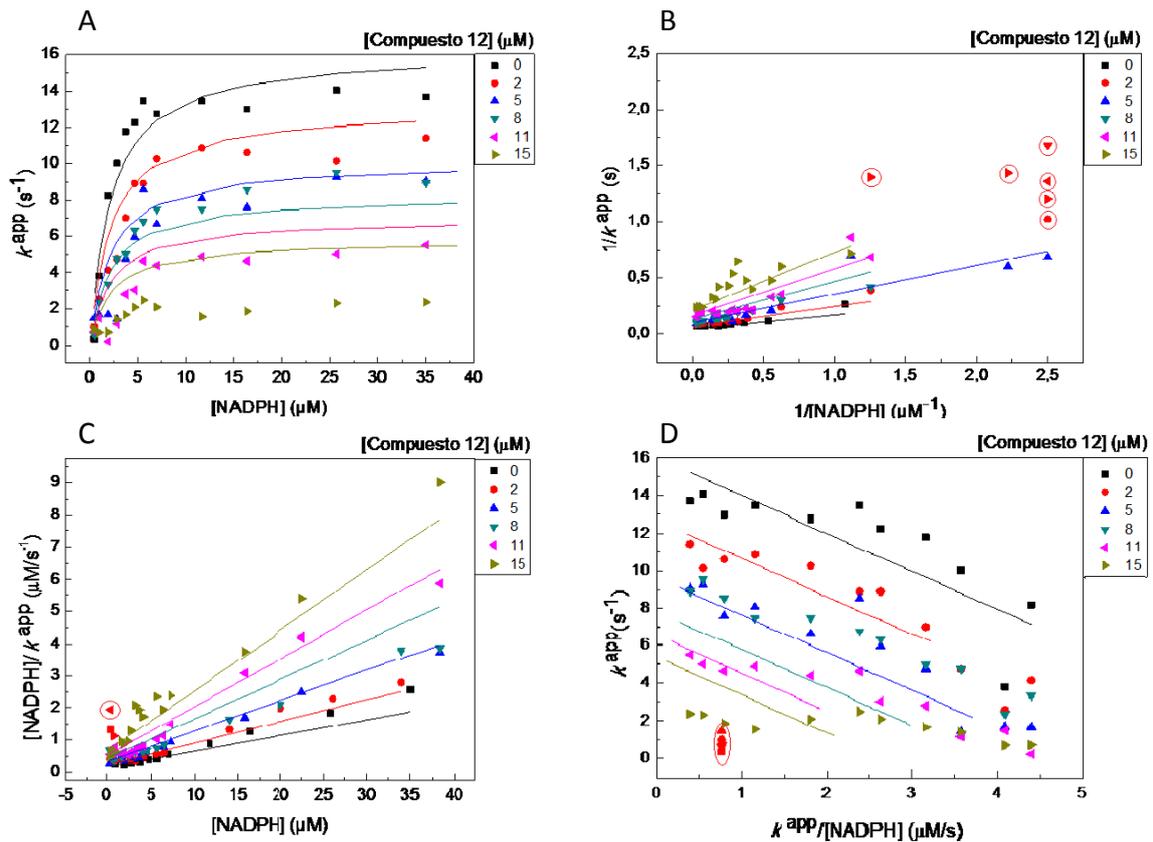


Figura 17: Representaciones gráficas de los los ajustes globales (líneas) a los datos cinéticos experimentales (puntos) para la inhibición de tipo no competitiva; A) ajustes a las ecuaciones de M-M modificadas por el factor de inhibición y linealizaciones B) Lineweaver-Burk C) Hanes-Woolf y D) Eadie Hofstee. Con círculo rojo se muestran los datos experimentales que fueron descartados para el ajuste.

En la tabla 5 se muestran los valores de los coeficientes de determinación (R^2) para los ajustes a los tres tipos de inhibición. La inhibición de tipo no competitivo es la que muestra dicho valor más elevado en todas las representaciones y deduciéndose que los datos cinéticos se ajustan mejor a este tipo de inhibición.

Tabla 5: Coeficientes de determinación (R^2) de los ajustes a las ecuaciones de M-M con el factor de inhibición (1ª columna de datos) y a sus inversos (2ª a 4ª columna de datos).

	M-M	L-B	H-W	E-H
Competitiva	0,83	0,78	0,80	0
Anticompetitiva	0,89	0,79	0,91	0,75
No competitiva	0,93	0,83	0,93	0,81

El mecanismo al que peor se ajustan nuestros datos cinéticos es al de tipo no competitivo, que muestran un ajuste muy pobre de los datos cinéticos para la ecuación de Eadie-Hofstee ($R^2=0$).

Los ajustes globales a un tipo de inhibición no competitiva proporcionan los valores de los parámetros K_i ($5 \mu\text{M}$), K_m ($3 \mu\text{M}$) y de k_{cat} (18 s^{-1}) que se muestran la tabla 6. Los valores de K_m y k_{cat} , mostrados en esta tabla sólo se obtienen cuando la concentración de C12 es $0 \mu\text{M}$ y son por tanto similares a los de XacFPR en ausencia del C12 (Tabla 6 y Figura 11). A cualquier otra concentración de C12, el valor de k_{cat} se verá afectado por el factor de inhibición $(1 + \frac{[I]}{K_i})$. Así, por ejemplo, a una concentración de $8 \mu\text{M}$ de C12, el valor de k_{cat} que ahora denominaremos k_{cat} aparente será $6,9 \text{ s}^{-1}$. Este valor se ha obtenido a partir de la ecuación de M-M con factor de inhibición para el tipo no competitivo (Tabla A.1 en Anexos) y mediante el siguiente cálculo: $18 \text{ s}^{-1} / (1 + \frac{8 \mu\text{M}}{5 \mu\text{M}}) = 6,9 \text{ s}^{-1}$.

Tabla 6: Parámetros cinéticos del ajuste global de los datos cinéticos a las funciones inversas de M-M con factor inhibidor para el tipo de inhibición no competitiva y parámetros cinéticos de XacFPR en ausencia de inhibición.

	Presencia C12			Ausencia C12
	L-B	H-W	E-H	
K_m (μM)	$2,4 \pm 0,3$	$3,4 \pm 0,5$	$2,5 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,2$
k_{cat} (s^{-1})	$20,1 \pm 0,9$	$20,6 \pm 2,1$	$17,0 \pm 0,6$	$14,6 \pm 0,5$
K_i (μM)	$4,6 \pm 0,8$	$5,2 \pm 0,8$	$5,0 \pm 0,6$	-

A la vista de los resultados obtenidos, el tipo de inhibición de C12 sobre la actividad de XacFPR más probable es el no competitivo (Figura 18).

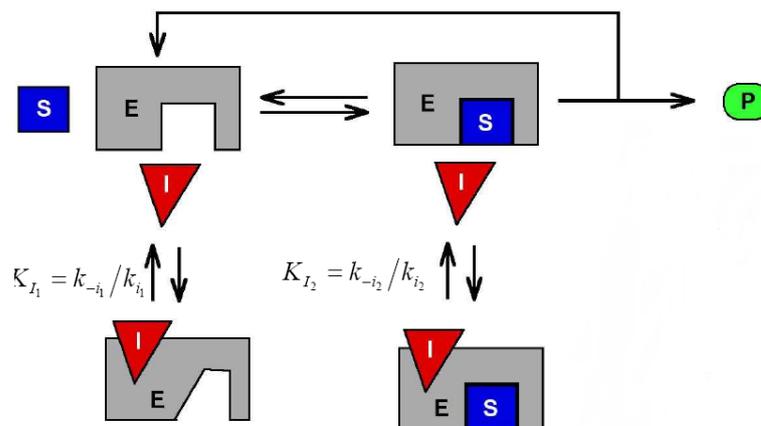


Figura 18: Esquema de la inhibición no competitiva; E: enzima, S: sustrato, I: inhibidor, P: producto

En este tipo de inhibición la K_m de la enzima aparente no varía y la V_{max} aparente va disminuyendo conforme aumenta la concentración del compuesto inhibidor.

Como muestra la Figura 18, en este tipo de inhibición el compuesto inhibidor se une a la enzima en una zona distinta al sitio activo del sustrato, y puede unirse tanto a la enzima libre como al complejo enzima-sustrato. Esto explica que haya que tener en cuenta dos K_i distintas, una de la disociación de los complejos enzima-inhibidor y otra de enzima-sustrato-inhibidor. Nuestros ajustes globales a este tipo de inhibición se han realizado suponiendo que los dos valores de estas dos constantes son iguales, lo que simplifica la ecuación y elimina un parámetro. En estudios posteriores más avanzados de este compuesto sería necesario analizar este mecanismo de inhibición con dos constantes de inhibición de distinto valor. De este modo se comprobaría si la unión del sustrato facilita o impide y en qué medida, la unión del compuesto 12.

Después de obtener unos resultados satisfactorios de varios compuestos líderes, hay que recordar que estos ensayos se han realizado *in vitro*, por lo que después serán necesarios ensayos de los inhibidores *in vivo*, teniendo en cuenta la estructura completa de la bacteria patógena. Y es que las bacterias Gram negativas cuentan con potentes sistemas para protegerse de compuestos nocivos para su viabilidad y crecimiento [18] como por ejemplo, las bombas de expulsión, mecanismos que operan captando el antibiótico en el espacio periplásmico y expulsándolo al exterior, evitando así que llegue a su sitio de acción, en este caso, la diana terapéutica. También existen procesos de modificación enzimática, mediante los cuales las bacterias expresan enzimas capaces de inducir cambios en la estructura del antibiótico haciendo que éste pierda su funcionalidad, así como cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática. En estos últimos se incluyen canales de paso de la membrana plasmática como las porinas, que son regulados de forma que no dejan entrar a la célula moléculas tales como los inhibidores [18].

4.5 Interacción simulada de Xac FPR y el compuesto 12

Para estudiar el posible sitio de unión del C12 a la estructura de la XacFPR, se realizaron unos primeros ensayos *in silico* con el servidor *swissdock* que predice acoplamientos de ligandos sobre la estructura de proteínas.

Hay que tener en cuenta que este servidor *swissdock* excluye de la simulación cualquier elemento que no sea la propia cadena peptídica de la XacFPR, lo que incluye al cofactor FAD. Por tanto, durante las simulaciones de unión, el FAD fue excluido de los datos iniciales. De esta manera se obtienen complejos XacFPR:ligando en los que el C12 se une en la zona de unión del FAD a la enzima (Figura 19.A).

El ensayo *in silico* de acoplamiento se realizó también entre XacFPR y NADP⁺ y el resultado fue que el NADP⁺ se une en el sitio del FAD como en el caso del C12. (Figura 19.B).

Las interacciones que se predicen entre el C12 y la enzima en esta primera simulación son principalmente hidrofóbicas, a través de los anillos aromáticos presentes en C12. Los residuos apolares de la enzima que estabilizan la unión según la interacción simulada son Phe256, Ile70, Arg52, Leu 77 y Ala53 que interactúan con los grupos aromáticos del compuesto (Figura 19.C).

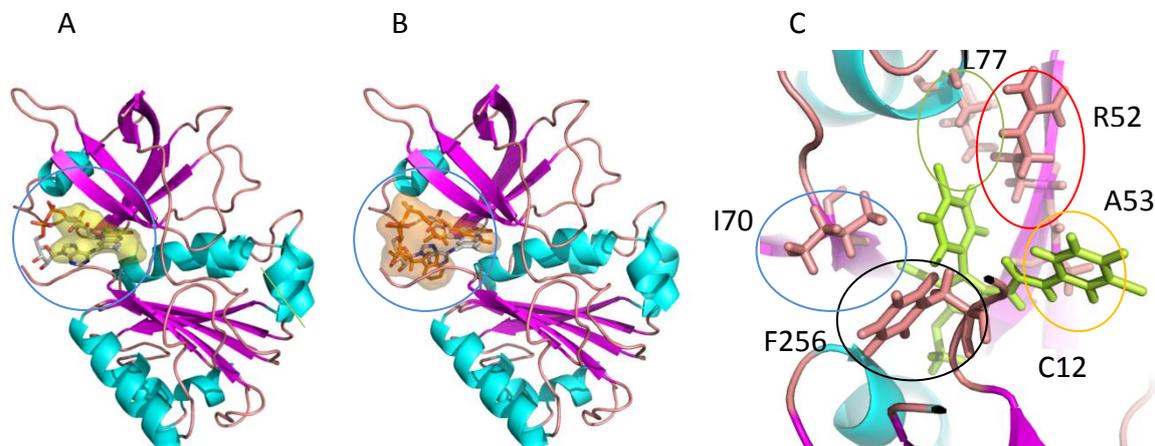


Figura 19: (A) Representación del resultado del acoplamiento molecular del complejo XacFPR: C12 y superposición con el FAD. (B) Representación de la interacción del complejo XacFP: NADPH y superposición con el FAD. El compuesto C12 se representa como una envoltura amarilla, el NADP⁺ como una envoltura naranja y el FAD en varillas coloreadas con el código CPK. (C) Representación de las interacciones hidrofóbicas de los residuos Phe 256 (círculo negro), Ile 70 (círculo azul), Arg 52 (círculo rojo), Ala 53 (círculo naranja) y Leu 77 (círculo verde) de XacFPR con C12 representado en estructura verde.

De todos modos, al unirse tanto el compuesto como el NADP⁺ en la zona del FAD, estos estudios son preliminares sin valor fisiológico y deberán repetirse con un servidor que incluya en las simulaciones al FAD.

5. CONCLUSIONES

- Se han seleccionado 13 compuestos de los 43 de partida por mostrar un valor de IC50 menor de 80 μM : C12, C29, C17, C21, C19, C2, C30, C15, C26, C32, C5, C34 y C11, de los cuales se ha estudiado en más detalle el C12 por ser uno de los más prometedores, con un IC50 de 9,7 μM y alto porcentaje de inhibición enzimática (94,6%).
- Los grupos químicos bencilo y bencilo con un H sustituido por cloro, más conservados en los compuestos que han resultado mejores inhibiendo a la enzima, podrían convertirse en grupos funcionales de la molécula activa de un futuro producto bactericida contra el patógeno *Xanthomonas*.
- Los ajustes globales a las funciones de Michaelis-Menten con el factor de inhibición y a los inversos de ésta, realizados *in silico*, sugieren que el efecto inhibitor del C12 en la actividad de la *XacFPR* es de tipo no competitivo, con un valor de K_i de 5 μM .
- Los ensayos *in silico* de acoplamiento molecular del C12 en la estructura de *XacFPR* no son concluyentes ya que las simulaciones se realizan sin la presencia del FAD. La unión del C12 en el lugar donde se une el FAD se estabiliza con interacciones hidrofóbicas implicando a distintos aminoácidos apolares de la enzima y anillos aromáticos del compuesto.

5. CONCLUSIONS

- The following compounds out of the 43 have been selected for showing an IC50 value of less than 80 μM : C12, C29, C17, C21, C19, C2, C30, C15, C26, C32, C5, C34 and C11, from which C12 has been studied in more detail as one of the most promising compound, with an IC50 of 9,7 μM , and a high inhibition percentage (94,6%).
- Chemical groups benzyl and benzyl substituted with chlorine present in compounds which have proved to be the best inhibiting the enzyme may become functional groups of the active molecule for a future product bactericidal against pathogen *Xac*.
- The inhibitory effect on the *XacFPR* activity seems noncompetitive as global fitting for Michaelis-Menten function with inhibition factor and its inverses have shown.
- The *in silico* molecular docking tests are inconclusive since simulations occur without the presence of FAD. The binding of C12 to the FAD binding site is stabilized by

hydrophobic interactions involving several apolar amino acids of the enzyme and aromatic rings of the compound.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Ana Sánchez Azqueta. 2013. "Mecanismos catalíticos en ferredoxina-NADP⁺ reductasas de tipo planta" 13-16.
- [2] Dym, O. and Eisenberg, D. (2001). "Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins." *Protein Sci* 10(9): 1712-28.
- [3] Fraaije, M. W. and Mattevi, A. (2000). "Flavoenzymes: diverse catalysts with recurrent features." *Trends BiochemSci* 25(3): 126-32.
- [4] Bianchi, V., Haggard-Ljungquist, E., Pontis, E. and Reichard, P. (1995). "Interruption of the ferredoxin (flavodoxin) NADP⁺ oxidoreductase gene of *Escherichia coli* does not affect anaerobic growth but increases sensitivity to paraquat." *J Bacteriol* 177(15): 4528-31.
- [5] María Laura Tondo, Ramón Hurtado-Guerrero, Eduardo A. Ceccarelli, Milagros Medina, Elena G. Orellano and Marta Martínez-Júlvez. (2013). "Crystal Structure of the FAD-Containing Ferredoxin-NADP⁺ Reductase from the Plant Pathogen *Xanthomonas axonopodis pv citri*". *BioMed Research International*. Volume 2013, Article ID 906572.
- [6] Hald, S., Nandha, B., Gallois, P. and Johnson, G. N. (2008). "Feedback regulation of photosynthetic electron transport by NADP(H) redox poise." *BiochimBiophysActa* 1777(5): 433-40.
- [7] Forti, G. (1966). "Studies on NADPH-cytochrome f reductase of chloroplasts." *Brookhaven SympBiol* 19: 195-201.
- [8] Graham JH, Gottwald TR, Cubero J, Achor DS (2004) "*Xanthomonas axonopodis* pv. citri: factors affecting successful eradication of citrus canker. *Mol Plant Pathol*".
- [9] Starr M.P, and W.L. Stephens. 1964. "Pigmentation and taxonomy of the genus *Xanthomonas*". *Journal of bacteriology* 87:293-302.
- [10] Sgro, G.G., Ficarra, F.A., Dunger, G., Scarpeci, T.E., Valle, E.M., Cortadi, A., Orellano, E.G., Gottig, N., Ottado, J. (2012) Contribution of a harpin protein from *Xanthomonas axonopodis* pv. citri to pathogen virulence. *Mol Plant Pathol.*, 13, 1047-59.
- [11] Asha M. Brunings, Dean W. Gabriel, " *Xanthomonas* citri: breaking the surface", Blackwell Publishing Ltd., *Molecular Plant Pathology* (2003) 4(3), 141–157.
- [12] Gottwald T.R., Graham J.H., and T.S. Shubert. 2002. "Citrus canker: The pathogen and its impact". *Plant Health*.
- [13] Avron, M. and Jagendorf, A. T. (1956). "A TPNH diaphorase from chloroplasts." *Arch BiochemBiophys* 65(2): 475-90.
- [14] Michaelis, L., Menten, M. L., Johnson, K. A. and Goody, R. S. (2011). "The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper." *Biochemistry* 50(39): 8264-9.

[15] Grosdidier, A., Zoete, V., Michielin, O. (2011). "SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS." In: *Nucleic Acids Research* 39 (suppl), S. W270–W277.

[16] Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M. et al. (2004): "UCSF Chimera-- a visualization system for exploratory research and analysis." In: *J Comput Chem.* (13), S. 1605–1612.

[17] Warren L. DeLano, Sarina Bromberg. (2004). "PyMOL User's Guide". DeLano Scientific LLC.

[18] José David Tafur, Julián Andrés Torres, María Virginia Villejas. "Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas". 2008. Asociación Colombiana de infectología.

7. ANEXOS

Figura A.1

Consenso	Rx	YS	Yxx	G xxxS	GTGIxP									
Anabaena sp.	DLTGGMLKYI	EGQSIGIIPP	GVD---KMG	---KPKHLRL	YSIASTRHGD	DVDDKTIISLC	VRQLEYKHPE	SGET---VYG	VCSTYLTHIE	PG-SEVKITG	FVGKEMLLP-	DDPEANVIML	ATGTGIAPMR	TYLWRMFKDA
Synechococcus sp.	DISEGDLRYL	EGQSIGIIPP	GED---KMG	---KPKHLRL	YSIASTRHGD	MEDNKTIVSLC	VRQLEYQDPE	SGET---VYG	VCSTYLCNLP	VGTDVVKITG	FVGKEMLLP-	DDDATVVMML	ATGTGIAPFR	AFLWRMFKE-
Synechocystis sp.	DLSAGDLRYL	EGQSIGIIPP	GED---DMG	---KPKHLRL	YSIASTRHGD	FGDDKTVSLC	VRQLEYQD-E	AGET---VVG	VCSTYLCNIK	EG-DDIAITG	FVGKEMLLP-	PDEDANVIML	ATGTGIAPFR	AFLWRMFKE-
Spirulina sp.	DISGGDLRYL	EGQSIGIIPP	GTD---NMG	---KPKHLRL	YSIASTRHGD	HVDDKTVSLC	VRQLEYKHPE	TGET---VYG	VCSTYLCNLE	AG-ADVAITG	FVGKEMLLP-	EDEDATIIMM	ATGTGIAPFR	AFLWRMFKE-
S. oleracea leaf	SHDG-EIPYR	EGQSVGVIPD	GED---KMG	---KPKHLRL	YSIASSALGD	FGDAKIVSLC	VKRLIYTM-D	AGET---IRG	VCSNFCCLK	PG-AEVKLTG	FVGKEMLLP-	KDPNATIIML	GTGTGIAPFR	SFLWRMFFE-
O. sativa leaf	STEG-EIPYR	EGQSIGVIAD	GVD---KMG	---KPKHLRL	YSIASSALGD	FGDSKIVSLC	VKRLIYTM-D	QGEI---VWG	VCSNFCCLK	PG-SDVKITG	FVGKEMLLP-	KDPNATIIML	ATGTGIAPFR	SFLWRMFFE-
P. sativum leaf	STEG-EVPYR	EGQSIGIVPD	GID---KMG	---KPKHLRL	YSIASSALGD	FGDSKIVSLC	VKRLIYTM-D	AGEV---VWG	VCSNFCCLK	PG-SEVKITG	FVGKEMLLP-	KDPNATIIML	GTGTGIAPFR	SFLWRMFFE-
N. tabacum leaf	STEG-EVPYR	EGQSIGVIAD	GVD---AMG	---KPKHLRL	YIASSALGD	FGDSKIVSLC	VKRLIYTM-D	KGEE---VWG	VCSNFCCLK	PG-AEVKITG	FVGKEMLLP-	KDPNATIIML	ATGTGIAPFR	SFLWRMFFE-
A. thaliana leaf	TTEG-EVPYR	EGQSIGVIPE	GID---KMG	---KPKHLRL	YSIASSALGD	FGDSKIVSLC	VKRLIYTM-D	GGEI---VWG	VCSNFCCLK	PG-DEAKITG	FVGKEMLLP-	KDPNATIIML	GTGTGIAPFR	SFLWRMFFE-
O. sativa root	DHGG-NVPYV	EGQSYGIIPP	GEMP---KMG	---APHMVRL	YSIASTRYGD	SFDGRTISLC	VRRAVIYDPE	TGKEDPSKMG	VCSNFCCLSK	PG-DKVKITG	P8GKIMLLPE	EDFNATHIMI	ATGTGVAPFR	GYLRRMFE-
P. sativum root	NHDG-NVPYV	EGQSYGIIPP	GEMP---KMG	---APHMVRL	YSIASTRYGD	NFDGRTISLC	VRRAVIYDPE	TGKEDPSKMG	VCSNFCCLSK	PG-DKIKITG	P8GKIMLLPE	DDFNATHIMI	ATGTGVAPFR	GYLRRMFE-
N. tabacum root	DHDG-NVPYV	EGQSYGIIPP	GEMP---KMG	---APHMVRL	YSIASTRYGD	SFDGRTISLC	VRRAVIYDPE	TGKEDPSKMG	VCSNFCCLSK	PG-DKVKITG	P8GKIMLLPE	EIPNATHIMI	GTGTGVAPFR	GYLRRMFE-
A. thaliana root	DHDG-NVPYV	EGQSYGIIPP	GEMP---KMG	---APHMVRL	YSIASTRYGD	SFDGRTISLC	VRRAVIYDPE	TGKEDPSKMG	VCSNFCCLSK	PG-DKVKITG	P8GKIMLLPE	DDFNATHIMI	ATGTGVAPFR	GYLRRMFE-
L. interrogans	AIDHSAYPVV	IGQSGGVIPP	GEDPEKQKMG	LADVYIVLRL	YSIASPSYSF	GKEDNIEFI	IKRDNVYDEN	GNIQ---FMG	VCSNFCCLSK	PG-DEVTMTG	P8GKIMLLPN	TDFSGDIMFL	ATGTGIAPFI	GMSSEELHE-
A. vinelandii	TTRNPSLREF	NGQFVMIGLE	VD-----	---GRPLMRA	YSIASPNYEE	HLEFFSIKVP	N-----	-----G	PLTSRLQHLK	EG-DELMVSR	KFTGTLVSD	LLPGKHLVLM	STGTGLAPFM	SLIQ-----
P. aeruginosa	TTRNPSLREF	NGQFVMIGLE	VE-----	---GRPLMRA	YSIASPNYEE	HLEFFSIKVP	D-----	-----G	PLTSRLQHLK	EG-DELMVSR	KFTGTLVSD	LLPGKHLVLM	STGTGLAPFM	SVIQ-----
X. axonopodis	TTRDAGFRFE	NGQFVMIGLE	TE-----	---TRPLMRA	YSIASPNYEE	HLEFFSIKVP	D-----	-----G	PLTSRLQHLK	EG-DELMVSR	KFTGTLVSD	LLPGKHLVLM	STGTGLAPFM	SVIQ-----
R. capsulatus	VTRPQTLRFR	SGEFVMIGLL	DDM-----	---GKPLMRA	YSIASPNYEE	HLEFFSIKVP	D-----	-----G	PLTSRLQHLK	EG-DELMVSR	KFTGTLVSD	LLPGKHLVLM	STGTGLAPFM	SVIQ-----
A. vinelandii	CTRPPEFRFR	AGQFARGLC	K-----	---ADGGVWRA	YSIASPNYEE	HLEFFSIKVP	D-----	-----G	PLTSRLQHLK	EG-DELMVSR	KFTGTLVSD	LLPGKHLVLM	STGTGLAPFM	SVIQ-----
E. coli	VH-APVLPPT	AGQFARGLC	I-----	---DGERVQRA	YSIASPNYEE	HLEFFSIKVP	D-----	-----G	PLTSRLQHLK	EG-DELMVSR	KFTGTLVSD	LLPGKHLVLM	STGTGLAPFM	SVIQ-----
B. aphidicola APS	LN-APIEPFF	AGQFARGLC	N-----SN	FLNPKTIQRA	YSIASPNYEE	HLEFFSIKVP	D-----	-----G	PLTSRLQHLK	EG-DELMVSR	KFTGTLVSD	LLPGKHLVLM	STGTGLAPFM	SVIQ-----

Consenso	SR	YxOGL	ExF											
Anabaena sp.	ERAANPEYQF	KGFSWLVFGV	PTTPNIIYKE	ELEEIQQKYP	-----DNF	RLTYAISRE-	-QPNPQGGRM	YIQDRVAEHA	DELWQLINQ	KTHYICGLR	GMEGIDAAL	SAAAAKEGVT	WSDYQKDLK	AGRWHVETV
Synechococcus sp.	---QHEDYKF	KGKAWLIFGV	PYTANILYKD	DFEPMGAENP	-----DNF	RLTYAISRE-	-QKTADGGKV	YVQSKVSEYA	DELWQLINQ	NTHVYMGCLK	GMPPIDETF	TAAEAKGGLN	WEEMRRSMGK	EHRWHVEVY
Synechocystis sp.	---QHEDYKF	KGLAWLIFGI	PKSENILYKD	DLEHMAAEPF	-----DNF	RLTYAISRE-	-QQNAEGGGM	YIQDRVAEHA	EELWMLQNP	KTHYICGLR	GMEGIDEAF	TALAEQNGEK	WTFQRMGK	EHRWHVEVY
Spirulina sp.	---QHEDYKF	KGLAWLIFGI	PYSFNIIYQQ	ELEELQEEFP	-----DNF	RLTYAISRE-	-QQNPQGGRM	YIQDRVAEHA	DQLWELIQK	NTHYICGLR	GMEGIDEGM	SAAAGKFDVD	WSDYQKDLK	KRWVHVETV
S. oleracea leaf	---KHEDYKF	NGLAWLFLGV	PTSSSLLYKE	EFEPMKEKAP	-----DNF	RLDFAVSRE-	-QTNERGERM	YIQTRMAQYA	VELWMLKGD	NTHYICGLR	GMEGIDDDM	VSLAAAEGLD	WIEYKRLK	AEQWVVEVY
O. sativa leaf	---KHEDYKF	NGLAWLFLGV	PTSSSLLYKE	EFEPMKEKAP	-----DNF	RLDFAVSRE-	-QTNERGERM	YIQTRMAQYA	VELWMLKGD	NTHYICGLR	GMEGIDDDM	VSLAAAEGLD	WIEYKRLK	AEQWVVEVY
P. sativum leaf	---KHEDYKF	NGLAWLFLGV	PTSSSLLYKE	EFEPMKEKAP	-----DNF	RLDFAVSRE-	-QTNERGERM	YIQTRMAQYA	VELWMLKGD	NTHYICGLR	GMEGIDDDM	VSLAAAEGLD	WIEYKRLK	AEQWVVEVY
N. tabacum leaf	---KHEDYKF	NGLAWLFLGV	PTSSSLLYKE	EFEPMKEKAP	-----DNF	RLDFAVSRE-	-QTNERGERM	YIQTRMAQYA	VELWMLKGD	NTHYICGLR	GMEGIDDDM	VSLAAAEGLD	WIEYKRLK	AEQWVVEVY
A. thaliana leaf1	---KHEDYKF	NGLAWLFLGV	PTSSSLLYKE	EFEPMKEKAP	-----DNF	RLDFAVSRE-	-QTNERGERM	YIQTRMAQYA	VELWMLKGD	NTHYICGLR	GMEGIDDDM	VSLAAAEGLD	WIEYKRLK	AEQWVVEVY
O. sativa root	---DVEKYRF	GGLAWLFLGV	ANSDSLLYDE	EFTSYLQYYP	-----DNF	RYDKALSRE-	-QKNKMGGM	YVQDKIEEYS	DEIFKLLDGG	-AHYFCGLR	GMPGIQDTL	KVVAEQRGES	WEQKLSQLK	NKQWVVEVY
P. sativum root	---SVPTKRF	GGLAWLFLGV	ANVDSLLYDD	EFTSYLQYYP	-----DNF	RYDKALSRE-	-QKNKMGGM	YVQDKIEEYS	DEIFKLLDGG	-AHYFCGLR	GMPGIQDTL	KVVAEQRGES	WEQKLSQLK	NKQWVVEVY
N. tabacum root	---SVPTKRF	NGLAWLFLGV	ANVDSLLYDD	EFTSYLQYYP	-----DNF	RYDKALSRE-	-QKNKMGGM	YVQDKIEEYS	DEIFKLLDGG	-AHYFCGLR	GMPGIQDTL	KVVAEQRGES	WEQKLSQLK	NKQWVVEVY
A. thaliana root1	---NVNPFKF	DGLAWLFLGV	ANSDSLLYDE	EFTSYLQYYP	-----DNF	RYDKALSRE-	-QKNKMGGM	YVQDKIEEYS	DEIFKLLDGG	-AHYFCGLR	GMPGIQDTL	KVVAEQRGES	WEQKLSQLK	NKQWVVEVY
L. interrogans	---KLIKRF	TGNITLVYGA	PYSDELVMDD	YKAGLESQHK	-----NF	KLITAIISREE	-KNSFDGGGM	YISHRVBEQA	EAVKILNNG	GRFYICGSK	GMEGIVIEEI	QKISGNTG-T	YEEFKHLE	AGQLFVETV
A. vinelandii	---DPEVYER	FEKVVLHGV	RQVNLAMAYQ	FITEHLSQSE	YFGEAVKEKL	IYPTVITRES	FHM--QGRIT	DLMRSGKLE	DIGLPPINPQ	DDRAMICGSP	SMLDESCEVL	DGFLK----	---ISPFMGE	PQDYLIERAFVEK--
P. aeruginosa	---DPEVYER	FEKVVLHGV	RQVNLAMAYQ	FITEHLSQSE	YFGEAVKEKL	IYPTVITRES	FHM--QGRIT	DLMRSGKLE	DIGLPPINPQ	DDRAMICGSP	SMLDESCEVL	DGFLK----	---ISPFMGE	PQDYLIERAFVEK--
X. axonopodis	---DPEVYER	FEKVVLHGV	RQVNLAMAYQ	FITEHLSQSE	YFGEAVKEKL	IYPTVITRES	FHM--QGRIT	DLMRSGKLE	DIGLPPINPQ	DDRAMICGSP	SMLDESCEVL	DGFLK----	---ISPFMGE	PQDYLIERAFVEK--
R. capsulatus	---EPGAYEK	FDEVDMMHAC	KIVAELEYGR	QLVEALQEDP	YFGEAVKEKL	IYPTVITRES	FHM--QGRIT	DLMRSGKLE	DIGLPPINPQ	DDRAMICGSP	SMLDESCEVL	DGFLK----	---ISPFMGE	PQDYLIERAFVEK--
A. vinelandii	---DPEVYER	FEKVVLHGV	RQVNLAMAYQ	FITEHLSQSE	YFGEAVKEKL	IYPTVITRES	FHM--QGRIT	DLMRSGKLE	DIGLPPINPQ	DDRAMICGSP	SMLDESCEVL	DGFLK----	---ISPFMGE	PQDYLIERAFVEK--
E. coli	---LQKDLDR	FNQVLVHAA	RYAADLSYLP	IMQELEKRYE	-----GKL	RIQTVVSRRT	AAGSLTGRIP	ALIESGELES	TIGLP-MNKE	TSHVMCGNP	QVRDTQQLL	KETRM----	---TKHLRRR	PQDMTAHYVW----
B. aphidicola APS	---EGKNINR	FNHITLTHAV	RYQNELTYLP	IMKELRQKYN	-----GKL	RIQTVVSRRT	AAGSLTGRIP	ALIESGELES	TIGLP-MNKE	TSHVMCGNP	QVRDTQQLL	KETRM----	---TKHLRRR	PQDMTAHYVW----

Figura A.1: Alineamiento de secuencias de FNRs de tipo planta. Se resaltan en morado las 6 regiones conservadas entre FNRs de tipo planta, en verde el bucle característico de FNRs plásticas que acomoda la parte adenosina del cofactor, y en rojo los residuos correspondientes a la extensión carboxilo terminal de FNRs bacterianas.

Tabla A.1: Ecuación de M-M y linealizaciones sin inhibición y para cada tipo de inhibición.

	Función:	Inverso de Lineweaver-Burk	Inverso de Hanes-Woolf	Inverso de Eadie-Hofstee
Michaelis-Menten (M-M)	$v = \frac{v_{\max}[S]}{K_m + [S]}$	$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max} S} + \frac{1}{V_{\max}}$	$\frac{S}{v} = \frac{K_m + S}{V_{\max}}$	$\frac{V_{\max}}{v} = \frac{K_m + S}{S}$
M-M con inhibición competitiva	$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + [S]}$	$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + \frac{1}{V_{\max}}$	$\frac{[S]}{v} = \frac{K_M}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + \frac{[S]}{V_{\max}}$	$v = V_{\max} - K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) \frac{v}{[S]}$
M-M con inhibición acompetitiva	$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_{I'}}\right)}$	$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{S V_{\max}} + \frac{1 + \frac{[I]}{K_I}}{V_{\max}}$	$\frac{[S]}{v} = \frac{[S]}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + \frac{K_m}{V_{\max}}$	$v = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{[I]}{K_I}} - \frac{K_m v}{1 + \frac{[I]}{K_I} [S]}$
M-M con inhibición no competitiva	$v = \frac{V_{\max}[S]}{(K_m + [S]) \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}$	$\frac{1}{v} = \frac{1 + \frac{[I]}{K_I}}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max} S} \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)$	$\frac{[S]}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + \frac{1 + \frac{[I]}{K_I}}{V_{\max}} S$	$v = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{[I]}{K_I}} - \frac{K_m v}{[S]}$

Figura A.2

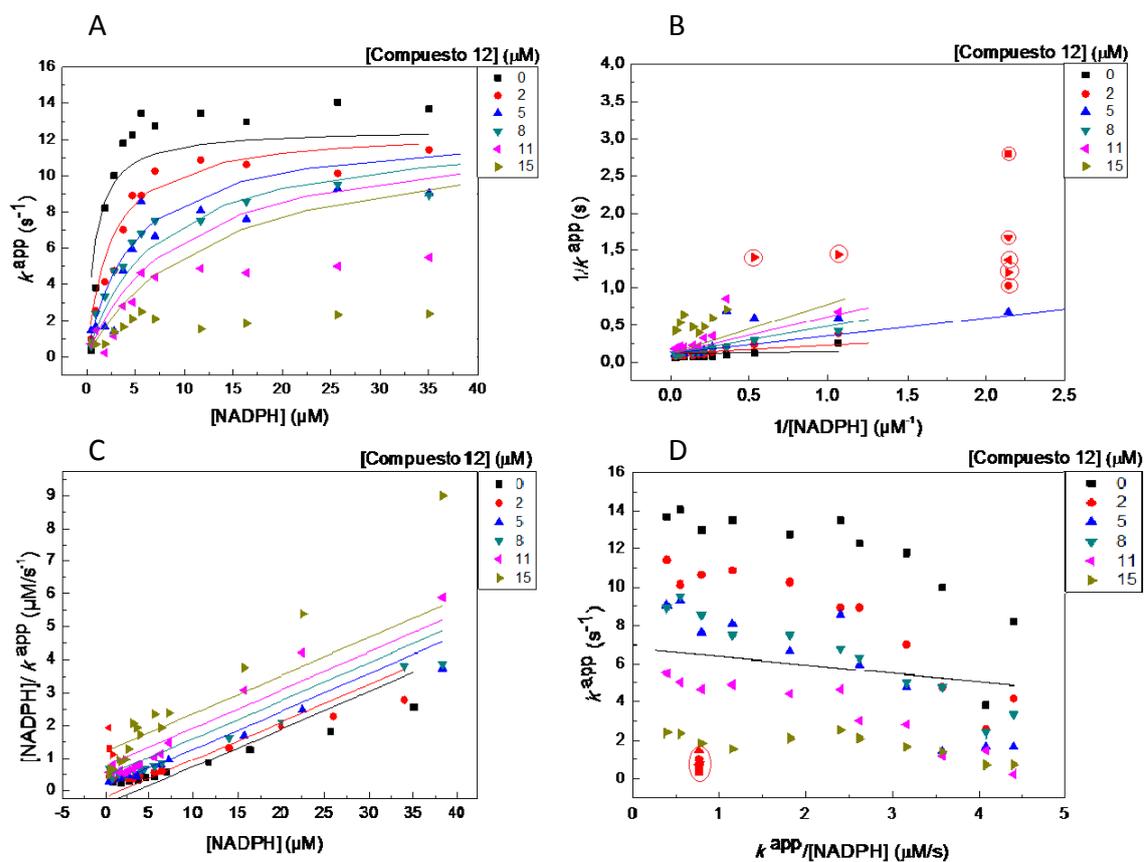


Figura A.2: Representaciones gráficas de los ajustes globales (líneas) a los datos cinéticos experimentales (puntos) para la inhibición de tipo competitivo de **A)** las ecuaciones de M-M modificadas por el factor de inhibición y sus inversos **B)** Lineweaver-Burk **C)** Hanes-Woolf y **D)** Eadie Hofstee. Con círculos rojos se muestran los datos experimentales que fueron descartados para el ajuste.

Figura A.3

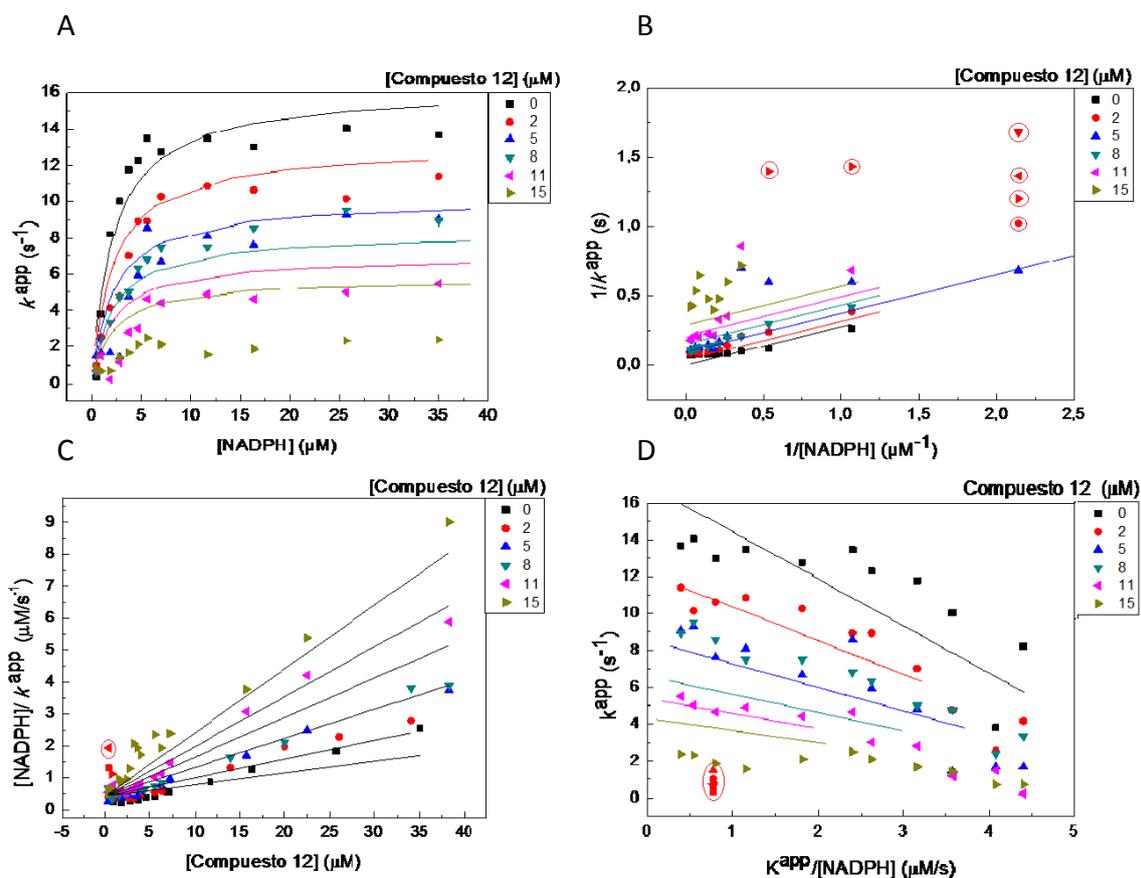


Figura A.3: Representaciones gráficas de los ajustes globales (líneas) a los datos cinéticos experimentales (puntos) para la inhibición de tipo anticompitativo de A) las ecuaciones de M-M modificadas por el factor de inhibición y sus inversos B) Lineweaver-Burk C) Hanes-Woolf y D) Eadie Hofstee. Con círculos rojos se muestran los datos experimentales que fueron descartados para el ajuste.