

VOLUMEN 37 XXX Verano De la Ciencia ISSN 2395-9797 www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

Análisis in silico de las proteínas Triosafosfato isomerasa (Tpi1), Piruvato descarboxilasa (Pdc1), Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) y Fosfoglicerato mutasa (Gpm1) de especies de Candida como posibles blancos terapéuticos contra candidiasis

In silico analysis of Triosephosphate isomerase (Tpi1), Pyruvate decarboxylase (Pdc1), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and Phosphoglycerate mutase (Gpm1) proteins from *Candida* species as potential therapeutic targets against candidiasis

Mónica Arlette Camarillo-Manzo¹, Dulce María Márquez-Salas¹, Sahian Arely Gómez-Hernández¹, Guadalupe Sierra-Juárez¹, Edson Everardo Magueda-Cabrera¹, Mayra Cuéllar-Cruz¹*.

¹Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato, Noria Alta S/N, Col. Noria Alta, C.P. 36050, Guanajuato, Guanajuato, México.
*mcuellar@ugto.mx

Resumen

Las infecciones fúngicas invasivas (IFI's), especialmente las candidiasis, representan una amenaza significativa para pacientes inmunocomprometidos, siendo Candida albicans la especie más común. No obstante, el uso extensivo de antibióticos y dispositivos médicos ha favorecido la emergencia de especies de Candida no-C. albicans con resistencia antifúngica, como Candida glabrata. En estudios previos del grupo de trabajo, se han identificado proteínas de pared celular (PPC) de cinco especies patógenas de Candida con función y localización dual (denominadas moonlight) con posible potencial como blancos terapéuticos contra estos microorganismos. Dentro de estas PCC se encuentran la Triosa fosfato isomerasa (Tpi1), la Piruvato descarboxilasa (Pdc1), la Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y la Fosfoglicerato mutasa (Gpm1). En el presente trabajo se planteó como objetivo, mediante herramientas in silico, evaluar el potencial de estas cuatro PPC tipo moonlight como blancos terapéuticos. Se obtuvieron las secuencias de Tpi1, Pdc1, GAPDH y Gpm1 de cinco especies de Candida, así como de Homo sapiens, las cuales fueron modeladas tridimensionalmente (3D) con AlphaFold3. Las estructuras 3D. se evaluaron mediante las herramientas de SAVES, ModLoop, YASARA SwissDock y PyRx. Posteriormente, se realizó el acoplamiento molecular con los antifúngicos fluconazol, caspofungina y anfotericina B, y se visualizaron las interacciones con PLIP Tool y ChimeraX-1.9. Los resultados mostraron que Tpi1 y Gpm1 presentan alta similitud estructural con sus homólogas humanas, con mayor afinidad de unión hacia las isoformas humanas. No obstante, interesantemente la Pdc1 y GAPDH mostraron menor similitud con proteínas humanas y presentaron interacciones favorables con fármacos en especies de Candida, especialmente C. tropicalis, C. galabrata y C. parapsilosis, lo que sugiere un mayor potencial terapéutico. Los datos obtenidos permiten concluir que el modelado molecular puede guiar el desarrollo de nuevos antifúngicos dirigidos específicamente a proteínas fúngicas, reduciendo así los efectos adversos en el hospedero humano y mejorando la eficacia del tratamiento.

Palabras clave: C. albicans; C. tropicalis; C. krusei; C. parapsilosis; C. glabrata; H. sapiens; Tpi1; Pdc1; GAPDH; Gpm1; Fluconazol; Caspofungina; Anfotericina B.

Introducción

Las infecciones fúngicas invasivas (IFI's), particularmente las candidiasis, representan una causa importante de morbilidad y mortalidad en pacientes hospitalizados e inmunocomprometidos¹. Candida albicans es la especie más frecuentemente asociada a estas infecciones. No obstante, el uso indiscriminado de antibióticos de amplio espectro y la implementación de dispositivos médicos ha favorecido el surgimiento de especies Candida no Candida albicans (NCAC), como Candida glabrata, Candida krusei, Candida parapsilosis y Candida tropicalis, las cuales presentan una creciente resistencia a los antifúngicos^{2,3}. Dentro de los factores de virulencia y/o patogenicidad asociados a estos patógenos, la capacidad de formar biopelículas se ha identificado como uno de los factores de virulencia más relevantes en Candida, dado que las células sésiles muestran resistencia tanto

¹ Ramírez-Quijas, M.D., López-Romero, E., Cuéllar-Cruz, M. (2015). Proteomic analysis of cell wall in four pathogenic species of *Candida* exposed to oxidative stress. *Microbial Pathogenesis*, 87(2015) 1-12.

² Serrano-Fujarte, I., López-Romero, E., Reyna-López, G.E., Martínez-Gámez, M.A., Vega-González, A., Cuéllar-Cruz, M. (2015). Influence of Culture Media on Biofilm Formation by *Candida* Species and Response of Sessile Cells to Antifungals and Oxidative Stress. *BioMed Research International*, 2015, 1-15.

³ Ramírez-Quijas, M.D., Zazueta-Sandoval, R., Obregón-Herrera, A., López-Romero, E., Cuéllar-Cruz, M. (2015). Effect of oxidative stress on cell wall morphology in four pathogenic *Candida* species. *Mycol Progress*, 14(8).



VOLUMEN 37 XXX Verano De la Ciencia

ISSN 2395-9797

www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

a antifúngicos como a las especies reactivas de oxígeno (ERO) producidas durante el estallido respiratorio de células fagocíticas¹. Las biopelículas se desarrollan sobre tejidos del hospedero y sobre dispositivos médicos, siendo la primera etapa de la infección la adhesión mediada por proteínas de la pared celular (PPC), dentro de las cuales se encuentran proteínas con función y localización dual denominadas moonlight, debido a que presentan funciones múltiples no relacionadas con su papel metabólico primario^{4,5}. Én ocasiones las biopelículas pueden generar resistencia a antifúngicos como triazoles, equinocandinas y polienos, actuando como una barrera protegiendo las células subyacentes de los fármacos antimicóticos lo cual reduce la concentración del fármaco⁶. La resistencia por parte de las especies de Candida a antifúngicos de uso rutinario, hace indispensable el desarrollo de nuevos fármacos, asi como la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos. En esta vía, en estudios previos de nuestro grupo de trabajo se han identificado PPC tipo moonlight como potenciales blancos terapéuticos contras estos microorganismos, tales como la Triosafosfato isomerasa (Tpi1), la Piruvato descarboxilasa (Pdc1), la Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) y la Fosfoglicerato mutasa (Gpm1). Estas PPC además se han reportado que participan en el metabolismo del etanol, glucólisis y glucogénesis, así también poseen otras funciones como ayudar a mantener el pH en equilibrio durante la anaerobiosis, en la adhesión de tejidos y biomateriales, evasión inmune y respuesta al estrés oxidativo (REO), lo cual contribuye a la formación de biopelículas y persistencia del patógeno en el hospedero^{1,4,7}. Con la finalidad de contribuir en la identificación de posibles blancos terapéuticos, el objetivo del presente trabajo fue evaluar mediante herramientas in silico, el potencial de estas cuatro PPC tipo moonlight como blancos terapéuticos.

Materiales y métodos

1. Obtención de secuencia de las proteínas

Las secuencias de las proteínas de interés fueron obtenidas de la base de datos UniProt (https://www.uniprot.org), mediante la búsqueda de los nombres específicos: triosafosfato isomerasa (Tpi1), piruvato descarboxilasa (Pdc1), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y fosfoglicerato mutasa (Gpm1), en las especies de interés: *C. albicans, C. tropicalis, C. krusei, C. parapsilosis, C. glabrata y H. sapiens.* Para cada caso, se seleccionó la secuencia con la mayor información disponible, considerando secuencias completas, evitando isoformas redundantes o truncadas y se descargaron en formato FASTA. Los códigos de acceso utilizados se muestran en la tabla 1:

Tabla 1. Códigos de acceso en las bases de datos UniProt y NCBI.

Proteína	Organismo	ID UniProt	ID NCBI
	C. albicans	Q9P940	XP_719842.1
	C. glabrata	Q6FRI3	XP_447161.1
	C. krusei	A3FKF2	XP_ABN55898.1
Triosofosfato isomorasa (Tni1)	C. parapsilosis	A0A8X7NMW5	XP_KAF6052360.1
Triosafosfato isomerasa (Tpi1)	C. tropicalis	C5MHR5	XP_002551310.1
	H. sapiens isoforma 1	P60174-1	XP_ 000356.1
	H. sapiens isoforma 2	P60174-3	NP_001152759.1
	H. sapiens isoforma 3	P60174-4	NP_001244955.1
	C. albicans	A0A8H6F5V1_CANAX	KAF6071669.1
	C. glabrata	PDC1_CANGA	CAG62667.1
Piruvato descarboxilasa	C. krusei	A0A1Z8JR31_PICKU	OUT23045.1
Fild valo descarboxilasa	C. parapsilosis	G8BFQ0_CANPC	CCE42684.1
	C. tropicalis	C5M3P1_CANTT	EER35941.1
	H. sapiens	ODPB_HUMAN	AAA36428.1
	C. albicans	Q5ADM7	XP_719909.1
	C. glabrata	Q6FPW3	XP_447731.1
Gliceraldehído-3-fosfato	C. krusei	A0A099P8U3	XP_029320181.1
deshidrogenasa (GAPDH)	C. parapsilosis	G8BB94	CCE42318.1
	C. tropicalis	C5MHX3	XP_002551368.1
	H. sapiens isoforma 1	P04406	AAP88932.1
	H. sapiens isoforma 2	O14556	AAF87970.1
	C. albicans	PMGY_CANAL	XP_721022.1
Fosfoglicerato mutasa (Gpm1)	C. glabrata	Q6FN95_CANGA	XP_448299.1
	C. krusei	A0A099NZM0_PICKU	AWU76917.1

⁴ Serrano-Fujarte, I., López-Romero, E., Cuéllar-Cruz, M. (2015). Moonlight-like proteins of the cell wall protect sessile cells of *Candida* from oxidative stress. *Microbial Pathogenesis*, 90, 22-33.

⁵ Núñez-Beltrán, A., López-Romero, E., Cuéllar-Cruz, M. (2017). Identification of proteins involved in the adhesion of *Candida* species to different medical devices. *Microbial Pathogenesis*, 107, 293-303.

⁶ Costa-Olivera, S., & Rodriguez, A. (2020). Candida albicans Antifungal Resistance and Tolerance in Bloodstream Infections: The Triad Yeast-Host-Antifungal. Microorganisms MDPI. ID PMC7074842.

⁷ Medrano-Díaz, C.L., Vega-González, A., Ruiz-Baca, E., Moreno, A., Cuéllar-Cruz, M. (2018). Moonlighting proteins induce protection in a mouse model against *Candida* species. *Microbial Pathogenesis*, 124(2018), 21-29.



VOLUMEN 37 XXX Verano De la Ciencia

ISSN 2395-9797 www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

 C. parapsilosis
 G8B878_CANPC
 CCE40663.1

 C. tropicalis
 C5MF82_CANTT
 EER31942.1

 H. sapiens isoforma 1
 PGAM1_HUMAN
 NP_002620.1

 H. sapiens isoforma 2
 PGAM2_HUMAN
 NP_000281.2

2. Predicción de estructuras tridimensionales (3D)

La predicción de las estructuras tridimensionales (3D) monoméricas de las cuatro proteínas se realizó utilizando el servidor AlphaFold3. Las secuencias correspondientes, en formato FASTA, fueron cargadas al sistema, y las predicciones estructurales se generaron utilizando los parámetros predeterminados. En el caso de la proteína Pdc1 se modelaron interacciones con cofactores de manera integrada, permitiendo incorporar los iones metálicos directamente durante la predicción estructural.

3. Evaluación y selección del mejor modelo estructural

La calidad de los modelos estructurales predichos fue evaluada mediante el servidor SAVES v6.1 (https://saves.mbi.ucla.edu/), utilizando las herramientas ERRAT, Verify-3D y Procheck. Con la finalidad de analizar el factor de calidad global, la compatibilidad entre estructura y secuencia y el análisis mediante la generación de diagramas de Ramachandran respectivamente. El modelo con el mejor desempeño en estas evaluaciones fue seleccionado para cada proteína. Se consideró como modelo de alta calidad aquel que cumpliera con los siguientes criterios: un valor de ERRAT superior al 90%, una puntuación en Verify-3D superior al 60% y ausencia de residuos en regiones desfavorables según el análisis Procheck.

4. Refinamiento de bucles

Se realizó un refinamiento de los bucles en las estructuras GAPDH y Pdc1 utilizando ModLoop (https://modbase.compbio.ucsf.edu/modloop/), con el objetivo de reducir tensiones estructurales y mejorar la geometría en regiones flexibles del modelo. La selección de los residuos a refinar se basó en puntuaciones bajas observadas en los diagramas de Ramachandran y el refinamiento condujo a mejoras en las puntuaciones de ERRAT y Verify-3D, así como un ajuste estructural más favorable en general. No se requirió refinamiento para las proteínas Tpi1 y Gpm1.

5. Minimización energética

Los modelos de cada proteína que cumplieron los criterios de calidad fueron sometidos a un proceso de minimización energética utilizando el servidor YASARA, con el objetivo de optimizar las interacciones intermoleculares. La minimización se realizó empleando el campo de fuerza AMBER14, con parámetros predeterminados y un máximo de 5000 pasos hasta alcanzar la convergencia. Posteriormente, los modelos minimizados fueron evaluados mediante la función SCORE de YASARA, verificando la optimización.

6. Docking molecular (acoplamiento)

El acoplamiento molecular se realizó utilizando AutoDock Vina, a través del servidor SwissDock (https://www.swissdock.ch) y PyRx de manera individual para la Tpi1. En ambos casos, los ligandos (anfotericina B ID: 5280965, caspofungina ID: 16119814 y fluconazol ID: 3365) fueron obtenidos desde la base de datos de PubChem (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov). SwissDock generó múltiples conformaciones tridimensionales de cada ligando y les asignó las cargas parciales y parámetros moleculares correspondientes utilizando el campo de fuerza CHARMM. De forma paralela, las proteínas cargadas en formato PDB fueron procesadas internamente: se eliminaron moléculas de agua no esenciales, se agregaron átomos de hidrógeno y se asignaron cargas conforme al campo de fuerza. Por otro lado, PyRx generó de igual manera las conformaciones estructurales de proteína-ligando para Tpi1 en Vina. El sitio de acoplamiento fue definido mediante una caja que abarcó toda la superficie proteica, permitiendo un análisis del tipo "blind docking", y el parámetro de exhaustividad se estableció en 10 para ambos programas. Finalmente, el algoritmo EADock DSS, integrado en SwissDock, exploró múltiples orientaciones y conformaciones posibles del ligando, generando complejos proteína-ligando y sus respectivas energías de afinidad.

7. Visualización de interacciones proteína-ligando

La visualización de las interacciones receptor-ligando se realizó utilizando la herramienta PLIP Tool (Protein-Ligand Interaction Profiler. https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index), la cual permite identificar de manera rápida y precisa interacciones no covalentes, como enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas





y acoplamientos p-p. Para cada complejo analizado, se seleccionó el modelo con la mejor energía de afinidad obtenida en el acoplamiento molecular. La inspección tridimensional de los complejos se realizó utilizando el programa UCSF ChimeraX-1.9, mientras que, para complementar y validar estos resultados, se empleó el software BIOVIA Discovery Studio Visualizer.

Resultados y discusión

Con la finalidad de realizar una comparación adecuada entre las proteínas minimizadas energéticamente de cada especie de *Candida* y *Homo sapiens*, fueron superpuestas las estructuras proteícas utilizando como estructura guía la proteína del humano en su isoforma 1, asignando a cada especie un color distintivo y así visualizar similitudes y diferencias entre las proteínas. Como se observa en la figura 1, las proteínas más similares con respecto a las especies de *Candida* y demás isoformas de *Homo sapiens*, son Tpi1, GAPDH y Gpm1. Debido a que, al excluir en el programa regiones estructuralmente diferentes, se superponen las partes con mayor similitud⁸, lo que se puede rectificar en la tabla 2, el RMSD de las proteínas ya mencionadas es diferente a 0.0 Å, resultado que muestra no son iguales, pero a menor el valor de RMSD, mayor es la semejanza entre las proteínas comparadas.

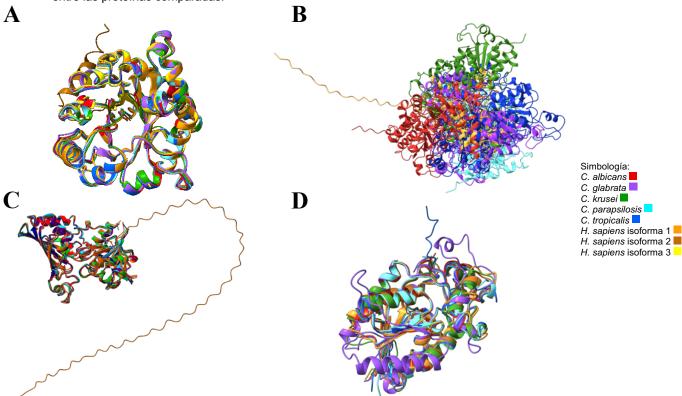


Figura 1. Comparación estructural tridimensional (3D) de proteínas por medio de superposición. Las estructuras fueron optimizadas mediante minimización energética y alineadas con matchmaker en ChimeraX-1.9. A) Superposición estructural de las proteínas triosafosfato isomerasa (Tpi1); B) Superposición estructural de las proteínas piruvato descarboxilasa (Pdc1); C) Superposición de las proteínas gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH); D) Superposición estructural de las proteínas fosfoglicerato mutasa (Gpm1).

En todos los casos, la desviación cuadrática media (RMSD) obtenida fue inferior a 2.0 Å, dato que sugiere que son estructuras moleculares muy similares y su diferencia es mínima entre la distancia entre los pares de átomos. Sin embargo, en el caso de la proteína Pdc1 (Fig. 1B), no se observa un alineamiento definido entre la estructura de *H. sapiens* y las especies del género *Candida*, a diferencia de lo observado en las otras proteínas analizadas. Esta diferencia se puede atribuir a que en humanos no se encuentra una proteína homóloga directa a la Pdc1, debido a que esta enzima es característica de levaduras y plantas. Por esta razón, se empleó como equivalente funcional la subunidad E1 de la piruvato deshidrogenasa mitocondrial. Además, la base de datos UniProt no reporta una versión humana de Pdc1. En la tabla 2 el RMSD de la Pdc1 supera 1 Å lo que señala que hay variaciones en la secuencia de aminoácidos y una menor similitud estructural 3D.

⁸ UCSF ChimeraX feature Highlights. (s. f.). RBVI.



VOLUMEN 37 XXX Verano De la Ciencia

ISSN 2395-9797 www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

Tabla 2. Valores de RMSD (Root Mean Square Deviation) entre proteínas modelo de especies de Candida spp. y humanas, comparadas con la isoforma 1 de H. sapiens.

Proteína	H. sapiens Isoforma 1	C. albicans	C. tropicalis	C. krusei	C. parapsilosis	C. glabrata	H. sapiens Isoforma 2	H. sapiens Isoforma 3
Triosafosfato isomerasa (Tpi1)	Estructura de referencia	0.731_Å	0.712Å	0.687Å	0.734Å	0.653Å	0.363Å	0.488Å
Piruvato descarboxilasa (Pdc1)		1.020 Å	1.444 Å	1.291 Å	1.114 Å	1.464 Å	N/A	N/A
Gliceraldehído-3- fosfato- deshidrogenasa (GAPDH)		0.621 Å	0.619 Å	0.670 Å	0.599 Å	0.708 Å	0.564 Å	N/A
Fosfoglicerato mutasa (Gpm1)		0.718 Å	0.951 Å	0.983 Å	0.978 Å	0.977 Å	0.413 Å	N/A

N/A: No aplica.

En este estudio se utilizaron tres fármacos antifúngicos ampliamente utilizados de uso rutinario en los diferentes tipos de candidiasis, con la finalidad de evaluar sus posibles interacciones in silico con las cuatro PPC tipo moonlight seleccionadas, y de esta manera predecir si estas enzimas podrían funcionar como blancos terapéuticos. Uno de los fármacos utilizados fue la anfotericina B, un polieno de amplio espectro y uno de los antifúngicos más utilizados en la práctica clínica. Los polienos actúan uniéndose al ergosterol, componente clave de la membrana plasmática de los hongos, lo que genera poros que alteran la permeabilidad celular y provocan la muerte celular por la liberación de iones y metabolitos^{9,10}. Otro de los antifúngicos empleados fue la caspofungina, la cual es un miembro de la familia de las equinocandinas, cuya acción consiste en inhibir la síntesis de (1,3)-β-D-glucano, un polisacárido esencial para la integridad de la PC de Candida spp., lo que conduce a la lisis celular en cepas susceptibles¹¹. Finalmente, se incluyó al fluconazol, un antifúngico del grupo de los azoles, que actúa inhibiendo la enzima lanosterol 14 α-desmetilasa dependiente del citocromo p-450 (también conocida como p-450). Esta enzima participa en la biosíntesis de ergosterol, componente fundamental de las membranas plasmáticas fúngicas; su inhibición interfiere con la función y estabilidad de la membrana, afectando el crecimiento fúngico¹².

Al realizar las interacciones receptor-ligando se observó que las representaciones tridimensionales de las proteínas estudiadas, generadas mediante el software bioinformático UCSF ChimeraX v1.9, después de establecer las interacciones receptor-ligando con ayuda de BIOVIA Discovery Studio Visualizer, las imágenes muestran los complejos formados entre proteínas de distintas especies e isoformas humanas con los tres fármacos antifúngicos evaluados (Fig. 2). En cada caso, se destacan las regiones de unión mediante recuadros ampliados que permiten observar los residuos aminoacídicos involucrados y el tipo de interacción no covalente. Se identificó que especies como C. albicans, C. glabrata, C. parapsilosis, C. tropicalis, así como las isoformas 1 y 2 de Homo sapiens, presentaron un mayor número de interacciones favorables con los respectivos fármacos (Fig. 2).

 $^{^9}$ Douglas, V. (2023). Amphotericin B: A Polyene Antifungal Agent. Fungal Genomics & Biology, 13(2), 1-2.

¹⁰ Carolus, H., Pierson, S., Lagrou, K., & Van Dijck, P. (2020). Amphotericin B and Other Polyenes—Discovery, Clinical Use, Mode of Action and Drug Resistance.

Journal of Fungi, 6(4), 321.

11 Mora-Duarte, J., Betts, R., Rotstein, C., Lopes-Colombo, A., Thompson-Moya, L., Smietana, J., et al. (2003). Eficacia de la caspofungina comparada con la



Ciencia

VOLUMEN 37 XXX Verano De la Ciencia ISSN 2395-9797

www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

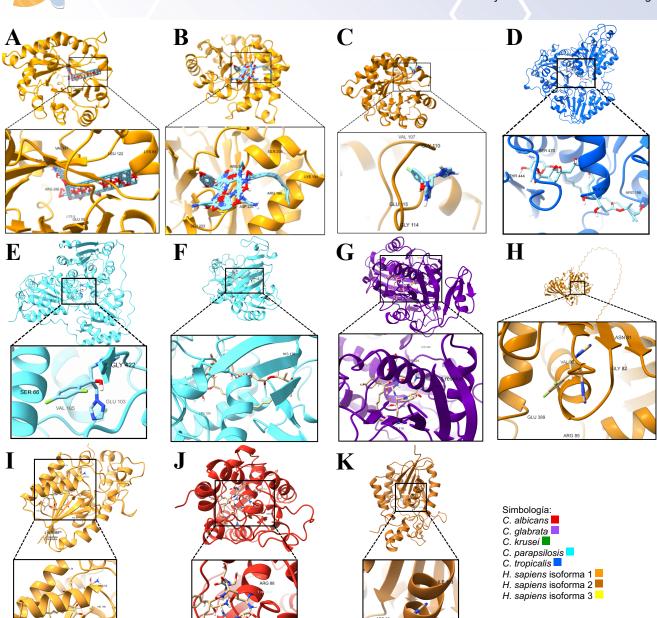


Figura 2. Interacciones receptor-ligando. A) Interacción de la proteína Triosafosfato isomerasa con la anfotericina B; B) Interacción de la proteína Triosafosfato isomerasa con la caspofungina; C) Interacción de la proteína Triosafosfato isomerasa con el fluconazol; D) Interacción de la proteína Piruvato descarboxilasa con el anfotericina B; E) Interacción de la proteína Piruvato descarboxilasa con el fluconazol; F) Interacción de la proteína Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa con la anfotericina B; G) Interacción de la proteína Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa con la caspofungina; H) Interacción de la proteína Fosfoglicerato mutasa con la anfotericina B; J) Interacción de la proteína Fosfoglicerato mutasa con la caspofungina; K) Interacción de la proteína Fosfoglicerato mutasa con el fluconazol. Se destaca la ausencia de interacciones favorables entre la Piruvato descarboxilasa con la caspofungina.

Estas interacciones proteína-ligando se desglosan a detalle en la tabla 3, en donde se muestran las interacciones *in silico* observadas entre las proteínas seleccionadas y los tres fármacos antifúngicos evaluados. Se incluyen los valores de energía de afinidad, los cuales reflejan la estabilidad del complejo proteína-ligando: un valor más negativo, significa que la afinidad es mayor y la probabilidad de una interacción estable termodinámicamente¹³. Asimismo, se identificaron los residuos aminoacídicos involucrados en cada interacción, así como el tipo de enlace no covalente establecido, entre los que se incluyen puentes de hidrógeno, enlaces

¹³ Yunta, M. J. R. (2016). Docking and Ligand Binding Affinity: Uses and Pitfalls. American Journal of Modeling and Optimization, 4(3), 74-114.



www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

carbono-hidrógeno, interacciones del tipo alquilo e interacciones con átomos halógenos como flúor. Datos que permiten inferir tanto la proximidad espacial como la naturaleza química de la unión, lo que contribuye a evaluar la potencial eficacia del acoplamiento.

Tabla 2. Interacciones moleculares proteína-ligando y energías de afinidad.

Proteína	Ligando	Energía de afinidad (Kcal/mol)	Especie	Aminoácidos	Interacción enlace
		,		ARG A:206	Puente de Hidrogeno
	Anfotericina B	-12.3	H. sapiens isoforma 1	VAL A:161	Puente de Hidrogeno
				SER A:204	Carbono-Hidrogeno
				ARG A:5	Puente de Hidrogeno
	Caspofungina	-7.6	H. sapiens isoforma 1	LYS A:194	Alquilo
				GLN A:203	Puente de Hidrogeno
				VAL A:107	Halógeno (Flúor)
	Fluconazol	-7.3	H. sapiens isoforma 2	GLY A:110	Puente de Hidrogeno
				GLU A:115	Carbono-Hidrogeno
A	Anfotericina B	-6.946	C. tropicalis	THR A:444	Puente de hidrógeno
Pdc1	Caspofungina	-4.234	C. tropicalis		Sin interacciones favorables
	Fluconazol	-6.851	C. parapsilosis	GLY A:422	Halógeno (Flúor)
	Fluconazoi	-0.051		VAL A:105	Alquilo
	Anfotericina B	7 574	C. parapsilosis	HIS A:178	Carbono-Hidrógeno
	Aniotericina B	-7.574		LEU A:326	Alquilo
				ALA A:214	Alquilo
GAPDH	Caspofungina	-5.583	C. glabrata	HIS A:289	Puente de hidrógeno
GAPDH				TYR A:316	Carbono-Hidrógeno
				ASN A:81	Carbono-Hidrógeno
	Fluconazol	-6.440	H. sapiens isoforma 2	VAL A:90	Alquilo
				GLU A:389	Halógeno
				HIS A:186	Puente de hidrógeno
	Anfotericina B	-7.400	H. sapiens isoforma 1	PRO A:215	Alquilo
Gpm1				GLY A:34	Carbono-Hidrógeno
				VAL A:7	Alquilo
	Caspofungina	-4.219	C. albicans	ALA A:181	Carbono-Hidrógeno
				ARG A:88	Puente de hidrógeno
				ILE A:193	Alquilo
	Fluconazol	-7.044	H. sapiens isoforma 2	ASN A:88	Carbono-Hidrógeno
				ARG A:10	Puente de hidrógeno
				HIS A:11	Halógeno (flúor)

En el caso de la proteína Tpi1 se encontró una alta afinidad con los tres ligandos antifúngicos evaluados, sin embargo, en todos los casos el valor mayor de energía de afinidad se observó con las isoformas humanas de la enzima y no en las especies de Candida. En particular, la anfotericina B mostró una alta afinidad de -12.3 kcal/mol en la isoforma 1 de H. sapiens, la caspofungina mostró un valor de -7.6 kcal/mol en la isoforma 1 de H. sapiens, y el fluconazol mostró una afinidad de -7.3kcal/mol en isoforma 2 de H. sapiens. Estos resultados muestran la limitación de poder considerar a Tpi1 como blanco terapéutico, va que un blanco ideal debe presentar una especificidad por el patógeno en este caso para las especies de Candida y no en proteínas humanas (Figs. 2A, B, C); la Tpi1 es una enzima metabólica clave en la interconversión de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y D-gliceraldehído-3-fosfato (G3P) en la glucólisis y la gluconeogénesis; en humanos, deficiencias congénitas de esta enzima dan lugar a un trastorno autosómico recesivo poco común, caracterizado por anemia hemolítica crónica, alteraciones neurológicas, debilidad muscular progresiva y miocardiopatía, condiciones que generalmente resultan fatales en los primeros años de vida¹⁴. Por lo tanto, a pesar de la alta afinidad observada, la fuerte interacción en isoformas humanas sugiere un riesgo elevado. Mientras en el caso de las enzimas GAPDH y Gpm1 fue en donde se encontraron los valores más altos de afinidad de unión, y también se registraron en isoformas humanas. En el caso de Gpm1, con las isoformas de H. sapiens, tanto la anfotericina B como el fluconazol mostraron energías de afinidad de -7.400 y -7.044 kcal/mol, respectivamente, lo cual sugiere un potencial riesgo de efectos adversos fuera del blanco terapéutico, en caso de que esta enzima se consideré como diana terapéutica. De manera similar, para GAPDH en la isoforma humana 2, se obtuvo una energía de afinidad de -6.440 kcal/mol con fluconazol. En ambos casos, la afinidad preferencial hacia las isoformas humanas en lugar de las proteínas del patógeno reduce su potencial terapéutico, ya que un blanco ideal debe mostrar especificidad hacia las proteínas del organismo objetivo para minimizar posibles efectos adversos en el hospedero.

¹⁴ Rodríguez-Almazán, C., Arreola, R., Rodríguez-Larrea, D., Aguirre-López, B., Tuena de Gómez-Puyou, M., Pérez-Montfort, R., Costas, M., Gómez-Puyou, A., & Torres-Larios, A. (2008). Structural basis of human triosephosphate isomerase deficiency: Mutation E104D is related to alterations of a conserved water network at the dimer interface. *Journal of Biological Chemistry*, 283(35), 23254–23263.



www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

No obstante, interesantemente, en el caso de las proteínas Pdc1, GAPDH y Gpm1 también se encontró una interacción de proteína-ligando con las especies de Candida, ya que tuvieron una mayor energía de afinidad (Fig. 2, Tabla 3). En la Pdc1, la anfotericina B y la caspofungina mostraron una mayor energía de afinidad para la especie de C. tropicalis y para el fluconazol fue para C. parapsilosis. Sin embargo, en la visualización de esta interacción de manera tridimensional para la caspofungina no existió, entonces la energía de afinidad dada en el programa AutoDock solo fue una posible conformación tridimensional evaluada. En el resto de los modelados moleculares 3D de las interacciones de los ligandos con las proteínas de las especies de Candida, se muestran los aminoácidos más afines con interacciones al fármaco mediante puentes de hidrógeno, halógenos, alquilos o carbonos (Fig. 2, Tabla 3). Datos que indican en conjunto que las proteínas GAPDH y Pdc1 exceptuando la interacción con la caspofungina para la proteína Pdc1, se pueden utilizar como blancos terapéuticos. Resultado que se encuentra en correlación con otros trabajos, en donde se ha reportado que la ausencia de estas proteínas en Candida provoca que este patógeno sea susceptible al estrés oxidativo¹⁵. Se puede plantear que estos modelados moleculares de proteína-ligando son de gran ayuda, porque al observar estas interacciones específicas de los aminoácidos que participan, posibilita conocer el sitio de unión y así un futuro desarrollo de antifúngicos más específicos que puedan reducir el metabolismo de Candida y así como su adhesión para un mejor tratamiento y que tengan una menor probabilidad de resistencia.

De esta manera, aún cuando en el caso de Pdc1 no se ha reportado como posible blanco terapéutico en otras infecciones, nuestros datos indican que posiblemente pueda ser utilizada como diana terapéutica debido a que su deficiencia o alteraciones en su actividad pueden llevar a problemas metabólicos que sí se relacionan con la patogenicidad en ciertas condiciones¹⁶. Interesantemente, en el caso de la GAPDH, nuestros datos se encuentran en concordancia con otros trabajos, en donde se ha mostrado que esta enzima presenta inmunogenicidad en C. albicans. En otros trabajos se han propuesto a las GAPDH de Schistosoma mansoni y Onchocerca volvulus como candidatas para vacunas¹⁷. GAPDH se ha propuesto como posible candidata a vacuna debido a que además de su función en la glucólisis, participa en la adhesión celular, modulación inmunitaria y virulencia. Esta proteína ha mostrado que es capaz de inducir respuestas inmunes frente a diversos patógenos, como Schistosoma mansoni, Echinococcus multilocularis, Litomosoides sigmodontis y bacterias como Aeromonas spp., Vibrio spp., Edwardsiella spp., Streptococcus iniae, S. uberis y S. dysgalactiae. Sin embargo, debido a su alta conservación entre especies, es necesario identificar epítopos específicos del patógeno para evitar posibles reacciones autoinmunes¹⁸. En el hongo Aspergillus nidulans se identificó una nueva isoenzima de la GAPDH, denominada GpdC, la cual utiliza NADP+ como cofactor, a diferencia de la isoforma glucolítica GpdA que utiliza NAD+. Esta isoenzima se expresa en respuesta al estrés por especies reactivas de nitrógeno, las cuales dañan componentes celulares e inducen desórdenes metabólicos. La interrupción del gen gpdC redujo la actividad de GAPDH, afectó el crecimiento micelial y limitó la fermentación de etanol. Bajo estas condiciones, el hongo depende de la glucólisis y no puede metabolizar otras fuentes de carbono. Resultados que indican que GpdC contribuye a la adaptación metabólica del patógeno, facilitando la tolerancia al estrés y la conservación de energía durante la infección del huésped19. Finalmente, la Gpm1 se ha reportado como factor de virulencia clave en la bacteria fitopatógena Acidovorax citrulli, causante del tizón bacteriano de la fruta en cucurbitáceas, la Gpm dependiente de 2,3-bisfosfoglicerato (BdpmAc) se ha identificado como un factor de virulencia clave. La eliminación del gen correspondiente redujo la virulencia, afectó el metabolismo del carbono, la formación de biopelículas, la movilidad y la tolerancia al estrés osmótico, lo que sugiere que BdpmAc cumple funciones pleiotrópicas esenciales para la patogenicidad, y podría ser aprovechada como blanco para estrategias de control biotecnológico. En conjunto, estos hallazgos evidencian que la Gpm1, además de su rol metabólico clásico, tiene funciones adicionales que la convierten en un objetivo de interés para el desarrollo de vacunas antiparasitarias y métodos de control de enfermedades agrícolas²⁰. Evidencias en conjunto que se encuentran en concordancia con nuestros resultados obtenidos por medio del análisis in silico que se realizó en el presente trabajo, en donde Pdc1 y GAPDH muestran un potencial para ser

¹⁵ Arribas, V.; Monteoliva, L.; Hernáez, M.L.; Gil, C.; Molero, G. (2024). Unravelling the Role of Candida albicans Prn1 in the Oxidative Stress Response through a Proteomics Approach. Antioxidants, 13, 527.

¹⁶ Chaffin W. L. (2008). Candida albicans cell wall proteins. Microbiology and molecular biology reviews: MMBR, 72(3), 495-544.

¹⁷ Li, X., Wu, H., Zhang, M., Liang, S., Xiao, J., Wang, Q., Liu, Q., & Zhang, Y. (2012). Secreted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a broad

spectrum vaccine candidate against microbial infection in aquaculture. Letters in applied microbiology, 54(1), 1-9.

18 Perez-Casal, J., & Potter, A. A. (2016). Glyceradehyde-3-phosphate dehydrogenase as a suitable vaccine candidate for protection against bacterial and

parasitic diseases. *Vaccine*, *34*(8), 1012–1017.

¹⁹ Kadooka, C., Katsuki, N., Masuo, S., Kojima, S., Amahisa, M., Suzuki, K., Doi, Y., Takeshita, N., & Takaya, N. (2024). Fungal glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase GpdC maintains glycolytic mechanism against reactive nitrogen stress-induced damage. Frontiers in microbiology, 15, 1475567.

²⁰ Lee, J., Lee, J., Cho, Y., Choi, J., & Han, S. W. (2022). A putative 2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase is involved in the virulence, carbohydrate metabolism, biofilm formation, twitching halo, and osmotic tolerance in Acidovorax citrulli. Frontiers in plant science, 13, 1039420.



www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

consideradas como posibles blancos terapéuticos contra las especies patógenas de *Candida*. No obstante, es indispensable llevar a cabo los estudios experimentales, en donde nuestro grupo se encuentra trabajando actualmente en esta dirección.

Conclusión

Se evaluó *in silico* si las proteínas Triosafosfato isomerasa (Tpi1), Piruvato descarboxilasa (Pdc1), Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y Fosfoglicerato mutasa (Gpm1), presentes en la PPC de cinco especies de *Candida*, pueden ser propuestas como blancos terapéuticos mediante su interacción con los fármacos antifúngicos de uso rutinarios como son el fluconazol, la anfotericina B y la caspofungina. Los resultados obtenidos sugieren que las interacciones proteína-ligando con Tpi1 y Gpm1 no serían viables para su uso como blanco terapéutico, debido a su alta similitud con la proteína humana. Por otro lado, las proteínas Pdc1 y GAPDH presentaron menor similitud con las isoformas humanas y mostraron una mayor especificidad con los antifúngicos, lo que indica su potencial como posibles blancos terapéuticos. Estos hallazgos muestran que no todas las PPC con función y localización dual evaluadas son dianas adecuadas para el diseño de terapias antifúngicas. No obstante, las interacciones encontradas aportan información valiosa que puede contribuir al desarrollo de fármacos más específicos, capaces de inhibir la proliferación de *Candida* formadora de biopelículas.

Agradecimientos

Mónica Arlette Camarillo-Manzo, Dulce María Márquez-Salas y Sahian Arely Gómez-Hernández agradecen la beca otorgada por el Programa del XXX Verano de la Ciencia 2025 de la Universidad de Guanajuato.

Bibliografía/Referencias

- Arribas, V.; Monteoliva, L.; Hernáez, M.L.; Gil, C.; Molero, G. (2024). Unravelling the Role of Candida albicans Prn1 in the Oxidative Stress Response through a Proteomics Approach. *Antioxidants*, *13*, 527.
- Carolus, H., Pierson, S., Lagrou, K., & Van Dijck, P. (2020). Amphotericin B and Other Polyenes—Discovery, Clinical Use, Mode of Action and Drug Resistance. *Journal of Fungi*, 6(4), 321.
- Chaffin W. L. (2008). Candida albicans cell wall proteins. Microbiology and molecular biology reviews: MMBR, 72(3), 495–544. Costa-Olivera, S., & Rodriguez, A. (2020). Candida albicans Antifungal Resistance and Tolerance in Bloodstream Infections: The Triad Yeast-Host-Antifungal. Microorganisms MDPI. ID PMC7074842.
- Douglas, V. (2023). Amphotericin B: A Polyene Antifungal Agent. Fungal Genomics & Biology, 13(2), 1-2.
- Kadooka, C., Katsuki, N., Masuo, S., Kojima, S., Amahisa, M., Suzuki, K., Doi, Y., Takeshita, N., & Takaya, N. (2024). Fungal glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase GpdC maintains glycolytic mechanism against reactive nitrogen stressinduced damage. Frontiers in microbiology, 15, 1475567.
- Lee, J., Cho, Y., Choi, J., & Han, S. W. (2022). A putative 2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase is involved in the virulence, carbohydrate metabolism, biofilm formation, twitching halo, and osmotic tolerance in *Acidovorax citrulli. Frontiers in plant science*, 13, 1039420.
- Li, X., Wu, H., Zhang, M., Liang, S., Xiao, J., Wang, Q., Liu, Q., & Zhang, Y. (2012). Secreted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a broad spectrum vaccine candidate against microbial infection in aquaculture. *Letters in applied microbiology, 54*(1), 1–9.
- Medrano-Díaz, C.L., Vega-González, A., Ruiz-Baca, E., Moreno, A., Cuéllar-Cruz, M. (2018). Moonlighting proteins induce protection in a mouse model against *Candida* species. *Microbial Pathogenesis*, 124(2018), 21-29.
- Mora-Duarte, J., Betts, R., Rotstein, C., Lopes-Colombo, A., Thompson-Moya, L., Smietana, J., et al. (2003). Eficacia de la caspofungina comparada con la anfotericina B en el tratamiento de la candidiasis invasora. *Med Intensiva*, 27(6):436-48
- Núñez-Beltrán, A., López-Romero, E., Cuéllar-Cruz, M. (2017). Identification of proteins involved in the adhesion of *Candida* species to different medical devices. *Microbial Pathogenesis*, 107, 293-303.
- Perez-Casal, J., & Potter, A. A. (2016). Glyceradehyde-3-phosphate dehydrogenase as a suitable vaccine candidate for protection against bacterial and parasitic diseases. *Vaccine*, *34*(8), 1012–1017.
- Ramírez-Quijas, M.D., López-Romero, E., Cuéllar-Cruz, M. (2015). Proteomic analysis of cell wall in four pathogenic species of *Candida* exposed to oxidative stress. *Microbial Pathogenesis*, 87(2015) 1-12.
- Ramírez-Quijas, M.D., Zazueta-Sandoval, R., Obregón-Herrera, A., López-Romero, E., Cuéllar-Cruz, M. (2015). Effect of oxidative stress on cell wall morphology in four pathogenic *Candida* species. *Mycol Progress, 14*(8).
- Rodríguez-Almazán, C., Arreola, R., Rodríguez-Larrea, D., Aguirre-López, B., Tuena de Gómez-Puyou, M., Pérez-Montfort, R., Costas, M., Gómez-Puyou, A., & Torres-Larios, A. (2008). Structural basis of human triosephosphate isomerase deficiency: Mutation E104D is related to alterations of a conserved water network at the dimer interface. *Journal of Biological Chemistry*, 283(35), 23254–23263.
- Serrano-Fujarte, I., López-Romero, E., Cuéllar-Cruz, M. (2015). Moonlight-like proteins of the cell wall protect sessile cells of *Candida* from oxidative stress. *Microbial Pathogenesis*, *90*, 22-33.



www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

Serrano-Fujarte, I., López-Romero, E., Reyna-López, G.E., Martínez-Gámez, M.A., Vega-González, A., Cuéllar-Cruz, M. (2015). Influence of Culture Media on Biofilm Formation by *Cndida* Species and Response of Sessile Cells to Antifungals and Oxidative Stress. *BioMed Research International*, 2015, 1-15.

Sheehan, D. J., Hitchcock, C. A., & Sibley, C. M. (1999). Current and emerging azole antifungal agents. *Clinical microbiology reviews*, *12*(1), 40–79.

UCSF ChimeraX feature Highlights. (s. f.). RBVI.

Yunta, M. J. R. (2016). Docking and Ligand Binding Affinity: Uses and Pitfalls. *American Journal of Modeling and Optimization*, 4(3), 74-114.