

Diseño racional de fármacos aplicado a la búsqueda de candidatos para el tratamiento de patologías dérmicas

Cecilia Barbieri¹, Priscila A. Lanza-Castronuovo¹, María Inés Crespo², Macarena Funes-Chabán², María Belén Joray², Sara M. Palacios², María Cecilia Carpinella², D. Mariano A. Vera¹.

ceciliabarbieri@live.com.ar

1- Química Analítica y Modelado Molecular (QUIAMM), Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología (INBIOTEC), Mar del Plata.
2- Instituto de Investigaciones en Recursos Naturales y Sustentabilidad José Sánchez Labrador S. J. (IRNASUS), Universidad Católica de Córdoba.

INTRODUCCIÓN

La "tirosinasa" o "fenol oxidasa" es una proteína esencial ampliamente distribuida en la naturaleza en organismos tales como hongos, bacterias, plantas y animales. Esta metalo-enzima de cobre, interviene en las primeras etapas de la síntesis de melanina, que involucra la hidroxilación de L-tirosina a 3,4-dihidroxi-fenilalanina (L-DOPA) (actividad monofenolasa) y la consecuente oxidación de L-DOPA a dopaquinona (actividad difenolasa). Cada una de estas oxidaciones es promovida por diferentes formas activas de la enzima: la forma Oxi cataliza la oxidación de la L-tirosina y la forma Met la segunda oxidación (usando como sustrato L-DOPA). [1]

Desórdenes asociados a esta enzima causan diferentes problemas en la piel que van desde las manchas de edad hasta el melanoma maligno; también se relaciona con la sobreproducción de melanina, involucrada en la neurodegeneración asociada a la enfermedad de Parkinson. En hongos, esta enzima se relaciona con el proceso de pardeamiento, de impacto en la industria alimentaria. [2,3]

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron como estructura proteica modelos construido a partir de dos estructuras de rayos X de *Agaricus bisporus* con un inhibidor co-cristalizado. Los ligandos fueron optimizados con *Gaussian-09* empleando el modelo semiempírico PM6. Los ensayos experimentales fueron aportados por el grupo colaborador IRNASUS de la Universidad Católica de Córdoba.

Docking molecular

AutoDock 4.2.6 es un software de simulación de modelado molecular efectivo para el acoplamiento de proteínas y ligandos. Permite encontrar los conformeros de mínima energía que puede adoptar una molécula (ligando) al formar un complejo con una macromolécula (proteína) y determinar las constantes de inhibición (K_i). La K_i se relaciona con la energía de ligado (ΔG Binding) mediante la expresión

$$\Delta G^{\circ} \text{Binding} = -RT \ln K_i$$

$$\Delta G \text{ Binding} = \sum \Delta G \text{ VdW}_i + \sum \Delta G \text{ elec}_i + \sum \Delta G \text{ Hbond}_i + \Delta G \text{ desolv} + \Delta G \text{ tors}$$

en donde los primeros tres términos son calculados por el software con valores individuales para cada tipo de átomo.

Los conformeros de docking más estables de cada ligando fueron seleccionados mediante un algoritmo genético Lamarckiano, creando 150 individuos por generación con 10^5 generaciones con un sobreviviendo por generación y un límite de 6×10^6 evaluaciones de energía. De ésta forma, se obtuvieron en total 4000 conformeros de cada ligando. Se presentó un análisis de cluster para los complejos ligando-proteína empleando un RMSD de 2.5Å.

Preparación del modelo estructural de la enzima metálica (QM/MM)

A partir de la estructura cristalográfica se reconstruyeron los estados correctos de coordinación y oxidación del sitio activo, caracterizándose la distribución de carga del mismo mediante cálculos DFT (*Density Functional Theory*) en un marco híbrido QM/MM.

Los métodos QM/MM permitieron realizar la partición del sistema en una región tratada de forma cuántica, que corresponde con la zona químicamente relevante y una región tratada de forma clásica, que incluye el resto del sistema. Las posiciones de los átomos pesados se matuvieron fijas excepto el OH- en el caso de la forma Met. Para la forma Oxi, preparada a partir de estructuras de la forma DeOxi y Met se requirió una minimización con métodos de QM/MM. La minimización de energía se aplicó mediante la implementación ONIOM de *Gaussian-09*. La capa cuántica involucró el sitio activo de la proteína, formado por dos átomos de cobre unidos por un ligando oxo transversal en su forma activa Oxi y un oxhidrilo en su forma activa Met, las seis histidinas coordinadas (H61, H85, H258, H263 y H296) y una cisteína C83 que está unida covalentemente al anillo de imidazol de la H85. Esta capa se trató con el nivel de teoría CAM-B3LYP/6-31+G*. El resto de la proteína conformó la parte clásica del sistema, en esta región se conservaron las posiciones de la estructura de rayos X y se describieron con un campo de fuerzas. La interacción electrostática entre la parte cuántica y la clásica fue tratada con la aproximación *electrostatic embedding*. Las estructuras así obtenidas se utilizaron para obtener las cargas que se utilizaron en Autodock para lo que fue la región cuántica.

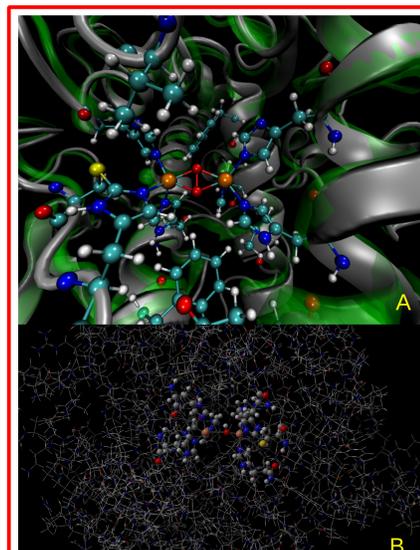


FIGURA 1: A) Parte cuántica para el cálculo de la electrostática de la forma Oxi representado con balls-and-sticks y parte clásica con cartoon. B) Forma Met, parte clásica representada con líneas.

El ácido kójico y la dalenina (Figura 2) son inhibidores de la tirosinasa. Utilizando éstos como referencia [1] y el compuesto h como control negativo, se analizaron mediante docking molecular un set de compuestos derivados del ácido cafeico, determinándose las energías libres de ligado y las constantes de inhibición tanto en la forma Oxi como en la Met. Los datos obtenidos y el estudio de los modos de ligado permitieron elegir algunos compuestos que serán utilizados en simulaciones de dinámica molecular (Figura 3).



FIGURA 2: Inhibidores de tirosinasa empleados como referencia.

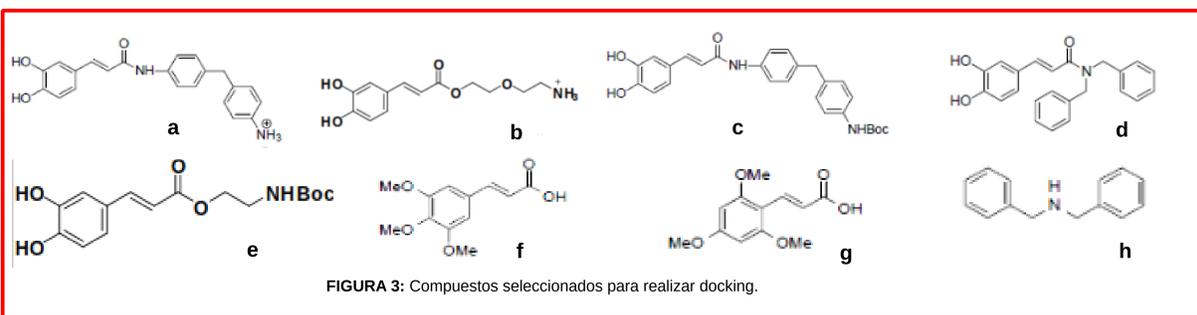


FIGURA 3: Compuestos seleccionados para realizar docking.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

TABLA 1: Resultados de Docking. Estimación de la energía libre de ligado (Binding Energy, BE) en Kcal/mol. K_i en μM

Compuesto	OXI tirosinasa		MET tirosinasa	
	BE	K_i	BE	K_i
Dalenina	-6.33	23.05	-7.31	4.40
Acido kójico	-4.06	1060.00	-5.37	116.11
a	-6.78	10.76	-8.90	0.30
b	-6.10	33.52	-8.74	0.39
c	-7.96	1.46	-8.01	1.15
d	-6.86	9.43	-7.72	2.18
e	-6.70	12.35	-7.93	1.54
f	-5.67	70.13	-4.92	249.06
g	-4.96	231.58	-5.22	148.70
h	-5.61	76.69	-6.99	7.53

TABLA 2: K_i experimentales (μM) frente a L-tirosina (primera oxidación (Oxi)).

Compuesto	Actividad
Dalenina	13.6
a	16.9
b	14.3±4.2
c	24.5
d	17.2
e	41±21.8
f	> 40
g	> 40
h	>>>40

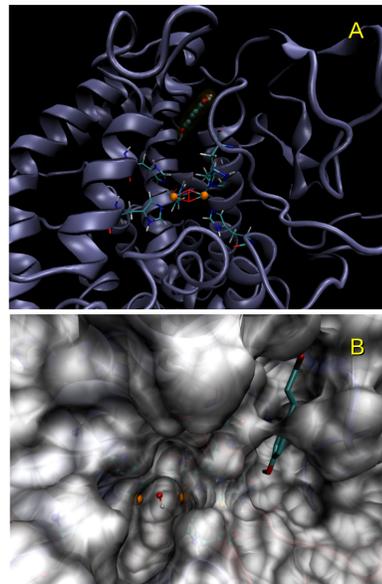


Figura 4: A) Sitio de ligado del ácido cafeico en la forma Oxi. B) Ácido cafeico en la forma Met (proteína como superficie translúcida)

Se determinó experimentalmente [4] que el ácido cafeico del cual derivan los compuestos de la serie es un inhibidor no competitivo de actividad media tanto en la forma Oxi como Met (Figura 4 A y B, respectivamente).

Según el análisis de las interacciones ligando/proteína en la Oxi tirosinasa, se encontró que la serie de compuestos a-e ejercen inhibición competitiva, con un modo de ligado similar al de los compuestos de referencia, mientras que f y g resultan no competitivos. En la Figura 5A, se observa al compuesto c (junto con el ácido kójico de referencia) superponiéndose al sitio activo de la proteína; la pose de c es consistente con una inhibición competitiva, a diferencia del ácido cafeico del que fue derivado (Figura 4a). En términos energéticos, los ligandos a, c, d y e muestran leves mejoras sobre los de referencia, con una tendencia general en acuerdo con los resultados experimentales.

En la forma Met, tanto el ácido kójico como la dalenina inhiben a la enzima de forma no competitiva. Los ligandos analizados actúan de manera similar a éstos excepto a que es competitivo (Figura 5B) y mejora la energía de binding de los compuestos de referencia. Se están llevando a cabo las mediciones experimentales con la L-DOPA como sustrato a fin de confirmar esta mejora en la actividad de los compuestos sintetizados en relación al ácido cafeico y los inhibidores de referencia en la inhibición de la forma Met.

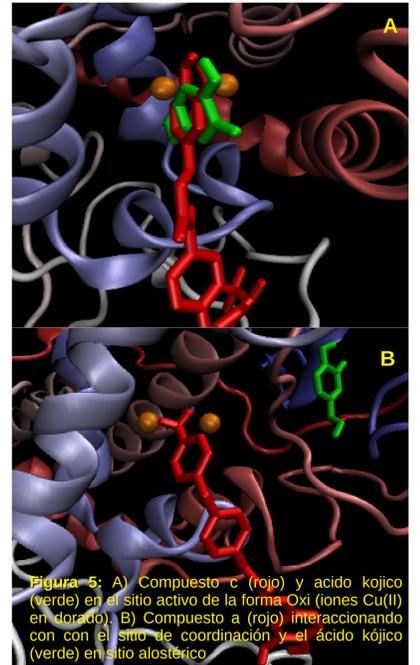


Figura 5: A) Compuesto c (rojo) y ácido kójico (verde) en el sitio activo de la forma Oxi (iones Cu(II) en dorado). B) Compuesto a (rojo) interactuando con el sitio de coordinación y el ácido kójico (verde) en sitio alostérico

CONCLUSIONES/PROYECCIONES

Los compuestos estudiados hasta aquí son mucho más activos que el inhibidor de tirosinasa utilizado habitualmente (y aprobado para su uso clínico), el ácido kójico. No mejoran significativamente su actividad respecto de dos nuevos compuestos propuestos por el grupo [1,4], la dalenina y el ácido cafeico respecto de su actividad contra la forma Oxi. No obstante, al menos *in silico*, muestran una mejora remarcable en su actividad para la forma Met.

Los modelos proteína-inhibidor obtenidos serán utilizados como estructuras iniciales para simulaciones de dinámica molecular. A partir de los datos obtenidos *in silico*, se seleccionarán los compuestos más promisorios para su posterior estudio cinético experimental a fin de confirmar el modo de inhibición.

REFERENCIAS

- [1] M.-E. Chiari, D. M. A. Vera, S. M. Palacios, M.-C. Carpinella. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 3474-3482
- [2] W. Li, I. Kubo. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 701-713.
- [3] J. A. Prezioso et. al *Cancer Letters* **1992**, *63*, 73.
- [4] M. I. Crespo, M. Funes-Chabán, P. A. Lanza, M. B. Joray, S. M. Palacios, D. M. A. Vera, M. C. Carpinella, *Food and Chemical Toxicology*, **2019**, *125*, 383-391.