

# Estudio de Acoplamiento Molecular (Docking) de una serie de derivados sintéticos del 5-nitrofurano en el sitio de unión de la Tripanotión Reductasa del *Trypanosoma cruzi*

## Computational docking study of a serial of synthetic 5-Nitrofurans derivatives in the binding site of the enzyme Trypanothion reductase from *Trypanosoma cruzi*

MELINA MONASTERIOS\*, ÁNGEL AMESTY Y MILAGROS AVENDAÑO

### Resumen

Se describe un estudio teórico de acoplamiento molecular (docking) realizado en una serie de derivados benzotiazolil-5-nitrofuranos, en el sitio de unión de la enzima Tripanotión Reductasa del *Trypanosoma cruzi* (agente causal de la enfermedad de Chagas). La estructura cristalina de la enzima fue obtenida de la base de datos Protein Data Bank y se utilizó el software Arguslab version 4.0.1 para el estudio. Los resultados obtenidos muestran que los derivados sintéticos acoplados tienen una alta probabilidad de ser inhibidores suicidas de la enzima tripanotión reductasa debido a que presentan una mayor afinidad de unión con respecto al Nifurtimox, compuesto empleado como referencia. Esta mayor afinidad relativa se encuentra asociada a una energía libre de unión ( $\Delta G$ ) más negativa.

**Palabras clave:** Posicionamiento molecular, derivados del 5-nitrofurano, compuestos antichagásicos.

### Abstract

The present investigation describes a computational docking study developed with a serial of benzothiazolyl-5-Nitrofurans derivatives, in the binding site of the enzyme Trypanothion reductase from *Trypanosoma cruzi* (causal agent of Chagas' disease). The crystal structure of the enzyme was downloaded from the database of the Protein Data Bank and the software used for the docking study was Arguslab version 4.0.1. Our results show that the docked synthetic derivatives have a high probability of behaving as suicidal inhibitors of trypanothion reductase because they display a higher affinity that the reference compound, Nifurtimox. This higher relative affinity is in turn associated to a more negative binding free energy ( $\Delta G$ ).

**Key words:** Docking, 5-nitrofurans derivatives, anti-trypanosomal compounds.

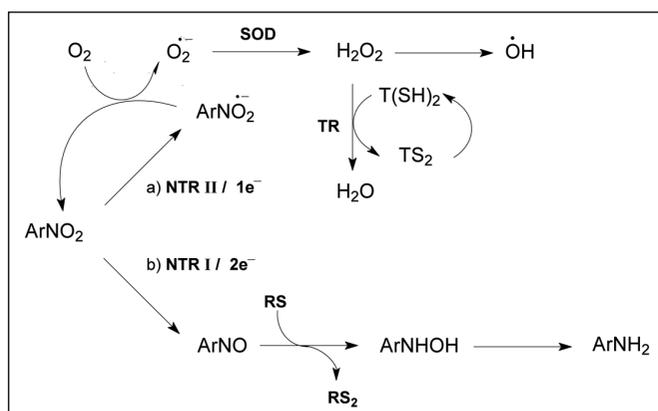
### Introducción

Los protozoarios parásitos de la familia Trypanosomatidae son agentes causantes de muchas enfermedades tropicales importantes, incluyendo la leishmaniasis, la tripanosomiasis africana y la enfermedad de Chagas (Baell y col., 2009), ahora llamadas enfermedades tropicales desatendidas (NTD por sus siglas en inglés, neglected tropical diseases) (Bolognesi y col., 2009). La enfermedad de Chagas o tripanoso-

miasis americana es un importante problema de salud que afecta a unas 20 millones de personas en Centro y Sur América, alrededor de 2 a 3 millones de individuos desarrollan los síntomas típicos de esta enfermedad. Su agente causal es el protozoario hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), el cual es transmitido a humanos y otros mamíferos por insectos vinchucas tales como el *Rhodnius prolixus* y el *Triatomma infestans* (Cerecetto y col., 2006).

\* Unidad de Química Medicinal. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela. Apdo. 40109 Caracas 1040-A. Venezuela. Telf.: (58)212.6052757. Fax.: (58)212.6052757. E-mail: melinalf@yahoo.es

El tratamiento vigente para esta enfermedad se basa en fármacos de viaja data (Nifurtimox (Nfx), Benznidazol) que a pesar de ser capaces de eliminar la parasitemia y reducir los títulos serológicos, no garantizan la curación completa y están asociados con severos efectos tóxicos (Gambino y col., 2008). El modo de acción de ambos fármacos contra este parásito está asociado con la biorreducción del grupo nitro. Este proceso se inicia con la reducción del grupo nitro a radical-anión nitro, en una reacción catalizada por nitroreductasas. En el caso del Nfx sufre un ciclo redox, con el oxígeno molecular, el cual produce anión superóxido y seguidamente peróxido de hidrógeno, mediante una reacción catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD) (figura 1) (Tarlovsky y col., 2006). Estas especies, en presencia de hierro, forman radicales hidroxilos fuertemente oxidantes vía reacción de Haber-Weiss. La producción incrementada de estas especies reactivas de oxígeno (ROS) eventualmente conduce al parásito a estrés oxidativo (Denicola y col., 2010).



**Figura 1. Biorreducción de los fármacos nitroaromáticos.** a) Reducción de un electrón por la nitroreductasa tipo II (NTR II) promoviendo el ciclo redox con formación de superóxido/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y regenerando el fármaco, la producción de esta ROS oxidan los tioles de los parásitos. b) Reducción de dos electrones por la nitroreductasa tipo I (NTR I) formando los nitroso compuestos, que es un buen recolector de tioles.

Estos fármacos son inefectivos, imprácticos y severamente tóxicos, he aquí la necesidad precisa de encontrar nuevos compuestos que sean capaces de inhibir selectivamente un blanco que se encuentre solamente en estos organismos, como es el caso de la enzima Tripanotión reductasa (TR) del *T. cruzi* (Cecchetto y col., 2004). La TR es una óxido-reductasa NADPH-dependiente que ayuda al parásito a protegerse del estrés oxidativo mediante el mantenimiento de un medio ambiente intracelular reducido. Realiza esto mediante la reducción del tripanotión (T(S)<sub>2</sub>): Conjugado N<sup>1</sup>, N<sup>5</sup>-bisglutacionil espermidina a dihidrotriptanotión (T(SH)<sub>2</sub>) (Tapia y col., 2002). El T(SH)<sub>2</sub>

juega un papel importante en la inactivación del daño potencial de radicales y especies reactivas de oxígeno, y es re-oxidado a T(S)<sub>2</sub> en este proceso (Hamilton y col., 2003). Los 5-nitrofuranos inhiben la reducción del T(S)<sub>2</sub> por la TR, reduciéndose ellos mismos en el ciclo redox en presencia de oxígeno para formar las ROS como superóxido y peróxido de hidrógeno; dado que el T(S)<sub>2</sub> es un captador de radicales libres, al bajar sus niveles, las células del parásito se vuelven hipersensibles al daño oxidante (Chauviere y col., 2003; Fairlamb, 1990). La utilización de la enzima en estos derivados del nitrofurano constituye una subversión de su papel normal antioxidante, por tal motivo estos compuestos fueron denominados substratos «subversivos» para la TR (Docampo, 1990).

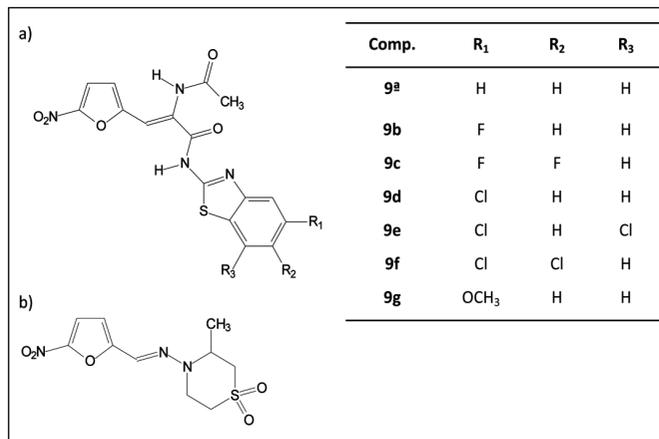
Una metodología empleada para hallar compuestos que inhiban esta enzima es mediante la realización de un estudio de acoplamiento molecular o Docking. El Docking es un método computacional que tiene como objetivo principal identificar las posiciones correctas (poses) de los ligandos en el sitio de unión (binding site) para así predecir la afinidad entre el ligando y la proteína. En otras palabras, describe un proceso mediante el cual una molécula interacciona con otra para formar un complejo estable en un espacio tridimensional (Krovat y col., 2005). Con base a lo anteriormente expuesto y a los resultados obtenidos en investigaciones previamente reportadas, se planteó la realización de un estudio teórico de Docking en una serie de derivados sintéticos del 5-nitrofurano en el sitio activo de la enzima TR del *T. cruzi*, con miras a determinar sus afinidades y modos de unión y con base a los resultados obtenidos, la realización de pruebas biológicas.

## Sección experimental

### LIGANDOS Y ENZIMA

En este estudio se utilizaron como ligandos una serie de siete derivados del 5-nitrofurano desarrollados por nuestro grupo de investigación para los cuales se reportó su síntesis (Monasterios y col., 2003; Charris y col., 2002), los cálculos computacionales donde se determinó que cumplen con unos requisitos estéricos para que este tipo de compuestos presenten actividad antichagásica (Monasterios y col., 1998), requisitos estéricos, electrostáticos y electrónicos para que presenten actividad antibacteriana (Monasterios y col., 2006; Monasterios y col., 2005) y la evaluación preliminar de su posible toxicidad (Amaro y col., 2009). Se escogió conjuntamente el Nfx como compuesto activo de referencia (figura 2). La enzima utilizada fue la Tripanotión reductasa (TR) del *T. cruzi*. La estructura cristalina del dímero de la

mencionada enzima bajo su forma oxidada se extrae de la base de datos Protein Data Bank, en un complejo con su sustrato natural Tripanotión (T) y con el cofactor dinucleotido adenina-flavina (FAD), que se encuentra registrada bajo la entrada 1BZL (figura 3) (Hunter y col., 1999).



**Figura 2. Ligandos utilizados en el estudio: a) Derivados sintéticos. b) Nifurtimox.**



**Figura 3. Enzima TR del *T. cruzi* en complejo con el T y el FAD (1BZL). Definición del sitio de unión de los ligandos (Binding site).**

## CÁLCULOS

El primer paso en este estudio teórico consistió en la construcción de los modelos moleculares de todos los derivados del 5-nitrofurano. Se realizaron dos optimizaciones geométricas para cada estructura, primero usando los algoritmos *Conjugate Gradient* y *Block-Diagonal Newton Raphson*, del campo de fuerza MM3 (Allinger, 1989) mediante el software de la compañía CAChE (CaChe, 2003), y después empleando el método químico-cuántico semiempírico, Método Paramétrico 3 (PM3) en vacío, utilizando el software libre ArgusLab 4.0.1 (Tompson, 2004). Las orientaciones y/o conformaciones obtenidas fueron

organizadas en orden creciente de sus valores de calor de formación para seleccionar las que iban a ser posicionadas. El Nfx también fue incluido en este esquema de trabajo.

## ACOPLAMIENTO MOLECULAR «DOCKING»

El Docking se realizó con el software libre ArgusLab 4.0.1; el cual emplea algoritmo genético para generar las conformaciones u orientaciones de los ligandos en el sitio de unión. La estructura cristalina de la enzima se refinó removiéndole todas las moléculas de agua presentes y posteriormente añadiéndole los átomos de hidrógenos faltantes como en la estructura PDB original. El sitio activo de la enzima se delimitó antes de hacer el docking y está contenido en una caja que tiene unas dimensiones de X = 24.686000 Å, Y = 20.117000 Å, Z = 21.750000 Å y una resolución de la cuadrícula (grid) de 0.4000 Å. La metodología empleada fue la semiflexible, es decir enzima rígida y ligandos flexibles. Los ligandos moleculares se posicionaron usando un esquema de puntuación (scoring), esto es, mediante el contacto y la energía de la cuadrícula, se realizó una minimización de la energía para cada orientación posicionada y se calculó una energía final de puntuación. Este proceso se realizó diez veces en cada caso y se calcularon los valores promedios (Young, 2009). El análisis de los resultados, para cada ligando, fue realizado considerando las orientaciones de menor energía y los valores de desviación de la raíz media cuadrática (RMSD) reportados por el programa. Para cada ligando se obtuvieron agrupaciones de conformaciones (clusters) a fin de identificar las diferentes maneras de unión. Las orientaciones fueron asignadas a las diferentes agrupaciones cuando los valores de RMSD fueron menores que 3,0 Å. También se midieron los contactos moleculares entre las orientaciones de los ligandos y los residuos del sitio activo hasta un radio de 5,0 Å.

## Resultados y discusión

### AFINIDAD DE UNIÓN

La afinidad relativa de los ligandos en el sitio unión de su receptor es la principal información que proporciona un docking. El sitio de unión de la TR está constituido por dos cadenas: la cadena A formada por 12 residuos de aminoácidos y la cadena B formada por 9 residuos de aminoácidos (Tabla I). Las energías libres de unión para los complejos de los derivados sintéticos del 5-nitrofurano y el Nfx con el sitio de unión de la TR se reportan en la Tabla II. En estos datos correspondientes a las orientaciones de menor energía (mejor puntuación) de cada ligando

se puede evidenciar que las energías resultantes para todos los derivados sintéticos fueron inferiores al valor de energía obtenida para el compuesto activo de referencia Nfx. Estos hallazgos indican que si esta unión es indispensable para la actividad antichagásica de los 5-nitrofuranos, los compuestos sintéticos deberían tener una gran probabilidad de ser activos.

**Tabla I**  
**Residuos de los aminoácidos presentes en el sitio activo de la TR**

Cadena A		Cadena B	
Cys 53	Ser 110	Glu 949	Ser 947
Glu 19	Thr 335	Glu 950	Ser 953
Ileu 107	Trp 22	His 944	Thr 946
Ileu 339	Tyr 111	Phe 879	
Leu 18	Val 54	Pro 881	
Ser 15	Val 59	Pro 945	

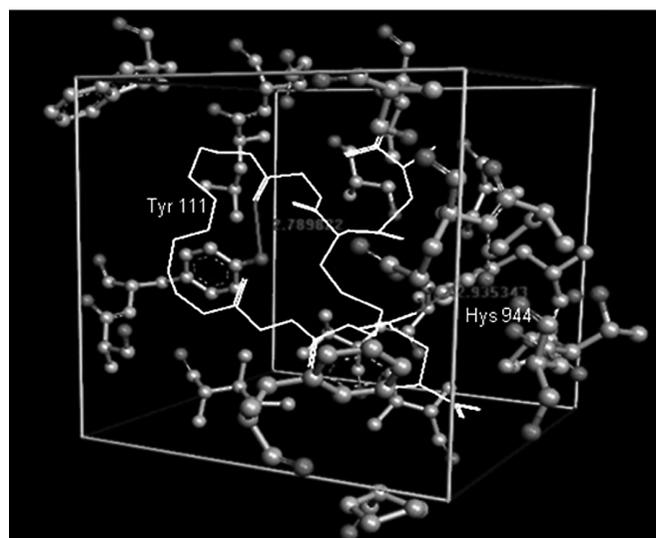
**Tabla II**  
**Energías libres de unión (DG) para las orientaciones de mínima energía de los nitrofuranos posicionados en el sitio activo de la TR**

Ligando	<i>E</i> (kcal/mol)
9a	-9.84329
9b	-7.54972
9c	-8.14886
9d	-8.57123
9e	-9.50419
9f	-9.34536
9g	-8.57272
Nfx	-7.22516

## Puentes de Hidrógenos

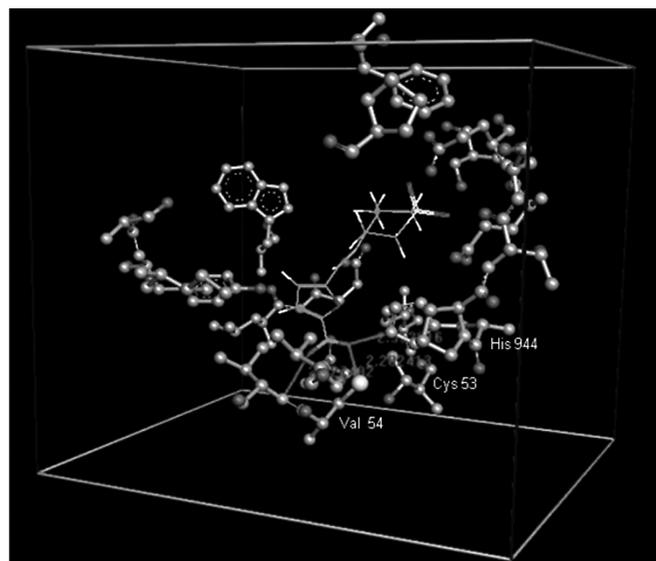
El análisis gráfico de los modos de unión de los derivados del 5-nitrofurano en el sitio activo de la TR mostró que la mayoría de estos ligandos fueron capaces de establecer varias interacciones de puente de hidrógeno, principalmente entre el grupo nitro y los residuos polares. El sustrato natural de la enzima T, efectúa sólo dos interacciones de puente de hidrógeno con la misma, que son entre dos de sus grupos carbonilos y el residuo histidina 944 (His 944) de una hoja-b de la cadena B y el residuo tirosina 111 (Tyr 111) de un codo de la enzima (Figura 4).

Para todos los compuestos tipo 5-nitrofurano, el número de interacciones de puente de hidrógeno que establecen con los residuos de aminoácidos presentes en el sitio de unión de la TR es mayor que las que realiza el T. En el caso del compuesto de referen-



**Figura 4.** Puentes de hidrógeno establecidos entre el T (cilindros color blanco) y el sitio catalítico de la TR, se observan los residuos involucrados en estos enlaces.

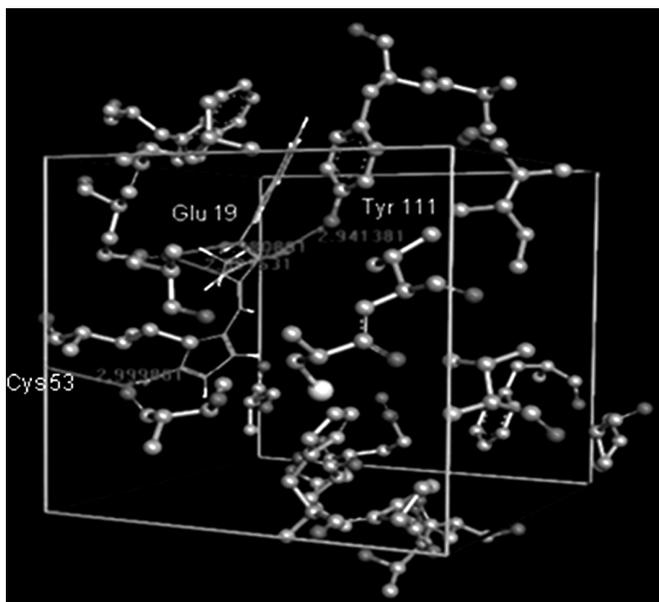
cia, Nfx, se realizan tres enlaces puente de hidrógeno, que se establecen entre los dos átomos de oxígeno del grupo nitro con tres de los residuos presentes en el sitio de unión de la enzima, que son: valina 54 (val 54) y cisteína 53 (cis 53) de una  $\alpha$ -hélice de la cadena A e histidina 944 (His 944) de una hoja-b de la cadena B (figura 5).



**Figura 5.** Puentes de Hidrógeno establecidos entre el NFX (cilindros color gris, amarillo y rojo) y el sitio catalítico de la TR, se observan los residuos involucrados en estos enlaces.

En lo referente al modo de unión de los derivados sintéticos, todos son energéticamente más estables y presentan más números de contactos en el sitio de unión de la enzima que el T. En el caso específico del derivado sintético **9a**, se observó el establecimiento de cuatro interacciones de puente de hidrógeno, las

cuales son: entre un oxígeno de grupo nitro y el residuo cis 53, entre el nitrógeno del grupo acetamido y los oxígenos del grupo carboxilato del ácido glutámico 19 (Glu 19) de una  $\alpha$ -hélice de la cadena A y otro entre el nitrógeno del grupo benzotiazolilamido con estos mismos oxígenos del grupo carboxilato del ácido Glu 19 y finalmente entre el carbonilo del grupo acetamido y el residuo Tyr 111, igual que lo hace el T con éste último residuo. Esto indica que los 5-nitrofuranos interactúan con el sitio de unión de la enzima de igual manera que lo hace su sustrato natural (figura 6), formando adicionalmente un complejo muy estable evidenciado en el bajo valor de energía libre de unión que ellos presentan.



**Figura 6.** Puentes de Hidrógeno establecidos entre el compuesto 9a (cilindros color gris, amarillo y rojo) y el sitio catalítico de la TR, se observan los residuos involucrados en estos enlaces.

## Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio de Docking se puede concluir lo siguiente:

1. Los derivados sintéticos benzotiazolilsustituido-5-nitrofurano muestran una alta afinidad por la enzima TR y su modo de unión con esta enzima es similar a la de su sustrato natural el T.
2. Los compuestos estudiados benzotiazolil-5-nitrofuranos al ser tan afines por la enzima TR y formar complejos con ella altamente estables, tienen muchas probabilidades de presentar una marcada actividad antichagásica, que podría ser atribuida además de la bio-reducción del grupo nitro a un posible comportamiento como sustratos «subversivos».

3. Este estudio teórico de Docking podrá ser validado cuando se realice la evaluación de la posible actividad antichagásica *in vitro* de estos derivados sintéticos.

## Agradecimientos

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela, Proyecto PG 06-00-5645-2004.

## Referencias Bibliográficas

- Aguirre G, Boiani M, Cabrera E, Cerecetto H, Di Maio R, González M, Denicola A, Sant'anna CM, Barreiro. 2006. New potent 5-nitrofuryl derivative as inhibitor *Trypanosoma cruzi* growth. 3D-QSAR (CoMFA) studies. *Eur J Med Chem* 41: 457-466.
- Aguirre G, Boiani L, Cerecetto H, Fernández M, González M, Denicola A, Otero L, Gambino D, Rigol C, Olea-Azar C, Fernández M. 2004. In vitro activity and mechanism of action against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones. *Bioorg Med Chem Lett* 12: 4885-4893.
- Allinger NL, Yuh YH, Lii HJ. 1989. Molecular mechanics. The MM3 force field for hydrocarbons. *J Am Chem Soc* 111: 8551-8556.
- Amaro MI, Monasterios M, Avendaño M, Charris J. 2009. Preliminary evaluation of the toxicity of some synthetic furan derivatives in two cell lines and *Artemia salina*. *J App Toxicol* 29: 36-41.
- Bioani M, Piacenza L, Hernández P, Bioani L, Cerecetto H, González M, Denicola A. 2010. Mode of action of Nifurtimox and N-oxide-containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*: is oxidative stress involved? *Biochem Pharmacol* 79:1736-1745.
- Bond CS, Zhang Y, Berriman M, Cunningham ML, Fairlamb AH, Hunter WN. 1999. Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase in complex with trypanothione, and the structure-based discovery of new natural products inhibitors. *Structure* 7: 81-89.
- CAChe reference. version 6.0. 2003. Fujitsu Limited CAChe.
- Cavalli A, Lizzi F, Bongarzone S, Brun R, Krauth-Siegel RL, Bolognesi ML. 2009. Privileged structure-guided synthesis of quinazoline derivatives as inhibitors of trypanothione reductase. *Bioorgan Med Chem* 19: 3031-3035.
- Charris J, Monasterios M, Domínguez J, Infante W, Castro N. 2002. Synthesis of some 5-Nitro-2-furfurylidene derivatives and their antibacterial and antifungal activities. *Heterocycl Commun* 8: 275-280.
- Docampo R. 1990. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. *Chem-Biol Interact* 73: 1-27.
- Fairlamb AH. 1990. Novel approaches to the chemotherapy of trypanosomiasis. *TransRoy Soc Trop Med Hyg* 84: 613-617.

- Hamilton CJ, Saravanamuthu A, Eggleston IM, Fairlamb AH. 2003. Ellman's-reagent-mediated regeneration of trypanothione in situ: substrate-economical microplate and time-dependent inhibition assays for trypanothione reductase. *Biochem J* 369: 529-537.
- Hernández SM, Sánchez MS, Schwarch de Tarlovsky MN. 2006. Polyamines as a defense mechanism against lipoperoxidation in *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* 98: 94-102.
- Holloway GA, Charman WN, Fairlamb AH, Brun R, Kaise M, Kostewicz E, Novello PM, Parisot JP, Richardson J, Street, IP, Watson KG, Baell JB. 2009. Trypanothione reductase high-throughput screening campaign identifies novel classes of inhibitors with antiparasitic activity. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 2824-2833.
- Krovat EM, Steindl T, Langer T. 2005. Recent advances in Docking and scoring. *Curr. Comput. Aided Drug Des* 1: 93-102.
- Maya JD, Bollo S, Núñez-Vergara LJ, Squella JA, Repetto Y, Morillo A, Perie J, Chauviere G. 2003. *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurans derivatives. *Biochem Pharmacol* 65:999-1006.
- Monasterios M, Avendaño M, Amaro MI, Infante W, Charris J. 2006. Relation between electrostatic molecular potential, several electronic properties and antibacterial activity of some synthetic furane derivatives. *J Mol Struc* 798: 102-108.
- Monasterios M, Capobianco M, Cordero MI. 1998. Conformational analysis of Nifurtimox and derivatives applied to the rational design of trypanocide drugs. *An Quim-Int Ed* 94: 345-348.
- Monasterios M, Charris J, Infante W, De Castro N. 2003. Avance en la síntesis de Derivados del 5-nitrofurano con posible actividad antibacteriana. *Revista de la Facultad de Farmacia*. 66: 27-32.
- Monasterios M, Escorche M, Avendaño M. 2005. Conformational analysis, electronic properties and molecular electrostatic potential of nitrofurans derivatives with antibacterial activity. *J Mol Struc* 748: 49-55.
- Otero L, Maya JD, Morello A, Rigol C, Barriga G, Rodríguez J, Folch C, Norambuena E, González M, Olea Azar C, Cerecetto H, Gambino D. 2008. Insight into the bioreductive mode of action of antitrypanosomal nitrofuril containing thiosemicarbazones. *Med Chem* 4: 11-17.
- Paulino M, Iribarne F, Hansz M, Vega M, Seoane G, Cerecetto H, Di Maio R, Caracelli I, Zukerman-Schpector J, Olea C, Stoppani AOM, Berriman M, Fairlamb A H, Tapia O. 2002. Computer assisted design of potentially active anti-trypanosomal compounds. *J Mol Struc-THEOCHEM* 584: 95-105.
- Thompson MA. 2004. ArgusLab 4.0. Planaria Software LLC, Seattle, WA.
- Young, DC. 2009. *Computational Drug Design. A guide for computational and Medicinal Chemistry*. USA. John Wiley & Sons inc. P. 141.