

Diseño *in-silico* de ligandos de RAR- γ para el tratamiento de acné severo con menor incidencia de efectos neurológicos

KENYA GONZÁLEZ-RESÉNDIZ, JIMENA OBLEA-POSTIGO, ITZAYANA GUADALUPE RODRÍGUEZ-NUÑO, MANUEL GUILLERMO SÁNCHEZ-TEJEDA, JESUS EDUARDO TRUJILLO-HIDALGO

Resumen— El acné, es un trastorno que ocurre en la piel, que afecta los folículos polisebáceos, permitiendo la producción en exceso de sebo que da lugar a lesiones en la dermis. Para casos graves, suele indicarse el uso de isotretinoína, un profármaco retinoide que ejerce su acción farmacológica mediante la activación de los receptores de ácido retinoico (RAR) y retinoide X (RXR). Dentro de los eventos adversos serios asociados a la isotretinoína destacan el aumento de episodios depresivos y tendencias suicidas en los pacientes que la usan, esto se ha atribuido a la interacción de los metabolitos activos de la isotretinoína con los receptores del ácido retinoico en el cerebro. En este trabajo se diseñaron y evaluaron por métodos computacionales una serie de análogos del ácido 13-cis-retinoico que tuvieran afinidad por el receptor RAR y nula permeabilidad hacia la barrera hematoencefálica para disminuir la incidencia de efectos neurológicos. Los ligandos Asebaroteno e ISO20 surgieron como dos entidades moleculares que cumplen con ambas características, por lo que representan un punto de partida para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento del acné severo con mayor seguridad al tener menor posibilidad de generar efectos adversos neurológicos.

I. INTRODUCCIÓN

El acné es un trastorno dérmico que afecta a los folículos poli sebáceos cuando estos se tapan con células muertas y/o grasa generando una producción excesiva de sebo que provoca una variedad polimórfica de lesiones a lo largo del sistema tegumentario que consisten en comedones, pápulas, pústulas y nódulos. Está presente en 8 de cada 10 mexicanos adolescentes entre 12 y 21 años y aunque por sí solo no genera problemas de salud graves la Secretaría de Salud de México en 2016 indicó que provoca afectaciones emocionales como depresión y baja autoestima. La Asociación Mexicana de Dermatología en 2017 afirmó que los jóvenes con este padecimiento optan en primera instancia por un tratamiento de dudoso o nulo reconocimiento científico para tratar estas afecciones. [1]

Ciertamente, este padecimiento no tiene cura, sin embargo, existen diversos tratamientos efectivos para reducir de manera significativa los síntomas, como es el caso de la isotretinoína, el único fármaco disponible que tiene la capacidad de erradicar

todos los agentes etiológicos que causan el acné (Figura 1). La eficacia de la isotretinoína recae en su capacidad de influir en el desarrollo del ciclo celular, en la diferenciación celular, sobrevivencia y apoptosis de las células. Su principal efecto en el organismo es la reducción de la producción del sebo, influye en la comedogénesis, disminuye la presencia de *Cutibacterium* (antes *Propionibacterium*) *acnes* en la superficie de la piel y poros, además presenta propiedades antiinflamatorias. Una dosis de 0.5 mg/kg/día reduce en un 90% la producción de sebo en 6 semanas [2].

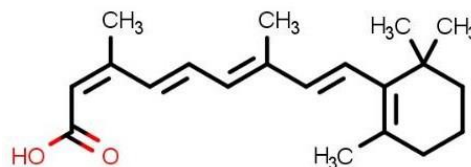


Figura 1. Estructura de la isotretinoína.

La isotretinoína, es considerada un retinoide, los cuales se refieren a toda la familia de compuestos (naturales o sintéticos) que tienen estructura similar a la vitamina A. Los derivados de vitamina A se han visto que también están implicados en una gran variedad de regulaciones biológicas, como diferenciación celular, proliferación celular, apoptosis y adipogénesis; por mencionar algunas. [3] Después de la absorción de la vitamina A en el cuerpo, ésta se une a una proteína denominada RBP (por sus siglas en inglés de *Retinol Binding Protein*). En el cuerpo, se convierte a sus diversos metabolitos que dan diversas señalizaciones celulares. Uno de los metabolitos generados es el ácido retinoico (Figura 2), el cual se une a ciertos receptores conocidos como RARs y RXRs [4], [5].

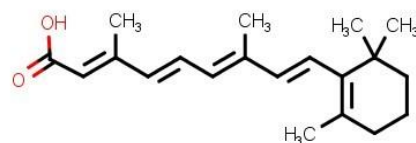
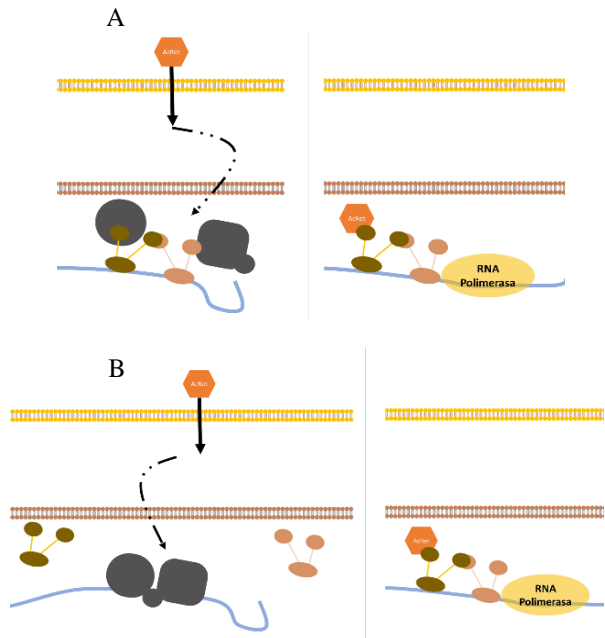


Figura 2. Estructura del ácido retinoico.

La isotretinoína tiene de muy baja o nula capacidad de unirse receptores nucleares de ácido retinoico (RAR y RXR), pero tiene la capacidad de actuar como un profármaco que se convierte intracelularmente en metabolitos que actúan como agonistas de los receptores de ácido retinoico (RAR) y receptores X retinoides (RXR) [6].

KENYA GONZÁLEZ-RESÉNDIZ, JIMENA OBLEA-POSTIGO, ITZAYANA GUADALUPE RODRÍGUEZ-NUÑO, MANUEL GUILLERMO SÁNCHEZ-TEJEDA, JESÚS EDUARDO TRUJILLO-HIDALGO pertenecen a la carrera QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO de la FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS dentro del curso de FARMACIA MOLECULAR (Email: jimenaopostigo@gmail.com).
El proyecto fue asesorado por el DR. MARCO ANTONIO LOZA MEJÍA.

Los receptores del ácido retinoico (RAR) son receptores nucleares y existen tres subtipos: RAR α , β y γ ; también llamados NR1B1, NR2B2, NR1B3. Estos receptores se componen de un dominio N-terminal variable (NTD), dos dominios altamente conservados que se unan al ADN (DBD) y un dominio C-terminal implicado en la unión del ligando (LBD). [4], [7] El Esquema 1 ilustra las vías de señalización propuestas para este tipo de receptores.



Esquema 1. Se muestran las dos propuestas de vías de señalización principales del ácido retinoico. En donde ésta, induce por cascadas de fosforilación y varios intermediarios los dos siguientes posibles efectos: (A) Existen proteínas represoras (en negro) unidas a los RAR y RXR, impidiendo la expresión de genes. (B). Las proteínas represoras evitan que RAR y RXR se unan al gen.

El problema con las terapias para el tratamiento del acné basadas en el uso de isotretinoína, son los efectos secundarios; pues se ha visto que después del tratamiento se incrementan los niveles de colesterol y triglicéridos. En algunos casos se han reportado incidencias de tendencias suicidas y depresión por parte de los pacientes.[2], [8], [9] La relación entre la isotretinoína y esta afección está estrechamente asociada con la presencia y ubicación de los receptores del ácido retinoico en el cerebro, específicamente en la zona límbica (amígdala, córtex prefrontal e hipotálamo), la cual está vinculada al control y regulación de las emociones. Se ha informado que parte de los efectos adversos de la isotretinoína involucran la disminución de macrófagos, degeneración de los axones y una formación de complejos anormales de células de Schwann [9]–[11].

En el presente trabajo se busca diseñar análogos retinoides que conserven o presenten mayor afinidad al receptor RAR al cual se atribuyen los efectos terapéuticos de la isotretinoína y sus metabolitos activos, pero disminuyendo los efectos adversos sobre el sistema nervioso. Las estrategias que se pretenden emplear son:

- a) *Diseño de análogos con valores más bajos de logP.* Esta estrategia se utilizó para el diseño de

antihistamínicos que no causan somnolencia debido a que tienen menor permeabilidad hacia la barrera hematoencefálica.[12] Otro ejemplo proviene de las estatinas, donde la regulación de los valores de logP favorece su distribución selectiva hacia hígado, disminuyendo los eventos serios asociados a su uso como la rabdomiólisis. La incorporación de grupos funcionales más polares suele disminuir los valores de logP [13].

- b) *Diseño de fármacos rápidamente metabolizables.* Los fármacos suaves o *soft drugs* son fármacos diseñados para tener biotransformación controlada y predecible, donde los metabolitos son sustancias inactivas o de rápida excreción. Esta estrategia se ha empleado para el diseño de corticosteroides de acción local no sistémica mediante la incorporación de grupos metabólicamente lábiles [14], [15].

Una vez diseñadas las moléculas, se evaluará su afinidad teórica mediante acoplamiento molecular utilizando el programa Molegro Virtual Docker, mientras que sus propiedades farmacocinéticas y toxicológicas se estimarán mediante el uso de plataformas quimioinformáticas como SwissADME y Osiris Property Explorer.

II. METODOLOGÍA

Construcción de la biblioteca. El diseño de los nuevos ligandos partió de diversas modificaciones estructurales al ácido retinoico y la isotretinoína buscando incorporar grupos funcionales más polares y que fueran rápidamente metabolizables (ésteres, iminas, fosfatos), con la intención de disminuir el logP y que los compuestos diseñados pudieran metabolizarse a compuestos aún más polares y de menor afinidad al receptor RAR. Las moléculas se dibujaron en el programa ChemSketch,[16] se optimizó su geometría por mecánica molecular y se guardaron en formato *.mol y se registraron los códigos SMILES de cada una.

Evaluación de la afinidad teórica por acoplamiento molecular. Los estudios de acoplamiento se realizaron en base a las estructuras cristalinas del Receptor de Ácido Retinoico gamma (RAR- γ) con el código de acceso al PDB 1FCY. Todas las estructuras se descargaron del sitio web del ProteinDataBank (www.rcsb.org/pdb)[17]. Los estudios de acoplamiento se llevaron utilizando el programa Molegro Virtual Docker[18] usando el protocolo sugerido por el fabricante y que ha sido reportado en varios estudios sobre afinidad teórica de fármacos.[19]–[22] Las moléculas de disolvente, los ligandos y los cocrystalizadores se eliminaron. El Ligand Binding Domain (LBD) se eligió como sitio de búsqueda limitada por una esfera de 15 Å. Se utilizó el un algoritmo genético con 5000 iteraciones con 25 corridas para cada ligando. Se seleccionó MolDock score como el algoritmo de evaluación de la afinidad teórica. A valores más negativos sugiere una mayor afinidad del ligando por la proteína. Para el análisis posterior se eligieron las poses y las moléculas de mejor afinidad.

Determinación del perfil ADME/Tox teórico. El perfil farmacocinético se evaluó en el portal de SwissADME.[23] La información suministrada fue el código SMILES de cada ligando. Este portal arroja como resultado la predicción de

ciertos parámetros fisicoquímicos relacionados con la absorción oral, la permeabilidad a la pared hematoencefálica y el metabolismo por ciertas isoformas del citocromo P450. El perfil toxicológico se estimó con el portal Osiris Property Explorer[24] el cual a partir de la estructura reconoce la presencia de porciones moleculares asociadas a irritabilidad y carcinogénesis.

Selección de los ligandos más prometedores. Debido a que se buscó disminuir el valor de logP, se priorizó la selección de las moléculas por aquellas que obtuvieran mejor puntuación de MolDock Score y obtuvieran un valor de logP menor a 3.00. Posteriormente se excluirían aquellas que en la toxicidad teórica presentarían efectos contraproducentes.

III. RESULTADOS

La table I muestra los resultados de las 10 moléculas con mayor afinidad teórica, conforme al puntaje descrito por el MolDock score. Se incluyen, los valores obtenidos de las moléculas de isotretinoína y del ácido retinoico como puntos de referencia. Se incluyen en esta tabla los datos sobre la predicción de la absorción y facilidad sintética (en una escala del 1 al 10, donde 10 representa mayor dificultad de síntesis química) predichos por el portal de SwissADME. La Figura 3 muestra el potencial complejo que se formaría entre la molécula asebaroteno y el LBD del receptor RAR- γ .

TABLA 1

Resultados de moldock score determinados por el programa molegro virtual docker y de facilidad sintética y absorción del portal swissadme

Clasificación	Nombre Genérico	MolDock Score	Facilidad sintética	Absorción GI
1	ISO 24	-180.484	4.49	Alta
2	ISO 18	-177.296	4.31	Alta
3	ISO 22	-169.687	4.54	Alta
4	ISO 30	-163.084	4.24	Alta
5	ISO 19	-162.945	3.78	Alta
6	ISO 4	-162.871	4.17	Alta
7	Asebaroteno	-159.639	3.65	Alta
8	ISO 21	-153.448	3.54	Alta
9	ISO 17	-151.577	4.02	Alta
10	ISO 7	-146.441	4.36	Alta
13	Ac. Retinoico	-138.677	4.1	Alta
17	ISO 20	-137.56	4.16	Alta
32	Isotretinoína	-119.247	4.1	Alta

La Tabla 2 muestra los resultados de la determinación del perfil farmacocinético-toxicológico (ADME/Tox) determinados en la plataforma de Osiris Property Explorer.

IV. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La búsqueda de nuevas estructuras con actividad farmacológica suele implicar el conocimiento de varias disciplinas para poder proponer estructuras atractivas para su síntesis química. En este sentido, la exploración de bibliotecas de alta variabilidad estructural, y que se encuentran disponibles en línea o en fuentes de la literatura

científica, de cientos, miles o millones de moléculas ha mostrado éxito [19], [25].

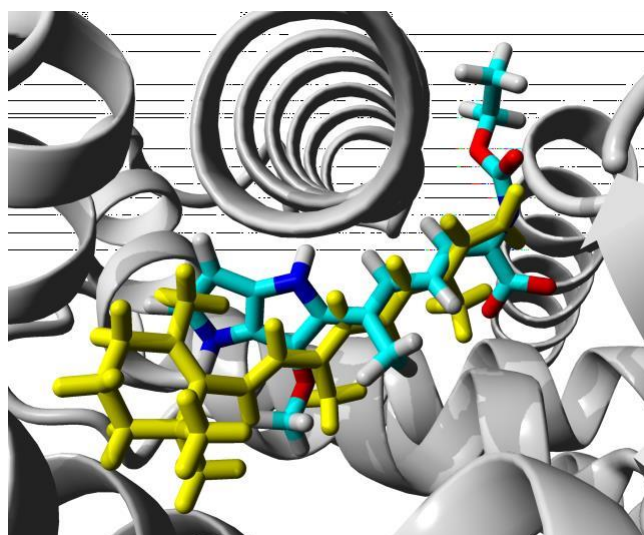


Figura 3. Sobreposición de los complejos del ácido retinoico (en amarillo) y el asebaroteno (en colores CPK) en el Ligand Binding Domain del receptor RAR- γ .

TABLA 2
Perfil adme/tox de las moléculas de la tabla 1

Clasificación	Nombre Genérico	logP	logS (solubilidad acuosa)	Advertencias sobre la Toxicidad
1	ISO 24	6.44	-3.78	Tóxico para reproducción
2	ISO 18	5.01	-5.56	No tóxico
3	ISO 22	4.88	-3.48	Irritante
4	ISO 30	3.51	-3.59	Mutagénico
5	ISO 19	5.18	-3.8	Tóxico para reproducción
6	ISO 4	5.57	-3.42	No tóxico
7	Asebaroteno	1.41	-2.4	No tóxico
8	ISO 21	3.71	-2.71	Irritante y mutagénico
9	ISO 17	4.77	-4.41	No tóxico
10	ISO 7	4.89	-3.17	Mutagénico
13	Ac. Retinoico	5.82	-3.48	No tóxico
17	ISO 20	2.18	-3.58	No tóxico
32	Isotretinoína	5.82	-3.48	No tóxico

El diseño de bibliotecas con propiedades estructurales específicas suele ser una tarea más demandante, puesto estas bibliotecas no siempre están disponibles en línea y es necesaria construirlas *a mano*. Este enfoque requiere el conocimiento de las propiedades fisicoquímicas de todos los grupos funcionales que son relevantes para las propiedades farmacodinámicas (formación de interacciones químicas para mejorar la afinidad), farmacocinéticas (absorción, distribución y metabolismo) y toxicológicas (formación de entidades reactivas, presencia de toxicóforos). Sin embargo, esta aproximación dirigida suele dar mejores resultados, particularmente en diseños auténticamente racionales o *in combo* [26].

En este sentido, nuestros objetivos se centraron en diseñar moléculas que conservaran la afinidad hacia el receptor

RAR-γ, con menor valor de logP para disminuir el cruce de la barrera hematoencefálica y evitar la unión a los receptores ubicados en el cerebro. Además, se buscó combinar esta característica con el enfoque de *soft drugs* para reducir aún más esta posibilidad.

Dentro del estudio se identificaron a las moléculas asebaroteno (nombre propuesto por nosotros con base a la nomenclatura INN) e ISO20 como aquellas que cumplieron con estas propiedades. Particularmente, la molécula asebaroteno conservó las interacciones clave con los residuos de Arg278 y Ser289 que tiene el ácido retinoico (Figuras 4a y 4b) justamente con el átomo de nitrógeno de la imina, que es el centro rápidamente metabolizable.

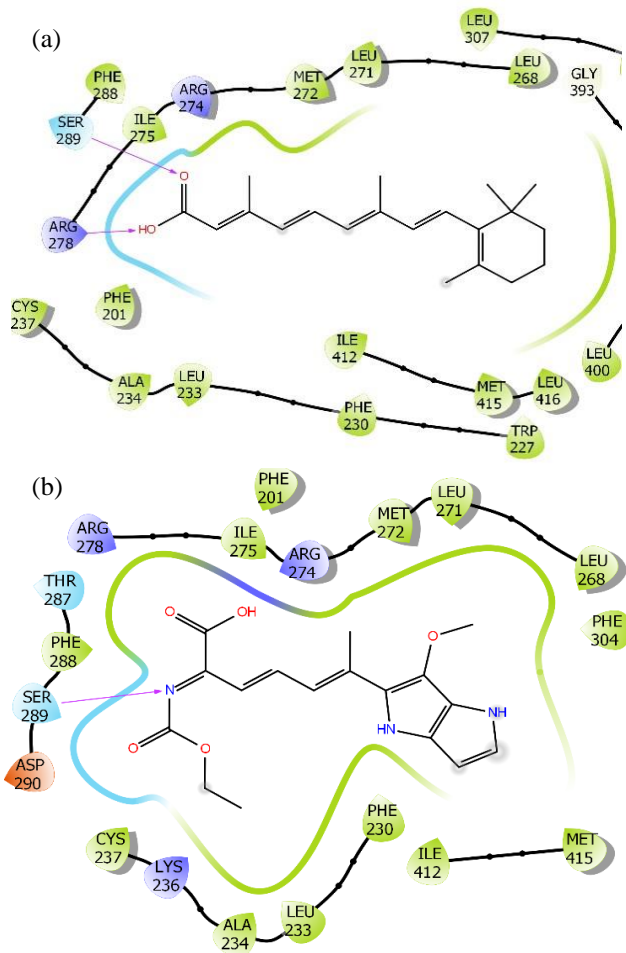
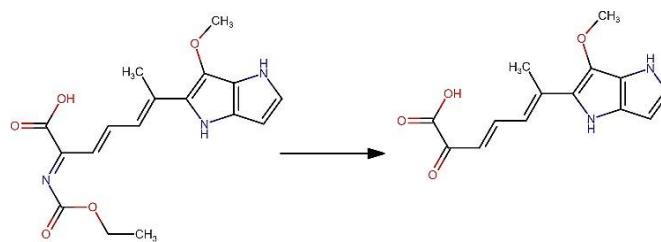


Figura 4. Diagrama 2D de la interacción del (a) ácido retinoico y (b) asebaroteno con los aminoácidos del LBD de RAR gamma.

Un punto importante dentro del concepto de *soft drug*, es garantizar que la nueva molécula posea no solamente menor afinidad hacia el sitio activo, además no debe tener propiedades tóxicas y preferentemente pueda ser fácilmente eliminable, por lo que debe de evaluarse también el perfil *in silico* del potencial metabolito. Es probable que la hidrólisis de la imina genere al metabolito principal del asebaroteno como se ilustra en el Esquema 2. Los datos de su evaluación *in silico*, comparadas con las del asebaroteno, se ilustran en la Tabla 3.



Esquema 2: Potencial metabolito del asebaroteno.

TABLA 3

Resultados de moldock score y perfil adme/tox in silico del potencial metabolito del asebaroteno

Ligando	MolDock Score	LogP	Perm. BBB	Alertas sobre la Toxicidad
Asebaroteno	-159.639	1.41	No	No tóxico
Metabolito	-125.070	0.60	No	No tóxico

Perm.BBB=Permeabilidad barrera hematoencefálica

De los datos de la Tabla 3 se desprende que el potencial metabolito posee menores valores de afinidad teórica y de logP, además de que no posee alertas sobre la toxicidad según el algoritmo de Osiris Property Explorer y no tendría permeabilidad hacia la barrera hematoencefálica al igual que el asebaroteno, por lo que el asebaroteno cumpliría con los preceptos de una molécula *soft drug*.

Finalmente, como el uso de retinoides para el tratamiento de acné induce varios efectos sistémicos, visualizamos que la mejor manera de administrar los nuevos posibles fármacos sería por acción tópica. En este sentido es probable que el asebaroteno con un logP cercano a 1.5 tendría moderada permeabilidad a la piel (lo cual puede mejorarse con tecnología farmacéutica) y que una vez ejerciendo su función en los folículos polisebáceos podría biotransformarse a metabolitos inactivos en caso de llegar a circulación sistémica.

V. CONCLUSIONES

Se diseñaron una serie de análogos retinoides con el objetivo de que tuvieran mayor afinidad por el RAR, que actuaran como *soft drug* y que sus propiedades fisicoquímicas sugieran que tanto el fármaco original como sus metabolitos tendrían baja permeabilidad a la barrera hematoencefálica, identificándose a las moléculas Asebaroteno e ISO 20 como los candidatos más prometedores.

Estos ligandos mantienen las interacciones clave hacia el receptor RAR y su perfil ADME/Tox sugiere que serían seguras por lo que constituyen un punto de partida para el desarrollo de nuevos agonistas del receptor RAR para el manejo del acné severo sin eventos adversos neurológicos.

REFERENCIAS

- [1] J. Alvaro and P. Martínez, "El acné," 2003.
- [2] J. W. Marson and H. E. Baldwin, "An Overview of Acne Therapy, Part 2: Hormonal Therapy and Isotretinoin," *Dermatol. Clin.*, vol. 37, no. 2, pp. 195–203, Apr. 2019.
- [3] M. C. Liggins, L. Zhang, and R. L. Gallo, "885 Retinoids

- improve innate immune defense by enhancing reactive dermal adipogenesis,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 138, no. 5, p. S150, May 2018.
- [4] B. B. Davidovici and Y. Tüzün, “Retinoid Receptors,” *Dermatol. Clin.*, vol. 25, no. 4, pp. 525–530, Oct. 2007.
- [5] E. Pérez, W. Bourguet, H. Gronemeyer, and A. R. de Lera, “Modulation of RXR function through ligand design,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*, vol. 1821, no. 1, pp. 57–69, Jan. 2012.
- [6] F. Wang *et al.*, “Retinoic acid 4-hydroxylase inducibility and clinical response to isotretinoin in patients with acne,” *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 61, no. 2, pp. 252–258, Aug. 2009.
- [7] J. Bastien and C. Rochette-Egly, “Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes,” *Gene*, vol. 328, pp. 1–16, Mar. 2004.
- [8] N. Prevost and J. C. English, “Isotretinoin: Update on Controversial Issues,” *J. Pediatr. Adolesc. Gynecol.*, vol. 26, no. 5, pp. 290–293, Oct. 2013.
- [9] J. Tan, S. Boyal, K. Desai, and S. Knezevic, “Oral Isotretinoin: New Developments Relevant to Clinical Practice,” *Dermatol. Clin.*, vol. 34, no. 2, pp. 175–184, Apr. 2016.
- [10] J. D. Bremner and P. McCaffery, “The neurobiology of retinoic acid in affective disorders,” *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry*, vol. 32, no. 2, pp. 315–331, Feb. 2008.
- [11] L. C. Schaffer, C. B. Schaffer, S. Hunter, and A. Miller, “Psychiatric reactions to isotretinoin in patients with bipolar disorder,” *J. Affect. Disord.*, vol. 122, no. 3, pp. 306–308, May 2010.
- [12] A. M. ter Laak, R. S. Tsai, G. M. Donné-Op den Kelder, P.-A. Carrupt, B. Testa, and H. Timmerman, “Lipophilicity and hydrogen-bonding capacity of H1- antihistaminic agents in relation to their central sedative side-effects,” *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 2, no. 5–6, pp. 373–384, Dec. 1994.
- [13] D. T. Manallack, E. Yuriev, and D. K. Chalmers, “The influence and manipulation of acid/base properties in drug discovery,” *Drug Discov. Today Technol.*, vol. 27, pp. 41–47, Jul. 2018.
- R. B. Silverman, M. W. Holladay, R. B. Silverman, and M. W. Holladay, “Drug Metabolism,” in *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action* Elsevier, 2014, pp. 357–422.
- [14] Y. R. Bhardwaj, A. Pareek, V. Jain, and D. Kishore, “Chemical delivery systems and soft drugs: Retrometabolic approaches of drug design,” *Saudi Pharm. J.*, vol. 22, no. 4, pp. 290–302, Sep. 2014.
- [15] Advanced Chemistry Development, “ChemSketch,” 2017. [Online]. Available: www.acdlabs.com.
- [16] H. M. Berman *et al.*, “The Protein Data Bank,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 28, no. 1, pp. 235–242, Jan. 2000.
- [17] R. Thomsen and M. H. Christensen, “MolDock: A New Technique for High-Accuracy Molecular Docking,” *J. Med. Chem.*, vol. 49, no. 11, pp. 3315–3321, Apr. 2006.
- [18] M. A. Loza-Mejía and J. R. Salazar, “Sterols and triterpenoids as potential anti-inflammatories: Molecular docking studies for binding to some enzymes involved in inflammatory pathways,” *J. Mol. Graph. Model.*, vol. 62, pp. 18–25, Nov. 2015.
- [19] M. A. Loza-Mejía, J. R. Salazar, and J. F. Sánchez-Tejeda, “In Silico Studies on Compounds Derived from Calceolaria: Phenylethanoid Glycosides as Potential Multitarget Inhibitors for the Development of Pesticides,” *Biomolecules*, 2018.
- [20] I. V. Ogungbe, W. R. Erwin, and W. N. Setzer, “Antileishmanial phytochemical phenolics: Molecular docking to potential protein targets,” *J. Mol. Graph. Model.*, vol. 48, pp. 105–117, 2014.
- [21] I. Ogungbe and W. Setzer, “Comparative Molecular Docking of Antitrypanosomal Natural Products into Multiple Trypanosoma brucei Drug Targets,” *Molecules*, vol. 14, no. 4, pp. 1513–1536, Apr. 2009.
- [22] D. Gfeller, A. Grosdidier, M. Wirth, A. Daina, O. Michielin, and V. Zoete, “SwissTargetPrediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 42, no. Web Server issue, pp. W32–8, Jul. 2014.
- [23] T. Sander, “Osiris Property Explorer.” [Online]. Available: www.organic-chemistry.org/osiris/peo.
- [24] S. Bietz *et al.*, “From cheminformatics to structure-based design: Web services and desktop applications based on the NAOMI library,” *J. Biotechnol.*, vol. 261, no. March, pp. 207–214, 2017.
- [25] G. Navarrete-Vázquez *et al.*, “Synthesis, in vitro and in silico studies of a PPAR γ and GLUT-4 modulator with hypoglycemic effect,” *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 24, no. 18, pp. 4575–4579, Sep. 2014.