

Modificaciones Moleculares Aplicadas a la Reserpina y la Tetrabenazina para el Diseño de Fármacos Duales para el Tratamiento de la Enfermedad de Huntington: Evaluación por Métodos Quimioinformáticos y Acoplamiento Molecular

Coras-Franco Gyna A, Flores-Alfaro Gustavo, Martínez-Costales Ricardo, Rojas-Campos Abril A, Loza-Mejía Marco A.

Resumen---La enfermedad de Huntington es un padecimiento neurológico degenerativo de herencia autosómica dominante, causado por una expansión CAG que codifica una secuencia de poliglutamina en la proteína huntingtina.[1] Esta revisión estará centrada en los movimientos coreicos que caracterizan a la enfermedad y con base a sus posibles tratamientos farmacológicos se propondrá un nuevo fármaco a través de experimentos *in silico* donde se reportan los resultados de las moléculas diseñadas a partir de las modificaciones estructurales de dos fármacos depletores de dopamina; la tetrabenazina y la reserpina, específicamente a la unión de la proteína VMAT2. **Palabras clave:** Huntington, huntingtina, movimientos coreicos, experimentos in Silico, depletores de dopamina, tetrabenazina, reseppina.

I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Huntington es un padecimiento neurodegenerativo hereditario que se caracteriza por tener movimientos arrítmicos descontrolados, deterioro cognitivo y síntomas psiquiátricos[2]

EPIDEMIOLOGIA Y ETIOLOGÍA

Esta enfermedad se encuentra distribuida en todo el mundo, afectando tanto a hombres como mujeres. Tiene una prevalencia de entre 5 y 10 casos por 100 mil habitantes.[2] Según las estadísticas del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía(INNN), se cree que en México hay alrededor de 8000 personas con esta enfermedad.[3] Esta enfermedad se puede heredar de forma autosómica dominante, es causada por una amplificación génica producida por la repetición del trinucleótido CAG. El gen responsable de esta enfermedad es el gen1T15, específicamente en el cromosoma 4p16.3. [4] Cuando el gen1T15 se encuentra en individuos saludables contienen entre 15 y 34 repeticiones de trinucleótidos CAG, en comparación con los individuos que presentan la

enfermedad de Huntington contiene desde 35 hasta 66 repeticiones.[4] Los trinucleótidos de CAG codifican para glutamina, al tener una larga cadena anormal de glutaminas se producen huntingtinas.[4]

La huntingtina es una proteína de 348 KDa, posee un segmento poliQ que comienza en el residuo 17 seguido de un segmento del residuo prolina, cerca del N-terminal. [5]

Los niveles máximos de expresión están en los testículos y el sistema nervioso central (SNC). Dentro del cerebro, corteza cerebral, corteza cerebrosa, hipocampo y núcleo estriado. Es expresada en toda la célula, pero principalmente en el citoplasma, núcleo, mitocondria, membrana plasmática y endosomas. Ya que no se conoce muy a detalle las funciones, mencionaremos una de las posibles la cual se encuentra relacionada con el transporte intracelular y la endocitosis ya que se encuentra asociada a membranas intracelulares que contienen clatrina.[6]

Se han caracterizado las proteínas que interaccionan con la huntingtina (htt) normal y mutada. Como es la HAP-11, HIP-1 y LA HIP-14, las cuales se encuentran asociadas a vesículas y aparato de Golgi e interacciones con proteínas del citoesqueleto.[7]

FISIOPATOLOGÍA

Los pacientes con la enfermedad de Huntington se caracterizan por no tener control en sus movimientos. En una persona saludable el sistema motor subcortical de los ganglios basales transmiten una señal al tálamo, que a su vez manda otra señal hacia el la corteza cerebral. Sin embargo en los que presentan esta enfermedad presentan una atrofia del cuerpo estriado que se encuentra en la región subcortical del ganglio basal.[2], [5]

La atrofia se debe a la pérdida neuronal (neuronas espinosas principalmente), gliosis y agregados proteicos.

La función de las neuronas espinosas es transmitir señales de distintas zonas a través de neurotransmisores:

- GABA
- Glutamina

Coras Franco Gyna Alejandra, Martínez Costales Ricardo, Rojas Campos América Abril, pertenecen a la carrera de QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO de la Facultad de Ciencias Químicas y realizaron el proyecto dentro del curso de FARMACOLOGÍA MOLECULAR (gynacorass@live.com) El proyecto fue asesorado por Dr. Marco Antonio Loza Mejía.

- Acetil colina
- Dopamina
- Serotonina

En esta enfermedad, el neurotransmisor GABA se encuentra en menores concentraciones. Por lo que las dos vías eferentes motoras se encuentran afectadas como se muestra en el siguiente esquema:



Esquema 1. Esquemización de las vías eferentes motoras dañadas por la enfermedad de Huntington. En rojo se muestran las estructuras que se encuentran en menor actividad y en azul oscuro las que se encuentran en mayor actividad. Adaptado de la referencia [8]

La dopamina es un neurotransmisor catecolaminérgico y agonista directo de los receptores D1 y D2 y también actúa de forma indirecta estimulando la liberación de norepinefrina endógena. Es producida por el cuerpo humano, y participa en la regulación de diversas funciones como la actividad motora, la emotividad y la afectividad, así como en la comunicación neuroendócrina. [9]

Los receptores dopaminérgicos pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G. En esta familia de receptores, el reconocimiento del neurotransmisor y la molécula efectora son entidades diferentes, acopladas entre sí por una proteína con capacidad para unir nucleótidos de guanina.

	Familia D ₁			Familia D	
	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D
Subtipo	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D
Secuencia codificada	446 a.a.	477 a.a.	D2a443 a.a. D2a444 a.a.	400 a.a.	387 a.a.
Intrones	No	No	Si	Si	Si
Localización cromososomal	5q 35.1	4p 15.1-16.1	11q 22-23	3q 13.3	11p 15.5
Tamaño del RNAm	3.8 kb	3 kb	2.5 kb	8.3 kb	5.3 kb
Regiones de alta densidad	Neoestriado	Hipotálamo hipocampo	No estriado	Paleoestriado	Corteza frontal
Autorreceptor	No	---	No	Si inhibición	---
adenilil ciclasa	estimulación	---	inhibición	---	---
Efecto	Gas	Gas	Gas/o	Gai/o	Gai/o

Tabla 1. Características estructurales de los receptores dopaminérgicos.

Los transportadores de vesículas de monoaminas (VMAT) son aquellas vesículas que se encuentran en el botón presináptico y que se encargan de la recaptura de neurotransmisores, como la dopamina, para evitar que estos neurotransmisores sufran una degradación metabólica prematura. [10]

Existen 2 tipos:[10], [11]

- VMAT-1: se encuentra principalmente en las células paracrina y endocrinas

- VMAT-2: se encuentra principalmente en el cerebro Los VMAT-2 cuando excitan los neurotransmisores y estos llegan a su respectivo receptor que se encuentra en el botón pos sináptico. En el caso de la enfermedad de Huntington la dopamina, excitada por la VMAT-2, interactúa con el receptor D2 que se encuentra afectado. [10], [11]

SIGNOS Y SÍNTOMAS

Trastornos motores:

Los pacientes con enfermedad de Huntington presentan movimientos coreicos es decir movimientos involuntarios que dependiendo de la etapa y progresión de la enfermedad estos se harán más prominentes.

La corea es un trastorno involuntario del movimiento que es muy característico debido a que son movimientos espontáneos, excesivos, arrítmicos, que son distribuidos por todo el cuerpo en forma aleatoria que presentan cambios de velocidad y dirección.[2]

Conforme va evolucionando la enfermedad pueden presentar: [2], [4]

- Disonia
- Alteraciones en la marcha
- Rigidez
- Lenguaje disártrico
- Hiperreflexia
- En pocos casos signo de Babinski
- Crisis epilépticas

Trastornos psiquiátricos:

- Cambios en la personalidad
- Paranoia o esquizofrenia
- Alucinaciones
- Trastornos afectivos como la depresión
- Trastornos del sueño
- Tendencia al suicidio.[2], [12]

Trastornos cognitivos: [2], [12]

- Alteraciones en la memoria de corto y largo plazo
- Déficit de atención
- Demencia subcortical (no puede conectar ideas)
- Afasia
- Apraxia
- Agnosia.

TRATAMIENTO

Este debe ser multidisciplinario, ya que deben intervenir genetistas, neurólogos y psicólogos.

- No existe un tratamiento que sea eficaz para evitar la progresión o retrasar el comienzo de esta enfermedad, sin embargo se les puede dar tratamiento farmacológico de los síntomas:
- Corea: se utilizan antagonistas de los receptores dopaminérgicos del cuerpo estriado e inhibidores de la liberación de dopamina
- Depresión
- Ansiedad: generalmente es tratada con benzodiacepinas[2]

Clase	Fármacos
Fármacos depletors de dopamina	Tetrabenazina Reserpina
Antipsicóticos típicos	Haloperidol Flufenazina Tioridazina Tiotixene

Tabla 2. Fármacos utilizados para el tratamiento de la Enfermedad de Huntington

En este trabajo se pretende proponer la modificación de los fármacos depletors de dopamina, tetrabenazina y reserpina, debido al papel que juegan los receptores dopaminérgicos en la fisiopatología de la enfermedad. A continuación, se describen algunas generalidades de ambos fármacos.

FÁRMACOS DEPLETORES DE DOPAMINA

TETRABENAZINA

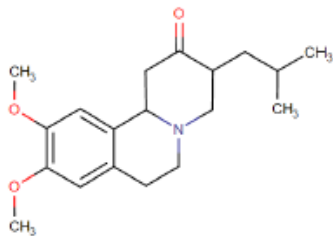


Figura 1. Molécula de Tetrabenazina

Es un fármaco soluble en agua con pKa de 6.51, utilizado anteriormente como antipsicótico y tratamiento de diversos trastornos del movimiento. Bloquea la captación de neurotransmisores en vesículas adrenérgicas de almacenamiento y se han utilizado como marcadores de alta afinidad para el sistema de transporte de vesículas.[13]

Después de la administración oral de tetrabenazina, el grado de absorción es al menos 75%. Después de dosis orales únicas que oscilan entre 12,5 y 50 mg, las concentraciones plasmáticas de tetrabenazina están generalmente por debajo del límite de detección debido al metabolismo hepático rápido y extenso de la tetrabenazina. Los alimentos no afectan la absorción de tetrabenazina. Cmax, oral = 4,8 ng / ml en HD o pacientes con discinesia tardía.

Es un inhibidor reversible del tipo 2 de transportador de monoamina vesicular (Ki = 100 nM). Actúa dentro de los ganglios basales y promueve el agotamiento de los neurotransmisores monoamina serotonina, norepinefrina y dopamina de las tiendas. También disminuye la captación en las vesículas sinápticas. La dopamina es necesaria para el movimiento del motor fino, por lo que la inhibición de su transmisión es eficaz en pacientes con discinesia tardía; Tmax, oral = 69 min en HD o para el movimiento hiperkinético. La tetrabenazina muestra una débil afinidad de unión in vitro al receptor D2 de dopamina.[14]

RESERPINA

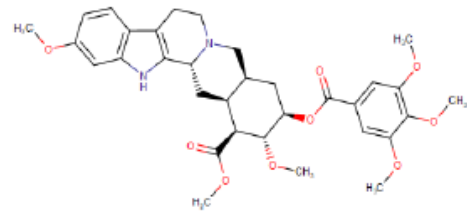


Figura 2. Molécula de Reserpina

La reserpina es un alcaloide, derivado de las raíces de *Rauwolfia serpentina*. Actúa como inhibidor de la captación adrenérgica con efectos antihipertensivos. Es liposoluble y puede penetrar la barrera hematoencefálica. El mecanismo de acción es a través de que inhibe la bomba de catecolamina ATP/Mg²⁺ en las vesículas de almacenamiento en las neuronas centrales y periféricas adrenérgicas, inhibiendo así la captación de norepinefrina, la serotonina de dopamina en las vesículas de almacenamiento presinápticas.[17][15] Esto da como resultado la reducción de catecolaminas y serotonina que persisten en el citoplasma donde son destruidas por la monoamina oxidasa intraneuronal, causando así el agotamiento de las reservas de catecolamina y serotonina en las terminales nerviosas central y periférica. El agotamiento produce una falta de descarga activa del transmisor a partir de las terminaciones nerviosas tras la despolarización nerviosa y, en consecuencia, conduce a una disminución de la frecuencia cardíaca y una disminución de la presión arterial, así como a efectos sedativos.[18][16]

El objetivo de este trabajo se centra en el diseño de moléculas basadas en la estructura de la tetrabenazina y la reserpina. Y evaluar su potencial farmacológico a través de modelos computacionales, para el tratamiento de la enfermedad de Huntington.

VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS MÉTODOS QUIMIOINFORMÁTICOS.

Los métodos quimioinformáticos, se han incorporado poco a poco a las metodologías para la investigación y desarrollo de medicamentos, estas nuevas tecnologías permiten un mejor uso de recursos y del tiempo invertido en el proceso de identificación, selección, desarrollo y optimización de nuevos medicamentos, sin embargo al ser un estudio computacional no garantiza al 100% que los resultados obtenidos de la eficiencia de una molécula van a ser los mismos si se decidiera llevar el estudio a fase I y II del desarrollo de medicamentos. A pesar de esto usar esta metodología es de gran utilidad hoy en día para el desarrollo de nuevos fármacos.

II. METODOLOGÍA

La investigación de la enfermedad y los potenciales blancos biológicos de la tetrabenazina y la reserpina mostró que la

proteína VMAT2 es común para ambos fármacos. VMAT2 es una proteína transportadora 12TM que se encarga del transporte de monoaminas. Esta proteína no se encuentra en el Protein Data Bank, por lo que se tuvo que emplear un modelo generado por homología basado en el transportador de lactosa.

Se realizaron modificaciones a las moléculas base para generar una base de datos de moléculas la cual se construyó en el programa ChemSketch de la empresa ACDLabs. Las moléculas se evaluaron en los programas Openmolecules (<http://www.openmolecules.org/>), ADMETSar (<http://lmm.d.ecust.edu.cn/admetsar1/>), y Molinspiration (www.molinspiration.com) para calcular el perfil ADME/Tox *in silico*.

Los estudios de acoplamiento molecular se realizaron sobre la proteína VMAT2 usando el programa Molegro Virtual Docker, usando el protocolo recomendado por el fabricante del software. El programa arroja posibles modos de unión de las moléculas de la base de datos en el sitio de búsqueda dentro de la proteína. Dichos modos de unión, llamados poses, son a su vez evaluados mediante puntaje (*Rerank score*) que aproxima la energía de interacción de los ligandos evaluados con los aminoácidos del sitio de búsqueda. Valores más negativos de *Rerank score* se relacionan con una mejor afinidad.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tabla 3 muestra los resultados obtenidos para la reserpina (R00) y la tetrabenazina (T00) y de las 3 moléculas que mostraron mayor afinidad a VMAT2 y que tuvieron una evaluación favorable para su perfil ADME/Tox *in silico*.

Molécula	BBB	Absorción oral	Toxicidad	VMAT2 Rerank score
T00	0.9394	0.9948	0.8391	-66.6564
R00	0.7352	0.8449	0.5585	-106.4525
T02	0.7298	1	0.5745	-88.9265
R01	0.8365	0.9127	0.5249	-111.8164
R06	0.5924	0.8305	0.5764	-111.9142

Tabla 3. Resultados perfil ADME/Tox de fármacos originales y modificaciones con el perfil más favorable

- ✓ BBB: Probabilidad de atravesar la barrera hematoencefálica
- ✓ Absorción oral: Probabilidad de presentar absorción oral
- ✓ Fármaco original
- ✓ Favorable
- ✓ Desfavorable

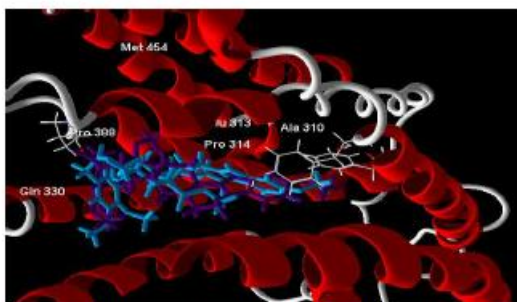


Figura 3. Interacción entre R00 y R01 con VMAT2, generada en Molegro Virtual Docker

La Figura 3, muestra la interacción de R00 y R01 con el sitio de unión en VMAT2. Se observa que no tienen interacciones en común, pero R01 presenta otras interacciones como son: tirosina 4340, fenilalanina 4300 y prolina 3880, las que explican su mayor afinidad a esta proteína.

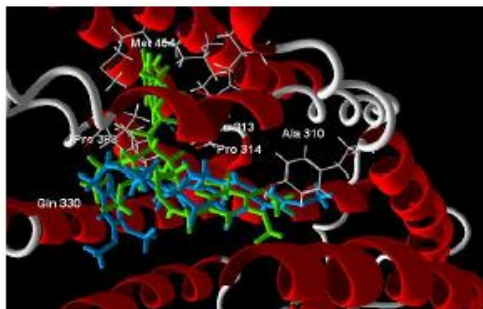
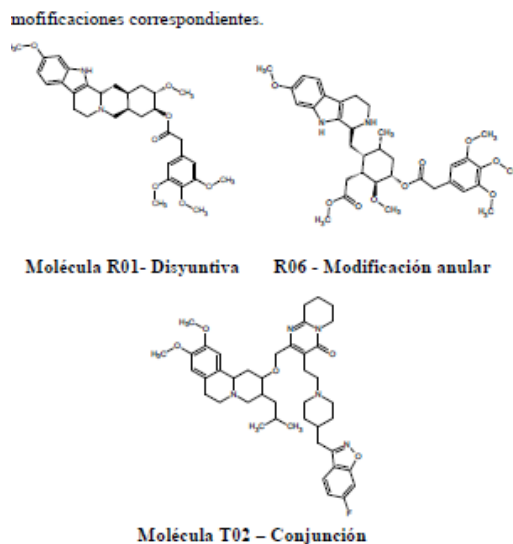


Figura 4. Interacción entre R00 y R06 con VMAT2, generada en Molegro Virtual Docker

La Figura 4, muestra la interacción de R00 y R06 con el sitio de unión en VMAT2. Se observa que tienen una interacción en común como es con la glutamina 3130. Sin embargo, R06 presenta interacciones adicionales como son glicina 4580, valina 3920, metionina 4540, isoleucina 4570, leucina 3120 y tirosina 4340, que explican su mayor afinidad a esta proteína.

A continuación se muestran las moléculas con las modificaciones correspondientes.



Los resultados obtenidos a través de los diferentes programas utilizados muestran que la molécula R01 tendría alta probabilidad de atravesar la barrera hematoencefálica, así como buena absorción intestinal, baja toxicidad y baja carcinogenicidad, en comparación de la molécula original. La molécula R06 es más afín que la reserpina a la proteína VMAT2 por los resultados del estudio de acoplamiento molecular, sin embargo, tiene menor probabilidad de atravesar la barrera hematoencefálica.

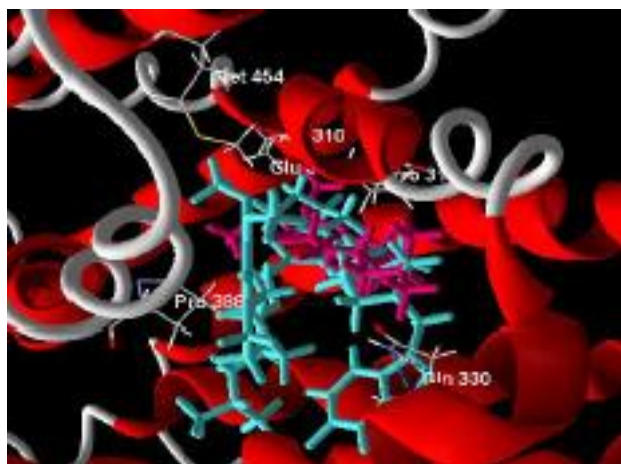


Figura 5. Interacción de T00 y T02 con VMAT2, generada en Molegro Virtual Docker

La modificación T02 tendría alta probabilidad para atravesar la barrera hematoencefálica, así como buena absorción oral, baja probabilidad de provocar arritmias (revelado por su baja probabilidad de unión al canal iónico *ether a-go-go*, resultado no mostrado) y baja toxicidad oral, lo que sugiere que serían más ventajosas que el fármaco original. El resto de las modificaciones realizadas presentaron alertas respecto a su potencial toxicidad y/o tuvieron menor afinidad a VMAT2 en comparación a la reserpina y la tetrabenazina.

La Figura 5, muestra la interacción de T00 y T02 con el sitio de unión en VMAT2. Se observa que tienen una interacción en común como es con la glicina 3300. Sin embargo, T02 presenta interacciones adicionales como son alanina 3100, metionina 4540, prolina 3880 y 3140, que explican su mayor afinidad a esta proteína.

IV. CONCLUSIONES

Durante este trabajo se lograron diseñar y evaluar por métodos *in silico* una base de datos de moléculas basadas en la estructura de la tetrabenazina y la reserpina. Se identificaron tres moléculas prometedoras (R01, R06, T02) las cuales presentan mejor afinidad por la proteína VMAT y con un perfil ADME/Tox aceptable, por lo que se considera son moléculas prometedoras para el desarrollo posterior de fármacos que ayuden en el tratamiento sintomático de la enfermedad de Huntington.

V. REFERENCIAS

[1] M. Miranda C. y L. Bustamante C., "DIAGNÓSTICO GENÉTICO PARA ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS. UN IMPORTANTE DESAFÍO PARA CHILE," *Rev. Médica Clínica Las Condes*, vol. 27, no. 3, pp. 332–337, 2016.

[2] J. Michel, R. Pupo, Y. Viviana, D. Rojas, Y. Rojas Rodríguez, Y. Rodríguez Batista, y E. N. Arias, "Actualización en enfermedad de Huntington."

[3] "Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía." [Online]. Available: <http://www.innn.salud.gob.mx/interior/atencionapacientes/padecimientos/huntington.html>. [Accessed: 27-Feb-2017].

[4] M. Peña, E. Pérez, and P. Picart, "Enfermedad de Huntington: aspectos genéticos," *Medwave*, vol. 4, no. 10, Nov. 2004.

[5] M. Alejandra Rosales-Reynoso Patricio Barros-Núñez y F. Salamanca-Gómez, "Diagnóstico molecular de la enfermedad de Huntington BIOLOGÍA MOLECULAR Y MEDICINA," vol. 144, no. 3, 2008.

[6] J. M. García Martínez, "Mecanismos intracelulares de supervivencia y muerte neuronal en modelos excitotóxicos y transgénicos de la enfermedad de Huntington.," 2007.

[7] J. F. Torres Peraza, "Estudio de los mecanismos implicados en la neurodegeneración estriatal en modelos murinos de la enfermedad de Huntington.," 2007.

[8] J. R. Blengio y J. Orizaga, *Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica*, 11th ed. Colombia, 2007.

[9] J. G. Tejas, J. M. Mancilla-Díaz, B. Florán, y R. E. Escartún, "Los Receptores Dopaminérgicos D2/D3 hipotalámicos participan en la regulación del comportamiento alimentario," *Rev. Mex. Análisis la Conduct.*, vol. 36, no. 2, Jul. 2010.

[10] D. Paleacu, "Tetrabenazine in the treatment of Huntington's disease.," *Neuropsychiatr. Dis. Treat.*, vol. 3, no. 5, pp. 545–51, 2007.

[11] M. Martín-Carrasco, "Tetrabenazina en los trastornos del movimiento," *PSICOGERIATRÍA*, vol. 2, no. 1, pp. 3–14, 2010.

[12] P. Arroyane y M. Riveros, "Enfermedad de Huntington," *Univ. Médica, Pontif. Univ. Javeriana Colomb.*, vol. 47, no. 2, pp. 121–130, 2006.

[13] J. Jankovic and K. Clarence-Smith, "Tetrabenazine for the treatment of chorea and other hyperkinetic movement disorders," *Expert Rev. Neurother.*, vol. 11, no. 11, pp. 1509–1523, Nov. 2011.

[14] D. R. P. Guay, "Tetrabenazine, a monoamine-depleting drug used in the treatment of hyperkinetic movement disorders," *Am. J. Geriatr. Pharmacother.*, vol. 8, no. 4, pp. 331–373, Aug. 2010.

[15] L. H. Poon, G. A. Kang, and A. J. Lee, "Role of Tetrabenazine for Huntington's Disease-Associated Chorea," *Ann. Pharmacother.*, vol. 44, no. 6, pp. 1080–1089, Jun. 2010.

[16] Y. S. Kim, J. H. Shin, F. S. Hall, and D. J. Linden, "Dopamine Signaling Is Required for Depolarization-Induced Slow Current in Cerebellar Purkinje Cells," *J. Neurosci.*, vol. 29, no. 26, pp. 8530–8538, Jul. 2009.

[17] P. Mandela, M. Chandley, Y.-Y. Xu, M.-Y. Zhu, and G. A. Ordway, "Reserpine-induced reduction in norepinephrine transporter function requires catecholamine storage vesicles," *Neurochem. Int.*, vol. 56, no. 6–7, pp. 760–767, May 2010.

[18] U.S. Department of Health and Human Services, "NCI Thesaurus."

[19] K. Wimalasena, "Vesicular monoamine transporters: Structure-function, pharmacology, and medicinal chemistry," *Med. Res. Rev.*, vol. 31, no. 4, pp. 483–519, Jul. 2011.