

# Diseño de inhibidores de la C-14 alfadesmetilasa (CYP51) basado en métodos quimioinformáticos y acoplamiento molecular para el tratamiento de la Coccidioidomicosis

MACIAS-GUTIÉRREZ CAROLINA ITZEL, RAMÍREZ-PALOMARES JOSÉ LUIS, LOZA-MEJÍA MARCO ANTONIO

**Resumen—** La Coccidioidomicosis en una infección de transmisión vía inhalatoria cuya área endémica se encuentra en América del Norte. Solamente en México, de 1988-1994, su tasa de incidencia promedio nacional fue de 0.8 por cada 100,000 habitantes. Debido a que su tratamiento es prolongado y de baja potencia, se buscó el diseño vía computacional de moléculas que con mayor potencia. Durante el estudio se identificó una molécula que además un potencial inhibidor de la CYP51, mostró alta afinidad teórica hacia la quitinasa, lo que la ubica como un compuesto candidato para el desarrollo de antifúngicos duales con acción sobre ambas enzimas.

## I. INTRODUCCIÓN

La coccidioidomicosis es una infección fúngica exclusiva del continente americano, descrita por primera vez en un soldado argentino en 1892, reportándose el caso como micosis fungoidea, cuya área endémica más importante abarca el sudoeste de los EEUU. y el norte de México, así como los valles centrales de América Central, en Venezuela, en Colombia, en el nordeste de Brasil, en el noroeste de Paraguay y en la República Argentina. Estas áreas se caracterizan por suelos de pH alcalino, ricos en sales y pobres en nutrientes, así mismo, de tener un invierno corto y lluvioso, el verano prolongado, muy cálido y seco, una vegetación espinosa y vientos frecuentes e intensos. [1]

Tanto *C. immitis* y *C. posadasii*, son genéticamente similares y fenotípicamente idénticas: una pared celular gruesa, refringente y de doble contorno, tiene clamidoartroconidios que se inhalan de 3-5  $\mu\text{m}$  y se transforman dentro del pulmón en una estructura denominada esférula (fase parásita) que alcanza un diámetro de 70 o más micras, donde se observan con un citoplasma heterogéneo, granular y con inclusiones de lípidos. Conforme crece la esférula, se generan hifas septadas y conforman una endoespora; posteriormente, se rompe la esférula, liberando las endoesporas en los tejidos circundantes, provocando

Carolina Macias y José Luis Ramírez pertenecen al sexto semestre de la licenciatura Químico Farmacéutico Biólogo de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad La Salle, realizando éste proyecto durante el curso de Farmacología Molecular, impartido por el Dr. Marco Antonio Loza Mejía, asesor del mismo proyecto. (e-mail:caromac96@gmail.com)

nuevas formaciones de esférulas. Los cultivos óptimos para su crecimiento son agar-glucosado de Sabouraud, lactrimel, agar infusión de cerebro-corazón, incubados a 28°C y 37°C, produciéndose Coccidioides en colonias de micelio aéreo algodonoso, blanquecinas o color pardo claro. Debido a que los artroconidios son muy infectantes en fase micelial, su manejo sólo es permitido en cámaras con flujo laminar.[2]

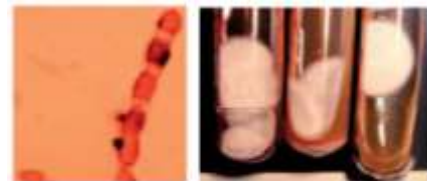


Figura 1. Del lado izquierdo, la clamisoartroconidios de *C. Posadasii*. Del lado derecho, colonial de *C. Posadasii* en agar Sabouraud [1]

La infección, al ser por vía inhalatoria, penetran hasta el alvéolo pulmonar, donde generan un tipo de linfocitos T sensibilizados para destruir los Coccidioides, también macrófagos capaces de fagocitar únicamente la fase tisular de los Coccidioides; éstas acciones dan como respuesta una inflamación. Ésta infección desarrolla una neumonitis que posteriormente invade los ganglios linfáticos y llega hasta el torrente sanguíneo, produciendo fungemia; todo esto asintomático, siendo el 60% de los sujetos que se infectan y 5% con secuelas. [1, 3]

El sistema inmunológico activa las citoquinas de tipo Th1 con el fin de parar la micosis, dejando granulomas, epitelioides, fibrosis y calcificaciones con pocas esferas de Coccidioides. En casos graves, la inmunidad adaptativa mediada por células falla, porque responde a citoquinas Th2, estimulando linfocitos B, formando granulomas laxos que consecutivamente reactivará la infección. [1]

## Coccidioidomicosis en México [3]

Las publicaciones sobre estudios epidemiológicos en México cubren el periodo de 1944 a 2005, en las que de mayor relevancia son las investigaciones de González Ochoa, como en la Encuesta Nacional (Figura 2), donde Baja California, Sonora y Chihuahua tenían las tasas más elevadas

de inmunorreacción en pruebas cutáneas con coccidioidina. Ésta, hasta el momento, es la referencia más importante sobre la distribución espacial de las principales áreas endémicas en México. La situación actual en México se desconoce ya que no se tiene información desde 1995 debido a que fue excluida del informe para el registro nacional. Sin embargo, se presume que ésta es similar a la de E.E.U.U., por el contraste realizado en el 2005 con la información desde 1988. (Figura 3)

De acuerdo a la Secretaría de Salud, la tasa de incidencia de la coccidioidomicosis en México entre 1988 y 1994 fue de 0,5 a 1,3 por 100.000 habitantes, con una media nacional de 0,8 por 100.000 habitantes (Figura 4), y con las tasas de incidencia más elevadas para los estados de Nuevo León (2,6 por 100.000 habitantes), Tamaulipas (2,1 por 100.000 habitantes) y Chihuahua (1,8 por 100.000 habitantes). Durante los años 1990 a 1994, los grupos de edad más afectados fueron los niños menores de cinco años y los adultos mayores de 45 años, duplicándose la tasa de incidencia tan solo en cuatro años y siguiendo un patrón muy similar al registrado en el sur de California.

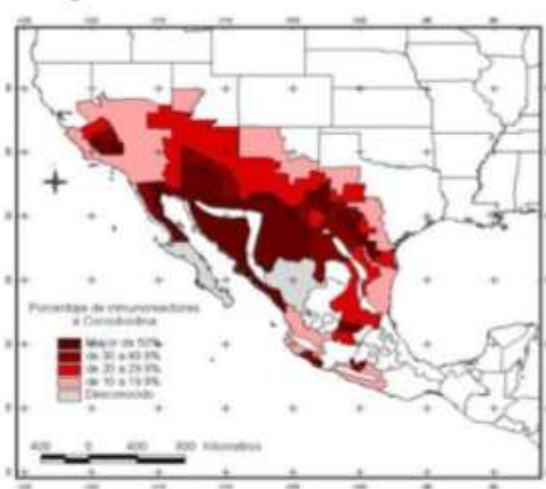


Figura 2. Áreas endémicas principales de Coccidioidomicosis en América del Norte [14]

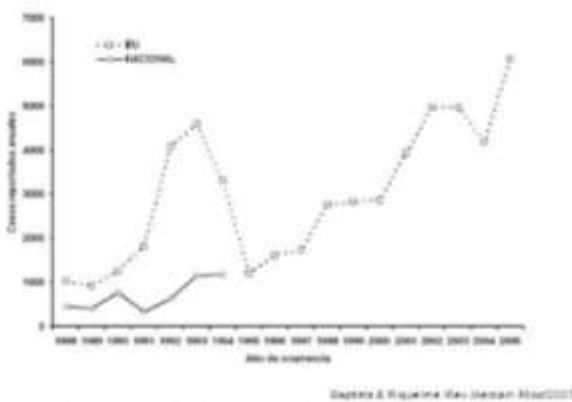


Figura 3. Comparación de casos de Coccidioidomicosis en Estados Unidos de América y México [14]

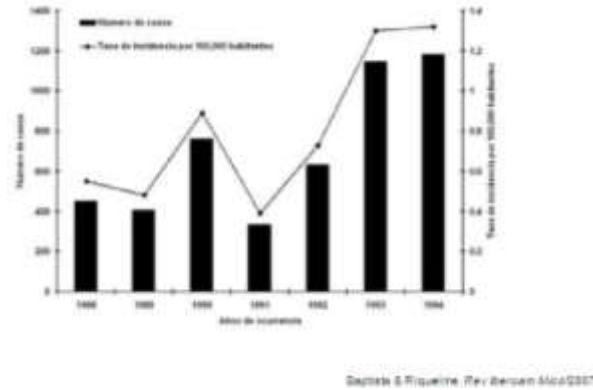


Figura 4. Tasa de incidencia de Coccidioidomicosis en México 1988-1994 [14]

Clasificación clínica [1]

- Primoinfección pulmonar asintomática o subclínica. La más frecuente en 60% de los infectados.
- Primoinfección sintomática. Secuelas de la primoinfección pulmonar. Cuadros respiratorios variables similares a una gripe o neumonía. Tiene una erupción maculosa cutánea, involuiona y se generan alteraciones clínicas con hipersensibilidad en pacientes de tés blanca presentándose en forma de eritemas nudosos en los miembros inferiores, polimorfo en la mitad superior del cuerpo y poliartropatía inflamatoria no supurativa.
- Neumopatía persistente. Perdura más de 6 meses y ataca a personas con antecedentes de alcoholismo, tabaquismo o VIH. Tanto la fiebre como la eritrosedimentación son indicativos de la progresión lesional y la diseminación, conduciendo a una insuficiencia respiratoria aguda.
- Coccidioidomicosis pulmonar crónica excavada. Aparece sólo en pacientes hombres de 40 años en adelante, presentando un cuadro similar a la tuberculosis avanzada llegando hasta la muerte.
- Coccidioidomicosis diseminada subaguda o crónica. Presentan un cuadro grave fiebre prolongada, pérdida de peso, anemia, adenomegalias en diversos territorios, imágenes pulmonares reticulonodulillares, cefalea, hipersomnia y manifestaciones de cuadro meningoencefálico solapado. El cuadro meníngeo es más fuerte: alteraciones de la conciencia, convulsiones, rigidez de nuca y parálisis cerebral. Las mucosas suelen estar indemnes, en tanto que la piel puede mostrar distintos tipos de lesiones: pápulas pequeñas, ulceración, tubérculos y nódulos. Las formas diseminadas crónicas se asocian con mayor frecuencia con compromiso cutáneo, ganglionar, óseo y del sistema nervioso central.

Tratamiento

La coccidioidomicosis incluye un espectro de presentaciones que van desde la primoinfección no

complicada, que es autolimitada y se resuelve sin tratamiento en la mayoría de los casos, sin embargo, las formas diseminadas agudas casi siempre son fatales. Por esta razón las estrategias de tratamiento varían considerablemente de un paciente a otro.<sup>2</sup>

Los antimicóticos más utilizados para contrarrestar esta enfermedad son derivados triazólicos y imidazólicos como el fluconazol (400-800 mg/día por vía oral o intravenosa), voriconazol (derivado sintético del fluconazol) y el itraconazol (400 mg/día por vía oral) (Figura 5). [2,5]



Figura 5. Estructura del Fluconazol

Los azoles actúan sobre la membrana celular del hongo, inhibiendo al citocromo P450 CYP3A4 de la célula fúngica, a través de la inactivación de la enzima C-14- $\alpha$ -desmetilasa, con lo cual se interrumpe la síntesis del ergosterol en la membrana celular. Debido a la falta de ergosterol se comienzan a acumular esteroides tóxicos intermedios, aumenta la permeabilidad de la membrana y se interrumpe el crecimiento del hongo. Las interacciones en su sitio activo son sobre la enzima a través de puente de hidrógeno entre el grupo C=O de la enzima y el grupo OH del fármaco, interacción que tiene una fuerza de unas 5 kcal/mol. [4,5]

La C-14-  $\alpha$ -desmetilasa o CYP51, es una enzima que forma parte del grupo de proteínas del citocromo P450 que metabolizan sustancias orgánicas y biosintetizan esteroides importantes, lípidos y vitaminas en eucariotes. Esta enzima se encuentra conformada por 6 regiones que incluyen la hélice B', loop B' / C, hélice C, hélice I, loop K /  $\beta$ 1-4 y hebra  $\beta$  1 que son responsables de formar la superficie de la cavidad de unión al sustrato, sin embargo, esta superficie migra al sitio activo a través del canal formado por el alfa hélice A' y loop  $\beta$ 4; el sitio activo contiene un grupo hemo cuyo núcleo ferroso se ata a un ligando tiolato de un residuo de cisteína conservado (Figura 6). [6,7]

Particularmente, CYP51 ayuda a la conversión de lanosterol en 4,4-dimetilcolesta-8(9), 14, 24-trien-3 $\beta$ -ol, al remover el grupo metilo del carbono 14  $\alpha$ , siendo éste compuesto un precursor del ergosterol, un importante constituyente de la membrana fúngica. Esta conversión se logra en 3 pasos con la ayuda de un reductor como NADPH y oxígeno molecular, obteniendo como intermediarios un carboxialcohol y un carboxialdehído, concretando el mecanismo en la desmetilación (Figura 7). [6,7]

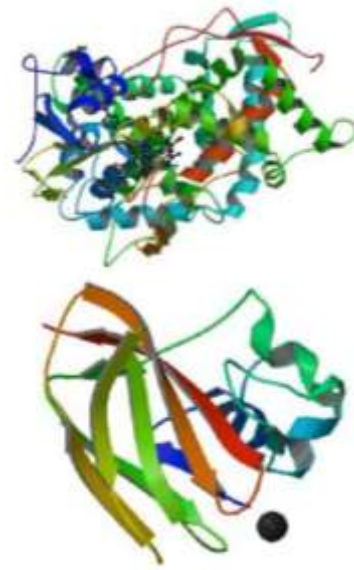


Figura 6. Enzima CYP51 (superior) y enzima quitinasa (inferior) [Protein Data Bank]

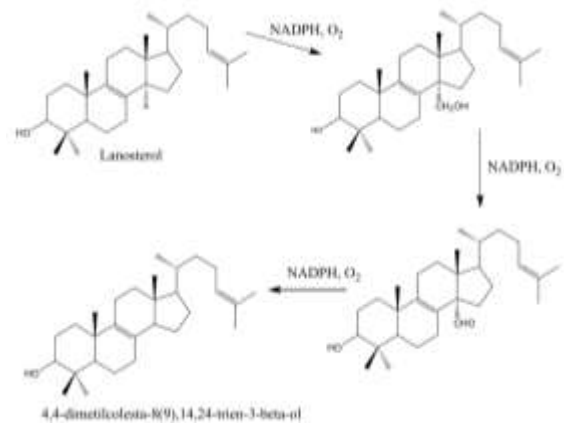


Figura 7. Conversión del lanosterol en 4,4-dimetilcolesta-8(9), 14, 24-trien-3 $\beta$ -ol, intermediario en la síntesis del ergosterol

El objetivo de este trabajo consiste en el diseño de una molécula derivado de azoles debido a su hidrosolubilidad y sencilla difusión a través de las meninges, como el fluconazol; además, estudios demuestran que se utiliza como un buen profiláctico, por su amplio espectro de acción y derivar pocas reacciones secundarias, incluyendo efectos endocrinos. [4,5] Sin embargo, la generación de resistencia y la falta de apego al tratamiento prolongado por parte de algunos pacientes, hace necesario el desarrollo de moléculas más potentes para el tratamiento de la coccidiomicosis.

## II. METODOLOGÍA

Se realizó una búsqueda de las enzimas que permiten la proliferación de los microorganismos de la Coccidioidomicosis, así como los tratamientos actuales que se utilizan para eliminarlo del huésped, encontrándose que el fluconazol es el fármaco de primera elección para el tratamiento de la misma.

A partir de la estructura del fluconazol, se diseñó una base de datos empleando estrategias de modificación estructural típicas en la química farmacéutica. Estas moléculas fueron construidas a través de Chem Sketch generándose el código SMILES de cada una y guardando sus coordenadas en formato \*.mol

Para la evaluación quimioinformática se emplearon los siguientes programas:

- Molinspiration: Predice la potencial actividad biológica y el cumplimiento de la regla de Lipinski.[10]
- Pass Online: Predice la potencial bioactividad que tiene la molécula. [11]
- Swiss Target: Predice la potencial actividad biológica[12]
- AdmetSAR: Predice toxicidad, carácter cancerígeno y permeabilidad de la barrera hematoencefálica. [13]

Para los estudios de acoplamiento molecular (docking) se empleó el programa Molegro ver. 6.0.1-La estructura tridimensional de la proteína se descargó del Protein Data Bank (código PDB: 1EA1). Durante la evaluación quimioinformática, se identificó que algunas moléculas podrían ser ligandos de la quitinasa, razón por la cual se realizaron también estudios de acoplamiento molecular con esta enzima (código PDB: 2A3B). El protocolo que se empleó fue el sugerido por el fabricante, el cual se describe brevemente: se identificaron las cavidades candidatas a ser un sitio de unión de ligandos, seleccionándose aquella que coincidiera con el sitio catalítico de la enzima. Se empleó el algoritmo de búsqueda de Moldock optimizer el cual es un algoritmo genético implementado para encontrar el mejor modo de unión de las moléculas analizadas con el sitio de búsqueda. Como método de puntaje (score) se seleccionó Rerank score, el cual hace una mejor valoración de las interacciones químicas en comparación con otros métodos de puntaje implementados dentro del programa. Un valor de Rerank score más negativo se relaciona con una mejor interacción ligando-receptor.

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Cuadro I se muestran los principales resultados obtenidos con las moléculas 1, 8 y 9, las cuales presentaron valores de score menores que el fluconazol (Figura 8).

CUADRO I  
PRINCIPALES RESULTADOS OBTENIDOS

Compuesto	CL	PC	Score CYP51	Score quitinasa
Fluconazol	Si	Riesgo	-97.89	-87.11
8	Si	Sin riesgo aparente	-107.72	-85.71
9	No	Sin riesgo aparente	-128.85	-88.84

CL: Cumplimiento de las reglas de Lipinski  
PC: Potencial carcinogénico

- Deben cumplir las reglas de Lipinski, cuyo logP debe tener un valor menor a 5, no más de 5 donadores de enlaces por puentes de hidrógeno, no más de 10 aceptores de enlaces de puentes de hidrógeno y un peso molecular no mayor a 500 uma. Sin embargo, solo la molécula 9 no cumplía con éstas reglas.
- Otra importante observación en los resultados de predicción según admetSAR es que el fluconazol tiene riesgo de carcinogénesis, sin embargo, ambas moléculas diseñadas por la estrategia de conjuntiva adquirieron una predicción fuera de riesgo de carcinogénesis.
- Finalmente, al realizar el estudio de acoplamiento molecular con Molegro de cada molécula en relación con la proteína deseada, se logró el mejor score de la molécula 9 siendo un valor de -128.85 en relación con CYP51 y -88.84 con la quitinasa, que en comparación con la molécula base, aumentó significativamente en conjunto la potencia.

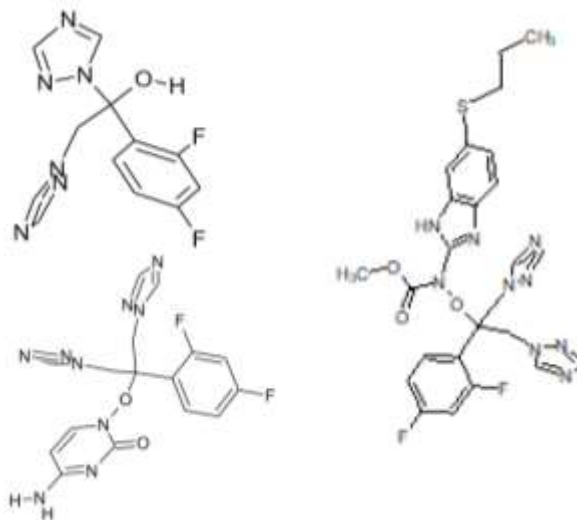


Figura 8. Estructuras del Fluconazol (base) y molécula 8 (de arriba abajo del lado izquierdo), y molécula 9 (lado derecho)

Por éstas razones, aunque no cumpliera con las reglas de Lipinski, resultó que la molécula 9 se postuló como la mejor estructura por su alta afinidad con ambas enzimas. La CYP51 o C-14-alfa-desmetilasa permite la conversión de lanosterol en un compuesto precursor del

ergosterol, compuesto de la membrana fúngica, por lo que inhibirlo no permite la proliferación de la micosis. Por otro lado, la quitinasa promueve la ruptura de enlaces glicosídicos de la quitina, molécula constituyente de la pared celular de hongos y exoesqueletos de algunos animales, en particular en los hongos ayuda al modelaje de su pared celular y hay inhibidores de la misma que están en desarrollo. [9] Sin embargo, no hay en la clínica inhibidores duales de CYP51 y quitinasa, lo cual permite posicionar a la molécula 9 como un potencial candidato a estudios de desarrollo de nuevos antifúngicos.

Las ilustraciones 9 y 10 muestran los complejos del fluconazol y la molécula 10 con los sitios activos de CYP51 y la quitinasa, respectivamente. Del análisis de estos complejos se desprende que la molécula 10 es capaz de interactuar en los mismos sitios que el fluconazol en ambas enzimas, sin embargo, lo hace con diferentes aminoácidos lo cual es importante a considerar, ya que se han identificado mutaciones en CYP51 que reducen la afinidad del fluconazol con el sitio activo de esta enzima.

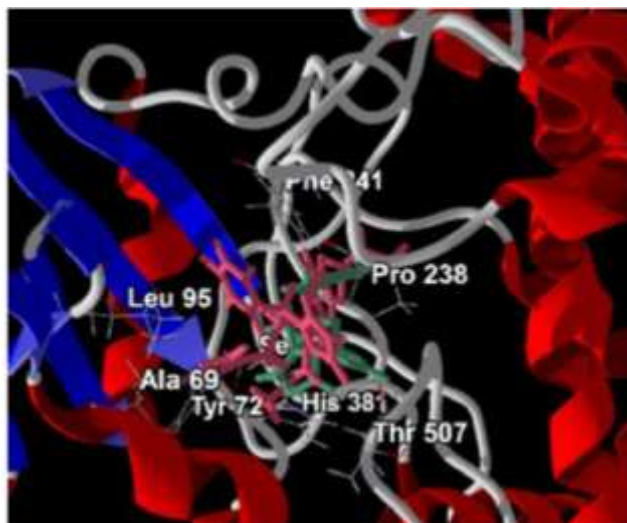


Figura 9. Interacciones de la molécula 9 (Rosa) y el fluconazol (verde) para inactivación de CYP51

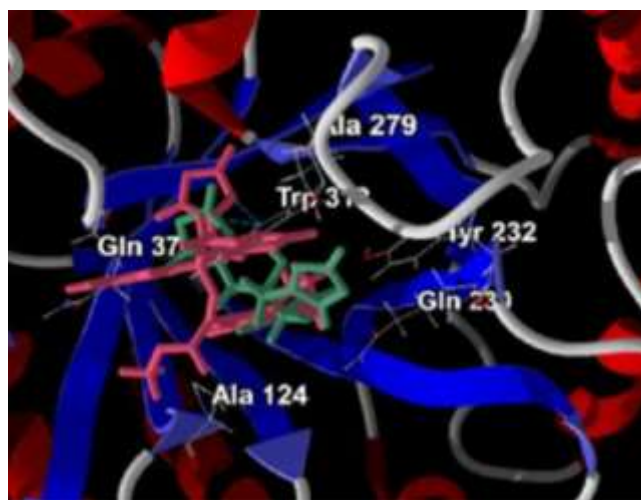


Figura 10. Interacciones de la molécula 9 (Rosa) y el fluconazol (verde) con las quitinasa

#### IV. CONCLUSIONES

Se identificó la molécula 9 como un potencial antifúngico ya que presentó mayor afinidad hacia las enzimas CYP51 y quitinasa y con un mejor perfil ADME-TOX en comparación con el fluconazol, por lo que se considera una estructura para iniciar un programa de desarrollo de antifúngicos duales.

#### REFERENCIAS

- [1] Negroni, R., Arechavala, A., & Maiolo, E. (2010). Coccidioidomicosis. *Medicina Cutánea Ibero-Latino-Americana*, 38(5), 179-188.
- [2] Laniado-Laborín, R. (2006). Coccidioidomicosis: Más que una enfermedad regional. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 19(4), 301-308.
- [3] Rosas, R. C. B., & Riquelme, M. (2007). Epidemiología de la coccidioidomicosis en México. *Revista iberoamericana de micología*, 24(2), 100-105.
- [4] Fernández, C. A. M., Uría, J. C., Arenas, R. D. C., Perurera, J. M., & Iribar, W. T. (1998). Tratamiento de las micosis profundas. Estado actual. *Acta Medica*, 8(1), 80-5.
- [5] Gregori Valdés, B. S. (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos. *Revista Cubana de Farmacia*, 39(2), 1-1.
- [6] Lepesheva, Galina I., and Michael R. Waterman. "Sterol 14 $\alpha$ Demethylase Cytochrome P450 (CYP51), a P450 in All Biological Kingdoms." *Biochim Biophys Acta*. 2008. 1770(3): 467-77.
- [7] Hargrove TY, Wawrzak Z, Liu JL, Nes WD, Waterman MR, Lepesheva GI. "Substrate Preferences and Catalytic Parameters Determined by Structural Characteristics of Sterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) from *Leishmania infantum*." *J Biol Chem*. 2011, 286:26838–26848.
- [8] Chen, Z., Li, H., Dong, W., Miao, M., & Ren, H. (2016). I2-Catalyzed Oxidative Coupling Reactions of Hydrazones and Amines and the Application in the Synthesis of 1, 3, 5-Trisubstituted 1, 2, 4-Triazoles. *Organic letters*, 18(6), 1334-1337.
- [9] Schüttelkopf, A. W., Gros, L., Blair, D. E., Frearson, J. A., van Aalten, D. M. F., & Gilbert, I. H. (2010). Acetazolamide-based fungal chitinase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18(23), 8334–8340.
- [10] Molinspiration.com "Calculation of molecular properties and bioactivity score" URL: <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>
- [11] Pharmaexpert.ru URL: <http://www.pharmaexpert.ru/passonline/predict.php>
- [12] Swisstargetprediction.ch URL: <http://swisstargetprediction.ch/>
- [13] admetSAR @ LMMD URL: <http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar1/>
- [14] Baptista & Riquelme en la Revista Iberoamericana 2007