

Diseño y estudio in silico de posibles ligandos de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ como tratamiento para la isquemia cerebral

JESSICA MEZA RESILLAS, XIOMARA C. DÍAZ HERNÁNDEZ, MÓNICA L. RAMÍREZ CARRANZA, CLAUDIA MORALES HADAS, MARCO A. LOZA-MEJÍA

Resumen— La isquemia cerebral es una enfermedad vascular cerebral originada por la obstrucción de flujo sanguíneo, así como de sustratos en el cerebro, debido a las condiciones de este padecimiento las funciones motoras y cognitivas se ven deterioradas. La principal causa de la isquemia cerebral es la formación de trombos debido a irregularidades en la agregación plaquetaria, por esta razón el diseño de ligandos que actúen en la inhibición de este proceso es una opción viable para plantear un posible tratamiento. Uno de los fármacos usados para este fin es el tirofiban, un antagonista de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, que tiene como limitante un tiempo de vida media bajo en el organismo, lo que obliga a la administración frecuente del fármaco. A partir de diversas estrategias para la modificación estructural de fármacos se diseñaron varias moléculas basadas en la estructura del tirofiban como potenciales ligandos de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. Los resultados de la evaluación *in silico* muestran que varias de las moléculas que se diseñaron presentarían mayor afinidad hacia la diana biológica y tendrían un tiempo de vida media mayor que el tirofiban, por lo que se constituyen como potenciales puntos de partida para el diseño de nuevos fármacos para el manejo de uno de los riesgos asociados a la isquemia cerebral.

En este trabajo nos centraremos en la isquemia cerebral, la cual es una enfermedad cerebrovascular de tipo obstructiva que afecta la función normal y estructura del cerebro ocasionando diversas alteraciones en el organismo como por ejemplo déficit motor, sensitivo y trastornos del lenguaje. Cabe mencionar que la sintomatología de la enfermedad puede variar según la localización del trombo, pues puede estar en el territorio vertebrobasilar o carotídeo.

Cuando el trombo está localizado en la zona vertebrobasilar las manifestaciones clínicas presentadas pueden ser hemianopsia homónima, ceguera total transitoria, ataxia, diplopía, vértigo, disfagia, disartria, por mencionar algunas, cuando el trombo se encuentra localizado en el territorio carotídeo se presentan síntomas como hormigueo en un lado del cuerpo, pérdida del equilibrio, coordinación, visión entre otros.[7]

Esta ECV es de gran importancia médica pues de no tratarse además de toda la sintomatología anteriormente descrita puede causar incluso la muerte.

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cerebrovasculares (ECV) como su nombre lo indica son aquellas enfermedades que abarcan ciertas alteraciones en la vasculatura del cerebro, lo que ocasiona una disminución del flujo sanguíneo en el mismo y por consecuencia el deterioro de funciones motoras y cognitivas. Estas pueden clasificarse en 2 tipos, obstructivas o hemorrágicas. En la ECV de tipo obstructiva una arteria del cerebro se estenosa o bloquea por la presencia de un trombo causando así un déficit en el suministro de sangre, oxígeno y diversos sustratos.

La isquemia cerebral tiene tres causas principales: trombosis, embolia y arteriosclerosis. La trombosis hace referencia a la formación de un tapón en la arteria que bloquea el suministro sanguíneo, este tapón se forma por la adherencia de las plaquetas en los bordes de la misma. Cuando se refiere a embolia como agente causal de la isquemia cerebral se habla de la formación de un trombo en otra locación del organismo distinta al cerebro, el cual tiene un diámetro menor respecto al de un vaso sanguíneo, lo que facilita su distribución a distintas zonas del cuerpo, en el caso de la isquemia cerebral, este trombo se puede viajar a la vasculatura cerebral. Por último, la arteriosclerosis provoca que las paredes de las arterias se endurezcan y los conductos se estrechan pudiendo ocasionar el cierre completo de los vasos sanguíneos.[6]

La formación de trombos debido a una falla en el proceso de agregación plaquetaria es uno de los principales factores relacionados con la isquemia cerebral, por lo cual evitar la formación de estos es un mecanismo altamente estudiado en el diseño de fármacos, así como también es importante recalcar que el mecanismo de los fármacos empleados para tratar esta enfermedad sigue en área de investigación pues la mayoría de estos tiene el riesgo de provocar una ECV de tipo hemorrágica.

J. MEZA, X. HERNÁNDEZ, C. MORALES, M. RAMÍREZ pertenece a la carrera QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO DE LA UNIVERSIDAD LA SALLE y realizaron el proyecto dentro del curso(s) Farmacología Molecular (Email: jessica.meza@lasallistas.org.mx). EL PROYECTO FUE asesorado por MARCO ANTONIO LOZA MEJÍA

Con base a lo anterior, se concluye que la formación de trombos debido a la agregación plaquetaria es uno de los principales factores relacionados de la enfermedad, por lo cual evitar la formación de estos es un mecanismo altamente estudiado en el diseño de fármacos.

La formación de trombos ocurre por medio de mecanismos de hemostasia, los cuales son activados en los procesos hemorrágicos del organismo para evitar la pérdida de sangre, normalmente cuando ocurre una lesión.[7] En estos mecanismos el factor principal son las plaquetas y ocurren una serie de pasos que conllevan a su adhesión, activación y agregación.[1] La adhesión de las plaquetas se produce cuando hay un daño en el endotelio, estas se adhieren a la superficie dañada por medio de ligando que se presentan cuando hay una lesión, como el colágeno, la trombina, el factor de Von Willebrand. Otros compuestos como el difosfato de adenosina, tromboxano A₂, serotonina, noradrenalina, adrenalina, colágeno y trombina se encargan de activar las plaquetas para que ocurra la degranulación de sus componentes y con ello un cambio conformacional, lo que expone a la integrina α IIb β 3, para unirse con el fibrinógeno, generando así un trombo que finalmente se estabiliza con la trombina convirtiendo el fibrinógeno en fibrina, este último paso da como resultado el final de la agregación plaquetaria.[3] Por ello, la integrina α IIb β 3 se ha convertido en objeto de estudio para el diseño de fármacos antiplaquetarios.

La integrina α IIb β 3, también llamada glicoproteína IIb/IIIa, es una de las más abundantes en la membrana de las plaquetas. Su estructura se basa en un heterodímero, compuesto por dos subunidades, α y β , las cuales tienen un largo dominio extracelular y un solo dominio transmembrana. La subunidad α consta de una cadena pesada y una cadena ligera unidas por un puente disulfuro, mientras que la subunidad β consta de solo una cadena pesada.[2] La formación del heterodímero ocurre por medio de la unión del dominio propulsor β de la subunidad α y por el dominio β I de la subunidad β , los cuales forman la cabeza de la proteína, parte fundamental de unión al ligando. Cabe mencionar que el dominio β I tiene tres sitios de unión a iones metálicos como Mg⁺² (MIDAS) y Ca⁺² (ADMIDAS), los cuales son importantes reguladores en la unión receptor-ligando, por este motivo se considera que la integrina α IIb β 3 es dependiente de Ca⁺². Se ha estudiado que este heterodímero es el principal sitio de unión del fibrinógeno y por ende parte crucial de la agregación plaquetaria.

La integrina α IIb β 3 se une específicamente en la terminación del carboxilo de la molécula dimerica del fibrinógeno de la subunidad γ (péptido γ C). El elemento biológicamente importante que contiene el fibrinógeno para ser reconocido por parte de la integrina α IIb β 3 es el pentapéptido QAGDV (Glutamina-Alanina-Glicina-Ácido aspártico-Valina; péptido γ C). El péptido γ C se une en la interface entre el propulsor beta de la subunidad α y el dominio β I de la subunidad β , en esta última subunidad también se da la presencia de MIDAS y

ADMIDAS (unión de los iones metálicos reguladores Mg⁺² y Ca⁺²).

Es importante resaltar el papel de MIDAS y ADMIDAS en la unión ligando-receptor. Gracias a la coordinación en la que estos iones metálicos participan se pueden estabilizar algunas interacciones, favoreciéndolas y generando una mayor afinidad del ligando, por lo que este proceso en el mecanismo de unión también se puede tomar en cuenta para el diseño de fármacos. El principal aminoácido con los que se coordina ADMIDAS es Val-411 en la subunidad β 3, por medio de los carboxilos libres.[2]

Se ha visto en estudios que la falta del pentapéptido QAGDV en el fibrinógeno causa desórdenes hemorrágicos en ratones, por lo cual el diseño de nuevos antitrombóticos específicos de la integrina α IIb β 3, que sigan su ruta de unión pueden ser eficaces contra el tratamiento de la isquemia cerebral. [2]

Un ejemplo de lo anterior es el tirofiban, fármaco antagonista de la integrina α IIb β 3, el cual funge como inhibidor de la agregación plaquetaria. Tiene una vida media de 2 horas, por lo cual se requiere de su administración constante. Su vía de administración es intravenosa y la dosis recomendada es de 0,4 mg/Kg/min en 30 min. Este fármaco inhibe la agregación plaquetaria en un 90% y este proceso regresa a su estado anterior después de 4 u 8 horas luego de su administración. [1]

La Figura 1 muestra la estructura de este fármaco.

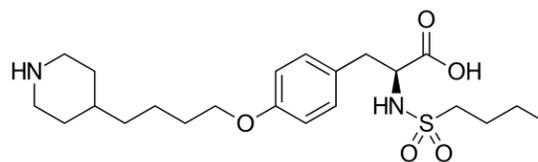
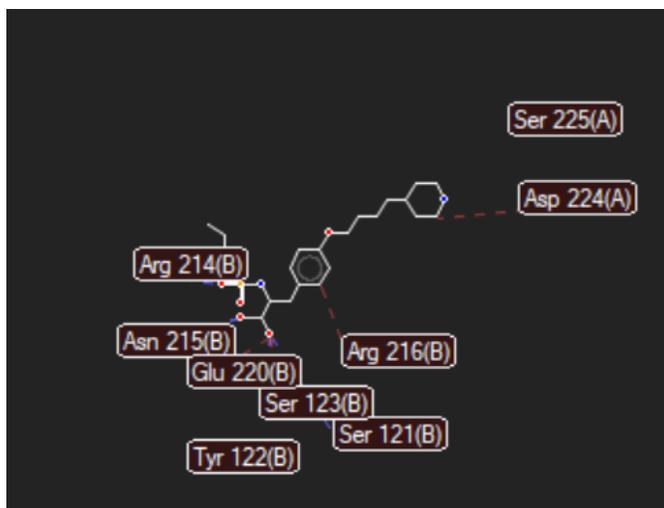


Figura 1. Estructura de la molécula tirofiban, dibujada con ChemDraw Professional 15.0. El tirofiban interactúa con la mayoría de los aminoácidos implicados en el proceso de agregación plaquetaria. En la Figura 2 se ilustran los aminoácidos principales de la integrina α IIb β 3 con los que interactúa, siendo estos Ser225, Arg214,



Asn215, Glu220, Ser123, Arg216, Ser121, Tyr122 y Asp224.

Figura 2. Interacciones de la molécula tirofiban con los aminoácidos de la integrina α IIb β 3. Imagen obtenida de Molegro Virtual Docker versión 6.0.1

A pesar de su efectividad terapéutica, una de las limitantes del tirofiban es su bajo tiempo de vida media, que obliga a la administración frecuente del fármaco. Por ello, en este proyecto pretendemos diseñar nuevas estructuras con potencial antiplaquetario que tengan una afinidad similar o mayor que la del tirofiban, pudiendo permanecer en la diana biológica afectada un mayor tiempo, y que dependiendo de su sitio de acción puedan tener distintos mecanismos de acción, disminuyendo la capacidad hemorrágica de los mismos.

Estas propuestas se evaluarán por métodos *in silico*, incluyendo análisis quimioinformático y estudios de acoplamiento molecular (*docking*).

II. METODOLOGÍA.

Se seleccionó el Tirofiban como la estructura base para posteriormente realizar las modificaciones pertinentes. Estas consistieron de estrategias de modificación racional de fármacos, de las cuales se utilizaron la conjuntiva, duplicativa, disyuntiva, análoga, modificación anular, isosterismo clásico, entre otras. Las estructuras que surgieron de las modificaciones antes mencionadas se construyeron en el software ChemDraw Professional 15.0 y se optimizó su estructura por mecánica molecular a través de Chem3D. La estructura tridimensional de la integrina α IIb β 3, a su antagonista tirofiban se descargó del ProteinDataBank

(<https://www.rcsb.org>)(código PDB: 2VDM), con resolución de 2.9 Å.

El análisis quimioinformático se realizó utilizando las plataformas Molinspiration Cheminformatics (<http://www.molinspiration.com/>) fue utilizado para el cálculo predictivo de las propiedades fisicoquímicas de los ligandos diseñados, como logP, peso molecular, donadores y aceptores de electrones y la plataforma admetSAR (<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar1/predict/>) con la cual se calcularon las propiedades farmacológicas predictivas basadas en la relación estructura-actividad del perfil ADMET (Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad).

Para los estudios de acoplamiento molecular se empleó el programa Molegro Virtual Docker Version 6.0.1 utilizando el protocolo convencional descrito por el fabricante. Se obtuvieron valores de puntaje (*Moldock score*) que se relacionan con la afinidad teórica de los ligandos evaluados con el receptor. A menor valor de score, mayor afinidad teórica.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

A partir de la base de datos original, se identificaron en total 37 ligandos con mayor afinidad que el antagonista de referencia tirofiban, según los datos obtenidos con Molegro Virtual Docker a partir de los valores de score calculados. Las estructuras de los 5 ligandos con mayor afinidad teórica (*top-5*), se muestran en la Figura 3. Las propiedades farmacológicas predictivas obtenidas y la energía de interacción de los ligandos con la integrina α IIb β 3, se muestran en la Tabla 1. La toxicidad es relacionada con el gen de inhibición Human Ether-a-go-go, donde WI significa inhibidor débil.

Tabla 1. Propiedades farmacológicas del top 5 de las moléculas con mayor afinidad hacia la integrina α IIb β 3.

Molécula	F oral	Toxicidad (HERG)	Grado de toxicidad	Score
<i>Tirofiban</i>	0.9934	0.5278	III	-116.2
<i>mc.is.1</i>	1	0.7118	III	-176.9
<i>mc.is.14</i>	0.9721	0.5373	III	-165.6
<i>xi.is.10</i>	1	0.6915	III	-149.1
<i>Je.is.1</i>	0.9007	0.5395	III	-144.3
<i>xi.is.1</i>	1	0.6915	III	-143.3

F oral= Fracción de biodisponibilidad oral

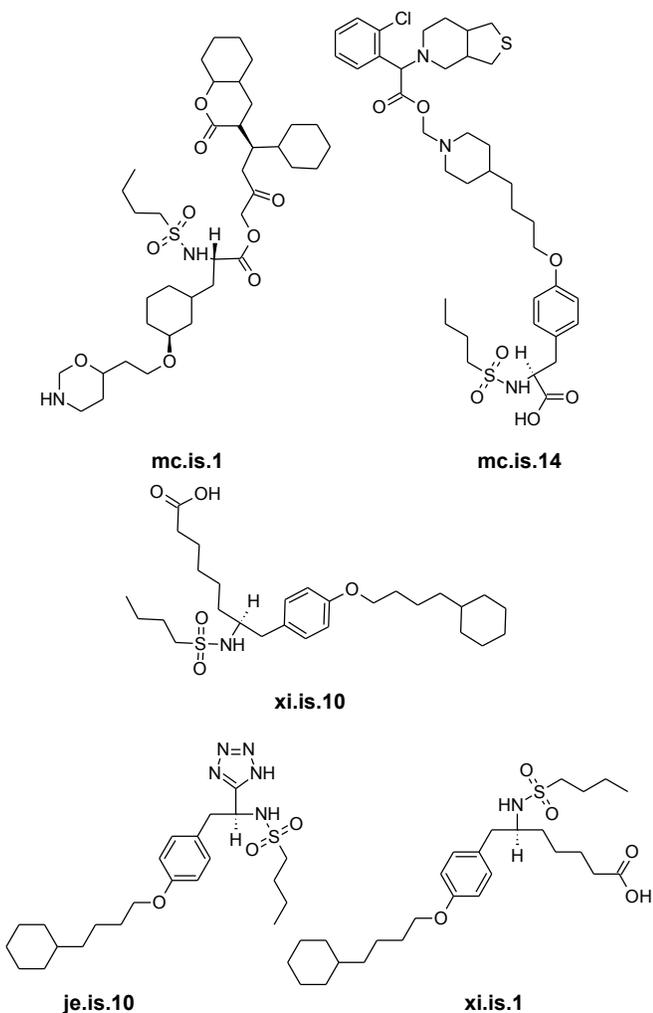


Figura 3. Estructuras de los ligandos *top-5* .

Como se puede observar en la Tabla 1, la toxicidad de los ligandos diseñados es baja (la mayoría de los fármacos se consideran grado III) y la biodisponibilidad es buena manteniéndose en el rango cercano a la unidad, cabe mencionar que la mayoría de las moléculas en estudio tienen similitud en estas características, por lo que se puede decir que el perfil ADME predictivo de los ligandos es favorable.

Una de las propiedades fisicoquímicas más importantes relacionadas con el tiempo de vida media es el logP. En la Tabla 2 se encuentra el logP del top 5 de las moléculas con mayor afinidad hacia la integrina α IIB β 3 y el tirofiban. Se puede apreciar que las moléculas diseñadas presentan un logP mayor que el tirofiban por lo que se infiere que su tiempo de vida media puede ser más largo que este debido a que puede haber una mayor distribución y permanencia en tejidos. Otro de los puntos importantes a considerar en la vida media es el metabolismo de fármacos, por lo que una de las perspectivas de este trabajo incluiría la predicción y evaluación *in silico* de los potenciales metabolitos de los ligandos propuestos.

Tabla 2. LogP de Tirofiban y el top5 de las moléculas diseñadas.

Molécula	LogP
mc.is.1	2.83
mc.is.14	5.93
xi.is.10	7.58
je.is.1	3.00
xi.is.1	7.07
Tirofiban	1.98

En cuanto a las interacciones observadas en la unión ligando-proteína se comparó el top 3 de las moléculas diseñadas, y se observó que aquellas que presentan un mayor número de átomos de carbono involucrados en la formación de anillos y cadenas hidrocarbonadas revelan un incremento en la afinidad hacia nuestro receptor de interés debido a interacciones nuevas con aminoácidos de la integrina α IIB β 3, así como mayores interacciones en comparación con el tirofiban reflejados en un mayor número de puentes de hidrógeno e interacciones estéricas.

En la Figura 4 se puede observar que la molécula mc.14.is ocupa una mayor superficie en el sitio de unión del receptor, situándose sobre la subunidad A y parte de la subunidad B de la integrina α IIB β 3, lo que le confiere una mayor afinidad, mientras que el tirofiban al ser estructuralmente más pequeño ocupa mayormente la subunidad A y con la subunidad B interacciona en menor proporción.

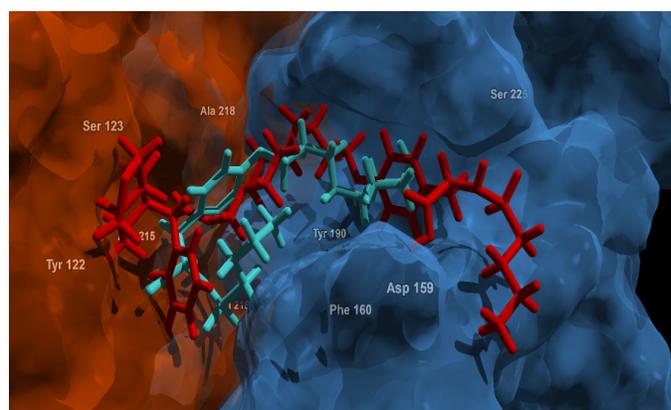


Figura 4. Moléculas mc.is.14 y tirofiban unidas con la integrina α IIB β 3 mostrando los aminoácidos de interacción y el lugar de acoplamiento. En color rojo se encuentra la estructura del mc.is.14 y en color azul claro se encuentra la estructura de tirofiban. La subunidad B de la integrina α IIB β 3 se nota de color naranja y la subunidad A de color azul oscuro. Imagen realizada con Molegro Virtual Docker versión 6.0.

Los ligandos analizados presentan interacciones en común con el tirofiban con los residuos de Arg216, Asn215, Phe 160, Ser225 y Tyr19, por lo que se deduce que la interacción con estos aminoácidos es clave para una mayor afinidad de los

ligandos. Asimismo, se identificaron interacciones con otros aminoácidos pertenecientes al sitio activo lo cual puede influir en una mayor afinidad o bien ser nuevos sitios de exploración para el diseño de nuevos antagonistas. Estos residuos incluyen al Asp217, Ala 218, Asp 232, Glu220, Ser226, Asp159, Tyr122. Estas nuevas interacciones son principalmente de naturaleza hidrofóbica. La Figura 5 muestra las interacciones de la molécula mc.ls.14 con el sitio de búsqueda en la integrina.

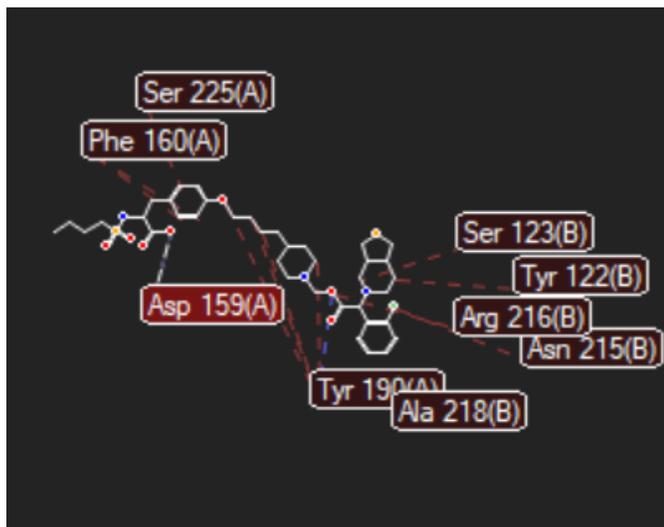


Figura 5. Interacciones de la molécula mc.ls.14 con los aminoácidos de la integrina α IIb β 3. Interacciones debidas a carbonos añadidos en ciclos de 6: Ser 123 y Tyr 122. Interacciones debidas a oxígenos añadidos en ésteres: Tyr 190 y Arg 216. Interacciones debidas a heteroátomos: Asn 215.

IV. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

Se lograron identificar 37 ligandos con mayor afinidad hacia la integrina α IIb β 3 respecto al tirofiban. De estas, las 5 estructuras con mayor afinidad teórica presentaron un perfil ADME/Tox in silico favorable y características fisicoquímicas diferentes a las del tirofiban, como por ejemplo una mayor lipofiliidad. Se identificaron nuevas interacciones de los ligandos diseñados con aminoácidos del receptor debido a la adición de carbonos en cadena o ciclos de seis carbonos, también se observaron nuevas interacciones con la adición de ésteres y heteroátomos. El hecho de que hayan nuevas interacciones con aminoácidos distintos a los del tirofiban marca la pauta para definir un sitio de acoplamiento de la integrina α IIb β 3 distinto al conocido tanto con el fibrinógeno con el tirofiban por lo que representan puntos de partida de interés para el diseño de nuevos antagonistas de la integrina α IIb β 3 que pudieran ayudar en el tratamiento de la ICT y que posiblemente no causen procesos hemorrágicos, aunque esto se deberá verificar posteriormente en estudios in vivo.

V. REFERENCIAS

- [1] Lóriga, F. M. C., & López, H. P. (2012). Los inhibidores de los receptores plaquetarios IIb/IIIa en los síndromes coronarios agudos. *Revista Cubana de Cardiología y Cirugía Cardiovascular*, 15(1), 40-51.
- [2] Springer, T. A., Zhu, J., & Xiao, T. (2008). Structural basis for distinctive recognition of fibrinogen γ C peptide by the platelet integrin α IIb β 3. *The Journal of cell biology*, 182(4), 791-800.
- [3] Calvete, J. J. (1994). Clues for understanding the structure and function of a prototypic human integrin: the platelet glycoprotein IIb/IIIa complex. *Thrombosis and haemostasis*, 72(1), 1-15.
- [4] Arauz, A., & Ruíz-Franco, A. (2012). Enfermedad vascular cerebral. *Mayo-Junio*, 55(3). Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/facmed/v55n3/v55n3a3.pdf>
- [5] Isselbacher J, Harrison T, Wintrobe M, Kasper D. (1994). Enfermedad cerebrovascular isquemia: aspectos generales. En Principios de medicina interna (2570-2572). España: 13 ed McGRAW-HILL INTERAMERICANA.
- [6] Álvarez J, Artigas A, Belda F, Bonet B. (2002). Isquemia cerebral. En Tratando cuidados cirios y emergencias II(541-550). España: Aran.
- [7] Cantú-Brito, C., Ruiz-Sandoval, J. L., Arauz-Góngora, A., Villarreal-Careaga, J., Barinagarrementeria, F., Murillo-Bonilla, L. M., ... & Rangel-Guerra, R. (2010). Prevalencia de estenosis carotídea en pacientes con isquemia cerebral transitoria en México. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 11(5), 343-348.
- [8] Arauz-Góngora, A., Coral-Casas, J., & Leyva-Rendón, A. (2005). Isquemia cerebral transitoria: Conceptos actuales. *Archivos de neurociencias (México, DF)*, 10(4), 250-254.
- [9] Fernández-Travieso, C., & César, J. (2014). Enfermedad cerebrovascular: incidencia y tratamiento actual. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 45(3). Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181232136002>
- [10] Muñoz-Collazos, M. (2001). Enfermedad cerebrovascular. Retrieved from <https://www.acnweb.org/guia/glc12i.pdf>
- [11] E. Díez Tejedor Clasificación. (2001). NOMENCLATURA DE LAS ENFERMEDADES CEREBROVASCULARES. *REV NEUROL*, 33(5), 455-464. Retrieved from http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/rehabilitacion-logo/clasificacion_ave.pdf
- [13] Arauz, A., & Ruíz-Franco, A. (2012). Enfermedad vascular cerebral. *Mayo-Junio*, 55(3). Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/facmed/v55n3/v55n3a3.pdf>
- [14] CardioAragon. (n.d.). Retrieved April 27, 2018, from <http://www.cardioaragon.com/doc.php?op=revista3&id=113&id2=12>
- [15] Cheng, F., Li, W., Zhou, Y., Shen, J., Wu, Z., Liu, G., ... & Tang, Y. (2012). admetSAR: a comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties.