

Diseño y evaluación dirigido por acoplamiento molecular y quimioinformática de puentes moleculares entre la glicoproteína GpIb y el colágeno para el tratamiento de la enfermedad de Von Willebrand

Ayna Marbella Miranda-Marroquín¹, Elena Isabela Flores-Pérez¹, María Fernanda Macías-Flores¹

¹Universidad La Salle México, Facultad de Ciencias Químicas. Ciudad de México, México.

am.mm@lasallistas.org.mx, ei.flores@lasallistas.org.mx,
mf.macias@lasallistas.org.mx

Resumen. La enfermedad de Von Willebrand es un trastorno sanguíneo en el que la sangre no coagula adecuadamente debido a una deficiencia de la proteína denominada Factor de Von Willebrand (FvW). Actualmente no existe un tratamiento conciso para esta enfermedad, por lo que en este trabajo se planteó como alternativa el diseño de un ligando que sirva como puente molecular entre la glicoproteína Ib (GpIb) y el colágeno, formando un complejo ternario GpIb-ligando-colágeno que promueva la hemostasia primaria y con ello el proceso de coagulación. El proyecto busca contribuir con el tercer Objetivo de Desarrollo Sostenible referente a la Salud y el Bienestar con un mayor enfoque en la meta 3.b de dicho objetivo, ya que la molécula propuesta al imitar la función del FvW podría funcionar como un tratamiento de emergencia seguro y eficaz para todas las personas que padezcan la enfermedad. El diseño molecular *de novo* se basó en los sitios de unión del FvW en la GpIb y el colágeno buscando la formación del complejo ternario. La evaluación de la molécula propuesta se realizó mediante acoplamiento molecular con la GpIb, la construcción del complejo ternario GpIb-ligando-colágeno y la evaluación de su estabilidad mediante dinámica molecular. Por último, se le realizó el perfil farmacocinético y toxicológico. En conclusión, se diseñó una molécula que logró formar un complejo ternario estable y que hasta nuestro conocimiento es la primera propuesta de diseño de puentes moleculares con aplicaciones terapéuticas.

Palabras Clave: FvW, glicoproteína, colágeno, puentes moleculares.

1 Descripción de la problemática prioritaria abordada

La sangre contiene muchas proteínas que ayudan a que el cuerpo pare de sangrar en caso de una hemorragia, una de estas proteínas se llama factor de Von Willebrand (FvW). La enfermedad de Von Willebrand es un trastorno sanguíneo en el que la sangre no coagula adecuadamente debido a una deficiencia o defecto de esta proteína coagulante que funciona como pegamento a fin de ayudar a las plaquetas a sellar roturas de vasos sanguíneos dañados (tapón plaquetario). Si la persona no tiene suficiente FvW o si éste no funciona bien, las plaquetas no pueden adherirse adecuadamente al área lesionada, entonces no podrá formarse un tapón plaquetario y la hemorragia persistirá durante más tiempo (CDC, 2020).

Asimismo, el FVW ayuda a la supervivencia del factor VIII, otra proteína involucrada en el proceso de la coagulación. Por lo tanto, la ausencia relativa del FVIII puede conducir a problemas de la coagulación (CDC, 2020 y FHRM, s.f.).

Es el trastorno hereditario de coagulación más común en seres humanos, afectando aproximadamente al 1% de la población. Se estima una frecuencia de 30 casos por millón de habitantes y en el mundo se cuenta con aproximadamente 620,000 casos sintomáticos. Hay tres tipos principales de EVW, el tipo 1 que se debe a una disminución cuantitativa en la proteína del FVW, el tipo 2 a un FVW disfuncional y el tipo 3 a FVW ausente o muy reducido. De los pacientes, el tipo 1 representa el 70-80%, del 5-15% son tipo 2 y menos del 5% son tipo 3 (Tovar et cols, 2020).

Esta enfermedad afecta con la misma frecuencia a hombres y mujeres; sin embargo, las mujeres tienen más probabilidad de sentir los síntomas de esta afección debido al mayor sangrado que causa durante los periodos menstruales, durante el embarazo y después del parto. Entre el 2012 y el 2016, más de 14 600 hombres, mujeres y niños fueron atendidos en centros de tratamiento para la hemofilia para brindarles tratamiento para la enfermedad de Von Willebrand. Alrededor de 2/3 eran mujeres y niñas (FHRM, s.f.).

Algunos cuidados generales que deben tener los pacientes con esta enfermedad de acuerdo con los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, 2020 , son:

- Siempre tener en casa compresas frías y el medicamento prescrito por el Hematólogo para tratar los episodios de sangrando (en su caso).
- Evitar medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), como aspirina, ibuprofeno, diclofenaco, naproxeno, metamizol.
- Las mujeres que padecen EvW tienen que afrontar diversos retos, debido a que el nivel del FvW varía con los cambios hormonales por lo que las manifestaciones de la enfermedad pueden cambiar con el tiempo.
- Para el uso de hormonales y anticonceptivos debe evaluarse cada caso individualmente dependiendo de la edad de la paciente, el tipo de enfermedad que tenga y sus deseos reproductivos.
- Durante la menstruación, las mujeres con EvW generalmente sangran más o durante un tiempo más prolongado a lo normal, además padecen muchos cólicos menstruales o menstruaciones irregulares. Este flujo menstrual excesivo puede provocar anemia por lo que a las mujeres con EvW se les deben realizar exámenes de laboratorio para detectar anemia.

Las anomalías estructurales cualitativas o cuantitativas del FvW disminuyen la adhesión plaquetaria, que provoca una hemorragia sistémica leve. Es más, la deficiencia cuantitativa de FvW crea una deficiencia del factor VIII secundaria a la disminución de la función de transporte. En la mayoría de los casos, el nivel de factor VIII permanece en niveles suficientes para mantener una coagulación eficaz, sin embargo, en la deficiencia grave del FvW los niveles del factor VIII disminuyen a valores que se asemejan a los de la hemofilia A grave y, en este caso, el sangrado anatómico acompaña al sistémico (Tovar et cols, 2020).

Actualmente, aunque la Enfermedad de Von Willebrand no tiene cura, el tratamiento puede ayudar a prevenir o detener los episodios de sangrado, dentro de los cuales de acuerdo al National Center on Birth Defects and Developmental Disabilities, 2020, se encuentran :

- Inyección de acetato de desmopresina: se inyecta en una vena para tratar personas con la enfermedad de Von Willebrand de tipo 1; provocando que el cuerpo libere más cantidad del FvW en la sangre.
- Atomizador nasal de acetato de desmopresina: para personas con la enfermedad de tipo I, funcionando de una manera muy similar que el medicamento anterior.
- Tratamiento reconstitutivo del factor: consiste en el factor de Von Willebrand recombinante (como Vonvendi®) y los medicamentos con una buena concentración del factor de Von Willebrand y del factor VIII (por ejemplo, Humate P®, Wilate®, Alphanate®, or Koate DVI®) usados para tratar a las personas con las formas más graves de la enfermedad de Von Willebrand.

2 Objetivo

Diseñar una molécula que funcione como un puente molecular entre la glicoproteína y el colágeno mediante acoplamiento molecular usando el programa Molegro Virtual Docker, para el tratamiento de la enfermedad de Von Willebrand.

3 Propuesta teórico-metodológica

Por medio de una investigación bibliográfica se buscaron las regiones clave que reconocían el FvW por parte de la glicoproteína Gplb y las fibras de colágeno. En este caso, se encontró que por parte de la Gplb los residuos de aminoácidos que interactúan con el FvW son los segmentos 561-566, mientras que para el colágeno los que potencialmente lo reconocen son del 983- 987.

Mencionado lo anterior, con base en la naturaleza de los aminoácidos se diseñó una molécula que empalmará con la Gplb y una que interactuará con el colágeno; las dos moléculas se unieron mediante un linker para realizar un acoplamiento molecular con el programa Molegro Virtual Docker entre dicha molécula y la glicoproteína Gplb (código PDB:1SQO). Con los resultados obtenidos se evaluaron las moléculas con mayor afinidad para realizar el perfil farmacológico y toxicológico en el programa ADMETLab 2.0.

Asimismo, la molécula que obtuvo los mejores resultados en afinidad, perfil farmacológico y toxicológico se evaluó mediante dinámica molecular con la Gplb y las fibras de colágeno para determinar la estabilidad del complejo ternario [Gplb-ligando-colágeno]. A continuación, se colocó el complejo Gplb-ligando en formato mol2 en el software YASARA Dynamics versión 22 y se incorporó la estructura correspondiente a una fibra de colágeno (código PDB: 4DMT) de manera manual permitiendo la interacción de los residuos de arginina del colágeno con el ligando. Posteriormente se llevó a cabo la simulación por dinámica molecular formando alrededor del complejo ternario una caja con dimensiones de 10 x10 x10 Å a la cual se llenó con moléculas de agua y permitiendo el ajuste de pH a 7.4.

4 Discusión de resultados

Los ligandos diseñados se estructuraron con base a los restos de aminoácidos ubicados en los sitios de unión de la Gplb y el colágeno a los que se une el FvW, esto con el objetivo de establecer interacciones entre dichas cavidades y las moléculas de interés. El ligando seleccionado para este proyecto

obtuvo de las mejores afinidades hacia la Gplb (**Figura 1**) y los mejores resultados de las evaluaciones farmacocinética y toxicológica, ya que de acuerdo a los resultados de la **Tabla 1** se obtuvo una adecuada absorción ($F_{20\%}$), asimismo valores como V_D (volumen de distribución) de color verde indican que la molécula permanecerá en plasma, lo cual es de suma importancia para el tratamiento de la enfermedad de von Willebrand ya que la molécula no debe pasar barrera hematoencefálica debido a que se requiere que la molécula emite la función del FvW en la circulación sanguínea. Igualmente, los resultados del perfil toxicológico indican que la molécula es segura ya que no es hepatotóxica, cardio tóxico ni mutagénica.

Dado lo anterior, fue necesario observar su capacidad como puente molecular al medir la estabilidad del complejo [Gplb-ligando-colágeno] mediante dinámica molecular para simular las interacciones del ligando con ambas proteínas, arrojando los resultados mostrados en la **Figura 3 y 4**.

En la **Figura 3** se muestra la medida del movimiento de cada átomo en cada fotograma (RMSD), si el RMSD es mayor a 2 Å se considera que los átomos están en demasiado movimiento y esto ocasiona que el complejo no sea estable, sin embargo, en la **Figura 3** se observó que en los primeros 8 ns la variación de RMSD es mayor a 2 Å, lo que sugiere que el complejo aún no alcanza el equilibrio y por ende aún no es estable. Posterior a los 8 ns y hasta el final de la dinámica, el valor de RMSD va de 2.5 a 3.5 Å aproximadamente, indicando que el complejo ha alcanzado el equilibrio y es estable ya que la diferencia entre ambas no sobrepasa los 2 Å. En la **Figura 4** se muestra la distancia de la interacción tipo electrostática del residuo de Arg 9 hasta el ligando diseñado; este tipo de interacciones pueden mantenerse incluso hasta 10 Å de distancia y en la **Figura 4** se aprecia que la distancia ligando-colágeno no la sobrepasa, por lo que puede inferirse que esta interacción se mantuvo a lo largo de la simulación, esto indica que el ligando es capaz de mantener cerca al colágeno, haciendo al complejo ternario [Gplb-ligando-colágeno] estable. Por esta razón los resultados obtenidos están diseñados para abarcar el tercer objetivo de desarrollo sostenible (ODS) sobre la salud y bienestar ya que la evidencia computacional anterior sugiere que es posible diseñar puentes moleculares sintéticos que imiten el FvW como se puede observar en la **Figura 2**.

5 Conclusiones y perspectivas futuras

En conclusión, mediante la realización de dinámicas moleculares, se logró realizar el diseño de una molécula segura y eficiente, que funcione como un puente molecular entre el colágeno y la glicoproteína para promover la coagulación sin la posible formación de trombos, ya que con base a la literatura consultada y a los resultados obtenidos de las únicas pruebas realizadas (*in silico*) es posible tener un acercamiento al mecanismo de acción deseado, es decir, no promover la síntesis innecesaria de más glicoproteínas o plaquetas en la sangre, sino sustituir al FvW con una molécula que ayude a la glicoproteína y a las plaquetas disponibles en la sangre a que interactúen de manera indirecta para estimular el proceso de coagulación. Siendo, así la molécula propuesta, la primera implementación de un puente molecular como una alternativa para el tratamiento contra la Enfermedad de Von Willebrand; un padecimiento poco abordado debido a la baja prevalencia reportada a nivel nacional y cuyas estrategias de tratamiento no han sido definidas de manera clara.

Dicho lo anterior se tiene como perspectiva la realización de más análisis *in silico*, como lo son las dinámicas cuánticas que contribuirían con un mayor panorama del comportamiento de la molécula

estando en el medio fisiológico (dentro del cuerpo), con el fin de poder optimizar la molécula y aumentar sus valores de eficacia; del mismo modo se tiene pensado el planteamiento de su ruta de síntesis para posteriormente realizar estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, destacando que para este último solo se implementarían ensayos en voluntarios que padezcan esta enfermedad, ya que en caso contrario, podría ocasionar alteraciones en el proceso de coagulación de los sujetos sanos.

De esta forma se busca colaborar con la resolución del Objetivo de Desarrollo Sostenible número tres correspondiente a la Salud y Bienestar ofreciendo una alternativa rápida y temporal a la enfermedad de Von Willebrand tomando la iniciativa con la meta 3.b referente al apoyo de las actividades de investigación y desarrollo de vacunas y medicamentos para las enfermedades transmisibles y no transmisibles que afectan primordialmente a los países en desarrollo y facilitar el acceso a medicamentos y vacunas esenciales asequibles de conformidad con la Declaración de Doha relativa al Acuerdo sobre los ADPIC y la Salud Pública, en la que se afirma el derecho de los países en desarrollo a utilizar al máximo las disposiciones del Acuerdo sobre los Aspectos de los Derechos de Propiedad Intelectual Relacionados con el Comercio en lo relativo a la flexibilidad para proteger la salud pública y, en particular, proporcionar acceso a los medicamentos para todos.

6 Agradecimientos

Los autores agradecen a Marco Antonio Loza Mejía por su apoyo durante el desarrollo de este proyecto y por su contribución con el préstamo de los programas computacionales necesarios para demostrar la estabilidad de los complejos formados.

7 Referencias

1. Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. (2020). *Datos y estadísticas de Von Willebrand*. National Center on Birth Defects and Developmental Disabilities. Recuperado de: <https://www.cdc.gov/ncbddd/spanish/vwd/data.html> .
2. Federación de Hemofilia de la República Mexicana. (s.f.). *Enfermedad de Von Willebrand*. Recuperado de: <https://hemofilia.org.mx/enfermedad-de-von-willebrand/>
3. Rodak, B. (2005). *Hematología: Fundamentos y Aplicaciones clínicas*. 2ª edición. Uruguay. Editorial Medica Panamericana.
4. Tovar Sánchez, Catherin; Salazar Reviakina, Alexander; Rumbo Romero, José Alejandro; Sierra Bretón, María Manuela; Madariaga Perpiñán, Ithzayana & Zarante Montoya, Ignacio (2020). *¿Qué avances recientes hay en el entendimiento, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Von Willebrand?: una revisión de la literatura*. *Universitas Medica*, 61(2). <https://doi.org/10.11144/Javeriana.umed61-2.vonw> .

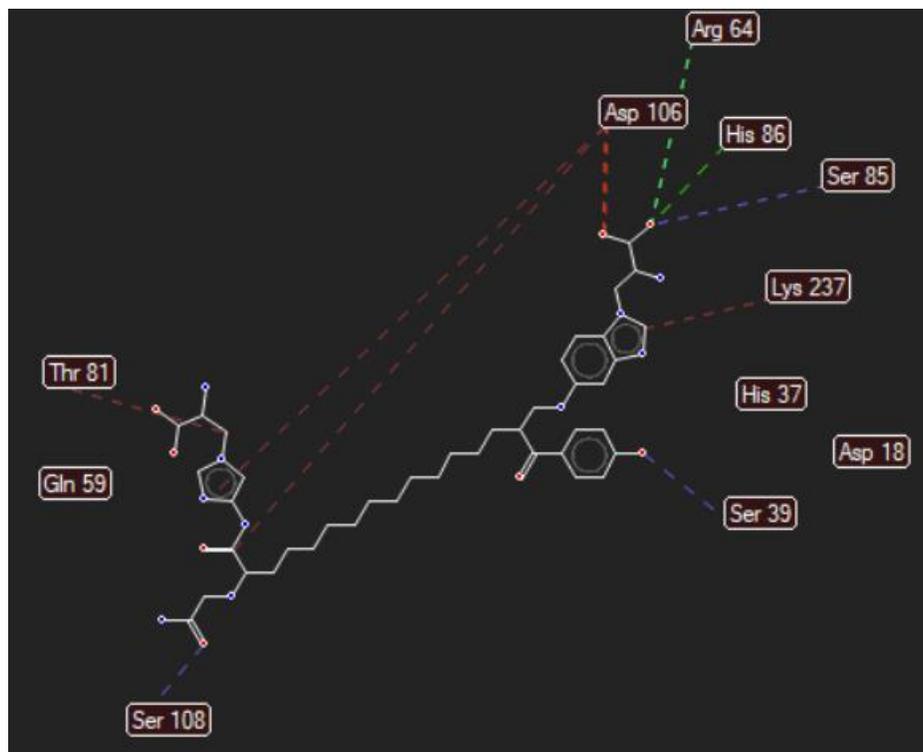


Figura 1. Interacciones del puente molecular con GpIb en dockin con Molegro.

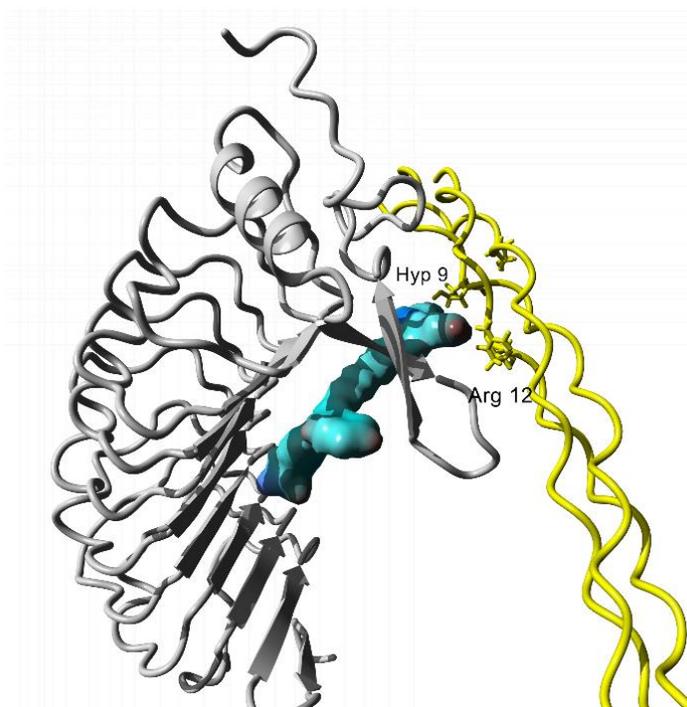
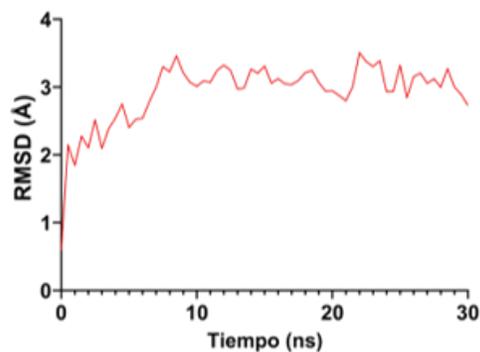
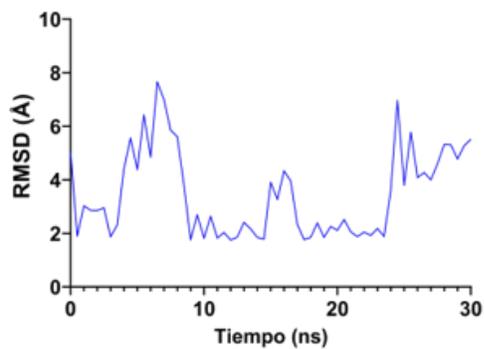


Figura 2. Complejo ternario [GpIb-ligando-colágeno].

Tabla 1. Perfil farmacocinético y toxicológico de la molécula con mayor afinidad hacia la Gplb

Rerank score	Perfil farmacocinético	Perfil toxicológico
- 112.695	Sustrato P-gp	hERG
	F _{20%}	h-HT
	F _{30%}	Mutagenicidad
	PPB	
	VD	Carcinogenicidad.
	CL	

**Figura 3.** RMSD durante la simulación**Figura 4.** Distancia de los residuos de Arginina del colágeno al ligando.