

De la infección PARASITARIA al modelaje computacional

Evelyn **Martínez Morales**
Thomas F. **Scior**

Lourdes **Millán PerezPeña**
Eduardo M. **Salinas Stefanón**

La infección parasitaria conocida como malaria (o paludismo), es causada por un protozoo del género *Plasmodium*; este parásito se encuentra distribuido globalmente y representa un problema serio de salud pública. El paludismo es una enfermedad endémica de las regiones tropicales; en México fue catalogada como problema de salud desde 1940.¹ El descubrimiento del *Plasmodium* (agente etiológico de la enfermedad) por *Charles Louis*, en 1880, y la demostración experimental por R. Ross y B. Grass, en 1899, de que la hembra del mosquito *Anopheles pseudopunctipennis* era el principal responsable de la transmisión del paludismo, condujo a la búsqueda sistemática de un tratamiento efectivo contra el parásito; sin embargo, esta búsqueda ha sido infructuosa. Uno de los inconvenientes más serios con esta parasitosis es la resistencia desarrollada a los fármacos empleados en su tratamiento. El arsenal farmacológico disponible se concentra en una sola familia de fármacos, las aminoquinolinas, originalmente desarrolladas a partir de un extracto de la corteza de un árbol, la chinchona, y estudiadas por Luis Pasteur en la primera mitad del siglo XIX. Pasteur describe varios componentes de este extracto: la quinidina, su estereoisómero cloroquina, la chinchonina, etcétera.

El relativo éxito de estos compuestos se ha visto mermado por los efectos secundarios que se presentan en los pacientes infectados, especialmente los referentes a la función cardiovascular. Por lo tanto, en nuestro laboratorio se aborda el estudio de los fármacos antimaláricos que han mostrado ser útiles en el tratamiento de dicha infección, pero que tienen efectos muy importantes sobre el sistema cardiovascular, particularmente la primaquina.^{2,3}

La primaquina (PQ) es una 8-aminoquinolina (quinolina: contiene una estructura aromática bicíclica tipo N que consta de un anillo de benceno con un anillo de piridina, Figura 1) que se administra por vía oral, para producir una cura radical, eliminando casi todos los reservorios de *Plasmodium vivax* y *P. ovale*. También es efectiva para prevenir la transmisión del paludismo por *Plasmodium falciparum*. El mecanismo de acción de la PQ sobre el parásito no se conoce con precisión, pero se cree que interfiere en la reproducción y la generación de energía (probablemente alterando la función mitocondrial del parásito), lo cual lleva a la muerte del plasmodio por agotamiento celular.^{4,5,6}

La fisiopatología de los efectos secundarios de la PQ sobre el sistema cardiovascular no se conoce, pero se tienen indicios de que se une a ciertas proteínas integrales de la membrana de células excitables conocidas como canales iónicos, estructuras responsables del paso de iones a través de la membrana celular. Estas proteínas coadyuvan a la correcta transmisión de información intercelular. Por lo tanto, si la PQ interfiere con estas proteínas, es muy probable que al menos parte de los efectos colaterales, cardíacos o cardiovasculares, observados en muchos pacientes, sea ocasionada por la unión de esta aminoquinolina con los canales iónicos. Para demostrar esta hipótesis, decidimos abordar esta pregunta desde dos ángulos diferentes: primero, el estudio electrofisiológico (registrando el funcionamiento de estos canales iónicos *in vivo*), y segundo, utilizando un método consis-

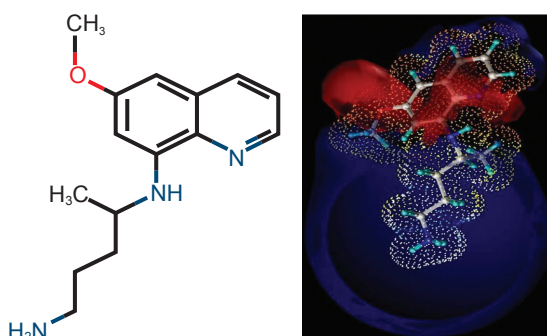


Figura 1. Estructura de la primaquina. A la izquierda se observa su estructura química, el anillo de quinolina. A la derecha se observan las nubes electrónicas de la PQ; la nube más grande, en azul, muestra la alta carga positiva; las nubes pequeñas, en rojo, son las cargas negativas.

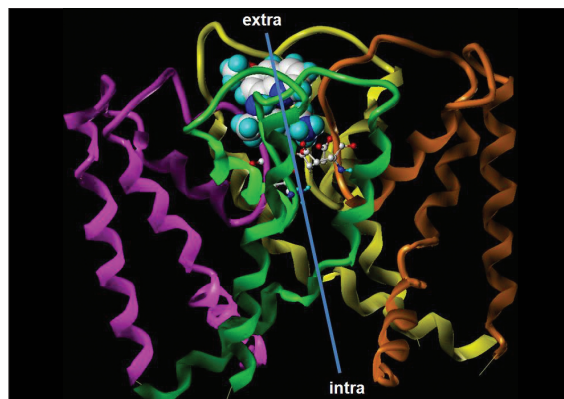


Figura 2. Docking de la PQ con el canal de sodio en su estado nativo. El ligando (PQ) se muestra con esferas grandes, y su posible interacción con el receptor (canal de sodio) mediante ciertos aminoácidos del canal (motivo DEKA en bastones y esferas pequeñas en la parte central). En la figura se muestran las α-hélices de los segmentos S5 y S6 de cada dominio (DI-magenta, DII-amarillo, DIII-naranja y DIV-verde). Extra: espacio extracelular, intra: espacio intracelular. La PQ y el DEKA están coloreados de acuerdo al tipo de átomo: C en blanco, O en rojo, N azul oscuro, y H en azul claro.

tente en el modelaje computacional de canales iónicos y la unión o desunión del fármaco (modelos *in silico*).

MODELOS *IN SILICO*

El diseño de nuevos fármacos y medicamentos demanda el uso de la tecnología computacional. La farmacología computacional, también conocida como modelaje *in silico*, incluye bases de datos, estudios cuantitativos de la relación estructura-actividad, modelaje molecular, determinación de sitios de unión, cambios de energía de pegado ligando-receptor, etcétera. Esta tecnología permite simular procesos biológicos en un ordenador sin necesidad de experimentos *in vivo*. El modelaje *in silico* es utilizado para ligandos virtuales y blancos basados en el tamizaje y afinidad de perfiles virtuales.⁷

Estudios previos de nuestro grupo⁸ muestran que el *docking* (acoplamiento) molecular es un método efectivo para explorar los diferentes modos de unión de dos moléculas que interactúan en una solución, generalmente en agua, aunque puede realizarse con otros solventes. El *docking* molecular se basa en encontrar las formas de interacción de menor energía (a menos energía, más interacción) de una molécula (ligando) con otra molécula de mayor tamaño (receptor). La búsqueda del ligando o receptor a través de las bases de datos con técnicas de acoplamiento molecular representa una alternativa muy interesante para diseñar fármacos específicos o encontrar mecanismos de acción de drogas.⁹

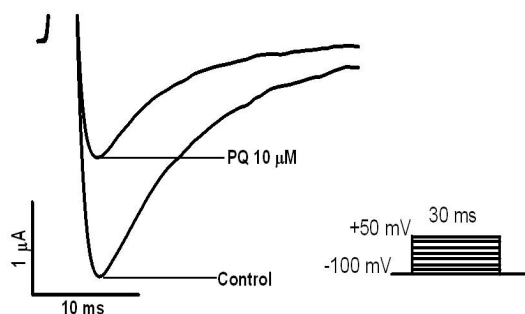


Figura 3. Corriente de sodio registrada después de la aplicación de un pulso de voltaje (-20 mV), bajo condiciones control y luego de la aplicación de PQ.

En nuestro caso, con la ayuda de sistemas de expresión heteróloga con mutagénesis de sitio dirigida y el *doc-king* molecular, nos planteamos una hipótesis sobre el sitio o sitios de unión en nuestro receptor (canal de sodio) que interactúa(n) con el ligando (primaquina) (Figura 2).

MÉTODOS

En los últimos años se ha podido clonar y secuenciar diversos genes que codifican para proteínas de membrana (canales iónicos). En este trabajo se usó un sistema de expresión heteróloga (ovocitos de la rana *Xenopus laevis*), en el que se inyecta el DNA o RNA sintetizado *in vitro*, que codifica para un cierto canal iónico. El ovocito es capaz de traducirlo y expresarlo funcionalmente en la membrana. Haciendo mutaciones o deleciones y observando cómo tales cambios alteran las propiedades funcionales del canal, se han identificado los segmentos responsables de los distintos componentes funcionales, como son el poro acuoso, el sensor de voltaje o la com-

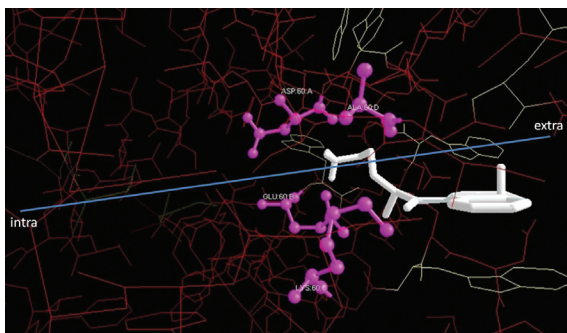


Figura 4. Modelo tridimensional del docking de la PQ con el canal de sodio en su estado nativo. En la figura se representan el canal de sodio en rojo; en la parte central, el motivo DEKA (bastones y esferas pequeñas en magenta); a la derecha del DEKA se observa el área rica en triptófanos (líneas delgadas en blanco). El ligando PQ (bastones en blanco) se encuentra entre el motivo DEKA y el área de triptófanos. Asp: D, Lys: K, Glu: E, Ala: A.

puerta de inactivación, así como sitios específicos de interacción entre ligando y receptor.

RESULTADOS

En trabajos previos^{10,11,12,13,14,15,16} se describió que los miembros de la familia de las aminoquinolinas, como la cloroquina, quinidina, 4,7-dicloroquinolina, quinolina y primaquina, tienen diferentes efectos electrofisiológicos sobre las corrientes iónicas presentes en tejido cardíaco, principalmente de Na^+ , K^+ y Ca^{+2} . En nuestro laboratorio, expresando el canal de Na^+ en ovocitos de *Xenopus laevis*, se encontró que la PQ inhibe la corriente de sodio (Figura 3), dejando abierta la posibilidad del uso clínico de este fármaco.

El modelo *in silico* del canal de sodio⁸ propone como probable sitio de unión del fármaco antimalárico (PQ) una estructura de aminoácidos conocida como filtro de selectividad (motivo DEKA), pero este modelo, aunque altamente probable, no es la única solución posible. Cuando estos resultados se añan a la experimentación *in vivo*, se encontró que debería haber otro sitio de unión, probablemente compartido, entre los aminoácidos del motivo DEKA y otro u otros cercanos a él. Resultados experimentales *in vivo* muestran que la PQ pudiera interactuar con una serie de triptófanos (Trp) cercanos al filtro de selectividad, en la proximidad de la boca externa del canal de sodio; estos resultados fueron corroborados recientemente utilizando el modelaje *in silico*, que mostró que esta unión es la de más baja energía (es decir, la unión más probable) y, por tanto, pudiera ser la clave para la interacción de la PQ con su receptor¹⁷ (Figura 4).

Combinando las técnicas de transfección de ADNc y el modelaje *in silico*, se obtuvo como resultado el modelo que se ilustra en la figura 5. La sustitución del triptófano por una cisteína desplaza la interacción de la PQ de su posición original. Este desplazamiento del fármaco de su posible receptor hace que la energía de pegado se incremente unas 100 veces (de 4.7×10^{-7} a 1.9×10^{-5}), lo que indica que, como consecuencia de la mutación, el receptor ha perdido su capacidad de unión al ligando, sugiriendo que se trata de un sitio apto para el pegado no solo de este ligando, sino de otros con características similares.

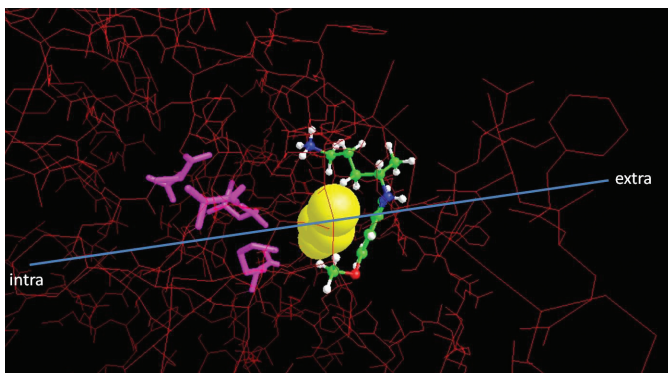


Figura 5. Modelaje tridimensional de la mutación w756C. La mutación a cisteína (esferas amarillas) desplaza el fármaco (bastones y esferas pequeñas) de su sitio original cerca del motivo DEKA (bastones en magenta). La molécula de PQ está coloreada de acuerdo al tipo de átomo: H en blanco, O en rojo, C azul oscuro, N en verde.

CONCLUSIONES

El uso de antimaláricos como la PQ para el tratamiento de la infección parasitaria, aunque efectivo, no solo afecta al parásito, sino que conlleva riesgos importantes para la función cardiovascular generando efectos indeseables tales como las arritmias. Nuestro trabajo ha mostrado que el mecanismo de acción de la PQ está íntimamente relacionado a su unión con el canal de sodio, y esta conclusión nos permite sugerir que la unión debe ocurrir por medio de la carga positiva del fármaco y las negativas de los triptófanos que se encuentran en la boca externa del canal y, por tanto, probablemente se trate de una unión electrostática (interacciones π - π) entre la carga fuertemente positiva de la PQ y los triptófanos en la estructura del canal. Otro hallazgo importante es que la PQ actúa por el lado extracelular del canal uniéndose a la boca externa (llena de triptófanos); este posible sitio puede ser alcanzado por otros fármacos con características similares (como tamaño, anillos cíclicos, carga eléctrica, etc.).

El descubrimiento de un nuevo sitio de unión en los canales de sodio abre la posibilidad no solo de encontrar fármacos similares a la PQ, con características farmacológicas afines, sino también de diseñar fármacos específicos para este nuevo sitio de unión que pudieran interferir en la cinética del canal y favorecer el tratamiento de enfermedades en las cuales la alteración de los canales sodio es importante, tales como las arritmias cardíacas o la epilepsia periódica familiar, entre otras.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Secretaría de Salud de México. Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud. Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades. Dirección de Programa de Enfermedades Transmitidas por Vectores. Sistema de Información de Vectores. (2004).
- 2 López-Antuñano, F.J. y Schuminis G. Diagnóstico de malaria. Organización Panamericana de la Salud. Publicación Científica núm. 512, 39-50 (1988).
- 3 White, N.J. Cardiotoxicity of antimalarial drugs. *Lancet Infect Dis.* 7:549-558 (2007).
- 4 Panisko, D.M. y Keystone, J.S. Treatment of Malaria. *Drugs*, 39(2):160-89 (1990).
- 5 White, N.J. The Treatment of Malaria. *N Engl J Med*, 335(11):800-6 (1996).
- 6 Beers, M.H.MD, y Berkow, R.MD. "Extraintestinal Protozoa: Malaria." Section 13, chapter 161. En: *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy*. Whitehouse Station, NJ: Merck Research Laboratories (2005).
- 7 Ekins, S., Mestres, J., Testa, B. In silico pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling. *Br J Pharmacol*. 152:9-20 (2007).
- 8 Scior, T., Martínez, M.E., y Salinas, S.E., Los modelos *in silico*, una herramienta para el conocimiento farmacológico. *Elementos*. 68:25-28 (2007).
- 9 Ewing, T.J.A, Makino, S., Skillman, A.G., Kuntz, I.D. DOCK 4.0: Search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 15:411-428 (2001).
- 10 Cebada, J. y Salinas, E. Chloroquine selectively blocks the inward rectifying potassium channel in dog cardiac myocytes. *The intracellular effect. Biophys. J.*, 66: A211 (1994).
- 11 Clark, R.B., Sanchez, C.J., Salinas, S.E., Duff, H.J. y Giles, W.R. Quinidine-induced open channel block of K^+ current in rat ventricle. *British J. Pharmacol*, 115:335-343 (1995).
- 12 Nenov, N.I., Crumb, W.J., Pigott, J.D., Harrison, L.H. y Clarkson, C.W. Quinidine interactions with human atrial potassium channels. Developmental aspects. *Circ. Res.*, 83:1224-1231 (1998).
- 13 Orta, S.G. Efectos electrofisiológicos de la 4,7-dicloroquinolina sobre las corrientes iónicas de potasio de entrada y salida, en miocitos aislados del corazón de mamífero. Tesis de Maestría, Instituto de Fisiología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (1999).
- 14 Sánchez, C.J., Salinas, S.E., Torres, J.J., Benavides, H.D. y Navarro, P.R. Blockade of currents by the antimalarial drug chloroquine in feline ventricular myocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 297:437-445 (2001).
- 15 Gloria, A.B. Efectos electrofisiológicos de la quinolina sobre las corrientes iónicas de potasio de entrada y salida en cardiocitos ventriculares aislados de mamífero. Tesis de Maestría. Instituto de Fisiología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (2002).
- 16 Orta-Salazar, G., Bouchard, R.A., Morales-Salgado, F. y Salinas-Stefanon, E.M. Inhibition of cardiac Na^+ current by primaquine. *British Journal of Pharmacology*, 135:751-763 (2002).
- 17 Scior, T.R.F., Martínez-Morales, E., Cruz, S.L. y Salinas-Stefanon, E.M. *In silico* modeling of toluene binding site in the pore of voltage-gate sodium channel. *J Receptor, Ligand Channel Res.* 2: 1-9 (2009).

Evelyn Martínez Morales, Eduardo M. Salinas Stefanón,
Instituto de Fisiología, BUAP.
email: esalinas@siu.buap.mx
Thomas F. Scior,
Facultad de Ciencias Químicas, BUAP.
Lourdes Millán Pérez Peña,
Instituto de Ciencias, BUAP.