

# Prospección *in silico* de Ligandos con Potencial Acción Multitarget hacia Blancos Terapéuticos del Glaucoma

ERICK FRANCISCO PUERTAS SANTAMARÍA, FERNANDO MANUEL MANCHA MELÉNDEZ, ANDRÉS RAMÍREZ MARTÍNEZ, ULISES FIERRO DÁVILA, CARLOS ALBERTO ESPINOSA ALARCÓN, MARCO ANTONIO LOZA MEJÍA

**Resumen** — El glaucoma, una de las principales causas de ceguera a nivel mundial, es una neuropatía ocular incurable ocasionada por el aumento de la presión intraocular provocando daño en el nervio óptico y a su vez la pérdida de la visión. Se divide principalmente en glaucoma de ángulo abierto (siendo la de mayor incidencia) y de ángulo cerrado, ambas siendo asintomáticas en su fase inicial lo que a su vez dificulta su diagnóstico. Actualmente no existe una cura efectiva contra esta enfermedad, solamente se tienen tratamientos que retrasan la pérdida de visión. Se realizó un Virtual Ligand Screening en “Molegro Virtual Docker” en dos etapas, creando una biblioteca de ligandos de derivados de fármacos existentes contra blancos terapéuticos enfocados en la disminución de la presión intraocular. Se llevaron a cabo estudios *in silico* en “SwissADME” y “Osiris Property Explorer” de los ligandos con los mayores “Multitarget Index” siendo estos los de mayor afinidad en para determinar su toxicidad y propiedades farmacocinéticas. De los resultados obtenidos se tienen derivados del fármaco Netarsudil que poseen una alta afinidad teórica hacia los blancos terapéuticos en comparación a los fármacos existentes y a su vez estas poseen un perfil farmacodinámico aceptable de acuerdo a los parámetros de referencia del cuerpo humano y una toxicidad teóricamente nula.

## I. INTRODUCCIÓN

El ojo humano es uno de los órganos más complejos y muy sensible del cuerpo humano. El humor acuoso es el líquido de mayor relevancia clínica en el ojo, ya fluye en el ojo por la malla trabecular y luego se drena en su mayoría por el canal de Schlemm, teniendo como función proveer nutrientes y oxígeno a la córnea y el cristalino [1]. Por este mecanismo se logra mantener la Presión Intraocular (PIO).

La PIO depende directamente del equilibrio entre la secreción y el drenaje del humor acuoso. La medición de la PIO es por tonometría, siendo la PIO normal en una persona saludable de aproximadamente 10-21mmHg siendo 21 el límite superior de la normalidad [1]. El aumento de la PIO es

debido, en su mayoría, a la resistencia que presenta el humor acuoso a ser drenado, resultando en una patología del globo ocular como el glaucoma siendo una de las principales causas de ceguera a nivel mundial [2], [3].

El glaucoma es una enfermedad incurable, considerada como una neuropatía progresiva del nervio óptico que afecta a millones de personas en el mundo, considerada como la segunda causa de ceguera irreversible a nivel mundial según la OMS [4]. Se caracteriza por el incremento de la presión ocular (teniendo una PIO mayor a 22mmHg) constante que resulta en daño al nervio óptico irreversible. El glaucoma se puede clasificar en distintos tipos según distintas fuentes, sin embargo, la forma más común es el glaucoma de ángulo abierto primario o glaucoma crónico simple, el cual corresponde al 60% de los casos a nivel mundial según la OMS [4]. Los síntomas del glaucoma de ángulo abierto generalmente surgen con la pérdida de la visión periférica en la etapa inicial y en la etapa avanzada hay la pérdida de la visión del túnel [5].

En cuanto a los síntomas de glaucoma de ángulo cerrado, que es la segunda forma más común, incluye visión borrosa, dolor en el ojo, ojos rojos [4], [6]. La OMS estima alrededor de 60 millones de personas en el mundo que padecen glaucoma y para el 2020 la cifra ascienda a 80 millones, del cual menos de la mitad sabe que lo padecen ya que puede ser asintomática en la etapa inicial [4], [7]. Su diagnóstico es difícil lo que dificulta su prevención y tratamiento temprano para evitar la ceguera total e irreversible.

La Fundación de Investigación del Glaucoma (GRF) hace mención que aproximadamente 10% de las personas diagnosticadas con glaucoma y que reciben tratamiento adecuado, experimentan pérdida de visión [7]. En la actualidad se desconoce la causa principal del glaucoma, como causas secundarias se encuentra como una comorbilidad debido principalmente por tumores, diabetes, cataratas avanzadas, inflamación e hipertensión [5].

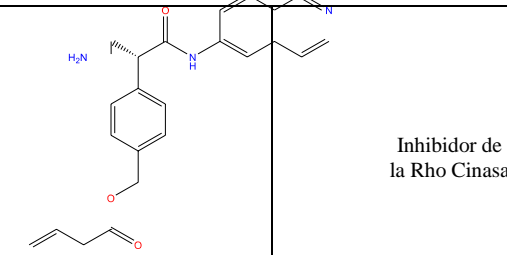
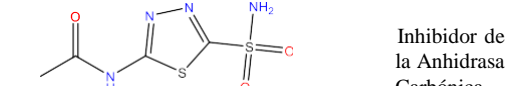
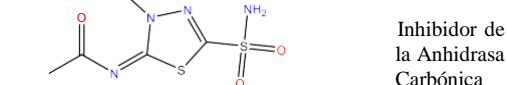
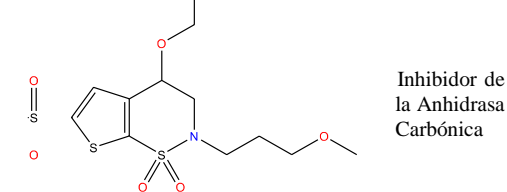
Actualmente, la primera línea de tratamiento es dirigida a la disminución de la PIO, utilizando fármacos inhibidores de las enzimas Rho Cinasa y Anhidrasa Carbónica, ya que la función de estas enzimas involucra el drenaje y la producción del

ERICK FRANCISCO PUERTAS SANTAMARÍA, FERNANDO MANUEL MANCHA MELÉNDEZ, ANDRÉS RAMÍREZ MARTÍNEZ, ULISES FIERRO DÁVILA, CARLOS ALBERTO ESPINOSA ALARCÓN pertenece a la carrera QUÍMICA de la NOMBRE DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS. (Email: marcoantonio.loza@lasalle.mx).

El proyecto fue asesorado por MARCO ANTONIO LOZA MEJÍA

humor acuoso. Otro blanco atractivo es la enzima Aldosa Reductasa ya que esta participa en la producción de polioles (sorbitol, galactitol) en el cristalino, estos compuestos al acumularse producen un gradiente osmótico en el ojo fomentando la difusión del humor acuoso y este a su vez aumenta la PIO [2], [8]–[12]. La Tabla 1 muestra algunos de los fármacos aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) para el tratamiento del Glaucoma.

TABLA 1  
Fármacos aprobados por la fda para el tratamiento del glaucoma

Fármaco	Estructura química	Función farmacológica
Netarsudil		Inhibidor de la Rho Cinasa
Acetazolamide		Inhibidor de la Anhidrasa Carbónica
Methazolamide		Inhibidor de la Anhidrasa Carbónica
Brinzolamide		Inhibidor de la Anhidrasa Carbónica

La problemática actual de los fármacos utilizados en el tratamiento hoy en día se debe justamente a que son fármacos selectivos ya que actúan sobre una diana terapéutica específica, por lo que el tratamiento consta de 2 o más medicamentos para tener el efecto terapéutico.

Para ello se propone el diseño de nuevos potenciales ligandos multitarget hacia las tres dianas biológicas antes mencionadas, con el objetivo de reducir los costos en el tratamiento actual, cantidad de fármacos administrados y obtener un efecto terapéutico equivalente al uso de 2 o más medicamentos en un solo fármaco.

Posteriormente se evaluarán mediante métodos in silico como acoplamiento molecular y filtro quimioinformático.

## II. METODOLOGÍA

*Diseño y construcción de los ligandos.* Se construyó una base de datos de 100 ligandos (*training set*) de las cuales 4 son actualmente fármacos para el tratamiento del glaucoma

(Netarsudil, Acetazolamida, Metazolamida y Brinzolamida), 1 molécula de THC y de luteína y se realizaron 94 modificaciones utilizando estrategias basadas en ligandos con aproximación disyuntiva, conjuntiva y analógicas en los 4 fármacos. Todos los ligandos se dibujaron utilizando ChemDraw y se optimizaron utilizando el campo de fuerza de mecánica molecular (MMFF) en ChemDraw 3D. Estos compuestos se exportaron a Molegro Virtual Docker [13], en el tipo de archivo \*.mol2 (SYBYL2).

*Estudios de acoplamiento molecular.* El acoplamiento molecular se realizó en base a las estructuras cristalográficas de algunos objetivos moleculares que se describen en la literatura como dianas terapéuticas principales como son: Anhidrasa Carbónica (CA) (PDB ID: 3K34), Rho Cinasa (RK) (PDB ID: 2ETK) y Aldosa Reductasa (AR) (PDB ID: 2J8T). Todas las estructuras cristalográficas se obtuvieron de Protein Data Bank. [14].

Se realizó un Virtual Ligand Screening (VLS) donde se realiza el acoplamiento molecular de una base de datos de ligandos a un objetivo molecular mediante la aplicación del algoritmo de Molegro. A partir de los primeros resultados del VLS de las tres enzimas, se construyó en cada enzima un índice (Index) donde el MDS de cualquier compuesto (MDS<sub>x</sub>) se divide entre el valor de MDS del compuesto más bajo (que tiene la afinidad teórica más alta) (MDS1) siendo 1 como resultado del índice de referencia mayor (donde es el compuesto con mayor afinidad en la enzima) [15].

$$Index = \frac{MDS_x}{MDS1}$$

Los índices de cada enzima se suman (Fórmula 2), se predice que la molécula que haya tenido la mejor afinidad en las 3 enzimas (A, B, C) su MTi será equivalente o cercano al número de blancos terapéuticos con el que se trabaja.

Fórmula (2)

$$MTi = (Index A) + (Index B) + (Index C)$$

Ejemplo: Si Index A, B y C = 1

$$MTi = 3$$

*Optimización de los ligandos más prometedores.* Se seleccionaron los primeros 20 ligandos con mayor MTi y a estos ligandos se le realizaron modificaciones con las estrategias ya realizadas, donde se creó una nueva biblioteca de 60 ligandos donde 20 son los ligandos originales del Top 20 y 40 ligandos son derivados de estos (2 por cada uno). Se repitió el procedimiento con los ligandos en ChemDraw3D y se volvió a realizar el VLS con la nueva biblioteca (*final set*). Se calculó el MTi con los nuevos resultados y se definió un Top 10.

Al top 20 se le realizaron pruebas in silico en los programas OSIRIS Property Explorer [16] y en SwissADME [17], para determinar la toxicidad y las propiedades farmacocinéticas de los ligandos.

III. RESULTADOS

La liga del *Apéndice de Resultados* se localiza al final del escrito.

TABLA 2 (APÉNDICE DE RESULTADOS)  
Resultados del vls del *training set* – top 20

TABLA 3 (APÉNDICE DE RESULTADOS)  
Resultados del vls del *final set* – top 20

FIG 1 – 3 (APÉNDICE DE RESULTADOS)  
Estructuras de los ligandos indazosin, ácido netarsonídico, netronidina respectivamente

TABLA 4

Propiedades farmacocinéticas de los 3 ligandos con mayor afinidad y mayor MTI

Nombre del Ligando	Indazosin	Netarsonidic Acid	Netronidine
LogP	4.61	1.67	3.44
LogS	-5.64	-3.87	-5.08
Peso Molecular	479.53	508.57	544.62
Accesibilidad Sintética	3.56	4.16	4.15
MolDock Score (MDS) CA	-146.773	-164.667	-165.445
MDS RK	-164.194	-164.233	-156.868
MDS AR	-227.443	-207.278	-209.938
MTi	2.7982	2.816	2.7886

TABLA 5

Propiedades farmacocinéticas de los fármacos actuales para el tratamiento del glaucoma

Nombre del Ligando	Netarsudil	Acetazolamide	Methazolamide	Brinzolamide
LogP	4.73	-0.39	-0.2	-0.65
LogS	-6.2	-1.9	-2.1	-2.7
Peso Molecular	453.542	222.245	236.26	383.507
Accesibilidad Sintética	3.45	3	3.11	4.41
MDS CA	-120.61	-93.03	-84.21	-121.72
MDS RK	-147.6	-88.51	-141.68	-110.25
MDS AR	-195.68	-118.31	-110.04	-135.37
MTi	0.7537	1.68	1.5	2.07

TABLA 6 (APÉNDICE DE RESULTADOS)  
Farmacocinética, fisicoquímica y otros parámetros quimioinformáticos del *final set*– top 10

TABLA 7 (APÉNDICE DE RESULTADOS)

Toxicidad predictiva de indazosin, netronidina y ácido netarsonídico respectivamente por osiris property explorer

TABLA 8 (APÉNDICE DE RESULTADOS)  
Biblioteca de ligandos del *training set*

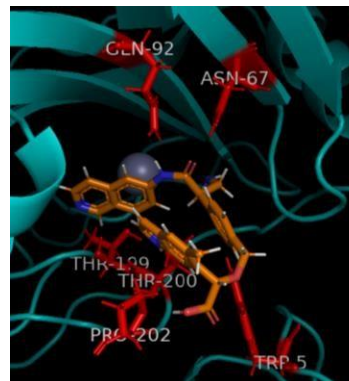


FIGURA 4. Ácido netarsonídico (naranja) acoplado al sitio activo de anhidrasa carbónica (cyan). residuos que interaccionan con el ligando por puentes de hidrógeno (rojo).

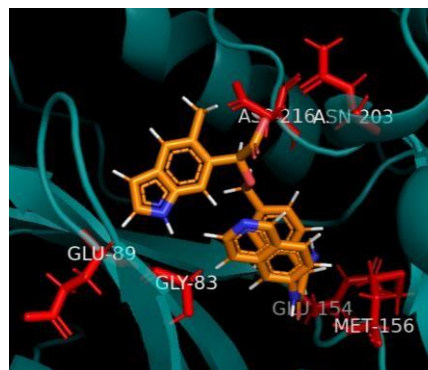


FIGURA 5. Ácido netarsonídico (naranja) acoplado al sitio activo de rho cinasa (cyan). residuos que interaccionan con el ligando por puentes de hidrógeno (rojo).

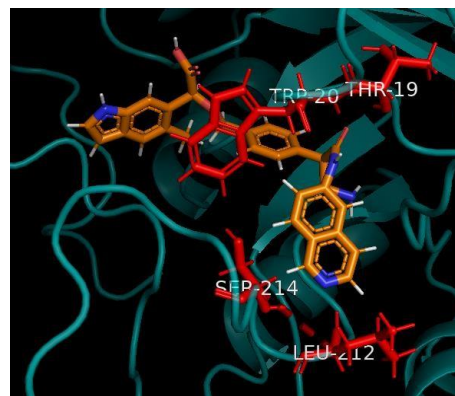


FIGURA 6. Ácido netarsonídico (naranja) acoplado al sitio activo de aldosa reductasa (cyan). residuos que interaccionan con el ligando por puentes de hidrógeno (rojo)

#### IV. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados arrojados por el *training set* (Tabla #1 apéndice (QR ubicado al final del escrito) en el acoplamiento molecular nos dieron información sobre los ligandos con mayor afinidad teórica, a los cuales se le hicieron modificaciones posteriores para observar en el *final set* las mejoras en cuanto a afinidad se refieren, teniendo como resultados una mejora en la mayoría de los nuevos ligandos. El ligando con mayor afinidad teórica en los 3 blancos moleculares dando un MTi de 2.99 (ligando Nt-Ind) es un ligando clave en las modificaciones posteriores ya que en base a dicho ligando y al mapa de energía de los blancos moleculares, se determinó que era clave hacer una modificación de tipo polar por lo que sus derivados (Nt-Ind- OH y Nt-Ind-COOH) tuvieron en el FS una alta afinidad teórica como se esperaba.

Al realizar las pruebas en OSIRIS y SwissADME los resultados nos ayudaron a discriminar a las moléculas que tenían cierto grado de toxicidad teórica y propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas como lo fueron los ligandos con un MTi más alto. por tales razones, se buscaron ligandos entre el Top 10 que cumpliera con la acción Multitarget además de cumplir las propiedades farmacocinéticas y fisicoquímicas ideales para una molécula con posible acción biológica.

Nt-Ind es un derivado del fármaco Netarsudil al cual se adiciono un heterociclo de tipo indol en el benceno del éster. En las modificaciones realizadas para el FS, al Nt-Ind se le realizó un cambio en su amina primaria por un alcohol primario el cual fue nombrado Indazosin. dicho ligando a pesar de no ser el que tiene el mayor MTi fue elegido como uno de los mejores 3 dado a sus propiedades farmacocinéticas como el logP (2-5 y una toxicidad teóricamente nula, además la relación estructura -actividad(SAR por sus siglas en inglés) la cual nos indica que el ligando tiene interacción con los residuos que forman el sitio activo (Trp219, Cys298, Trp111, His110, Trp20, Tyr48), mismas interacciones que posee el Netarsudil, lo cual nos permite predecir que la molécula tendrá el mismo tipo de acción inhibitoria sobre dicho blanco molecular (RK).

Por otra parte, tenemos la molécula NT-IND-COOH (Ácido Netarsonídico) la cual es también un derivado de NT-IND a la que se le añadió un grupo carboxilo el cual ayuda a mejorar su afinidad teórica, además es la molécula más prometedora en cuanto a Multitarget se refiere. Sin embargo, al ser una molécula tan promiscua, su selectividad disminuye en cuanto a su actividad sobre RK podemos inferir cierta inhibición sobre la enzima ya que tiene interacciones de tipo estéricas y puente de hidrogeno muy similares a las que tiene el fármaco Netarsudil con la misma (Trp219, Cys298, Trp111, His110, Trp20, Tyr48).

Asimismo, tenemos a la molécula Netronidina la cual también es un derivado de una modificación que se le hizo inicialmente

al Netarsudil, a ésta se le añadió un alqueno de 3 carbonos el cual demostró un aumento en la afinidad a comparación del Netarsudil y su modificación previa. Dicha molécula, al ser la que presenta mayor afinidad teórica de nuestro top 3 con la CA esperábamos tener interacciones que favorezcan la inhibición dichas interacciones tendrían que darse con el grupo de histidinas que rodea el cofactor(zinc) presente en CA.

Con esto se puede proponer que molécula con acción multitarget sobre las tres dianas analizadas, debería reunir las siguientes características:

- a) Debe de tener una toxicidad nula (mutagenicidad, irritabilidad, carcinogenicidad dependen de la estructura del ligando)
- b) Sus propiedades moleculares deben de cumplir con los parámetros teóricos farmacocinéticos que permitan una buena biodisponibilidad oral (Reglas de Lipinski como LogP, al igual que LogS, TPSA, Peso Molecular).
- c) Debe de tener una afinidad teórica mayor que los fármacos específicos en todas las dianas terapéuticas.

Nuestra molécula Ácido Netarsonídico cumple en su mayoría con los tres postulados anteriores por lo que esta molécula se podría considerar como una estructura de interés farmacológico para el desarrollo de compuestos multitarget para el tratamiento del glaucoma.

#### V. CONCLUSIONES

Los ligandos derivados de Netarsudil como son el Indazosin, Ácido Netarsonídico y Netronidina, cumplen con los objetivos buscados de toxicidad, farmacocinética y con una acción multitarget de manera teórica, por medio de la prospección in silico, por el cuál predecimos que estas moléculas podrán ser bioactivas y posiblemente tener una actividad biológica benéfica y con potencial para el desarrollo de fármacos con distintos blancos moleculares para el tratamiento del glaucoma.

Mediante el estudio SAR se identificaron las porciones moleculares que mejoran la afinidad de los ligandos con respecto a los fármacos, teniendo en cuenta que al modificar la estructura del ligando, esta misma adquiere una nueva conformación al acoplarse con la diana terapéutica teniendo interacciones que ayudan en el aumento de la afinidad del complejo ligando-proteína.

#### REFERENCIAS

- [1] A. C. Guyton and J. E. Hall, *Guyton and Hall: Textbook of Medical Physiology*, 12th Editi. ELSEVIER, 2010.
- [2] R. Mietzner and M. Breunig, "Causative glaucoma treatment: promising targets and delivery systems," *Drug Discov. Today*, Mar. 2019.

- [3] C. M. Adams, C. L. Grosskreutz, G. Prasanna, N. Rangaswamy, R. Stacy, and C. Bigelow, "Glaucoma - Next Generation Therapeutics: Impossible to Possible," *Pharm. Res.*, vol. 36, no. 2, 2018.
- [4] H. A. Quigley, "Glaucoma," *Lancet*, vol. 377, no. 9774, pp. 1367–1377, Apr. 2011.
- [5] L. L. Marshall and G. A. Stevens, "Therapy for Open- Angle Glaucoma," vol. 33, no. 8, 2018.
- [6] AMERICAN ACADEMY OF OPHTHALMOLOGY, "What Is Glaucoma?," 2018. [Online]. Available: <https://www.aaopt.org/eye-health/diseases/what-is-glaucoma>.
- [7] Glaucoma Research Foundation, "Glaucoma Facts and Stats," 2019. [Online]. Available: <https://www.glaucoma.org/glaucoma/glaucoma-facts-and-stats.php>.
- [8] K. S. Yadav, R. Rajpurohit, and S. Sharma, "Glaucoma: Current treatment and impact of advanced drug delivery systems," *Life Sci.*, vol. 221, pp. 362–376, Mar. 2019.
- [9] M. Shen *et al.*, "Discovery of Rho-kinase inhibitors by docking-based virtual screening," *Mol. Biosyst.*, vol. 9, no. 6, p. 1511, 2013.
- [10] M. Honjo and H. Tanihara, "Impact of the clinical use of ROCK inhibitor on the pathogenesis and treatment of glaucoma," *Jpn. J. Ophthalmol.*, vol. 62, no. 2, pp. 109–126, Mar. 2018.
- [11] C. A. Behnke *et al.*, "Atomic resolution studies of carbonic anhydrase II," *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, vol. 66, no. 5, pp. 616–627, May 2010.
- [12] K. A. Head, "Natural therapies for ocular disorders part two: Cataracts and glaucoma," *Altern. Med. Rev.*, vol. 6, no. 2, pp. 141–166, 2001.
- [13] R. Thomsen and M. H. Christensen, "MolDock: A New Technique for High-Accuracy Molecular Docking," *J. Med. Chem.*, vol. 49, no. 11, pp. 3315–3321, Jun. 2006.
- [14] H. M. Berman, "The Protein Data Bank," *Nucleic Acids Res.*, vol. 28, no. 1, pp. 235–242, Jan. 2000.
- [15] M. Loza-Mejía, J. Salazar, and J. Sánchez-Tejeda, "In Silico Studies on Compounds Derived from Calceolaria: Phenylethanoid Glycosides as Potential Multitarget Inhibitors for the Development of Pesticides," *Biomolecules*, vol. 8, no. 4, p. 121, Oct. 2018.
- [16] T. Sander, "Organic Chemistry Portal," 2019. [Online]. Available: <https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>.
- [17] A. Daina, O. Michielin, and V. Zoete, "SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 42717, May 2017.

APÉNDICE DE RESULTADOS: <https://bit.ly/2xbPnB2>