



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**EL MODELADO MOLECULAR COMO HERRAMIENTA  
PARA EL DESCUBRIMIENTO DE NUEVOS FÁRMACOS  
QUE INTERACCIONAN CON PROTEÍNAS**

Autor: Muñoz Silva, Miguel

Tutor: Giorgio Giorgi

Convocatoria: Junio

# Índice

Resumen .....	3
Abstract .....	3
1. Introducción y antecedentes .....	4
1.1 Herramientas para el descubrimiento de nuevos fármacos .....	4
1.1.1 Visión general.....	4
1.1.2 Diseño de principios activos basado en su estructura .....	4
1.1.3 Estrategias utilizadas para el descubrimiento de fármacos.....	4
1.1.4 Fármacos multidiana .....	5
1.2 Enfermedades neurodegenerativas .....	6
1.2.1 ROCK: introducción y sus inhibidores .....	6
1.2.2 MAO: introducción y sus inhibidores .....	8
1.2.3 Radicales libres y estrés oxidativo .....	10
2. Hipótesis y objetivos .....	12
3. Metodología .....	12
4. Resultados .....	14
4.1 Conformación farmacófora .....	14
4.2 Docking molecular .....	15
5. Discusión.....	17
6. Conclusión y perspectivas futuras.....	18
7. Bibliografía.....	19

## Resumen

Las necesidades de descubrimiento de nuevos fármacos se encuentran a la orden del día. Herramientas para el diseño de moléculas que en potencia puedan ser utilizadas como principios activos, evolucionan rápidamente junto con la bioinformática y la química computacional. En este sector, las técnicas de docking molecular se entienden como una alternativa atractiva, permitiendo una predicción inicial de la afinidad del ligando con su receptor.

En el presente estudio, se realiza una aplicación de estas técnicas para un aumento en el arsenal terapéutico de enfermedades neurodegenerativas, tan importantes en la actualidad. Un fármaco comercializado, Fasudil, es modificado con la finalidad de crear un fármaco multidiana y que permita la inhibición de enzimas relevantes en el desarrollo de estas patologías como son la ROCK o la MAO.

**Palabras clave:** Fasudil · Docking Molecular · MAO · ROCK · Radicales Libres · Estres oxidativo · Enfermedades neurodegenerativas

## Abstract

Discovery of new drugs are supposed to be on the actual agenda. Tools for the design of molecules that can be potentially used as active ingredients, rapidly evolve together with bioinformatics and computational chemistry. In this sector, molecular dockings techniques are understood to be an attractive alternative, being an initial prediction of the affinity of the ligand with its receptor.

In the present study, an application of these techniques is made for an increasement in the therapeutic arsenal of neurodegenerative diseases, so important at present. A commercialized drug, called Fasudil, is modified in order to create a multi-target drug that allows the inhibition of relevant enzymes in the development of these pathologies such as ROCK or MAO.

**Key words:** Fasudil · Molecular Docking · MAO · ROCK · Free Radicals · Oxidative Stress · Nerodegenerative pathologies

## **1. Introducción y antecedentes**

### ***1.1 Herramientas para el descubrimiento de nuevos fármacos***

#### **1.1.1 Visión general**

Todo proceso biológico es resultado de la interacción estrecha entre ciertas moléculas (complejo ligando-receptor). El conocimiento de estas uniones ha sido y es una de las principales ambiciones a nivel clínico (concepto llave-cerradura desarrollado por Fisher y Ehrlich o modelo rígido, modelo ajuste inducido o modelo flexible...) con el fin de una optimización o mejora de éstas en pro de obtener mejores resultados. Para ello, es necesario el entendimiento de las características químicas necesarias, siendo esta información estructural crítica para el análisis profundo de los procesos moleculares biológicos.<sup>1</sup>

#### **1.1.2 Diseño de principios activos basado en su estructura**

Actualmente, con el rápido avance de las ciencias bioinformáticas y técnicas computacionales existen herramientas que, basándose en una amplia biblioteca de datos de compuestos ya existentes, permiten predecir las configuraciones más estables y/o activas mediante homología y similitud (complementariedad hidrofóbica, fuerzas electroestáticas, puentes de hidrógeno, energías de conformación, características termodinámicas...)<sup>1</sup>

#### **1.1.3 Estrategias utilizadas para el descubrimiento de fármacos**

Las interacciones moleculares son procesos dinámicos. Cualquier intento de simular estos procesos debe tener en cuenta características cinéticas y equilibrios en solución, haciendo uso de aproximaciones o simplificaciones en los programas computacionales.

El Virtual Screening o Cribado Virtual se trata de un screening computacional basado en analogías químicas. El objetivo principal del mismo es el filtrado rápido y eficiente de moléculas, desechando las inactivas o las no requeridas mediante comparaciones con ligandos existentes de interés.<sup>2</sup>

La conformación farmacófora se define como las características tridimensionales de una molécula que permite su reconocimiento en el sitio activo del ligando, siendo responsable de su actividad biológica.<sup>2</sup> El modelado de conformaciones farmacóforas es una técnica que ayuda

al descubrimiento y al desarrollo de nuevos compuestos con posibilidad de ser utilizados como moléculas con fines clínicos. Para ello, se utilizan algoritmos matemáticos permitiendo un mapeo global y completo de todas las características químicas: aceptores y donadores de hidrógeno, zonas hidrofóbicas...,<sup>3</sup> gracias al alineamiento entre el ligando de referencia y las moléculas a estudio.<sup>2</sup> Todo ello, permite la obtención y la construcción de modelos químicos con propiedades farmacóforas.

Posteriormente, se encuentra el docking molecular, herramienta diseñada con una matriz computacional permitiendo y reproduciendo la conformación óptima y bioactiva del ligando para que se lleve a cabo el complejo ligando-receptor o diana proteica.<sup>3</sup> Es decir, cada compuesto es evaluado, en multitud de orientaciones, ubicado en el sitio activo del receptor mediante el posicionamiento de los grupos funcionales del ligando con los residuos del sitio activo del receptor.<sup>4</sup> Los mejores resultados se corresponden con los compuestos que presumiblemente pueden ser interesantes a ese nivel, cuantificando la interacción, la afinidad y la facilidad de la formación del complejo receptor-ligando,<sup>1,2</sup> basándose en el cálculo de la energía libre de la propia reacción.<sup>5</sup>

La importancia de estas técnicas ha sido reconocida en 2013 por la Real Academia Sueca de las Ciencias, dando el Premio Nobel a desarrolladores de las mismas (M. Karplu, M. Levitt y A. Warshel).<sup>5</sup>

A pesar de las dificultades que supone, los métodos de diseño de nuevos fármacos comentados son valiosas herramientas y estrategias alternativas que permiten una mayor facilidad para la realización de screenings moleculares iniciales, evitando pérdidas tanto de tiempo como de dinero, permitiendo un rápido acceso a posibles moléculas de interés, reduciendo el número de falsos positivos.<sup>1-4</sup>

#### **1.1.4 Fármacos multidiana**

La salida al mercado de nuevos fármacos ha sido mínima. Tradicionalmente, la investigación se ha basado en “una diana, un fármaco” como idea principal. Sin embargo, esto es limitado cuando se intentan tratar enfermedades multifuncionales,<sup>6</sup> tales como el cáncer, la diabetes, desordenes inmunitarios y metabólicos o enfermedades neurodegenerativas.

Los fármacos que se poseían hasta entonces no eran efectivos, ya que fueron diseñados con una diana específica, siendo los fármacos multidiana o multi-target la solución para el

tratamiento de estas enfermedades, mejorando la eficacia de éstos. En definitiva, se trata de una sola entidad química que permite actuar simultáneamente a varios niveles o en distintas dianas terapéuticas, produciendo un efecto biológico y, por lo tanto, terapéutico.<sup>5</sup> El problema de estas estructuras es el conseguir la multiselectividad deseada y aumentar o, al menos, mantener la efectividad de cada compuesto por separado.<sup>7</sup>

Estos fármacos han revolucionado la medicina moderna, siendo vistos como la solución a grandes patologías.<sup>8</sup>

Un posible ejemplo práctico de estas técnicas sería la aplicación de las mismas para el desarrollo de nuevos fármacos útiles en diferentes trastornos como, por ejemplo, las enfermedades neurodegenerativas.

## **1.2 Enfermedades neurodegenerativas**

Las investigaciones científicas sobre las enfermedades neurodegenerativas han concluido la relación existente entre estos trastornos y la mala regulación de ciertas enzimas como pueden ser la ROCK y MAO o, incluso, radicales libres. Todas estas variantes se estudian en este trabajo.

### **1.2.1 ROCK: introducción y sus inhibidores**

La Rho-kinasa (ROCK) pertenece a la familia de proteínas de tipo serina/treonina kinasa (Ser/Thr), activadas mediante la unión de moléculas de GTP (GTPasa). Posee dos isoformas: ROCK1 y ROCK2. Ambas poseen un dominio quinasa catalítico N-terminal con gran homología entre sus secuencias, un dominio central de unión a la Rho (RBD) y un dominio C-terminal rico en cisteínas (ver imagen 1).<sup>9,10</sup> Son expresadas ampliamente en numerosos tejidos, siendo en el tejido cerebral más abundante la isoforma ROCK2.<sup>11</sup> ROCK1 y ROCK2 pueden ser activadas o inhibidas individualmente, sin tener funciones *in vitro* redundantes. Actualmente, se encuentra en auge la investigación de fármacos que actúan frente a una isoforma de la ROCK específica, incluso mediante técnicas genéticas, silenciando ciertos genes.<sup>9</sup>

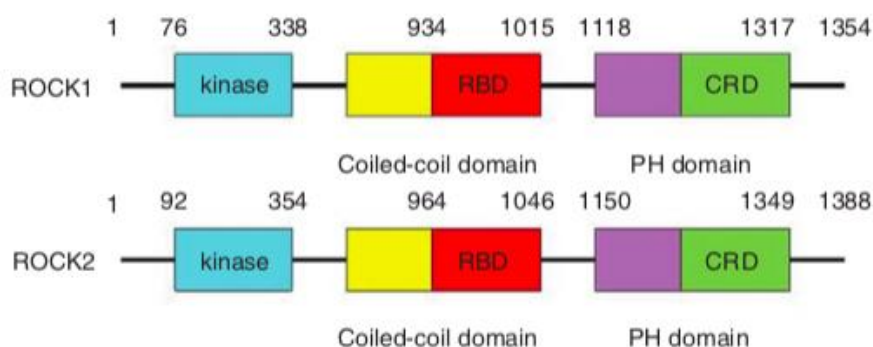


Imagen 1: Estructura molecular de ROCK<sup>10</sup>

La ROCK es conocida por jugar un importante papel en la organización del citoesqueleto, regulando la actividad de la actina, la cual es fundamental en un gran número de procesos celulares (adhesión, proliferación, diferenciación, apoptosis...).<sup>9,10</sup> Por lo tanto, la sobreexpresión de la ROCK puede derivar en enfermedades cardiovasculares (hipertensión, aterosclerosis, hipertensión pulmonar, isquemia del miocardio, hipertrofia cardíaca, paro cardíaco...), enfermedades neurodegenerativas (esclerosis lateral amiotrófica, Alzheimer, Parkinson, dolor neuropático, epilepsia, atrofia muscular espinal...),<sup>10,12</sup> cáncer, enfermedades renales, etc., siendo de tal forma una diana terapéutica en estudio actualmente.<sup>9,11</sup>

Los tratamientos actuales de enfermedades del sistema nervioso central se centran en atenuar los síntomas y no tanto en prevenir la progresión o el avance de las mismas. Fasudil® (1-(5-isoquinolinsulfonil)-homopiperazina) se trata del único fármaco inhibidor de la ROCK aprobado (mecanismo competitivo con el sitio de unión del GTP),<sup>10</sup> siendo utilizado como tratamiento en el vasoespasmio cerebral y la isquemia en Japón desde 1995.<sup>11</sup> Además de ello, se ha evaluado su posible aplicación en desórdenes metabólicos, inmunitarios, glaucoma, cáncer y patologías neurológicas y neurodegenerativas por su efecto neuroprotector, protegiendo neuronas motoras, evitando la muerte de éstas y promoviendo la regeneración y reparación de los circuitos neuronales afectados, así como prevenir la respuesta inflamatoria por la

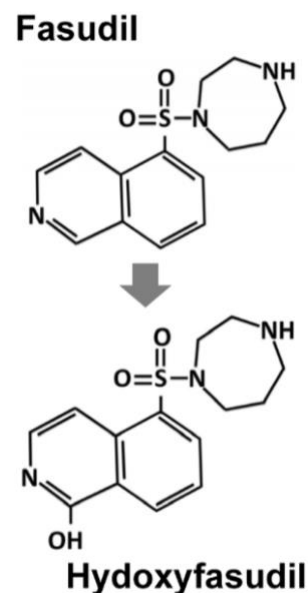


Imagen 2: Metabolismo del Fasudil<sup>9</sup>

inhibición de la infiltración de neutrófilos.<sup>10,12,13</sup> Hidroxifasudil es el principal metabolito formado en el metabolismo del fármaco (ver imagen 2), siendo más potente que el propio Fasudil y eliminándose más lentamente, contribuyendo por lo tanto a su potencia y su acción duradera.<sup>13</sup> Se trata de un fármaco con un efecto no selectivo actuando en ambas isoformas ROCK1 y ROCK2.<sup>9</sup>

La cascada Rho/ROCK se entiende como un punto vital para el tratamiento de estos desórdenes. Por lo tanto, se han intentado realizar numerosas modificaciones:

- Mediante la adición de ciertas moléculas al principio activo en cuestión (cabeza de serie) como nitroglicerina, imidapril, ozagrel o prostaciclina.<sup>9</sup>
- Mediante la modificación de la estructura en tres puntos: homopiperazina, anillo de isoquinolina, el grupo sulfonil.<sup>10</sup>
- Mediante la mejora en su formulación, presentándose como preparaciones liposomales, ya que tanto el fasudil como su metabolito poseen baja distribución a nivel cerebral.<sup>10</sup>

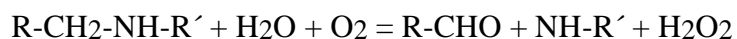
Todos estos posible tratamientos se estudian debido al amplio espectro de la enzima, tanto por su abundante representación y localización en tejidos como por su papel en numerosos procesos celulares, siendo además un fármaco bien tolerado sin apenas reacciones secundarias adversas.

### 1.2.2 MAO: introducción y sus inhibidores

Monoamino oxidasa o conocida como MAO (E.C. 1.4.3.4) es una flavoproteína que cataliza la desaminación oxidativa de aminas primarias y, en ocasiones secundarias, con la formación final de peróxido de hidrógeno. Se encuentran dos isoformas, MAO-A y MAO-B, ambas ubicadas en la membrana externa mitocondrial mediante la zona C-terminal como dímeros<sup>14</sup> y en la totalidad de tejidos, aunque mayoritariamente en el hígado.<sup>15</sup> Las dos isoformas se encuentran codificadas en genes separados, localizados en el cromosoma X (Xp11.23).<sup>14,15</sup> Poseen gran similitud estructural y pesos moleculares similares, pero se diferencian en la selectividad de sus sustratos e inhibidores. La isoforma B posee una cavidad más pequeña, permitiendo el paso de moléculas hidrofóbicas más reducidas, mientras que moléculas más espaciales no poseen esta facilidad.



En su actividad, produce moléculas de aldehído y radicales libres o especies reactivas de oxígeno, las cuales son rápidamente metabolizadas mediante enzimas metabolizadoras de aldehído y catalasa, superóxido dismutasa o antioxidantes, respectivamente. Por lo tanto, una actividad anormal de esta enzima podría traducirse en posible causa de estrés oxidativo.



Estas enzimas se han estudiado durante décadas para el descubrimiento de sus inhibidores (inhibición reversible o irreversible) como tratamientos farmacológicos útiles en depresiones y enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson.<sup>14</sup> Estas investigaciones han sido realizadas gracias al conocimiento de la farmacocinética y al desarrollo de nuevas herramientas informáticas, avanzando rápidamente tras el conocimiento de la unión del ligando y su efecto inhibitorio.<sup>15</sup>

La sigla I-MAO se corresponde con los inhibidores de la monoamino oxidasa, encontrándose gran cantidad de fármacos que actúan como tales. No fue hasta hace unas décadas cuando se observó la actividad inhibitoria selectiva dependiendo de la isoforma de estas moléculas.

El primer I-MAO fue la fenelzina perteneciente al grupo de las hidracinas (no selectivo). El uso de este fármaco se encuentra limitado a depresiones resistentes a otros tratamientos, depresiones atípicas o ansiedad pronunciada. Posteriormente, en el grupo de las ciclopropilaminas, se encuentra la trancilpromina (único fármaco de este grupo en uso), tratándose de una molécula con gran efectividad y una rápida acción inhibitoria de ambas isoformas, pudiendo dar reacciones adversas o interacciones conocidas como “síndrome del queso” caracterizado por altas concentraciones de tiramina que producen hipertensión, eventos coronarios agudos, etc. Tras este fármaco se encuentran los grupos más utilizados y modernos como son las propargilaminas, que también producen una inhibición irreversible, encontrándose fármacos como la Clorgilina o N-[3-(2,4-diclorofenoxi)propil]-N-metilprop-2-in-1-amina (utilizada comúnmente como sustrato específico para la investigación, como sustrato de referencia) o la Rasagilina o N-(prop-2-inil)-2,3-dihidro-1-H-indan-1-amina, actuando a nivel de MAO-A y MAO-B, respectivamente.<sup>15</sup>

Los fármacos que actúan mediante una inhibición irreversible son más útiles en tratamientos de enfermedades neurodegenerativas, ya que son afecciones crónicas de larga

duración, aunque tienen el problema de poder producir efectos tóxicos no reversibles como el síndrome serotoninérgico.<sup>15</sup> Estos inhibidores irreversibles se unen a la enzima mediante la formación de un aducto reactivo que, posteriormente, forma un enlace covalente con el cofactor FAD (átomo N5) (ver imagen 3).<sup>15,16</sup> Esta inhibición es tiempo dependiente, debiéndose sintetizar de nuevo la enzima y posicionar en la membrana externa de la mitocondria, y no reversible mediante diálisis.<sup>14</sup>

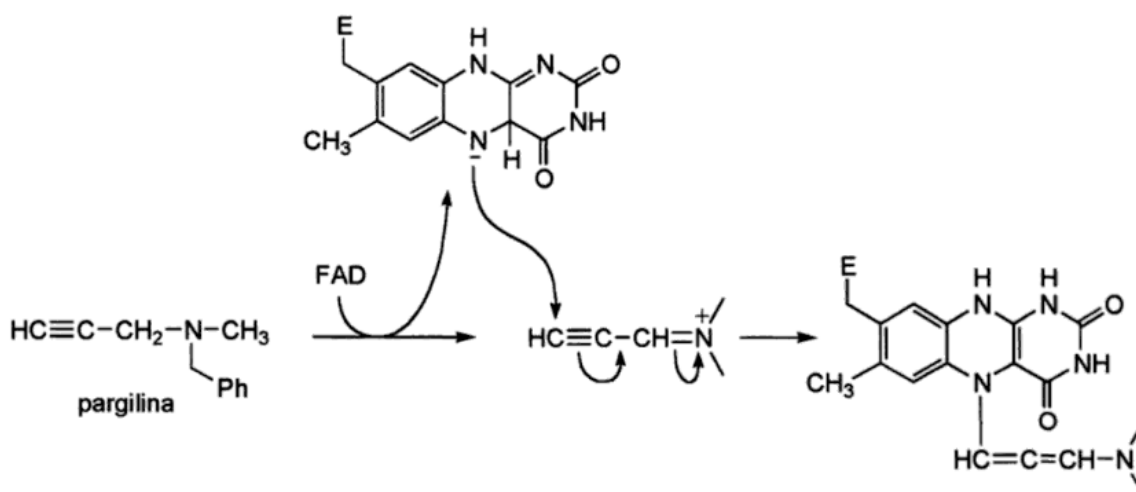


Imagen 3: Mecanismo de acción de pargilina (Propargilaminas)

Aunque los I-MAO-A poseen un mayor efecto que los inhibidores de la isoforma B en el aumento de las concentraciones de dopamina, no pueden ser utilizados en pacientes que padecen de Parkinson por la posibilidad de efectos cardíacos. Además, los inhibidores de MAO-B poseen propiedades neuroprotectoras que complementan su acción.

### 1.2.3 Radicales libres y estrés oxidativo

Las enfermedades neurodegenerativas se trata de un grupo heterogéneo de patologías, explicadas mediante la afectación de motoneuronas y/o del control motor, encontrando factores genéticos predisponentes. Éstas poseen un papel destacado en la sociedad actual, debido a su prevalencia, morbilidad y mortalidad.<sup>17</sup>

El estrés oxidativo (EO) es una situación compleja debido a un desequilibrio entre la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) o especies reactivas de nitrógeno (ERN) y la acción de los antioxidantes. Estos radicales libres (moléculas o átomos con uno o más electrones desapareados) son formados de forma natural conforme se realizan los procesos biológicos, existiendo una patología cuando los mecanismos para revertir esta situación

(enzimas antioxidantes como la catalasa, superóxido dismutasa o atrapadores de radicales libres y antioxidantes como glutatión, vitamina C, el  $\beta$ -caroteno, etc.) se encuentran en baja proporción, resultando en muerte neuronal.<sup>17,18</sup> Por lo tanto, el estrés oxidativo se entiende como la unión de factores ambientales, endógenos y genéticos.

El sistema nervioso central es rico en ácidos grasos insaturados y hierro, factores que convierten a éste vulnerable al EO. Por lo tanto el EO, entre otros factores como edad, excitotoxicidad, autoinmunidad, etc.,<sup>17</sup> se relaciona etiológicamente con enfermedades neurodegenerativas tales como el Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, Corea de Huntington, epilepsias, etc., ya que una acumulación de estos radicales libres produce una activación de los mecanismos de peroxidación lipídica dañando, en última instancia, al ADN y proteínas, provocando alteraciones estructurales y funcionales y procesos inflamatorios no específicos, junto con la modificación del proteosoma y la consiguiente disfunción de los mecanismos de defensa antioxidantes.

A pesar de todas las evidencias científicas que aseguran la patogenicidad de las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (ERO y ERN, respectivamente) y la necesidad del uso de antioxidantes como terapia farmacológica, no existen tales fármacos comercializados.<sup>18</sup>

Numerosas investigaciones muestran cómo ciertas moléculas con grupos fenólicos son eficaces contra los radicales libres mediante la inhibición de la propagación de éstos a través de mecanismos de donación de hidrógenos, hidroxilación aromática o quelación de metales.<sup>19,20</sup>

Algunos ejemplos de moléculas que poseen capacidades captadoras de radicales libres son el ferúlico (ácido 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)prop-2-enoico) y cafeíco (ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)prop-2-enoico), debido a sus radicales hidroxil y carboxil. Esto es debido a la facilidad de resonancia del propio compuesto, cuando cualquier radical libre reacciona con él, deslocalizándose por toda la molécula gracias a la conjugación que existe a lo largo de toda la cadena insaturada (ver imagen 4).<sup>21</sup> Esta estabilización global en la molécula no permite la

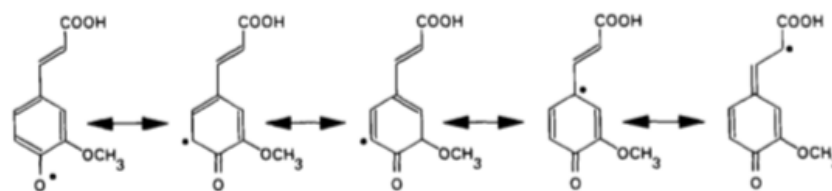


Imagen 4: Estabilización por resonancia del ácido ferúlico<sup>19</sup>

reactividad, evitando la propagación del radical.<sup>19</sup> Por lo tanto, se trata de una buena solución para mantener la integridad fisiológica y biológica de la célula y, con ello, del organismo.

Por todo lo expuesto anteriormente, se observa como existe un vacío terapéutico importante en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas. Por consiguiente, este trabajo intenta realizar el desarrollo completo inicial de un fármaco nuevo.

## 2. Hipótesis y objetivos

Para la realización de este estudio, se realiza una revisión bibliográfica en la literatura científica actual sobre el conocimiento de las herramientas moleculares informáticas y computacionales existentes para el desarrollo de nuevos fármacos, entendiendo ciertos conceptos tales como: modelado, docking molecular, conformaciones activas o farmacóforas, cribado...

Se realiza, como sustento de la parte teórica, un ensayo sobre la aplicación de estas técnicas. Se parte del fármaco comercializado Fasudil® que, mediante modificaciones estructurales, se quiere convertir en un fármaco multidiana, actuando como inhibidor frente a ROCK y MAO. Además, se investiga la posibilidad de adición de una acción novedosa como puede ser la de captador de radicales libres. Posteriormente, se prueba mediante la aplicación de docking molecular estas hipótesis.

## 3. Metodología

Como inicio de este trabajo, se ha realizado una revisión bibliográfica online en bases de datos científicas fiables (Scifinder®, PubMed®), buscadores universitarios como Cisne® o plataformas de revistas científicas como ScienceDirect® o Scopus®, recogiendo artículos actuales con el fin de comprender los conceptos necesarios para la realización de este trabajo.

En primer lugar, ha sido necesaria la obtención de las estructuras básicas de las enzimas en alta resolución mediante procesos de rayos X y resonancia magnética que se han hallado en la base de datos PDB o ProteinDataBase®. Las enzimas seleccionadas han sido:

- PDB ID: 2ESM. "Crystal Structure of ROCK 1 bound to fasudil".<sup>22</sup>

- PDB ID: 2BXR. “Human Monoamine Oxidase A in complex with Clorgyline, Crystal Form A”.<sup>23</sup>
- PDB ID: 1S2Q. “Crystal Structure of MAOB in complex with N-propargyl-1(R)-aminoindan (Rasagiline)”.<sup>24</sup>

En la parte práctica, el desarrollo del nuevo fármaco comienza con el estudio del grupo farmacóforo de cada ligando con el fin de obtener moléculas que continúen siendo activas. Para ello, se ha utilizado el programa LigandScout® en la versión 4.2.1. Este programa permite la obtención y la determinación de las zonas estructurales mínimas necesarias para que el complejo ligando-receptor y, por lo tanto, su acción terapéutica se lleve a cabo correctamente, obteniendo su conformación activa (proceso de 3D-QSAR).

Cuando se han obtenido estas estructuras, se comienza a realizar las diferentes modificaciones, primero teóricas y posteriormente se lleva a cabo el docking molecular para la resolución de datos de actividad. Para ello, han sido necesarios tres programas informáticos de licencia libre: ChemSketch, Chimera y AutoDockTools. El primero permite la obtención de moléculas en 2D y la minimización y optimización de las mismas. El segundo trata de transformar esas estructuras a 3D, visualizando las mismas y permitiendo el cambio de extensión del archivo, paso necesario para poder trabajar con éstas en el AutoDockTools, el cual permite la realización de pasos intermedios necesarios y, como última instancia, el docking molecular.

Por lo tanto, tras la obtención de la enzima a estudiar, se debe preparar la misma, eliminando todos los componentes no necesarios, como pueden ser los ligandos y el disolvente. El agua juega un papel crítico en la obtención de los resultados correctos, siendo el disolvente universal. Aún así, una eliminación del agua de cristalización es necesaria. A su vez, los átomos de hidrógeno han sido adicionados, permitiendo que todos los grupos ionizables se encuentren en el estado más probable a un pH fisiológico (pH 7,4).

Tras ello, es necesario la búsqueda del centro activo, conociendo su posición. Por otro lado, se debe preparar el ligando, aportando su conformación espacial correcta. Una vez realizados estos pasos el docking molecular se pone en marcha, generando archivos de tipo GPF y DPF (Grid Parameter File y Dock Parameter File, respectivamente). En este caso, se ha

establecido una grid determinada utilizada en todos los dockings realizados, permitiendo un correcto acomodamiento de los principios activos a estudio.

Finalmente, se obtienen los 10 mejores resultados en cuestión de energía libre de unión en la interacción y formación de complejo ligando-receptor (KJ/mol), los cuales son guardados para su comparación y análisis posterior, debiendo cumplir la condición de que  $\Delta E < 0$ .

## 4. Resultados

### 4.1 Conformación farmacófora

Con respecto a la enzima ROCK, el grupo farmacóforo se puede observar en la imagen 5 a). El nitrógeno de la isoquinolina se trata de un aceptor de hidrógeno, por lo que forma un enlace con la Met156. A su vez, la piridina como tal, se trata de una estructura hidrofóbica favoreciendo y contribuyendo al enlace del ligando en el sitio de unión del GTP de la enzima, permitiendo su competitividad y, por lo tanto, su inhibición posterior. Por ello, cuanto mayor hidrofobia posea esta zona, más fuerte será su unión con el bolsillo hidrofóbico que posee la enzima, teniendo cuidado con las características farmacodinámicas. En esta unión, se ha descrito que Val90 y Leu205 poseen una contribución importante aportando fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas con el ligando.<sup>11</sup>

Además de ello, el nitrógeno de la homopiperazina se trata de un donador de hidrógeno, formando un enlace con la Asp160 y Asp202. Al igual que el nitrógeno de la isoquinolina, el grupo sulfóxido se trata de un posible aceptor de hidrógeno. Todo ello se entiende como el grupo farmacóforo del Fasudil, quedando claro el potencial lipófilo que posee la molécula.

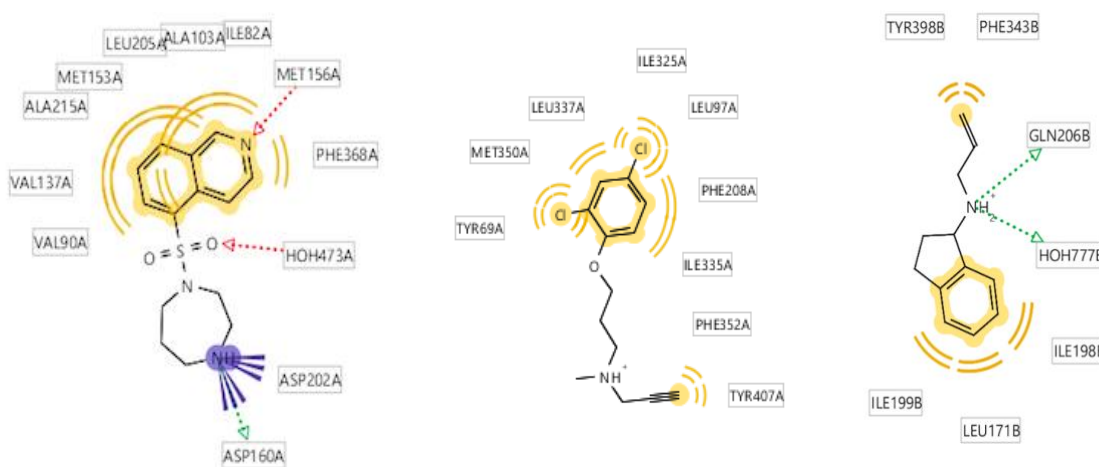


Imagen 5: Grupos farmacóforos de Fasudil, Clorgilina, Rasagilina, respectivamente

Este trabajo también se ha centrado en las MAO-A y MAO-B, junto con sus ligandos específicos, Clorgilina y Rasagilina, respectivamente (imagen 5 b). y 5 c).). Se ha encontrado una zona hidrofóbica bastante amplia, gracias a la existencia de radicales cloro y áreas hidrofóbicas aportadas por los anillos benceno, que permiten la entrada al bolsillo hidrofóbico de la enzima. Por último, el radical propargilo es esencial para la selectividad y la actividad inhibitoria que poseen estas moléculas, viéndose involucrada además en efectos neuroprotectores de la rasagilina.<sup>25</sup>

## 4.2 Docking molecular

La estructura cristalizada del complejo ROCK-Fasudil ha sido utilizada para el cálculo de los dockings de referencia, permitiendo una comparación numérica real. El mismo proceso se siguió con los datos de referencia correspondientes a la enzima MAO, en ambas isoformas MAO-A y MAO-B

Las modificaciones realizadas han sido las siguientes (ver tabla 1):

- Modificación de anillo de homopiperazina por anillo de pirazina (F6)
- Adición de radical propargílico en átomo de N de la homopiperazina (FM7) y de la pirazina (FM6)
- Adición de radical ferúlico en el átomo de N de la homopiperazina (FFD7) y de la pirazina (FFD6)
- Adición de radical ferúlico hidrolizado en el átomo de N de la homopiperazina (FFH7) y de la pirazina (FFH6)

En referencia a los datos obtenidos, representados en la tabla 2, se puede observar cómo todas las moléculas son activas, ya que  $\Delta E$  siempre  $< 0$ , obteniendo en algún caso mejores resultados de energía de enlace.

Con respecto a los dockings realizados en la ROCK, ninguna de las moléculas probadas mejoran los resultados de referencia (docking 1), aunque se encuentran cercanos. Se puede ver cómo cuanto mayor es la modificación estructural que se realiza, esta energía de enlace aumenta, traduciéndose en una peor facilidad para la formación del complejo y, por lo tanto, en una menor actividad biológica (docking 2-8). Se puede deducir que modificaciones estructurales severas, como puede ser la adición de grupos voluminosos o, incluso, los grados

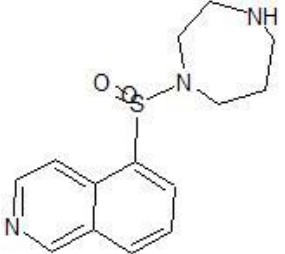
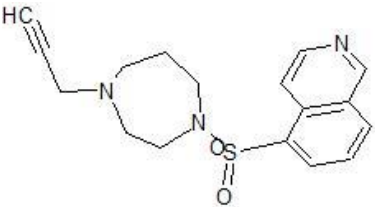
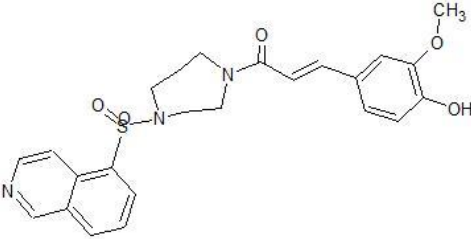
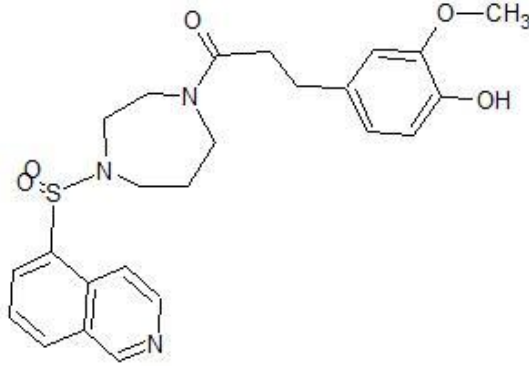
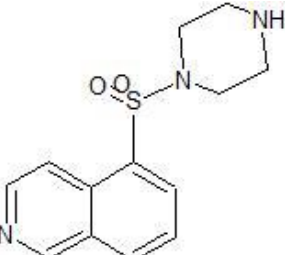
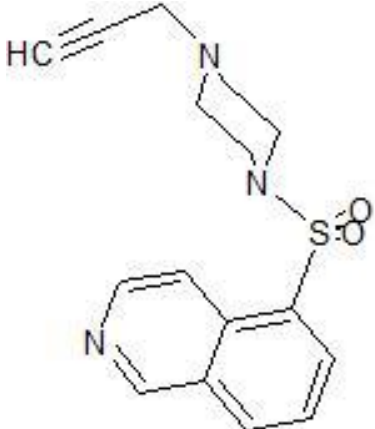
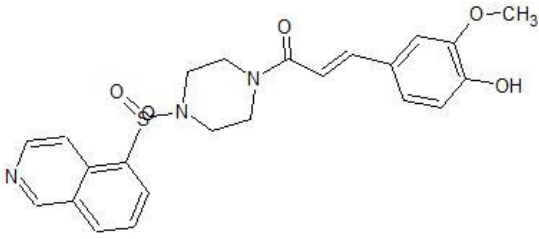
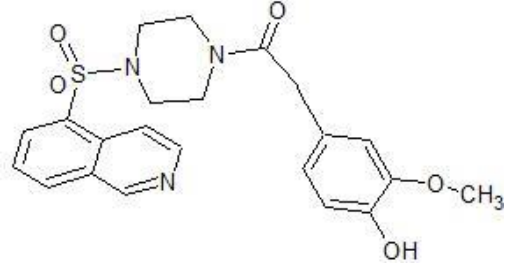
	<b>Fasudil</b>	<b>Fasudil-MAO</b>	<b>Fasudil-Ferúlico</b>	<b>Fasudil-Ferúlico hidrogenado</b>
Anillo de homopiperazina				
		<b>FM7</b>	<b>FFD7</b>	<b>FFH7</b>
Anillo de piperazina				
		<b>FM6</b>	<b>FFD6</b>	<b>FFH6</b>

Tabla 1: Modificaciones realizadas



libres de torsión o flexibilidad de los mismos, afectan radicalmente a los datos de energía de enlace.

PROTEINA	DOCKING	LIGANDO	ENERGIA DE ENLACE (KJ/mol)									
ROCK	1	FASUDIL	-9,81	-9,8	-9,8	-9,79	-9,79	-9,79	-9,79	-9,78	-9,5	-9,27
	2	F6	-9,41	-9,4	-9,38	-9,38	-9,36	-9,03	-9,01	-8,97	-8,86	-8,71
	3	FM7	-9,67	-9,66	-9,61	-9,59	-9,56	-9,52	-9,43	-9,09	-9,08	-8,83
	4	FM6	-8,88	-8,79	-8,79	-8,77	-8,75	-8,72	-8,7	-8,7	-8,7	-8,54
	5	FFD7	-7,68	-7,3	-6,97	-6,86	-6,65	-6,54	-6,54	-5,72	-3,55	-3,51
	6	FFD6	-6,88	-6,51	-6,37	-4,56	-3,42	-2,94	-2,3	-1,08	-0,2	-0,18
	7	FFH7	-8,89	-8,57	-7,89	-7,83	-7,81	7,78	-7,78	-7,68	-7,6	-7,12
	8	FFH6	-7,39	-7,34	-6,82	-6,75	-6,75	-6,69	-6,67	-6,65	-6,64	-5,73
MAOA	9	CLORGLINA	-4,79	-4,74	-4,71	-4,29	-4,03	-4,02	-3,84	-3,79	-3,78	-3,77
	10	FM7	-7,28	-7,23	-7,22	-7,22	-7,22	-7,22	-7,21	-7,19	-7,18	-6,87
	11	FM6	-7,19	-7,19	-7,14	-7,07	-6,93	-6,81	-6,79	---	---	---
MAOB	12	RASAGILINA	-6,8	-6,79	-6,79	-6,79	-6,67	-6,67	-6,66	-6,61	-6,6	-6,59
	13	FM7	-10,03	-10,02	-10,02	-10,01	-10,0	-9,98	-9,69	-9,36	-9,17	-8,95
	14	FM6	-9,54	-9,53	-9,51	-9,51	-9,49	-9,42	-9,4	-8,96	-8,94	-8,94

Tabla 2: Resultados obtenidos tras la realización del Docking

Acerca de los datos de la monoamino oxidasa, tanto en la isoforma A como en la B, se observa una mejora en los resultados de energía de enlace respecto a los datos seleccionados de referencia (docking 9 y 12, respectivamente), lo que implica una mayor capacidad de inhibición (dockings 10, 11, 13 y 14).

## 5. Discusión

Es interesante cómo la aplicación de ciertas herramientas moleculares informáticas, desarrolladas en las últimas décadas, pueden aportarnos tanta información. En primera instancia, se han obtenido los grupos farmacóforos de cada ligando permitiendo la posterior variación de la estructura de diversas moléculas sin variar las zonas esenciales para que la actividad biológica se lleve a cabo. Estas variaciones se han realizado correctamente, ya que la actividad del propio ligando no se ha visto disminuida radicalmente.

Tras las modificaciones, se ha procedido a realizar los dockings necesarios. Son tan extensas las bases de datos que poseemos y tan precisos los algoritmos matemáticos utilizados, que los datos obtenidos pueden ser bastantes aproximados a la realidad, sintetizándose y estudiándose a nivel clínico solo los compuestos altamente eficaces, procesos que resultan altamente costosos.

Conforme los resultados obtenidos, las modificaciones en el fármaco de interés han sido satisfactorias teniendo, en algunos casos (FM7 y FM6), gran capacidad de formación del complejo ligando-receptor (incluso superior a los datos de referencia), traduciéndose en una posible mayor eficacia.

A pesar de la correcta descripción del grupo farmacóforo y la posible actividad de estas moléculas puestas a prueba, la obtención de estos datos se debe poner en perspectiva, limitando la generalización de los resultados obtenidos. Es decir, en el presente caso, el Fasudil junto con el radical ferúlico posee mayor energía de enlace respecto a la ROCK. En un principio, esto indica que no posee tanta actividad biológica. Pero, ¿y si la actividad captadora de radicales libres junto con su acción inhibitoria de la ROCK produce un efecto sinérgico y complementario, mejorando la sintomatología y la patología en general? Por ello, estos estudios sirven para la eliminación segura de ciertas moléculas, siendo recomendable la realización de numerosos estudios posteriores con los principios activos que sean interesantes, avalando dichas actividades y cuantificando las mismas.

En este caso, se habla de enfermedades neurodegenerativas, siendo el papel de la ROCK y de la MAO importante. Sin embargo, estas técnicas pueden ser aplicadas a otros niveles u otras zonas de estudios emergentes para el tratamiento de enfermedades multifuncionales como pueden ser desórdenes metabólicos o cáncer, pudiéndose instaurar como protocolos necesarios e imprescindibles en la investigación clínica.

## **6. Conclusión y perspectivas futuras**

Una implementación de las estrategias comentadas, a nivel global, con introducciones de datos, tanto teóricos como prácticos, de forma continua se trata de una alternativa perfectamente útil a nivel de realización de screening. Posteriormente, estas moléculas resultantes deben ser evaluadas in vitro e in vivo, observando su acción y actividad a nivel fisiológico, buscando su acción terapéutica.

Durante todo este proceso, un mejor conocimiento de las interacciones entre proteína-ligando ha sido obtenido, pudiendo utilizarse para el diseño de potentes moléculas inhibitorias.

En definitiva, a pesar de las dificultades y los retos que supone el uso de estas técnicas y su mejora, se trata de herramientas potentes, debido a su capacidad de análisis compleja, y útiles

desarrolladas que no deben ser olvidadas, suponiendo un avance en la búsqueda de tratamientos necesarios.

## 7. Bibliografía

- [1] D. A. Gschwend, A. C. Good, y I. D. Kuntz, «Molecular docking towards drug discovery», *J. Mol. Recognit.*, vol. 9, n.º 2, pp. 175-186, mar. 1996.
- [2] N. M. Mascarenhas y N. Ghoshal, «An efficient tool for identifying inhibitors based on 3D-QSAR and docking using feature-shape pharmacophore of biologically active conformation – A case study with CDK2/CyclinA», *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 43, n.º 12, pp. 2807-2818, dic. 2008.
- [3] A. Ece y F. Sevin, «The discovery of potential cyclin A/CDK2 inhibitors: a combination of 3D QSAR pharmacophore modeling, virtual screening, and molecular docking studies», *Med. Chem. Res.*, vol. 22, n.º 12, pp. 5832-5843, dic. 2013.
- [4] M. Kontoyianni, L. M. McClellan, y G. S. Sokol, «Evaluation of Docking Performance: Comparative Data on Docking Algorithms», *J. Med. Chem.*, vol. 47, n.º 3, pp. 558-565, ene. 2004.
- [5] J. M. S. Montero, «Molecular modeling methodologies in the design, synthesis and rational explanation of results», p. 17.
- [6] N. P. Macías, «Ligandos multidiana, una estrategia alternativa para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer», p. 171, 2017.
- [7] K. Nikolic *et al.*, «Drug Design for CNS Diseases: Polypharmacological Profiling of Compounds Using Cheminformatic, 3D-QSAR and Virtual Screening Methodologies», *Front. Neurosci.*, vol. 10, jun. 2016.
- [8] G. R. Zimmermann, J. Lehár, y C. T. Keith, «Multi-target therapeutics: when the whole is greater than the sum of the parts», *Drug Discov. Today*, vol. 12, n.º 1-2, pp. 34-42, ene. 2007.
- [9] J. Shi y L. Wei, «Rho Kinases in Cardiovascular Physiology and Pathophysiology: The Effect of Fasudil», *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, vol. 62, n.º 4, pp. 341-354, oct. 2013.
- [10] M. Chen, A. Liu, Y. Ouyang, Y. Huang, X. Chao, y R. Pi, «Fasudil and its analogs: a new powerful weapon in the long war against central nervous system disorders?», *Expert Opin. Investig. Drugs*, vol. 22, n.º 4, pp. 537-550, abr. 2013.
- [11] M. Shen *et al.*, «Discovery of Rho-kinase inhibitors by docking-based virtual screening», *Mol. Biosyst.*, vol. 9, n.º 6, p. 1511, 2013.

- [12] M. Takata *et al.*, «Fasudil, a rho kinase inhibitor, limits motor neuron loss in experimental models of amyotrophic lateral sclerosis: Fasudil and amyotrophic lateral sclerosis», *Br. J. Pharmacol.*, vol. 170, n.º 2, pp. 341-351, sep. 2013.
- [13] S. Satoh *et al.*, «Pharmacological profile of hydroxy fasudil as a selective rho kinase inhibitor on ischemic brain damage», *Life Sci.*, vol. 69, n.º 12, pp. 1441-1453, ago. 2001.
- [14] K. F. Tipton, «90 years of monoamine oxidase: some progress and some confusion», *J. Neural Transm.*, abr. 2018.
- [15] J. P. M. Finberg, «Update on the pharmacology of selective inhibitors of MAO-A and MAO-B: Focus on modulation of CNS monoamine neurotransmitter release», *Pharmacol. Ther.*, vol. 143, n.º 2, pp. 133-152, ago. 2014.
- [16] A. C. Tripathi, S. Upadhyay, S. Paliwal, y S. K. Saraf, «Privileged scaffolds as MAO inhibitors: Retrospect and prospects», *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 145, pp. 445-497, feb. 2018.
- [17] J. C. Martínez-Lazcano, M. C. Boll-Woehrlen, A. Hernández-Melesio, M. Rubio-Osornio, y M. A. Sánchez-, «Radicales libres y estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas», p. 16, 2010.
- [18] M. L. Díaz-Hung y M. E. González Fraguera, «El estrés oxidativo en las enfermedades neurológicas: ¿causa o consecuencia?», *Neurología*, vol. 29, n.º 8, pp. 451-452, oct. 2014.
- [19] E. Graf, «Antioxidant potential of ferulic acid», *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 13, n.º 4, pp. 435-448, oct. 1992.
- [20] I. Gulcin, «Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid)», *Toxicology*, vol. 217, n.º 2-3, pp. 213-220, ene. 2006.
- [21] T. C. Genaro-Mattos, Â. Q. Maurício, D. Rettori, A. Alonso, y M. Hermes-Lima, «Antioxidant Activity of Caffeic Acid against Iron-Induced Free Radical Generation—A Chemical Approach», *PLOS ONE*, vol. 10, n.º 6, p. e0129963, jun. 2015.
- [22] M. Jacobs *et al.*, «The Structure of Dimeric ROCK I Reveals the Mechanism for Ligand Selectivity», *J. Biol. Chem.*, vol. 281, n.º 1, pp. 260-268, ene. 2006.
- [23] L. De Colibus, M. Li, C. Binda, A. Lustig, D. E. Edmondson, y A. Mattevi, «Three-dimensional structure of human monoamine oxidase A (MAO A): Relation to the structures of rat MAO A and human MAO B», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 102, n.º 36, pp. 12684-12689, sep. 2005.
- [24] C. Binda *et al.*, «Crystal Structures of Monoamine Oxidase B in Complex with Four Inhibitors of the *N*-Propargylaminoindan Class», *J. Med. Chem.*, vol. 47, n.º 7, pp. 1767-1774,

mar. 2004.

[25] J. Chen, D. Swope, y K. Dashtipour, «Comprehensive review of rasagiline, a second-generation monoamine oxidase inhibitor, for the treatment of Parkinson's Disease», *Clin. Ther.*, vol. 29, n.º 9, pp. 1825-1849, sep. 2007.