



## XVIII Simposio Internacional Sobre Enfermedades Desatendidas

### IDENTIFICACIÓN DE UNA DROGA TRIPANOCIDA MEDIANTE EL EMPLEO DE ESTRATEGIAS COMBINADAS DE “VIRTUAL SCREENING”

Chantal Reigada<sup>1</sup>, Edward Valera<sup>1</sup>, Carla C. Avila<sup>2</sup>, Melisa M Sayé<sup>1</sup>, Mariana R. Miranda<sup>1</sup> y Claudio A. Pereira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Parasitología Molecular (LPM), Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari (CONICET-UBA).

<sup>2</sup>Departamento de análisis clínico y toxicológico, Universidad de San Pablo.

Email: chanreigada@hotmail.com

#### INTRODUCCIÓN

Las poliaminas, putrescina, espermidina y espermina son metabolitos esenciales para el funcionamiento celular y crecimiento del parásito *Trypanosoma cruzi*. En tripanosomátidos, son precursoras en la biosíntesis de tripanotión, fundamental para el equilibrio redox. Dado que *T. cruzi* es incapaz de sintetizar las poliaminas *de novo*, su disponibilidad intracelular depende exclusivamente del transporte. Por lo tanto, el transporte y el metabolismo de poliaminas son interesantes blancos terapéuticos contra la enfermedad de Chagas. Dentro de la familia multigénica de transportadores de aminoácidos y derivados del parásito (TcAAAP), se encuentra un transportador de poliaminas denominado TcPAT12. En el presente trabajo se identificó una droga tripanocida usando el TcPAT12 como blanco para el reposicionamiento de drogas mediante la combinación de técnicas *in silico* e *in vitro*.

#### MATERIALES Y MÉTODOS

Con el objetivo de identificar drogas que inhiban el transporte de poliaminas se usó la permeasa de estos compuestos TcPAT12 como blanco para el reposicionamiento de drogas mediante el empleo de técnicas *in silico* e *in vitro*. En primer lugar se realizó una búsqueda por similitud utilizando una base de datos de 3,000 drogas aprobadas por la FDA y el acetato de retinol como compuesto de referencia. Este compuesto, según reportes previos, en *Leishmania* spp. produce la disminución intracelular de poliaminas. Con las drogas obtenidas en la primera etapa y un modelo tridimensional del transportador TcPAT12 se realizó un análisis de “molecular docking”. Finalmente, se realizaron ensayos *in vitro* con epimastigotes y células infectadas con tripomastigotes de *T. cruzi*.

#### RESULTADOS

#### Búsqueda *in silico* de posibles inhibidores del transporte de poliaminas.

##### 1-“Screening” virtual basado en ligando.

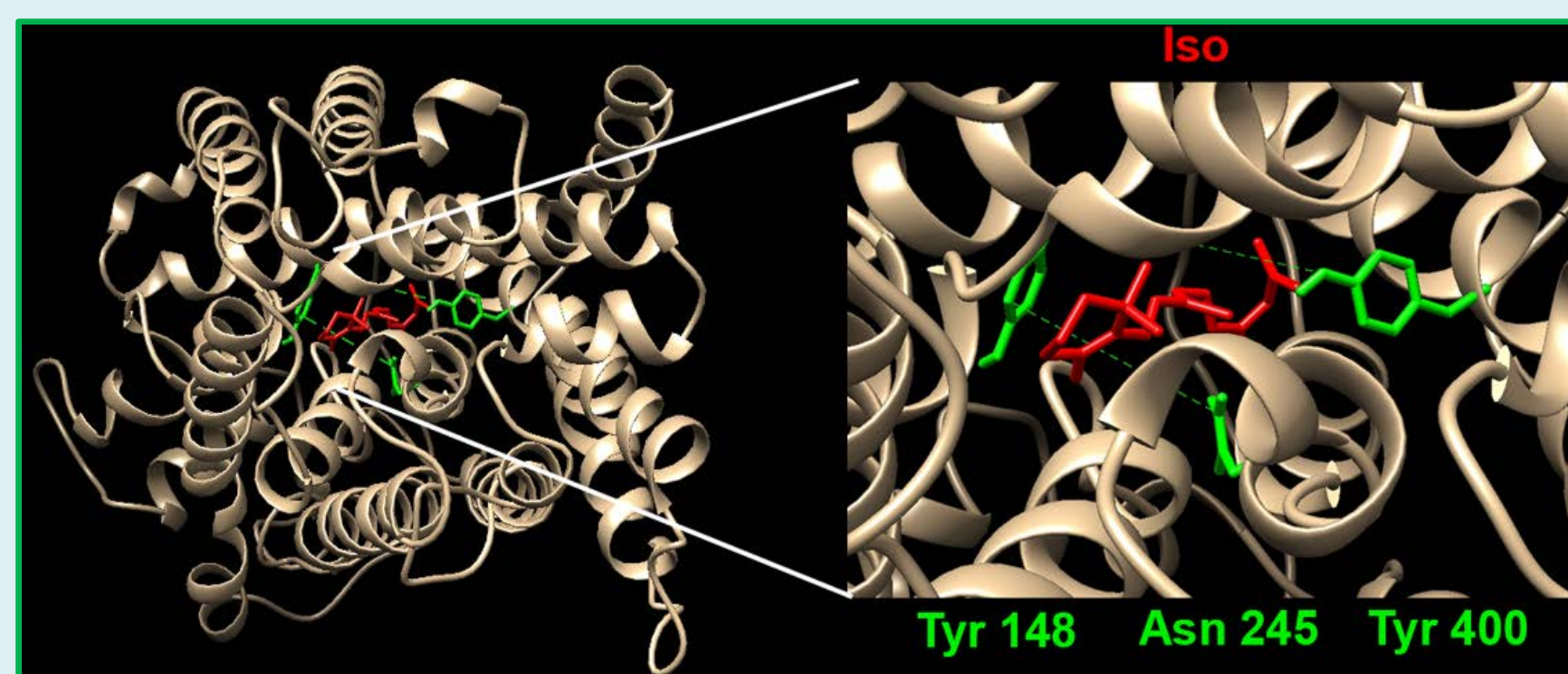
Se seleccionaron siete retinoides, usados en medicina, con mayor puntaje de similitud.

##### PUNTO DE PARTIDA

Acetato de retinol  
Disminuye [PA] *Leishmania*

LiSiCA (2D similitud) – ZINC DB  
(2924 compuestos aprobados-FDA)

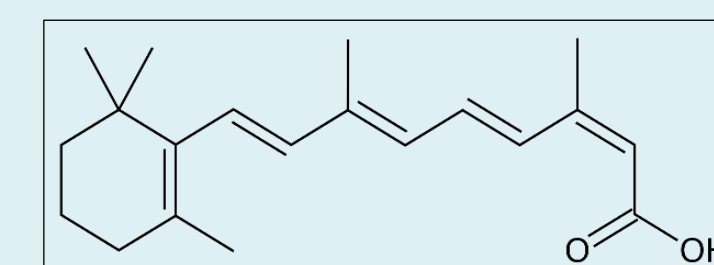
#	Compuesto
C1	Acitretina
C2	Alitretinoína
C3	Etretinato
C4	Isotretinoína
C5	Putrescina
C6	Retinal
C7	Ácido retinoico
C8	Retinol
C9	Acetato de retinol
C10	Espermidina



La estructura tridimensional de TcPAT12 se modeló usando como templado el transportador de aminoácidos de *E. coli* (AdiC) y datos de mutagénesis que establecieron el sitio de reconocimiento del sustrato. De acuerdo a los resultados de “docking” la isotretinoína (en rojo) se une al sitio de reconocimiento de poliaminas interaccionando con los residuos Asn 245, Tyr 148 y Tyr 400 (en verde) del TcPAT12.

##### 2-“Screening” virtual basado en receptor.

La isotretinoína presentó el menor valor de diferencia de energía libre (dG) y, considerando que se encuentra disponible y a un precio accesible, se seleccionó para realizar ensayos *in vitro*.



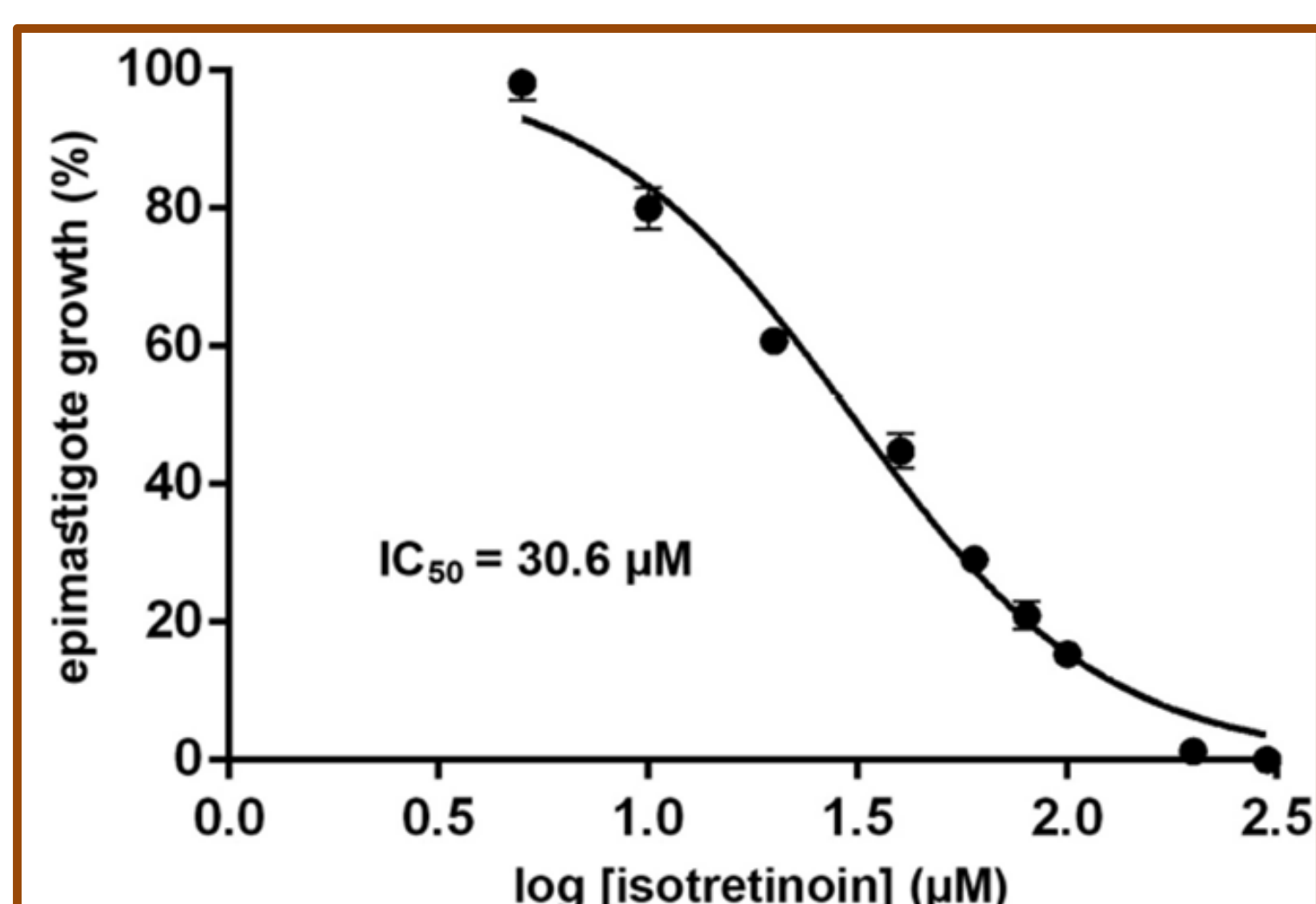
La isotretinoína (ácido 13-cis-retinoico) es un derivado de la vitamina A y se utiliza para el tratamiento de acné.

#### ISOTRETINOÍNA: ensayos *in vitro*.

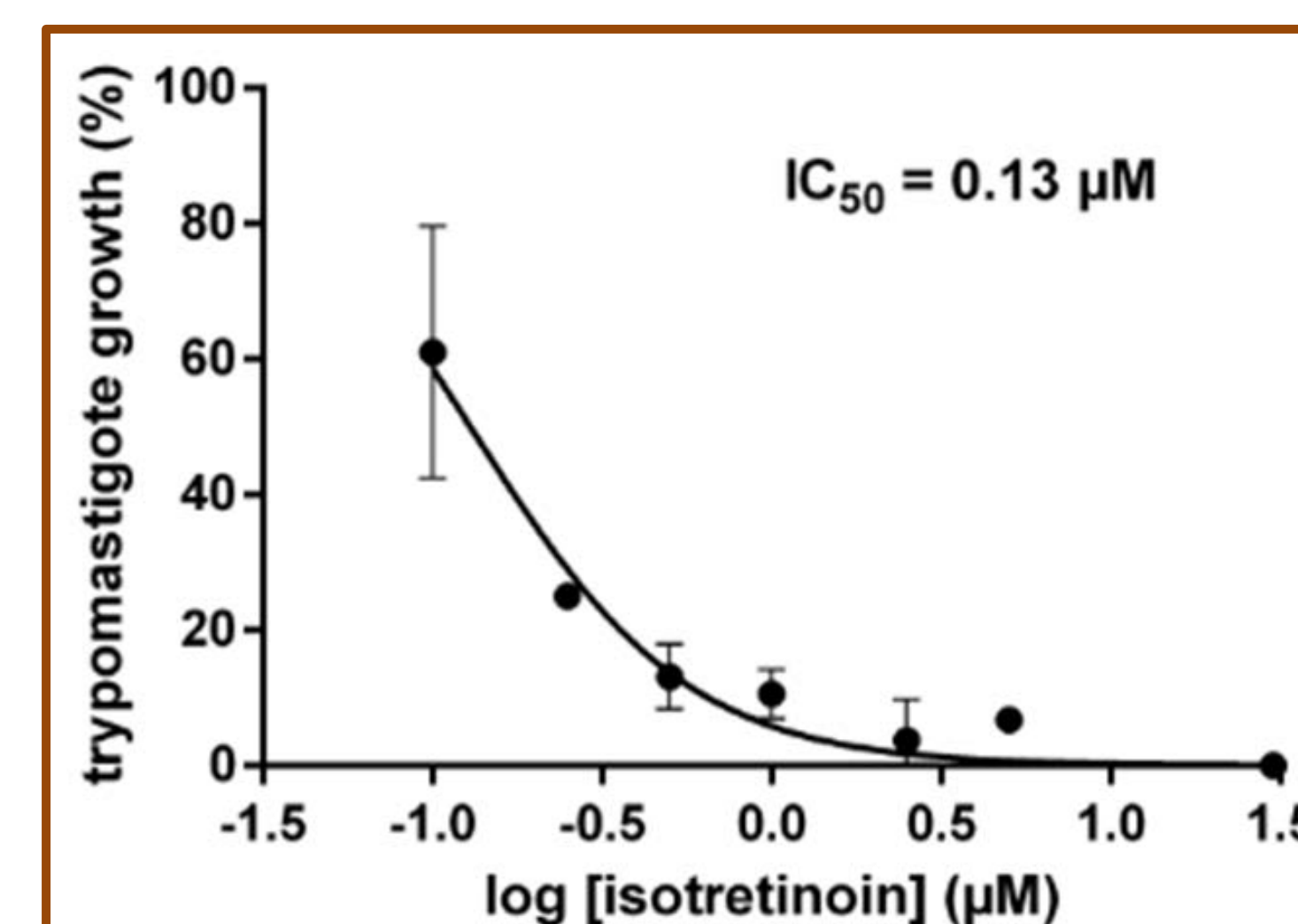
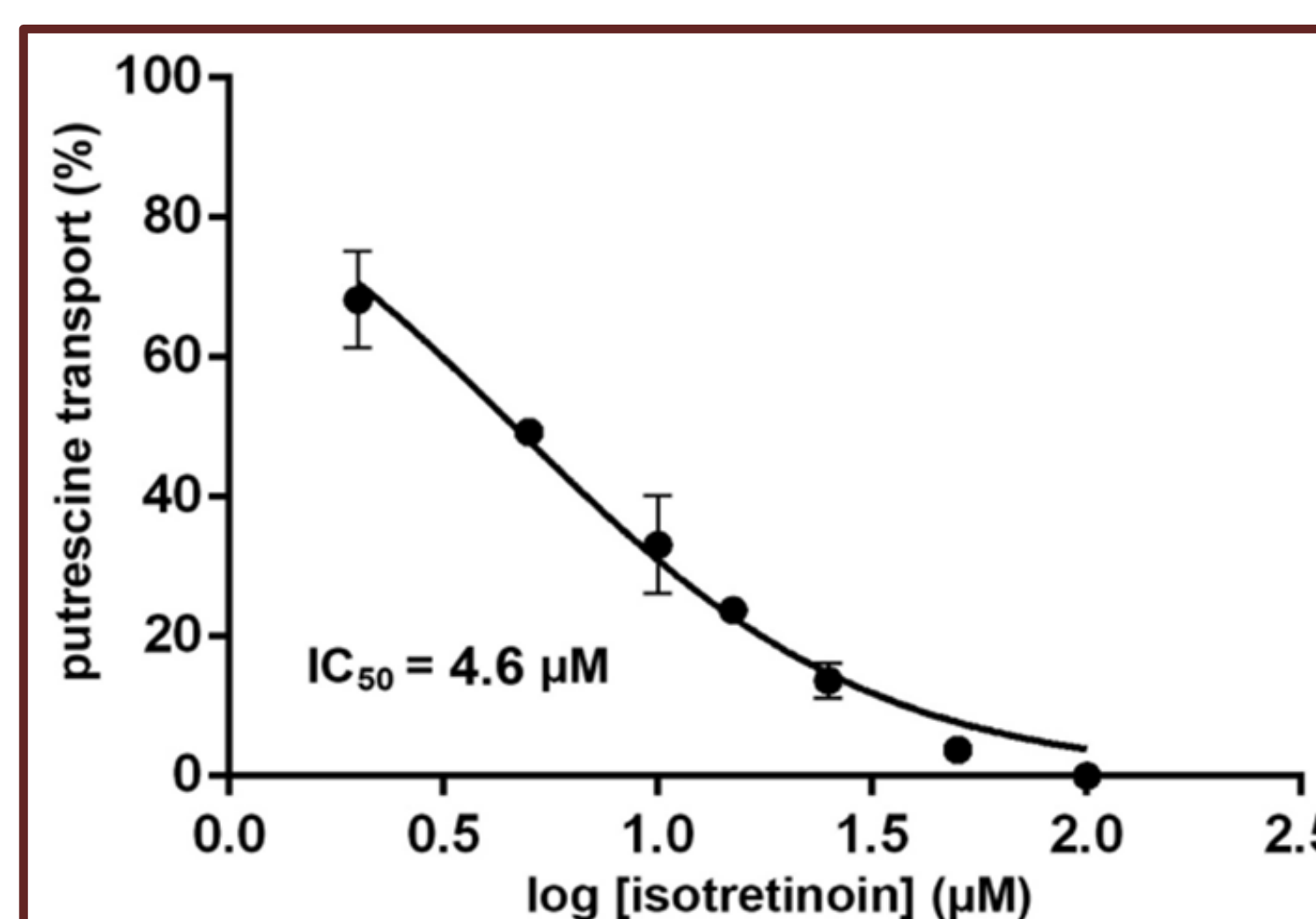
##### Efecto de la isotretinoína en el transporte de poliaminas.

Se evaluó la capacidad de la isotretinoína (0 a 100  $\mu\text{M}$ ) de inhibir el transporte de putrescina (100  $\mu\text{M}$ ) en epimastigotes de *T. cruzi*. Se obtuvo un valor de  $\text{IC}_{50}$  de 4,6  $\mu\text{M}$ .

La droga también inhibió los transportadores de aminoácidos de la misma familia del TcPAT12 (TcAAAP). Los valores de  $\text{IC}_{50}$  fueron entre 5 y 10  $\mu\text{M}$ .



##### Efecto de la isotretinoína en el crecimiento de *T. cruzi*.



Con el objetivo de analizar si la inhibición de poliaminas afecta la viabilidad de *T. cruzi*, se evaluó el efecto de la droga sobre el crecimiento de los estadios epimastigote y tripomastigote.

La isotretinoína mostró un efecto tripanocida fuerte en tripomastigotes con una  $\text{IC}_{50}$  de 130 nM. En cambio, en epimastigotes se obtuvo una  $\text{IC}_{50}$  mayor (30,6  $\mu\text{M}$ ).

El índice de selectividad (toxicidad en células / toxicidad en tripomastigotes) es de 920.

#### CONCLUSIONES

-Se identificó una droga tripanocida, isotretinoína, usando el TcPAT12 como blanco para el reposicionamiento de drogas mediante la combinación de técnicas *in silico* e *in vitro*.

-Se demostró que la droga inhibió el transporte de putrescina y de aminoácidos de la misma familia de proteínas al que pertenece TcPAT12, denominada TcAAAP.

- La droga presentó una fuerte actividad tripanocida en tripomastigotes, con un valor de  $\text{IC}_{50}$  de 130 nM. Resultó ser 25 veces más efectiva que las drogas nifurtimox y benznidazol.

-Estos resultados demuestran que la isotretinoína, aprobada por la FDA, es una droga prometedora para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

#### $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) Tripomastigotes de *T. cruzi*

Nifurtimox	2,8
Benznidazol	3,8
Isotretinoína	0,13

Efecto de las drogas que se utilizan para el tratamiento de la enfermedad de Chagas y de la isotretinoína en la viabilidad de tripomastigotes de *T. cruzi*.

El retinoide resultó ser 25 veces más efectivo que nifurtimox y benznidazol.