

## **Diseño Asistido por Computadora de Inhibidores de PLA2 de venenos de serpientes del NEA**

Gómez Chávez, José Leonardo – Lobón, Ignacio Exequiel – Angelina,  
Emilio Luis – Peruchena, Nélida María

Director de Beca: Angelina, Emilio Luis

Correo Electrónico: gomezleonardo721@gmail.com

Palabras Claves: Accidente Bothrópico, Dinámica Molecular, QTAIM,  
Cribado Virtual

---

### **-INTRODUCCIÓN:**

En nuestro país, los accidentes ofídicos son un grave problema de Salud Pública, siendo el género *Bothrops* responsable del 97% de los accidentes; la mayoría de los mismos notificados por las provincias del Nordeste y Noroeste, durante la temporada de verano.

Entre los componentes de los venenos uno de los principales responsables de los efectos sistémicos son las fosfolipasas A2 (PLA2) [1]. El manejo clínico de las mordeduras de serpientes venenosas sigue provocando controversia. Muchos de los efectos de la mordedura aparecen rápidamente y los antivenenos han demostrado tener limitaciones para neutralizarlos. Además, la administración de antiveneno tiene complicaciones potenciales como las reacciones de hipersensibilidad [2]. Por lo tanto, la búsqueda de nuevos inhibidores del veneno es de gran interés como complemento a la terapia con suero real.

El grupo Productos Naturales de la FACENA-UNNE, ha aislado y caracterizado una serie de derivados glicosilados de la quercetina, extraídos de las hojas de una planta autóctona del NEA que han mostrado actividad antiveneno en serpientes Bothrópicas particularmente en *Bothrops diporus* (Bd, yarará chica). Estos flavonoides son metabolitos secundarios ampliamente producidos en tejidos vegetales y por lo tanto son blancos adecuados para extracciones farmacéuticas. [3,4,5]

En este trabajo se aplicó un enfoque computacional basado en la estructura de la PLA2 de Bd para investigar las interacciones clave de estos derivados glicosilados de quercetina sobre PLA2 que permitan explicar la actividad antiveneno en ensayos *in vitro*.

El conocimiento adquirido en este estudio retrospectivo servirá para guiar la búsqueda de nuevos inhibidores mediante el cribado virtual (CV) de compuestos adquiribles comercialmente. Los mejores ranqueados serán comprados y probados experimentalmente para confirmar las predicciones computacionales.

### **-MATERIALES Y MÉTODOS:**

Las simulaciones de DM se llevaron a cabo con el paquete Amber14 [6]. Para acelerar las simulaciones se empleó la versión CUDA de Amber14, utilizando núcleos de GPU (Unidad de Procesamiento Gráfico) de una NVIDIA® Geforce GTX 970.

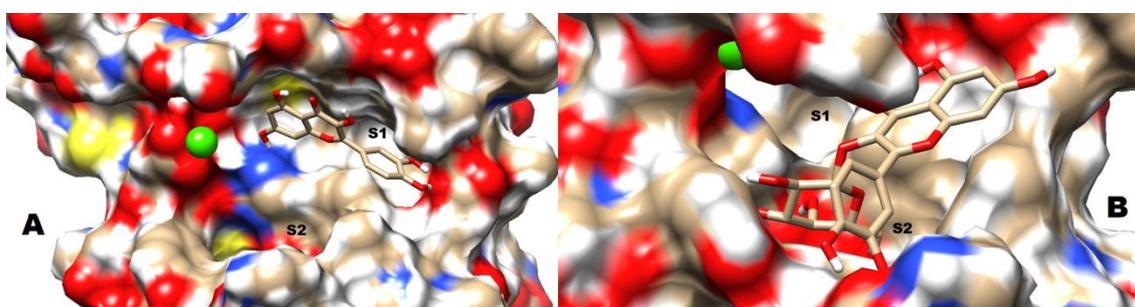
Los cálculos de Docking se llevaron a cabo con el programa AutoDock[7].

El análisis de densidad electrónica QTAIM se realizó con el software Multiwfn[8]. Los gráficos moleculares fueron representados con Pymol. La visualización de los fingerprint se realizó con el software R ([r-project.org](http://r-project.org)). Las interacciones de cada residuo del blanco molecular se ordenaron en una matriz en donde cada columna representa una interacción y cada fila un compuesto diferente.

## **-RESULTADOS Y DISCUSIÓN:**

### **Predicción del modo de unión de flavonoides:**

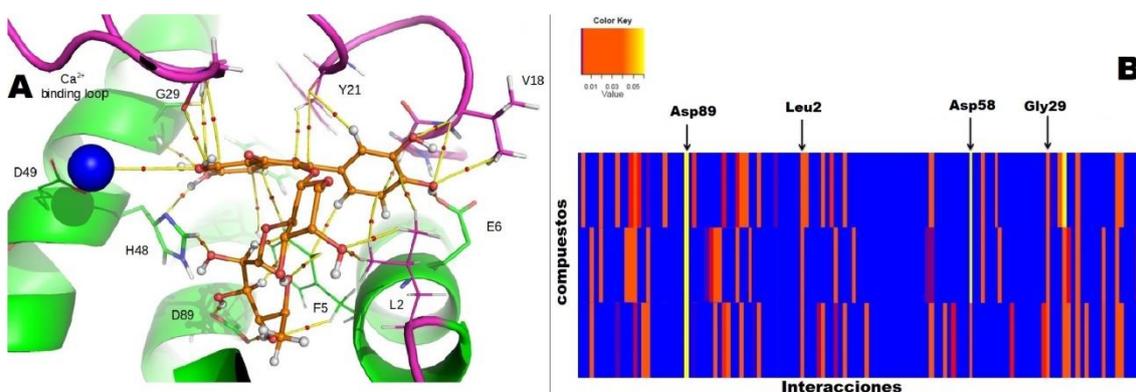
En primera instancia se realizaron simulaciones de dinámica molecular (DM) de los flavonoides glicosilados en el sitio de unión de PLA2. Se encontraron dos modos de unión posibles para estos flavonoides, quercetin driven (QD) y sugar driven (SD), donde la unión es guiada por quercetina o por el azúcar, respectivamente. (Figura 1)



**Figura 1:** (A) Modo de unión Quercetin Driven. La Quercetina guía la unión anclándose en el sub-bolsillo 1 (S1). (B) Modo de unión Sugar Driven de uno de los flavonoides glicosilados. El azúcar guía la unión anclándose en el sub-bolsillo 2 (S2). Ión  $Ca^{2+}$  representado en verde.

### **Análisis de las interacciones intermoleculares basado en la densidad electrónica.**

El análisis de la densidad electrónica en el complejo Proteína-Ligando permitió detectar interacciones interatómicas inusuales tanto por su naturaleza (inusuales) como por su fortaleza (débiles) que de otra forma pasarían inadvertidas en un análisis meramente geométrico. La Figura 2A muestra un grafo molecular de la densidad electrónica del complejo.

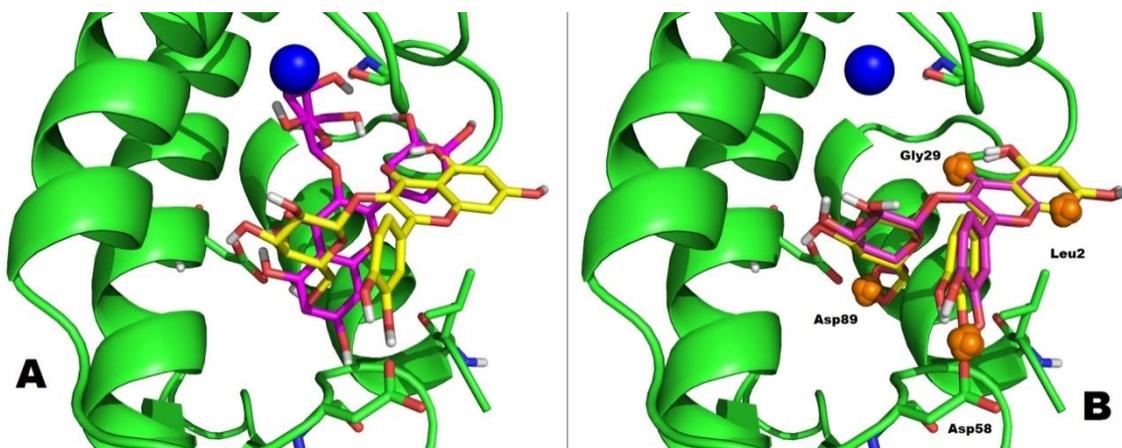


**Figura 2.** (A) Grafo molecular de unión SD de uno de los flavonoides glicosilados en el bolsillo de unión de PLA2. Los caminos de enlace y puntos críticos de enlace de las interacciones intermoleculares se muestran con líneas amarillas y círculos

rojos pequeños, respectivamente. En azul el ión  $Ca^{2+}$ . (B) Fingerprint de interacciones de los complejos SD. Cada columna representa las interacciones del blanco molecular con los átomos del ligando en una escala colorimétrica y cada fila un compuesto diferente.

### Redocking con Puntos Farmacofóricos

Las interacciones más relevantes y comunes a todos los complejos identificados en el análisis de los fingerprints (Figura 2B) fueron introducidos a modo de puntos farmacofóricos (PFs) en el algoritmo de docking para guiar las soluciones de los cálculos de docking. Los parámetros de estos PFs se ajustaron de manera de reproducir los modos de unión de los flavonoides glicosilados (docking retrospectivo). (Figura 3)



**Figura 3.** Poses de uno de los flavonoides glicosilados antes (A) y después (B) de la introducción de los PFs para SD. Modo de unión de referencia y pose de docking en amarillo y magenta, respectivamente. En magenta ligando proveniente del cálculo de docking conformacional. Con esfera azul se representa el ión  $Ca^{2+}$  y en naranja los PFs implementados para guiar el cálculo conformacional. Nótese como mejora la predicción al introducir los PFs.

Este protocolo de docking guiado obtenido con la información del estudio de las interacciones claves de la unión Ligando-PLA2 se implementará en una campaña de cribado virtual de bases de datos de compuestos con el objetivo de encontrar posibles nuevos candidatos a inhibidores.

### **-BIBLIOGRAFÍA:**

- [1] Meier, J. & White, J. (Eds). CRC Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons. (CRC Press Inc, 1995).
- [2] Hage-Melim LI, da Silva CH, Semighini EP, Taft CA, Sampaio SV, Computer-aided Drug Design of Novel PLA2 Inhibitor Candidates for Treatment of Snakebite (2009) J. Biomol. Struct. & Dyn.,27, 27-35.
- [3] Torres A. 2012. Caracterización quimotaxonómica de especies pertenecientes al género Nectandra en el Nordeste Argentino Evaluación de su potencial actividad antiveneno en accidentes provocados por Bothrops neuwiedi diporus (COPE) "yarará chica". Tesis de Doctorado. Universidad Nacional del Nordeste Especialidad Química.

[4] Torres A, Camargo F, Ricciardi G, Dellacassa E, Ricciardi A. Neutralizing effects of *Nectandra angustifolia* extracts against *Bothrops neuwiedi* snake venom (2011) *Nat. Prod. Comm.* 6,1393-1396.

[5] Dellacassa E., Torres A., Ricciardi G., Camargo F., Tressens S., Ricciardi A. Anti-venom Activity of Medicinal Plants from South America. Vol. 2 the book series *Utilisation and Management of Medicinal Plants*. Daya Publication House, New Delhi, 2013.

[6] Case, A.D. et al. (2015), *AMBER 2015*, University of California, San Francisco.

[7] Morris, G. M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* 30, 2785–2791 (2009).

[8] T. Lu, F. Chen, Multiwfn: a multifunctional wavefunction analyzer, *J Comput Chem* 33(5) (2012) 580-92.

**-AVAL DEL RESUMEN EXTENDIDO**