

MODELO COMPUTACIONAL PARA LA PREDICCIÓN DE ACTIVIDAD ANTICONVULSIVA MEDIANTE BLOQUEO DE CANALES DE SODIO

Pablo Palestro, Maria Luisa Villalba, Andrea Enrique, Luciana Gavernet, Luis Enrique Bruno-Blanch.

Cátedra de Química Medicinal, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. Calle 47 s/n. La Plata. C.P 1900. pablopalestro@biol.unlp.edu.ar

Introducción:

La epilepsia es uno de los desórdenes neurológicos crónicos de mayor prevalencia en el mundo, afectando alrededor de 50 millones de personas.[1] Se caracteriza por descargas eléctricas excesivas, súbitas, de grupos de células cerebrales, produciendo manifestaciones sintomáticas muy variadas, dependiendo del sitio del cerebro en el que se originan, denominadas crisis epilépticas.

Los canales iónicos son proteínas expresadas en la membrana plasmática de las células. Su función es regular el flujo de cationes y aniones, principalmente Na⁺, K⁺, Ca⁺² y Cl⁻. [2] Estas proteínas forman poros que sufren cambios conformacionales rápidos entre estados cerrados, no permeables y abiertos. El funcionamiento anómalo de los canales da lugar a patologías del sistema nervioso central, entre ellas la epilepsia.

La acción anticonvulsiva asociada al bloqueo de canales de sodio voltaje dependientes resulta un buen punto de partida para el descubrimiento de nuevas drogas.

Aunque ún no se ha logrado dilucidar experimentalmente la estructura del canal de sodio humano, si se encuentran disponibles diversas estructuras de canales de sodio bacterianos en la base de datos Protein Data Bank.[3] Estos canales bacterianos están compuestos por 4 subunidades idénticas, mientras que los canales de sodio de mamíferos están formados por 4 dominios no idénticos de una misma proteína.

En el presente trabajo se construyó un modelo tridimensional del canal de sodio humano Nav1.2 en su conformación abierta a partir de las estructuras de los canales de sodio disponibles.[3] Se postula que los anticonvulsivos se unen al canal de sodio con mayor afinidad por el estado inactivado (abierto pero no permeable). Con este se realizó un análisis de las interacciones, mediante herramientas computacionales, de derivados de sulfamidas con acción anticonvulsiva obtenidos en nuestro laboratorio (los cuales presentaron actividad en estudios in-vivo "MES-test") con la intención de inferir el posible mecanismo de acción vinculado a esta actividad.

Metodología:

El modelo tridimensional del canal de sodio se realizo mediante el software MODELLER[4], utilizando como moldes la estructura cristalográfica del canal de Sodio NavAb de *Arcobacter butzleri* (3RVY) y del canal de Sodio NaK de *Bacillus cereus* (3E86), en estado cerrado y abierto respectivamente. La superposición de las conformaciones cerrada y abierta de NaK demuestra que las mayores diferencias entre ambas se dan en la zona interna del poro, debajo del filtro de selectividad, mientras que las regiones en torno a este último se mantienen en las mismas posiciones. Comparaciones entre NavAb y NaK muestran que la zona del filtro de selectividad presenta diferencias significativas en cuanto a la estructura secundaria adoptada. Teniendo en cuenta estas diferencias, se reemplazo el segmento S6 (segmento que conforma el poro del canal) de la estructura NavAb (estado cerrado) por el

correspondiente a NaK en estado abierto. Esta estructura fue utilizada como molde para la generación del canal abierto mediante alineamiento de su secuencia con la correspondiente a cada dominio del canal. El modelo obtenido fue minimizado mediante mecánica molecular con el software AMBER11[5], con el fin de resolver posibles malos contactos que generen repulsión estérica. Esta, finalmente, se utilizó para evaluar la afinidad del canal con derivados de sulfamidas desarrollados en nuestro laboratorio mediante la técnica de docking molecular. La misma se llevo a cabo mediante el software AUTODOCK VINA[6] donde el sitio activo se centro en la zona de los residuos F1754-Y1759 con un tamaño de 20x20x20 Angstroms. Para validar el método se utilizaron 2 conjuntos de compuestos obtenidos de la base de datos ZINC[7]. Un conjunto de compuestos con alta afinidad de unión (activos en ensayos de unión a concentraciones menores o iguales a 10 micromolar) sobre el canal Nav1.2[8] y otro conjunto de compuestos obtenidos a partir de la búsqueda de estructuras similares a compuestos con baja afinidad de unión (Deprenilo, gabapentina, mecamilamina, moclobemida, nialamida, procainamida, tiaprida y topiramato). El desempeño del modelo se analizó tomando como referencia la conformación de menor "score" obtenida en el docking para cada compuesto y evaluando estos resultados mediante el uso de curvas ROC (receiver operating characteristic).[9]

Resultados:

El gráfico de Ramachandran correspondiente al modelo de la estructura de Nav1.2 abierta muestra un 91.9% de los residuos aminoácidos dentro de zonas permitidas, mientras que un 76.8% se encuentra en zonas favorables.

En la validación del modelo de docking se utilizaron 495 compuestos, de los cuales 180 presentan una alta afinidad al canal de sodio y 315 fueron seleccionados por su similitud con compuestos poco afines. La curva ROC de estos compuestos mostró un área bajo la curva de 0.91, obteniéndose como mejor punto de corte el valor de -8.1 (Sensibilidad: 0.88 y Especificidad: 0.8).

Resultados preliminares muestran que algunas de las sulfamidas preparadas presentan una fuerte interacción con el sitio de unión del canal de sodio. Estos datos nos permitirían inferir que la acción anticonvulsiva de estos compuestos podría estar asociada a la inhibición de Nav1.2.

Conclusiones:

A partir de los resultados de la validación, consideramos que el modelo desarrollado es capaz de predecir correctamente entre compuestos con alta afinidad al canal de aquellos con nula o escasa afinidad por el mismo.

Dado que los resultados obtenidos han sido contrastados con estudios "in-vivo" de actividad anticonvulsiva, creemos que es necesario realizar ensayos biológicos mas específicos para corroborar la hipótesis de su acción a través del bloqueo de canales de sodio.

Referencias:

1. WHO. *Fact sheet number 999: Epilepsy (2012)*.
2. Stefan H., et al.; *Pharm. & Therapeutics 2007, 113, 165–183*.
3. <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
4. Sali, A., et al.; *J. Mol. Biol. 1993, 234, 779–815*
5. Case D. A., et al.; Amber 11, University of California, San Francisco, Calif, USA, 2010.
6. Trott, O., et al. *Journal of computational chemistry, 2010, 31(2), 455–461*.
7. Irwin, S. et al., *J. Chem. Inf. Model. 2012*

8. http://zinc.docking.org/targets/SCN2A_HUMAN
9. Triballeau, N., et al. *Journal of medicinal chemistry*, 2005, 48(7), 2534-47.