

Acoplamiento molecular sobre la proteína dUTPasa de *Trypanosoma cruzi* para el descubrimiento de inhibidores en el tratamiento de la enfermedad de Chagas

John Alexander Torres Lemus^{1,2a}, Ángela Patricia Rojas Rojas^{1,2b}, Fabián López-Vallejo^{3c}

¹ Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Carrera 45 N.º 26-85, Bogotá D. C., Colombia.

² Grupo de Investigación Biología Celular y Autoinmunidad, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Carrera 45 N.º 26-85, Bogotá D. C., Colombia.

³ Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Carrera 45 N.º 26-85, Bogotá D. C., Colombia.

Correos electrónicos:

^a joatorresle@unal.edu.co

^b aprojasr@unal.edu.co

^c fhlopezv@unal.edu.co

Recibido: 25 de noviembre de 2020

Revisado: 9 de abril de 2021

Aceptado: 13 de abril de 2021

RESUMEN

Introducción: la enfermedad de Chagas es endémica de las zonas tropicales de América Latina y presenta una importante prevalencia, sin embargo, existen pocos tratamientos disponibles en el mercado por lo que la búsqueda de moléculas con potencial farmacológico que actúen en el parásito *Trypanosoma cruzi*, causante de la enfermedad, es necesaria considerando las graves complicaciones. **Objetivo:** evaluar las potenciales proteínas blanco, disponibles en la base de datos de PDB considerando como parámetro inicial, la similitud con proteínas humanas e identificar potenciales inhibidores del blanco elegido por medio de acoplamiento molecular. **Metodología:** se realizó una evaluación de las proteínas del parásito por medio de alineamiento de secuencias y posteriormente un cribado virtual por acoplamiento molecular con bases de datos y recursos informáticos disponibles en el Centro de Cómputo Avanzado de la Universidad de Texas (TACC), y se evaluaron los mejores resultados en función de afinidad, farmacocinética y toxicidad. **Resultados:** el

blanco molecular elegido fue la dUTPasa. Posterior al cribado virtual se seleccionaron 12 moléculas que presentan potencial inhibidor de estas, la 4-{3-[3-(trifluorometil)fenil]isoxazol-5-il}pirimidin-2-amina es una de las moléculas con mejor perfil para convertirse en candidato en el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

Palabras claves: Cribado virtual, acoplamiento molecular, chagas, *T. cruzi* dUTPasa.

SUMMARY

Molecular docking of the *Trypanosoma cruzi* dUTPase for identification of inhibitors in Chagas disease treatment

Introduction: Chagas disease is endemic to the tropical areas of Latin America and has an important prevalence, however, there are few treatments available in the market, so the search for molecules with pharmacological potential that can act in the same way as the disease, it is necessary considering the serious complications.

Aim: to evaluate the possible target proteins available in the PDB database, considering the similarity with human proteins as an initial parameter and identify potential inhibitors of the chosen target using molecular docking. **Methodology:** an evaluation of the parasite proteins was carried out by means of sequence alignment and subsequently a virtual molecular coupling screening was performed with databases and computer resources available at Centro de Cómputo Avanzado de Universidad de Texas (TACC), and the best results were evaluated based on affinity, pharmacokinetics, and toxicity. **Results:** the molecular target chosen was the dUTPase. After virtual screening, 12 moles showing inhibitory potential were selected of these, 4-{3-[3-(trifluoromethyl) phenyl] isoxazole-5-yl} pyrimidine-2-amine is one of the molecules with the best profile to become a candidate in the treatment of Chagas disease.

Keywords: Virtual screening, molecular docking, chagas disease, *T. cruzi* dUTPase.

RESUMO

Docking molecular da dUTPase do *Trypanosoma cruzi* para identificação de inibidores no tratamento da doença de Chagas

Introdução: a doença de Chagas é endêmica das áreas tropicais da América Latina e possui importante prevalência, porém, poucos são os tratamentos disponíveis no mercado, por isso a busca por moléculas com potencial farmacológico que possam

atuar da mesma forma que a doença, é necessário considerando as complicações graves. **Objetivo:** avaliar as possíveis proteínas-alvo disponíveis na base de dados do PDB, considerando a similaridade com proteínas humanas como parâmetro inicial e identificação de potenciais inibidores do alvo escolhido por meio de acoplamento molecular. **Metodologia:** uma avaliação das proteínas do parasita foi realizada por meio de alinhamento de seqüências e posteriormente foi realizada uma triagem de acoplamento molecular virtual com bancos de dados e recursos computacionais disponíveis no Centro de Cômputo Avanzado de Universidad de Texas (TACC), e os melhores resultados foram avaliados com base na afinidade, farmacocinética e toxicidade. **Resultados:** o alvo molecular escolhido foi a dUTPase. Após a triagem virtual, 12 moles mostrando potencial inibitório foram selecionados destes, 4- {3- [3- (trifluorometil) fenil] isoxazol-5-il} pirimidina-2-amina é uma das moléculas com o melhor perfil para se tornar um candidato no tratamento da doença de Chagas.

Palavras-chave: Triagem virtual, docking molecular, doença de chagas, *T. cruzi* dUTPase.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es causada por el parásito protozoo *Trypanosoma cruzi*. Es endémica de América Latina, donde afecta a 21 países y es reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las 17 enfermedades tropicales desatendidas en el mundo [1]. La enfermedad es transmitida por la subfamilia *Triatominae* de la chinche, de la cual 123 especies son conocidas por ser vectores naturales del parásito. Además de esto, la enfermedad también se expande geográficamente debido a la migración del vector por el cambio climático y, sin embargo, las opciones de tratamiento siguen siendo limitadas e ineficaces [2, 3]. Estas consisten en dos fármacos utilizados desde la década de los 70, nifurtimox y benznidazol [4]; ambos se activan por medio de una nitrorreductasa tipo I dependiente de NADH localizada a nivel mitocondrial y se ha demostrado que la disminución de la actividad de esta enzima juega un papel importante en la resistencia a estos tratamientos [5]. Además de esto, Nifurtimox es un fármaco de estrecho margen terapéutico y el tratamiento puede presentar reacciones adversas tales como: neuropatía periférica y depresión de médula ósea que pueden ser severas y acompañarse de fiebre, inflamación ganglionar y edema que corresponden a síntomas de hipersensibilidad a antimicrobianos [6].

Existen diferentes proteínas del parásito que pueden ser blancos moleculares para el desarrollo de nuevos fármacos en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. En las últimas décadas se han estudiado diferentes rutas metabólicas del parásito que pueden ser moduladas para obtener resultados terapéuticos tales como las de la biosíntesis de

ergosterol y los sistemas enzimáticos redox [7]. También se han estudiado proteínas involucradas en la adhesión a las células del huésped como la transialidasa [8] y otras proteínas como la tripanotión reductasa y la superóxido dismutasa que actúan protegiendo al parásito del daño generado por las especies reactivas del oxígeno [9]. Sin embargo, no se han logrado descubrir ni diseñar inhibidores potentes de estas enzimas [8]. Estrategias adicionales se han usado para el descubrimiento de nuevos fármacos entre las que se incluye el modelado *in silico* de proteínas del parásito homólogas a proteínas de función conocida en otras especies [10], presentándose las desventajas derivadas de no disponerse de estructura cristalizada. También se han evaluado compuestos de actividad farmacológica conocida para inhibir rutas metabólicas específicas como la biosíntesis de ergosterol, la glucólisis, el metabolismo del pirofosfato, entre otras rutas [11]; así mismo, presentándose desventajas como la alta probabilidad de manifestación de eventos adversos, por lo tanto, la evaluación y aproximación a nuevos blancos moleculares resulta necesaria para el desarrollo de tratamientos adecuados.

La dUTPasa (desoxiuridina trifosfato nucleótido hidrolasa) es una enzima que cataliza la reacción de ruptura hidrolítica del dUTP (desoxi uridin trifosfato) generando pirofosfato y dUMP (desoxi uridin monofosfato) como productos. La función de esta enzima es necesaria para generar los sustratos de la timidilato sintasa que es la responsable de la síntesis de dTMP (desoxi timidin monofosfato) y por lo tanto está relacionada con el aporte del nucleótido timina para la síntesis del ADN. En organismos eucariotas existen vías adicionales para sintetizar los sustratos de la enzima timidilato sintasa, por lo que en estos organismos es de especial importancia una segunda función de la dUTPasa que consiste en mantener el dUTP en muy bajas cantidades evitando que este nucleótido se adicione equivocadamente al ADN. La ADN polimerasa no puede diferenciar entre el dUTP y el dTTP (desoxi timidin trifosfato), por esto, se necesita que la proporción de estos nucleótidos se encuentre en órdenes de $1:1 \times 10^5$, con el objetivo de que el sustrato principal en la síntesis del ADN sea el dTTP y no se adicione uracilo al ADN [12, 13]. Cuando la cantidad de dUTP aumenta se facilita el ingreso de uracilo al ADN con lo que se inician mecanismos de ruptura y reparación que terminan con una fragmentación del ADN y muerte celular [12]; se ha demostrado que el bloqueo o el inadecuado funcionamiento de esta enzima lleva a letalidad en los organismos [14].

El grupo más común de dUTPasas, distribuidas en organismos desde mamíferos hasta bacterias y retrovirus, corresponden a un grupo de proteínas homotriméricas, compuestas fundamentalmente de hojas plegadas beta y presentan cinco dominios conservados localizados en las interfases de las subunidades donde se constituyen los sitios activos [15]. La dUTPasa de *T. cruzi*, por el contrario, es una proteína dimérica que no presenta ninguno de los 5 dominios conservados en los sitios de acción de las

proteínas homotriméricas y constituye una familia de secuencias diferentes en relación tanto a las proteínas monoméricas como las triméricas [16]. Se ha demostrado que la expresión de la dUTPasa es fundamental en *Leishmania major* y debido al alto grado de similitud de esta proteína entre tripanosomátidos se puede extrapolar la importancia a otros parásitos de la familia como *T. cruzi* [16].

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección del blanco

Se realizó una búsqueda de las proteínas cristalizadas usando el parámetro “*Trypanosoma cruzi*” en la base de datos del Protein Data Bank (PDB) y una selección basada en el menor porcentaje de similitud con proteínas humanas. Se tomaron secuencias en formato Fasta y se realizó el alineamiento de cada una usando la herramienta básica de búsqueda de alineamiento local para proteínas pBLAST” del Centro Nacional de Información Biotecnológica de Estados Unidos NCBI. Se eligió la base de datos psitKB/Swiss-Prot (swissprot) ya que esta es una base de datos exhaustiva y de alta calidad que abarca todas las secuencias tanto caracterizadas como inferidas disponibles públicamente [17]. En los parámetros del algoritmo, considerando el objetivo de la búsqueda, se usó la matriz de alineamiento BLOSUM 62, ya que esta matriz es superior que las matrices PAM para evaluación de homología y presenta mejores resultados comparativamente con BLOSUM 45 y BLOSUM 80 [18]. Se seleccionó el organismo *Homo sapiens*, se estableció un costo de brecha de 11 por existencia y 1 por extensión.

Los resultados se analizaron evaluando los valores de *query cover* e identidad obtenidos de los alineamientos, se tomó de base un umbral máximo de 10 % en el *query cover* para analizar las proteínas que cumplieran con porcentajes inferiores a ese valor. Se revisó la importancia biológica de la vía en la que actúa la enzima y si se habían conducido estudios que buscaran inhibidores de estas. Luego de esto, se realizó un análisis del sitio activo de la proteína; se corrió un protocolo de alineamiento PSI-BLAST y se compararon los resultados del pBLAST y el PSI-BLAST en las secuencias alineadas con los aminoácidos del sitio activo de la proteína para evaluar si se encontraban similitudes entre estos y evaluar la viabilidad de la proteína como blanco.

Análisis y preparación del blanco

Se evaluaron las estructuras cristalizadas de la proteína blanco elegida y se realizó la elección para el proceso de cribado, considerando que dicha estructura tuviera las subunidades en las que se encuentra el sitio activo y el ligando cristalizado. Posteriormente,

se revisó el reporte de validación de la estructura y se realizó la preparación de la misma usando el *software* maestro 11.3 de Schrödinger; para esto, se establecieron condiciones de pH de 7,3 para determinar los estados de protonación de las cadenas laterales ya que estas son las condiciones de pH a las que se encontrará la proteína en el parásito [19]; se evaluaron los residuos en los que se presentaban problemas en las cadenas laterales y se optimizaron. Luego de esto, la proteína procesada se llevó al *software* AutoDockTools-1.5.6 de Scripps donde se calcularon cargas atómicas parciales y se eliminó el ligando cristalizado para tener la estructura final que se sometió al proceso de cribado.

Considerando que la plataforma DrugDiscovery del Centro de Cómputo Avanzado de la Universidad de Texas (TACC) usa el sistema AutoDock Vina para realizar cribado virtual [20], se validó el método de acoplamiento realizando un reacoplamiento *in house* del ligando endógeno de la proteína usando el mismo *software* de cribado. Inicialmente, se usó AutoDockTools para determinar la posición tridimensional del ligando, se estableció el tamaño y las posiciones x , y y z del centro del grid en el sitio activo, el cual abarca la totalidad de este. De acuerdo con esto, los valores definitivos usados para el grid fueron: Centro x : 9779, Centro y : 3585, Centro z : 55 438; 68 puntos en dimensión x , 64 puntos en dimensión y , 66 puntos en dimensión z .

Luego se usó el *software* maestro para diseñar la estructura del ligando endógeno y se llevó dicha estructura al *software* MarvinSketch versión 18.24 de ChemAxon para determinar los estados de protonación y cargas parciales de la molécula a las condiciones de pH ya mencionadas, según los resultados de la especie mayoritaria a pH 7,3; se ajustaron cargas de la estructura en maestro y se llevó al *software* AutoDockTools para determinar enlaces rotables y cambiar formato de archivo para el proceso de acoplamiento. Con los archivos de ligando y proteína preparados se realizó el proceso de reacoplamiento usando los tamaños de grid y centros determinados previamente y se usó un valor de exhaustividad de 100; se realizó el proceso de acoplamiento del ligando móvil usando el *software* AutoDock Vina (Scripps) [21].

Se calculó el valor de desviación de raíz cuadrada media de posiciones atómicas (RMSD), entre el ligando cristalizado y el mejor resultado del acoplamiento para determinar si el valor es $\leq 2,5.0$ Å, considerando que esta es la medida aceptada para una conformación bien acoplada en relación con la estructura determinada experimentalmente [22].

Cribado virtual

Se corrió el proceso de cribado en la plataforma DrugDiscovery de TACC, usando el archivo de la proteína preparada y el tamaño de grid seleccionado previamente. Se usaron tres de las bases de datos disponibles: la base de prueba (base de resultados rápidos y número limitado de ligandos que permite obtener resultados previos de forma

rápida), la base de compuestos disponibles comercialmente de ZINC (46 702 ligandos) y la base de datos de compuestos naturales (194 090 ligandos).

Selección de moléculas candidato

De los resultados del proceso de cribado en TACC se tomaron aquellos que tenían mejores valores de *score* (valores de mejor energía libre de unión calculada con relación a la energía libre entre el blanco y el ligando endógeno), comparados con el resultado del reacoplamiento *in house* realizado durante la validación del método de acoplamiento. Para evaluar los resultados arrojados por TACC se realizó inicialmente una selección entre las moléculas que cumplían los valores adecuados de *score*, para esto, se revisaron en PyMOL estas moléculas y se descartaron aquellas que presentaban peso molecular mayor a 500 Dalton y estructuras con interacciones únicamente hidrofóbicas; posteriormente, a las moléculas restantes se les realizó un acoplamiento molecular *in house*, iniciando por las moléculas de mayor *score* para corroborar los datos entregados por TACC. Para esto, inicialmente se llevaron los archivos de las moléculas al *software* maestro, se prepararon las estructuras y se llevaron al *software* Marvin donde se realizaron los diagramas de distribución de especies, allí se determinó la especie mayoritaria a pH 7,3 para ajustar cargas y estados de protonación en el *software* maestro de la especie que se sometería a acoplamiento *in house*. Cada molécula fue llevada posteriormente al *software* AutoDockTools para revisar enlaces rotables y prepararla en el formato adecuado para el acoplamiento molecular. Posteriormente, se les realizó el proceso de acoplamiento con AutoDock Vina y se revisaron los resultados. Luego de esto, a cada molécula se le calcularon propiedades fisicoquímicas indicadoras de farmacocinética tales como Log*P*, aceptores y donadores de puentes de hidrógenos con el *software* Marvin y se evaluó potencial de toxicidad evaluando los resultados en 13 modelos de la plataforma Xundrug.cn. determinando la viabilidad de las moléculas para fases posteriores de investigación como estudios *in vitro*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se decidió usar pBLAST para realizar la selección del blanco entre las proteínas cristalizadas de *T. cruzi* disponibles en PDB, considerando que la búsqueda del porcentaje de similitud entre secuencias a través de alineación básica local es un método para aproximarse a la identificación de homología entre proteínas [21]. Teniendo en cuenta que se buscaban las proteínas con el menor porcentaje de similitud en relación con proteínas humanas, se decidió tomar el valor límite de 10 % de *query cover* para evaluar aquellas que presentaban valores iguales o inferiores a dicho valor. Se excluyeron las proteínas que no presentaban similitud significativa (NR), ya que este resultado se puede presen-

tar en secuencias con valor esperado (E value) superior al umbral máximo establecido para el proceso (expect threshold); esto debido a que el valor E se ve afectado por la longitud de la secuencia [23]. Igualmente, se realizó la mencionada exclusión, considerando que dicho resultado se obtiene en proteínas con elevadas secuencias de baja complejidad, en las cuales, por el proceso de filtración del alineamiento se alteran los resultados por aumento de significancia estadística sin relación con importancia biológica [24].

Se evaluaron 271 secuencias, se excluyeron 51 del total de 322 arrojadas en la búsqueda, al corresponder a microorganismos diferentes a *T. cruzi*. Como se observa en la tabla 1, se encontraron siete secuencias que corresponde a tres proteínas con un porcentaje de *Query cover* inferior al 10 %. Dichas proteínas son: la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (código PDB 1II2), de la cual se alineó el 8 % de la secuencia con 32 % de identidad; la glucoquinasa (códigos 5BRD, 5BRE, 5BRF y 5BRH) con un 9 % de la secuencia alineada y 32 % de identidad y la dUTPasa (códigos 1OGL y 1OGK) 9 % de la secuencia alineada con 47 % de identidad.

Tabla 1. Listado de proteínas de *T. cruzi* con *query cover* inferior al 10 % en relación con proteínas humanas.

Código PDB	Nombre	<i>Query cover</i> (%)	Identidad (%)
1II2	PEPCK*	8	32
5BRD, 5BRE, 5BRF, 5BRH	Glucoquinasa	9	32
1OGL, 1OGK	dUTPasa	9	47

*PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa.

Se seleccionó la dUTPasa considerando que, aunque las tres proteínas participan en vías metabólicas necesarias para la supervivencia del parásito, de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y la glucoquinasa ya se han buscado inhibidores en otros trabajos [25, 26] y que la dUTPasa es una enzima que tiene diferencias estructurales importantes con proteínas de actividad catalítica similar en mamíferos y presenta una ventaja importante que corresponde a su doble función considerando que, además de generar el sustrato de la timidilato sintasa, evita que se aumente la proporción dUTP-dTTP, lo que es necesario para la supervivencia del parásito [12]. Revisando entonces los resultados del alineamiento de la dUTPasa se encontró que solo se obtuvo un valor significativo de alineamiento con proteínas humanas y corresponde a la proteína no caracterizada c4orf19 con valor E de 9,1; y al evaluar las dos secuencias se halló que no se presenta similitud en los aminoácidos del sitio activo. Del resultado del PSI-BLAST a la secuen-

cia 1OGK se obtuvo que, para valores de E menores al umbral no se encontró ningún resultado, para valores de E superiores al umbral se obtuvieron 4 resultados en el que el mayor *query cover* corresponde a la proteína Anillin, en la cual, no se presenta similitud significativa con el sitio activo de la proteína dUTPasa. Demostrando con todo lo anterior, la viabilidad de la proteína como potencial blanco molecular.

A. sp|Q8IY42|CD019_HUMAN Uncharacterized protein C4orf19 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C4orf19 PE=1 SV=1
 Sequence ID: Query_247639 Length: 314 Number of Matches: 1

Range 1: 260 to 289

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
27.3 bits(59)	3e-04	Compositional matrix adjust.	14/30(47%)	18/30(60%)	3/30(10%)
Query 118	PAHAKSTAASGQR---THGGDGDGDELLE	144			
	P HA SG R T+G DSDGD E+++				
Sbjct 260	PVHAMPVWDSGNRQEDTHGSDGDGEIVD	289			

Distribution of the top 1 Blast Hits on 1 subject sequences



B. sp|Q9NQW6|ANLN_HUMAN Anillin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANLN PE=1 SV=2
 Sequence ID: Query_164059 Length: 1124 Number of Matches: 1

Range 1: 913 to 1025

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
29.6 bits(65)	3e-04	Composition-based stats.	26/115(23%)	53/115(46%)	10/115(8%)
Query 162	NIIQLASIYRFDLITKGLLLAAQDLDFNLVGYVV-----AKYTLNQIRQLKGYKEGV	213			
	+I ++I+ + + G L A + +F LVG Y K+ L+++ L + +				
Sbjct 913	SITTKSNIHSSVMASPGGLSAVRTSNFALVGSYTLSLSSVGNTKFLVLDKVPFLSSLEGIH	972			
Query 214	YVKVREGVEDNELLHECVQSVSVEDVLENGTYLKAWEKIACSVDFAFGMPPEEERR	268			
	Y+K++ V N + E EDV G + + W ++ + + P++E+R				
Sbjct 973	YLKIKCQV--NSSVEERGFLTIFEDVSGFGAWHRRKCVLSGNCISYWTYPDDEKR	1025			

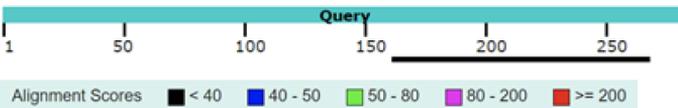


Figura 1. A. Alineamiento de secuencias entre la dUTPasa (1OGK) y la proteína no caracterizada c4orf19, único alineamiento de valor significativo con proteínas humanas usando pBLAST. B. Alineamiento con PSI-BLAST entre la dUTPasa y anillin, proteína que presentó el mayor *query cover* para valores de E superiores al umbral.

Considerando que se encuentran dos estructuras de la dUTPasa, reportadas por los mismos autores [16], las cuales corresponden a los códigos 1OGL y 1OGK, se realizó la evaluación de sus estructuras para realizar la selección. La estructura 1OGL presenta mejores parámetros de cristalización tales como: una resolución de 2,4 Å, valor de clashscore de 5,0 y porcentaje de valores atípicos de Ramachandran de 0.0%. Por

otra parte, la proteína 1OGK presenta una resolución de 2,85 Å, clashscore de 16 y porcentaje de valores atípicos de Ramachandran de 2,3 %. Sin embargo, se decidió usar la estructura 1OGK porque esta estructura se encuentra en complejo con el ligando y contiene las subunidades A y B, esto es necesario teniendo en cuenta que el sitio activo se ubica entre estas dos subunidades [16].

Adicionalmente, se revisó el reporte completo de validación de la estructura cristalo-gráfica de la proteína dUTPasa (código 1OGK) [27], encontrando que el valor de R, que se usa como medida de la calidad del modelo atómico, presenta un valor de 0,205, muy cercano al valor típico de 0,2 para este parámetro [28]. De igual forma, el valor de *R-free* que corresponde a una medida diseñada para reducir el sesgo presente en el valor R, presenta un valor de 0,267, cercano al valor típico de 0,26 [28, 29].

Adicionalmente, se evaluó la integridad del sitio activo de 1OGK, que corresponde a la zona que se usó para el cribado virtual y la identificación de potenciales inhibidores. Para esto, se tomó el reporte general de validación de la estructura y se revisaron los aminoácidos con valores atípicos de ángulos de enlace, se observaron valores alterados en 2 aminoácidos del sitio activo que corresponden a los residuos 52 (ácido glutámico) y 77 (ácido glutámico), ambos de la subunidad B; este último residuo presenta un valor atípico de longitud de enlace de 1,61 Å (átomos CG-CD) contra un valor ideal de 1,51 Å. En cuanto a la revisión de los ángulos diedros, en el mapa de Ramachandran, no se encontró ningún aminoácido con valores atípicos. Considerando que se tiene un valor de clashscore elevado, se evaluaron los solapamientos entre átomos, encontrándose que se reporta solapamiento de un hidrógeno del residuo 209 (tirosina) con un oxígeno del residuo 204 (arginina), ambos de la subunidad B, cuyo valor de superposición es de 0,49 Å. En tirosina 209, se reportó una superposición de 0,49 Å de un carbono con un hidrógeno de la lisina 63 de la subunidad A y con un carbono de este mismo residuo, lisina 63, con un valor de 0,46 Å. Asimismo, al usar la herramienta *Protein Preparation Wizard* de maestro, se encontró una superposición adicional entre el oxígeno del residuo 201 (asparagina) con un hidrógeno del residuo 205 (glicina) de la subunidad A.

De los 17 aminoácidos del sitio activo se encontraron problemas en 4 de ellos, por lo que se decidió realizar una preparación de la proteína con el módulo *Protein Preparation Wizard* del *software* maestro para solucionar los problemas observados desde el reporte de validación [27]. Considerando que todos los solapamientos observados en el sitio activo se presentaban con átomos de hidrógenos se decidió remover los hidrógenos originales antes de añadir hidrógenos en maestro y usar la herramienta para minimizar hidrógenos de especies alteradas; además de esto, se estableció un pH de 7,3 y usar la herramienta Propka determinando los estados de ionización de las especies de las cadenas laterales y las especies tautoméricas estables de las histidinas.

En la figura 2 se presenta el sitio activo de la dUTPasa de *T. cruzi* tanto en representación 3D como 2D con el ligando de la estructura cristalizada. Se muestran los aminoácidos con los que interactuaba el ligando endógeno, en este sitio se ubicó el grid para el proceso de cribado virtual.

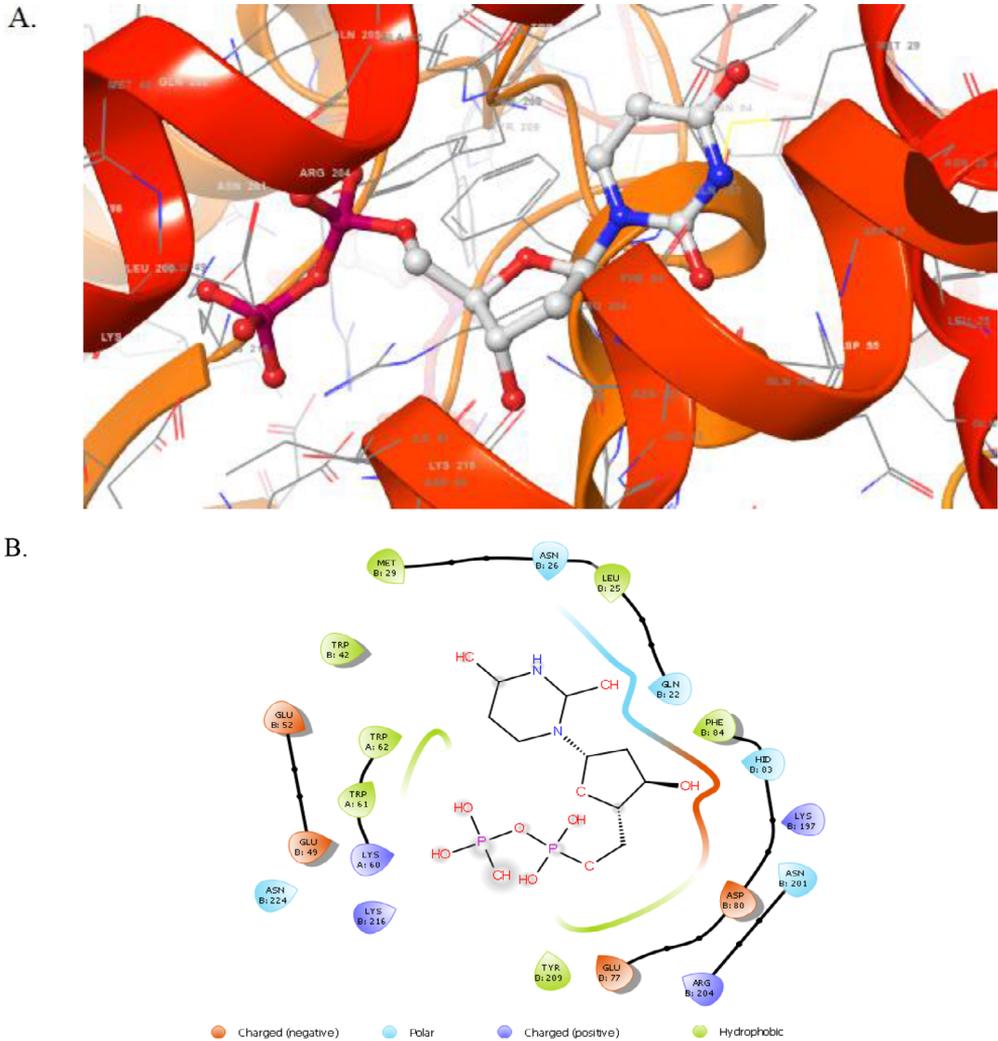


Figura 2.A. Vista 3D del sitio activo de la dUTPasa de *T. cruzi* con ligando cristalográfico dUDP (lugar de localización del grid). B. Vista 2D del sitio activo con los aminoácidos que presentan interacciones con el ligando.

Se usó AutoDock Vina, ya que además de ser el sistema usado por la plataforma Drug Discovery de TACC [20], es un programa calibrado con 30 complejos proteína ligando

con constantes de acoplamiento determinadas experimentalmente y es uno de los programas que predice las mejores posiciones con los mejores puntajes [30]. Para evaluar si las posiciones son correctamente acopladas en relación con la estructura determinada experimentalmente, se tomó la especie química mayoritaria a pH 7,3 del dUTP que se encuentra en un 48 % según se determinó usando *software* Marvin. El mejor resultado arrojado del proceso de acoplamiento en AutoDock Vina presentó una afinidad calculada de -8,9 kcal/mol, al determinar el valor de RMSD en PyMOL en relación con la estructura del ligando cristalizado se obtuvo un valor de 1,4 Å, demostrando que el programa usado para el acoplamiento es capaz de reproducir el modo de unión del ligando cristalizado.

CRIBADO VIRTUAL Y SELECCIÓN DE MOLÉCULAS CANDIDATO

Considerando que se buscan moléculas que puedan actuar como inhibidores competitivos de la enzima, se descartaron los resultados con valores de *score* más positivos que el obtenido para el dUTP (-8,9 kcal/mol). Así entonces, se descartaron todos los resultados de la base de prueba, ya que el mejor resultado de esta corresponde a la estructura con código ZINC C00001567 de *score* -8,4 kcal/mol. Después de realizar el análisis y exclusión de resultados por tamaño molecular y estructura química, se realizó un nuevo acoplamiento molecular (*in house*) de los potenciales candidatos, para confirmar el valor de energía libre de unión calculada usando AutoDock Vina. Se realizó dicho proceso de acoplamiento molecular *in house* considerando que, aunque la plataforma del TACC permite el acceso a potentes recursos computacionales con una interfaz de acceso intuitivo que permite el uso de una herramienta de acoplamiento molecular robusta como Autodock Vina [31], la plataforma tiene un estrecho rango de variables a modificar en los proyectos enviados permitiendo definir el sitio activo, el tamaño del grid, la librería, pero dejando varias variables fuera de alcance.

Por lo anterior, al no poder tener control sobre todas las variables del proceso de acoplamiento molecular, se realizó el acoplamiento *in house* usando el mismo *software* manejado por la plataforma, Autodock Vina, para validar los resultados obtenidos teniendo control sobre todos los parámetros del proceso de acoplamiento especialmente sobre la exhaustividad. Al igual que en el caso del dUTP, se evaluó la especie química mayoritaria a pH 7,3 para cada resultado considerando que el estado de protonación de la molécula tiene importancia en las interacciones entre ligando y la proteína, principalmente las electrostáticas que impactarán en la fuerza y especificidad de la unión [32]). Se observó que en todos de los casos la especie mayoritaria tenía carga neta de 0 y correspondía a un porcentaje superior al 87 %. En la tabla 2 se presentan los resultados obtenidos del acoplamiento *in house* para las potenciales moléculas candidato; se puede observar

que al controlar todos los parámetros del acoplamiento se presentan cambios en los resultados para algunas moléculas, sin embargo, no se excluyó ningún resultado considerando que todos los valores fueron más positivos que $-8,9$ kcal/mol. Las variaciones observadas en algunos resultados presentados en la tabla 2, pudieron ocurrir debido a que la exhaustividad usada por el AutoDock Vina del TACC pudo no ser suficiente para reproducir los resultados *in house*, posiblemente, debido a que el tamaño del grid, al ser superior a 30 \AA en cada eje, requería un aumento de exhaustividad [33].

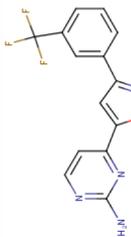
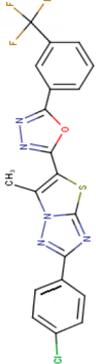
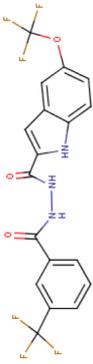
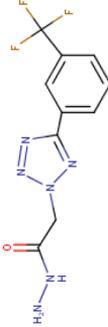
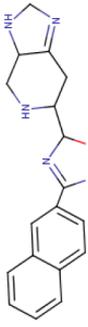
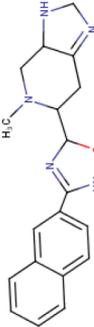
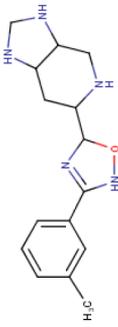
Tabla 2. Listado de potenciales moléculas candidato con su correspondiente puntaje de afinidad.

Código ZINC de la molécula	Base de datos	TACC (kcal/mol)	Porcentaje de la especie mayoritaria*	Acoplamiento <i>in house</i> (kcal/mol)**
ZINC00124103	ZINC	-11,7	100	-11,4
ZINC02157508	ZINC	-11,4	100	-11,4
ZINC01040055	ZINC	-11,1	99,1	-10,3
ZINC01044975	ZINC	-10,9	99,9	-10,8
ZINC15670188	ZINC N. P.	-11,5	87,3	-11,5
ZINC15670345	ZINC N. P.	-11,5	87,6	-11,4
ZINC20460463	ZINC N. P.	-11,3	95,9	-11,3
ZINC20464484	ZINC N. P.	-11,2	87,3	-11,2
ZINC15670144	ZINC N. P.	-11,2	87,6	-11,2
ZINC03846627	ZINC N. P.	-11,1	96,4	-11,1
ZINC01777088	ZINC N. P.	-11,0	99,9	-11,1
ZINC02203974	ZINC N. P.	-11,0	100	-11,0
ZINC09576136	ZINC N. P.	-11,0	96,5	-10,9

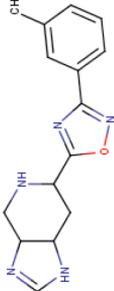
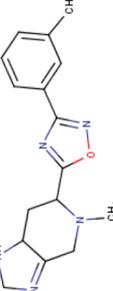
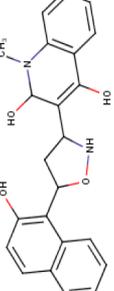
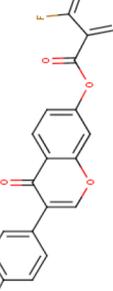
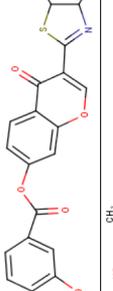
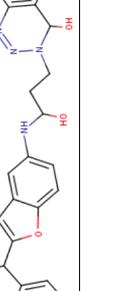
*Porcentaje de la especie química mayoritaria a pH 7,3 ** Sometida a acoplamiento *in house* (columna 5). La base de datos Zinc N.P. corresponde a la base de compuestos naturales.

Para la evaluación de características indicadoras de un adecuado perfil farmacocinético de un fármaco de administración oral, se realizó el análisis del perfil de absorción por vía oral, según las reglas de Lipinski, las cuales enuncian que una adecuada biodisponibilidad se tendrá en moléculas que cumplan al menos 3 de los siguientes criterios: masa molecular menor a 500 daltons, menos de 5 donadores, menos de 10 aceptores de puentes de hidrógeno y un valor de Log P calculado menor a 5 [34]). Según los resultados mostrados en la tabla 3, basados en los anteriores criterios, ninguna de las moléculas estudiadas presentaría pobre absorción por vía oral. Se observa que todas las moléculas cumplen al menos 3 de los criterios mencionados anteriormente, sin embargo, aunque alguna de las moléculas hubiera incumplido las reglas de Lipinski, no se excluiría de los análisis posteriores teniendo en cuenta que, a pesar de ser un criterio orientador en el desarrollo de fármacos no implica que el potencial

Tabla 3. Resultado de análisis de criterios de Lipinski para absorción por vía oral de las potenciales moléculas candidato seleccionadas.

Código ZINC de la molécula	Masa molecular (Dalton)*	Log P calculado*	Donadores de puentes de hidrógeno	Aceptores de puentes de hidrógeno**	Estructura química
ZINC00124103	322,37	2,64	1	5	
ZINC02157508	484,02	6,10	0	6	
ZINC01040055	449,43	4,42	3	6	
ZINC01044975	298,31	1,64	3	7	
ZINC15670188	350,52	2,42	3	6	
ZINC15670345	491,35	2,95	2	6	
ZINC20460463	295,42	1,18	4	6	

(Continúa)

Código ZINC de la molécula	Masa molecular (Dalton)*	Log P calculado*	Donadores de puentes de hidrógeno	Aceptores de puentes de hidrógeno**	Estructura química
ZINC20464484	283,33	1,07	2	6	
ZINC15670144	297,36	2,86	1	6	
ZINC03846627	390,16	3,09	4	6	
ZINC01777088	418,97	4,70	0	4	
ZINC02203974	455,65	3,60	0	6	
ZINC09576136	458,52	4,54	4	8	

*Determinado usando *software* MarvinSketch V. 18.2.4.

**Tomado como la suma de oxígenos y nitrógenos en la estructura molecular.

activo sea inviable desde punto de vista farmacocinético, dejando abierta la posibilidad, por ejemplo, de una administración parenteral [35]. Así entonces, este análisis se reporta para dar indicios de la vía de administración que podría llegar a ser usada en fases posteriores de investigación.

Adicionalmente, se evaluaron las moléculas bajo los 13 modelos de toxicidad disponibles en el servidor eMoltox que corresponden a toxicidad mitocondrial, hepática, cardíaca, respiratoria, renal, reproductiva, en sistema nervioso central, oral aguda, mutagenicidad/genotoxicidad, carcinogénesis, citotoxicidad, sensibilización en piel y efectos sobre citocromo P450. eMoltox predice la toxicidad usando datos conocidos mediante un desarrollo de aprendizaje automático [36]. Se tomaron los datos de la principal acción que presenta el mayor valor de confianza por cada molécula.

Como se puede observar en la tabla 4, para la mayoría de estas moléculas los efectos tóxicos se podrían presentar a nivel hepático, esto se evidencia al predecirse efectos en proteínas como la bomba exportadora de sales biliares que es el principal transportador de lípidos y ácidos biliares en la membrana del canalículo de los hepatocitos y cuya expresión irregular se relaciona con alteración en la secreción de ácidos biliares [37]. También se puede observar que en las moléculas con códigos ZINC02157508 y ZINC01040055 se predicen posibles efectos en el receptor hepático X alfa o LRXa con valores de confianza superiores a 0,99; esta macromolécula actúa como sensor de colesterol y se tiene la hipótesis que participa en los mecanismos de regulación de conversión de colesterol a sales biliares regulando la expresión de la enzima 7 α -hidroxilasa, se ha demostrado que la actividad de esta enzima también se relaciona con la regulación de los niveles de LDL [38]. La molécula código ZINC01777088, según la predicción obtenida, podría tener efectos a nivel del receptor farnesoide X (FRX) que se expresa en altos niveles en tejidos intestinales y hepáticos y se encuentra asociado con la regulación de colesterol, glucosa, lípidos y ácidos biliares [39]. Por otra parte, las moléculas en las que se predice *in silico* la mayor seguridad son ZINC00124103 ya que el principal efecto relacionado con toxicidad corresponde a una inhibición metabólica de CYP 1A2, que corresponde al 13 % del citocromo en el hígado y es una de las enzimas más importantes relacionada con la biotransformación de medicamentos como acetaminofén, amitriptilina, propranolol y warfarina entre otros [40], y las moléculas ZINC01044975, ZINC20460463, ZINC20464484 y ZINC15670144, en las que no se encontraron efectos tóxicos en los modelos evaluados.

Al evaluar las interacciones entre los potenciales candidatos y la dUTPasa usando *free maestro*, se evidencia que todas las estructuras presentan interacciones con las regiones de unión a fosfatos, a uracilo y a desoxirribosa del dUTP. Como se observa en la tabla 5, la mayoría de los aminoácidos involucrados en las interacciones de los potenciales can-

Tabla 4. Valores de la principal acción tóxica y el valor de confianza de esta para las potenciales moléculas candidato.

Molécula (código ZINC)	Confianza	Acción
ZINC00124103	0,988	Inhibición de CYP1A2
ZINC02157508	0,998	Agonista del receptor hepático X alfa.
ZINC01040055	0,994	Agonista del receptor hepático X alfa.
ZINC01044975	No se encontró acción tóxica en los modelos evaluados.	
ZINC15670188	0,983	Citotoxicidad diferencial contra líneas celulares de pollo DT40 isogénicas con vías conocidas de respuesta al daño en el ADN-Línea celular mutante Rad54 / Ku70
ZINC01777088	0,993	Antagonista de la vía de señalización del receptor X farnesoide (FXR)
ZINC02203974	0,997	Bloqueo de la bomba exportadora de sales biliares
ZINC20460463	No se encontró acción tóxica en los modelos evaluados.	
ZINC20464484	No se encontró acción tóxica en los modelos evaluados.	
ZINC15670144	No se encontró acción tóxica en los modelos evaluados.	
ZINC03846627	0,995	Antagonista de la vía de señalización del receptor de estrógenos alfa.
ZINC15670345	1,0	Modulador de purinoreceptor P2X3.
ZINC09576136	0,995	Antagonista de la vía de señalización del receptor de estrógenos alfa.

didatos concuerdan con las reportadas para el ligando endógeno [16]. De los resultados mostrados en la tabla 5, se puede observar que por lo menos dos de los aminoácidos involucrados en la interacción con fosfatos en el dUDP, resultan ser de alta importancia para las potenciales moléculas candidato, dichos aminoácidos corresponden a Lisina 197 y Arginina 204 de la subunidad B; con el primero, se presentan interacciones tipo π -catión, puente de hidrógeno e interacciones dipolares en dos moléculas diferentes para cada tipo de interacción, en el caso la molécula con mejor puntuación (ZINC00124103), como se puede observar en la figura 3, este aminoácido además de presentar interacción tipo π -catión, actúa como donador de puente de hidrógeno lo que también sucede con la molécula ZINC01044975. En el caso de Arginina 204 de la subunidad B, se puede ver su importancia al presentar interacciones de diferentes tipos, ya sea puente de hidrógeno, π -catión o por dipolos con todas las potenciales moléculas candidato.

Se observa que en la región de unión a uracilo resultan ser importantes las interacciones hidrofóbicas al encontrarse que la mayoría de las moléculas evaluadas presentan interacción con metionina 29 de la subunidad B y triptófano 61 de la subunidad A, interacciones que presenta también el ligando endógeno. La naturaleza principalmente apolar

Tabla 5. Tipos de interacciones presentadas en la unión de las moléculas seleccionadas con el blanco y aminoácidos involucrados.

Aminoácidos involucrados en cada interacción						
Molécula	Puente de Hidrógeno	Hidrofóbica	Polar (interacción con dipolos)	Interacción $\pi-\pi$ apilamiento $\pi-\pi$	Interacción π -catión	
ZINC00124103	Glu B 77, Lys B 197	Trp A 61, Leu B 25, Met B 29, Trp B 42, Phe B 84, Tyr B 209	Lys A 60, Lys A 63, Gln B 22, Asn B 26, Glu B 49, Glu B 52, Asp B 80, His B 83, Ser B 87, Asn B 201, Arg B 204, Lys B 216, Asn B 224	Lys A 60, Lys A 63, Asn B 26, Glu B 49, Glu B 52, Ser B 87, Arg B 204, Glu B 222	Trp A 62	Lys B 197
ZINC02157508		Trp A 61, Trp A 62, Met B 29, Trp B 42, Phe B 84, Tyr B 209	Lys A 60, Lys A 63, Asn B 26, Glu B 49, Glu B 52, Asp B 80, His B 83, Ser B 87, Arg B 204, Glu B 222	Lys A 60, Gln B 22, Asn B 26, Glu B 49, Glu B 52, Glu B 77, Ser B 87, Lys B 197, Asn B 201, Asn B 224	Trp A 62	Lys B 197, Lys B 216
ZINC01040055	Asp B 80	Trp A 61, Leu B 25, Met B 29, Trp B 42, Phe B 84	Lys A 60, Gln B 22, Asn B 26, Glu B 49, Glu B 52, Glu B 77, His B 83, Ser B 87, Asn B 201, Asn B 224	Lys A 60, Gln B 22, Asn B 26, Glu B 49, Glu B 52, Glu B 77, His B 83, Ser B 87, Asn B 201, Asn B 224	Trp A 62	Arg B 204, Lys B 216
ZINC01044975	Asp B 80, Lys B 197, Arg B 204	Leu B 25, Met B 29, Trp B 42, Phe B 84, Tyr B 209	Lys A 60, Gln B 22, Asn B 26, Glu B 49, Glu B 52, Glu B 77, His B 83, Ser B 87, Asn B 201, Asn B 224	Lys A 60, Gln B 22, Asn B 26, Glu B 49, Glu B 52, Glu B 77, His B 83, Ser B 87, Asn B 201, Asn B 224	Trp A 62	Lys B 197
ZINC15670188	Lys B 197, Arg B 204	Trp A 61, Met B 29, Trp B 42, Phe B 84, Tyr B 209	Lys A 60, Gln B 22, Asn B 26, Glu B 49, Glu B 52, Glu B 77, His B 83, Ser B 87, Asn B 201, Asn B 224	Lys A 60, Gln B 22, Asn B 26, Glu B 49, Glu B 52, Glu B 77, His B 83, Ser B 87, Asn B 201, Asn B 224	Trp A 62	Lys B 197
ZINC15670345	Lys B 197, Arg B 204	Trp A 61, Met B 29, Trp B 42, Tyr B 209	Lys A 60, Gln B 22, Asn B 26, Glu B 49, Glu B 52, Glu B 77, His B 83, Ser B 87, Asn B 201, Asn B 224	Lys A 60, Gln B 22, Asn B 26, Glu B 49, Glu B 52, Glu B 77, His B 83, Ser B 87, Asn B 201, Asn B 224	Trp A 62, His B 83, Phe B 84	Lys B 197
ZINC20460463	Asp B 80	Trp A 61, Leu B 25, Met B 29, Trp B 42, Phe B 84	Lys A 60, Gln B 22, Asn B 26, Glu B 49, Glu B 52, Glu B 77, His B 83, Ser B 87, Asn B 201, Arg B 204, Lys B 216	Lys A 60, Gln B 22, Asn B 26, Glu B 49, Glu B 52, Glu B 77, His B 83, Ser B 87, Asn B 201, Arg B 204, Lys B 216	Trp A 62	Lys B 197
ZINC20464484	Asp B 80	Trp A 61, Leu B 25, Met B 29, Trp B 42, Phe B 84, Tyr B 209	Lys A 60, Gln B 22, Asn B 26, Glu B 49, Glu B 52, Glu B 77, His B 83, Ser B 87, Asn B 201, Lys B 216	Lys A 60, Gln B 22, Asn B 26, Glu B 49, Glu B 52, Glu B 77, His B 83, Ser B 87, Asn B 201, Lys B 216	Trp A 62	Lys B 197, Arg B 204
ZINC15670144	Asp B 80	Trp A 61, Leu B 25, Met B 29, Trp B 42, Phe B 84, Tyr B 209	Lys A 60, Lys A 63, Gln B 22, Asn B 26, Glu B 49, Glu B 52, Glu B 77, His B 83, Ser B 87, Asn B 201, Lys B 216	Lys A 60, Lys A 63, Gln B 22, Asn B 26, Glu B 49, Glu B 52, Glu B 77, His B 83, Ser B 87, Asn B 201, Lys B 216	Trp A 62	Lys B 197
ZINC03846627	Lys B 197, Trp A 62	Trp A 61, Met B 29, Trp B 42, Phe B 84, Tyr B 209	Lys A 60, Lys A 63, Gln B 22, Asn B 26, Glu B 49, Glu B 52, Glu B 77, His B 83, Ser B 87, Asn B 201, Lys B 216	Lys A 60, Lys A 63, Gln B 22, Asn B 26, Glu B 49, Glu B 52, Glu B 77, His B 83, Ser B 87, Asn B 201, Lys B 216	Trp A 62	Arg B 204, Lys B 216
ZINC01777088	Trp A 62, Lys B 216	Leu B 25, Met B 29, Phe B 84	Lys A 60, Gln B 22, Asn B 26, Glu B 49, Glu B 52, Glu B 77, Arg B 204	Lys A 60, Gln B 22, Asn B 26, Glu B 49, Glu B 52, Glu B 77, Arg B 204	Trp A 62	Lys B 216
ZINC02203974	Trp A 62	Met B 29, Trp A 61	Lys A 60, Gln B 22, Glu B 49, Glu B 52, Glu B 77, Asp B 80, Lys B 197, Asn B 201, Arg B 204, Asn B 224	Lys A 60, Gln B 22, Glu B 49, Glu B 52, Glu B 77, Asp B 80, Lys B 197, Asn B 201, Arg B 204, Asn B 224	Trp A 62, His B 83, Phe B 84	Lys B 216
ZINC09676136	Glu B 52, Lys B 197, Arg B 204, Asn B 224	Trp A 61, Leu B 25, Met B 29, Trp B 42, Phe B 84, Tyr B 209	Asp A 55, Lys A 60, Lys A 63, Gln B 22, Asn B 26, Glu B 49, Glu B 77, Asp B 80, Asp B 83, Asn B 201, Lys B 216	Asp A 55, Lys A 60, Lys A 63, Gln B 22, Asn B 26, Glu B 49, Glu B 77, Asp B 80, Asp B 83, Asn B 201, Lys B 216	Trp A 62	Lys B 216

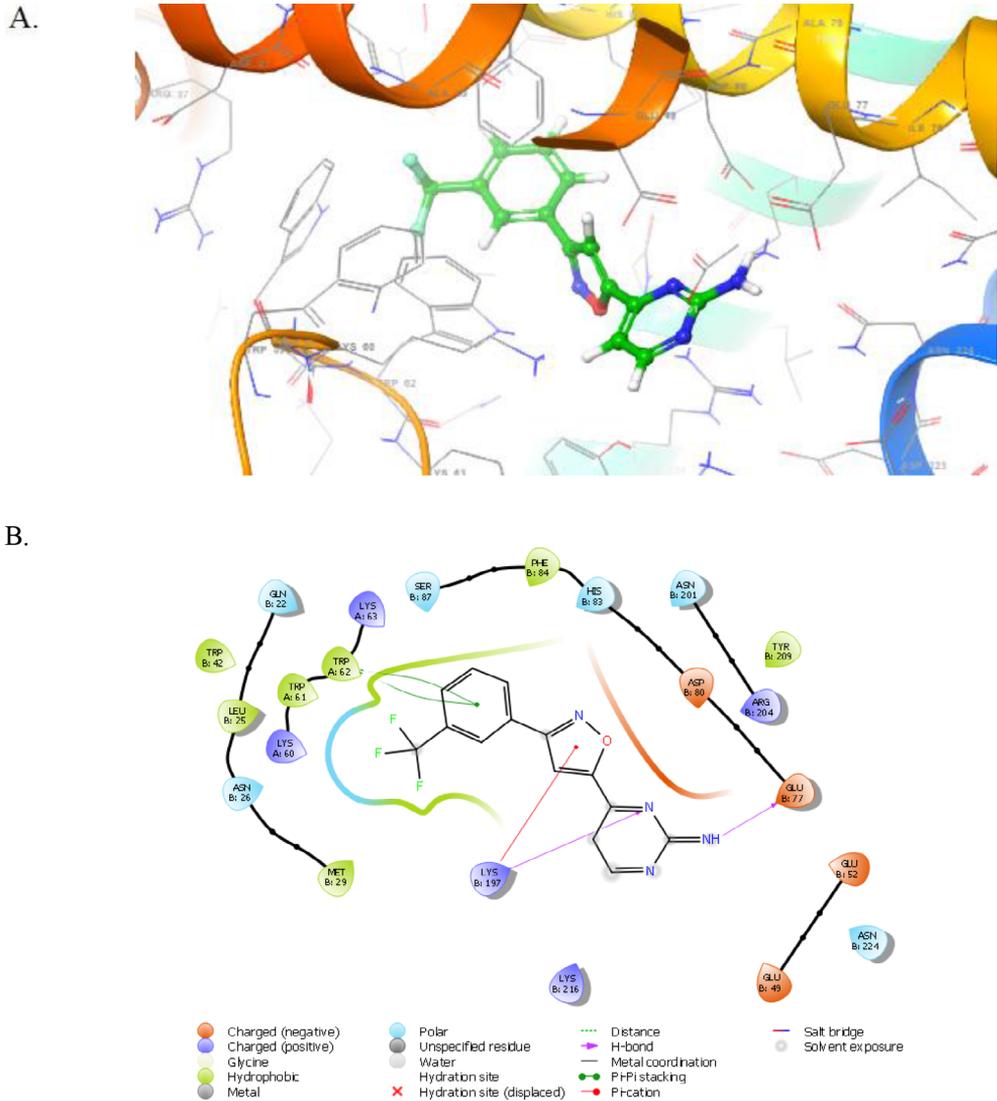


Figura 3. Interacciones de la molécula candidato que presentan la mejor puntuación, ZINC00124103 (4-{3-[3-(trifluorometil)fenil]isoxazol-5-Il}pirimidin-2-amina) con el sitio activo de la dUTPasa en vistas A. 3D y B. 2D.

de las partes de las moléculas que interactúan con esta región del receptor permite que se presenten interacciones hidrofóbicas con residuos de aminoácidos diferentes a los reportados para el ligando endógeno como leucina 25 y triptófano 42 de la subunidad B. También es importante resaltar que la interacción por apilamiento π - π que presentan las moléculas candidato con triptófano 62 de la subunidad A, en esta región de

unión con uracilo, parece tener gran importancia para la afinidad de los potenciales inhibidores teniendo en cuenta que todas las moléculas presentan esta interacción.

En dos de las moléculas en las que se calcularon las menores energías libres de unión (ZINC02157508, ZINC20460463) y por lo tanto en las que se esperarían los complejos de unión más estables, se observa interacción tipo pi-cación con lisina 197 por lo que se podría relacionar esta interacción con el incremento de estabilidad de la formación de complejo enzima-inhibidor.

Se excluye como potencial candidato a fármaco la molécula código ZINC15670345 considerando que esta solamente se diferencia en un metilo de la molécula código ZINC15670188, la presencia de dicho metilo no muestra interacciones adicionales con los aminoácidos de la proteína lo que es coherente con los resultados del proceso de acoplamiento mostrados en la tabla 2, donde se puede observar que la diferencia entre las puntuaciones de ambas moléculas es solamente de 0,1 kcal/mol siendo mayor en la molécula código ZINC15670188 lo que puede deberse a que la ausencia del grupo metilo en esta molécula favorece la formación de puentes de hidrógeno con Lisina 63 de la subunidad A.

De los resultados obtenidos se puede observar que la molécula que presenta un mejor balance entre los resultados indicadores de actividad y de seguridad *in-silico* corresponde a la molécula 4-{3-[3-(trifluorometil)fenil]isoxazol-5-1}pirimidin-2-amina con código ZINC00124103 ya que además de calcularse energía libre de unión de -11,4 kcal/mol, no se encontraron efectos severos dentro de los modelos de toxicidad. Así entonces, esta sería una primera opción para evaluación de dinámica molecular y escalado a estudios *in vitro* de seguridad y efectividad. Sin embargo, las moléculas restantes también podrían llegar a ser opciones viables teniendo en cuenta que en cuatro de ellas no se encontraron efectos de toxicidad *in silico*.

CONCLUSIONES

La proteína dUTPasa de *Trypanosoma cruzi* es un blanco viable para el diseño e investigación de nuevos fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, esto se fundamenta entre otros, en la alta diferencia que presenta el sitio activo en comparación con proteínas que ejercen la misma actividad catalítica en humanos; así entonces, se hace viable la investigación de moléculas que actúen sobre este blanco como potenciales moléculas candidato. Debido a esto, se condujo una búsqueda de moléculas que tras procesos de acoplamiento presentan afinidad por la enzima blanco, encontrándose 12 moléculas con potencial unión y bloqueo del sitio activo de la enzima además de adecuadas características moleculares indicadoras de farmacocinética. Entre estas moléculas, la de menor energía libre de unión calculada con la proteína blanco y menores

posibilidades de efectos tóxicos corresponde a la 4-{3-[3-(trifluorometil)fenil]isoxazol-5-1}pirimidin-2-amina que puede ser una potencial molécula candidato para estudios posteriores de dinámica molecular y pruebas *in vitro* en cultivos del parásito.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos al grupo de biología celular y autoinmunidad del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

REFERENCIAS

1. C. Roca Saumell, A. Soriano-Arandes, L. Solsona Díaz, J. Gascón Brustenga, Documento de consenso sobre el abordaje de la enfermedad de Chagas en atención primaria de salud de áreas no endémicas, *Atención Primaria*, **47**(5), 308-317 (2015).
2. V. Vidal, S. Ibañez, C. Martínez, Infección natural de chinches Triatominae con *Trypanosoma cruzi* asociadas a la vivienda humana en México, *Salud Pública de México*, **42**(6), 496-503 (2000).
3. L.J. Robertson, Introduction: Some historical and geographical aspects and the relevance of Chagas disease among foodborne infections. En: B de Noya, O González, L.J Robertson (editors), *Trypanosoma cruzi as a Foodborne Pathogen*, Springer, London, 2015, Vol. 1, p. 1-5.
4. S. Sosa-Estani, E. L. Segura, Tratamiento de la infección por *Trypanosoma Cruzi* en fase indeterminada. Experiencia y normatización en la Argentina, *Medicina (Buenos Aires)*, **59**, 166-170 (1999).
5. S.R. Wilkinson, M.C. Taylor, D. Horn, J.M. Kelly, I. Cheeseman, A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**(13), 5022-5027 (2008).
6. Ministerio de Protección social Colombia, *Guía de atención clínica de la enfermedad de Chagas 2010*, Convenio Cooperación técnica No 637 de 2009, URL: <https://www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/Guia%20de%20atencion20clinica%20de%20chagas%202010.pdf>, consultado en marzo de 2019.

7. R.F. Sadok Menna-Barreto, K.T. Belloze, J. Perales, F.P. Silva, Proteomic and bioinformatic analysis of *Trypanosoma cruzi* chemotherapy and potential drug targets: new pieces for an old puzzle, *Curr. Drug Targets*, **15**(3), 255-271 (2014).
8. B.R. Miller, A.E. Roitberg, *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase as a drug target against Chagas disease (American trypanosomiasis), *Future Med. Chem.*, **5**(15), 1889-1900 (2013).
9. I. Beltran-Hortelano, S. Perez-Silanes, S. Galiano, Trypanothione reductase and superoxide dismutase as current drug targets for *Trypanosoma cruzi*: An overview of compounds with activity against Chagas disease, *Curr. Med. Chem.*, **24**(11), 1066-1138 (2017).
10. C.R. Lima, N. Carels, A.C. Guimaraes, P. Tufféry, P. Derreumaux, *In silico* structural characterization of protein targets for drug development against *Trypanosoma cruzi*, *J. Mol. Model.*, **22**(10), 244 (2016).
11. C.R. Fonseca-Berzal, *Búsqueda y optimización de potenciales alternativas terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas*, tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid, 2017, p. 61-76.
12. V.M. Castillo-Acosta, *Papel de la desoxiuridina trifosfato nucleótido hidrolasa en la viabilidad celular y la integridad genética en Trypanosoma brucei*, tesis doctoral, Universidad de Granada e Instituto de parasitología y biomedicina "Lopez Neyra", 2007, p. 14-23.
13. M. Goulian, B. Bleile, B.Y. Tseng, Methotrexate-induced misincorporation of uracil into DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **77**(4), 1956-1960 (1980).
14. H.H. el-Hajj, H. Zhang, B. Weiss, Lethality of a dut (deoxyuridine triphosphatase) mutation in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **170**(3), 1069-1075 (1988).
15. R. Persson, E.S. Cedergren-Zeppezauer, K.S. Wilson, Homotrimeric dUTPases: Structural solutions for specific recognition and hydrolysis of dUTP, *Curr. Prot. Pept. Sci.*, **2**(4), 287-300 (2001).
16. M. Harkiolaki, E.J. Dodson, V. Bernier-Villamor, J.P. Turkenburg, D. González-Pacanowska, K.S. Wilson, The crystal structure of *Trypanosoma cruzi* dUTPase reveals a novel dUTP/dUDP binding fold, *Structure*, **12**(1), 41-53 (2004).
17. M. Schneider, L. Lane, E. Boutet, D. Lieberherr, M. Tognolli, L. Bougueleret, A. Bairoch, The UniProtKB/Swiss-Prot knowledgebase and its Plant Proteome Annotation Program, *J. Proteomics*, **72**(3), 567-573 (2009).
18. S. Choudhuri, Sequence alignment and similarity searching in genomic databases: BLAST and FASTA, en: S. Choudhuri (editor), *Bioinformatics for Beginners: Genes, Genomes, Molecular Evolution, Databases and Analytical Tools*, Academic Press (Elsevier), London, 2014, vol. 1, p. 133-155.

19. N. Van Der Heyden, R. Docampo, Intracellular pH in mammalian stages of *Trypanosoma cruzi* is K⁺-dependent and regulated by H⁺-ATPases, *Mol. Biochem. Parasitol.*, **105**(2), 237-251 (2000).
20. J. Allen, Texas Advanced Computing Center, DrugDiscovery@TACC Purpose, URL: <https://www.tacc.utexas.edu/research-development/tacc-projects/drug-discovery>, consultado en mayo 2019.
21. O. Trott, A.J. Olson, AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, *J. Comput. Chem.*, **31**(2), 455-461 (2010).
22. K.W. Lexa, H.A. Carlson, Protein flexibility in docking and surface mapping, *Quart. Rev. Biophys.*, **45**(3), 301-343 (2012).
23. D. Xu, J.M. Keller, M. Popescu, R. Bondugula, *Applications of Fuzzy Logic in Bioinformatics*, Imperial College Press, London, 2008, vol. 9, p. 24.
24. National Center for Biotechnology information, *BLAST topics*, URL: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastDocs&DOC_TYPE=BlastHelp#expec, consultado en junio de 2019.
25. J.A. Urbina, C.E. Osorno, A. Rojas, Inhibition of phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* epimastigotes by 3-mercaptopicolinic acid: *in vitro* and *in vivo* studies, *Arch. Biochem. Biophys.*, **282**(1), 91-99 (1990).
26. E.L. D'Antonio, M.S. Deinema, S.P. Kearns, T.A. Frey, S. Tanghe, K. Perry, T.A. Roy, H.S. Gracz, A. Rodriguez, J. D'Antonio, Structure-based approach to the identification of a novel group of selective glucosamine analogue inhibitors of *Trypanosoma cruzi* glucokinase, *Mol. Biochem. Parasitol.*, **204**(2), 64-76 (2015).
27. M. Harkiolaki, E.J. Dodson, V. Bernier-Villamor, J.P. Turkenburg, D. González-Pacanowska, K.S. Wilson, *Full wwPDB X-ray Structure Validation Report*, Protein Data Bank, URL: https://files.rcsb.org/pub/pdb/validation_reports/og/1ogk/1ogk_full_validation.pdf, consultado en junio 2019.
28. G.J. Kleywegt, T.A. Jones, Model building and refinement practice, *Methods in Enzymology* **277**, 208-230 (1997).
29. A.T. Brünger, Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures, *Nature*, **355**, 472-475 (1992).

30. N.S. Pagadala, K. Syed, J. Tuszynski, Software for molecular docking: a review, *Biophys. Rev.*, **9**(2), 91-102 (2017).
31. U. Viswanathan, S.M. Tomlinson, J.M. Fonner, S.A. Mock, S.J. Watowich, Identification of a novel inhibitor of dengue virus protease through use of a virtual screening drug discovery Web portal, *J. Chem. Inf. Model.*, **54**(10), 2816-2825 (2014).
32. M.L. García, B. De Pascual, M. Fernández, Estudio teórico del modo de unión entre CDK2 y butirolactona I., *An. R. Acad. Nac. Farm.*, **70**, 325-356 (2004).
33. AutoDock Vina Manual, URL: <http://vina.scripps.edu/manual.html>, Consultado en junio 2019.
34. C. Abad-Zapatero, *Ligand Efficiency Indices for Drug Discovery*, Academic Press (Elsevier), London, 2013, vol. 1, p. 67-69.
35. M.Q. Zang, B. Wilkinson, Drug discovery beyond the 'rule-of-five', *Curr. Opin. Biotechnol.*, **18**(6), 478-488 (2007).
36. C. Ji, F. Svensson, A. Zoufir, A. Bender, eMolTox: prediction of molecular toxicity with confidence, *Bioinformatics*, **34** (14), 2508-2509 (2018).
37. I. Castro, M. Martínez, Transportadores de lípidos biliares: una revisión actualizada, *Gen.*, **67**(1), 49-57 (2013).
38. A.G. Sandoval, F. Manzur, D. Gómez, C. Gómez-A., Receptores nucleares y metabolismo de lípidos: implicaciones cardiovasculares, *Rev. Colomb. Cardiol.*, **16**(1), 29-34 (2009).
39. A. Milona, Final Report Summary-MECHFXR (Towards FXR-mediated therapeutic intervention: Understanding how FXR integrates metabolic, endocrine and inflammatory signaling.), <https://cordis.europa.eu/project/rcn/103109/reporting/es>, consultado en febrero de 2019.
40. R.G. Argüello, El citocromo 1A2 (CYP 1A2) en una población universitaria de Costa Rica, *Rev. Costarric. Cienc. Méd.*, **23**, 25-31 (2002).

COMO CITAR ESTE ARTÍCULO

J.A. Torres-Lemus, Á.P. Rojas-Rojas, F. López-Vallejo, Acoplamiento molecular sobre la proteína dUTPasa de *Trypanosoma cruzi* para el descubrimiento de inhibidores en el tratamiento de la enfermedad de Chagas, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **50**(3), 740-763 (2021).