

Acoplamiento molecular de la interacción de imidazoles 4,5-fenil y 4,5-furilsustituidos con enzimas Cyp51 de *T. Cruzi*, *T. Brucei* y *L. Infantum*

Molecular docking of the interaction of 4,5- phenyl and 4,5- furyl imidazoles with *T. Cruzi*, *T. Brucei* and *L. Infantum* Cyp51 enzymes

Mariana Castro-Piñol^{1*} <http://orcid.org/0000-0001-5179-5868X>

América García-López (PT)¹ <http://orcid.org/0000-0003-3773-887X>

Julio Rojas Vargas¹ <http://orcid.org/0000-0002-8877-1592>

Jorge Acevedo Martínez¹ <http://orcid.org/0000-0001-8201-7479>

¹Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba

*Autor para correspondencia: marianpinyol@gmail.com

RESUMEN

Las subespecies *Leishmania spp.*, *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei* son los agentes causantes de la leishmaniasis, la tripanosomiasis americana y la tripanosomiasis africana humana, respectivamente. Estas enfermedades no ocupan a las grandes empresas farmacéuticas, y los fármacos disponibles son ineficientes y tóxicos. Con el objetivo de indagar sobre alternativas farmacológicas se explora mediante un estudio *in silico* a través de un acoplamiento molecular, la diferencia que puede producirse al sustituir grupos fenilo por furilo en las posiciones 4 y 5 de imidazoles que son potenciales antiprotozoarios contra *Leishmania spp.*, *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*. En general, los grupos fenilo logran una mayor disminución de la energía libre de unión, lo cual indica una mayor afinidad por las proteínas estudiadas, sin embargo, existen excepciones debido a particularidades geométricas de los sitios activos y a las estructuras de los imidazoles.

Palabras clave: imidazol; acoplamiento molecular; *Trypanosoma cruzi*; *Trypanosoma*

brucei; *Leishmania infantum*; CYP51.

ABSTRACT

The subspecies *Leishmania spp.*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei* are the causative agents of leishmaniasis, American trypanosomiasis and human African trypanosomiasis respectively. These diseases are not prioritized on the bigger pharmaceutical companies, since they usually affect the poorest countries and the drugs that are available for their treatment are inefficient, old and toxic. In order to find pharmacological alternatives, the following investigation is carried out, which explores *in silico* study through molecular docking, the difference of using phenyl or furyl groups in positions 4 and 5 of imidazoles as potential antiprotozoa against *Leishmania spp.*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. It seems to be a general rule that phenyl groups achieve a greater decrease in free binding energy, which indicates a greater affinity for the proteins studied, however there are exceptions due to geometric particularities of the active sites and the structures of the imidazoles.

Keywords: imidazole; molecular docking; *Trypanosoma cruzi*; *Trypanosoma brucei*; *Leishmania infantum*; CYP51.

Recibido: 4/11/2021

Aprobado: 20/12/2021

Introducción

Los *Trypanosomatidae* forman una familia de parásitos eucariotas unicelulares del orden *Trypanosomatida*, clase *Kinetoplastida*, phylum *Euglenozoa*, supergrupo *Excavata*. Varios patógenos humanos son vectores de las especies de los géneros *Leishmania* y *Trypanosoma*. Los ciclos de vida de estos organismos resultan ser muy complejos, moviéndose constantemente entre insectos y hospedadores mamíferos.⁽¹⁾ Las especies *Leishmania spp.*,

Trypanosoma cruzi y *Trypanosoma brucei* son los agentes causantes de la leishmaniasis, la tripanosomiasis americana (enfermedad de Chagas) y la tripanosomiasis africana humana (enfermedad del sueño), respectivamente.⁽²⁾

Las leishmaniasis son un grupo diverso de enfermedades tropicales desatendidas que afectan humanos en 98 países, y son causadas por al menos veinte especies de los parásitos protozoarios del género *Leishmania*. Las manifestaciones de la enfermedad van desde la leishmaniasis cutánea autocurativa hasta la leishmaniasis mucocutánea mutilante o leishmaniasis cutánea difusa⁽³⁾ y leishmaniasis visceral potencialmente mortal.⁽⁴⁾ La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que hay aproximadamente 0,2–0,4 millones de nuevos casos de leishmaniasis visceral y 0,7–1,2 millones de nuevos casos de leishmaniasis cutánea por año.⁽⁵⁾ La enfermedad no ocupa un lugar destacado en la agenda política o de investigación de muchos países, ya que normalmente afecta a los más pobres entre los pobres.⁽⁶⁾

La enfermedad llega a la población humana cuando el humano y los huéspedes reservorios comparten el mismo entorno.⁽⁷⁾ Las especies de leishmania se transmiten en un ciclo zoonótico, con perros o roedores como reservorio animal, pero otras son estrictamente antroponóticas.⁽⁸⁾

Las alternativas terapéuticas más usuales incluyen sales pentavalentes de antimonio, desoxicolato de anfotericina B y anfotericina B liposomal, paromomicina, pentamidina y azoles. Desde el inicio del tratamiento con antimoniales pentavalentes, se ha observado que los enfermos se resisten al tratamiento debido a su gran toxicidad y efectos secundarios; a su vez, se desarrollan cepas más resistentes del parásito. La mejora del desoxicolato de anfotericina B en forma liposomal redujo los efectos secundarios; sin embargo, el impacto financiero en las regiones pobres es preocupante. Se han desarrollado otros fármacos, entre ellos la miltefosina; sin embargo, existen cepas resistentes, y en la forma tegumentaria de la enfermedad, la respuesta varía según la especie del parásito. En este sentido, es importante desarrollar nuevas estrategias de tratamiento para la población afectada.⁽⁹⁻¹⁰⁾

La enfermedad de Chagas es una enfermedad tropical desatendida con alta prevalencia, morbilidad y mortalidad significativas. Las estimaciones de la carga de morbilidad de la Organización Mundial de la Salud colocan a la enfermedad de Chagas en el primer lugar entre las enfermedades parasitarias en las Américas. La transmisión ocurre cuando las heces de los insectos infectados contaminan el sitio de la picadura o las membranas mucosas intactas.⁽¹¹⁾

Sin embargo, durante la última década se han reportado numerosos casos de infección por *T. cruzi* por vía oral, debido a la contaminación de alimentos con heces de triatomíneos silvestres.⁽¹²⁾

El tratamiento de la enfermedad de Chagas todavía se basa en solo dos medicamentos, nifurtimox y benznidazol, los cuales fueron desarrollados en la década de 1970⁽¹³⁾ y tienen una eficacia limitada en la fase crónica tardía, causan efectos secundarios frecuentes y tienen resistencia a los medicamentos evolucionada.⁽¹⁴⁾

La tripanosomiasis africana humana, o enfermedad del sueño, es una enfermedad parasitaria transmitida por la mosca tsetse (*Glossina spp.*) y tiene una prevalencia fluctuante en el África subsahariana. La enfermedad es causada por dos subespecies de *Trypanosoma brucei*: *T. b. gambiense* (que causa la forma crónica más prevalente de la enfermedad) y *T. b. rhodesiense* (una subespecie mucho más virulenta y menos común). Ambas formas de la enfermedad progresan a través de una etapa inicial y temprana que involucra la infección de los sistemas sanguíneo y linfático, evolucionando hacia una infección del sistema nervioso central (SNC) en etapa tardía donde surgen los síntomas característicos: interrupción del sueño, confusión, coma y, si no se trata, muerte.⁽¹⁵⁾

Para la tripanosomiasis africana humana, la mayoría de los pacientes se diagnostican durante la etapa de afectación del SNC, se requieren fármacos que traspasen la barrera hematoencefálica. Esto ha dado lugar a una farmacopea bifurcada, en la que la infección del torrente sanguíneo se trata con los fármacos que no penetran en el cerebro suramina y pentamidina, mientras que la infección del SNC se ha tratado con eflornitina (con o sin nifurtimox) o melarsoprol (un agente tóxico que contiene arsénico) y que tiene una tasa de mortalidad del 5,7 %. Este último fármaco, hasta la reciente implementación de la terapia de combinación nifurtimox/eflornitina (NECT), era el único terapéutico disponible para las infecciones por *T. b. gambiense* y ahora está restringido al tratamiento del estadio 2 de la infección por *T. b. rhodesiense*.⁽¹⁵⁾

Todos estos medicamentos adolecen de limitaciones importantes que van desde la eficacia específica de la etapa hasta una toxicidad significativa, así como la necesidad de administración parenteral (intravenosa para suramina, melarsoprol y eflornitina e intramuscular para pentamidina), lo que plantea desafíos prácticos en las zonas rurales de África.⁽¹⁶⁾

Un sexto fármaco, el fexinidazol, concluyó recientemente con éxito los ensayos clínicos. Los resultados de los ensayos clínicos con fexinidazol administrado por vía oral demostraron que es seguro y eficaz contra *T. b. gambiense*, lo que lo convierte en el primer nuevo tratamiento terapéutico en tres décadas, así como la primera monoterapia oral tanto en etapa 1 como en etapa 2.⁽¹⁷⁾ No obstante, la resistencia se induce fácilmente *in vitro* y el fexinidazol muestra resistencia cruzada con el nifurtimox. Además, este fármaco requiere un régimen de tratamiento de alta carga de píldoras, lo que subraya que los esfuerzos de investigación para el descubrimiento de nuevas terapias para tratar esta enfermedad tropical desatendida siguen siendo de gran interés.⁽¹⁶⁾

No es de extrañar, que para estas tres enfermedades, la búsqueda de alternativas farmacológicas sea un reto para un gran número de investigadores del mundo.^(9, 18, 19) La proteína Cyp51 del citocromo P450 en la actualidad es una de las dianas más empleadas para el diseño de fármacos. El Cyp51 es empleado comúnmente como diana para el diseño de antifúngicos.⁽²⁰⁻²¹⁾ Varios triazoles utilizados como fungicidas, exhiben actividad tripanocida tanto *in vitro* como *in vivo*. El mecanismo de acción de tales fármacos se basa sobre la inhibición de la biosíntesis de ergosterol que afecta la viabilidad y el crecimiento celular.⁽¹⁸⁾

Para vencer el reto del diseño de nuevos candidatos a fármacos, existe una gran cantidad de técnicas, entre las que se destacan las técnicas computacionales como QSAR,^(22, 23) acoplamiento molecular (*molecular docking*)⁽²⁴⁻²⁶⁾ y/o dinámica molecular.^(27, 28)

A lo largo de su actividad, el grupo de investigación de Compuestos Bioactivos y Química Sostenible de la Universidad de Oriente ha diseñado un buen número de imidazoles sustituidos con potencial como el imidazol 4,5-difurilsustituido, dada su probada actividad antifúngica de interés agrícola. A su vez, estudios para evaluar la probable actividad antileishmania mediante el acoplamiento molecular de imidazoles 2-aril, 4,5-difuril sustituidos con diferentes blancos terapéuticos⁽²⁹⁾, orientan hacia el estudio de los imidazoles 2-[5-(4-nitrofenil)furil]-4,5-difurilimidazol y 2-[5-(4-carboxifenil)furil]-4,5-difurilimidazol. Estos resultados sugieren que se debe continuar el estudio de imidazoles 4,5-difurilsustituidos como potenciales agentes antimicrobianos.

Recientemente, en el grupo de investigación se han sintetizado imidazoles 2,4,5-triaril sustituidos y 1,2,4,5-tetraaril sustituidos donde, en su mayoría, las posiciones 4 y 5 son ocupadas por el fenilo y en menor medida por el grupo 2-furilo. Los mismos no habían sido estudiados como posibles agentes terapéuticos. Así, se han realizado estudios de acoplamiento

molecular explorando su interacción con diferentes blancos terapéuticos de *Mycobacterium tuberculosis* ⁽³⁰⁾, de la proteína oncogénica Bcr-Abl Tirosina Kinasa ⁽³¹⁾, y estudios combinados *in vitro* e *in silico* por acoplamiento molecular de su actividad antiprotozoaria.^(1, 32)

Tomando en consideración estos elementos, el objetivo del presente trabajo es realizar un estudio comparativo *in silico*, empleando el método de acoplamiento molecular, que permita evaluar la diferencia de emplear sustituyentes fenil o 2-furil en las posiciones 4 y 5 de imidazoles tetraarilsustituidos y triarilsustituidos como potenciales antiprotozoarios contra *Leishmania spp.*, *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*.

Materiales y métodos

Recursos computacionales

Los cálculos fueron realizados basados en los recursos computacionales del HPC de la Universidad de Oriente, clúster de tipo especializado. Se utilizó el sistema operativo Linux distribución Debian 8.0.

Modelación molecular de proteínas y ligandos para el acoplamiento molecular

Para la representación de las estructuras de los imidazoles sustituidos (figura 1), se empleó el programa ChemDraw Professional 15.0.⁽³³⁾ El programa Chem3D 15.0, ⁽³³⁾ se utilizó para realizar una optimización previa de las geometrías de los mismos, utilizando el método de mecánica molecular con campo de fuerza MMFF94 (en inglés Merck Molecular Force Field).

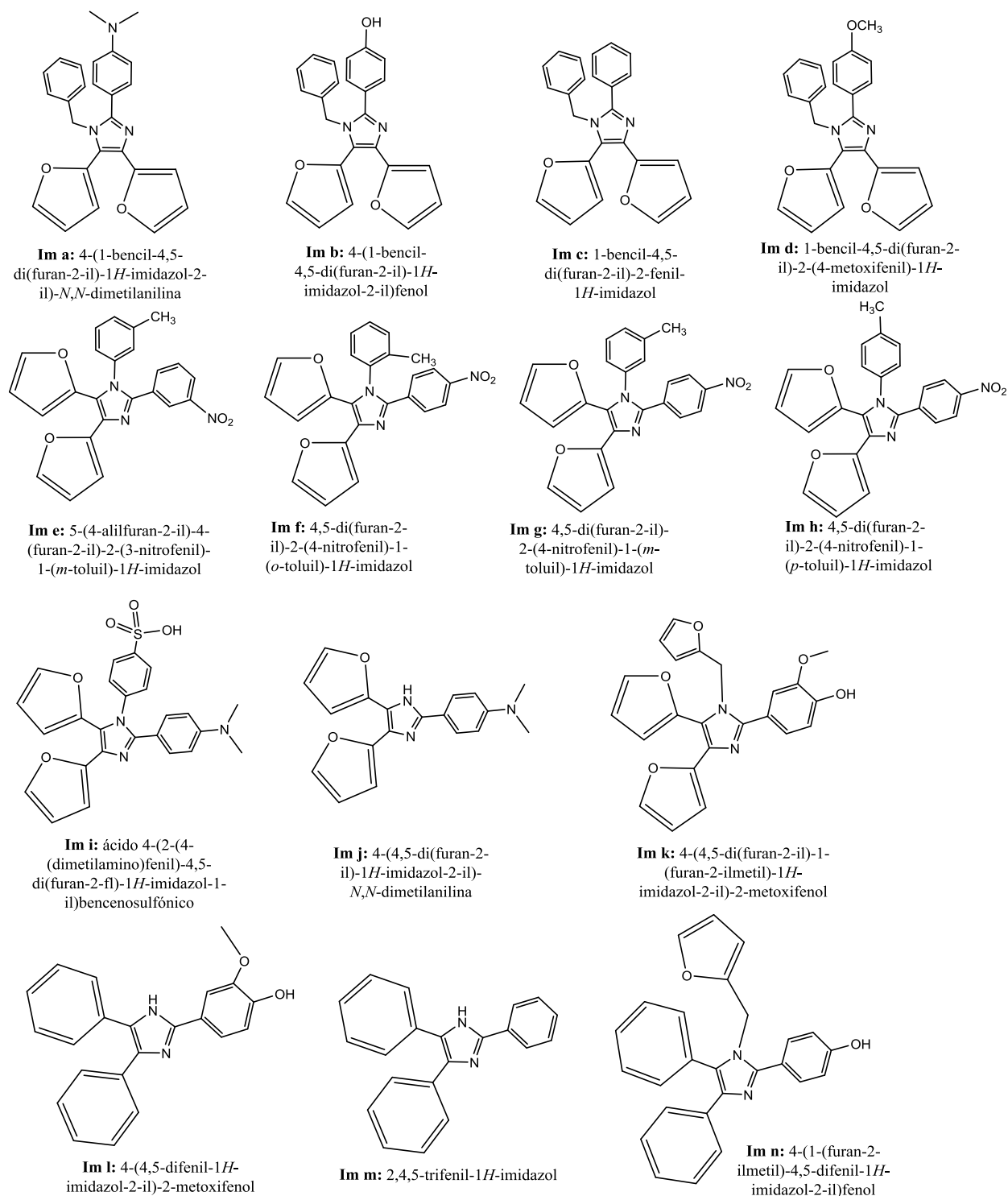


Fig. 1- Estructuras de los imidazoles estudiados

Para la modelación molecular de las proteínas se obtuvieron sus estructuras tridimensionales en formato .pdb, provenientes de la Base de Datos de Proteínas (en inglés Protein Data Bank), la cual es de acceso gratuito. Como estas estructuras son obtenidas generalmente por

difracción de rayos X, con el software UCSF Chimera versión 1.10.227⁽³⁴⁾ se identificaron todos los residuos provenientes de la cristalización de la macromolécula que no pertenecen como tal a las proteínas en su estado natural y podían interferir con sus centros activos y, por lo tanto, con la interpretación de los resultados.

El estudio de acoplamiento molecular se llevó a cabo a través de los programas AutoDock 4.2 y AutoDock Tools 1.5.6. Se utilizó el método de cálculo de carga de Gasteiger⁽³⁵⁾ y se agregaron cargas parciales a los átomos del ligando antes del acoplamiento, a través de AutoDock Tools. La visualización bidimensional de las interacciones hidrofóbicas y por puente de hidrógeno de los complejos, se efectuó por el programa Ligplot⁽³⁶⁾ y UCSF Chimera versión 1.10.227.⁽³⁴⁾

Las proteínas seleccionadas para este estudio corresponden al Citocromo P450, lanosterol 14 α demetilasa CYP51, de las especies *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. infantum*. Para el caso del CYP51 de *T. cruzi*, esta proteína se encuentra formando un complejo con el inhibidor VNF ((4-(4-clorofenil)-N-[2-(1H-imidazol-1-il)-1-feniletíl]benzamida) y su PDBID es 3KSW⁽³⁷⁾ con una resolución de 3.05 Å. El CYP51 de *T. brucei* se encuentra unido al (S)-N-(3-(1H-indol-3-il)-1-oxo-1-(piridin-4-ilamino)propan-2-il)-3,3'-difluoro-(1,1'-bifenil)-4-carboxamida con PDBID: 4BJK⁽³⁸⁾ y resolución de 2.67 Å. Para *L. infantum* la proteína CYP51 se encuentra formando un complejo con el fluconazol, su PDBID es 3L4D⁽³⁹⁾ y su resolución de 2.75 Å.

En las estructuras de las proteínas 3L4D y 4BJK se seleccionó la cadena A para la realización del acoplamiento molecular. La estructura de la 3KSW presenta una sola cadena.

Elección de parámetros para el acoplamiento molecular

AutoDock requiere de la realización de un pre-cálculo de los mapas *grid*, uno para cada tipo de átomo presente en el ligando y ubicar, a su vez a dicho ligando, alrededor de la región de interés (sitio activo) en la macromolécula. Para lograr esto se requiere suministrar una serie de parámetros afines. En la tabla 1 se muestran los parámetros elegidos para cada una de las proteínas estudiadas.

Tabla 1- Parámetros para la realización del precálculo de los mapas *grid* y la ubicación del ligando alrededor de la región del sitio activo de la macromolécula

Proteínas	Coordenadas x;y;z	Tamaño (puntos)	Espaciado (Å)
CYP51— <i>T. cruzi</i>	2,48; 26,996; 22,191	50 · 50 · 50	0,375
CYP51— <i>L. infantum</i>	31,917; -28,96; -1,658	50 · 50 · 50	0,375
CYP51— <i>T. brucei</i>	26,642; 58,216; 26,493	50 · 50 · 50	0,375

El Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA) fue utilizado para explorar el mejor espacio conformacional para el ligando, con 50 corridas para cada uno de los acoplamientos. Se ajustó el cálculo a un número de evaluaciones de la energía de $2,5 \cdot 10^6$.

Resultados y discusión

Análisis del acoplamiento molecular de los imidazoles con las proteínas estudiadas

A continuación se evalúa el efecto de la sustitución en las posiciones 4 y 5 del imidazol por grupos fenilo o 2-furilo. Para ello se toman como muestra catorce imidazoles sustituidos y se analiza su interacción con las proteínas CYP51 de *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. infantum*. Para ello se tomó como referencia lo reportado por Rojas y colaboradores ⁽¹⁾, donde 11 imidazoles tetraarilsustituidos y 3 triarilsustituidos fueron sintetizados, determinadas sus actividades antiprotozoarias *in vitro* y analizada su interacción con enzimas Cyp51 empleando la técnica *in silico* del acoplamiento molecular. Un incremento significativo de los valores de las energías libres de unión, con la consiguiente disminución de la constante de inhibición de los imidazoles 2-furilsustituidos con respecto a los fenilsustituidos, indicará una mayor afinidad de la proteína por los imidazoles 2-furilsustituidos. En caso contrario, indicará una mayor afinidad por los fenilsustituidos.

En la figura 2 se muestra cómo el sitio activo de esta proteína CYP51—*L. infantum* se encuentra en una región más bien neutra; se pudiera decir que hasta en algunos sitios

ligeramente hidrofóbico, aunque la presencia del grupo Hemo le brinda un fuerte carácter hidrofílico. Por lo tanto, es de esperar que la mayor parte de las interacciones con los imidazoles ocurra mediante puentes de hidrógeno con el grupo Hemo e interacciones hidrofóbicas con el resto del sitio activo, aunque no se deben descartar otras interacciones.

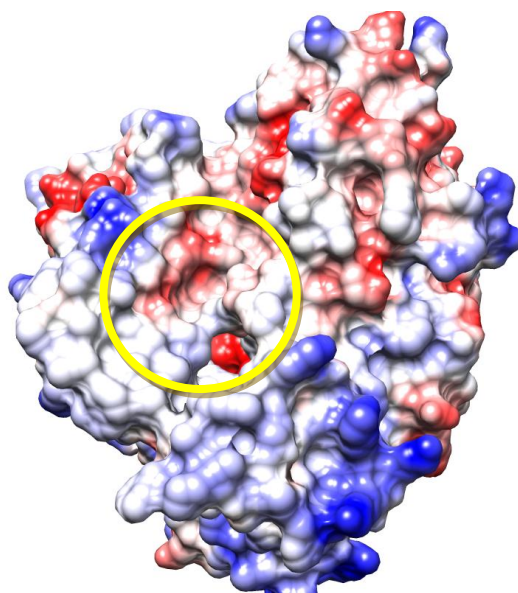
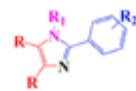


Fig. 2- Superficie electrostática de la proteína CYP51—*L. infantum*. Según la escala de colores, el rojo representa el carácter hidrofílico y el azul el hidrofóbico

Los valores de las energías libres de unión y los valores de la constante de inhibición del complejo proteína-imidazol se muestran en la tabla 2. Como se puede observar, los imidazoles fenilsustituídos presentan mejores valores de energía libre de unión y de constante de inhibición que sus homólogos 2-furilsustituídos. Esto es algo esperado, ya que el grupo fenilo es más voluminoso que el 2-furilo y, por lo tanto, debe generar más interacciones hidrofóbicas. Sin embargo, un imidazol escapa a ese comportamiento.

Tabla 2- Valores de energías libres de unión (ΔG en kcal/mol) y constante de inhibición (K_i en nM) de los acoplamientos de los imidazoles sustituidos con la proteína CYP51—*L. infantum*

			R= 2-furil		R= fenil	
Im-	R1	R2	ΔG (kcal/mol)	Ki (nM)	ΔG (kcal/mol) ^a	Ki (nM) ^a
a	Ph-CH ₂	<i>p</i> -N(CH ₃) ₂	-9,76	70,13	-11,13	7
b	Ph-CH ₂	<i>p</i> -OH	-9,67	81,63	-10,37	25,1
c	Ph-CH ₂	H	-9,65	84,43	-10,74	13,31
d	Ph-CH ₂	<i>p</i> -OCH ₃	-9,87	58,24	-10,95	9,46
e	<i>m</i> -CH ₃ -C ₆ H ₄ -	<i>m</i> -NO ₂	-10,55	18,48	-12,88	0,36
f	<i>o</i> -CH ₃ -C ₆ H ₄ -	<i>p</i> -NO ₂	-7,59	2 730	-9,22	175,52
g	<i>m</i> -CH ₃ -C ₆ H ₄ -	<i>p</i> -NO ₂	-10,64	15,88	-9,40	128,58
h	<i>p</i> -CH ₃ -C ₆ H ₄ -	<i>p</i> -NO ₂	-8,14	1 080	-8,44	649,09
i	<i>p</i> -SO ₃ H-C ₆ H ₄ -	<i>p</i> -N(CH ₃) ₂	-5,72	64 150	-6,39	20 800
j	-	<i>p</i> -N(CH ₃) ₂	-8,47	618,66	-9,84	61,34
k	Fu-CH ₂	4-OH, 3-CH ₃ O	-8,95	275,18	-10,61	16,18
l	-	4-OH, 3-CH ₃ O	-7,75 ^a	2 080,00 ^a	-9,08	220,96
m	-	C ₆ H ₅	-8,19 ^a	10 00,00 ^a	-9,32	147,37
n	Fu-CH ₂	<i>p</i> -OH	-10,26 ^a	29,97 ^a	-10,20	33,37

^aFuente: R. VARGAS, J. A. *et al.*

El “Im g” presenta un descenso marcado en los valores de energía libre de unión y de constante de inhibición, por lo que se puede decir que es el único de los imidazoles 2-furilsustituidos con mejor afinidad hacia la proteína CYP51—*L. infantum*, que su par fenilsustituido. En la figura 3 se puede apreciar que las interacciones en común se establecen con los residuos Met357, Met359, Met459, Val460, Leu355, Tyr115, Phe104 y Tyr102. Aparte de ellas, “Im g” presenta 8 interacciones hidrofóbicas con residuos de aminoácidos y otra con el grupo Hemo. Por su parte, su par fenilsustituido presenta 6 interacciones hidrofóbicas con residuos de aminoácidos y tres puentes de hidrógeno con el grupo Hemo.

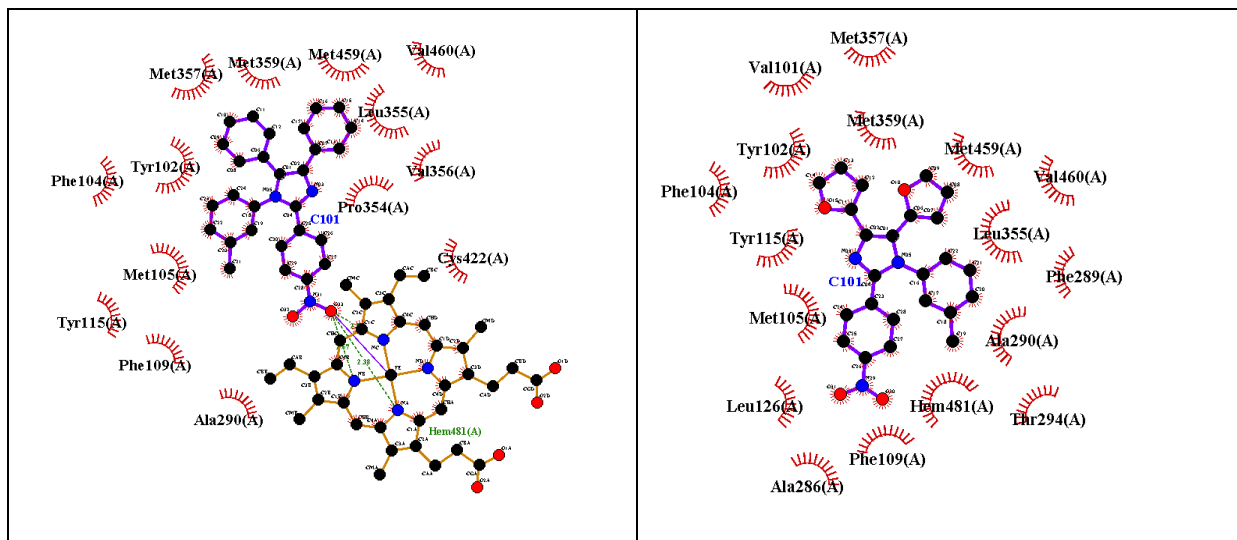


Fig. 3- Interacciones de “Imi g” y su par fenilsustituido contra la proteína CYP51—*L. infantum*

En la figura 4 se muestra cómo el sitio activo de esta proteína CYP51—*T. brucei* es similar al de la proteína CYP51—*L. infantum*, lo cual era de esperar, dado a que estos protozoos pertenecen a una misma familia.

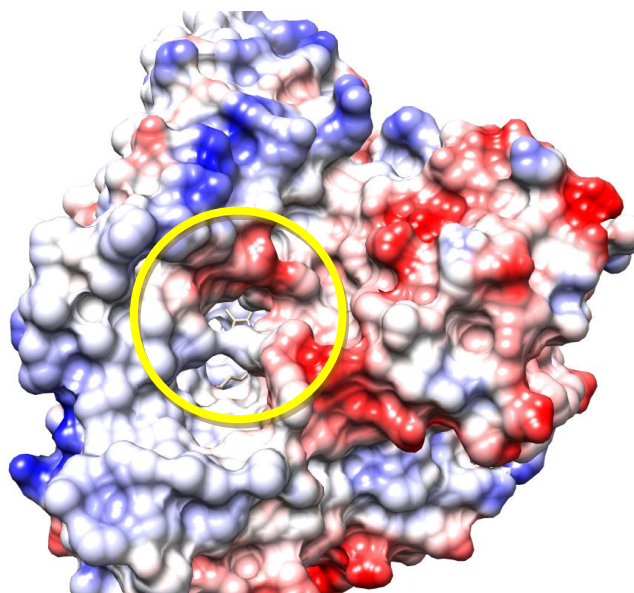
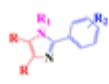


Fig. 4- Superficie electrostática de la proteína CYP51—*T. brucei*. Según la escala de colores, el rojo representa el carácter hidrofílico y el azul el hidrofóbico

De manera similar ocurre con la proteína CYP51—*T. brucei* (tabla 3), donde los imidazoles

fenilsustituidos presentan mejores valores de energía libre de unión y de constante de inhibición que sus homólogos 2-furilsustituidos, excepto para el imidazol “Im h”, el cual presenta un ligero descenso en su valor de energía libre de unión y constante de inhibición en comparación con su par fenilsustituido.

Tabla 3- Valores de energías libres de unión (ΔG en kcal/mol) y constante de inhibición (K_i en nM) de los acoplamientos de los imidazoles sustituidos contra la proteína CYP51— *T. brucei*

			R= 2-furil		R= fenil	
Im-	R1	R2	ΔG (kcal/mol)	K_i (nM)	ΔG (kcal/mol) ^a	K_i (nM) ^a
a	Ph-CH2	p-N(CH3)2	-9,82	63,37	-10,58	17,68
b	Ph-CH2	p-OH	-9,45	118,33	-9,84	61,38
c	Ph-CH2	H	-9,06	228,55	-9,76	69,82
d	Ph-CH2	p-OCH3	-9,35	140,09	-9,97	49,08
e	m-CH3-C6H5	m-NO2	-13,68	0,09	-14,47	0,02
f	o-CH3-C6H5	p-NO2	-14,09	0,05	-14,75	0,02
g	m-CH3-C6H5	p-NO2	-12,79	0,42	-14,01	0,05
h	p-CH3-C6H5	p-NO2	-13,02	0,29	-12,56	0,62
i	p-SO3H-C6H5	p-N(CH3)2	-9,88	57,27	-10,58	17,55
j	-	p-N(CH3)2	-8,03	1 300,00	-8,68	437,39
k	Fu-CH2	4-OH, 3-CH3O	-9,26	163,07	-10,15	36,02
l	-	4-OH, 3-CH3O	-8,43 [*]	665,25 [*]	-8,74	392,23
m	-	C6H5	-9,07 [*]	226,01 [*]	-9,13	203,08
n	Fu-CH2	p-OH	-9,83 [*]	62,73 [*]	-9,62	88,82

^aFuente: R. VARGAS, J. A. *et al.*

En la figura 5 se puede apreciar que las interacciones en común de “Im h” y su par fenilsustituido se establecen con los residuos Met358, Met360, Met460, Val213, Cys422, Leu357, Tyr116, Phe105 y Tyr103. Aparte de ellas, “Im h” presenta 4 interacciones hidrofóbicas con residuos de aminoácidos y 3 puentes de hidrógeno con el grupo Hemo. Por su parte, su par fenilsustituido presenta 5 interacciones hidrofóbicas más con residuos de aminoácidos y también 3 puentes de hidrógeno con el grupo Hemo, aunque a mayor distancia que “Imi h”. Tal vez es por eso que la energía libre de unión de “Imi h” es mayor que la de su par fenilsustituido.

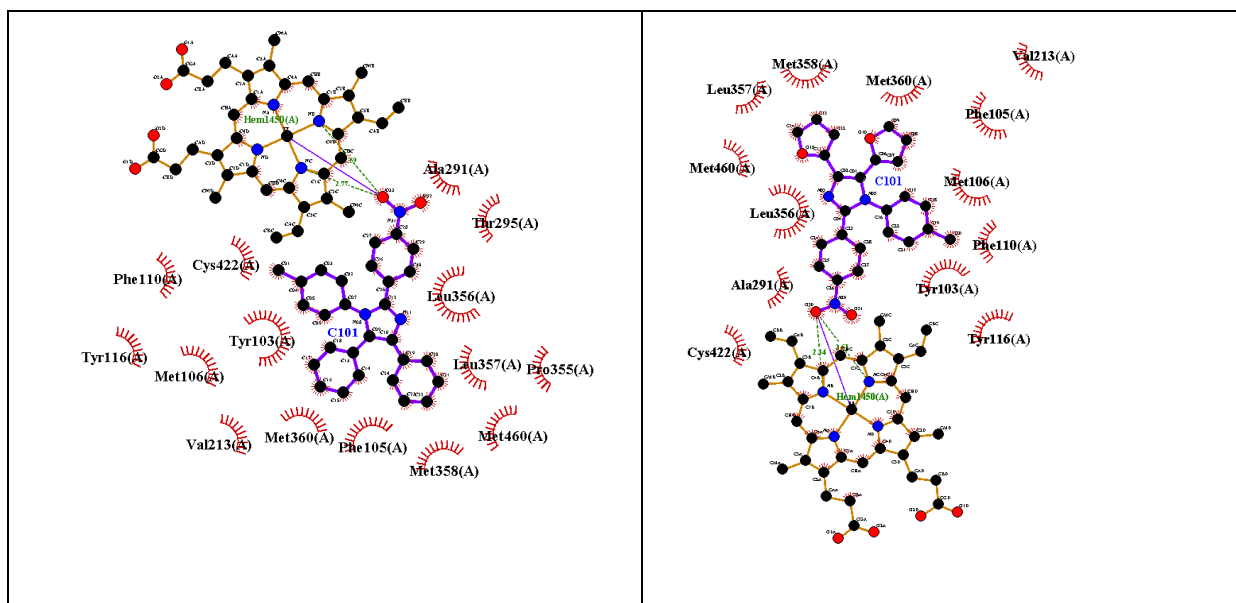


Fig. 5- Interacciones de “Imi h” y su par fenilsustituido contra la proteína CYP51— *T. brucei*

En la figura 6 se muestra cómo el sitio activo de esta proteína CYP51—*T. cruzi* es mucho más parecido al de la proteína CYP51—*T. brucei* que al de la proteína CYP51—*L. infantum*. De esto se podría esperar que el análisis de las conformaciones para esta proteína sea similar a la de la proteína CYP51—*T. brucei* y así es. En la tabla 4, se observan un ligero aumento de los valores de energía libre de unión y, por consiguiente menores valores de constante de inhibición para el imidazol “Im h”, al igual que ocurre en la proteína CYP51—*T. brucei*.

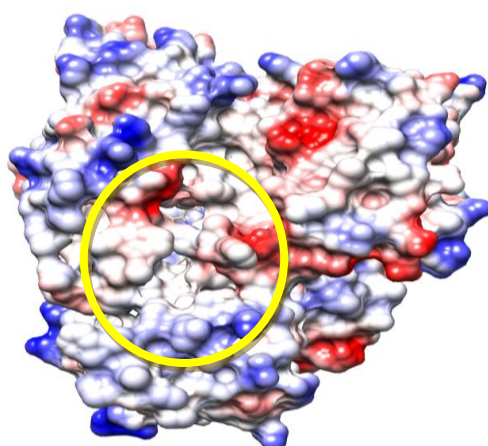
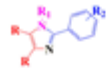


Fig. 6- Superficie electrostática de la proteína CYP51—*T. cruzi*. Según la escala de colores, el rojo representa el carácter hidrofílico y el azul el hidrofóbico

Tabla 4- Valores de energías libres de unión (ΔG en kcal/mol) y constante de inhibición (K_i en nM) de los acoplamientos de los imidazoles sustituidos contra la proteína CYP51— *T. cruzi*

			R=2-furil		R=fenil	
Im-	R1	R2	ΔG (kcal/mol)	K_i (nM)	ΔG (kcal/mol) ^a	K_i (nM) ^a
a	Ph-CH ₂	<i>p</i> -N(CH ₃) ₂	-9,30	152,43	-9,91	54,32
b	Ph-CH ₂	<i>p</i> -OH	-8,55	540,52	-9,98	48,54
c	Ph-CH ₂	H	-9,60	91,87	-9,61	90,61
d	Ph-CH ₂	<i>p</i> -OCH ₃	-9,85	60,24	-10,41	23,31
e	<i>m</i> -CH ₂ -C ₆ H ₄ -	<i>m</i> -NO ₂	-12,74	0,46	-13,32	0,17
f	<i>o</i> -CH ₂ -C ₆ H ₄ -	<i>p</i> -NO ₂	-12,97	0,32	-13,63	0,10
g	<i>m</i> -CH ₂ -C ₆ H ₄ -	<i>p</i> -NO ₂	-13,12	0,24	-13,8	0,08
h	<i>p</i> -CH ₂ -C ₆ H ₄ -	<i>p</i> -NO ₂	-13,73	0,088	-13,49	0,13
i	<i>p</i> -SO ₂ H-C ₆ H ₄ -	<i>p</i> -N(CH ₃) ₂	-12,72	0,47	-14,54	0,02
j	-	<i>p</i> -N(CH ₃) ₂	-7,8	1 920,00	-9,48	112,65
k	Fu-CH ₂	4-OH, 3-CH ₃ O	-8,27	867,07	-9,25	167,21
l	-	4-OH, 3-CH ₃ O	-7,24 ^b	4 950,00 ^b	-7,74	2,12
m	-	C ₆ H ₅	-7,31 ^a	4 370,00 ^a	-7,92	1570,00
n	Fu-CH ₂	<i>p</i> -OH	-9,33 ^a	144,90 ^a	-9,59	93,98

^aFuente: R. VARGAS, J. A. *et al.*

En la figura 7 se puede apreciar que las interacciones en común de “Im h” y su par fenilsustituido se establecen con los residuos Met106, Cys422, Leu 356, Ala291 y Phe110. Aparte de ellas, el “Im h” presenta 7 interacciones hidrofóbicas con residuos de aminoácidos y 5 puentes de hidrógeno con el grupo Hemo. Por su parte, su par fenilsustituido presenta 6 interacciones hidrofóbicas más con residuos de aminoácidos y 4 puentes de hidrógeno con el grupo Hemo, aunque a mayor distancia que “Imi h”.

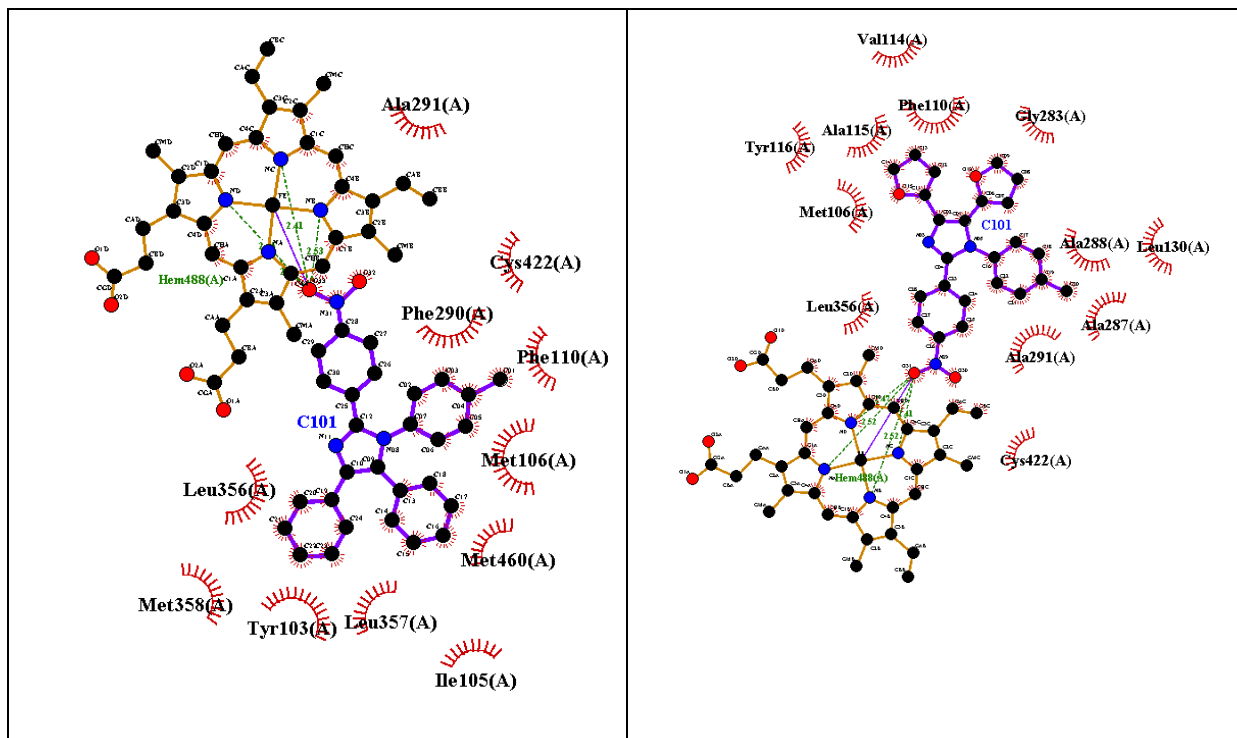


Fig. 7- Interacciones de “Imi h” y su par fenilsustituido contra la proteína CYP51— *T. cruzi*

Conclusiones

De manera general, los imidazoles sustituidos en las posiciones 4 y 5 con fenilos presentan mayor afinidad por las 3 proteínas estudiadas que los sustituidos con 2-furil. El “Imi g”, 4,5-di(furan-2-il)-2-(4-nitrofenil)-1-(m-toluil)-1H-imidazol constituye una excepción para la proteína CYP51— *L. infantum*, mientras que “Imi h”, 4,5-di(furan-2-il)-2-(4-nitrofenil)-1-(p-toluil)-1H-imidazol constiuye una excepción, tanto para la proteína CYP51— *T. brucei* como para *T. cruzi*.

Agradecimientos

Esta investigación se realizó con el apoyo del Centro Cubano de Supercomputación Académica (HPC-Cuba) apoyado por el proyecto VLIR-UOS JOINT y la Red Iberoamericana de Supercomputación (RICAP)

Referencias bibliográficas

1. R. VARGAS, J. A. *et al.* "In vitro evaluation of arylsubstituted imidazoles derivatives as antiprotozoal agents and docking studies on sterol 14 α -demethylase (CYP51) from *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum*, and *Trypanosoma brucei*". *Parasitology research*, 2019, **118** (5), 1533-1548. DOI: 10.1007/s00436-019-06206-z.
2. ALCÂNTARA, L. M.; FERREIRA, T. C. S.; GADELHA, F. R.; MIGUEL, D. C. "Challenges in drug discovery targeting TriTryp diseases with an emphasis on leishmaniasis". *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2018, **8** (3), 430-439. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2018.09.006.
3. ARONSON, N. E.; JOYA, C. A. "Cutaneous leishmaniasis: updates in diagnosis and management". *Infectious Disease Clinics*, 2019, **33** (1), 101-117. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.004>.
4. VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. "Visceral leishmaniasis". *Infectious Disease Clinics*, 2012, **26** (2), 309-322. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.005>.
5. HAILU, A.; DAGNE, D. A.; BOELAERT, M. *Leishmaniasis*. En GYAPONG, J.; BOATIN, B. *Neglected Tropical Diseases-Sub-Saharan Africa*. Springer, 2016, p. 87-112. ISBN: 978-3-319-25471-5. DOI: 10.1007/978-3-319-25471-5_5.
6. BOELAERT, M.; MEHEUS, F.; SANCHEZ, A.; SINGH, S., *et al.* "The poorest of the poor: a poverty appraisal of households affected by visceral leishmaniasis in Bihar, India". *Tropical medicine & international health*, 2009, **14** (6), 639-644. DOI: 10.1111/j.1365-3156.2009.02279.x.
7. ALEMAYEHU, B.; ALEMAYEHU, M. "Leishmaniasis: a review on parasite, vector and reservoir host". *Health Science Journal*, 2017, **11** (4), 1. DOI: 10.21767/1791-809X.1000519.
8. TORRES-GUERRERO, E.; QUINTANILLA-CEDILLO, M. R.; RUIZ-ESMENJAUD, J.; ARENAS, R. "Leishmaniasis: a review". *F1000Research*, 2017, **6**. DOI: 10.12688/f1000research.11120.1.
9. PONTE-SUCRE, A.; GAMARRO, F.; DUJARDIN, J.-C.; BARRETT, M. P., *et al.* "Drug

resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge". *PLoS neglected tropical diseases*, 2017, **11** (12), e0006052. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006052.

10. M. ROATT, B. *et al.* "Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 1-13. DOI: 10.1007/s00253-020-10856-w.

11. BERN, C.; KJOS, S.; YABSLEY, M. J.; MONTGOMERY, S. P. "Trypanosoma cruzi and Chagas' disease in the United States". *Clinical microbiology reviews*, 2011, **24** (4), 655-681. DOI: 10.1128/CMR.00005-11.

12. RUEDA, K.; TRUJILLO, J. E.; CARRANZA, J. C.; VALLEJO, G. A. "Transmisión oral de Trypanosoma cruzi: una nueva situación epidemiológica de la enfermedad de Chagas en Colombia y otros países suramericanos". *Biomédica*, 2014, **34** (4), 631-641. DOI: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i4.2204>.

13. RIBEIRO, V. *et al.* "Current trends in the pharmacological management of Chagas disease". *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2020, **12**, 7-17. <https://doi.org/10.1016/J.IJPDDR.2019.11.004>.

14. CARDOSO, M. F.; FOREZI, L. S.; DE SOUZA, A. S.; FARIA, A. F., *et al.* "Tandem Synthesis of Furanaphthoquinones via Enamines and Evaluation of Their Antiparasitic Effects against Trypanosoma cruzi". *J. Braz. Chem. Soc.*, 2021, **00** (00). Forthcomming Paper. <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/50309>.

15. POLLASTRI, M. P. "Fexinidazole: a new drug for African sleeping sickness on the horizon". *Trends in parasitology*, 2018, **34** (3), 178-179. DOI: 10.1016/j.pt.2017.12.002.

16. HULPIA, F. *et al.* "Combining tubercidin and cordycepin scaffolds results in highly active candidates to treat late-stage sleeping sickness". *Nature communications*, 2019, **10** (1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13522-6>.

17. MESU, V. K. B. K. *et al.* "Oral fexinidazole for late-stage African Trypanosoma brucei gambiense trypanosomiasis: a pivotal multicentre, randomised, non-inferiority trial". *The Lancet*, 2018, **391** (10116), 144-154. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)32758-7.

18. REIGADA, C. *et al.* "Repurposing of terconazole as an anti Trypanosoma cruzi agent". *Heliyon*, 2019, **5** (6), e01947. DOI: 10.1016/j.heliyon.2019.e01947.

19. DE KONING, H. P. "The drugs of sleeping sickness: their mechanisms of action and resistance, and a brief history". *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 2020, **5** (1), 14. DOI: 10.3390/tropicalmed5010014.
20. HAN, G. *et al.* "Discovery of novel fungal lanosterol 14 α -demethylase (CYP51)/histone deacetylase dual inhibitors to treat azole-resistant candidiasis". *Journal of medicinal chemistry*, 2020, **63** (10), 5341-5359. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.0c00102.
21. SONG, J.; ZHANG, S.; LU, L. "Fungal cytochrome P450 protein Cyp51: What we can learn from its evolution, regulons and Cyp51-based azole resistance". *Fungal Biology Reviews*, 2018, **32** (3), 131-142. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2018.05.001>.
22. DE ALMEIDA FIUZA, L. F. *et al.* "Identification of Pyrazolo [3, 4-e][1, 4] thiazepin based CYP51 inhibitors as potential Chagas disease therapeutic alternative: In vitro and *in vivo* evaluation, binding mode prediction and SAR exploration". *European journal of medicinal chemistry*, 2018, **149**, 257-268. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.02.020.
23. DE OLIVEIRA, P. I. C. *et al.* "Planning new Trypanosoma cruzi CYP51 inhibitors using QSAR studies". *Molecular Diversity*, 2020, 1-17. DOI: 10.1007/s11030-020-10113-2.
24. SHAH, S. M. *et al.* " β -Sitosterol from *Ifloga spicata* (Forssk.) Sch. Bip. as potential anti-leishmanial agent against leishmania tropica: docking and molecular insights". *Steroids*, 2019, **148**, 56-62. DOI: 10.1016/j.steroids.2019.05.001.
25. PALMA, L. C. *et al.* "A docking-based structural analysis of geldanamycin-derived inhibitor binding to human or Leishmania Hsp90". *Scientific reports*, 2019, **9** (1), 1-9. DOI:10.1038/s41598-019-51239-0.
26. MERCADO-CAMARGO, J. *et al.* "Homology modeling of leishmanolysin (gp63) from *Leishmania panamensis* and molecular docking of flavonoids". *ACS omega*, 2020, **5** (24), 14741-14749. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01584>.
27. BHOWMIK, D. *et al.* "Evaluation of potential drugs against leishmaniasis targeting catalytic subunit of *Leishmania donovani* nuclear DNA primase using ligand based virtual screening, docking and molecular dynamics approaches". *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2021, **39** (5), 1838-1852. DOI: 10.1080/07391102.2020.1739557.

28. SHI, N.; ZHENG, Q.; ZHANG, H. "Molecular dynamics investigations of binding mechanism for triazoles inhibitors to CYP51". *Frontiers in molecular biosciences*, 2020, **7**, 266. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.586540>.
29. R. VARGAS, J. A.; LOPEZ, A. G.; PIÑOL, M. C.; FROEYEN, M. "Molecular docking study on the interaction between 2-substituted-4, 5-difuryl Imidazoles with different Protein Target for antileishmanial activity". *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2018, **8** (03), 014-022. DOI:10.7324/JAPS.2018.8303.
30. ROJAS VARGAS, J. A.; LÓPEZ, A. G.; FROEYEN, M. "Molecular Docking Studies of 1, 2, 4, 5-tetrasubstituted Imidazoles with Different Protein Targets of *Mycobacterium tuberculosis*". *Biomirror*, 2016, **7**. <https://www.researchgate.net/publication/308564671>.
31. VARGAS, J. A. R.; LÓPEZ, A. G.; RODRÍGUEZ, L. A.; FROEYEN, M. "Molecular Docking Studies of Arylsubstituted Imidazoles on Oncogenic Protein Bcr-Abl Tyrosine kinase". *Journal of PharmaSciTech*, 2018, **8** (2). <https://www.researchgate.net/publication/331983186>.
32. ROJAS VARGAS, J. A. *et al.* ". *In vitro* Evaluation and Molecular Docking Studies of Aryl-Substituted Imidazoles against *Leishmania amazonensis*". *Int. J. Trop. Dis.*, 2021, **4** (2). 10.23937/2643-461x/1710050.
33. EVANS, D. A. "History of the Harvard ChemDraw project". *Angewandte Chemie International Edition*, 2014, **53** (42), 11140-11145. <https://doi.org/10.1002/anie.201405820>.
34. PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S., *et al.* "UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis". *Journal of computational chemistry*, 2004, **25** (13), 1605-1612. DOI: 10.1002/jcc.20084.
35. GASTEIGER, J.; MARSILI, M. "Iterative partial equalization of orbital electronegativity—a rapid access to atomic charges". *Tetrahedron*, 1980, **36** (22), 3219-3228. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(80\)80168-2](https://doi.org/10.1016/0040-4020(80)80168-2).
36. WALLACE, A. C.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. "LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions". *Protein engineering, design and selection*, 1995, **8** (2), 127-134. DOI: 10.1093/protein/8.2.127.

37. LEPESHEVA, G. I. *et al.* "Structural insights into inhibition of sterol 14 α -demethylase in the human pathogen *Trypanosoma cruzi*". *Journal of Biological Chemistry*, 2010, **285** (33), 25582-25590. DOI: 10.1074/jbc.M110.133215.

38. CHOI, J. Y. *et al.* "Rational development of 4-aminopyridyl-based inhibitors targeting *Trypanosoma cruzi* CYP51 as anti-Chagas agents". *Journal of medicinal chemistry*, 2013, **56** (19), 7651-7668. DOI: 10.1021/jm401067s.

39. HARGROVE, T. Y. *et al.* "Substrate preferences and catalytic parameters determined by structural characteristics of sterol 14 α -demethylase (CYP51) from *Leishmania infantum*". *Journal of Biological Chemistry*, 2011, **286** (30), 26838-26848. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.237099>.

Conflicto de interés

Los autores expresan que no hay conflictos de intereses en el manuscrito presentado.

Contribución de los autores

Mariana Castro, Julio Rojas. Participaron activamente en la discusión de los resultados.

América García López, Jorge Acevedo. Trabajaron en la revisión y aprobación de la versión final del trabajo.