

Modelado molecular y docking con la enzima NQO1 de naftofuroquinonas antitumorales, presentes en *Tabebuia barbata*

Molecular modeling and docking with the enzyme NQO1 from antitumoral naphthoquinones present in *tabebuia barbata*

MILAGROS AVENDAÑO*, TRINA COLMAN DE SAIZARBITORIA**
Y MARYSABEL CORDERO TROCONIS

Resumen

Tabebuia barbata (familia Bignoniaceae), conocida como "Palo de Arco" es autóctona del alto Orinoco. En algunas especies de esta familia se han encontrado naftoquinonas con actividad antitumoral. El análisis fitoquímico de esta especie reveló la presencia de cinco naftofuroquinonas que presentaron potente actividad citotóxica sobre células tumorales tales como A-549 (pulmón), MCF-7 (mama) y HT-29 (colon), además de inhibir el transporte electrónico mitocondrial. A fin de entender y explicar la función biológica de las estructuras químicas en términos moleculares, se estudiaron descriptores lipofílicos y electrónicos tales como las energías del HOMO y LUMO, afinidad electrónica y Log P. Estos parámetros fueron calculados para una serie de estructuras relacionadas utilizando nivel de teoría semiempírico (PM3) y fueron comparados con la metodología del funcional de la densidad (funcional B88-LYP GGA y base 6-31G(d)). Este último método fue seleccionado para cálculos posteriores. A continuación se llevó a cabo un estudio de docking utilizando como blanco la enzima oxidorreductasa NQO1 dependiente de NAD(P)H. Las citotoxicidades frente a líneas celulares A-549 y MCF-7, de los compuestos (1-5) mostraron relación con la afinidad electrónica (energía del LUMO) y con el ΔG de unión a NQO1. Finalmente, con ayuda del programa SYBYL[®] se postuló un modelo farmacofórico para naftofuroquinonas citotóxicas inhibidoras de la NQO1.

Palabras clave: Naftofuroquinonas; descriptores electrónicos; actividad antitumoral; oxidorreductasa NQO1.

Abstract

Tabebuia barbata (Bignoniaceae), known locally as "Palo de Arco" is indigenous to the upper Orinoco. Some related species have given rise to a variety of naphthoquinones with antitumor activity. Phytochemical analyses of this species revealed the presence of five naphthofuroquinones that demonstrated potent cytotoxic activity against tumor cell cultures such as A-549 (lung cancer), MCF-7 (breast cancer) and HT-29 (colon cancer); they also inhibit the mitochondrial electronic transport. Aiming to understand and explain the biological functions of chemical structures in molecular terms, the electronic and lipophilic descriptors are studied, such as HOMO and LUMO's energies, electronic affinity and log P. These parameters were calculated for a serial of related structures. Semiempirical (PM3) calculation was compared with the density functional methodology (B88-LYP GGA functional with the 6-31G(d) basis sets). The later was the selected method for the remaining calculation. Next, a docking study was performed using NAD(P)H NQO1 oxidoreductase enzyme as the selected target. The compounds (1 – 5) cytotoxic activity on A-549 and MCF-7 cell lines showed relation with the electron affinity (LUMO's energy) and also with the binding energy (ΔG) to NQO1. Finally with the aid of the SYBYL[®] program a pharmacophore alignment was performed and a pharmacophore model was postulated for these inhibitors of NQO1 cytotoxic naphthofuroquinones.

Key words: Naphthofuroquinones, Electronic descriptors, antitumor activity, NQO1 oxidoreductase.

* milavend@yahoo.es

** trinaco@cantv.net

Laboratorio de Modelado Molecular "José Luis Andrade", Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, Apartado Postal 40.109, Caracas 1040-A, Venezuela.

Introducción

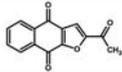
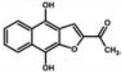
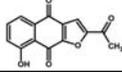
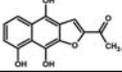
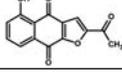
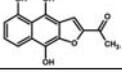
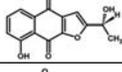
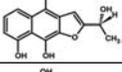
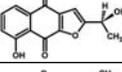
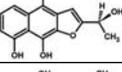
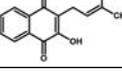
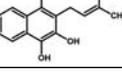
El cáncer representa un problema mundial de salud. El creciente número de casos con diagnóstico de cáncer coloca una enorme presión en los sistemas de salud a nivel mundial. En un organismo sano las células trabajan guiadas por una programación biológica que produce un conjunto armonioso. Las células cancerosas interrumpen este estado a causa de que pierden su programación natural luego que su ADN sufre mutaciones diversas. Los tratamientos tradicionales conllevan una serie de efectos secundarios que disminuyen la calidad de vida del paciente. Por ello, existe interés creciente en los remedios herbarios, los cuales cuentan con bastante aprecio del público general.

Tabebuia barbata (E. Mey) Sandw. (Bignoniaceae), conocida en Venezuela como "palo de arco", es autóctona de la región del alto Orinoco y del río Amazonas. Su corteza ha sido utilizada por la población indígena local por sus propiedades antibióticas, anti-inflamatorias y antimaláricas. Algunas especies relacionadas de *Tabebuia*, han sido utilizadas también en norte y sur América para los mismos propósitos durante muchos años. En un trabajo previo se realizó un fraccionamiento biodirigido del extracto etanólico de la corteza de esta planta, con la prueba de letalidad sobre *Artemia salina*. Este fraccionamiento condujo al aislamiento de cinco compuestos **1** – **5** (Colman, 1996) (Tabla I), los cuales demostraron poseer potente actividad antitumoral sobre cultivos celulares tales como células A-549 (cáncer de pulmón), células MCF-7 (cáncer de mama) y células HT-29 (cáncer de colon).

Las naftofuroquinonas han mostrado propiedades antibacterianas, antiprotozoarias (Wright, 1990; Colman, 1996) y, adicionalmente, los compuestos **1** – **5** resultaron ser inhibidores del transporte electrónico en mitocondrias de hígado de rata, usando como referencia a la Rotenona, con valores de IC_{50} entre 15 a 82,5 μ M (Colman, 1996). El Lapachol y la 3-Alil- β -lapachona han sido investigadas como antiprotozoarias y mostraron que poseen actividad contra varias especies de protozoarios. Las naftoquinonas también han resultado ser potentes inhibidores del transporte electrónico en protozoarios. La presencia de Lapachol (**5**) y de varias naftoquinonas genéticamente relacionadas en esta especie explica, al menos en parte, los efectos antitumorales observados *in vivo* y estos, a su vez, pueden relacionarse con las propiedades redox de los compuestos. Con la finalidad de explicar los efectos sobre las funciones biológicas de estas estructuras químicas en términos moleculares, se estudiaron descriptores electrónicos y lipofílicos, tales como las energías de los orbitales HOMO y LUMO, las afinidades electrónicas y el Log P. Estos parámetros fueron

Tabla I

Estructuras de las naftoquinonas modeladas

Compuesto	Fórmula	Compuesto	Fórmula
1		6	
2		7	
3		8	
4a		9a	
4b		9b	
5		10	

calculados para los compuestos **1-5** y para las formas reducidas de los mismos, hidroquinonas **6** – **10**. Las formas reducidas se incluyen porque durante su metabolismo, las quinonas pueden sufrir reducción enzimática a las correspondientes hidroquinonas, a través de varias vías metabólicas, siendo la principal de ellas la que se encuentra mediada por la enzima NAD(P)H-quinona oxidoreductasa (NQO1; DT-Diaforasa). Esta enzima, conocida con anterioridad como DT-diaforasa (Brunmark, 1987) es una flavoproteína presente tanto en el citosol como en el dominio hidrofílico del complejo I mitocondrial (Sazanov, 2007). La modulación de esta enzima podría ser útil para el desarrollo de fármacos con actividad antitumoral.

La biotransformación de las quinonas puede ocurrir a través de varias vías (ver figura 1). En una de ellas, se forma una hidroquinona relativamente estable, lo que involucra una reducción de dos electrones del sustrato quinona con oxidación estequiométrica del NAD(P)H, la cual no se encuentra asociada al consumo de oxígeno. La reducción de dos electrones de las quinonas también puede ser catalizada, en el hombre, por la carbonil reductasa hepática, pero este mecanismo suele ser menos importante. Otra vía metabólica en la que pueden involucrarse las quinonas es la de la enzima NADPH-citocromo P450 reductasa. Esta vía se encuentra asociada con consumo de oxígeno y con estrés oxidativo (Casarett, 2008).

La segunda vía metabólica de reducción de las quinonas produce una especie radical semiquinona producto de la reducción por un electrón. Las semiquinonas son especies altamente reactivas y autooxidables y, en consecuencia, entran en un ciclo redox que conduce a oxidación no estequiométrica de NADPH y

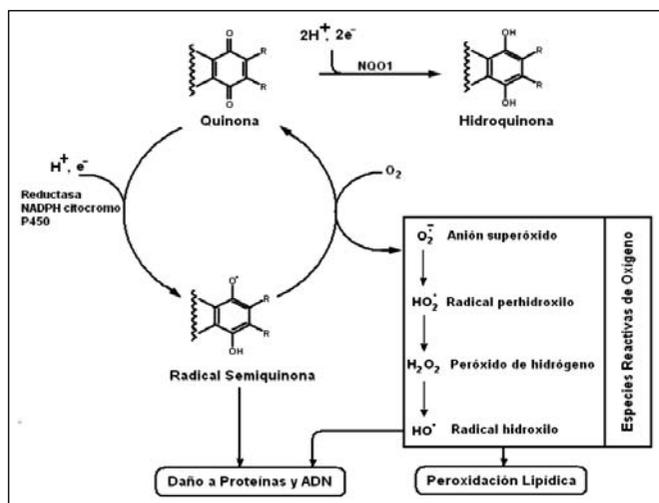


Figura 1: Metabolismo de las quinonas.

al consumo de oxígeno. El estrés oxidativo asociado con la autooxidación de las semiquinonas radicales libres ocurre con producción de anión superóxido, peróxido de hidrógeno y otras especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden ser extremadamente citotóxicas. Aquellos tejidos que son naturalmente bajos en contenido de enzima superóxido dismutasa (SOD), son especialmente susceptibles al estrés oxidativo proveniente del ciclo redox de las quinonas, lo cual explica, al menos en parte, los efectos cardiotoxicos de la adriamicina y de otros agentes anticancerosos relacionados (Minotti, 2004).

Materiales y métodos

Los compuestos estudiados fueron las naftofuroquinonas **1** – **5** y sus formas reducidas **6** - **10** (Tabla I). Todos los cálculos fueron realizados mediante el uso del programa Scigress Explorer® para Windows, versión 7.7 de Fujitsu Limited. Los modelos tridimensionales se construyeron con el editor del programa y posteriormente se minimizó su energía (optimizó su geometría). Para ello se utilizó Mecánica Molecular (MM) con campo de fuerza MM3 Augmented de Allinger (Allinger, 1989). Los parámetros de la Mecánica Molecular fueron Block diagonal Newton Raphson y convergencia a 0,001 Kcal/mol. La búsqueda del conformero más estable se realizó mediante la aplicación Conflex del programa mediante una búsqueda exhaustiva. Las estructuras de mínima energía se utilizaron para determinar las propiedades electrónicas a tres niveles de teoría: semiempírico (PM3) y DFT, utilizando el funcional híbrido B88-LYP GGA(*) con las bases 6-31G(d) y 6-31G(d,p) (Cache, 2008; Becke, 1988; Lee, 1988).

a) Determinación de Parámetros Físicoquímicos y Electrónicos:

Mediante la aplicación Project Leader (Cache,

2008), se extrajeron de las muestras los valores correspondientes a las energías de los orbitales HOMO y LUMO (relacionadas con el potencial de ionización y la afinidad electrónica respectivamente); la susceptibilidad nucleofílica (SN), superdeslocalizabilidad nucleofílica (SpN), momento dipolar y el Log P.

Todos los valores fueron tabulados y se compararon los tres diferentes niveles de teoría. A partir de aquí se seleccionó el nivel DFT, utilizando el funcional híbrido B88-LYP GGA con la bases 6-31G(d) para todos los cálculos posteriores.

b) Potencial Electroestático Molecular (PEM) y Orbitales de Frontera:

El potencial electrostático molecular sobre la densidad electrónica se generó con una función de onda DGauss/DFT y utilizando el funcional GGA/B88-LYP y la base 6-31G(d). El potencial electrostático se tabuló a una distancia de 0,2 Å. Las condiciones para evaluar la isosuperficie de los orbitales HOMO y LUMO fueron, así mismo, grid 51 y distancia 0,3 Å.

c) Determinación del Acoplamiento Molecular en la Enzima NQO1 (Docking)

La enzima NQO1 humana empleada para el estudio de docking se descargó de la base de datos PDB de Brookhaven donde se encontraba co-cristalizada con el ligando, sustrato de la enzima, EO9 (figura 2b) (código PDB 1GG5) (Faig, 2001). Se simplificó la estructura de cuatro unidades hasta reducirla al monómero (cadena A) con el cual se trabajó, dado que los cuatro sitios activos de la enzima son equivalentes. Este monómero es una subunidad completa que contiene todos los residuos y el cofactor. Se añadieron los hidrógenos faltantes en el monómero y eliminaron las moléculas de agua.

A continuación se encontró el conjunto de los restos de aminoácidos que forman parte del sitio activo. Para ello se empleó el ligando co-cristalizado con la enzima y se seleccionaron todos los restos que se encontraban en una esfera de 5 Å alrededor del mismo. Esta búsqueda produjo como resultado que el sitio activo de la NQO1 humana se encuentra formado por los residuos prolina 68 (Pro 68), alanina 69 (Ala 69), tirosina 126 (Tyr 126), tirosina 128 (Tyr 128), tirosina 132 (Tyr 132), Glicina 174 (Gly 174), Isoleucina 175 (Ile 175), fenilalanina 178 (Phe 178) y el cofactor FAD los cuales, en conjunto, forman un bolsillo donde se producen las reacciones de reducción de las diversas quinonas (figuras 2 y 3). Se seleccionó como distancia para la evaluación de la interacción una resolución de 0,3 Å/grid.

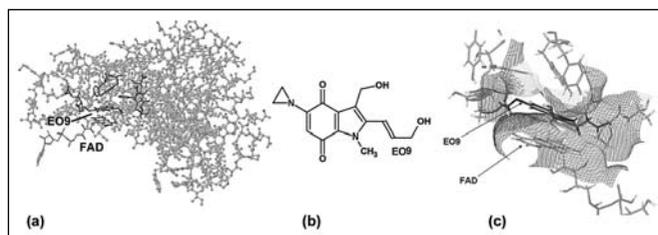


Figura 2. (a) Vista del sitio activo mostrando el ligando co-cristalizado (EO9), coloreado de rosado dentro del bolsillo. (b) Ligando EO9 (c) El bolsillo que forma el sitio activo limitado por el cofactor FAD.

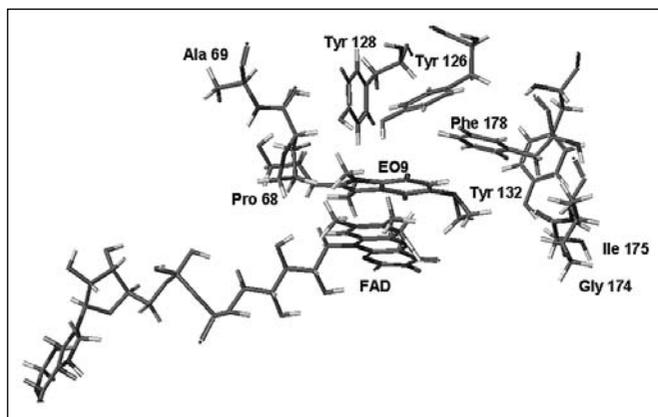


Figura 3. Sitio activo de la NQO1 señalando los aminoácidos y el EO9.

Una vez encontrado el sitio activo se procedió al acoplamiento utilizando el programa Scigress[®], cuya aplicación realiza un Docking automático y evaluó la disposición resultante dentro del sitio activo mediante la función PMF. Los parámetros fijados fueron: un tamaño de la caja de 15 Å de lado, ligando flexible y sitio activo rígido. Las coordenadas tridimensionales para la visualización de los ligandos (compuestos **1-5** y el EO9) fueron asignadas por el mismo programa. Previo al estudio de acoplamiento de los ligandos se realizó una prueba de validación para encontrar los parámetros óptimos para el proceso de docking con el programa Scigress. La calidad del acoplamiento se evaluó mediante la comparación de las raíces de las desviaciones cuadráticas medias (RMDS) de cada una de las posiciones con respecto a la estructura cristalina. El ligando EO9 se colocó de nuevo dentro del sitio activo de la NQO1 y se obtuvo un RMSD de 1,3 Å y un ΔG de interacción de -90,2 Kcal/mol. Todos los ligandos se acoplaron permitiendo flexibilidad al ligando de forma que se evaluara el tipo de unión y la afinidad. Los resultados son reportados como ΔG de unión ligando-enzima (8). Cada uno de los compuestos se evaluó 5 veces y se reportaron los valores promedio. En todos los casos los valores de ΔG tuvieron una dispersión menor o igual a ± 2 Kcal/mol.

d) Postulación de un Farmacóforo de Naftofuroquinonas Inhibidoras de la Enzima NQO1

Con la aplicación Galahad[®] del programa Sybyl[®] se identificaron las características estructurales y químicas relevantes para la actividad de este tipo de compuestos, proponiendo un modelo farmacofórico (Galahad[®], 2008). Para ello se creó una base de datos utilizando una serie de compuestos con actividad inhibidora de la enzima NQO1 reportada previamente (Tabla II) (Nolan, 2006). Con la aplicación de GALAHAD[®], se identificaron las características estructurales y químicas comunes que poseen estas moléculas incluyendo aspectos tridimensionales de las mismas. Del análisis de los modelos resultantes se seleccionó un conjunto de 3 propuestas, utilizando como criterio los valores bajos de energía, con un mayor número de aciertos y que se consideraran las interacciones de puente de hidrógeno. Por último se procedió a alinear cada una de las estructuras de las naftofuroquinonas **1 - 5** con los modelos seleccionados mediante la aplicación PMA (Pharmacophore Model Alignment). Del resultado de esta alineación se seleccionó el modelo farmacofórico propuesto.

Tabla II

Estructuras seleccionadas para el diseño del farmacóforo (Nolan, 2006)

Compuesto	Estructura	IC ₅₀ (μM)
339583		2,0
354279		2,0
2113		3,5
106547		10,0
224124		12,5
8735		20,0
618201		60,0

Resultados y discusión

Los resultados de los cálculos a los tres diferentes niveles de teoría muestran la misma tendencia, con variaciones en los valores absolutos (Tablas III y IV). Si se comparan los valores al nivel DFT, con las dos dife-

Tabla III

Propiedades electrónicas calculadas a tres niveles de teoría vs Actividad biológica

	Comp	Energía (kcal/mole)	Momento Dipolar (debye)	Log P	Energía del LUMO (eV)	Energía del HOMO (eV)	BST LC ₅₀ (µg/ml)	A-549 ED ₅₀ (µg/ml)	MCF-7 ED ₅₀ (µg/ml)	HT-29 ED ₅₀ (µg/ml)	RMB IC ₅₀ (µM)
PM3	1	-78,5800	3,277	0,809	-1,744	-10,129	5,0	3,36 x 10 ⁻²	3,65 x 10 ⁻²	1,94 x 10 ⁻¹	14,1
	2	-125,6320	2,090	0,524	-1,918	-9,717	6,8	< 10 ⁻³	4,64 x 10 ⁻³	2,03 x 10 ⁻²	17,0
	3	-126,1010	2,499	0,524	-1,884	-9,694	6,0	< 10 ⁻³	4,64 x 10 ⁻³	2,00 x 10 ⁻²	14,8
	4a	-137,9620	0,722	1,093	-1,732	-9,608	17,0	1,22 x 10 ⁻²	1,81 x 10 ⁻²	< 10 ⁻²	82,5
	4b	-137,9710	0,720	1,093	-1,735	-9,609	17,0	1,22 x 10 ⁻²	1,81 x 10 ⁻²	< 10 ⁻²	82,5
	5	-73,6610	2,178	2,722	-1,559	-9,391	72,0	32,32 x 10 ⁻¹	100 x 10 ⁻¹	37,70 x 10 ⁻¹	58,9
B88LYP/6-31G(d)	1	-526,470,586	2,953	0,809	-3,664	-5,742	5,0	3,36 x 10 ⁻²	3,65 x 10 ⁻²	1,94 x 10 ⁻¹	14,1
	2	-573,675,331	1,953	0,524	-3,772	-5,670	6,8	< 10 ⁻³	4,64 x 10 ⁻³	2,03 x 10 ⁻²	17,0
	3	-573,675,972	2,261	0,524	-3,771	-5,692	6,0	< 10 ⁻³	4,64 x 10 ⁻³	2,00 x 10 ⁻²	14,8
	4a	-574,415,412	1,033	1,093	-3,469	-5,420	17,0	1,22 x 10 ⁻²	1,81 x 10 ⁻²	< 10 ⁻²	82,5
	4b	-574,415,322	1,101	1,093	-3,463	-5,413	17,0	1,22 x 10 ⁻²	1,81 x 10 ⁻²	< 10 ⁻²	82,5
	5	-505,417,078	2,165	2,722	-3,493	-5,054	72,0	32,32 x 10 ⁻¹	100 x 10 ⁻¹	37,70 x 10 ⁻¹	58,9
B88LYP/6-31G(d,p)	1	-526,480,522	2,894	0,809	-3,656	-5,726	5,0	3,36 x 10 ⁻²	3,65 x 10 ⁻²	1,94 x 10 ⁻¹	14,1
	2	-573,687,704	1,942	0,524	-3,758	-5,657	6,8	< 10 ⁻³	4,64 x 10 ⁻³	2,03 x 10 ⁻²	17,0
	3	-573,688,199	2,119	0,524	-3,751	-5,670	6,0	< 10 ⁻³	4,64 x 10 ⁻³	2,00 x 10 ⁻²	14,8
	4a	-574,432,417	1,187	1,093	-3,443	-5,392	17,0	1,22 x 10 ⁻²	1,81 x 10 ⁻²	< 10 ⁻²	82,5
	4b	-574,432,492	1,211	1,093	-3,437	-5,389	17,0	1,22 x 10 ⁻²	1,81 x 10 ⁻²	< 10 ⁻²	82,5
	5	-505,436,554	2,096	2,722	-3,467	-5,033	72,0	32,32 x 10 ⁻¹	100 x 10 ⁻¹	37,70 x 10 ⁻¹	58,9

Tabla IV

Propiedades electrónicas calculadas a tres niveles de teoría vs Actividad biológica (compuestos 6-10)

	Comp	Energía (kcal/mole)	Momento Dipolar (debye)	Log P	Energía del LUMO (eV)	Energía del HOMO (eV)	BST LC ₅₀ (µg/ml)	A-549 ED ₅₀ (µg/ml)	MCF-7 ED ₅₀ (µg/ml)	HT-29 ED ₅₀ (µg/ml)	RMB IC ₅₀ (µM)
PM3	6	-98,424,00	1,684	1,831	-1,331	-8,266	5,0	3,36 x 10 ⁻²	3,65 x 10 ⁻²	1,94 x 10 ⁻¹	14,1
	7	-140,860,00	4,090	1,547	-1,422	-8,513	6,8	< 10 ⁻³	4,64 x 10 ⁻³	2,03 x 10 ⁻²	17
	8	-141,012,00	1,393	1,547	-1,458	-8,365	6,0	< 10 ⁻³	4,64 x 10 ⁻³	2,00 x 10 ⁻²	14,8
	9a	-153,817,00	1,695	2,116	-0,958	-8,287	17,0	1,22 x 10 ⁻²	1,81 x 10 ⁻²	< 10 ⁻²	82,5
	9b	-156,471,00	2,473	2,116	-0,958	-8,294	17,0	1,22 x 10 ⁻²	1,81 x 10 ⁻²	< 10 ⁻²	82,5
	10	-98,794,00	3,336	3,745	-0,283	-8,130	72,0	32,32 x 10 ⁻¹	100 x 10 ⁻¹	37,70 x 10 ⁻¹	58,9
B88LYP/6-31G(d)	6	-527,208,571	0,973	1,831	-2,461	-4,180	5,0	3,36 x 10 ⁻²	3,65 x 10 ⁻²	1,94 x 10 ⁻¹	14,1
	7	-574,404,893	4,493	1,547	-2,290	-3,968	6,8	< 10 ⁻³	4,64 x 10 ⁻³	2,03 x 10 ⁻²	17
	8	-574,407,520	4,755	1,547	-2,239	-4,002	6,0	< 10 ⁻³	4,64 x 10 ⁻³	2,00 x 10 ⁻²	14,8
	9a	-575,143,253	3,979	2,116	-1,340	-3,799	17,0	1,22 x 10 ⁻²	1,81 x 10 ⁻²	< 10 ⁻²	82,5
	9b	-575,143,193	4,133	2,116	-1,325	-3,789	17,0	1,22 x 10 ⁻²	1,81 x 10 ⁻²	< 10 ⁻²	82,5
	10	-506,152,602	1,182	3,745	-1,137	-3,999	72,0	32,32 x 10 ⁻¹	100 x 10 ⁻¹	37,70 x 10 ⁻¹	58,9
B88LYP/6-31G(d,p)	6	-527,210,022	1,203	1,831	-2,276	-3,976	5,0	3,36 x 10 ⁻²	3,65 x 10 ⁻²	1,94 x 10 ⁻¹	14,1
	7	-574,404,800	4,438	1,547	-2,123	-3,743	6,8	< 10 ⁻³	4,64 x 10 ⁻³	2,03 x 10 ⁻²	17
	8	-574,407,732	4,452	1,547	-2,029	-3,770	6,0	< 10 ⁻³	4,64 x 10 ⁻³	2,00 x 10 ⁻²	14,8
	9a	-575,147,405	1,530	2,116	-1,082	-3,387	17,0	1,22 x 10 ⁻²	1,81 x 10 ⁻²	< 10 ⁻²	82,5
	9b	-575,147,479	1,469	2,116	-1,082	-3,386	17,0	1,22 x 10 ⁻²	1,81 x 10 ⁻²	< 10 ⁻²	82,5
	10	-506,167,100	2,424	3,745	-0,912	-3,893	72,0	32,32 x 10 ⁻¹	100 x 10 ⁻¹	37,70 x 10 ⁻¹	58,9

rentes bases, puede verse que son virtualmente los mismos, por lo que se seleccionó la base más sencilla, 6-31G(d) para los cálculos posteriores. El método de funcional de la densidad (DFT), el cual es considerado por algunos autores, equivalente a un método de cálculo *ab initio* permite que se puedan realizar descripciones para moléculas con un alto grado de confiabilidad. Si se observan las tendencias, puede notarse que el método semiempírico se comporta bien, es decir, aunque los valores reales se encuentran subestimados, la tendencia es la misma. De esta forma se comprueba que la metodología semiempírica es adecuada cuando se desea una estimación cualitativa de las propiedades moleculares.

Puesto que el mecanismo de acción de estas estructuras involucra etapas de reducción (figura 1) se calcularon las afinidades electrónicas de todos los compuestos. Esta afinidad electrónica se encuentra relacionada con la energía del LUMO, tanto para las estructuras originales como para las estructuras reducidas. Al relacionar los valores de la energía del LUMO con la actividad biológica puede observarse, para el caso de las células MCF-7 y A-549, que existe una correlación de la potencia del compuesto con la energía del LUMO (o Afinidad Electrónica). Esta correlación puede verse con mayor claridad cuando se calcula el logaritmo de la Dosis Efectiva 50 (ED_{50}) y de la Concentración Inhibitoria 50 (IC_{50}) y se grafican contra la afinidad electrónica (ver Gráficos 1 y 2). La tendencia casi lineal que se observa en todos los casos indica que la actividad biológica que posee este tipo de quinonas tiene una alta susceptibilidad a pequeñas variaciones de la afinidad electrónica. Estas variaciones, a su vez dependen de los grupos sustituyentes sobre el anillo de quinona, lo cual se encuentra de acuerdo con las observaciones experimentales reportadas en la literatura. Así mismo, esto puede explicar el hecho de que algunas quinonas pueden ser más activas en las células tumorales que poseen la enzima NQO1 sobreexpresada (Cadenas, 1995), dado que serán reducidas por la misma.

Orbitales Moleculares de Frontera: HOMO y LUMO

Las superficies de los orbitales de frontera, HOMO y LUMO, se detallan en las imágenes de la figura 5. Las superficies de los orbitales HOMO resultaron muy similares entre todas las naftofuroquinonas (1-4). De la misma forma resultan bastante similares en los análogos reducidos (6-9). En contraste, el Lapachol (5) muestra una forma y extensión del HOMO muy diferente. Por otro lado las superficies del LUMO son muy similares, lo cual puede encontrarse relacionado con el hecho de que todas estas moléculas tienen ten-

dencia similar a comportarse como aceptores de electrones y que pueden interactuar con las mismas enzimas durante el metabolismo de reducción. Esta condición es necesaria para la actividad inhibitoria de la enzima, pero no determina la potencia inhibitoria.

POTENCIAL ELECTROSTÁTICO MOLECULAR (PEM)

En los gráficos del Potencial Electrostático Molecular (PEM), mostrados en la figura 5, se representan en color rojo las zonas de potencial electrostático positivo, mientras que en color azul las zonas de potencial

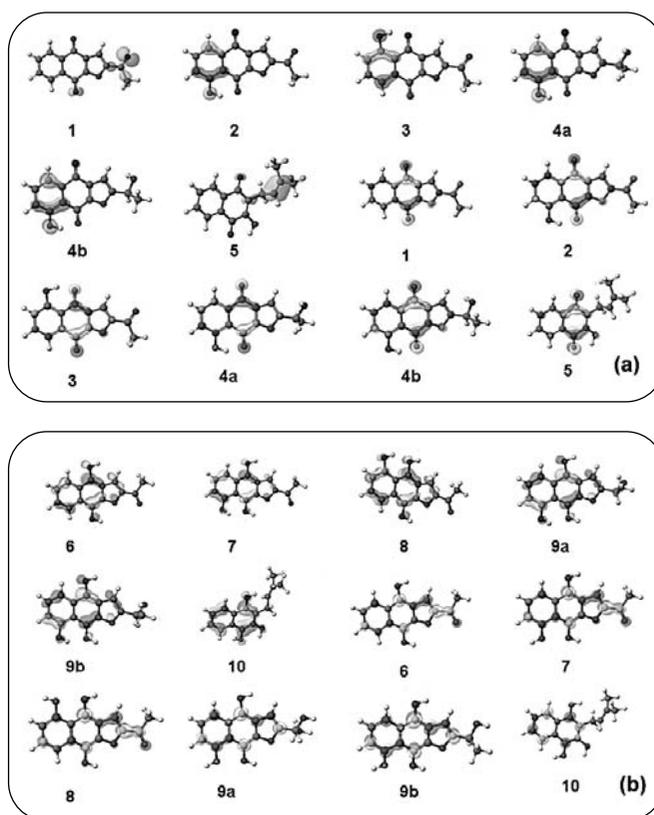


Figura 4: (a) Orbitales de frontera HOMO (azul/verde) y LUMO (rojo/amarillo) para los compuestos 1 – 5. (b) Orbitales de frontera HOMO (azul/verde) y LUMO (rojo/amarillo) para los compuestos 6-10.

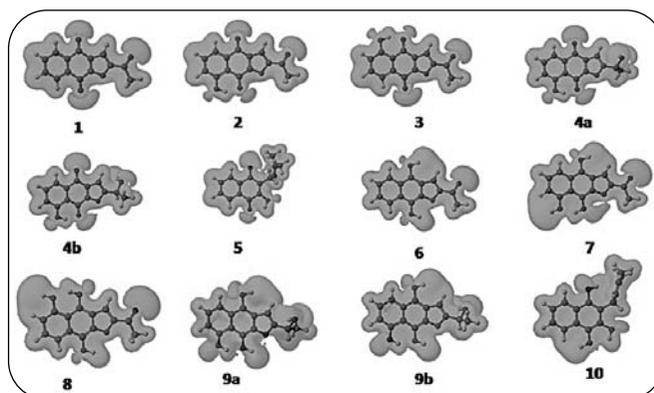
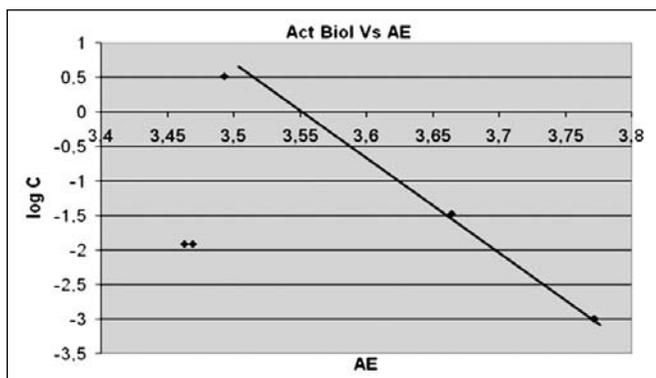


Figura 5: Potencial Electrostático Molecular para los compuestos 1 – 10.

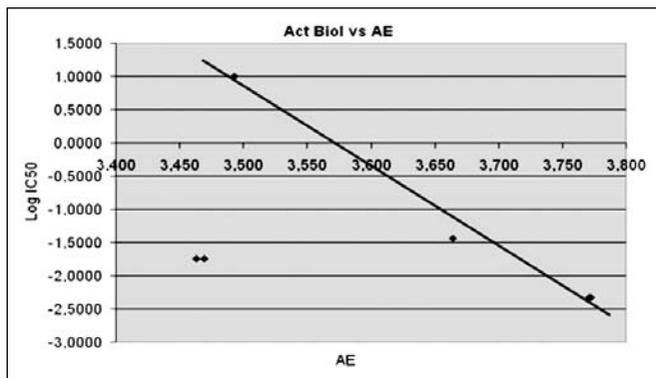
(a) A549

	Af Elec	C(x 10 ⁻²)	µg/mL	Log C
1	3,664	3,36	0,0336	-1,4737
2	3,772	0,1	0,001	-3,0000
3	3,771	0,1	0,001	-3,0000
4a	3,469	1,22	0,0122	-1,9136
4b	3,463	1,22	0,0122	-1,9136
5	3,493	323,2	3,232	0,5095



(b) MCF-7

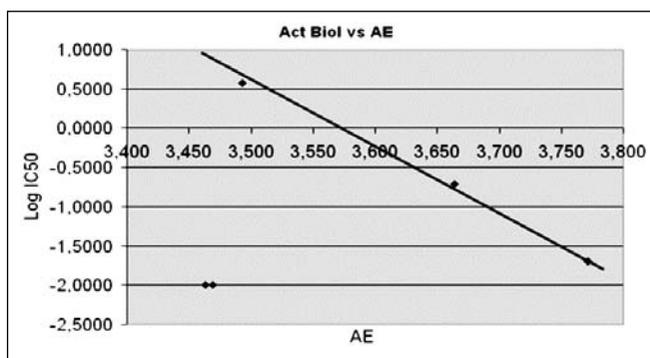
	Af Elec	C(x 10 ⁻²)	µg/mL	Log C
1	3,664	3,65	0,0365	-1,4377
2	3,772	0,464	0,00464	-2,3335
3	3,771	0,464	0,00464	-2,3335
4a	3,469	1,81	0,0181	-1,7423
4b	3,463	1,81	0,0181	-1,7423
5	3,493	1000	10	1,0000


Gráfico 1. Actividad biológica vs Afinidad electrónica sobre células (a) A549 y (b) MCF7.

electrostático negativo. Se puede observar que las zonas de PEM negativo se encuentran asociadas primordialmente a los pares de electrones sin compartir de los átomos de oxígeno. La presencia de un número mayor de regiones de potencial negativo en las estructuras **2** y **3** parece encontrarse relacionada con una mayor actividad. Debe recordarse que las superficies de PEM son útiles para visualizar de manera cualitativa los posibles lugares de interacción de las moléculas con sus dianas biológicas. En este caso la presencia de una mayor cantidad de áreas de PEM negativo parece favorecer una mayor actividad.

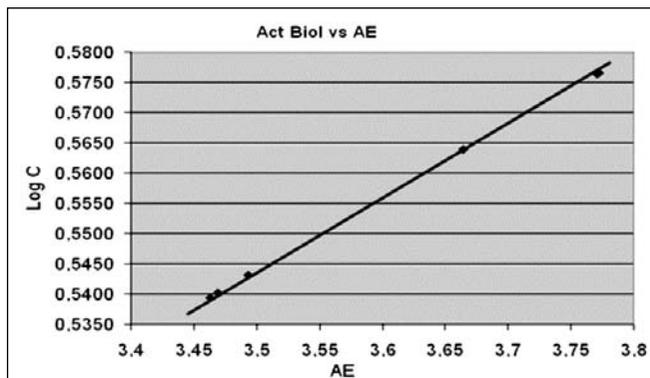
(a) HT-29

	Af Elec	C(x 10 ⁻²)	µg/mL	Log C
1	3,664	19,40	0,1940	-0,7122
2	3,772	2,03	0,0203	-1,6925
3	3,771	2,00	0,0200	-1,6990
4a	3,469	1,00	0,0100	-2,0000
4b	3,463	1,00	0,0100	-2,0000
5	3,493	377,00	3,7700	0,5763



(b) RMB

Compuesto	Af Elec	µg/mL	Log C
1	3,664	14,1	1,1492
2	3,772	17,0	1,2304
3	3,771	14,8	1,1703
4a	3,469	82,5	1,9165
4b	3,463	82,5	1,9165
5	3,493	58,9	1,7701


Gráfico 2. Actividad biológica vs Afinidad electrónica sobre células (a) HT29 y (b) inhibición del transporte electrónico mitocondrial vs afinidad electrónica.

SUSCEPTIBILIDAD Y SUPERDESLOCALIZABILIDAD NUCLEOFÍLICAS

Algunas quinonas resultan más citotóxicas porque pueden sufrir reacciones de alquilación cuando son atacadas por el átomo de azufre de GSH o de algún grupo tiol perteneciente a una proteína que, actuando como nucleófilo, produce el clásico producto de adición 1,4 (Cadenas, 1995; Thor, 1982). Esta reacción de alquilación es interesante porque los productos conjugados luego del ataque del azufre siguen siendo sustratos de las reductasas, lo cual quiere decir que

también son potencialmente capaces de aumentar el stress oxidativo y, en consecuencia, la citotoxicidad. Por ello se determinaron descriptores electrónicos que pueden relacionarse con la reactividad de las quinonas como lo son la susceptibilidad y la superdeslocalizabilidad nucleofílicas, por átomo de la molécula (Grafico 3).

	SpN	C(x 10 ⁻²)	µg/mL	Log C
1	1,358	19,4	0,194	-0,7122
2	1,368	2,03	0,0203	-1,6925
3	1,363	2,00	0,020	-1,6990
4a	1,364	1,00	0,010	-2,0000
4b	1,365	1,00	0,010	-2,0000
5	1,426	377	3,77	0,5763

Células HT-29

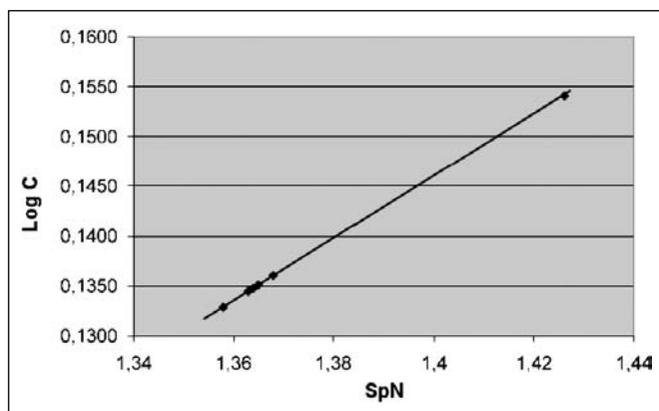


Grafico 3: Relación de la superdeslocalizabilidad nucleofílica de los compuestos 1 - 5 con respecto al log de la concentración inhibitoria para las células HT-29.

Observando los valores de la superdeslocalizabilidad nucleofílica (SpN) con respecto al Log de las actividades de la línea celular HT-29 (cáncer de colon), se encontró una buena correlación, lo cual se puede interpretar como que en esta línea celular predomina un mecanismo de acción que se inicia con la adición tipo Michael sobre la quinona para convertirse en sustratos citotóxicos a la célula tumoral.

DESCRIPTORES LIPOFÍLICOS

Como descriptores lipofílicos se calcularon el momento dipolar y el Log P. En este caso se encontró como aspecto más relevante que el Lapachol y su producto reducido muestran ambos un mayor valor de Log P que el resto de las naftofuroquinonas y es precisamente el Lapachol el compuesto que presenta la citotoxicidad más baja.

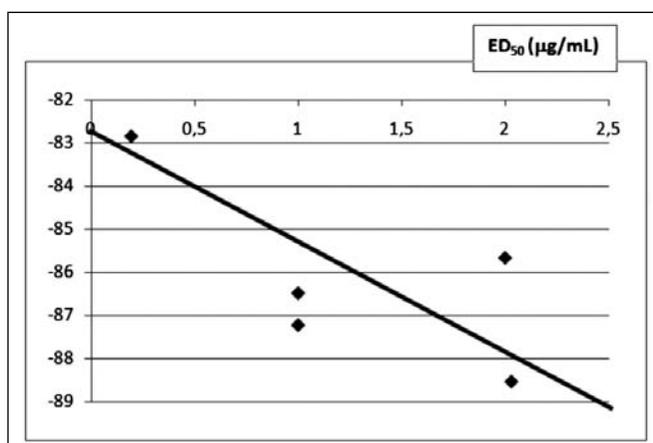
ACOPLAMIENTO MOLECULAR (DOCKING) CON LA ENZIMA NQO1

Los resultados del acoplamiento molecular (docking) para las naftofuroquinonas estudiadas y el Lapachol se encuentran en la Tabla V. Estos valores de ΔG

obtenidos se correlacionaron con cada una de las actividades biológicas sobre cada una de las líneas de células tumorales y se encuentran reportados en los gráficos 4 y 5.

(a)	MCF-7	ΔG (Kcal/mol)
Comp	µg/ml x 10 ⁻²	
1	3,65	-82,838
2	0,464	-88,539
3	0,464	-85,663
4a	1,81	-86,484
4b	1,81	-87,225
5	1000	-86,502

RMS = 0,7747



(b)	A-549	ΔG (Kcal/mol)
Comp	µg/ml x 10 ⁻²	
1	3,36	-82,838
2	0,1	-88,539
3	0,1	-85,663
4a	1,22	-86,484
4b	1,22	-87,225
5	323,2	-86,502

RMS = 0,8121

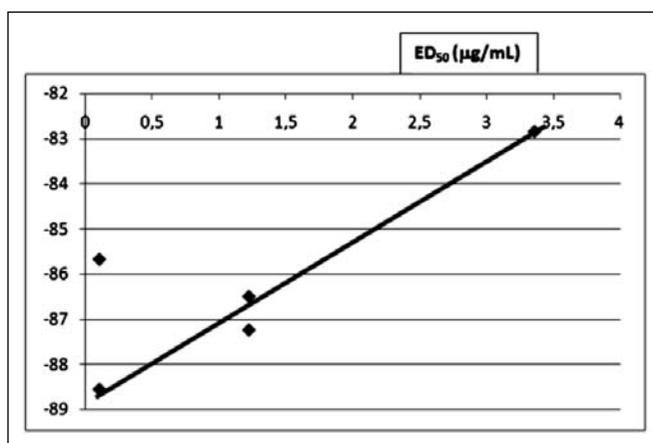
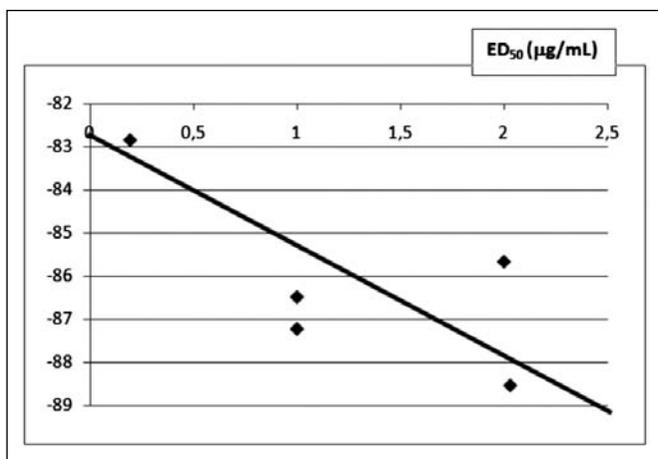


Grafico 4: Energía libre de unión vs ED50 para (a) células MCF-7 y (b) células A549.

(a)	HT-29	ΔG (Kcal/mo)
Comp	$\mu\text{g/ml} \times 10^{-2}$	
1	0,194	-82,838
2	2,03	-88,539
3	2,00	-85,663
4a	1,00	-86,484
4b	1,00	-87,225
5	377,00	-86,502

RMS = -0,7014



(b)	RMB	ΔG (Kcal/mo)
Comp	$\mu\text{g/ml} \times 10^{-2}$	
1	14,10	-82,838
2	17,00	-88,539
3	14,80	-85,663
4a	82,50	-86,484
4b	82,50	-87,225
5	58,90	-86,502

RMS = -0,3280

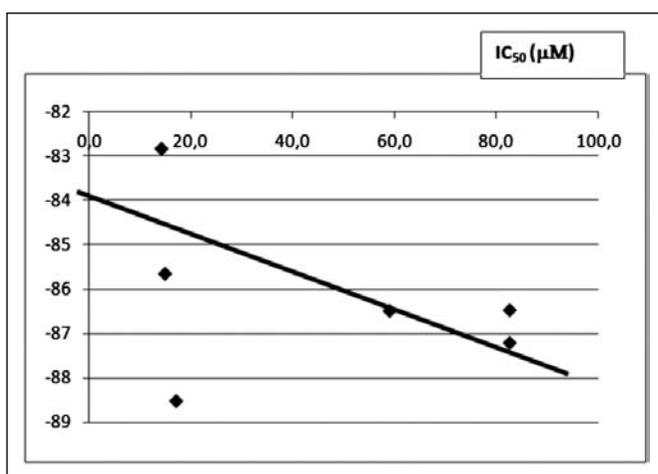


Gráfico 5: Energía libre de unión vs ED₅₀ para células HT-29. (b) Energía libre de unión vs IC₅₀ en transporte electrónico mitocondrial.

En el primer gráfico correspondiente a la línea tumoral MCF-7 (cáncer de mama) se observa la existencia de una buena correlación, de manera semejante al

Tabla V
Estructuras seleccionadas para el diseño del farmacóforo (Nolan, 2006)

Compuesto		ΔG (Kcal/mol)
1		82,838
2		-88,539
3		-85,663
4 ^a		-86,484
4b		-87,225
5		-86,502

resultado obtenido cuando se correlacionó el valor de la afinidad electrónica con la actividad biológica. Otros resultados anteriores obtenidos reportan un aumento de la producción de ROS atribuible a la vía metabólica de la enzima NQO1 (Fisher, 1993), debido a que la misma se encuentra sobreexpresada en esta línea tumoral y esto está en perfecto acuerdo con los resultados de este trabajo. Por otra parte ya se mencionó, que en células como la MCF-7 hay una buena correlación entre la actividad biológica y las afinidades electrónicas, lo cual confirma los resultados de Fisher y col. (1993), puesto que aquellos sustratos (2 y 3) que presentan una mayor afinidad electrónica son los más activos. Esto permite afirmar que en el caso del cáncer de mama, el mecanismo de acción citotóxico de las naftofuroquinonas está mediado por el estrés oxidativo causado por un aumento en la concentración de ROS.

En el segundo gráfico se comparan los valores de ΔG con la actividad sobre la línea A-549 (cáncer de pulmón) y puede apreciarse una buena correlación tal como en el caso anterior. Así mismo, la correlación de la actividad biológica con la afinidad electrónica para esta línea celular resultó buena, como en el caso de la MCF-7 por lo cual se puede postular que sus mecanismos de acción son bastante similares.

Para las células HT-29, la correlación de las energías de unión con las actividades antitumorales es mucho menor. Como se explica más arriba, en esta línea celular es mucho más probable que las quinonas sufran una adición previa al proceso de producción de ROS, lo cual puede explicar la baja correlación observada en este grupo de moléculas.

RELACIONES CON EL TRANSPORTE ELECTRÓNICO MITOCONDRIAL

La enzima NQO1, presente en el citosol, se encuentra formando parte del complejo I mitocondrial tanto de las células procariotas como eucariotas (Sazanov, 2007). Es por ello que se incluyeron dentro de los resultados obtenidos los valores del ensayo de inhibición que estos compuestos ejercen sobre el transporte electrónico mitocondrial (Tablas III y IV, columna RMB). En el gráfico 2b se observa la existencia de una muy buena correlación de las actividades biológicas para este grupo de estructuras. Esto apoya la idea de que este grupo de naftofuroquinonas interaccionan fuertemente con la enzima NQO1 presente en el Complejo I mitocondrial, por lo que se debe considerar el mecanismo redox como un mecanismo importante. Esto estaría de acuerdo con el hecho de que los compuestos 2 y 3, que poseen la afinidad electrónica más elevada, son también potentes inhibidores del transporte electrónico mitocondrial.

PROPUESTA DE UN MODELO FARMACOFÓRICO

A partir de la lista de modelos propuestos por el GALAHAD y las evaluaciones que reporta, para cada uno de ellos, el programa, se seleccionaron finalmente, luego de un estudio cuidadoso, 4 candidatos. Los modelos de farmacóforos seleccionados se utilizaron posteriormente para alinear, de manera individual y sobre ellos, los compuestos problema, (1-5) y seleccionando finalmente el mejor de ellos.

Los modelos seleccionados fueron el modelo 006, el modelo 008, el modelo 014 y el modelo 016 (Tabla VI). Estos modelos se escogieron, después de hacer la

inspección visual de las superposiciones, en base a los parámetros de número de aciertos elevado, la energía total y un valor relativamente alto de la contribución de los puentes e hidrógeno. Este último parámetro se considera importante porque es una de las fuerzas de unión que se encuentra durante los estudios de acoplamiento molecular analizados anteriormente. Este análisis, unido con los resultados de las superposiciones con las naftofuroquinonas, conduce a proponer que dentro del farmacóforo deberán estar presentes: (a) un mínimo de tres regiones hidrofóbicas, contiguas las cuales pueden relacionarse con el sistema de anillos aromáticos fusionados y (b) al menos una región que permita la formación de puentes de hidrógeno bien sea mediante un átomo aceptor o un átomo donador de puente de hidrógeno. El modelo que más se ajusta a esta descripción es el modelo 006 (Tabla VI).

Conclusiones

Los efectos fisiológicos y toxicológicos de las quinonas, bien sean de origen sintético o natural y su papel como agentes quimioterapéuticos puede entenderse como una consecuencia de su reactividad química. Así mismo son importantes las características estructurales debido a que estas serán las que determinan la facilidad de interacción con los sitios activos enzimáticos que median el metabolismo de estas estructuras.

En los estudios realizados se encontró buena correlación entre la citotoxicidad y la afinidad electrónica (energía del LUMO) para líneas celulares de tumores humanos tipo A-547 y MCF-7. También se encontró buena correlación entre los valores de ΔG de unión con la NQO1 en las líneas A-547 y MCF-7. Para la línea celular HT-29 se observó buena correlación entre la superdeslocalizabilidad nucleofílica (SpN) y el Log de las actividades citotóxica.

Para su interacción con la enzima NQO1 se propone el siguiente modelo farmacofórico:

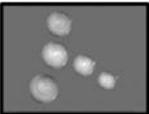
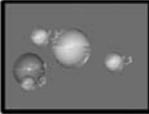
Un mínimo de tres regiones hidrofóbicas, contiguas las cuales pueden relacionarse con el sistema de anillos aromáticos fusionados.

Al menos una región que permita la formación de puentes de hidrógeno bien sea mediante un átomo aceptor o un átomo donador de puente de hidrógeno.

Agradecimientos: Al CDCH por financiamiento otorgado a través del proyecto institucional PI 06-00-6994-2007 y al Laboratorio de Modelado Molecular "José Luis Andrade" por los equipos utilizado para la realización de los cálculos.

Tabla VI

Modelos seleccionados mediante la aplicación de GALAHAD[®]

	Gráfico	Nº Hits	Energía	Factor Estérico	Puente de Hidrógeno
Modelo 006		7	755,8300	206,400	36,500
Modelo 008		7	19,9700	177,500	37,400
Modelo 014		6	8,4700	157,300	38,000
Modelo 016		7	66,6300	204,500	32,300

Referencias bibliográficas

- Allinger NL, Yuh Y, Lii JH. 1989. Molecular mechanics. The MM3 force field for hydrocarbons. *J Am Chem Soc* 111: 8551-8566.
- Becke AD. 1988. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Physical Reviews A* 38: 3098-3100.
- Brunmark A, Cadenas E, Lind C, Segura-Aguilar J, Ernster L. 1987. DT-diaphorase-catalyzed two electron reduction of quinone epoxides. *Free Radical Biol Med* 3: 181-188.
- Cadenas E. 1995. Antioxidant and prooxidant functions of DT-diaphorase in quinone metabolism. *Biochem Pharmacol* 49: 127-140.
- Casarett LJ, Klaassen CD. 2008. Cap 6, en: Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, Séptima edición, McGraw-Hill, USA, págs 188-190.
- Colman T, Anderson J, Alfonso D, McLaughlin J. 1997. Bioactive Naphthofuroquinones from *Tabebuia barbata* (Bignoniaceae)", *Acta Científica Venezolana*, 48, 42-46.
- Faig M, Bianchet MA, Winski S, Hargreaves R, Moody CJ, Hudnott AR, Ross D, Amzel LM. 2001. Structure-based development of anticancer drugs: complexes of NAD(P)H: quinone oxidoreductase I with chemotherapeutic quinines. *Structure* 9(8):659-667.
- Fisher G, Patterson LH, Gutiérrez P. 1993. A comparison of free radical formation by quinone anti-tumour agents in MCF-7 cells and the role of NAD(P)H (quinone-acceptor) oxidoreductase (DT-diaphorase). *Chemico-Biological Interactions* 88:137-153.
- GALAHAD® Manual del usuario; programa SYBYL 8.1. 2008.
- Lee C, Yang W, Parr RG. 1988. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys Rev B* 37: 785-789.
- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. 2004. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 56:185-229.
- Nolan KA, Timson D, Stratford IJ, Bryce RA. 2006. In silico identification and biochemical characterization of novel inhibitors of NQO1. *Bioorg Med Chem Lett*. 16: 6256-6254.
- Reference Guide CAChe Scigress versión 7.0, Editada por Fujitsu Limited. 2008.
- Sazanov L. 2007. Respiratory Complex I: Mechanistic and Structural Insights Provided by the Crystal Structure of the Hydrophilic Domain. *Biochem* 46(9): 2275-2288.
- Thor H, Smith MT, Hartzell P, Bellomo G, Jewell S, Orrenius S. 1982. The Metabolism of Menadione (2-Methyl-1,4-naphthoquinone) by Isolated Hepatocytes. *J Biol Chem* 257:12419-12425.
- Wright C, Phillipson D. 1990. Natural products and development of selective antiprotozoal drugs. *Phytotherapy Res* 4:127-136.