

# EVALUACIÓN *in silico* DE LA INHIBICIÓN DE LA PROTEÍNA 3GW2 DE *Mycobacterium bovis* MEDIANTE DOCKING MOLECULAR CON CARNOSOL

## *in silico* EVALUATION OF THE INHIBITION OF THE 3GW2 PROTEIN FROM *Mycobacterium bovis* USING MOLECULAR DOCKING WITH CARNOSOL

Villanueva-Castillo A. <sup>1,2,4\*</sup>, Pastelín-Rojas C. F. <sup>1,2,4</sup>, Moreno-Mejía R.S. <sup>1,2,4</sup>, Hinojosa-Moya J.J. <sup>3,4</sup>,  
Sánchez y Cuéllar C. A. <sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. <sup>2</sup>Cuerpo Académico de Enfermedades Emergentes,  
Bioinformática y Dinámica Molecular (CA-BUAP-207), <sup>3</sup>Facultad de Ingeniería Química y  
Complejo Regional Centro. <sup>4</sup>Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Cañada-Morelos m 7.5  
El Salado, Tecamachalco, Puebla.

\*Autor de correspondencia: [arnulfo.villanueva@correo.buap.mx](mailto:arnulfo.villanueva@correo.buap.mx)

**Recibido:** 07/junio/2024

**Aceptado:** 10/diciembre/2024

### RESUMEN

La infección generalmente se produce por la inhalación de aerosoles, por otro lado, las mycobacterias tienen cofactores enzimáticos que requieren metales para su actividad catalítica, ya que son esenciales para la supervivencia y patogenicidad, así como de otras bacterias. Estas proteínas enzimáticas desempeñan un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis celular y la respuesta adaptativa de la bacteria a su entorno. El objetivo de este estudio es evaluar *in silico* la inhibición de la proteína 3GW2 de la familia ArsR de *Mycobacterium bovis* mediante el acoplamiento molecular utilizando carnosol. Para ello, se emplea un enfoque de docking molecular que permite simular y analizar las interacciones entre el carnosol y la proteína objetivo, identificando los sitios activos y las posibles conformaciones del complejo proteína-ligando. Los resultados obtenidos indican que el carnosol presenta una afinidad significativa por la proteína 3GW2, sugiriendo su potencial como un agente terapéutico en el tratamiento de infecciones por *Mycobacterium bovis*. En

conclusión, este estudio proporciona una base sólida para futuras investigaciones sobre el uso de carnosol como un posible inhibidor en la lucha contra la tuberculosis causada por esta bacteria.

**Palabras Clave:** Inhibición enzimática, *Mycobacterium*, enfermedades pulmonares, Carosol.

## ABSTRACT

Infection generally occurs through the inhalation of aerosols. Additionally, mycobacteria possess enzymatic cofactors that require metals for their catalytic activity, which are essential for survival and pathogenicity, similar to other bacteria. These enzymatic proteins play a crucial role in maintaining cellular homeostasis and the bacterium's adaptive response to its environment. The objective of this study is to evaluate *in silico* the inhibition of the 3GW2 protein from the ArsR family of *Mycobacterium bovis* through molecular docking using carnosol. For this purpose, a molecular docking approach is used to simulate and analyze the interactions between carnosol and the target protein, identifying active sites and potential conformations of the protein-ligand complex. The results obtained indicate that carnosol shows significant affinity for the 3GW2 protein, suggesting its potential as a therapeutic agent in the treatment of *Mycobacterium bovis* infections. In conclusion, this study provides a solid foundation for future research on using carnosol as a potential inhibitor in the fight against tuberculosis caused by this bacterium.

**Keywords:** Enzyme inhibition, *Mycobacterium*, pulmonary diseases.

## INTRODUCCIÓN

*Mycobacterium bovis* causa tuberculosis tras ser inhalado y fagocitado por macrófagos, generando granulomas e inflamación crónica que varía según la respuesta inmune (O'Reilly y Daborn, 1995; Saha *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2019; Grange, 2001). *Mycobacterium bovis* es una de las diversas bacterias causantes de la tuberculosis, una enfermedad que afecta a millones de personas cada año. Las personas pueden infectarse cuando son expuestas a aerosoles contaminados o a través de otras vías de transmisión relacionadas con este patógeno (Gao *et al.*, 2011). La proteína 3GW2 de *Mycobacterium bovis* se inhibe *in silico* mediante docking molecular con carnosol, ofreciendo perspectivas terapéuticas (Kumar *et al.*, 2019;

C. H. Gao *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2017a, 2017b; Mahmoud *et al.*, 2022; Rakesh *et al.*, 2020; Brieskorn *et al.*, 1964; Johnson, 2011).

Este estudio se centra en el docking molecular, un método *in silico* para evaluar interacciones entre moléculas y proteínas. Se investiga el carnosol como inhibidor de la proteína 3GW2, con potencial para desarrollar nuevos fármacos contra la familia ArsR de *Mycobacterium bovis* (O'Reilly y Daborn, 1995; Johnson, 2011; Kumar *et al.*, 2019) y otros agentes químicos nocivo (C. H. Gao *et al.*, 2011; C. hui Gao *et al.*, 2012). Estas proteínas desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis celular y la respuesta adaptativa de la bacteria a su entorno (Li *et al.*, 2017a).

ArsR regula la expresión de phoP (regulador transcripcional) en *Mycobacterium*, implicando un rol en la patogénesis (Gao *et al.*, 2012). Un motivo de secuencia invertida por ArsR es crucial para la regulación de phoP (Gao *et al.*, 2011; Busenlehner *et al.*, 2003; Saha *et al.*, 2017). MSMEG1415 modula la arginasa en *Mycobacterium*, esencial para la supervivencia y resistencia a condiciones adversas (Ryndak *et al.*, 2015; Yan *et al.*, 2021). El carnosol tiene potencial terapéutico contra ciertos cánceres y efectos antimicrobianos (Brieskorn *et al.*, 1964; Johnson, 2011). El objetivo de este estudio es evaluar *in silico* la inhibición de la proteína 3GW2 de la familia ArsR de *Mycobacterium bovis* mediante el acoplamiento molecular utilizando carnosol.

## MATERIALES Y MÉTODOS

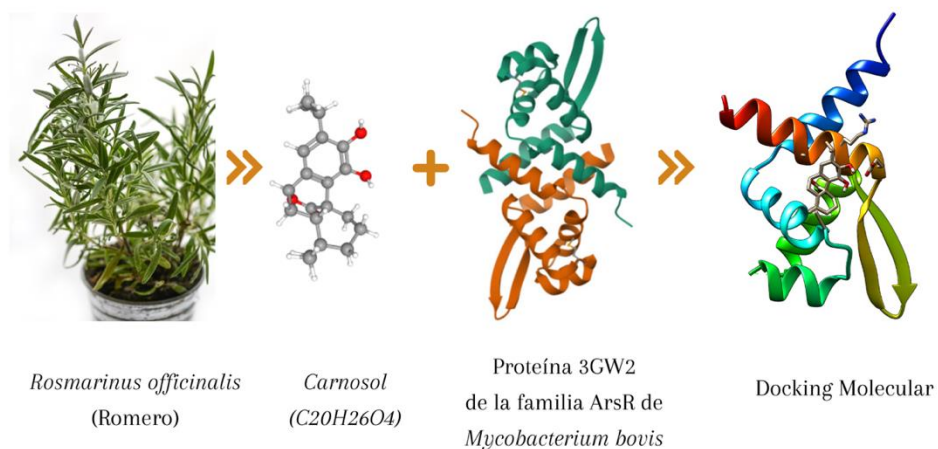
### *Proteínas/macromoléculas*

Para identificar la estructura de la proteína ArsR de *Mycobacterium bovis*, se utilizó la base de datos de proteínas (PDB, código 3GW2), la cual proporcionó información detallada sobre su resolución y los organismos relacionados (<https://www.rcsb.org/>) (Figura 1).

### *Ligandos y fármacos*

La estructura del carnosol se analizó usando PubChem, un repositorio que incluye datos de sustancias y bioensayos. Se evaluaron sus propiedades farmacológicas con la regla de cinco de Lipinski, considerando factores como el peso molecular y la capacidad de enlace de hidrógeno, según Della & Pinto (2018) y SWISSADME (<http://www.swissadme.ch/>).

**Figura 1.** Diagrama de construcción del docking molecular in silico.



*Fuente:* elaboración propia.

### ***Determinación de sitios activos***

Los aminoácidos del sitio activo de una proteína fueron identificados con el uso de CASTp, una herramienta para analizar la topografía de superficies proteicas. (<http://sts.bioe.uic.edu/castp/index.html?3gw2>).

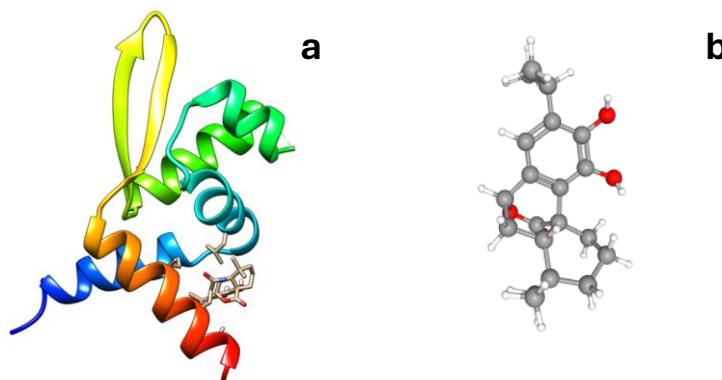
### ***Docking Molecular (Acoplamiento molecular)***

El estudio de acoplamiento del compuesto sobre *Mycobacterium bovis* (3GW2) se estudió utilizando los softwares de acoplamiento de swsdock (<http://www.swissdock.ch/>) (Grosdidier *et al.*, 2011).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Las estructuras 3GW2 (Figura 2a) de *Mycobacterium bovis* se obtuvieron de la Protein Data Bank (PDB). El ligando nativo de estas estructuras, identificado como Carnosol ( $C_{20}H_{26}O_4$ ) (Figura 2b), proviene de PUBChem 442009: CHEBI:3429. Este compuesto podría tener aplicaciones en terapia antimicrobiana debido a su interacción con las bacterias y su potencial para combatir la resistencia a los antibióticos (Busenlehner *et al.*, 2003).

**Figura 2.** a) Las estructuras 3GW2 de *Mycobacterium bovis* (post docking); b) Ligando nativo de estas estructuras, identificado como Carnosol ( $C_{20}H_{26}O_4$ ).



*Fuente: elaboración propia.*

Para la determinación de sitios activos en la proteína 3GW2 de *Mycobacterium bovis* se identificaron aminoácidos y sus átomos asociados: ARG26 (C, O, CG, CD, NE, NH1, NH2, CA), ILE30 (CD1, CG1, CG2), ALA45 (CA, O), THR48 (CB, O61), GIY49 (C), THR54 (G2, CB), ALA55 (N, CA, CB) y ASN58 (ND2) (Cuadro 1; Figura 3), estos residuos son críticos para la interacción proteína-ligando, inhibiendo la formación del motivo (secuencia específica de aminoácidos) y afectando la función de la proteína 3GW2, son objetivos importantes para futuras investigaciones en terapia antimicrobiana (Nieto *et al.*, 2018).

**Cuadro 1.** Determinación de los sitios activos 3GW2.

Aminoácido	Átomos	Aminoácido	Átomos
ARG26	C, O, CG, CD, NE, NH1, NH2, CA	ILE30	CD1, CG1, CG2
ALA45	CA, O	THR48	CB, O61
GIY49	C	THR54	G2, CB
ALA55	N, CA, CB	ASN58	ND2

**Fuente:** elaboración propia.

El estudio de acoplamiento del compuesto sobre *Mycobacterium bovis* (3GW2) se realizó con el software SwissDock. Se evaluaron parámetros como ClusterRank,  $\Delta G$ , FullFitness (Kcal/mol), SimpleFitness (Kcal/mol) y Energy. Los resultados sugieren que los complejos con menor  $\Delta G$  y mayor FullFitness y SimpleFitness tienen mayor afinidad al sitio activo de la proteína (figuras 4, 5 y 6). La biología computacional y estructural ha agilizado el

descubrimiento de fármacos para tratar enfermedades emergentes y reemergentes, como las *Mycobacterias* (Grange, 1984; Da Fonseca *et al.*, 2009). Estos hallazgos podrían ser relevantes para el desarrollo de futuros compuestos antimicrobianos (Nadendla, 2004; Eweas *et al.*, 2014; Dev y Kaur, 2020; Rakesh *et al.*, 2020; Firdayani *et al.*, 2022; Mahmoud *et al.*, 2022).

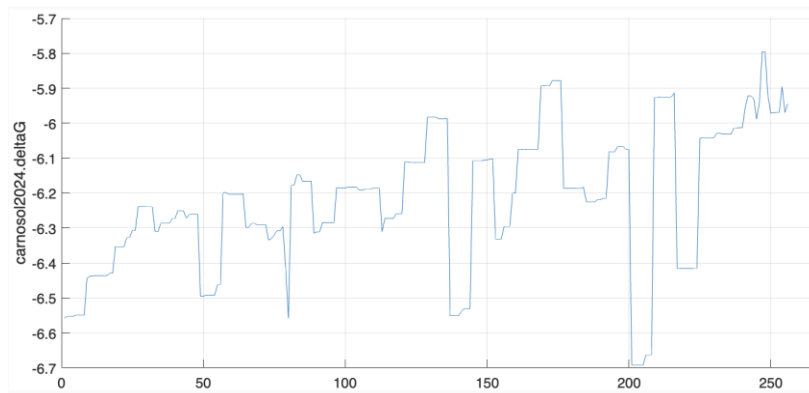
**Figura 3.** CASTp (Atlas computarizado de topografía superficial de proteínas). Sitios de Activos de 3GW2.



*Fuente: elaboración propia.*

La disminución de FullFitness (Figuras 3 y 4) indica una mayor afinidad proteína-ligando, relevante para tratamientos antimicrobianos y comparación de energía libre de unión ( $\Delta G$ ), un ejemplo son los opioides muestran alta afinidad por la proteasa principal de SARS-CoV-2, con  $\Delta G$  de -0.5 a -5.3 kcal/mol, superando al compuesto de referencia (-1.0 a -1.2 kcal/mol) y sugiriendo un potencial terapéutico significativo (Nadendla, 2004; Eweas *et al.*, 2014; Dev & Kaur, 2020; Rakesh *et al.*, 2020; Firdayani *et al.*, 2022; Mahmoud *et al.*, 2022).

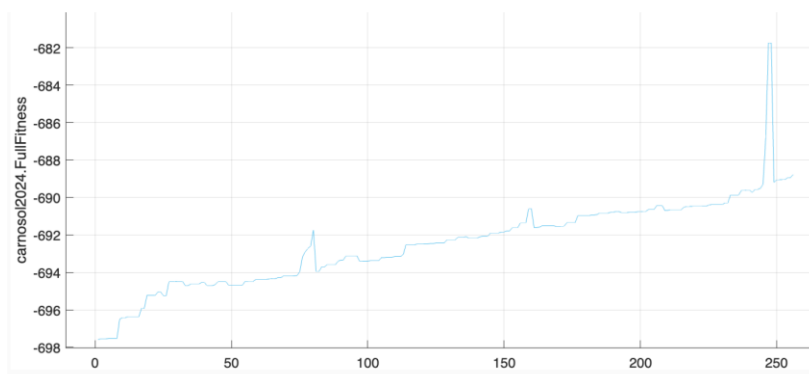
**Figura 4.** Variación de Energía Libre de Unión ( $\Delta G$ ) durante el acoplamiento (Kcal/mol).



*Fuente: elaboración propia.*

Estudios recientes indican que la folcodina, al unirse a la proteasa principal de SARS-CoV-2, exhibe una energía de unión muy baja, lo cual sugiere una interacción estable. Estas propiedades reflejan el potencial de la folcodina no solo en tratamientos antimicrobianos, sino también en la prevención y tratamiento de diversas enfermedades, similar al carnosol, que ha mostrado actividad contra células cancerosas y capacidad para inducir enzimas de detoxificación (Dev y Kaur, 2020; Eweas *et al.*, 2014; Firdayani *et al.*, 2022; Mahmoud *et al.*, 2022; Nadendla, 2004; Rakesh *et al.*, 2020).

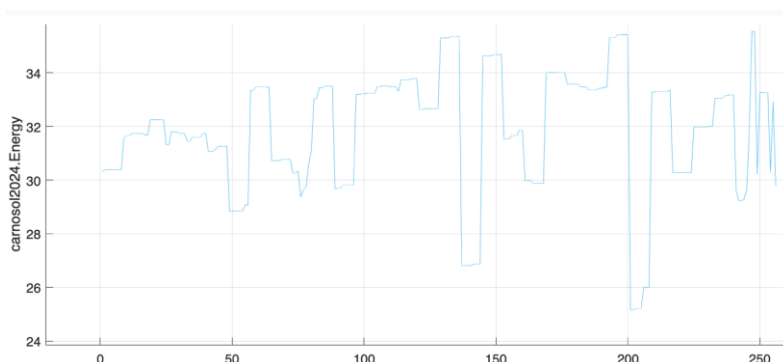
**Figura 5.** Variación de Energía Total de Unión (FullFitness;  $\Delta G$ ) durante el acoplamiento proteína-ligando (Kcal/mol).



*Fuente: elaboración propia.*

La energía total durante el acoplamiento entre la proteína y el ligando varía ligeramente, lo que indica la estabilidad del complejo y una mayor afinidad cuando los valores son bajos. En el caso de la folcodina unida a la proteasa principal de SARS-CoV-2, se observó una energía de unión muy baja y estable, lo que sugiere una fuerte interacción entre ambas moléculas. Con un RMSD de 18.39 (Mahmoud *et al.*, 2022), este hallazgo destaca el potencial de la folcodina en futuras aplicaciones terapéuticas. De manera similar, la energía de unión con la proteasa principal 3GW2 (figura 6) también muestra una interacción prometedora, lo cual es significativo para el desarrollo de nuevos tratamientos.

**Figura 6.** Variación de Energía Total (Energy;  $\Delta G$ ) durante el acoplamiento proteína-ligando (Kcal/mol).



*Fuente: elaboración propia.*

## CONCLUSIONES

La identificación de los sitios activos en la proteína 3GW2 de *Mycobacterium bovis*, que incluye aminoácidos críticos como ARG26, ILE30, ALA45, THR48, GIY49, THR54, ALA55 y ASN58, revela su importancia en la interacción proteína-ligando y en la función general de la proteína. Estos residuos son fundamentales para la inhibición de la actividad de la proteína por el carnosol, lo que sugiere que su modulación podría ser clave en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Los resultados del acoplamiento molecular indican que el carnosol tiene un potencial significativo como agente antimicrobiano, abriendo nuevas vías para el diseño de fármacos dirigidos a combatir infecciones por *Mycobacterium bovis*. En conclusión, este estudio no solo proporciona una comprensión más profunda de las interacciones entre el carnosol y la proteína 3GW2, sino que también establece un fundamento sólido para futuras investigaciones en el desarrollo de tratamientos innovadores contra la tuberculosis.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la BUAP y al CA-BUAP-207 por su invaluable apoyo. Especial reconocimiento a los profesores y estudiantes cuya dedicación fue esencial para el éxito de este proyecto.



## REFERENCIAS

- Brieskorn, C. H., Fuchs, A., Bredenber, J. B. S., McChesney, J. D., & Wenkert, E. (1964). The Structure of Carnosol. *Journal of Organic Chemistry*, 29(8), 2293–2298. <https://doi.org/10.1021/jo01031a044>
- Busenlehner, L. S., Pennella, M. A., & Giedroc, D. P. (2003). The SmtB/ArsR family of metalloregulatory transcriptional repressors: Structural insights into prokaryotic metal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2–3), 131–143. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00054-8](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00054-8)
- Da Fonseca, D. M., Silva, C. L., Wowk, P. F., Paula, M. O., Ramos, S. G., Horn, C., Marchal, G., & Bonato, V. L. D. (2009). Mycobacterium tuberculosis culture filtrate proteins plus CpG oligodeoxynucleotides confer protection to Mycobacterium bovis BCG-primed mice by inhibiting interleukin-4 secretion. *Infection and Immunity*, 77(12), 5311–5321. <https://doi.org/10.1128/IAI.00580-09>
- Della, L., & Pinto, G. (2018). La vía de absorción transdérmica Fármacos y profármacos. *Archivos Argentinos de Dermatología*, 1–11.
- Dev, S., & Kaur, I. (2020). Bioactive molecules from eucalyptus essential oil as potential inhibitors of COVID 19 corona virus infection by molecular docking studies. *Kragujevac Journal of Science*, 42, 29–43. <https://doi.org/10.5937/kgjsci2042029d>
- Eweas, A. F., Maghrabi, I. A., & Namarneh, A. I. (2014). Advances in molecular modeling and docking as a tool for modern drug discovery. *Der Pharma Chemica*, 6(6), 211–228.
- Firdayani, Riswoko, A., & Helianti, I. (2022). Inhibition of SARS-Cov-2 proteases by medicinal plant bioactive constituents: Molecular docking simulation. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 976(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/976/1/012054>
- Gao, C. H., Yang, M., & He, Z. G. (2011). An ArsR-like transcriptional factor recognizes a conserved sequence motif and positively regulates the expression of phoP in mycobacteria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 411(4), 726–731. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.07.014>

- Gao, C. hui, Yang, M., & He, Z. G. (2012). Characterization of a novel ArsR-like regulator encoded by Rv2034 in mycobacterium tuberculosis. *PLoS ONE*, 7(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036255>
- Grange, J. M. (1984). Mycobacterium avium. *European Journal of Respiratory Diseases*, 65(6), 399–401. <https://doi.org/10.1002/9781444317008.ch72>
- Grange, J. M. (2001). Mycobacterium bovis infection inhuman beings. *Tuberculosis*, 81(1–2), 71–77. <https://doi.org/10.1054/tube.2000.0263>
- Grosdidier, A., Zoete, V., & Michielin, O. (2011). SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucleic Acids Research*, 39(suppl), W270–W277. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr366>
- Johnson, J. J. (2011). Carnosol: A promising anti-cancer and anti-inflammatory agent. *Cancer Letters*, 305(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.02.005>
- Kumar, A., Phulera, S., Rizvi, A., Sonawane, P. J., Panwar, H. S., Banerjee, S., Sahu, A., & Mande, S. C. (2019). Structural basis of hypoxic gene regulation by the Rv0081 transcription factor of Mycobacterium tuberculosis. *FEBS Letters*, 593(9), 982–995. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13375>
- Li, Q., Li, C., Xie, L., Zhang, C., Feng, Y., & Xie, J. (2017a). Characterization of a putative ArsR transcriptional regulator encoded by Rv2642 from Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 35(9), 2031–2039. <https://doi.org/10.1080/07391102.2016.1206037>
- Li, Q., Li, C., Xie, L., Zhang, C., Feng, Y., & Xie, J. (2017b). Characterization of a putative ArsR transcriptional regulator encoded by Rv2642 from Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 35(9), 2031–2039. <https://doi.org/10.1080/07391102.2016.1206037>
- Mahmoud, S. S. A., Elkaeed, E. B., Als fouk, A. A., & Abdelhafez, E. M. N. (2022). Molecular Docking and Dynamic Simulation Revealed the Potential Inhibitory Activity of Opioid Compounds Targeting the Main Protease of SARS-CoV-2. *BioMed Research International*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/1672031>
- Nadendla, R. R. (2004). Molecular modeling: A powerful tool for drug design and molecular docking. *Resonance*, 9(5), 51–60. <https://doi.org/10.1007/bf02834015>

Nieto, G., Ros, G., & Castillo, J. (2018). Antioxidant and Antimicrobial Properties of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.): A Review. *Medicines*, 5(3), 98. <https://doi.org/10.3390/medicines5030098>

O'Reilly, L. M., & Daborn, C. J. (1995). The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: A review. *Tubercle and Lung Disease*, 76(SUPPL. 1), 1–46. [https://doi.org/10.1016/0962-8479\(95\)90591-X](https://doi.org/10.1016/0962-8479(95)90591-X)

Rakesh, N. R., Gurumurthy, H., Pradeep, H. K., Pradeep, S., Gurumurthy, D. M., & Sachin, C. L. (2020). In-Silico Pharmacological and Molecular Docking Studies of Natural Inhibitors form *Musa Spp.* On Vaca Gene a Vacuolating Cytotoxin Autotransporter. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 925(1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/925/1/012051>

Ryndak, M. B., Singh, K. K., Peng, Z., & Laal, S. (2015). Transcriptional profile of mycobacterium tuberculosis replicating in type II alveolar epithelial cells. *PLoS ONE*, 10(4), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123745>

Saha, R. P., Samanta, S., Patra, S., Sarkar, D., Saha, A., & Singh, M. K. (2017). Metal homeostasis in bacteria: the role of ArsR–SmtB family of transcriptional repressors in combating varying metal concentrations in the environment. *BioMetals*, 30(4), 459–503. <https://doi.org/10.1007/s10534-017-0020-3>

Yan, S., Zhen, J., Li, Y., Huang, Y., Ai, X., Li, Y., Stojkoska, A., Huang, X., Ruan, C., Li, J., Fan, L., & Xie, J. (2021). Mycobacterium Lrp/AsnC family transcriptional factor modulates the arginase pathway as both a sensor and a transcriptional repressor. *Journal of Genetics and Genomics*, 48(11), 1020–1031. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2021.06.018>