



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76

Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXVIII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS

SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2024

**IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS CANDIDATOS A FÁRMACOS
ANTILEISHMANIA COM AFINIDADE DUAL FRENTE A PTERIDINA
REDUTASE 1 E DIIDROFOLATO REDUTASE-TIMIDILATO SINTASE EM
*Leishmania major***

**Janine Ferreira de Souza Silva¹; Bruno Cruz de Souza³; Franco Henrique
Andrade Leite²**

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Farmácia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail:

fss.janine@gmail.com

2. Orientador, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: fhenrique@uefs.br

3. Coorientador, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: bcfarma@gmail.br

PALAVRAS-CHAVE: leishmaniose; pteridina redutase 1; diidrofolato redutase
timidilato-sintase.

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Cutânea (LC) é uma doença tropical negligenciada caracterizada como uma alteração polimórfica que acomete tegumentos e mucosas, a qual se não tratada pode causar deformidades e desfiguração (Cruz, 2021). Nos últimos cinco anos, foram notificados anualmente cerca de 42.166 casos de LC (OPAS, 2023). A doença é causada por protozoários do gênero *Leishmania*, sendo a *Leishmania major*, a espécie de maior impacto epidemiológico no mundo, apesar de ser uma espécie não endêmica no Brasil, foi identificada em indivíduos nativos, o que levanta questionamentos sobre a possível transmissão autóctone (Tiemi, 2023).

Atualmente, miltefosina é o único tratamento oral disponível para os paciente com LC, mas apresenta efeitos adversos significativos, como teratogenicidade (Santigo et al., 2021). Os antimoniais pentavalentes também são utilizados, mas efeitos de elevada toxicidade cardíaca, hepática, renal e do sistema musculoesquelético (Ramalho, 2017). Isso evidencia a necessidade de tratamentos eficazes e seguros para tratar paciente com leishmaniose cutânea. Uma forma de alcançar esse objetivo é identificar alvos terapêuticos exclusivos do parasito, como a enzima Pteridina Redutase 1 (PTR1), ausente em mamíferos e que age como desvio catalítico frente a Diidrofolato Redutase-Timidilato Sintase (DHFR-TS). Este estudo teve como objetivo identificar potenciais inibidores que atuem tanto na PTR1 quanto na (DHFR-TS) de *Leishmania major*, com o auxílio da triagem virtual por modelo farmacofórico dual, acoplamento molecular e dinâmica molecular. Além de serem analisadas as interações intermoleculares e as características estéreo-eletrônicas que favorecem essa inibição dual, visando contribuir para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos antileishmania.

MATERIAL E MÉTODOS OU METODOLOGIA

Triagem virtual em modelo farmacofórico de inibição dual

Foi realizada uma triagem virtual em modelo farmacofórico para inibidores duais frente a PTR1 e DHFR-TS de *L. major* (previamente construído por Quézia Sampaio; IC/UEFS 01/2021) através do software SYBYL-X 2.1.1 (TRIPOS INC., 2012). O banco de avaliação será o catálogo ZINC¹⁵ (<https://zinc15.docking.org>) com disponibilidade de compra imediata para testes biológicos futuros.

Priorização de compostos e estudos de acoplamento molecular

As moléculas remanescentes foram submetidas a estudos de acoplamento molecular através do software GOLD, de modo a prever a melhor pose dos compostos

nos sítios ativos das enzimas, o qual foi previamente validado. Os valores da energia de afinidade serão utilizados para ranquear as moléculas. Para a avaliação de inibição dual de PTR1 e DHFR-TS, foram priorizados compostos que apresentem perfil de modulação em ambos os sítios das enzimas. Através do servidor pkCSM (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsml/>), foram avaliadas propriedades farmacocinéticas e toxicológicas dos compostos, de modo a eliminar compostos com alto perfil de toxicidade, carcinogênese e mutagênese.

Estudos de dinâmica molecular e análise de interações

O composto com melhor perfil estereo-eletrônico frente a ambos os alvos (PTR1 e DHFR-TS) foi submetido a rotinas de dinâmica molecular (DM) com o auxílio do programa GROMACS 5.1.2 (Abraham et al., 2015). Os sistemas ligante-macromoléculas serão solvatados com água TIP3P, terão contra-íons adicionados e passarão por rotinas de 1ns para minimização/equilibração dos sistemas, com 1000 ciclos de *steepest descent* e gradiente conjugado, critério de convergência de força de 1 Kcal/mol/Å; e por fim, de 1000ns para produção. As interações ligante-macromolécula em PTR1 e DHFR-TS serão descritas e analisadas com base na quantidade e permanência das interações de hidrogênio observadas durante as trajetórias.

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO

O modelo farmacofórico dual filtrou 10.555 compostos a partir do catálogo do banco de dados ZINC¹⁵ (<https://zinc15.docking.org>). Dentre esse conjunto, 137 moléculas com valor de QFIT > 77.16 (valor correspondente ao primeiro falso negativo da triagem virtual) foram submetidas a acoplamento molecular no software GOLD frente as estruturas 3D da Pteridina redutase 1 (PTR1) (PDB ID 5L42) e Diidrofolato redutase-Timidilato sintase (DHFR-TS) de *Leishmania major* modelada e validada por Vadloori (2018) o que possibilitou o ranqueamento das estruturas conforme os valores de aproximação de energia de afinidade (*score*) (Ferreira et al, 2023). A escolha do melhor candidato baseou-se na análise físico-química, toxicológica e na eficiência de ligação aparente (EL_{app}).

ZINC06694453 atendeu aos parâmetros de biodisponibilidade oral presente na regra de Lipinski e Veber e não apresentou potencial de mutagenicidade. Além disso, esse composto demonstrou maior EL_{app} (PTR1 = 2,29 e DHFR-TS = 3,73). O composto foi então submetido a rotinas de DM no GROMACS 5.1.2 (Abraham et al., 2015). O objetivo dessa etapa consiste na análise do comportamento molecular entre o complexo ligante-macromolécula simulando as interações entre átomos e moléculas em nível atômico.

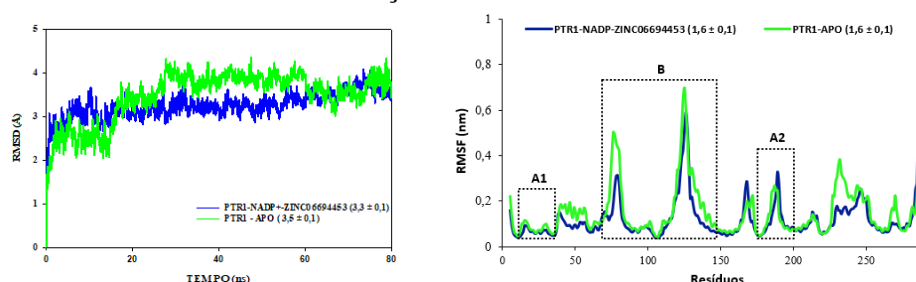


Figura 1: RMSD e RMSF (backbone) do complexo PTR1-NADP+ZINC06694453 em comparação com APO-PTR1.

A análise da estabilidade do complexo PTR1-NADP+ZINC06694453 em comparação com a forma APO da proteína (Figura 1) foi realizada através do cálculo do RMSD durante a trajetória de simulação de 80ns, a qual demonstrou que o complexo atingiu estabilidade após 20ns tendo uma variação de RMSD de $3,3 \pm 0,1$ Å. Enquanto, a forma apo atinge a estabilidade no intervalo de 30-60ns, com RMSD de $3,5 \pm 0,1$ Å. Os valores de RMSD são considerados adequando em torno de 3 Å (Verli, 2014). Sendo assim, a presença do ZINC06694453 foi então favorável para alcançar um sistema de

maior estabilidade, ou seja, com menores variações estruturais durante o tempo de simulação.

Objetivando uma análise que descrevesse a variação dos resíduos e a análise de determinadas regiões de maior e menor flexibilidade do sistema ao longo da simulação foi então calculado o RMSF durante a fase produtiva da DM (Figura 2). Com os dados obtidos através da comparação entre a forma APO e complexo, denota-se que nas regiões A1 e A2 podem ser identificados resíduos catalíticos presentes no sítio ativo como Arg-17, Asp-181, Tyr194 e Ser111 (Boakye, 2023) e que estão envolvidos na catalise enzimática. Além de serem observados também o comportamento do ligante em relação a regiões de alta flexibilidade (alças), como demonstrado na região B, em ambas as áreas destacadas, as interações da proteína e substrato fizeram com que o complexo apresentasse maior estabilidade, com menores flutuações quando comparadas com a forma APO de PTR1.

A avaliação da ocorrência e do tempo de permanência das interações intermoleculares durante simulação da DM é essencial para compreender a estabilidade do sistema. Dentre essas interações, destaca-se as ligações de Hidrogênio – essenciais para o reconhecimento biológico – devidamente calculadas através do módulo *hbond* disponível no pacote GROMACS 5.1.1 (Abraham et al., 2015) e pelo programa Hbmap2Grace (<http://lmdm.biof.ufrj.br/software/hbmap2grace>). Os resultados obtidos foram demonstrados no Gráfico 1, vale ressaltar que a análise foi estabelecida para as interações que permaneceram por tempo superior a 10%.

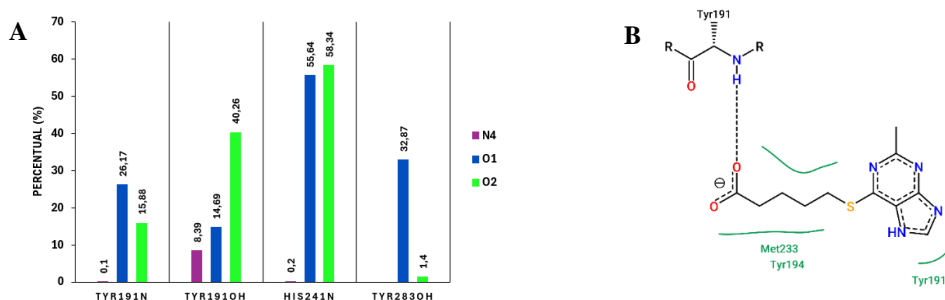


Figura 2. (A) Frequência das interações de Hidrogênio do ZINC06694453 no sítio de ligação de PTR1.

(B) Estrutura representativa dessas interações obtida a partir da simulação de DM.

Observa-se o comportamento de alguns resíduos (Figura 2-A), como por exemplo, Tyr-191 que estabelece uma multiplicidade de ligações de H com ZINC06694453 através do grupamento amino e com oxigênios presentes nas cadeias laterais, com frequências de 26,17% e 40,26%, respectivamente. O elevado tempo de permanência dessas ligações é necessário para garantir a inibição do alvo molecular, como forma de possibilitar o reconhecimento e a afinidade para com resíduos catalíticos. Além dessas, foram analisadas interações de distintas natureza, através de um agrupamento de características de uma diversidade conformacional (*clusters*) obtido especificamente da fase produtiva da DM (Figura 3).

A estrutura representativa (Figura 2-B) demonstrou outras interações do ligante e os resíduos Tyr-194 e Tyr-191 no sítio catalítico da Pteridina redutase 1. São observadas interações hidrofóbicas que pode ser um fator chave para a estabilização do complexo, resultando em uma maior afinidade do substrato, o que é crucial para a eficácia da inibição enzimática no contexto do tratamento da leishmaniose cutânea.

Além das análises para PTR1, com a finalidade de estudar o comportamento e a capacidade do ZINC06694453 de exercer inibição dual, o composto também foi submetido a DM frente a DHFR-TS. A trajetória de simulação para a forma APO foi de 100ns o que permitiu que a observação da estabilidade da proteína. Já para o complexo DHFR-TS-NADPH-ZINC06694453 o tempo de simulação foi de 16ns (em andamento), sendo a análise realizada de forma preliminar através do cálculo do RMSD. (Figura 3).

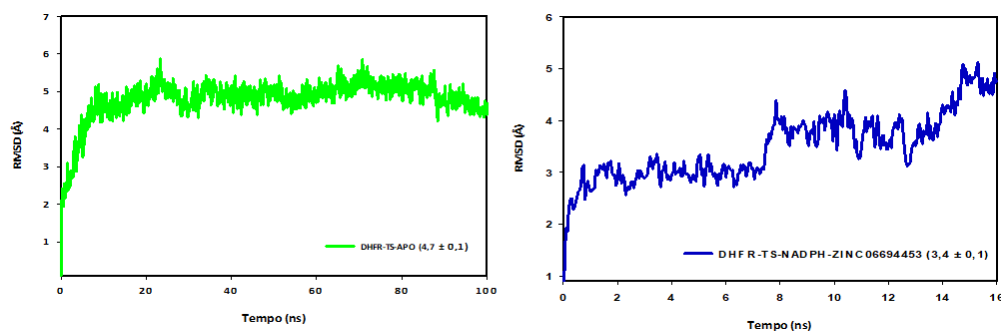


Figura 3: RMSD do complexo DHFR-TS-NADPH-ZINC06694453 e APO-DHFR-TS.

No tempo calculado (16 ns) (Figura 3) o complexo apresentou alterações dos níveis estabilidade com o RMSD de $3,4 \pm 0,1$ Å, enquanto a forma APO iniciou níveis de estabilização após 30ns e com RMSD superior a $4,5 \pm 0,1$ Å. Cabe destacar que os resultados observados até o momento gerado condizem com estudos anteriores e com dados experimentais disponível na literatura (Vadloori et al, 2018). Entretanto, devido ao tempo curto de simulação, algumas limitações são inerentes, logo promover uma extensão da trajetória auxiliará na obtenção de dados mais conclusivos em relação a estabilidade do complexo ligante-alvo e a interação com resíduos catalíticos para inibição enzimática.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Entre os compostos avaliados, ZINC06694453 através da triagem virtual hierárquica destacou-se como um potencial inibidor dual frente a Pteridina redutase 1 e a Dihidrofolato redutase Timidilato sintase de *Leishmania major*. Conforme dados obtidos nos estudos de acoplamento molecular e dinâmica molecular, demonstrou-se estável nas cavidades catalíticas da PTR1, mantendo interações importante como ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas com os principais resíduos dos sítios catalíticos. Entretanto, para que seja considerado um candidato a inibição dual, para a DHFR-TS como os dados são tempo-dependente se faz necessário dar segmento as trajetórias de simulação.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, M. J. et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v. 1–2, p. 19–25, set. 2015.
- CRUZ, D. L. V. **Doenças Negligenciadas: Leishmaniose**. Vol. 1. DOI: 10.47094/978-65-88958-22-3. Acesso em: 04 jun. 2024.
- FERNANDES, L. R. M. **Leishmaniose: Tratamento atual e perspectivas de novos fármacos**. 2014. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Química e Farmácia, Universidade do Algarve, [S.l.], 2014.
- Ferreira de Souza Silva, J.; Lorraine dos Santos Sampaio, Q. ; Henrique Andrade Leite, F. Identificação de potenciais inibidores Duais Frente a Pteridina Redutase 1 e Dihidrofolato redutase Timidilato-Sintase de *Leishmania Major*. **Revista Científica Eletrônica do Conselho Regional de Farmácia da Bahia**, [S. l.], v. 2, n. 2, p. e02022305, 2023.
- OPAS. **LEISHMANIOSES - Informe epidemiológico das Américas**. Num. 12. Dez. 2023. Disponível em: <http://www.paho.org/pt/documentos/leishmanioses-informe-epidemiologico-das-americas-num-12-dezembro-2023>. Acesso em: 04 jun. 2024.
- RAMALHO, D. B. Estudo clínico para avaliação da eficácia e segurança do uso intralesional de antimonio de meglumina no tratamento da leishmaniose cutânea localizada. (**Dissertação**). Disponível em: https://www.cpqrr.fiocruz.br/texto-completo/D_2018_DarioRamalho.pdf. Acesso em: 22 ago. 2024
- SANTIAGO, A.S. Tratamento da leishmaniose, limitações da terapêutica atual e a necessidade de novas alternativas: Uma revisão narrativa. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, e29510716543, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i7.16543>,
- TIEMI, M. C. Quarto caso de leishmaniose tegumentar no Brasil por *Leishmania major* – É possível a introdução de novas espécies no Brasil pela imigração? **Anais Brasileiros de Dermatologia** - Vol. 98. Issue 4. Pages 564-567 (01 July 2023). DOI: 10.1016/j.abdp.2023.03.009.
- VADLOORI, B et al. Homology modelling, molecular docking, and molecular dynamics simulations reveal the inhibition of *Leishmania donovani* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase enzyme by Withaferin-A. **BMC Res Notes** **11**, 246 (2018). <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3354-1>.
- VERLI, H. Dinâmica molecular. In: VERLI, H. (Org.). **Bioinformática: da biologia à flexibilidade**. São Paulo: SBBq, 2014. p. 173-187.