UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76
Recredenciamento pelo Decreto nº17.228 de 25/11/2016
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS
SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2021

IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS INIBIDORES DUAIS FRENTE A PTERIDINA REDUTASE 1 E DIIDROFOLATO REDUTASE-TIMIDILATO SINTASE DE *Leishmania major.*

Quézia Lorraine dos Santos Sampaio,[1] e Franco Henrique Andrade Leite[2]
1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduanda em Farmácia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: queziassampaio@gmail.com
2. Orientador, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: fhpharm@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: Acoplamento molecular; Triagem virtual hierárquica; Pteridina Redutase 1; Diidrofolato redutase-timidilato sintase.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma zoonose causada pelo protozoário do gênero *Leishmania*. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2019) estima-se que 700.000 a 1 milhão de novos casos e cerca de 26.000 a 65.000 mortes ocorrem anualmente. Apesar dos dados epidemiológicos, a terapia farmacológica é limitada e possui eficácia espécie-dependente, além de contar com fármacos *off-label* (desenvolvidos para outras terapias). Por esse motivo, a busca por novas alternativas para o tratamento de pacientes com leishmaniose é imprescindível. Uma forma de alcançar esse objetivo é através da aplicação de estratégias computacionais, como acoplamento molecular que possibilita avaliar a afinidade de uma molécula no sítio de ligação de um ou mais alvos promissores do parasito, como Pteridina redutase 1 (PTR1) e Diidrofolato redutase-timidilato sintase (DHFR-TS) e/ou modelo farmacofóricos que identifica requisitos estéreo-eletrônicos para atividade biológica. Através da triagem virtual hierárquica por modelo farmacofórico e acoplamento molecular foi realizada uma filtragem sucessiva dos bancos da Sigma Aldrich®, *Our Own Chemical Collection* (OOCC-UFSJ) e opnME (215.725 moléculas). Adicionalmente, filtros físico-químicos/toxicológicos e disponibilidade comercial foram aplicados às moléculas remanescentes. A aplicação desses filtros resultou na priorização de três moléculas com requisitos essenciais para inibição dual, potencial biodisponibilidade por via oral e disponível para testes biológicos.

MATERIAL E MÉTODOS OU METODOLOGIA

A estrutura 3D de PTR1 de *Leishmania major* (PDB ID 5L42) foi coletado no banco de macromoléculas biológicas (do inglês, *Protein Data Bank* - PDB). O estado de protonação foi ajustada com o auxílio do servidor H++ (ANANDAKRISHNAN; AGUILAR; ONUFRIEV, 2012; http://biophysics.cs.vt.edu/) com base no pH de maior eficiência catalítica (= 4,7). Cargas parciais Gaisteiger-Huckel e átomos de hidrogênio foram adicionadas e moléculas de água não estruturais e demais artefatos de cristalização foram excluídos. A estrutura 3D de DHFR-TS de *L. major* foi obtida por modelagem

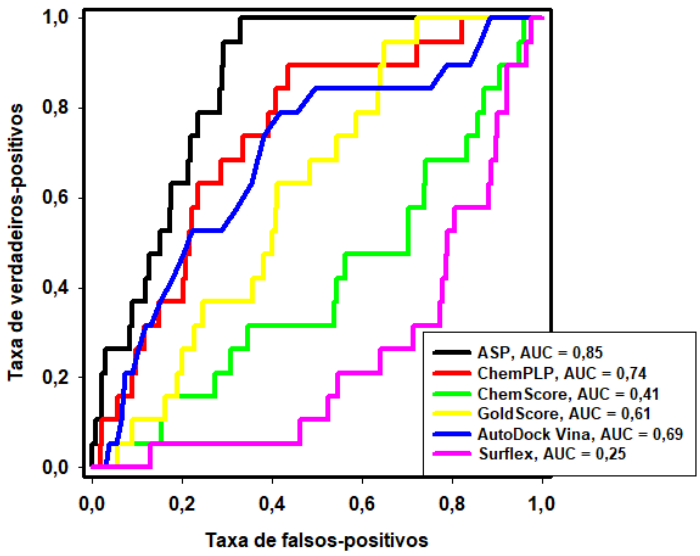
comparativa, conforme descrito em Teixeira (2019). A eficiência do acoplamento molecular dos programas GOLD (GOLD, 2008) (funções de pontuação: ASP, GoldScore, ChemScore e ChemPLP), Surflex-Dock (TRIPOS, 2010) (implementado no SYBYL-X 2.0) e AutoDock Vina 1.1.2 (TROTT et al., 2010) foi avaliada quanto a habilidade de diferenciar ativos de falsos positivos, com a construção da curva ROC (do inglês, *Receiver Operating Characteristic*) e cálculo da AUC (do inglês, *Area Under the Curve*). Com a seleção dos melhores parametros para o acoplamento molecular, iniciou-se a etapa de triagem virtual hierárquica. A filtragem inicial foi realizada com xxx moléculas contidas nos bancos da Sigma Aldrich®, *Our Own Chemical Collection* (OOCC-UFSJ) e opnME por modelo farmacofórico (previamente construído 01/2019) seguido por acoplamento molecular.

As moléculas remanescentes da filtragem foram avaliadas quanto ao potencial de absorção por via oral através dos descritores constantes na regra de Lipinski e Veber (Lipinski, 1997; Veber et al., 2002): número de aceptores de ligação de hidrogênio (≤ 10) e grupos doadores de ligação de hidrogênio (≤ 5), massa molecular (≤ 500 g/mol), coeficiente de partição octanol-água (clogP) (≤ 5) e da área de superfície polar (PSA) (≤ 140 angstrons), além do parâmetro mutagênico (teste de AMES) e disponibilidade comercial. Por fim, dois dendogramas (PTR1 e DHFR-TS) foram construídos com o auxílio do programa Dendroscope 3.7.5 (Huson, Scornavacca, 2012), para escolha das moléculas foi avaliado o valor de QFIT e a energia de afinidade; as moléculas em diferentes famílias com os melhores valores de QFIT/energia de afinidade foram escolhidas para a caracterização das interações intermoleculares.

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO

A busca por fármacos para tratar pacientes com leishmaniose é emergencial para o controle da doença visto que os fármacos existentes possuem efeitos adversos graves e eficácia variável. Uma das estratégias que possibilita essa busca é o acoplamento molecular que possibilita realizar a predição da atividade de um ligante em pesquisa, frente a um determinado alvo proteico. Outra estratégia ocorre a partir da busca de novos compostos através dos farmacóforos, que é definido por meio do conhecimento uma propriedade química proveniente de um grupo ou átomo presente na estrutura química responsável pela atividade biológica de interesse. Seis parâmetros de busca foram testados quando a taxa de acerto para a identificação de inibidores verdadeiros (Figura 1).

Figura 1: Curva ROC dos parâmetros de busca utilizados no acoplamento molecular frente a PTR1 de *L. major*



Com base nos dados obtidos, o parâmetro de busca escolhido foi a função de pontuação ASP do programa GOLD, (AUC=0,85), visto que AUC < 0,50 são associados a programas com desempenho pior do que uma seleção aleatória, enquanto os programas com AUC > 0,70 são moderadamente preditivos (METZ, 1978). O parâmetro de busca validado por Teixeira foi a função de pontuação ChemPLP do programa GOLD, contando com um valor de área sob a curva de 0.94.

Após selecionadas as melhores métricas para o acoplamento molecular, iniciou-se a etapa de triagem virtual hierárquica, que consiste na realização de filtragens sucessivas utilizando dois métodos diferentes, modelo farmacofórico e acoplamento molecular. Após a identificação de um modelo farmacofórico útil para a etapa de triagem virtual, uma filtragem sucessiva dos bancos da Sigma Aldrich®, *Our Own Chemical Collection* (OOCC-UFSJ) e opnME (totalizando 215.725 moléculas) foi realizada pelo modelo farmacofórico dual que gerou 10.651 moléculas com QFIT > 0. O objetivo da filtragem é possibilitar a priorização de moléculas candidatas a testes biológicos com maior grau de sobreposição ao modelo farmacofórico, por esse motivo aplicou-se um corte com base na média dos valores de QFIT somada mais duas vezes desvio padrão (M + 2x DESVPAD), a aplicação desse corte resultou na seleção de 215 moléculas com QFIT > 48,63, essas moléculas foram posicionadas no sítio de ligação da PTR1 de *L. major* e em seguida para DHFR-TS conforme parâmetros de busca validados.

Com o objetivo de aumentar o sucesso na priorização de potenciais moléculas biodisponíveis por via oral, utilizou-se da Regra de Lipinski e Veber et al., (2002); comumente utilizada para essa finalidade (LIPINSKI, 1997). Portanto, os descritores físico-químicos constantes nessas regras e toxicológicos (potencial mutagênico - teste de AMES) foram calculados para as moléculas remanescentes. Essa estratégia resultou na seleção de 10 moléculas sem nenhuma penalidade com base na regra de Lipinski e Veber, das quais todas possuem disponibilidade comercial.

A fim de selecionar moléculas com modos de ligação diferentes, foi realizado um agrupamento das moléculas selecionadas com base no perfil de ligação para possibilitar a seleção das melhores moléculas em cada família, resultando em dois dendogramas, referente à PTR1 e DHFR-TS (Figura 2 e Tabela 1).

Figura 2: Dendogramas referente à PTR1 e à DHFR-TS

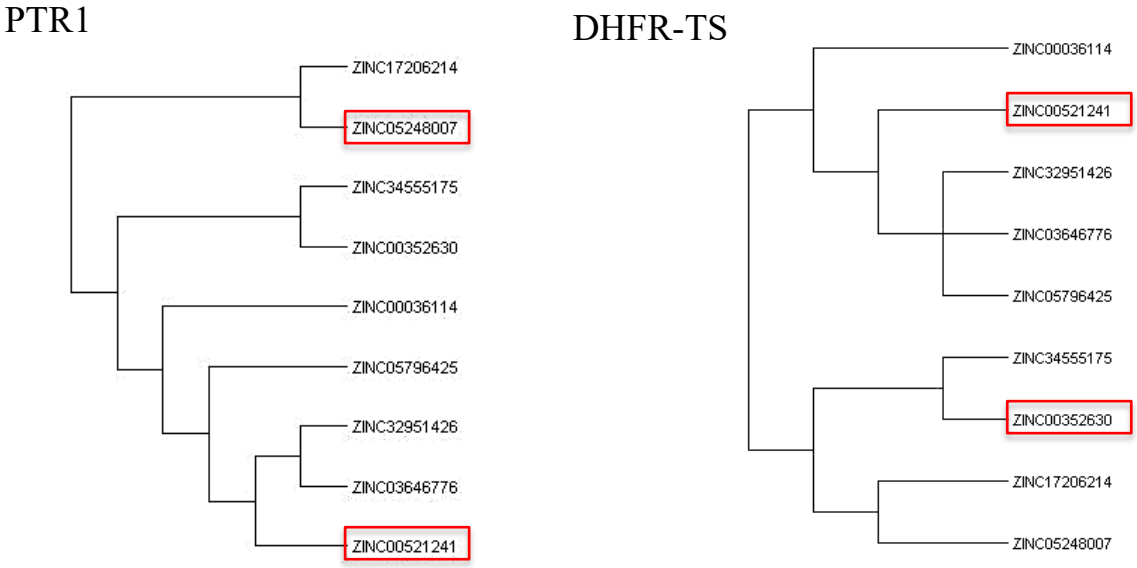


Tabela 1: Valores de QFIT e de energia de afinidade entre os ligantes e o alvo biológico

Molécula	QFIT	Valor de energia
ZINC00036114	50,42	67,65
ZINC00352630	80,50	63,37
ZINC00521241	80,50	63,32
ZINC03160984	58,02	48,43
ZINC03646776	48,71	50,91
ZINC05248007	77,41	57,46
ZINC05796425	48,71	40,93
ZINC17206214	48,71	50,24
ZINC32951426	48,64	55,76
ZINC34555175	49,85	47,71

De acordo com os valores as moléculas priorizadas frente a PTR1 foram ZINC05248007 e ZINC00521241, e as priorizadas frente a DHFR-TS foram ZINC00352630 e ZINC00521241. Destaque à molécula ZINC00521241, que possui elevado valor nos indicadores descritos e foi selecionada frente ambos os alvos. As moléculas selecionadas possuem características e interações já descritas na literatura, como a presença anéis aromáticos e/ou grupamentos aromáticos, grupos doadores e/ou aceptores de ligação de H (CAVAZZUTI et al., 2008).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A triagem virtual hierárquica é uma alternativa na avaliação de bibliotecas de compostos químicos, afim de reduzir o custo computacional, e melhor direcionar a seleção desses potenciais inibidores. Essa estratégia possibilitou filtrar sistematicamente e com alta eficiência de mais de 215.000 compostos naturais, resultando na seleção de três moléculas com os requisitos essenciais de atividade biológica e potência frente à Pteridina Redutase 1 (PTR1) e Diidrofolato redutase-timidilato sintase (DHFR-TS).

REFERÊNCIAS

ANANDAKRISHNAN R.; AGUILAR B.; ONUFRIEV A. V., H++ 3.0: automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations Nucleic Acids Research, v. 40, 2012.

BERMAN, H.M., et al. The Protein Data Bank (PDB). Nucleic Acids Research, v. 28, p. 235-242, 2000.Disponível em: <https://www.rcsb.org/>. Acesso em: 23 jan. 2021.

CAVAZZUTI, A., et al. Discovery of potent pteridine reductase inhibitors to guide antiparasite drug development. **PNAS.** v. 105. n. 5. p. 1448-1453, 2008.

GOLD, version 4.0; Cambridge Crystallographic Database: Cambridge, U.K, 2008.

HUSON, D. H.; SCORNAVACCA, C. Dendroscope 3- An interactive viewer for rooted phylogenetic trees and networks, Systematic Biology, 2012.

LIPINSKI, C. A., et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. Adv. Drug Deliv. Rev. v. 23. p. 3-26, 1997.

OMS - Organização Mundial da Saúde. Leishmaniase. 2018. Disponível em: <https://www.who.int/newsroom/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 28 set. 2021.

TRIPOS. SYBYL-X 2.0, St Louis, MO, USA, p. 190, 2010.

TROTT O., OLSON A. J., AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, Journal of Computational Chemistry, J Comput Chem. v. 31, p. 455–461, 2010.

VEBER et al. Molecular Properties That Influence the oral bioavailability of Drug Candidates. J. Med. Chem. v. 45. 2002.