



ESTUDOS DE ACOPLAMENTO MOLECULAR E DAS PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS DAS TIAZOLIDINEDIONAS FRENTE A TRIPANOTONA REDUTASE DE *Trypanosoma cruzi*

¹ Clarissa Maria Souza Peralva (UFBA) – cperalva411@hotmail.com; ² Kamel Metwally (ZU);
³ Samuel Silva da Rocha Pita (UFBA) – samuelpita@gmail.com;

Resumo: A enzima Tripanotiona Redutase de *Trypanosoma cruzi* (TcTR) é um alvo validado na busca por novos compostos anti-chagásicos. Desta forma, selecionamos uma série de tiazolidinedionas visando inibir esta enzima. Primeiramente, analisou-se as propriedades farmacocinéticas e toxicológicas através de servidores como pkCSM e DATAWARRIOR e, posteriormente, empregou-se o Autodock v.4.2 para analisar as interações entre estes derivados e a TcTR. Os melhores inibidores (KAM-4 e KAM-2) interagiram com os principais resíduos do sítio Z (PHE-396, PRO-398 e LEU-399), enquanto o KAM-13 (menor energia) interagiu distante do sítio ativo. Assim conclui-se que a interação das tiazolidinedionas e a TcTR pode ajudar na descoberta de novas estruturas químicas anti-chagas.

Palavras-Chaves: *Trypanosoma cruzi*; Tripanotiona Redutase; Propriedades farmacocinéticas; Acoplamento Molecular.

DOCKING AND PHARMACOKINETIC PROPERTIES OF THIAZOLIDINEDIONES STUDIED AGAINST *Trypanosoma cruzi* TRYPANOTHIONE REDUCTASE

Abstract: *Trypanosoma cruzi* Trypanothione Reductase (TcTR) is a validated target in the search for new anti-chagasic compounds. In this way, we studied a series of thiazolidinediones to inhibit this enzyme. First, the pharmacokinetic and toxicological properties were analyzed through servers such as pkCSM and DATAWARRIOR and, later, Autodock v.4.2 was used to analyze the interactions between thiazolidinediones and TcTR. The best inhibitors (KAM-4 and KAM-2) interacted with the Z-site residues (PHE-396, PRO-398 and LEU-399), while KAM-13 (lower energy) interacted far from the active site. Thus, it is concluded that the interaction of the thiazolidinedione derivatives and the TcTR may help in the discovery of new anti-chagas structures.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; Trypanothione Reductase; Pharmacokinetic Properties; Docking.



1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a doença de Chagas, uma doença negligenciada, afeta mundialmente cerca de 6 a 7 milhões de pessoas e ainda, se constitui a doença parasitária responsável pelo maior número de óbitos na América Latina [1]. Causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é endêmica na América do Sul e Central e está presente em 18 países do continente americano. O vetor desta patologia é o “barbeiro”, um inseto hematófago distribuído primariamente pelo continente americano [2].

Este parasito pode ser transmitido de diversas formas: vetorial (forma clássica), congênita, transfusional, via oral e através de transplante de órgãos [2]. Por ser uma doença negligenciada, o repertório de fármacos disponíveis para seu tratamento é limitado e apresenta, na maioria dos casos, baixos índices de eficácia ou adesão terapêutica, principalmente na sua fase crônica [3]. Assim, resta muito a ser feito, sobretudo em relação as populações vivendo distantes dos centros de atenção à saúde ou das possibilidades de tratamento [2].

A análise genômica e proteômica destes protozoários revelaram novos alvos terapêuticos onde se destaca a Tripanotiona Redutase (TcTR) [4], que é um alvo molecular validado pois, estudos de Biologia Molecular e Genética mostraram que a deficiência na síntese da tripanotiona não permite o desenvolvimento parasitário num meio contendo espécies oxidantes [5].

Esta enzima apresenta elevada afinidade, alta eficiência catalítica e exclusividade por seu substrato: tripanotiona [5]. Assim, a procura por compostos que sejam capazes de promover a sua desestabilização ou o bloqueio de sua atividade catalítica podem resultar em moléculas promissoras no tratamento da doença de Chagas. Deste modo, o objetivo principal deste trabalho é simular a interação entre uma série de tiazolidinedionas acéticas cedidas pelo Professor Kamel Metwally da Universidade de Zagazig (Egito), frente a Tripanotiona Redutase de *Trypanosoma cruzi* (TcTR) buscando entender sua interação para auxiliar o planejamento de novos compostos anti-chagásicos.

2. METODOLOGIA

Para compreender o modo de interação entre a Tripanotiona Redutase de *Trypanosoma cruzi* (TcTR) e as tiazolidinedionas acéticas, empregou-se o Acoplamento Molecular (*docking*, em inglês).

2.1. Preparo da Estrutura da Proteína

A estrutura cristalográfica da TcTR complexada com seu substrato natural foi obtida do *Protein Data Bank* [6], sob o código de acesso [1BZL](#), R = 2,40 Å [7]. As moléculas de água, do FAD e do substrato natural (GCG) foram extraídas. Foram adicionados todos os átomos de hidrogênios (método *noBondOrder*) e calculadas as cargas atômicas do tipo Gasteiger [8].

Em seguida, os hidrogênios não polares foram unidos aos carbonos que estavam ligados (*merge*) e por fim, assinalou-se os tipos de átomos, segundo o programa AutoDock v.4.2 [9]. Os valores de pKa para os aminoácidos da TcTR foram calculados pelo programa PropKa v.3.1 [10] e seguiram o pH determinado (pH=7,5): resíduos ácidos (ASP e GLU), carga -1; resíduos básicos (LYS e ARG),

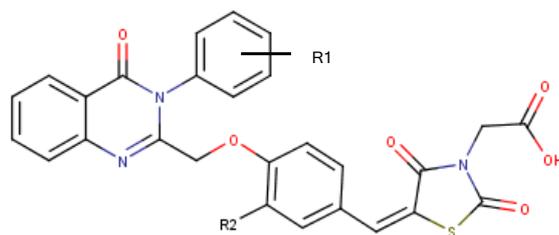


carga +1; HIS, carga 0, exceto a 233 e as CYS 53 e 58 fazem uma ligação dissulfídica.

2.2. Preparo das Estruturas dos Ligante

Através Marvin Sketch [11] desenhou-se a estrutura 2D dos ligantes tiazolidinedionas acéticos (Figura 1), bem como analisou-se suas microespécies no pH de estudo (7,5).

Figura 1. Estrutura 2D das tiazolidinedionas acéticas. A tabela abaixo indica os substituintes nas posições R1 e R2.



Código	R1	R2	Código	R1	R2
KAM-01	4-F	H	KAM-09	H	OCH ₃
KAM-02	3-Cl	H	KAM-10	3-Cl	OCH ₃
KAM-03	4-Br	H	KAM-11	4-Br	OCH ₃
KAM-04	3-Br	H	KAM-12	3-Br	OCH ₃
KAM-05	4-CF ₃	H	KAM-13	4-CF ₃	OCH ₃
KAM-06	4-CH ₃	H	KAM-14	3-OCH ₃	OCH ₃
KAM-07	3-CH ₃	H	KAM-15	H	H
KAM-08	3-OCH ₃	H			

Depois disso, realizou-se a minimização dos ligantes pelo programa Ghemical v.3.0 [12] com o campo de forças Tripos. Em seguida adicionou-se os átomos de hidrogênio com o método *noBondOrder*; calculou-se as cargas Gasteiger [8], fez-se um *merge* nos hidrogênios não polares e assinalou-se os tipos de átomos no AutoDock v.4.2 [9].

2.3. Autogrid, Autodock e Redocking do Ligante Cristalográfico

O AutoDock v.4.2 [9] requer mapas de grade de afinidade pré-calculados para a realização do docking, *grid* [13].

Para verificar se o *grid* estava posicionado no sítio ativo da TcTR, realizou-se o reacoplamento (*redocking*) com a estrutura cristalográfica do substrato natural, GCG [7], usando os seguintes parâmetros no *Autogrid* [13]: X= 25,183, Y=9,59, Z=-3,802, 74 x 62 x 54 pontos e espaçamento de 0,375 Å.



O *docking* dos ligantes com a TcTR foram executados pelo programa Autodock v.4.2 [9] que utiliza o algoritmo genético lamarckiano (LGA– *Lamarckian Genetic Algorithm*) na busca estocástica e na função de pontuação (*scoring*) para calcular a energia livre de ligação (ΔG_{bind}) [14]. O LGA empregou uma população inicial de 150 indivíduos em 100 corridas com, no máximo, 27.000 gerações e 2.500.000 avaliações de energia; taxa de mutação 2%; taxa de permutação 80%; taxa de elitismo 1,0 e os demais parâmetros definidos pelo programa automaticamente.

2.4. Propriedades Farmacocinéticas

Utilizou-se o pkCSM (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/>) que analisa as propriedades farmacocinéticas dos compostos através da codificação dos padrões de distância entre átomos [15].

As características toxicológicas foram avaliadas através do *DATAWARRIOR* (<http://www.openmolecules.org/datawarrior/>) que se apresenta como uma plataforma escalável, modular e consistente. No mesmo, é possível prever as propriedades moleculares de uma estrutura química, além de filtrar os dados em tempo real por critérios alfanuméricos e químicos [16].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O programa Autodock v.4.2 [9] empregado no Acoplamento Molecular, classificou os compostos com melhor energia no sítio ativo da TcTR (**Tab. 1**).

Tabela 1. Energias de interação (Kcal/mol) dos derivados Tiazolidinediona acoplados a TcTR obtidos a partir do Autodock v.4.2 [9].

Código	Energia de interação (Kcal/mol)
KAM-04	-10,69
KAM-07	-9,97
KAM-02	-9,92
KAM-09	-9,65
KAM-08	-9,62
KAM-10	-9,54
KAM-03	-9,49
KAM-06	-9,45
KAM-11	-9,41
KAM-14	-9,38
KAM-15	-9,26
KAM-01	-9,26
KAM-05	-9,2
KAM-12	-8,55
KAM-13	-8,55

De acordo com os resultados apresentados (**Tab. 1**) podemos concluir que quanto menor a energia de interação, melhor será o posicionamento das moléculas no sítio da TcTR e estes valores negativos indicam que as interações ocorrerão de forma espontânea (ΔG_{bind}) no acoplamento molecular.

Com o objetivo de alcançar a eficácia e sucesso terapêutico nas etapas que se procedem no desenvolvimento de fármacos, a interação entre farmacocinética, toxicidade e potência é crucial para se obter um composto de sucesso. Portanto, a



análise do perfil de absorção, distribuição, metabolização e excreção (ADMET) leva a uma redução do número de compostos que falham nos experimentos posteriores decorrente de dados de ADMET ruins [16].

A fim de filtrar os melhores compostos e estabelecer os possíveis candidatos a fármacos, analisamos as propriedades farmacocinéticas e toxicológicas (ADMET) das tiazolidinedionas, a partir dos servidores pkCSM [15] e DATAWARRIOR [16] (Tab. 2).

Tabela 2. Análises farmacocinéticas gerados pelo servidor pkCSM [15] e DATAWARRIOR [16].

Propriedades Farmacocinéticas e Toxicológicas	Valor (Referência)
Absorção intestinal	$\geq 70\%$ ($\geq 30\%$)
Caco-2	$0,634 \leq \text{Caco-2} \leq 0,856$ ($\geq 0,90$)
Permeabilidade ao SNC	≤ -3 (< -3)
LogD	$-0,09 \leq \log D \leq 1,10$
Inibidores da Glicoproteína-P	Não
Substrato da CYP3A4	Sim
Inibidores da CYP3A4	Não
Inibição hERG	Não (Não)
Mutagênicos e tumorigênicos	Não (Não)
Irritantes	Não (Não)
Ação nos órgãos reprodutivos	Não (Não)

Após os cálculos destas propriedades (Tab. 2), pode-se verificar que todos os compostos (Fig. 1) apresentaram uma alta absorção intestinal ($\geq 70\%$). A presença de grupos hidrofóbicos nos compostos (por exemplo: KAM-06, KAM-07), corrobora com os dados farmacocinéticos de absorção intestinal (Tab. 2).

Para prever a absorção de compostos administrado por via oral os dados de permeabilidade de células Caco-2 são amplamente utilizados nos modelos *in vitro* [15]. Todos os compostos, com exceção do composto KAM-14 (-0,153), tiveram uma boa permeabilidade Caco-2, pois os resultados ficaram próximos ao valor de referência, que é acima de 0,90 [16].

Os compostos apresentaram baixos valores de penetração no sistema nervoso central (SNC) (≤ -3 , Tab. 2), significando que abaixo desse índice, não ocorre penetração. Isto corrobora com o resultado de logD, já que todos os compostos apresentaram baixa lipofilicidade ($-0,09 \leq \log D \leq 1,10$).

Os mesmos, não são inibidores da Glicoproteína-P (Tab. 2). Quanto a metabolização realizada pela CYP3A4 (Tab. 2), principal enzima responsável pelo metabolismo de xenobióticos, todos os compostos mostraram não serem inibidores e sim, substrato da mesma, o que leva a conclusão que os mesmos serão metabolizados por esta enzima.

A inibição dos canais de potássio codificados pelo hERG são as principais causas que levam a arritmia ventricular fatal. A inibição dos canais hERG resultou na retirada de muitas substâncias do mercado farmacêutico [15]. Deste modo, para avaliar os possíveis riscos de ocorrerem eventos cardíacos, avaliou-se a inibição frente a esses canais e nossos resultados mostraram que todos os compostos não se apresentaram inibidores hERG (Tab. 2).



Finalmente, as características toxicológicas avaliadas pelo DATAWARRIOR [16], indicaram que os compostos não tiveram efeitos sobre os órgãos do aparelho reprodutor como também não se mostraram mutagênicos, tumorigênicos nem irritantes (**Tab. 2**).

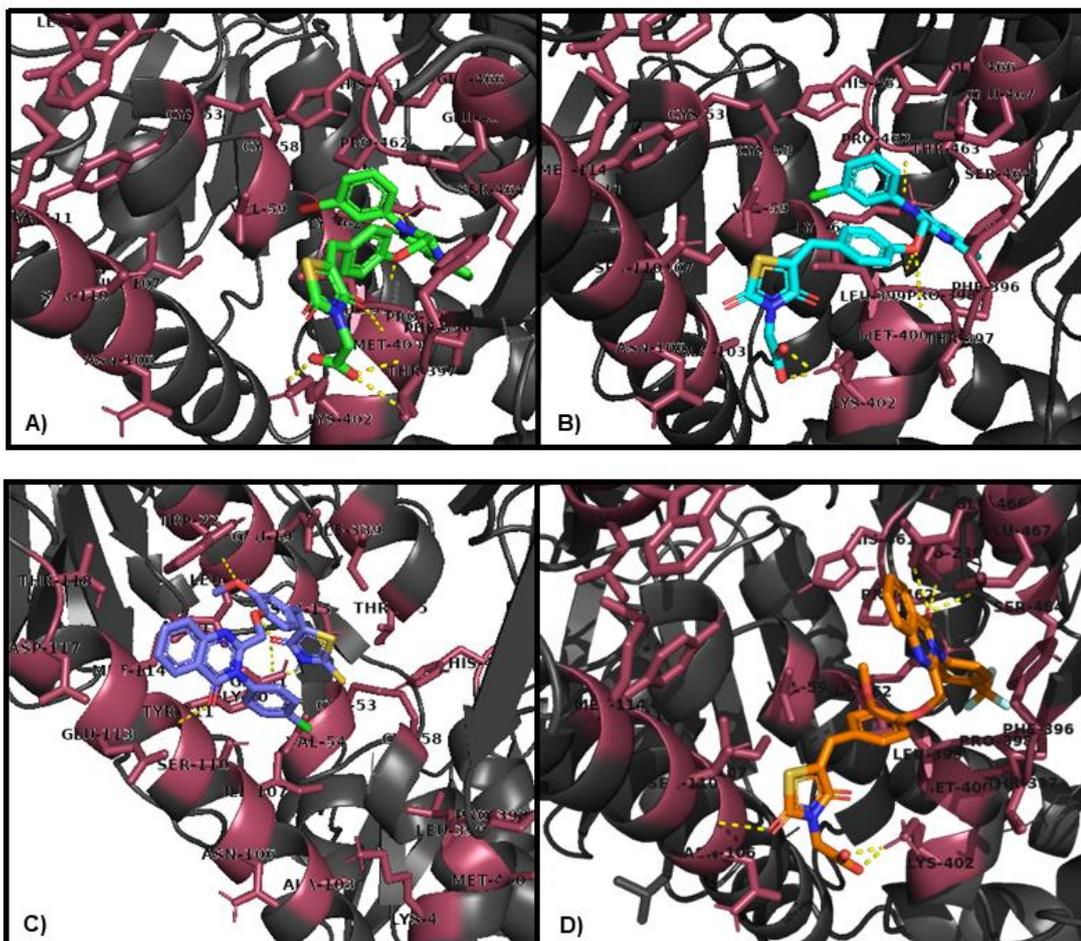
De acordo com os resultados farmacocinéticos e toxicológicos descritos acima, é possível inferir que as tiazolidinedionas deste estudo podem ser considerados possíveis candidatos a fármacos. Isto, viabiliza a análise do acesso destes compostos aos sítios de interação da TcTR pensando no planejamento de novos inibidores desta enzima com ação anti-chagásica.

Analisando os complexos TcTR-tiazolidinedionas, observa-se que os derivados que interagiram com o sítio Z (PHE-396, PRO-398, LEU-399, MET-400 e LYS-402) apresentaram as melhores energias de acoplamento (Figura 2. A e B; **Tab. 1**). Este sítio hidrofóbico foi previamente relacionado por Khan e colaboradores para ser acessado por potentes inibidores da TcTR [17]. Neste mesmo estudo, foi descrito que embora a carga líquida ajude na seletividade e também possa fornecer alguma orientação no sítio ativo, a hidrofobicidade, combinada com essa carga positiva particular, é importante para a melhora geral da inibição, possivelmente pela ocupação do sítio Z da enzima [17].

Nossos resultados de interação no sítio da TcTR (interações iônicas, ligações hidrogênio, contatos polares e interações hidrofóbicas) corroboram com esses dados, uma vez que os compostos que apresentaram melhores valores de energia de interação (KAM-02 e KAM-04) interagiram neste local (Figura 2. A e B; **Tab. 1**).

Outros compostos com menores energias, a exemplo dos compostos KAM-12 e KAM-13, interagiram com os resíduos distantes do sítio Z (Figura 2. C e D). O composto KAM-12, ao perder as interações hidrofóbicas do sítio Z, fez esse mesmo tipo de interação em outro sítio hidrofóbico [7]: TYR-111, MET-114, SER-110. Por sua vez, o composto KAM-13 interagiu com o sítio γ -Glu (HIS-461, GLU-466, GLU-467), o que provavelmente, pode dificultar suas interações na chegada ao sítio Z (Figura 2D).

Figura 2. Principais interações dos derivados de tiazolidinedionas acoplados a TcTR no AutoDock v.4.2 [9]. A estrutura da TcTR está representada em *cartoon* cinza (alfa hélice e folhas beta) e as ligações hidrogênio em amarelo (pontilhadas). Os resíduos do sítio ativo da TcTR são representados em bastões magenta e os ligantes são: **A) KAM-04** (verde) com interações no sítio Z [17] (LYS-402, MET-400, THR-397, LEU-399, PRO-398 e PHE-396); **B) KAM-02** (azul claro) com interações no sítio Z [17] (LYS-402, PRO-398 e LEU-399); **C) KAM-12** (púrpura) com interações no sítio hidrofóbico [7] (MET-114, ILE-107, TYR111 e VAL-54) e sítio γ -glutâmico [7] (LEU-18 e GLY-51); **D) KAM-13** (laranja) com interações no sítio Z [17] (LEU-399, PRO-398 e LYS-402), sítio catalítico [7] (GLU-466 e Glu-467), sítio-Y (SER-464) e sítio hidrofóbico (ASN-106). A figura foi gerada pelo programa PyMOL [18].



4. CONCLUSÃO

O tratamento da doença de Chagas, principalmente na sua fase crônica, é um ponto que ainda não está elucidado. Por isso, se justifica a busca por novos compostos com potente ação antiparasitária, a fim de melhorar a segurança e a eficácia no tratamento dos portadores da infecção chagásica.

Deste modo, as tiazolidinedionas podem ser consideradas possíveis anti-chagásicos pois estes interagiram com os resíduos presentes no sítio ativo da Tripanotona Redutase de *Trypanosoma cruzi* (TcTR). Para os compostos mais ativos (KAM-04, KAM-07 e KAM-02), que interagiram principalmente com o sítio Z (PHE-396, PRO-398 e LEU-399), seus resultados de energia são próximos por possuírem o mesmo modo de ligação.

Para as moléculas com energias mais baixas, observa-se que suas interações se deram com resíduos distantes do sítio catalítico. Assim essas interações justificam a ordem de classificação apontada pelo programa Autodock v.4.2.

Ademais nosso estudo revelou que as tiazolidinedionas apresentaram biodisponibilidade, distribuição, excreção e não apresentaram toxicidade. Assim pode-se dizer que através do Acoplamento Molecular e da análise de propriedades farmacocinéticas e toxicológicas, foi possível analisar o mecanismo de interação



entre as tiazolidinedionas e a TcTR donde conclui-se que nossos resultados podem ajudar na pesquisa de novos derivados com ação anti-chagásica.

Agradecimentos

Os autores agradecem as seguintes agências de fomento: CNPq, CAPES e FAPESB (JCB-0039/2013 e RED-008/2013).

5. REFERÊNCIAS

- ¹WHO. World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis). **Chagas disease fact sheet**. 2018.
- ²DIAS, J. C. P.; et al. Aspectos gerais da epidemiologia da doença de Chagas, com especial atenção ao Brasil. **Epidemiologia Serviço de Saúde**, v. 25, p. 7-86, 2016.
- ³OLIVEIRA, M. F.; et al. Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil. **Revista de patologia tropical**, v. 37, n. 3, p. 209-228, 2008.
- ⁴KRIGER, S.; et al. Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. **Molecular Microbiology**, v. 35, p. 542, 2000.
- ⁵PITA, S. S. R.; PASCUTTI, P. G. Alvos Terapêuticos na Doença de Chagas: a Tripanotonia Redutase como foco. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 4, p. 307-324, 2011.
- ⁶BERMAN, H. M. et al. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 235-242, 2000.
- ⁷BOND, et al. Crystal structure of Trypanosoma cruzi trypanothione reductase in complex with trypanothione, and the structure-based discovery of new natural product inhibitors. **Structure**, v. 7, n. 1, p. 81-89, 1999.
- ⁸GASTEIGER, J.; MARSILI, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity- a rapid access to atomic charges. **Tetrahedron**, v. 36, n. 22, p. 3219-3228, 1980.
- ⁹MORRIS, G. M.; et al. [Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility](#). **Journal of Computational Chemistry**, v. 16, p. 2785-2791, 2009.
- ¹⁰OLSSON, M. H. M.; et al. PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pKa Predictions. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 7, n. 2, p. 525-537, 2011.
- ¹¹CHEMAXOM. MarvinSketch was used for drawing, displaying and characterizing chemical structures, substructures and reactions, Version 5.12: **Chemaxom**, 2013.
- ¹²HASSINEN, T.; PERAKYLA, M. New energy terms for reduced protein models implemented in an off-lattice force field. **Journal of Computational Chemistry**, v. 22, p. 1229-1242, 2001.
- ¹³GOODFORD, P. J. A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 7, p. 849-857, 1985.
- ¹⁴MORRIS, G. M.; et al. Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function. **Journal of Computational Chemistry**, v. 19, n. 14, p. 1639-1662, 1998.



¹⁵PIRES, D. E. V.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B. pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 9, p. 4066-4072, 2015.

¹⁶TOEPAK, E. P.; TAMBUNAN, U. S. F. *In silico* design of fragment-based drug targeting host processing α -glucosidase I for dengue fever. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v.172, p. 1-10, 2017.

¹⁷KHAN, M. O.; et al. Use of an Additional Hydrophobic Binding Site, the Z Site, in the Rational Drug Design of a New Class of Stronger Trypanothione Reductase Inhibitor, Quaternary Alkylammonium Phenothiazines. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 3148-3156, 2000.

¹⁸SCHORODINGER, L. L. C. The Pymol Molecular Graphics System, version 1.5.0.4, 2013.