**VIRTUAL SCREENING DE COMPOSTOS NATURAIS COM POTENCIAL INIBIDOR DA ENZIMA TRIPANOTIONA REDUTASE DE LEISHMANIA AMAZONENSIS**

**ARRUDA**, Arthur Lima de[[1]](#footnote-1); **OLIVIER**, Danilo da Silva[[2]](#footnote-2)

**RESUMO**

O objetivo deste estudo foi buscar moléculas de origem de plantas medicinais que inibissem a enzima Tripanotiona Redutase de *Leishmania amazonensis*, enzima esta que é essencial para a sobrevivência deste parasita. Com a aplicação do método de modelagem por homologia e de *docking molecular* simulou-se interações entre cinco flavonoides e a enzima TR. A Luteolina foi a molécula que evidenciou maior energia de interação, sugerindo assim um maior potencial no sentido inibitório com relação a mesma. Os resultados agora obtidos indicam que tais compostos naturais podem ser promissores na busca por novos e mais acessíveis tratamentos leishmanicidas e com menos efeitos colaterais, ajudando no tratamento da referida doença.

**Palavras-chave**: Flavonoides. Tripanotiona. Leishmaniose. *Docking Molecular*.

1. **INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA**

A Leishmaniose, faz parte do grupo das Doenças Tropicais Negligenciadas (DNT), e afeta milhões de pessoas ao redor do mundo em situação de vulnerabilidade social, sem saneamento básico e água potável (Feasey *et* al., 2010). O agente etiológico da doença é o protozoário do gênero *Leishmania* (OPAS, 2022) e o vetor são os insetos do gênero *Lutzomyia* (Ministério da Saúde, 2024), podendo ser classificada em três tipos: cutânea, mucosa e visceral, sendo esta última a forma mais grave da doença. Nos últimos 21 anos foram notificados cerca de 1.105.545 casos de leishmaniose cutânea e 69.665 casos de leishmaniose visceral no Brasil, média de 52.645 e 2.488 casos anuais, respectivamente, sendo o Brasil líder em casos na América do Sul (OPAS, 2022).

O tratamento no Brasil é feito com antimoniais pentavalentes, sendo estes, embora úteis, apresentam toxicidade e grande custo, gerando efeitos colaterais severos como febre, náuseas, cefaleia, mialgia, dentre outros ocasionados pelo uso desses antimoniais (Soares-Bezerra; Leon; Genestra, 2004).

Portanto, o desenvolvimento de novos fármacos que sejam mais baratos e menos tóxicos é crucial para contornar a resistência do parasita e obter acesso a regiões com condições limitadas. A pesquisa procura alvos enzimáticos que, ao serem inibidos, possam levar ao desequilíbrio do patógeno levando-o à morte.

1. **BASE TEÓRICA**

Os flavonoides são compostos encontrados em vegetais, frutas e plantas medicinais, como o chá verde, possuindo propriedades terapêuticas e antioxidantes, atuando no combate a várias doenças (Scotti *et* al., 2010). Estudos mostram que estes compostos possuem atividade antileishmania, atraindo a atenção dos pesquisadores para serem utilizados no desenvolvimento de novos fármacos como potenciais inibidores (Scotti *et al*., 2015). A Tripanotiona Redutase (TR) é vital na sobrevivência do parasita, pois controla o equilíbrio redox pela redução da Tripanotiona oxidada, mantendo o ambiente intracelular em condições reduzidas, protegendo o parasita do estresse oxidativo. O estresse oxidativo é um dos mecanismos utilizados pelo sistema imunológico para eliminar microrganismos, principalmente por células fagocíticas do hospedeiro vertebrado (Krieger *et al*., 2002). A capacidade dos parasitas em resistir a este estresse nas células fagocíticas é fundamental para a sobrevivência no hospedeiro e a TR é imprescindível para a manutenção da viabilidade e virulência do parasita, favorecendo a invasão e resistência às defesas do hospedeiro, sendo, portanto, um alvo ideal para o desenvolvimento de moléculas inibidoras que possam reduzir sua atividade enzimática (Fonseca *et al.,* 2017; Battista *et al*., 2020).

1. **OBJETIVOS**

Este trabalho teve por objetivo buscar moléculas provenientes de plantas medicinais que possam ter ação inibitória da TR de *Leishmania amazonensis*. Além disso, caracterizar a atividade inibitória contra a TR, por meio de técnicas computacionais como modelagem por homologia, *virtual screening* e *docking molecular*.

1. **METODOLOGIA**

A enzima TR não possui modelo estrutural definido experimentalmente portanto, um modelo foi desenvolvido por homologia através do servidor SWISS-MODEL. A sequência da enzima foi obtida a partir do banco Uniprot (código Q0GU43) e o cristal utilizado foi o da *L. infantum* (PDB: 2JK6) com 90,76% de similaridade. As moléculas estudadas foram selecionadas com base em estudos sobre flavonoides com ação contra leishmania. Realizou-se a simulação de interações via *Docking Molecular* com cinco flavonoides: Epigalocatequina, Epigalocatequina-galato octacetato, Epigalocatequina-galato, Flavina dinucleotídeo de adenina e Luteolina. Todas as moléculas foram testadas no sítio ativo da TR.

1. **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A enzima TR tem estrutura bem caracterizada, é um homodímero obrigatório com cada uma das duas subunidades individuais, relacionadas por simetria dupla, compreendendo um domínio de ligação FAD (resíduos 1–160 e 289–360), um domínio de ligação NADPH (resíduos 161–288) e um domínio de interface (resíduos 361–488), (Avillán, *et al*., 2011; Fonseca, 2017). Possui função importante na atuação do controle do equilíbrio redox, mantendo o interior intracelular na sua forma reduzida tornando-se fundamental contra o estresse oxidativo, de maneira tal que a sobrevivência do parasita consiste na capacidade de resistir a esse ataque.

A próxima etapa foi a escolha de cinco moléculas candidatas a serem aplicadas na triagem virtual. Após a seleção das moléculas (ligantes), identificou-se o sítio de ligação da enzima, onde construiu-se uma caixa de busca na parte central do sítio a qual ficaram dispostas todas as cinco moléculas para realizar as simulações por meio do *Docking Molecular*.

Posteriormente, todas as cinco moléculas foram submetidas a 1000 simulações independentes por *Docking Molecular* a fim de identificar a energia de interação (enzima-ligante), quanto menor a energia de interação, maior será a probabilidade de ligação da molécula com o sítio catalítico. A Tabela 1 apresenta a energia de interação para cada molécula.

**Tabela 1:** Energia de interação entre os compostos e a TR.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Classificação** | **Composto** | **Energia (kcal/mol)** | **ξ(%)** |
| **Energia\*** | **Min.** | **Máx.** | **Desvio** |
| 1 | Luteolina | -8,5 | -8,50 | -8,40 | -8,50 (0,01) | 99,7 |
| 2 | Flavina dinucleotídeo de adenina | -8,5 | -8,90 | -8,10 | -8,50 (0,08) | 49,3 |
| 3 | Epigalocatequina | -8,4 | -8,40 | -8,00 | -8,40 (0,10) | 91,7 |
| 4 | Epigalocatequina-galato-octacetato | -7,9 | -8,00 | -7,80 | 7,90 (0,01) | 99,6 |
| 5 | Epigalocatequina-galato | -7,800 | -7,900 | -7,700 | -7,800 (0,004) | 99,8 |

\* Energia da configuração com maior taxa de sucesso.

 Após as 1000 réplicas serem realizadas, analisou-se a taxa de sucesso para cada ligante, observando a quantidade de vezes em que as moléculas apresentaram a mesma energia e posição no sítio catalítico. As moléculas apresentaram uma energia de interação com o sítio ativo da enzima variando entre -8,50 a -7,90 kcal/mol. Esses resultados indicam perspectivas promissoras para essas moléculas, apontando potencial capacidade inibitória da enzima.

Dentre as cinco moléculas estudas descaram-se dois com os melhores resultados.

A molécula Luteolina com fórmula química C15H10O6, apresentou energia de interação com a enzima de -8,5 kcal/mol com taxa de sucesso de 99,7%. Durante a interação com a enzima TR foram observadas forças intermoleculares de Van der Waals com os resíduos: Cys B: 50, Thr A: 456, Glu A: 459, His A: 454, Phe A:389, Pro A: 391, Thr B: 58. Além disso, ligações de hidrogênio com os resíduos: Val B: 51, Thr A: 390, Leu A: 392, ligações Pi-cátion e Pi-enxofre com os resíduos: Lys B: 54 e Met A: 393, respectivamente.

A molécula Epigalocatequina com fórmula química C15H14O7, apresentou energia de interação com a enzima TR de -8,4 kcal/mol com uma taxa de sucesso de 91,7%. Durante as interações foram observadas interações intermoleculares de Van der Waals com os resíduos: Phe A: 389, His A: 454, Glu A: 459, Ser A: 457, Met A: 393, Thr B: 58, Cys B: 50, além de ligações de hidrogênio com os resíduos: Thr A: 390, Leu A: 392, Thr A: 456 e Val B: 51. Foram observadas também ligações Pi-cátion e Pi-alquil com os resíduos: Lys B:54 e Leu B: 55, Pro A: 455, respectivamente.

Com base nas simulações realizadas, pode-se observar que 11 aminoácidos interagiram com todas as cinco moléculas, sendo eles, Phe A: 389, Glu A: 459, Thr A: 456, Leu A: 392, Pro A:391, Lys B: 54, Leu B: 55, Met A: 393, Pro A: 455, His A: 454, Val B: 51.

1. **CONCLUSÃO/CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A Leishmaniose é uma das DNTs que mais incidem sobre as populações vulneráveis, e os tratamentos disponíveis têm eficácia limitada, custos elevados e efeitos adversos significativos. Portanto, um maior esforço deve ser feito a fim de desenvolver fármacos mais eficazes e acessíveis. Um dos caminhos promissores é a busca de alvos enzimáticos essenciais para a sobrevivência do parasita, como a TR de Leishmania amazonensis, que é um alvo do potencial de virulência do patógeno.

Usando métodos computacionais, como modelagem por homologia, e *docking* *molecular*, outras moléculas foram encontradas que tinham potencial para inibir a TR. Dentre estas, a luteolina destacou-se pelas interações energéticas favoráveis com o sítio ativo da enzima, levando a uma alta probabilidade de sucesso. Esses resultados são animadores para futuros estudos no desenvolvimento de novos tratamentos leishmanicidas, mais eficazes e acessíveis, o que poderá contribuir de forma significativa ao combate da doença nas populações desfavorecidas.

1. **REFERÊNCIAS**

Avilán, L.; Gualdrón-López, M.; Quiñones, W.; González-González, L.; Hannaert, V.; Michels, P. A. M.; Concepción, J.-L. Enolase: A Key Player in the Metabolism and a Probable Virulence Factor of Trypanosomatid Parasites—Perspectives for Its Use as a Therapeutic Target. Enzyme Research, v. 2011, 7 abr. 2011. <https://doi.org/10.4061/2011/932549>.

Battista, T., Colotti, G., Ilari, A. & Fiorillo, A. Targeting trypanothione reductase, a key enzyme in the redox trypanosomatid metabolism, to develop new drugs against leishmaniasis and trypanosomiases. Molecules 25, (2020).

Feasey, N., Wansbrough-Jones, M., Mabey, D. C. W. & Solomon, A. W. Neglected tropical diseases. Br. Med. Bull. 93, 179–200 (2010).

Fonseca, M. S. da. Análise funcional de enzimas da via de síntese e redução da tripanotiona em Leishmania spp. 2017. Thesis – 2017. Disponível em: https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/33016. Acesso em: 25 agosto 2024.

FONSECA, Maísa Santos da et al. Análise funcional de enzimas da via de síntese e redução da tripanotiona em Leishmania spp. (2017). Tese de Doutorado.

Krieger, S. et al. Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. Mol. Microbiol. 35, 542–552 (2002).

Ministério da Saúde-Brasil. Leishmaniose Tegumentar (LT). Disponível em: Leishmaniose Tegumentar (LT) — Ministério da Saúde (www.gov.br). Acesso em: 13 de agosto de 2024.

Organização Pan Americana de Saúde. Leishmanioses - Informe epidemiológico das Américas. 1–12 (2022).

Scotti, L. et al. Chemometric studies on natural products as potential inhibitors of the NADH oxidase from Trypanosoma cruzi using VolSurf approach. Molecules, v. 15, n. 10, p. 7363-7377, 2010 Tradução. Disponível em: https://doi.org/10.3390/molecules15107363. Acesso em: 10 de agosto de 2024.

Scotti, L. et al. In-silico Analyses of Natural Products on Leishmania Enzyme Targets. Mini-Reviews in Medical Chemistry, v. 15, p. 253-269, 2015.

Soares-Bezerra, R. J.; Leon, L.; Genestra, M.. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 40, n. 2, p. 139–149, abr. 2004.

1. **AGRADECIMENTOS**

O desenvolvimento desta pesquisa contou com Apoio à Pesquisa e a Pós-Gradução da PROPESQ/UFNT.

1. Voluntário do Programa de Iniciação Científica (PIVIC). Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Centro de Ciências Integradas. e-mail: arthur.arruda@ufnt.edu.br [↑](#footnote-ref-1)
2. Professor orientador. Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Centro de Ciências Integradas. e-mail: danilo.olivier@ufnt.edu.br [↑](#footnote-ref-2)