



PROSPECÇÃO DE AGENTES INIBIDORES PARA A ENZIMA DIHIDROFOLATO REDUTASE - TIMIDILATO SINTASE (DHFR-TS) DE *LEISHMANIA AMAZONENSIS*

SILVA, G. A.¹; OLIVIER, D. S.²

RESUMO

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada causada por parasitas do gênero *Leishmania*, afetando milhões de pessoas globalmente. Os tratamentos disponíveis são tóxicos, caros e têm gerado resistência crescente, especialmente em áreas de baixa renda. Este trabalho tem como objetivo identificar moléculas com potencial inibitório para a enzima bifuncional Dihidrofolato Redutase-Timidilato Sintase (DHFR-TS) de *Leishmania amazonensis*, que é essencial para a biossíntese de nucleotídeos e, portanto, para a sobrevivência do parasita. A metodologia incluiu a modelagem estrutural por homologia da enzima, seguida de simulações de dinâmica molecular para avaliar sua estabilidade. Utilizando a técnica de triagem virtual, foram testados 9.213 compostos do banco de dados DrugBank, buscando inibidores com alta afinidade de ligação ao sítio ativo da enzima. Como resultado, cinco compostos foram selecionados com base em sua afinidade e taxa de sucesso, apresentando energias de ligação entre -10,5 e -8,1 kcal/mol. Estes compostos têm o potencial de inibir a DHFR-TS, bloqueando a replicação do DNA do parasita. O estudo representa um avanço significativo na busca por novos tratamentos para a leishmaniose, com possíveis implicações para futuros testes in vitro.

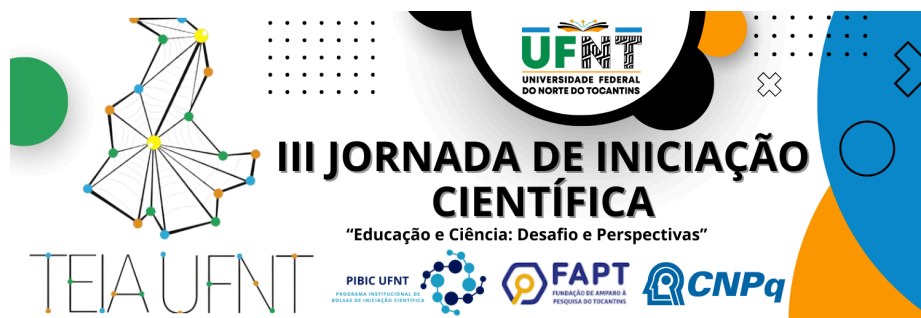
Palavras-chave: Leishmaniose, DHFR-TS, Modelagem Molecular, Triagem Virtual, Inibidores.

I. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada (DTN) causada por parasitas do gênero *Leishmania*, afetando cerca de 15 milhões de pessoas globalmente, com formas cutânea (CL), mucocutânea (ML) e visceral (VL) [14, 5, 11]. Os tratamentos disponíveis, como sais de antimônio pentavalentes e medicamentos

¹ Bolsista do Programa de Iniciação Científica (PIBIC). Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Centro de Ciências Integradas. E-mail: gislaine.silva@ufnt.edu.br

² Orientador e Professor do curso de Licenciatura em Física. Universidade Federal do Norte do Tocantins. E-mail: danilo.olivier@ufnt.edu.br



de segunda linha (anfotericina B, pentamidina, miltefosina e paramomicina), enfrentam limitações devido à toxicidade, altos custos e resistência [11, 12, 6]. A anfotericina B lipossomal, uma opção eficaz, é restrita por seu custo e efeitos adversos, dificultando sua aplicação em países em desenvolvimento [3]. Apesar dos esforços para desenvolver novos medicamentos [14, 5], o progresso é limitado, evidenciando a necessidade de novas quimioterapias [1]. A inibição de enzimas específicas do parasita, uma abordagem comum na indústria farmacêutica [17, 10, 8, 9], juntamente com o reposicionamento de fármacos para reduzir custos e acelerar o desenvolvimento, são estratégias promissoras. Este estudo explorou, por meio de técnicas computacionais, drogas potenciais para inibir a enzima DHFR, cuja inibição impede a biossíntese de timidina e DNA, resultando em morte celular [16, 4].

II. BASE TEÓRICA

Uma via metabólica importante no combate a tripanosomatídeos, como *Leishmania*, é a inibição da diidrofolato redutase (DHFR), que participa da biossíntese de cofatores folato [16]. A DHFR (EC 1.5.1.3) catalisa a redução de diidrofolatos (H₂Fs) em tetraidrofolatos (H₄Fs) utilizando NADPH, essencial para manter as concentrações de folato intracelulares [16, 4]. Nos tripanosomatídeos, um único gene codifica uma enzima bifuncional que contém tanto os domínios DHFR quanto timidilato sintase (TS) [7]. A DHFR-TS é vital para a sobrevivência do parasita, pois o folato é um cofator essencial na biossíntese de nucleotídeos, e sua inibição impacta duas etapas desta via [13]. Ao contrário dos humanos, que possuem enzimas DHFR e TS separadas, essa diferença estrutural torna a enzima do parasita um alvo interessante para agentes antimicrobianos [16]. Medicamentos antifolatos, como metotrexato, trimetoprima e pirimetamina, são utilizados no tratamento de outras infecções [16, 13].



III. OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo a busca por moléculas com potencial ação inibitória contra a enzima Dihidrofolato redutase-timidilato sintase (DHFR-TS) de *Leishmania amazonensis*.

IV. METODOLOGIA

Obtenção do Modelo Estrutural e Dinâmica Molecular

A estrutura da proteína DHFR-TS, não disponível no PDB, foi gerada por modelagem por homologia usando a sequência da UniProt (P16126). O modelo tridimensional foi baseado na estrutura do *Trypanosoma cruzi* (PDB ID: 3IMR), escolhida como template pelo servidor Swiss-Model por sua alta identidade com a proteína alvo.

Para estabilizar a estrutura, foi realizada uma dinâmica molecular com o pacote Amber22 em pH 7,4, utilizando uma caixa octaédrica de água com 15 Å de distância da proteína. O sistema consistiu em 4.055 átomos de proteína e 22.302 moléculas de água, com minimização de energia em duas etapas. O sistema foi aquecido e equilibrado a 298 K, seguido por duas simulações de 100 ns sem restrições, coletando dados a cada 10 ps.

Docking Molecular e Virtual Screening

O *Docking Molecular* prevê a posição e orientação de ligantes em relação a proteínas, permitindo a análise de interações e afinidade de ligação. Neste estudo, o software *AutoDock Vina* foi utilizado para triagem de 9.213 compostos do *DrugBank*, focando em moléculas que interagem com o sítio catalítico da DHFR-TS. As melhores conformações foram selecionadas com base na menor energia de ligação, com 50 moléculas analisadas em 100 simulações individuais para verificar a consistência das conformações energéticas, ranqueando os compostos pela afinidade e estabilidade.



V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Modelagem e Dinâmica Molecular

A identidade entre sequências indica a porcentagem de resíduos idênticos, enquanto o recobrimento avalia a sobreposição entre a proteína modelada e a de referência. A estrutura tridimensional da DHFR-TS foi modelada com base na Dihidrofolato Redutase Timidilato Sintase de *Trypanosoma cruzi* (PDB ID: 3IMR), apresentando 69,22% de identidade, conforme indicado pelo Swiss-Model.

Embora a similaridade fosse alta, o modelo passou por refinamento com simulações de Dinâmica Molecular (DM) de 100 ns cada, para avaliar sua estabilidade. As alterações observadas foram analisadas por RMSD, RMSF, Raio de Giração (RG) e Superfície Acessível ao Solvente (Surf). O RMSD estabilizou-se entre 3,5 Å e 4 Å, enquanto o RMSF apresentou flutuações maiores nos resíduos 200, 300 e 400, que correspondem a regiões de alças, com picos de até 5 Å. A região do sítio ativo (resíduos 390-395) manteve-se estável.

O Raio de Giração oscilou em torno de 26 Å, sem grandes desvios, padrão também observado no SURF. O método de clustering K-means identificou dois grupos principais, com a primeira simulação apresentando 61,2% para o cluster rep.0 e 38,8% para rep.1; na segunda simulação, esses valores foram 90,8% e 9,2%, respectivamente.

Com os representantes obtidos, foi realizada uma triagem virtual com compostos do DrugBank. Pequenas variações nas conformações foram notadas, com um RMSD entre os representantes de 1,694, sugerindo semelhança nas estruturas secundárias, apesar das flutuações térmicas.

Virtual Screening

A busca por compostos inibidores da enzima foi realizada por Virtual Screening e Docking Molecular, utilizando modelos das simulações de Dinâmica Molecular. A biblioteca DrugBank foi analisada em duas etapas: 1) seleção dos 50



compostos com as menores energias de interação e 2) avaliação da taxa de sucesso em 100 simulações independentes. Foram escolhidas 5 moléculas com as menores energias e taxa de sucesso acima de 80% para cada modelo. Os resultados estão resumidos na Tabela 1, que inclui informações sobre os compostos selecionados.

Tabela 1: Tabela combinada dos resultados das triagens visuais, como representativos das duas simulações por dinâmica molecular, renomeados receptor 1 e receptor 2, com compostos repetidos destacados por cores.

-	Classificação	Compostos	Torções	Átomos	Energia (kcal/mol)	ξ (%)
Receptor 1	1	DB12622	2	31	-10,5	100
	2	DB11913	2	38	-10,3	85
	3	DB12513	2	40	-10,2	92
	4	DB11829	2	35	-9,9	100
	5	DB06888	0	30	-9,8	100
Receptor 2	1	DB12622	2	31	-10,4	100
	2	DB12513	3	40	-9,5	98
	3	DB11913	2	38	-9,5	98
	4	DB06888	0	30	-8,7	100
	5	DB11829	2	35	-8,5	100

Alguns desses compostos têm características que favorecem a ligação a regiões específicas da proteína, garantindo a estabilidade da conformação e do sítio ativo, o que ajuda na inibição da DHFR-TS. As energias de afinidade variam de -10,5 a -9,8 kcal/mol no primeiro modelo e de -10,4 a -8,5 kcal/mol no segundo, com taxas de sucesso superiores a 80%. As moléculas contêm entre 30 e 40 átomos pesados e até 3 ligações rotacionais, afetando suas possibilidades conformacionais.

VI. CONCLUSÃO



A leishmaniose, doença tropical causada por parasitas do gênero *Leishmania*, afeta milhões de pessoas em suas formas cutânea, mucocutânea e visceral, e os tratamentos existentes enfrentam problemas como toxicidade, altos custos e resistência. A inibição da enzima DHFR-TS, essencial para a síntese de folatos nos parasitas, surge como uma estratégia promissora, pois é um alvo específico na *Leishmania amazonensis*, diferente das enzimas nos humanos. Este estudo, dividido em três etapas—modelagem da estrutura da DHFR-TS, simulação por Dinâmica Molecular e triagem virtual—identificou 10 compostos promissores, com quatro se destacando em ambos os testes, oferecendo insights para o desenvolvimento de medicamentos mais eficazes contra a leishmaniose.

VII. REFERÊNCIAS

- [1] BRINDHA, J., BALAMURALI, M. M., and CHANDA, K. **An overview on the therapeutics of neglected infectious diseases—leishmaniasis and chagas diseases**. *Front. Chem.* 9 (2021), 622286.
- [2] **Drug discovery strategies for neglected tropical diseases**: Repurposing knowledge, mechanisms and therapeutics to increase discovery efficiency. *Neglected Tropical Diseases: Drug Discovery and Development* (2019), 1–13.
- [3] FRÉZARD, F., AGUIAR, M. M. G., FERREIRA, L. A. M., RAMOS, G. S., SANTOS, T. T., BORGES, G. S. M., VALLEJOS, V. M. R., and DE MORAIS, H. L. O. **Liposomal amphotericin b for treatment of leishmaniasis: From the identification of critical physicochemical attributes to the design of effective topical and oral formulations**. *Pharmaceutics* 15 (2023), 99.
- [4] GILBERT, I. H. **Inhibitors of dihydrofolate reductase in leishmania and trypanosomes**. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 1587 (2002), 249–257.
- [5] GOURI, V., UPRETI, S., and SAMANT, M. **Evaluation of target-specific natural compounds for drug discovery against leishmaniasis**. *Parasitol. Int.* 91 (2022), 102622.
- [6] GUPTA, D., SINGH, P. K., YADAV, P. K., NARENDER, T., PATIL, U. K., JAIN, S. K., and CHOURASIA, M. K. **Emerging strategies and challenges of molecular**



therapeutics in antileishmanial drug development. *Int. Immunopharmacol.* 115 (2023), 109649.

[7] IVANETICH, K. M., and SANTI, D. V. **Thymidylate synthase-dihydrofolate reductase in protozoa.** *Exp. Parasitol.* 70 (1990), 367–371.

[8] **Innovation in neglected tropical disease drug discovery and development.** *Infectious Diseases of Poverty* 7, 1 (2018), 1–9.

[9] **Metal compounds against neglected tropical diseases.** *Chemical Reviews* 119, 3 (2019), 730–796.

[10] **Nanopharmaceuticals as a solution to neglected diseases: Is it possible?** *Acta Tropica* 170, 170 (2017), 16–42.

[11] SALARI, S., BAMOROVAT, M., SHARIFI, I., and ALMANI, P. G. N. **Global distribution of treatment resistance gene markers for leishmaniasis.** *J. Clin. Lab. Anal.* 36 (2022), e24599.

[12] SASIDHARAN, S., and SAUDAGAR, P. **Leishmaniasis: Where are we and where are we heading?** *Parasitol. Res.* 120 (2021), 1541–1554.

[13] SHAMSHAD, H., BAKRI, R., and MIRZA, A. Z. **Dihydrofolate reductase, thymidylate synthase, and serine hydroxy methyltransferase: Successful targets against some infectious diseases.** *Mol. Biol. Rep.* 49 (2022), 6659–6691.

[14] SONI, M., and PRATAP, J. V. **Development of novel anti-leishmanials: The case for structure based approaches.** *Pathogens* 11 (2022), 950.

[15] **Use of artificial intelligence and machine learning for discovery of drugs for neglected tropical diseases.** *Frontiers in Chemistry* 9, 9 (2021), 1–15.

[16] VICKERS, T. J., and BEVERLEY, S. M. **Folate metabolic pathways in leishmania.** *Essays Biochem.* 51 (2011), 63–80.

[17] **In silico chemogenomics drug repositioning strategies for neglected tropical diseases.** *Current Medicinal Chemistry* 26, 26 (2018), 4355–4379.

VIII. AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Tocantins – FAPT – Brasil.

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