

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Prospecção virtual, dinâmica molecular e seleção de potenciais inibidores complexados com tripanotona redutase do *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*.

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Kellen Cristina Silva Marques

Uberlândia - MG

Junho/2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Prospecção virtual, dinâmica molecular e seleção de potenciais inibidores complexados com tripanotona redutase do *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*.

Kellen Cristina Silva Marques

Prof. Dr. Nilson Nicolau Júnior

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia - MG

Junho/2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Prospecção virtual, dinâmica molecular e seleção de potenciais inibidores complexados com tripanotona redutase do *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*.

Kellen Cristina Silva Marques

Aprovado pela Banca Examinadora em: ___/___/____ Nota: _____

Nome e assinatura do Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia, 16 de junho de 2023

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho aos meus pais, principalmente a minha mãe que nunca mediu esforços para me ajudar, ao meu querido irmão que tanto admiro, as minhas avós e aos amigos que sempre estiveram comigo, obrigada por tudo!

Por fim, agradeço ao meu orientador Dr. Nilson que sempre me apoiou, ao IBTEC, CAPES e FAPEMIG por ter contribuído para a minha formação profissional.

RESUMO

Na família *Trypanosomatidae*, existem dois principais protozoários que causam infecção parasitária, uma é ocasionada pelo parasita *Trypanosoma cruzi*, considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) uma das doenças negligenciadas mais prejudiciais da América Latina, e a outra pelo parasita *Trypanosoma brucei* causando a doença do sono. Na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, apenas 5 a 10% dos indivíduos mostram alguns sintomas da doença, logo após, acontece a fase indeterminada que se caracteriza pela ausência de sinais e sintomas. Já a doença do sono afeta países africanos, na qual cerca de 70 milhões de pessoas tem o risco muito alto de contrair infecção a tripanossomíase humana africana (HAT), sua doença é caracterizada pelos sintomas de alterações mentais, dificuldade de concentração e estado de sonolência terminal. Ambas as doenças são bastante prejudiciais na qualidade de vida, pois os medicamentos disponíveis para o tratamento são considerados viáveis apenas para a fase aguda, além de apresentar vários efeitos colaterais. A enzima tripanotiona redutase é extremamente importante para o desenvolvimento do parasita devido a catalisação da tripanotiona dissulfeto à tripanotiona ditiol. Este processo ativa uma cascata de eventos que culmina na neutralização das espécies reativas de oxigênio. O que por sua vez protege o parasita do estresse oxidativo possibilitando assim, seu desenvolvimento. Dessa forma, a enzima é um possível alvo para o planejamento de inibidores na doença de Chagas e na doença do sono, devido a sua diferença estrutural em relação a glutathiona redutase, uma enzima com a mesma função nos humanos, que permite uma inibição seletiva da tripanotiona redutase. Os inibidores em potencial, indicados por esse estudo *in vitro* no desenvolvimento de fármacos foram o NuBBE 1479 e o CL 49068759.

Palavras-chaves: *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, bioinformática, *drug discovery*, parasitologia.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	6
2. JUSTIFICATIVA	9
3. OBJETIVOS	10
3.1 Objetivo Geral	10
3.2 Objetivos Específicos	10
4. MATERIAIS E MÉTODOS	10
4.1 Geração do modelo baseado em forma	10
4.2 Preparação do banco de dados	11
4.3 Triagem e docking	12
4.4 Análise de Propriedades farmacocinéticas in silico	12
4.5 Dinâmica Molecular	12
4.6 Análise de Estabilidade Complexa Pós-Dinâmica	13
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
5.1 Geração do modelo baseado em forma	13
5.2 Preparação do banco de dados	15
5.3 Triagem e docking	15
5.4 Análise de Propriedades farmacocinéticas in silico	18
5.5 Dinâmica Molecular	20
5.6 Análise de Estabilidade Complexa Pós-Dinâmica	20
6. CONCLUSÃO	22
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

1. INTRODUÇÃO

Os cinetoplastídeos são um grupo de protozoários flagelados que podem causar doenças em regiões de clima tropical e subtropical do mundo, doenças essas comumente negligenciadas. Entre essas, a tripanossomíase humana africana (HAT) ou doença do sono, causada pela *Trypanosoma brucei*; a doença de chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi* e a leishmaniose causada por infecção de *Leishmania*. Essas doenças ocorrem em áreas tropicais e subtropicais que causam em torno de 100.000 mortes por ano. (STUART et al., 2008)

A Doença de Chagas é bastante comum na América Latina devido a poucos métodos preventivos de tratamento, é considerada prejudicial e de risco, sendo muitas vezes negligenciada pela população e agentes de saúde (SÁNCHEZ-VALDÉZ et al., 2017). Essa doença é conhecida como tripanossomíase americana, além disso, é uma infecção parasitária ocasionada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* da ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* (GALVÃO, 2014). Os seus vetores são insetos da ordem *Heteroptera*, família *Reduviidae*, conhecidos como triatomíneos, apelidados de “barbeiros” ou “chupanças” (TARTAROTTI; OLIVEIRA-AZEREDO; CERON, 2004). A transmissão da doença pode ser via congênita, pela transfusão de sangue e contaminação pelo vetor, que ocorre através de feridas na pele ou mucosas, pela via oral e pela ingestão de alimentos contaminados. (DIAS; NETO, 2011).

De acordo com o Ministério da Saúde (2022), existem cerca de 1,9 a 4,6 milhões de pessoas infectadas com a Doença de Chagas no Brasil, sendo as regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste as que apresentam maiores taxas de subíndice para Chagas. Além disso, essa doença parasitária é a quarta causadora de mortes por doenças infecciosas no país, sendo que nos últimos 10 anos, 4 mil óbitos em média foram notificados a cada ano. Na América Latina, são cerca de 6 milhões de pessoas infectadas, com novos 30 mil casos anuais, causando cerca de 14 mil mortes por ano.

O parasita é transmitido pelas fezes do barbeiro, na qual se encontram os tripomastigotas (forma alongada do protozoário). A contaminação ocorre quando o barbeiro se alimenta do sangue do indivíduo, depositando as fezes na pele. Devido a picada o indivíduo acaba coçando o local, levando os tripomastigotas para ferida onde ocorrerá a invasão de células próximas, dentro das quais se diferenciam em amastigotas intracelulares que se multiplicam por fissão binária. O amastigota entra novamente no ciclo celular diferenciando em formas tripomastigotas delgadas,

que podem invadir células adjacentes, sendo liberados na corrente sanguínea e infectando várias células de vários órgãos e tecidos, ao infectar essas novas células podem se diferenciar novamente, tornando-se amastigotas. Os barbeiros são infectados quando ingerem um parasita contendo sangue de um humano ou animal infectado. Os tripomastigotas sofrem transformações morfológicas e fisiológicas no intestino médio do vetor e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos infecciosos, completando o ciclo de vida. (STUART et al., 2008; TYLER; OLSON; ENGMAN, 2003)

Na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, apenas 5 a 10% dos indivíduos mostram alguns sintomas da doença, logo após, acontece a fase indeterminada que se caracteriza pela ausência de sinais e sintomas. Em geral, cerca de 30% das pessoas infectadas pelo protozoário no período entre 10 a 20 anos desenvolvem miocardite crônica (TARTAROTTI; OLIVEIRA-AZEREDO; CERON, 2004) e cerca de 10% das pessoas infectadas desenvolvem problemas de saúde, como, lesões cardíacas e digestivas, que resultam em cardiopatia chagásica crônica, esofagopatia e colopatia (WANDERLEY; CORRÊA, 1995), afetando, principalmente, a população rural e pessoas de baixa renda, porém, com a migração da população para a cidade vem transformando em uma endemia urbana-rural (VINHAES; DIAS, 2000). O perfil epidemiológico da pessoa contaminada, na maioria das vezes, é de um adulto, do sexo feminino, contraído por via vetorial, com baixa escolaridade e possui origem rural ou de bairros periféricos em municípios (OLIVEIRA et al., 2006).

A tripanossomíase africana humana (HAT) ou doença do sono é causada pelo protozoário *Trypanosoma brucei*, sendo duas subespécies responsáveis pela doença, que são *Trypanosoma brucei gambiense* e *Trypanosoma brucei rhodesiense*, também existe a *Trypanosoma brucei brucei* que é apenas parasita de animais mamíferos domésticos e silvestres, não sendo patogênico para humanos (STUART et al., 2008; FRANCO et al., 2014). A HAT é uma doença endêmica nos países africanos, cerca de 70 milhões de pessoas vivem em níveis de riscos de sua infecção e mais de 5 milhões de pessoas moram em áreas com nível muito alto de contraí-la (FRANCO et al., 2014).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2023) cerca de 522 casos de infecção por HAT são notificados anualmente, sendo o *T. b. gambiense* encontrado em 24 países da África, representando 92% dos casos notificados, causando uma doença crônica. Além disso, é uma doença silenciosa, na qual o indivíduo pode estar infectado por meses ou até por anos sem sintomas, e, quando surge, a doença está extremamente avançada, afetando o sistema nervoso

central. Já o *T. b. rhodesiense* é encontrado em 13 países africanos e corresponde por 8% dos casos, além de ser uma doença aguda, seus sintomas surgem em algumas semanas e se desenvolve com rapidez em vários órgãos, principalmente o cérebro.

Os primeiros sintomas começam no local da picada da mosca tsé-tsé (*Glossina spp*), vector da doença de HAT, chamada de cancro tripanossômico, na qual ocorre uma reação local acompanhada por linfadenopatia regional. Após, na primeira fase da doença, os sintomas são discretos, podendo acontecer febre, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia e uma leve erupção cutânea. Na segunda fase da doença, que se inicia semanas na *rhodesiense* e meses na *gambiense*, ocorre encefalopatia crônica, associada a cefaleia e alterações mentais, além de dificuldade de concentração e estado de sonolência terminal. (STICH; ABEL; KRISHNA, 2002).

O parasita sobrevive na corrente sanguínea do hospedeiro como tipos de formas morfolologicamente delgadas, conhecido como tripomastigotas metacíclico, na qual essas células expressam glicoproteínas de superfície variável (VSGs) que tem como objetivo evitar a resposta imune dos mamíferos. Conforme o número de parasitas aumenta na corrente sanguínea, ocorre a diferenciação para formas morfolologicamente atarracadas, que são pré-adaptadas para transmissão às moscas tsé-tsé. Após isso, as moscas ingerem essa diferenciação dos protozoários ao picar a pessoa infectada, assim, ocorre a substituição do revestimento VSG por um composto de prociclinas, ademais, depois da proliferação no intestino médio da mosca tsé-tsé os tripanossomas migram para a glândula salivar e ligam-se como forma epimastigotas. Por fim, o parasita adquire novamente um revestimento VSG, transformando novamente em tripomastigotas metacíclicos, sendo liberado no lúmen da glândula salivar da mosca para inocular um novo hospedeiro (MATTHEWS, 2005).

O tratamento da doença com drogas tripanossomicidas, como, benznidazol e nifurtimox, mostra um excelente resultado em pacientes na fase aguda, porém, essas drogas provocam vários efeitos colaterais e não são eficazes para casos crônicos (KROPF, 2009), assim, o tratamento para a infecção é apenas vantajoso para as fases iniciais e não há tratamento efetivo para fase crônica avançada (DIAS, 2007). O medicamento nifurtimox está proibido no Brasil e em vários outros países devido à sua genotoxicidade, efeitos sob sistema nervoso central e gastrointestinal, e, embora seus efeitos apresentem semelhança ao benznidazol, o nifurtimox provoca efeitos mais enfatizados e graves. Além de serem medicamentos que apresentam alta toxicidade, na maioria das vezes não conseguem curar a infecção, uma vez que, na fase aguda a cura

parasitológica é de 40-70% com o tratamento de benznidazol (JÚNIOR, 2018). Assim sendo, existe a extrema necessidade de um novo composto farmacológico para o combate da Doença de Chagas que seja altamente eficaz e com baixa toxicidade.

Há no protozoário *Trypanosoma*, uma enzima fundamental no combate ao estresse oxidativo, a tripanotiona redutase (TR) que regenera o antioxidante tripanotiona (BRAGA, 2012). Essa enzima é responsável pelo crescimento e desenvolvimento do parasita, sendo essencial para a sua sobrevivência (SERAFIM, 2016).

Essa enzima faz a catalisação da tripanotiona dissulfeto reduzindo-a para tripanotiona ditiol, processo dependente de NADPH, fazendo que ocorra uma cascata de eventos para neutralizar as espécies reativas de oxigênio, proporcionando um ambiente redutor no interior do parasita, protegendo-o do estresse oxidativo. Desse modo, tal enzima é um alvo interessante para desenvolvimento de novos fármacos devido a sua diferença estrutural em relação a glutationa redutase, uma enzima com a mesma função nos humanos, que pode possibilitar a inibição seletiva da tripanotiona redutase. (DE OLIVEIRA et al., 2008).

2. JUSTIFICATIVA

Estudos do Ministério da Saúde (2022) apontam que existem 6 milhões de pessoas infectadas na América Latina com a Doença de Chagas, causando 14 mil mortes por ano, já no Brasil, existem cerca de 1 milhão de pessoas infectadas por *Trypanosoma cruzi*. A doença de Chagas é um grave problema de saúde que acarreta prejuízos para o desenvolvimento social e econômico do país, e a sua prevenção, controle e tratamento apresenta um grande desafio mundial, devido à ausência de fármacos que controlem o centro dessa doença. Da mesma forma que a doença do sono (HAT), causada pelo mesmo gênero *Trypanosoma*, que acarreta problemas de saúde para países emergentes do continente africano. Além disso, o repertório de fármacos disponíveis é limitado e inadequado, visto que os medicamentos utilizados são apenas eficazes durante a fase aguda, portanto, o desenvolvimento de novos fármacos é extremamente necessário, dado que, as drogas que estão disponíveis para os pacientes infectados com o *T. cruzi* e *T. brucei* possuem alto nível de toxicidade, causando vários efeitos colaterais, falta de eficácia para tratamentos crônicos e não apresenta cura significativa para os casos tratados.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Avaliar o potencial da tripanotona redutase do *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei* como alvo para desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas e HAT, buscando potenciais inibidores da enzima tripanotona redutase para sua estrutura tridimensional da enzima por meio da construção de modelo baseado em forma, triagem virtual e ancoragem molecular. Ademais, por meio de *docking* molecular compreender a estabilidade destes complexos por meio simulações de dinâmica molecular.

3.2 Objetivos Específicos

- Construir um modelo baseado na forma da estrutura dos inibidores selecionados e extraídos de um complexo com a estrutura tripanotona redutase.
- Realizar uma busca por meio de triagem virtual em bibliotecas de confôrmeros de pequenos ligantes.
- Estudar a interação receptor-ligante, entre o tripanotona redutase e os compostos selecionados na triagem virtual, por meio da técnica de ancoragem molecular.
- Validar os resultados da ancoragem molecular por meio de funções de pontuação e convergência dos compostos na interação entre o tripanotona redutase e os ligantes.
- Avaliar os potenciais propriedades tóxicas, *in silico*, dos compostos selecionados.
- Realizar dinâmica molecular dos principais inibidores selecionados da ancoragem.
- Realizar análise das interações de ligações de hidrogênio entre proteína e os compostos selecionados.

4. MATERIAIS E MÉTODO

4.1. Geração do modelo baseado em forma

A construção do modelo baseado em forma permite o planejamento de drogas sintéticas, por meio da análise da região da molécula, na qual, o ligante está intimamente relacionado com seu receptor. Assim, o modelo foi gerado a partir de inibidores conhecidos na literatura, que

abrangem as características necessárias para a inibição da evolução do parasita. A extração do inibidor foi realizada por meio do banco de dados do Protein Data Bank (PDB) (BERMAN, 2000), em que, o código de identificação é ID: 6OEZ, no organismo *Trypanosoma brucei* (DE GASPARO et al, 2019). Além disso, os inibidores (ID: 4NEW) no organismo *Trypanosoma cruzi* apresentam características promissoras para o desenvolvimento de uma nova droga anti-chagas (PERSCH et al, 2014). Essas moléculas foram analisadas de acordo com os resultados obtidos pelo *score* final submetido ao software vROCS 3.2.0.4, OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NH (HAWKINS; SKILLMAN; NICHOLLS, 2007).

4.2. Preparação do banco de dados

O modelo construído a partir do programa vROCS foi usado na triagem virtual de bibliotecas de compostos originários de cinco bancos de dados. O primeiro deles conhecido pela característica de moléculas oriundas de produtos naturais brasileiros (NuBBE). O segundo banco de dados chamado FDA que possuem as drogas conhecidas na literatura, e, também, o banco ZINC (IRWIN et al., 2012), conhecido como DrugsNow de posse de aproximadamente 10 milhões de compostos, por último, compostos originários de dois bancos de dados da Chembridge Corporation, San Diego, Califórnia, mais especificamente as bibliotecas DIVERSetTMEXP e CL. Essas bibliotecas foram submetidas ao software FILTER do OMEGA 2.5.1.4, OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM (HAWKINS et al., 2010). O programa FILTER é responsável por realizar de forma rápida a filtragem e seleção dos compostos, por meio de uma combinação de cálculos de propriedades físicas e estudo de grupos funcionais. Ao utilizá-lo é eliminado os compostos indesejáveis, como aqueles que apresentam funções tóxicas, com baixa biodisponibilidade oral, com alta facilidade de formar ligações covalentes com o alvo e compostos que podem causar interferências durante o ensaio experimental.

Os compostos resultantes dessa filtragem foram submetidos ao programa QUACPAC 1.6.3.1, OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM (<http://www.eyesopen.com>), com o objetivo de gerar compostos com cargas precisas. Assim, o QUACPAC busca e enumera o pKa, que apresenta compatibilidade com o sangue (pH = 7,4), e os tautômeros de cada composto, visando a obtenção das protonações corretas.

Por fim, as bibliotecas de compostos foram submetidos à geração de confôrmeros a partir do programa OMEGA. Por meio dele é possível obter os bancos de dados de multi-confôrmeros

bioativos com alta rapidez e credibilidade. Essa etapa é de extrema importância para resultados de modelos farmacofóricos satisfatórios, durante a triagem virtual, pois esses dependem das conformações bioativas.

4.3. Triagem e docking

A triagem foi realizada a partir do software ROCS 3.2.1.4 Software, Santa Fe, NM (HAWKINS et al., 2010) e o modelo validado, empregando os scores *Tanimoto combo*, *color force field: Implicit Mills-Dean* analisando-se os 500 melhores resultados. Os resultados foram visualizados por meio do software VIDA 4.3.0 Software, Santa Fe, NM.

Compostos dos Bancos de dados ZINC (bibliotecas Drugs Now e FDA), Chembridge (bibliotecas EXP e CL) e NuBBE (banco de dados de produtos naturais), previamente selecionados por triagem virtual para a tripanotona redutase de *Trypanosoma brucei*, foram atracados a proteína TR de *Trypanosoma cruzi* por meio da técnica de *docking* molecular.

As bibliotecas de compostos que foram geradas a partir da busca pelo modelo foram submetidas à técnica de ancoragem molecular. Dessa forma, essa etapa foi realizada utilizando o programa GOLD (VAN ZANTEN, 2012) que avalia a ancoragem flexível entre as proteínas e os ligantes. A partir de um algoritmo genético, esse programa é responsável por encontrar soluções por meio de ancoragem ramificando inúmeras cópias de modelos flexíveis do ligante no sítio ativo do receptor, redefinindo segmentos dessa cópia de forma aleatória até que seja gerado um conjunto convergido de estruturas. O algoritmo de pontuação e ranqueamento usado foi o CHEMPLP.

4.4. Análise de Propriedades farmacocinéticas *in silico*

Após os compostos serem avaliados na ancoragem, o software online pkCSM (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015) estimou as características principais de propriedades farmacocinéticas, sendo elas absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) para manifestar modelos de regressão e classificação preditivos. Essa etapa é de importante aspecto para que seja anunciado se, os potenciais inibidores em vista, possuirão os parâmetros ideais para seleção de drogas, de acordo com o organismo humano.

4.5 Dinâmica Molecular

Os dois melhores compostos (melhor score de *docking*) das bibliotecas estudadas foram submetidos às simulações de dinâmica molecular por meio do programa GROMACS 2016. A parametrização de cada ligante será realizada no servidor SwissParam, e a dinâmica molecular de cada complexo proteína-ligante será simulado por 100 ns usando o campo de força CHARMM27 com o modelo de água TIP3P. As interações eletrostáticas serão calculadas utilizando malha de partículas Ewald (PME) para eletrostática de longo alcance.

4.6 Análise de Estabilidade Complexa Pós-Dinâmica

Para avaliar a estabilidade do ligante, os resultados de dinâmica molecular serão avaliados usando ferramentas fornecidas pelo programa GROMACS, na qual, será realizada a análise de número de ligações de hidrogênio entre proteína e ligante.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Geração do modelo baseado em forma

Com o auxílio do programa vROCS 3.2.1.4, OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NH (HAWKINS et al., 2010), os ligantes retirados das proteínas 4NEW e 6OEZ do Protein Data Bank (PDB) foi utilizado para analisar as interações intermoleculares dos inibidores e da TR e, logo em seguida, construir um modelo baseado em forma (Figura 1 e 2).

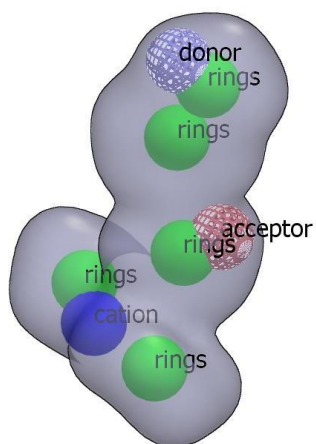


Figura 1: Modelo baseado em forma do ligante *Trypanosoma cruzi* (ID: 4NEW), construído pelo software vROCS. As esferas verdes representam as interações hidrofóbicas, as azuis de doador de elétrons na qual representa as ligações de hidrogênio, em vermelho são os aceptores de elétrons e o envoltório em cinza representa o corpo do modelo baseado em forma.

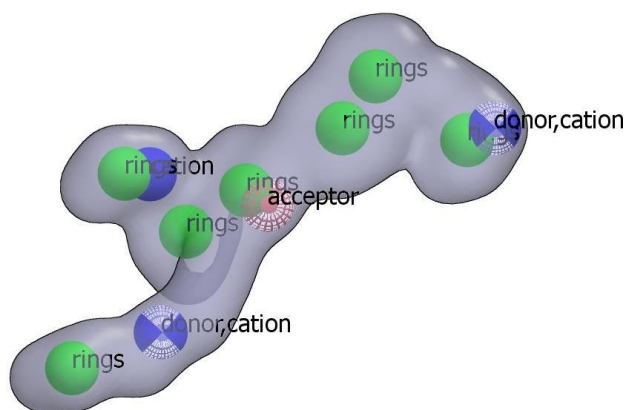


Figura 2: Modelo baseado em forma do ligante *Trypanosoma brucei* (ID: 6OEZ), construído pelo software vROCS. As esferas verdes representam as interações hidrofóbicas, as azuis de doador de elétrons na qual representa as ligações de hidrogênio, em vermelho são os aceptores de elétrons e o envoltório em cinza representa a corpo do modelo baseado em forma.

Portanto, por meio do software vROCS foi possível avaliar as interações dos modelos. O modelo baseado em forma do ligante *Trypanosoma cruzi* (Fig. 1) possui 5 interações hidrofóbicas, um doador de elétrons e um acceptor de hidrogênio. Já no modelo baseado em forma do ligante *Trypanosoma brucei* (Fig. 2), temos 7 interações hidrofóbicas, 2 doadores de elétrons e um acceptor de hidrogênio.

5.2 Preparação de bancos de dados de confômeros

Após construir um modelo baseado em forma, foram selecionadas bibliotecas de compostos originárias de cinco bancos de dados comerciais diferentes que são CL, EXP, Drugs Now, ZINC e o NuBBE. As cinco bibliotecas de compostos passaram por uma filtragem utilizando o programa FILTER na qual, esse programa utiliza cálculos de propriedades físicas e conhecimento de grupos funcionais para selecionar compostos e remover moléculas indesejáveis e tóxicas, além de considerar o estado de protonação e desprotonação e a geração de tautômeros e confôrmeros. Em seguida, a filtragem desses compostos foi submetida ao programa OMEGA que gera confômeros bioativos altamente eficazes e precisos.

5.3 Triagem e Docking

A triagem foi realizada com os bancos de dados CL, EXP, Drugs Now, ZINC e NuBBE utilizando o programa ROCS, a qual selecionou as 500 melhores moléculas de cada banco de dados com base na função de pontuação *TanimotoCombo*, que avalia a posição de encaixe de cada ligante no modelo baseado em forma e as propriedades químicas do modelo.

Após, as melhores moléculas selecionadas da triagem foram submetidas ao programa GOLD e pontuadas pelo algoritmo CHEMPLP, na qual essa pontuação avalia as diferentes formas e posicionamentos que um ligante pode apresentar no local de ligação do sítio receptor. Assim, foi realizado um ranking dos 2 melhores resultados de cada banco de dados por essa pontuação.

Tabela 1 – Ranking de moléculas com melhor pontuação CHEMPLP na ancoragem molecular dos bancos de dados no organismo *Trypanossoma brucei*.

Ranking	Ligante	CHEMPLP
1°	NuBBE_1479	81.13

2°	ZINC_724990	80.77
3°	EXP_7967065	80.46
4°	EXP_7730009	80.11
5°	FDA_35328014	79.94
6°	CL_54245067	79.69
7°	ZINC_77970406	79.19
8°	NuBBE_981	77.90
9°	CL_49068759	77.75
10°	FDA_19632618	77.67

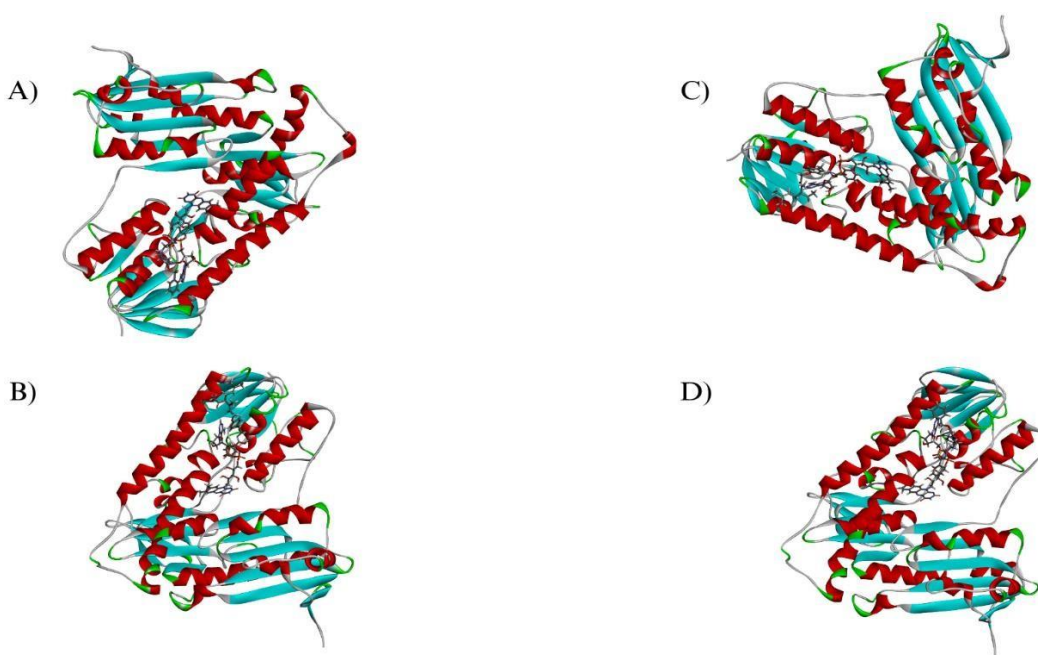
Fonte: Autoria própria (2023)

Tabela 2 - Ranking de moléculas com melhor pontuação CHEMPLP na ancoragem molecular do banco de dados ZINC no organismo *Trypanosoma cruzi*.

Ranking	Ligante	CHEMPLP
1°	EXP_7640372	83.83
2°	CL_21812616	81.92
3°	NuBBE_2162	81.70
4°	FDA_84758479	80.83
5°	CL_49068759	80.02
6°	NuBBE_1479	79.95
7°	FDA_643153	79.95
8°	EXP_5912668	79.82
9°	ZINC_5603065	79.88
10°	ZINC_37276608	79.57

Fonte: Autoria própria (2023)

Os ligantes 1479 e o 49068759, respectivamente dos bancos de dados NuBBE e CL estão presente nos top dez do ranking tanto do organismo *Trypanosoma brucei* quanto no organismo



5.4 Análise de propriedades farmacocinéticas *in silico*

Os dois compostos de cada organismo com as melhores pontuações de cada banco de dados foram avaliados pelo servidor pkCSM para analisar as propriedades farmacocinéticas, com o objetivo de avaliar a toxicidade dos compostos com potencial atividade farmacológica. Sendo assim, foram avaliados: a toxicidade AMES, na qual avalia o potencial mutagênico do composto em cepas de bactérias, sendo considerado um método extremamente importante na avaliação da segurança de compostos; a hepatotoxicidade, referente ao potencial do determinado composto de provocar danos ao fígado; os inibidores dos genes hERG I e II, referentes a inibição dos canais de potássio que pode causar desenvolvimento da síndrome do QT longo adquirido, ocasionando arritmias ventriculares fatais; por último, a dose máxima tolerável em humanos, na qual fornece o valor de dose tóxica de um determinado composto em humanos em que valores acima de 0,477 log (mg/Kg/dia) são considerados altos, ou seja, a dose necessária pode ser tóxico para humanos.

Na tabela abaixo apresenta os resultados referente às moléculas do banco de dados ZINC em comparação a tripationa redutase. As duas últimas moléculas, ZINC_05603065 e ZINC_00724990, apresentaram positivo para AMES toxicidade, na qual a ZINC_05603065 apresentou também uma alta dose máxima tolerável sendo considerado uma possível dose tóxica, e o ZINC_00724990 e ZINC_77970406 foram positivo para hepatotoxicidade. Todas apresentaram inibição do hERG II, ou seja, ocorre a inibição dos canais de potássio. Portanto, a melhor molécula referente aos resultados é a ZINC_37276608.

Tabela 3 – Resultados pkCSM do banco de dados ZINC

Código ZINC	AMES toxicidade	Hepatotoxi cidade	hERG I inibidor	hERG II inibidor	Dose Máxima Tolerável (humano) Log
37276608	Não	Não	Não	Sim	0.294
77970406	Não	Sim	Não	Sim	0.329
05603065	Sim	Não	Não	Sim	0.605
00724990	Sim	Sim	Não	Sim	0.175

Fonte: Autoria própria (2023)

Os resultados referentes às moléculas do banco de dados EXP são apresentados na tabela abaixo. A molécula 7730009 apresentou positivo para AMES toxicidade e hepatotoxicidade, a molécula 7967065 também apresentou positivo para hepatotoxicidade. Por último, a molécula

5912668 apresentou AMES toxicidade. Ambas inibem os canais de potássio em relação ao hERG II. Assim, a melhor molécula desse resultado foi a 7640372.

Tabela 4 - Resultados pkCSM do banco de dados EXP

Código EXP	AMES toxicidade	Hepatotoxicidade	hERG I inibidor	hERG II inibidor	Dose Máxima Tolerável (humano) Log
7730009	Sim	Sim	Não	Sim	0.175
7640372	Não	Não	Não	Sim	0.665
7967065	Não	Sim	Não	Sim	-0.047
5912668	Sim	Não	Não	Sim	0.383

Fonte: Autoria própria (2023)

A tabela abaixo apresenta os resultados referente às moléculas do banco de dados CL em comparação a tripartitiona redutase. Ambas as três moléculas apresentaram hepatotoxicidade e inibição do hERG II. E a última apresentou uma dose alta tolerável.

Tabela 5 - Resultados pkCSM do banco de dados CL

Código CL	AMES toxicidade	Hepatotoxicidade	hERG I inibidor	hERG II inibidor	Dose Máxima Tolerável (humano) Log
54245067	Não	Sim	Não	Sim	0.072
49068759	Não	Sim	Não	Sim	0.204
21812616	Não	Sim	Não	Sim	0.481

Fonte: Autoria própria (2023)

Os resultados referentes às moléculas do banco de dados NuBBE são apresentados na tabela abaixo. Apenas a molécula NuBBE_981 apresentou hepatotoxicidade, além disso, a molécula NuBBE_2162 teve log alto para a dose máxima tolerável, podendo ter a capacidade de ser tóxica para o organismo. Portanto, a melhor molécula é a NuBBE_1479 devido que não apresentou toxicidade, além de estar presente no melhor ranking dos 2 organismos. Porém, todas apresentam inibição dos canais de potássio devido ao hERG II.

Tabela 6 - Resultados pkCSM do banco de dados NuBBE

Código NuBBE	AMES toxicidade	Hepatotoxicidade	hERG I inibidor	hERG II inibidor	Dose Máxima Tolerável
---------------------	------------------------	-------------------------	------------------------	-------------------------	------------------------------

					(humano) Log
2162	Não	Não	Não	Sim	0.639
981	Não	Sim	Não	Sim	0.421
1479	Não	Não	Não	Sim	0.374

Fonte: A autoria própria (2023)

Os resultados referentes às moléculas do banco de dados FDA são apresentados na tabela abaixo. Ambas as moléculas apresentaram hepatotoxicidade e apenas a molécula ZINC_19632618 não apresentou AMES toxicidade, porém teve um log alto para a dose máxima tolerável, sendo possivelmente uma dose tóxica para o organismo humano. Ambas apresentam inibidor do hERG II.

Tabela 7 - Resultados pkCSM do banco de dados FDA

Código FDA	AMES toxicidade	Hepatotoxi cidade	hERG I inibidor	hERG II inibidor	Dose Máxima Tolerável (humano) Log
35328014	Sim	Sim	Não	Sim	0.435
19632618	Não	Sim	Não	Sim	0.644
84758479	Sim	Sim	Não	Sim	0.356
643153	Sim	Sim	Não	Sim	0.305

Fonte: A autoria própria (2023)

5.5. Dinâmica Molecular

Os compostos 1479 e o 49068759, respectivamente das bibliotecas estudadas NuBBE e CL foram submetidos às simulações de dinâmica molecular por meio do programa GROMACS. A dinâmica molecular fornece informações importantes para o planejamento de fármacos, devido por ser uma técnica computacional para o estudo de macromoléculas biológicas que pode ser utilizado para analisar o comportamento dinâmico microscópico para o entendimento das interações ligante-receptor e potenciais inibidores. (NAMBA, A. M., et al, 2008).

5.6 Análise de Estabilidade dos Complexos Pós-Dinâmica

Os compostos ligados com os seus respectivos organismos devido às simulações de dinâmica molecular foram submetidas à simulação de ligações de hidrogênio, sendo calculadas usando g_hbond do GROMACS em toda simulação na qual faz as análises das ligações de hidrogênio entre os possíveis doadores e aceptores. A análise de ligação de hidrogênio é extremamente

importante para o planejamento de fármacos devido ao seu papel na interação do hidrogênio com o fármaco.

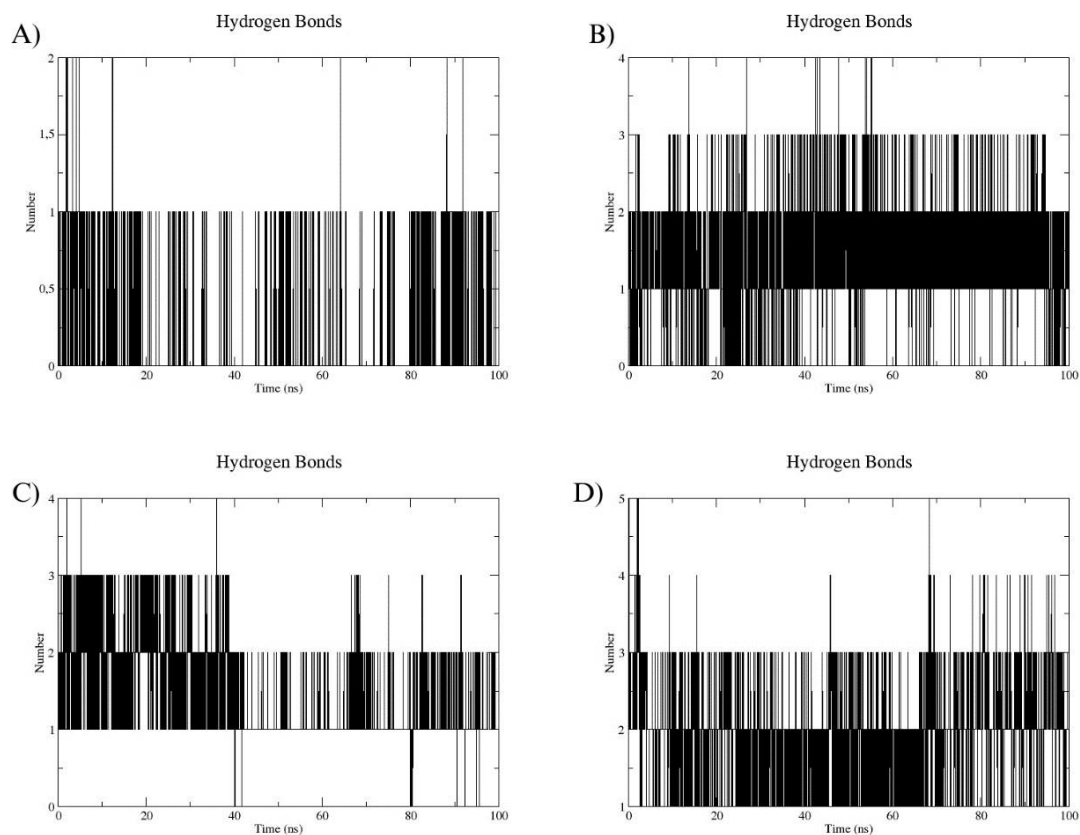


Figura 5: Ligações de hidrogênio intermoleculares, sendo A) formadas entre o organismo *Trypanosoma cruzi* com o ligante NuBBE 1479; B) organismo *Trypanosoma brucei* com o ligante NuBBE 1479; C) organismo *Trypanosoma cruzi* com o ligante CL 49068759; D) organismo *Trypanosoma brucei* com o ligante CL 49068759.

A figura 5, demonstrou que o composto CL 49068759 em ambos organismos realizaram uma ligação de hidrogênio estável com a região do sítio ativo, sendo melhor no *Trypanosoma brucei* devido a sua maior estabilidade nos números de ligação de hidrogênio em relação ao tempo. Já em relação ao composto NuBBE 1479, as ligações de hidrogênio no organismo *Trypanosoma brucei* foram mais estáveis com a região do sítio ativo ao longo do tempo em comparação com o organismo *Trypanosoma cruzi*.

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que através da criação do modelo baseado em forma e da triagem virtual, pode-se selecionar dois compostos NuBBE 1479 e CL 49068759 com as melhores propriedades e características para inibição da tripanotiona redutase em ambos os organismos. Ressalta-se, ainda, que o composto natural selecionado, NuBBE 1479, já possui resultados promissores contra protozoários, o que corrobora os resultados desse estudo. Ademais, o organismo *Trypanosoma brucei* teve uma resposta mais significativa nas ligações de hidrogênio entre os compostos e a TR quando comparados com *Trypanosoma cruzi*. Sendo assim, estas moléculas, se apresentam promissoras para o desenvolvimento de novos fármacos para essas doenças

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERMAN, H. M. The Protein Data Bank / Biopython. **Presentation**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 2000.
- BRAGA, P. A. C. et al. In vitro cytotoxicity activity on several cancer cell lines of acridone and N-phenylethyl-benzamide derivatives from *Swingles glutinosa* (Bl.) Merr. *Natural Product Research*, v. 21, n. 1, p. 47–55, 2007.
- BRAGA, S. F. P. Síntese de inibidores potenciais da tripanotiona redutase: base para o desenvolvimento de novos fármacos para tratamento da Doença de Chagas e *Leishmaniose*. p. 1–221, 2012.
- BRASIL. Bol Epidemiológico: Territorialização e vulnerabilidade para doença de Chagas crônica: 14 de abril – Dia Mundial de Combate à Doença de Chagas. Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde, [s. l.], n. Especial, p. 1–53, 2022.
- DE GASPARO, R.; et al. Targeting a Large Active Site: Structure-Based Design of Nanomolar Inhibitors of *Trypanosoma brucei* Trypanothione Reductase. **Chemistry - A European Journal**, v. 25, n. 49, p. 11416–11421, 2019.
- DE OLIVEIRA, R. B. et al. Síntese, avaliação biológica e modelagem molecular de arilfuranos como inibidores da enzima tripanotiona redutase. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 261–267, 2008.
- DIAS, J. C. P. Globalization, inequity and Chagas disease. **Cadernos de Saude Publica**, v. 23,

n. SUPPL. 1, p. 13–22, 2007.

DIAS, J. C. P.; NETO, V. A. Prevention concerning the different alternative routes for transmission of *Trypanosoma cruzi* in Brazil. v. 44, n. 3, p. 68–72, 2011.

DOS SANTOS, D. A. P. et al. Antiparasitic Activities of Acridone Alkaloids from *Swinglea glutinosa* (Bl.) Merr. J. Braz. Chem. Soc, v. 20, n. 4, p. 644–651, 2009.

FRANCO, J. R. et al. Epidemiology of human African trypanosomiasis. **Clinical Epidemiology**, v. 6, n. 1, p. 257–275, 2014.

GALVÃO, C. Sistemática e evolução dos vetores. **Vetores da doença de Chagas no Brasil**, p. 26–32, 2014.

HAWKINS, P. C. D. et al. Conformer Generation with OMEGA : Algorithm and Validation Using High Quality Structures from the Protein Databank and Cambridge Structural Database. v. 11, p. 572–584, 2010.

HAWKINS, P. C. D.; SKILLMAN, A. G.; NICHOLLS, A. Comparison of shape-matching and docking as virtual screening tools. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 1, p. 74–82, 2007.

IRWIN, J. J. et al. ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology. 2012.

JÚNIOR, V. J. B. Benznidazol associado a outros fármacos para o tratamento da doença de chagas. p. 1–46, 2018.

KROPF, S. P. Doença de Chagas, doença do Brasil: ciência, saúde e nação, 1909-1962. p. 1909–1962, 2009.

MATTHEWS, K. R. The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. Journal of Cell Science, v. 118, n. 2, p. 283–290, 15 jan. 2005.

NAMBA, A M.; SILVA, V. B.; SILVA, C. H. T. P. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Eclética Química**, v. 33, n. 4, p. 1–11, 2008.

OLIVEIRA, F. A. S. et al. Características epidemiológicas dos pacientes com Doença de Chagas. **Revista Brasileira de Medicina de Família e Comunidade**, v. 2, n. 6, p. 107–113, 2006.

PERSCH, E.; et al. Binding to large enzyme pockets: Small-molecule inhibitors of trypanothione reductase. **ChemMedChem**, v. 9, n. 8, p. 1880–1891, 2014.

PIRES, 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.

RA, L.; MB, S. LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, p. 2778–2786, 2011.

SÁNCHEZ-VALDÉZ, F. J. et al. Spontaneous dormancy protects *Trypanosoma cruzi* during extended drug exposure. **bioRxiv**, p. 1–20, 2017.

SERAFIM, R. A. M. Antichagásicos potenciais: síntese e modelagem molecular e híbridos de hidrazonas e liberadores de óxido nítrico. p. 1–300, 2016.

STICH, A.; ABEL, P. M.; KRISHNA, S. Human African trypanosomiasis. **BMJ**, v. 325, p. 203–206, 2002.

STUART, K. et al. *Kinetoplastids*: Related protozoan pathogens, different diseases. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, p. 1301–1310, 2008.

TARTAROTTI, E.; OLIVEIRA-AZEREDO, M. T.; CERON, C. R. Problemática vetorial da doença de chagas. **Arq Ciênc Saúde**, v. 11, n. 1, p. 44–7, 2004.

Trypanosomiasis, human African (sleeping sickness). **World Health Organization**, 2023. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-\(sleeping-sickness\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-(sleeping-sickness)). Acesso em: 02 de junho de 2023.

TYLER, K. M.; OLSON, C.; ENGMAN, D. M. The Life Cycle Of *Trypanosoma Cruzi*. 2003. UNESP. NuBBE 1479. Núcleo de Bioensaios Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais. Disponível em: <https://nubbe.iq.unesp.br>. Acesso em: 4 de junho de 2023.

VAN ZANTEN, A. De la ségrégation aux inégalités: La réduction des opportunités. **Formation Emploi**, v. 120, n. 4, p. 127–134, 2012.

VINHAES, M. C.; DIAS, J. C. Chagas disease in Brazil. **Cadernos de saúde pública / Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública**, v. 16 Suppl 2, p. 7–12, 2000.

WANDERLEY, D. M.; CORRÊA, F. M. Epidemiology of Chagas' heart disease. **São Paulo Medical Journal**, v. 113, n. 2, p. 742–749, 1995.