



## ESTUDOS DE ACOPLAMENTO MOLECULAR E DAS PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS DAS TIAZOLIDINEDIONAS DIIDROQUINAZOLINONAS FRENTE A TRIPANOTIONA REDUTASE DE *Trypanosoma cruzi*

<sup>1</sup> Naiara Silva Souza (UFBA) – [naiarasouza222@gmail.com](mailto:naiarasouza222@gmail.com); <sup>2</sup> Clarissa Maria Souza Peralva (UFBA) – [cperalva411@hotmail.com](mailto:cperalva411@hotmail.com); <sup>3</sup> Kamel Metwally (ZU); <sup>4</sup> Samuel Silva da Rocha Pita (UFBA) – [samuelpita@gmail.com](mailto:samuelpita@gmail.com).

**Resumo:** A enzima Tripanotiona Redutase de *Trypanosoma cruzi* (TcTR) é um alvo validado na busca por novos compostos anti-chagásicos. Analisou-se as propriedades farmacocinéticas e toxicológicas de uma série de tiazolidinedionas diidroquinazolinonas através do servidor pkCSM. Posteriormente, empregou-se o Autodock v.4.2 para analisar as interações entre estes compostos e a TcTR. Os melhores inibidores (3E e 3F) interagiram com os principais resíduos do sítio do FAD (SER-161, GLY-12, SER-15, ARG-288, THR-52, PHE-199), enquanto os compostos de menor energia (3K) interagiram com menos resíduos. Assim, conclui-se que a interação dos derivados de tiazolidinedionas diidroquinazolinonas e a TcTR podem ajudar na descoberta de novas estruturas anti-chagásicas.

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

## DOCKING STUDIES AND PHARMACOKINETIC PROPERTIES OF DIHYDROQUINAZOLINES THIAZOLIDINEDIONES AGAINST *Trypanosoma cruzi* TRYPANOTHIONE REDUCTASE

**Abstract:** *Trypanosoma cruzi* Trypanothione Reductase (TcTR) is a validated target in the search for new anti-chagasic compounds. The pharmacokinetic and toxicological properties of a series of thiazolidinediones dihydroquinazolinones were analyzed through the pkCSM server. Subsequently, Autodock v.4.2 was used to analyze the interactions between these compounds and TcTR. The best inhibitors (3E and 3F) interacted with the residues of the FAD site (SER-161, GLY-12, SER-15, ARG-288, THR-52, PHE-199), while the lower energy ones (3K) interacted with less residues. Thus, it is concluded that the interaction of thiazolidinedione dihydroquinazolinones derivatives and TcTR may aid in the discovery of new anti-Chagas' compounds.

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



## 1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), um sexto da população mundial está infectado com uma ou mais doenças negligenciadas [1]. Estas doenças não possuem tratamento eficaz e por afetarem populações em situação de pobreza ajudam a manter a desigualdade social e assim representam um impasse no desenvolvimento do país [2]. Atualmente, a prevalência dessas doenças vem aumentando nos países desenvolvidos por conta das migrações populacionais [3].

A doença de Chagas assola a humanidade há mais de 9.000 anos, sendo detectadas em múmias pré-colombianas em diferentes partes da África [4]. Seu agente etiológico é o *Trypanosoma cruzi* [5], até então silvestre, mas que passou a afetar o homem quando este tomou seus ecótopos [6].

O ciclo da doença ocorre através de dois hospedeiros [7] e ocorrem diferentes formas de infecção: vetorial, transfusional, sexual, vertical, oral, aleitamento materno, acidentes laboratoriais, transplantes de órgãos e através de drogas injetáveis [8]. Em 80 a 90% dos casos ocorre a transmissão da forma vetorial [9]. O vetor pertence à família *Reduviidae* e as principais espécies transmissoras existentes no Brasil são *Pastrongylus megistrus*, *Triatoma infestans*, e o *Rhodnius prolixus* [10].

Poucos avanços foram obtidos quanto ao tratamento da doença de Chagas, principalmente na fase crônica [8]. Contudo o *Trypanosoma cruzi* possui a Tripanotiona Redutase (TcTR), uma óxido-redutase, cuja principal função é a proteção contra o stress oxidativo [11]. A inexistência do alfa-tocoferol e beta-caroteno no *T. cruzi*, fornece uma menor proteção às espécies radiculares [12].

Portanto, a inibição da TcTR tornaria o parasito mais sensível a oxidação. Assim a finalidade desse estudo consistiu em avaliar computacionalmente as tiazolidinedionas diidroquinazolinonas (cedidas pelo professor Kamel Metwally da Universidade de Zagazig- Egito) frente a TcTR de modo a auxiliar no desenvolvimento de moléculas para o tratamento da doença de Chagas.

## 2. METODOLOGIA

O Acoplamento Molecular se dedica a previsão do modo de ligação e aos detalhes de reconhecimento molecular entre uma macromolécula e uma micromolécula [13].

### 2.1. Preparo da Proteína

Através do *Protein Data Bank* (PDB ID: 1BZL, <http://pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1bzl>) obteve-se a estrutura da TcTR, resolução em 2,40 Å [14]. As moléculas dos cofatores (FAD), água e do substrato natural (GCG) foram removidas automaticamente utilizando-se as ferramentas do AutoDock 4.2 [15]. Foram calculadas as cargas Gasteiger [16] e foram adicionados todos os átomos de hidrogênios (método *noBondOrder*). Posteriormente, os hidrogênios não polares foram unidos aos carbonos (*merge*) e por fim, assinalou-se os tipos de átomos, segundo o programa AutoDock 4.2 [15].

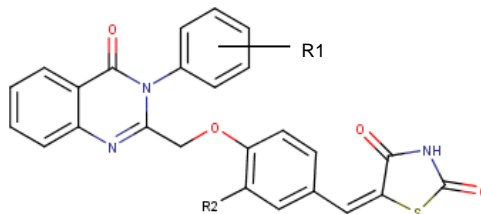
Os valores de pKa da TcTR foram calculados pelo programa Propka 3.1 [17] e seguiram o pH=7,5: ASP e GLU, carga -1; LYS e ARG, carga +1; HIS, exceto a 233, carga 0 e as CYS 53 e 58 fazem uma ligação dissulfídica.

### 2.2. Preparo do Ligante



O Marvin Sketch [18] foi utilizado para desenhar a estrutura 2D dos ligantes tiazolidinedionas diidroquinazolinonas (Figura 1) e para a escolha das micro espécies mais prevalentes no pH escolhido (7,5).

Figura 1. Estrutura 2D das tiazolidinedionas diidroquinazolinonas



Código	R1	R2
3a	H	H
3b	4-F	H
3c	4-Cl	H
3d	3-Cl	H
3e	4-Br	H
3f	3-Br	H
3g	4-CH <sub>3</sub>	H
3h	3-CH <sub>3</sub>	H
3i	4-CF <sub>3</sub>	H
3j	3-OCH <sub>3</sub>	H
3k	H	3-OCH <sub>3</sub>
3l	3-Cl	3-OCH <sub>3</sub>
3m	4-Br	3-OCH <sub>3</sub>
3n	3-Br	3-OCH <sub>3</sub>

Feito isso, a minimização dos ligantes foi realizada pelo programa Gchemical 3.0 [19] com o campo de forças Tripos. Os arquivos foram salvos em GPR e depois convertidos em PDB pelo programa OpenBabel [20]. Em seguida adicionou-se os átomos de hidrogênio com o método *noBondOrder*, calculou-se as cargas Gasteiger [16], fez-se um *merge* nos hidrogênios não polares e assinalou-se os tipos de átomos no AutoDock 4.2 [15].

### 2.3. Autodock e Redocking do Cofator FAD

O *grid* é uma metodologia do AutoDock 4.2 [15] onde os pontos em cada dimensão são ajustados a fim de ocupar praticamente o sítio de interação da proteína [21]. Os parâmetros de *grid* desse estudo tiveram as seguintes configurações: coordenadas do centro X= 22,406 Å; Y= 7,782 Å; Z= -17,993 Å e o espaçamento da rede de 0,375 Å.



Os cálculos de *docking* foram realizados pelo programa Autodock 4.2 [15] que utiliza o algoritmo genético lamarckiano (LGA– *Lamarckian Genetic Algorithm*) [22]. O protocolo do LGA empregou uma população inicial de 150 indivíduos em 50 corridas com: no máximo 27.000 gerações; 2.500.000 avaliações de energia; taxa de mutação 2%, permutação 80%, elitismo 1,0 e os demais parâmetros definidos automaticamente.

#### 2.4. Propriedades Farmacocinéticas

A análise do perfil de absorção, distribuição, metabolização e excreção (ADMET) leva a uma redução do número de compostos que falham nos ensaios posteriores. Para esta etapa, utilizou-se o servidor pkCSM (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsml/>) que codificam padrões de distância entre átomos [23]. As características toxicológicas foram avaliadas no *DATAWARRIOR* (<http://www.openmolecules.org/datawarrior/>) que prevê as propriedades moleculares de uma estrutura química filtrando os dados em tempo real [24].

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Acoplamento Molecular entre a TcTR e as tiazolidinedionas diidroquinazolinonas foi realizado no Autodock 4.2 [15]. De modo a distinguir as conformações de melhor energia de ligação e assim selecionar um conjunto de compostos ativos, classificou-se os compostos com melhor energia no sítio ativo da TcTR (Tabela 1).

Tabela 1. Energias de interação (Kcal/mol) dos derivados tiazolidinedionas diidroquinazolinonas acoplados a TcTR pelo Autodock 4.2 [15].

Código	Energia de interação (Kcal/mol)
3E	-12,59
3F	-12,38
3J	-12,20
3C	-12,15
3M	-12,14
3H	-12,09
3G	-12,08
3D	-12,06
3I	-12,03
3L	-11,86
3N	-11,75



<b>3A</b>	-11,65
<b>3B</b>	-11,27
<b>3K</b>	-11,16

A fim de selecionar as tiazolidinedionas diidroquinazolinonas com as melhores características, analisamos suas propriedades farmacocinéticas e toxicológicas nos servidores pkCSM [23] e DATAWARRIOR [24] (Tabela 2).

Tabela 2. Análises farmacocinéticas e toxicológicas geradas pelo servidor pkCSM [23] e DATAWARRIOR [24]

<b>Propriedades Farmacocinéticas</b>	<b>Valor (Referência)</b>
<b>Absorção Intestinal</b>	$\geq 92\%$ ( $\geq 30\%$ )
<b>Caco-2</b>	$0,76 \leq \text{Caco-2} \leq 1,17$ ( $>0,9$ )
<b>Penetração no SNC (logPS)</b>	-3,2 e -1,94 ( $\log\text{PS} < -3$ )
<b>LogP</b>	$3,89 \leq \log\text{P} \leq 4,93$
<b>Substrato da CYP 3A4</b>	Sim
<b>Inibidores da CYP 3A4</b>	Sim
<b>Inibição hERG</b>	Não
<b>Mutagênicos e Tumorigênicos</b>	Não
<b>Irritantes</b>	Não
<b>Reprodução Efetiva</b>	Não

Após análise das propriedades farmacocinéticas verificou-se que todos os compostos possuem uma boa absorção intestinal, pois o valor de referência  $\geq 30\%$  e os valores dos compostos foram  $\geq 92\%$  (Tabela 2).

Os dados de células Caco 2 são amplamente utilizados *in vitro* para prever a absorção de medicamentos e valores acima de 0,9 indicam alta permeabilidade [23]. Para as tiazolidinedionas diidroquinazolinonas temos alta permeabilidade, exceto 3J, 3K, 3L, 3M e 3N cujos valores foram 0,73, 0,89, 0,82, 0,81,  $0,82 \times 10^{-6}$  cm/s, respectivamente.

Para os dados de penetração no sistema nervoso central (SNC) (Tabela 2), tivemos a seguinte distribuição: **i)** sem penetração ( $\log\text{PS} < -3$ ): 3A, 3B, 3G, 3H, 3J, 3K, 3L, 3M e 3N; **ii)** com penetração ( $\log\text{PS} > -2$ ): 3C, 3D, 3E, 3F e 3I. Esses valores corroboram com a alta lipofilicidade dos compostos ( $4,28 \leq \log\text{P} \leq 5,05$ ) indicando que esta se correlaciona à permeabilidade no SNC.

Quanto a metabolização, a enzima CYP3A4 é a principal responsável pelo metabolismo humano [23]. Todos derivados mostraram, em tese, serem inibidores e substrato dela, o que leva a conclusão de que eles serão metabolizados por esta enzima.

A inibição dos canais hERG acarretou a remoção de muitos medicamentos do mercado farmacêutico [23]. A partir da análise dos compostos vemos que nenhum

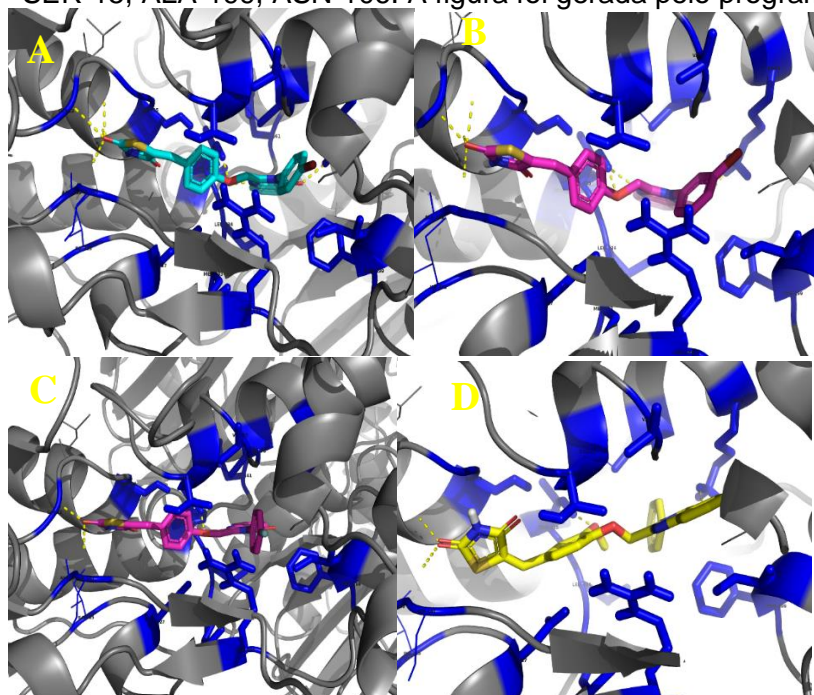




destes apresentou inibição dos canais hERG (Tabela 2). Ademais nota-se que os compostos não tiveram efeitos sobre os órgãos do aparelho reprodutor, como também não se mostraram mutagênicos, tumorigênicos nem irritantes (Tabela 2).

Analisando as interações da TcTR com as tiazolidinedionas diidroquinazolinonas, observa-se que os derivados que interagem com o sítio do FAD (SER-161, GLY-12, SER-15, THR-52, ALA-199) apresentaram melhores energias de acoplamento (Figura 2 A e B; Tabela 1). As interações envolvendo SER-161, GLY-12 e SER-15, são ligações hidrogênio (Figura 2 B), as interações THR-52 e o anel aromático e ALA-199 e o segundo anel aromático, interações hidrofóbicas. Nota-se também que os compostos de menor energia interagem com menos resíduos, pois os compostos de menor energia perdem a ligação de interação com hidrogênio.

Figura 2. Principais interações dos derivados de tiazolidinedionas diidroquinazolinonas acoplados a TcTR no AutoDock 4.2 [15]. 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 azul e os ligantes são: **A) 3E** interação com: SER-161, GLY-12, SER-15 **B) 3F** interação eletrostática [22] com: SER-161, GLY-12, SER-15, ARG- 878 **C) 3B** interações hidrofóbicas [22]: SER-161, GLY-12, SER-15, THR-52; **D) 3K** interações hidrofóbicas: SER-161, GLY-12, SER-15, ALA-199, ASN-106. A figura foi gerada pelo programa PyMOL [25].



#### 4. CONCLUSÃO

Após mais de um século de pesquisas, poucos avanços foram obtidos quanto ao tratamento da doença de Chagas mesmo o *Trypanosoma cruzi* possuindo um alvo terapêutico validado que o protege de estresses oxidativos, a Tripanotiona Redutase (TcTR).



Com isso as tiazolidinedionas diidroquinazolinonas foram estudadas pelo potencial de serem fármacos anti-chagásicos. As interações destes ligantes com os resíduos da TcTR mostraram que nos compostos mais ativos (3E, 3F e 3J) as interações no sítio do FAD (principalmente SER-161, GLY-12, SER-15, THR-52, ALA-199) foram favoráveis ao comportamento inibitório. Para as moléculas menos ativas, a interação se deu distante do FAD.

Além disso estudou-se as propriedades farmacocinéticas e toxicológicas as quais revelaram que os compostos apresentaram biodisponibilidade, distribuição, excreção e não apresentaram toxicidade. Assim pode-se dizer que nossos resultados permitem concluir que as tiazolidinedionas diidroquinazolinonas podem ajudar na pesquisa de novos inibidores da TcTR que sejam anti-chagásicos.

### **Agradecimentos**

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

### **5. REFERÊNCIAS**

<sup>1</sup> BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Ciência e Tecnologia. **Prioridade de Pesquisa em Saúde. Caderno 2 – Doenças Negligenciadas**. Departamento de Ciência e Tecnologia – Decit 2006.

[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/prioridades\\_invest/i2\\_tela4\\_2.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/prioridades_invest/i2_tela4_2.html)  
Acesso em 16/07/2018.

<sup>2</sup> BRASIL. Ministério da Saúde. **Oficina de Prioridades de Pesquisas em Saúde de Doenças Negligenciadas**. Informativo DECIT – Departamento de Ciência e Tecnologia/SVS da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde. Julho, 2008.

<sup>3</sup> Revista de Saúde Pública (RSP). Informe Técnico Institucional. **Doenças Negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde**. São Paulo, v. 44, n.1, p. 200-202, 2010.

<sup>4</sup> WERNECK, G. L. **A Pesquisa Brasileira em Saúde Coletiva sobre as Doenças Negligenciadas**. Saúde Pública – Periódicos. ISSN 1414-462X. Núcleo de Estudos de Saúde Coletiva/UFRJ. Rio de Janeiro, 1987.

<sup>5</sup> CHAGAS, Carlos. **Nova Tripanozomíase Humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., Agente etiológico de nova entidade mórbida do homem**. In: *Carlos Chagas: Coletânea de Trabalhos Científicos*. Editora Universidade de Brasília, p. 9-80; publicado originalmente em Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. I Fasc. II em 1909, 1981.

<sup>6</sup> FERNANDES, R. M. **A Evolução no Conhecimento e o Controle da Doença de Chagas no Brasil: um estudo de caso sobre a interação entre a ciência, a tecnologia, a saúde e a economia**. Faculdade de Ciências Econômicas – UFMG. [dissertação de mestrado] Belo Horizonte, 2005.

<sup>7</sup> LANA, M. & TAFURI, W. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas In: NEVES, D. P. (Org), **Parasitologia Humana**. Editora Atheneu, São Paulo SP, 10ª Edição. p.85-108, 2000.

<sup>8</sup> COURA, J.R.; PEREIRA, J.B. Doença de Chagas. O que é conhecido e o que deve ser melhorado: uma visão sistêmica. **Revista da Sociedade**



**Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 3, p. 286-296, maio-jun, 2012.

<sup>9</sup> TARLETON, R. L. & CURRAN, J. W., Is Chagas Disease Really the “New HIV/AIDS of the Americas”? **PLOS Neglected Tropical Diseases**, October, v. 6 n. 10 e1861, 2012.

<sup>10</sup> BARRY, M. A.; BEZEK, S.; SERPA, J.A.; HOTEZ, P.J.; WOC-COLBURN, L. Neglected Infections of Poverty in Texas and the Rest of the United States: Management and Treatment Options, **Nature publishing group**, v. 92, n. 2, August, 2012.

<sup>11</sup> WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Weekly epidemiological record Relevé** Geneva, 2012.

<sup>12</sup> DIAS, J. C. P., NETO, V. A., LUNA, E. J. A. **Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brazil e sugestões para sua prevenção**. *Rev. Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 44, n. 3, p. 375-379, mai-jun, 2011.

<sup>13</sup> GUEDES, A. I.; MAGALHÃES, S. C.; DARDENNE, E. L. **Atracamento Molecular**. In: Verli H. *Bioinformática da Biologia a flexibilidade Molecular*: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular- SBBq; p. 189-207, 2014.

<sup>14</sup> BERMAN, H. M. et al. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 235-242, 2000.

<sup>15</sup> MORRIS, G. M.; et al. Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 16, p. 2785-2791, 2009.

<sup>16</sup> GASTEIGER, J.; MARSILI, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity—a rapid access to atomic charges. **Tetrahedron**, v. 36, n. 22, p. 3219-3228, 1980.

<sup>17</sup> OLSSON, 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.

<sup>18</sup> CHEMAXOM. MarvinSketch was used for drawing, displaying and characterizing chemical structures, substructures and reactions, Version 5.12: **Chemaxom**, 2013.

<sup>19</sup> HASSINEN, 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.

<sup>20</sup> O’BOYLE, M. N.; et al. Open Babel: An open chemical toolbox. **Journal Computational Cheminformatics**, v. 33, n. 3, 2011.

<sup>21</sup> MONTARI, C. A. *Química Medicinal: Métodos e fundamentos em planejamento de fármacos*. São Paulo: EDUSP, 2011, cap.9.

<sup>22</sup> MORRIS, 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.

<sup>23</sup> 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.

<sup>24</sup> TOEPAK, E. P.; TAMBUNAN, U. S. F. In silico design of fragment-based drug targeting host processing  $\alpha$ -glucosidase, i for dengue fever. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v.172, p. 1-10, 2017.





<sup>25</sup>SCHORODINGER, L. L. C. **The Pymol Molecular Graphics System**, version 1.5.0.4, 2013.