

Artigo

Triagem Virtual Aplicada na Busca de Inibidores da Tripanotiona Redutase de *Trypanosoma cruzi* Utilizando a Base de Dados de Produtos Naturais do Semiárido Baiano (NatProDB)

Paixão, V. G.;* Pita, S. S. R.

Rev. Virtual Quim., 2016, XX (XX), no prelo. Data de publicação na Web: 25 de junho de 2016

<http://rvq.sbg.org.br>**Virtual Screening applied to search of inhibitors of *Trypanosoma cruzi* Trypanothione Reductase employing the Natural Products Database from Bahia state (NatProDB)**

Abstract: Neglected Tropical Diseases (NTDs) affect primarily the most vulnerable populations in developing countries and are the major causes of bacterial, parasitic and viral infections. According to the World Health Organization (WHO), Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, affects 21 countries in Latin America and it is a public health problem. There is any effective treatment for this disease, especially in its chronic phase, since there is a low perspective of financial return to the pharmaceutical industry. Thus, one way to work around this limitation is through the Virtual Screening based on the structure of Trypanothione Reductase of *Trypanosoma cruzi* (TcTR) using the *AutoDock v.4.2* program, we selected the best compounds listed from the Natural Products Database of Bahia State (NatProDB), classifying them according to their energy values of protein-ligand interactions (- 12,41 kcal/mol a - 8,59 kcal/mol). Our analysis also revealed, through automatic analysis of docking conformations using a self-organizing map (*AuPosSOM*), which innovative chemical groups are present in NatProDB and which could assist in the drug design against NTD. The use of these computational techniques can help us to verify which interactions are required to inhibit selectively this enzyme, a validated target, and that could eventually result in novel anti-Chagas' disease agents.

Keywords: Chagas disease; Trypanothione Reductase; Virtual Screening; NatProDB, *AuPosSOM*.

Resumo

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) afetam principalmente as populações mais vulneráveis dos países em desenvolvimento e estão entre as maiores causas de infecções bacterianas, parasitárias e virais. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, afeta 21 países da América Latina, sendo considerada um problema de saúde pública. Ainda não há tratamento efetivo para esta doença, principalmente na sua fase crônica, uma vez que não há perspectiva de retorno financeiro à indústria farmacêutica. Uma forma de contornar esta limitação é através da Triagem Virtual baseada na estrutura da Tripanotiona Redutase de *Trypanosoma cruzi* (TcTR), utilizando o programa *AutoDock v.4.2*. A partir deste programa, selecionamos compostos com os valores de energia de interação proteína-ligante (- 12,41 kcal/mol a - 8,59 kcal/mol) oriundos da Base de Dados de Produtos Naturais do Semiárido Baiano (NatProDB). Adicionalmente, identificamos através da análise automática das conformações de acoplamento, usando um mapa de auto-organização (*AuPosSOM*), quais grupos químicos inovadores estão presentes nas moléculas do NatProDB e quais são as interações intermoleculares que podem auxiliar no planejamento de fármacos contra a doença de Chagas. O emprego destas técnicas computacionais podem auxiliar na verificação das interações necessárias para inibir seletivamente esta enzima, um alvo validado no parasito, e que poderão futuramente resultar em novos fármacos anti-chagásicos.

Palavras-chave: Doença de Chagas; Tripanotiona Redutase; Triagem Virtual; NatProDB, *AuPosSOM*.

* Universidade Federal da Bahia, Av. Barão de Jeremoabo, 147, Faculdade de Farmácia, 1º andar, Laboratório de Bioinformática e Modelagem Molecular (LaBiMM), Ondina, CEP 40170-115, Salvador-BA, Brasil.

✉ vinicius_guimaraes7@hotmail.com

DOI:

Triagem Virtual Aplicada na Busca de Inibidores da Tripanotiona Redutase de *Trypanosoma cruzi* Utilizando a Base de Dados de Produtos Naturais do Semiárido Baiano (NatProDB)

Vinícius G. da Paixão,* Samuel S. R. Pita

Universidade Federal da Bahia, Av. Barão de Jeremoabo, 147, Faculdade de Farmácia, 1º andar, Laboratório de Bioinformática e Modelagem Molecular (LaBiMM), Ondina, CEP 40170-115, Salvador-BA, Brasil.

* vinicius_guimaraes7@hotmail.com

Recebido em 10 de setembro de 2015. Aceito para publicação em 23 de junho de 2016

1. Introdução

- 1.1. Doenças Tropicais Negligenciadas: Doença de Chagas
- 1.2. Produtos Naturais e o Planejamento de fármacos

2. Metodologia

- 2.1. Preparação das estruturas da proteína e dos ligantes da base de dados do NatProDB
- 2.2. Triagem Virtual por Acoplamento utilizando o *AutoDock v.4.2*
- 2.3. Análise dos agrupamentos de ligantes usando o *AuPosSOM*

3. Resultados e Discussão

4. Conclusões

1. Introdução

1.1. Doenças Tropicais Negligenciadas: Doença de Chagas

As doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) possuem uma alta prevalência nas populações mais pobres do mundo causando inúmeras mortes.¹ Embora estas doenças representem um risco a saúde de populações economicamente vulneráveis, ainda há certa resistência da indústria farmacêutica em investir na pesquisa e desenvolvimento de

novos fármacos para as DTN, pois os investimentos não atingiriam o grande mercado consumidor² capaz de dar um retorno lucrativo ao investimento. A Organização Mundial de Saúde (OMS) possui uma lista das 17 doenças negligenciadas e, dentre estas, três são causadas por protozoários e consideradas prioritárias para o estudo (DRG3): leishmaniose, tripanossomíase africana (doença do sono) e doença de Chagas.³

Segundo dados da OMS, a doença de Chagas possui uma incidência anual de 28 mil casos na região das Américas causando, em média, 12 mil mortes.⁴ Devido a sua alta

mortalidade nas regiões endêmicas, a doença de Chagas é considerada um grave problema de saúde pública e, apesar disso, há pouco interesse da indústria farmacêutica no desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas. A doença de Chagas é uma infecção parasitária causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) e sua transmissão se dá, principalmente, durante o repasto sanguíneo quando as formas tripomastigotas metacíclicas são eliminadas nas fezes do inseto triatomíneo, mais

conhecido como barbeiro (Figura 1: item 1).⁵ Ao atingir a corrente sanguínea, as formas tripomastigotas penetram as células do hospedeiro humano e se transformam em amastigotas (Figura 1: item 2). Estas possuem a capacidade de se multiplicar intracelularmente levando à fase crônica da doença (Figura 1: item 3) ou podem se transformar novamente em tripomastigotas podendo ser retransmitidas para o inseto (Figura 1: item 4) ao voltarem para a circulação sanguínea.^{3,5}

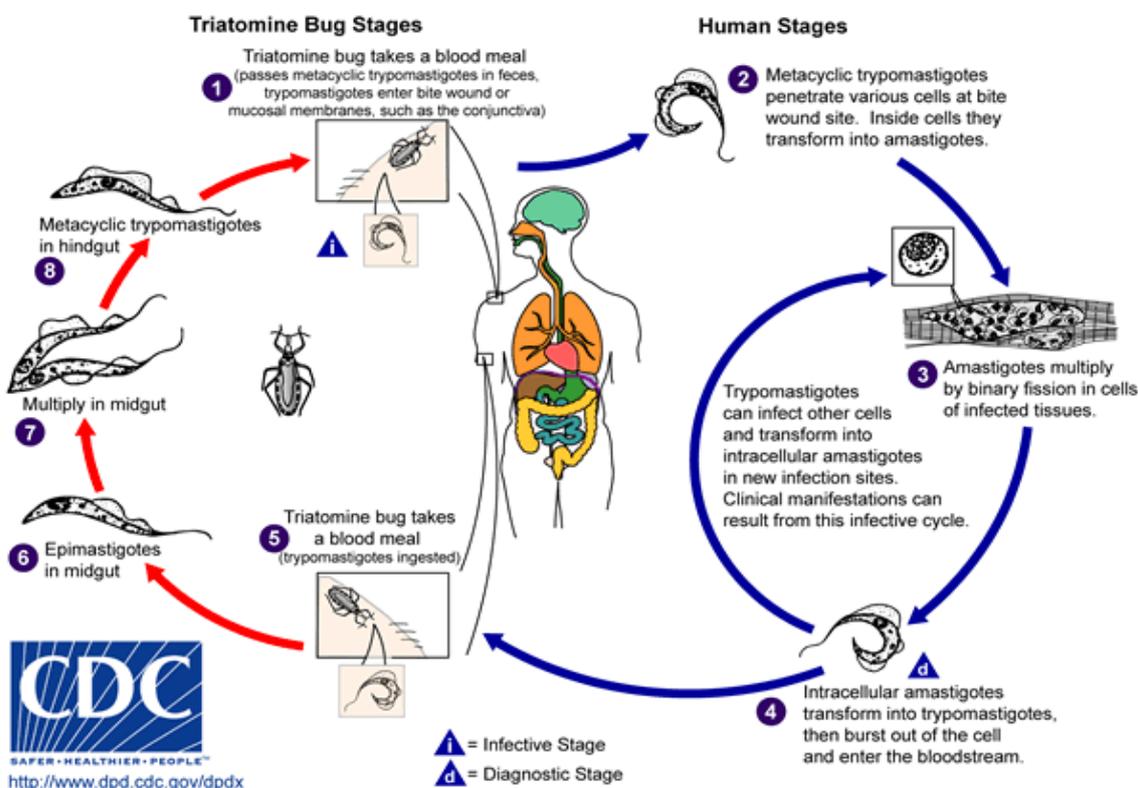


Figura 1. Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*. (Reproduzido de <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>)

O parasito, *T. cruzi*, possui uma enzima denominada Tripanotiona Redutase (TcTR) que pertence a classe das enzimas óxido-redutases (EC 1.8.1.12) e está intrinsecamente ligada à proteção contra o estresse oxidativo das células parasitárias.⁶ Por desempenhar o mesmo papel de proteção celular que a Glutathiona Redutase (GR) humana, a Tripanotiona Redutase de *T. cruzi* (TcTR) permite que o parasito não seja afetado pelos mecanismos de defesa do

sistema imunológico do hospedeiro humano.⁷ Entretanto, segundo Diaz e colaboradores⁸, a inexistência de α -tocoferol ou β -caroteno no *T. cruzi* fornece uma menor proteção celular dos mesmos às espécies radiculares, ao contrário do ocorre em células mamíferas, que se protegem eficazmente dos radicais livres por meio de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos. Logo, a inibição eficaz da TcTR comprometeria os mecanismos de defesa dos parasitos

tornando-os mais sensíveis aos fármacos e/ou espécies que causem dano redox.⁹

Estudos de biologia e genética molecular demonstraram que, na ausência do sistema Tripanotona Redutase-tripanotona, o parasito é mais susceptível ao estresse oxidativo e, portanto, não se desenvolve.¹⁰ Diante disso, nota-se que o principal mecanismo de proteção celular enzimático do *T. cruzi* é exercido pela TcTR, a qual é responsável por reduzir o seu substrato,

disulfeto de tripanotona ($T[S]_2$) em dihidrotripanotona ($T[SH]_2$) que, por sua vez, reduz as espécies reativas de oxigênio (ERO)¹¹ através de seus grupos tióis (R-SH) livres (Figura 2). A sobrevivência do *T. cruzi* depende principalmente desta enzima.⁶ Por isso, a procura por moléculas que sejam seletivas à TcTR constitui um campo promissor para o planejamento de fármacos contra a doença de Chagas.

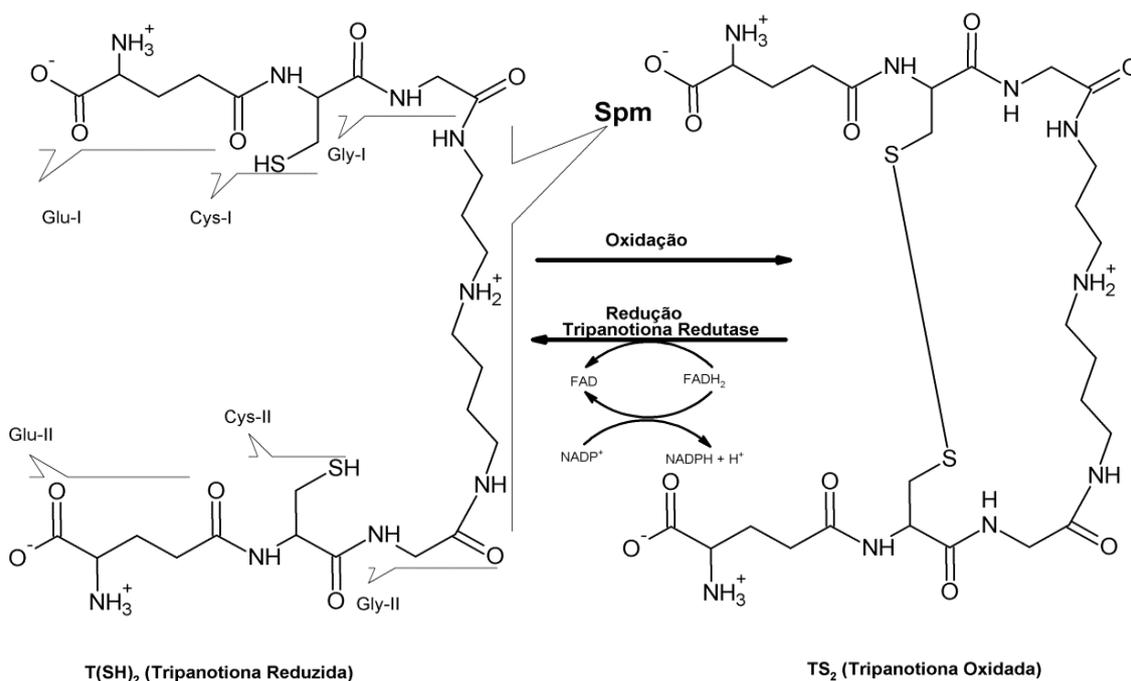


Figura 2. Reação de redução catalisada pela Tripanotona Redutase (TcTR, Reproduzido com permissão dos autores PITA e PASCUTTI, 2011)

A enzima Tripanotona Redutase está presente na classe dos tripanossomatídeos que compreende, dentre outros, os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*. A mesma é também sintetizada por outros organismos como a ameba patogênica *Entamoeba histolytica* e a alga verde flagelada *Euglena gracilis*.¹² Dessa forma, o estudo dos inibidores da TcTR é importante, pois poderá direcionar a busca seletiva por fármacos que sejam úteis não só para o tratamento da doença de Chagas, mas também no combate da Tripanossomíase Africana (causada pelo *Trypanosoma brucei*), das leishmanioses⁹ e,

possivelmente, outras doenças.

1.2. Produtos Naturais e o Planejamento de Fármacos

A partir da década de noventa, com o advento da química combinatória, a indústria farmacêutica conseguiu otimizar a busca por moléculas bioativas.¹³ Entretanto, a identificação de uma nova espécie química obtida de um produto natural não garante a sua atividade em sistemas biológicos, porém

o seu arcabouço molecular pode ser útil na identificação do farmacóforo, ou seja, o conjunto das características eletrônicas e estéricas responsáveis pelo efeito biológico.^{13,14} O reconhecimento dessas características farmacofóricas é importante para racionalizar a busca por fármacos, uma vez que, identificada a estrutura do composto protótipo, esta poderá ser modificada com o intuito de melhorar suas propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas.^{14,15}

A busca por novas espécies químicas obtidas de produtos naturais é muito importante dada a sua diversidade e complexidade estrutural.¹³ Embora tenham ocorrido grandes avanços nas técnicas de obtenção e purificação de substâncias naturais, há ainda, uma grande dificuldade para sua síntese.¹³ Apesar do Brasil ser um país rico em biodiversidade e detentor de vários biomas terrestres, muitas espécies da fauna e flora brasileira não foram exploradas como matéria-prima para a produção de medicamentos.^{13,15}

Evidências demonstram que grande parte dos medicamentos utilizados na clínica, foram descobertos a partir de produtos naturais extraídos de organismos como: plantas, fungos, bactérias e/ou (semi) sintetizados em laboratório.¹⁵ Como exemplo, podemos citar a morfina, um alcaloide isoquinolínico do ópio, que serviu de modelo para o desenvolvimento da meperidina, analgésico empregado no tratamento da dor aguda pós-operatória.¹⁵ Assim como a meperidina foi obtida por simplificação molecular da morfina, o alcaloide quinina também serviu como protótipo para a descoberta da mefloquina, que é utilizada como antimalárico.¹⁵ Ademais, aumentos significativos no número de estudos dos parâmetros físico-químicos dos produtos naturais têm chegado a conclusão de que as bases de dados de produtos naturais apresentam um maior grau de “druglikeness”, isto é, possuem uma probabilidade maior de serem aprovados nos ensaios farmacocinéticos, quando comparados com os compostos oriundos

tanto de bibliotecas sintéticas como combinatórias.¹⁶ Desta forma, o emprego de bases de dados de produtos naturais pode ser uma alternativa promissora no desenvolvimento de fármacos contra a doença de Chagas.

No presente trabalho empregamos a Triagem Virtual na *Tripanotiona Redutase* de *Trypanosoma cruzi* (TcTR) utilizando a Base de Dados de Produtos Naturais do Semiárido Baiano (NatProDB, <http://natprodb.uefs.br/>),¹⁷ a fim de verificar quais moléculas possuem atividade inibitória contra esse alvo. Dentre as diversas bases de dados de produtos naturais disponíveis para acesso público utilizou-se o NatProDB¹⁷ como fonte de pesquisa e seleção de moléculas, pois alguns dos compostos encontrados no semiárido da Bahia não possuem informações de atividade biológica, indicando que os mesmos são poucos explorados no planejamento de fármacos.¹⁸ Assim, o emprego de bibliotecas como o NatProDB¹⁷ pode ser relevante para a escolha dos compostos que possam interagir com a TcTR, permitindo, dessa forma, que sejam selecionadas moléculas que, em tese, tenham melhores atividades, efeitos terapêuticos mais pronunciados e efeitos adversos mínimos. Ademais, essa base foi desenvolvida por nossos colaboradores^{17,18} com o objetivo de auxiliar as pesquisas na identificação de novas espécies químicas, enriquecendo, dessa maneira, o espaço químico de onde poderão surgir novas entidades que também sejam úteis para o emprego contra as DTN.

2. Metodologia

Para realização dos cálculos de Triagem Virtual das moléculas do NatProDB na estrutura da *Tripanotiona Redutase* de *Trypanosoma cruzi* (TcTR) foi empregado um computador pessoal contendo sistema operacional *Linux (Ubuntu 12.0.4)* com processador *Intel® Core 2 Quad* com 4GB de RAM e 160GB de disco rígido. As estruturas

químicas das 50 melhores moléculas selecionadas pela triagem foram desenhadas no programa *ChemBioDraw v.12* (*ChemBioDraw® Ultra 12.0.2*) e as imagens 3D dos complexos TcTR-ligantes foram analisadas e geradas no *Pymol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC)*. Os resultados de uma triagem dependem da execução de várias etapas importantes neste processo (seleção dos compostos ativos, escolha dos parâmetros da triagem,...) e estas estão discriminadas abaixo.

2.1. Preparação das estruturas da proteína e dos ligantes da base de dados do NatProDB

A estrutura da proteína empregada para a Triagem Virtual por acoplamento molecular foi a estrutura cristalográfica da TcTR obtida no *Protein Data Bank* (PDB ID: 1BZL, <http://pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1bzl>), resolvida em 2,40 Å.¹⁹ A estrutura da TcTR foi preparada utilizando as ferramentas do *AutoDock v.4.2* no qual as moléculas dos cofatores (FAD), água e do substrato natural (GCG) foram automaticamente removidas.²⁰ Além disso, os átomos de hidrogênio polares (hidrogênios ligados a átomos eletronegativos) foram adicionados à estrutura e os átomos de hidrogênio não polares foram unidos (*merge*) aos átomos de carbono vizinhos para a realização dos cálculos. As cargas *Gasteiger* foram calculadas e os tipos de átomos foram assinalados para todos os átomos da proteína.²¹

O NatProDB¹⁷ contém compostos de origem natural, com grande diversidade química (como os terpenos, diterpenos, flavonoides, cumarinas, fenilpropanóides, dentre outros)¹⁸ e que podem ser livremente empregados, inclusive em ensaios de Triagem Virtual para o processo de descoberta de moléculas bioativas. Atualmente, este banco de dados de produtos naturais contém

aproximadamente 555 moléculas (dados de agosto de 2015) em formatos mol e pdbqt. Devido ao elevado número de arquivos a serem usados neste estudo, empregou-se o programa *Raccoon v.1.0* para a automatização dos procedimentos.²² Este, realiza uma análise prévia tanto dos arquivos da proteína (TcTR) quanto dos ligantes verificando seu formato, estado de protonação, distribuição de cargas e sua localização no computador. O *Raccoon v.1.0* recusou apenas um arquivo pdbqt de todas as moléculas do NatProDB.¹⁷ Dessa maneira, realizou-se a triagem com 554 moléculas obtidas do semiárido da Bahia.

2.1.1. Geração da rede

A rede (do inglês, *grid*) é um método empregado no *AutoDock v.4.2*²⁰ onde os pontos em cada dimensão (*x*, *y* e *z*) são ajustados com a finalidade de se ocupar praticamente todo o sítio ativo da proteína e/ou as regiões do sítio que tenham interações importantes com os ligantes.²³ Os parâmetros da rede do nosso estudo tiveram as seguintes configurações:

- i) Número de pontos nas dimensões *x*, *y* e *z*: 55, 72 e 35 respectivamente.
- ii) Coordenadas do centro da rede= 23,380; 6,466; -3,962, respectivamente (valores em Å)
- iii) Espaçamento da rede= 0,375 Å.

Neste trabalho, a configuração da rede considerou alguns resíduos de aminoácidos da TcTR que possuem interações fundamentais com o seu substrato natural (T[S]₂), destacando-se: Trp22, Ser110, Tyr111 da cadeia A, os resíduos do sítio γ -Glu da cadeia B como His461', Glu466', Glu467' (onde o apóstrofo "" indica resíduos que pertencem a cadeia B da TcTR), dentre outros^{7,9}. Seguiu-se os cálculos dos parâmetros da rede através do comando *AutoGrid*, um executável dentro do programa *AutoDock v.4.2*.²⁰

2.2. Triagem Virtual por Acoplamento utilizando o *AutoDock v.4.2*

A Triagem Virtual por acoplamento molecular foi realizada utilizando o *AutoDock v.4.2*²⁰ onde está implementado o Algoritmo Genético Lamarckiano (AGL). Este acoplamento tem por finalidade posicionar as moléculas do NatProDB¹⁷ (ligantes) na TcTR, através da amostragem de coordenadas espaciais dos ligantes no sítio de ligação (definido pelo *grid*) com a consequente aplicação de uma função de pontuação.²³ O AGL utiliza o mesmo princípio da evolução biológica onde cada conformação dos ligantes é tratada como um gene.^{14,21} A população de genes é submetida a um procedimento análogo à evolução no qual o objetivo é analisar as diferentes conformações das moléculas do NatProDB¹⁷ acopladas no sítio ativo da TcTR. A simulação é seguida pelo algoritmo de busca local que realiza uma minimização de energia sobre a população de indivíduos onde as conformações com energias mais baixas são, em seguida, transferidas para a próxima geração, sendo este processo repetido iterativamente até atingir o valor de gerações indicado pelo usuário²¹: no nosso estudo, 50 gerações.

Das 554 moléculas acopladas no sítio da TcTR, foram discriminados os 50 melhores complexos proteína-ligante. Esta classificação é baseada na energia de interação (ΔG_{bind}) proteína-ligante (TcTR-NatProDB), pois as funções de pontuação no *AutoDock v.4.2*²⁰ empregam, para o cálculo energético, o campo de força AMBER da mecânica molecular.²¹

2.3. Análise dos agrupamentos de ligantes usando o *AuPosSOM*

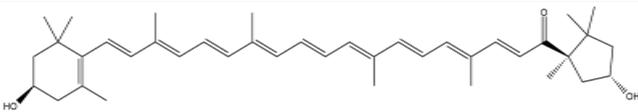
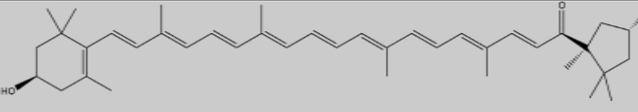
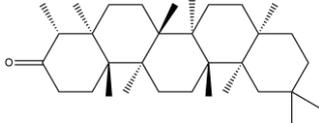
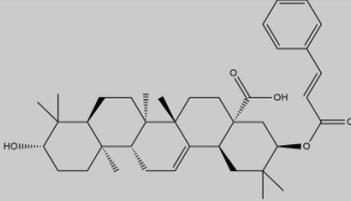
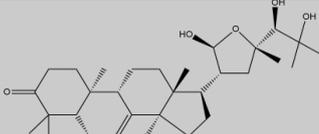
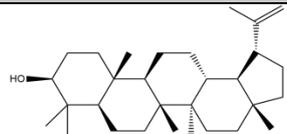
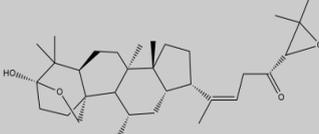
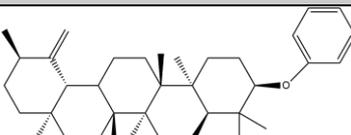
A análise automática das conformações dos 50 melhores complexos TcTR-ligante foi realizada através do servidor *AuPosSOM* (<https://www.biomedicale.univ->

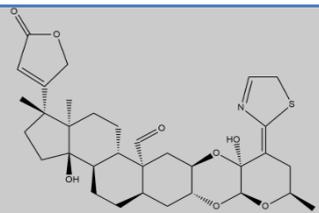
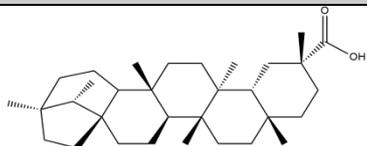
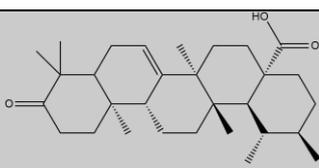
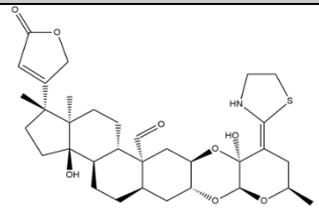
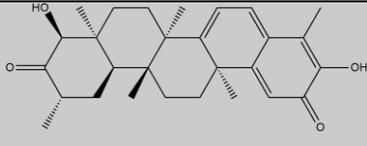
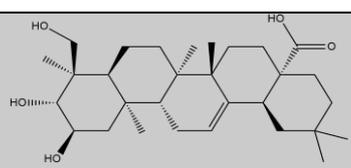
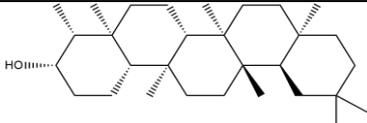
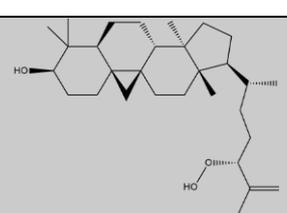
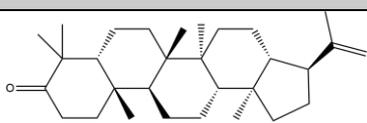
[paris5.fr/aupossom/](https://www.biomedicale.univ-paris5.fr/aupossom/))²⁴ que utiliza um mapa de auto-organização das interações em cada conformação. O *AuPosSOM*²⁴ analisa um conjunto dos complexos proteína-ligante com o intuito de classificar as interações químicas presentes em cada complexo agrupando-os de acordo com as suas similaridades. O conjunto das interações dos complexos proteína-ligante responsáveis pela diferença dos modos de ligação entre os ligantes e os ligantes não ativos (*decoys*) são o ponto chave para o sucesso das análises de agrupamentos.²⁵ A interface do *AuPosSOM*²⁴ exige como arquivos de entrada um arquivo multi mol2 do receptor juntamente com todos os ligantes a serem analisados. A partir disso, são comparadas as interações atômicas entre a TcTR e os ligantes, as quais, posteriormente, são combinadas para conter informações de ligantes diferentes.²⁴ O *AuPosSOM*²⁴ demonstrou bons resultados quando aplicado na análise dos inibidores da trombina, discriminando melhor os compostos ativos (ligantes) dos *decoys*, o que o torna um bom método para avaliar os resultados de acoplamento numa triagem virtual.^{24,25} Por isso, o *AuPosSOM*²⁴ representa uma abordagem promissora para escolha de compostos ativos através da similaridade de contato destes com um alvo terapêutico.

3. Resultados e Discussão

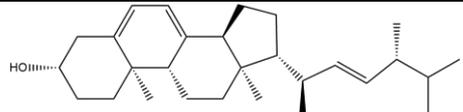
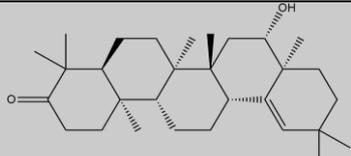
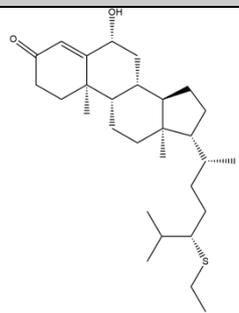
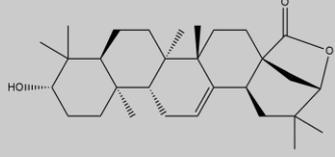
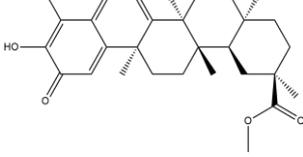
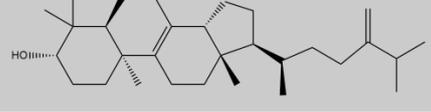
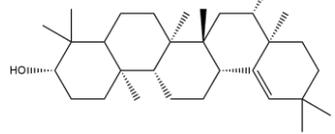
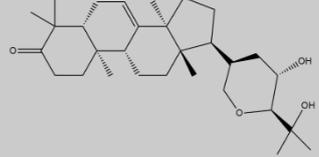
Utilizando a base de dados de Produtos Naturais do Semiárido Baiano (<http://natprodb.uefs.br/>)¹⁷ selecionamos os 50 melhores ligantes de acordo com seus valores de energia de interação com a TcTR (Tabela 1). O objetivo é distinguir as conformações de melhor energia de ligação e, assim, selecionar um conjunto de compostos ativos com base nas interações intermoleculares envolvidas no processo de reconhecimento molecular entre a TcTR e os produtos naturais do semiárido baiano.²³

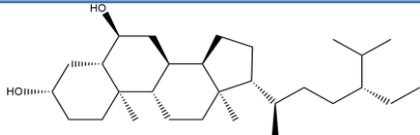
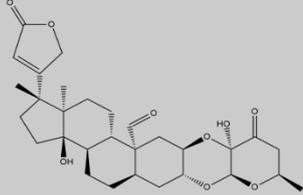
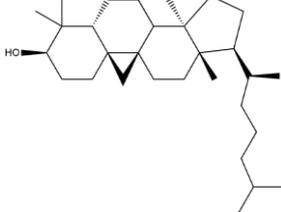
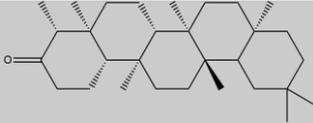
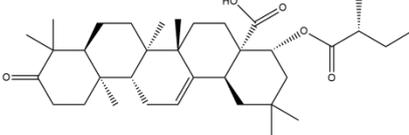
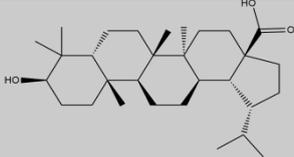
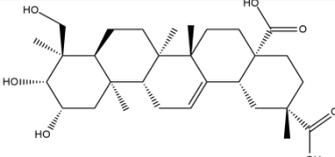
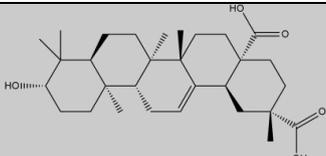
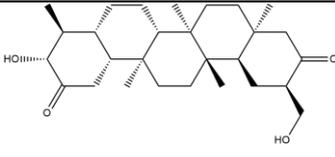
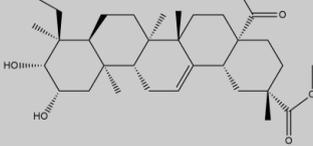
Tabela 1. Lista das 50 melhores energias de interação (kcal/mol) calculadas pelo *AutoDock* v. 4.2²⁰ após triagem virtual contra a TcTR usando a Base de Dados de Produtos Naturais do Semiárido Baiano (<http://natprodb.uefs.br/>)¹⁷

#	Código do NatProDB ¹⁷	Energia de interação (kcal/mol)	Estruturas químicas
1	TCA	- 12, 41	
2	CGA	- 10, 59	
3	REA	- 10, 05	
4	CLA	- 9, 61	
5	EAA	- 9, 48	
6	QNA	- 9, 47	
7	UJA	- 9, 47	
8	TDA	- 9, 41	
9	IBA	- 9, 39	

10	ZAA	- 9, 39	
11	OEA	- 9, 36	
12	FAA	- 9, 32	
13	ZSA	- 9, 31	
14	SEA	- 9, 27	
15	VEA	- 9, 27	
16	OTA	- 9, 22	
17	LTA	- 9, 21	
18	DEA	- 9, 16	
19	IIA	- 9, 14	

20	RRA	- 9,14	
21	QOA	- 9,12	
22	NSA	- 9,08	
23	RCA	- 9,08	
24	GUA	- 9,06	
25	GIA	- 9,02	
26	ZNA	- 9,01	
27	BFA	- 8,98	
28	WIA	- 8,96	
29	MIA	- 8,95	
30	HFA	- 8,94	

31	FUA	- 8,93	
32	JVA	- 8,90	
33	KVA	- 8,90	
34	LUA	- 8,89	
35	HBA	- 8,88	
36	UUA	- 8,88	
37	LEA	- 8,87	
38	ZTA	- 8,87	
39	BLA	- 8,85	
40	WNA	- 8,81	

41	IGA	- 8,80	
42	XAA	- 8,73	
43	AEA	- 8,69	
44	IFA	- 8,69	
45	QSA	- 8,69	
46	ZCA	- 8,66	
47	POA	- 8,65	
48	ROA	- 8,61	
49	NEA	- 8,59	
50	OOA	- 8,59	

Após a triagem virtual, é possível realizar a análise automática das conformações dos melhores complexos usando um mapa de auto-organização calculado pelo servidor *AuPosSOM*²⁴. Este servidor, analisa os resultados através de interações entre o complexos TcTR-ligantes agrupando-os conforme suas similaridades de interação após o processo de triagem virtual.^{24,25} No nosso estudo submetemos a análise do *AuPosSOM*²⁴ os 50 melhores complexos (Tabela 1).

Estas similaridades de interação podem ser visualizadas através da “árvore de Newick” gerada pelo *AuPosSOM*²⁴ (Figura 3). A árvore de Newick mostra como diferentes ligantes podem compartilhar um mesmo tipo de interação química com uma ou mais regiões específicas do sítio ativo da TcTR, isto é, cada grupo (“ramo”) da árvore com seus respectivos compostos, agrupados com base na similaridade de suas interações ligadas e não-ligadas, interage com certos resíduos presentes no sítio da TcTR.

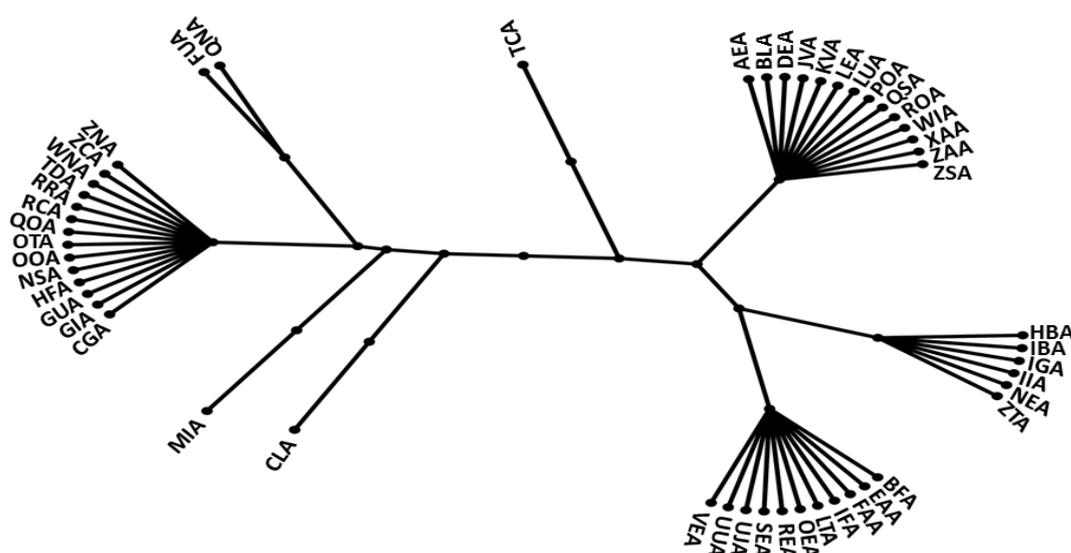


Figura 3. Árvore de Newick calculada pelo *AuPosSOM*²⁴ para os 50 complexos de melhor energia de interação (Tabela 1) selecionados pela triagem virtual contra a TcTR usando a Base de Dados de Produtos Naturais do Semiárido Baiano (<http://natprodb.uefs.br/>)¹⁷

O padrão distinto de interação entre os oito grupos apresentados na árvore de Newick (Figura 3) pode indicar uma seletividade diferente dos 50 ligantes mais ativos frente à TcTR. A fim de se avaliar esta hipótese, foram analisadas as interações

envolvendo cada grupo (“ramo”) presente na árvore de Newick (Figura 3). Desta maneira, construiu-se a Tabela 2, onde estão mostrados os 8 grupos da árvore de Newick com os seus ligantes particulares e a listagem das interações conservadas entre eles.

Tabela 2. Lista dos resíduos do sítio ativo da TcTR que interagem com as 50 moléculas mais

ativas do NatProDB (<http://natprodb.uefs.br/>)¹⁷ agrupados pelo *AuPosSOM*²⁴

Grupo	Código do NatProDB ¹⁷	Resíduos interagentes da TcTR	Nº total de resíduos interagentes na TcTR
Grupo 1	TCA	Ile107, Phe396', Thr397', Pro398', Leu399', Met400', His401', Lys402', Val403', Ser404', Gly405', Ser406', Lys407', Phe411', Val412', Ala413', Leu429', Ile437', Ile441', Gly459', His461', Pro462', Thr463', Ser464', Ala465', Glu466', Glu467', Leu468', Cys469', Met471', Arg472'	31
Grupo 2	KVA, WIA, LEA, ZSA, POA, DEA, QSA, LUA, AEA, JVA, ZAA, ROA, XAA, BLA	Asn106, Ile107, Ser110, Phe396', Thr397', Pro398', Leu399', Met400', Lys402', Val403', Pro462', Thr463', Glu467', Leu468'	14
Grupo 3	IGA, IIA, NEA, IBA, ZTA, HBA	Ser15, Gly16, Cys53, Val54, Cys58, Val59, Lys62, Tyr111, Asp112, Glu113, Thr335, Pro336, Ile339, Asn340, Leu399', Met400', His461', Pro462', Thr463', Leu468'	20
Grupo 4	FAA, IFA, BFA, VEA, SEA, OEA, REA, EAA, LTA, UJA, UUA	Ser15, Cys53, Val54, Cys58, Val59, Lys62, Ile107, Lys109, Ser110, Asp112, Glu113, Pro336, Ala338, Ile339, Asn340, Pro398', Leu399', Met400', His461', Pro462', Thr463', Ser464', Ala465', Glu467', Leu468'	25
Grupo 5	CLA	Ser15, Cys53, Val54,	31

		Cys58, Val59, Lys62, Ile107, Lys109, Ser110, Asp112, Glu113, Pro336, Ala338, Ile339, Asn340, Pro398', Leu399', Met400', Asn456', Thr457', Ile458', Gly459', His461', Pro462', Glu466', Glu467', Leu468', Cys469', Ser470', Met471', Arg472'	
Grupo 6	MIA	Cys53, Val54, Cys58, Val59, Lys62, Ile107, Lys109, Tyr111, Asp112, Glu113, Thr335, Pro336, Ala338, Ile339, Asn340, Phe396', Thr457', Ile458', Cys459', His461', Pro462', Glu466', Glu467', Cys469', Ser470', Met471', Arg472'	27
Grupo 7	TDA, QOA, HFA, GUA, ZNA, GIA, ZCA, OOA, RRA, NSA, CGA, WNA, OTA, RCA	Pro336, Ala338, Ile339, Asn340, Gly459', Glu466', Ser470', Met471'	8
Grupo 8	QNA e FUA	Ser15, Val59, Lys62, Pro336, Ala338, Ile339, Asn340, Phe396', Asn456', Thr457', Ile458', Gly459', His461', Pro462', Glu466', Glu467', Cys469', Met471', Arg472'	19

Diversos sítios de interação já foram descritos na TcTR e os mesmos foram descobertos a partir dos seus diferentes inibidores da TcTR testados: aminas carregadas,²⁶ derivados clorpromazínicos,⁹ sais de alquilamônio quaternário,²⁶ derivados peptídicos,²⁷ dentre outros. A análise do acesso dos produtos naturais contidos no NatProDB¹⁷ aos sítios de interação mais importantes da TcTR, pode auxiliar tanto no

entendimento da ação destes derivados naturais quanto no planejamento de novos inibidores que tenham uma maior diversidade química, diferente dos compostos testados até o presente.^{7,9,26,27} Por conseguinte, para as 50 moléculas mais ativas (Tabela 1), presentes nos 8 grupos analisados pelo *AuPosSOM*²⁴ (Tabela 2), foram analisadas suas interações nos subsítios da TcTR (Tabela 3).^{7,9,26,27}

Tabela 3. Subsítios da TcTR que interagem com as 50 moléculas mais ativas dos 8 grupos calculados pelo *AuPosSOM*²⁴

Subsítios da TcTR ²⁷	Resíduos dos subsítios da TcTR	Grupos do <i>AuPosSOM</i> ²⁴
Sítio γ -Glu	His461'	1, 3, 4, 5, 6 e 8
	Glu466'	1, 5, 6, 7 e 8
	Glu467'	1, 2, 4, 5, 6 e 8
Sítio Z	Phe396'	2, 3, 6 e 8
	Pro398'	1, 2, 4 e 5
	Leu399'	1, 2, 3, 4 e 5
Fenda Hidrofóbica	Leu18	----
	Trp22	----
	Tyr111	3 e 6
	Met114	----
Sítio Y ²⁴	Cys469'	1, 5, 6 e 8
	Ser470'	6 e 7
	Met471'	1, 5, 6, 7 e 8
	Arg472'	1, 5, 6 e 8

Analisando a Tabela 3 é possível notar que todos os grupos (1 a 8) possuem interações polares conservadas com pelo menos um resíduo do sítio γ -Glu⁹ da TcTR: His461', Glu466' e Glu467' (Figura 4). Este sítio apresenta resíduos doadores e aceptores de prótons, por exemplo: o resíduo catalítico His461', onde o imidazol é mantido em sua conformação ótima para a catálise através de uma ligação hidrogênio formada entre seu N_{δ1} e o O_{ε1} do Glu466'.²⁷ A His461' é um resíduo essencial da TcTR, pois interage por ligação hidrogênio com o resíduo γ -Glu-II do substrato natural (T[S]₂), podendo, portanto, mimetizar esta mesma interação com os ligantes mais ativos do NatProDB.^{17,27} A

ligação hidrogênio entre a His461' e o Glu466' permite que este último resíduo atue como doador de prótons no mecanismo de catálise da TcTR.²⁸ Em contrapartida, o resíduo Glu467' está relacionado com a neutralização do sítio ativo e também apresenta uma ligação hidrogênio com o resíduo γ -Glu-II do ligante endógeno.^{7,27} Sete (TCA, REA, CLA, EAA, QNA, UJA e ZAA) dos dez ligantes mais ativos do NatProDB¹⁷ (Tabela 1), interagem com este resíduo, indicando que estes compostos poderiam competir com o resíduo γ -Glu-II do T[S]₂ na ligação com o Glu467'⁷ e, com isso, impedir o mecanismo de catálise da TcTR, essencial para a sobrevivência do *T. cruzi* (Figura 4).

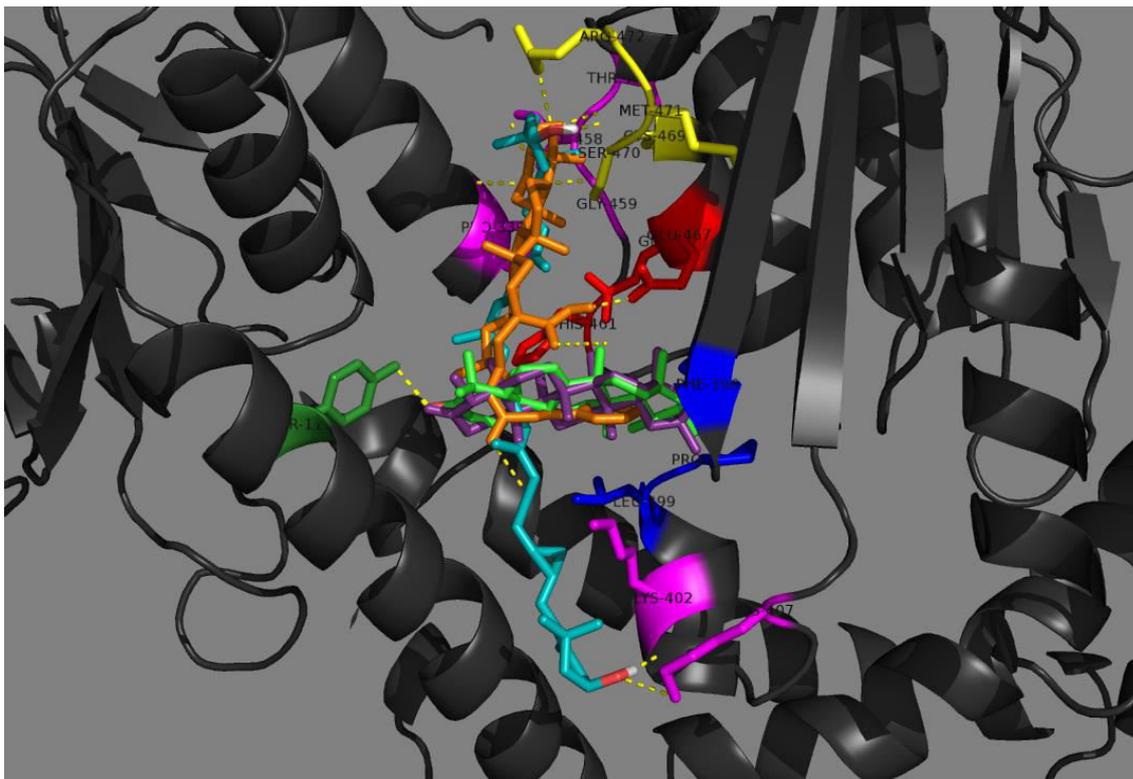


Figura 4. Interações por ligação hidrogênio (pontilhados amarelos) dos 4 ligantes mais ativos (TCA, REA, CLA, EAA) do NatProDB¹⁷ (Tabela 1) com os resíduos polares do sítio ativo da TcTR.⁹ A estrutura da TcTR está representada em *cartoon* (cinza escuro), os resíduos da TcTR e os ligantes estão representados em bastões: o sítio γ -Glu⁹ (vermelho), o sítio Z⁹ (azul marinho), o sítio Y²⁷ (amarelo), a Tyr111 do sítio hidrofóbico⁹ (verde escuro), outros resíduos interagentes (magenta), os ligantes TCA (ciano), REA (roxo), CLA (laranja), EAA (verde claro). A figura foi gerada pelo programa PyMOL (*The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC*)

Da mesma forma todos os grupos, exceto 7, apresentam interações químicas com ao menos um resíduo do sítio Z⁹: Phe396', Pro398' e Leu399'. Este sítio foi descoberto a partir da análise molecular da região próxima ao resíduo de Phe396' que, juntamente com os resíduos Pro398' e Leu399', compõem o segundo sítio hidrofóbico, o qual não é acessado pelo substrato natural da enzima (T[S]₂).⁹ A maioria dos ligantes, selecionados

pela triagem, com as melhores energias de interação com a TcTR (Tabela 1), apresentam em sua estrutura um núcleo esteroidal apolar. Dessa forma, a interação desses derivados esteroidais com os resíduos do sítio Z⁹ da TcTR (Figura 5) pode fornecer uma maior seletividade no mecanismo de inibição dessa enzima frente à isoforma humana e, conseqüentemente, contribuir para o desenvolvimento de fármacos antichagásicos.

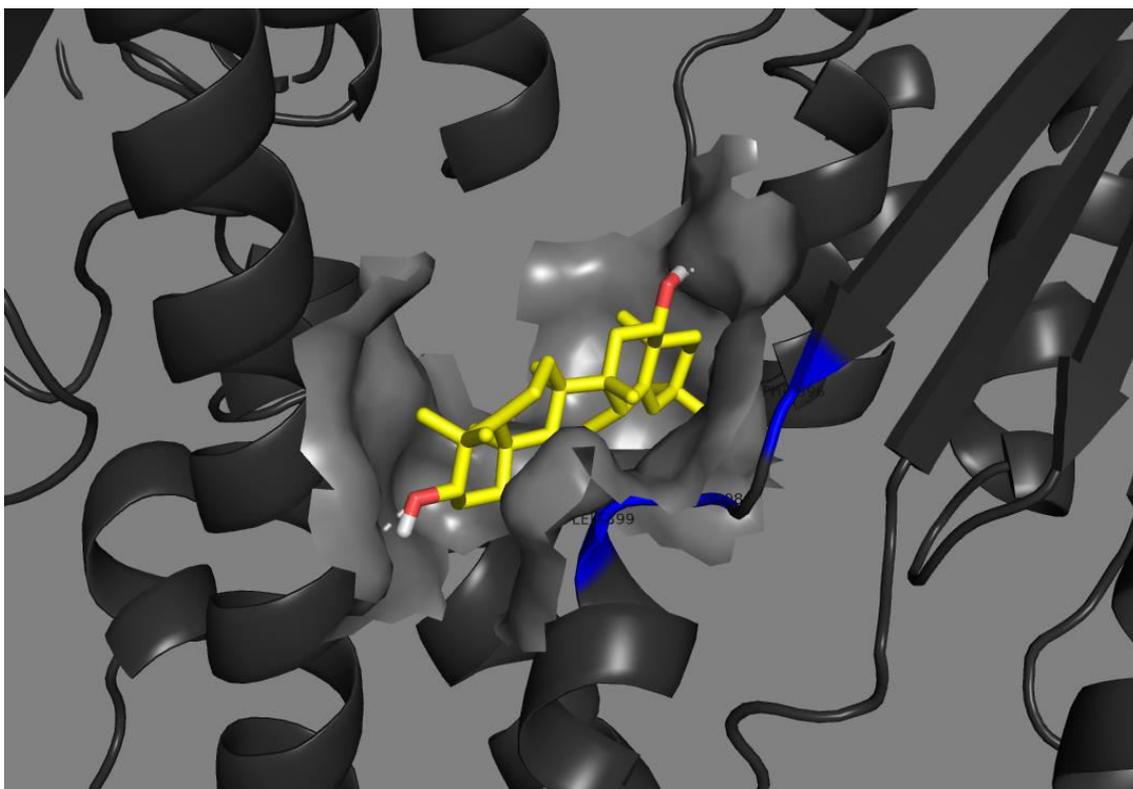


Figura 5. Interações do ligante BLA com os resíduos Phe396', Pro398' e Leu399' da TcTR.⁹ A estrutura da TcTR está representada em *cartoon* (cinza escuro), o ligante está representado em bastão amarelo e o sítio Z⁹ (azul marinho). A superfície molecular hidrofóbica formada pelo sítio Z⁹ na TcTR está representada em cinza. A figura foi gerada pelo programa PyMOL (*The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC*)

Os compostos presentes nos grupos 3 e 6 (Tabela 2) foram os únicos que apresentaram contatos com o resíduo de Tyr111 da fenda hidrofóbica⁹, conforme calculados pelo servidor *AuPosSOM*²⁴ (Tabela 3). Esta fenda hidrofóbica compreende as cadeias laterais dos resíduos de Leu18, Trp22, Tyr111 e Met114 do sítio ativo da TcTR⁹, que acomodam a cadeia espermidina do T[S]₂.¹⁹ Os ligantes IGA, IIA, NEA, IBA, ZTA, HBA e MIA interagiram com a Tyr111 porque foram os únicos deste estudo que conseguiram se orientar de modo a acessarem a porção superior desta fenda hidrofóbica. A Tyr111 pode interagir de duas formas principais:

interações por ligação hidrogênio e interações de van der Waals.²⁷ Uma interação por ligação hidrogênio do ligante MIA é observada com a hidroxila da cadeia lateral da Tyr111 no sítio hidrofóbico da TcTR (Figura 6). A Tyr111 é um resíduo importante para interação com esses compostos, pois já foi demonstrado que esse tipo de interação é fundamental para o reconhecimento intermolecular receptor-ligante.²⁷ Além de participar de interações por ligação hidrogênio, a Tyr111 poderá interagir por interações de van der Waals, mimetizando assim, a interação com uma porção da cadeia espermidina do T[S]₂.^{9,19}

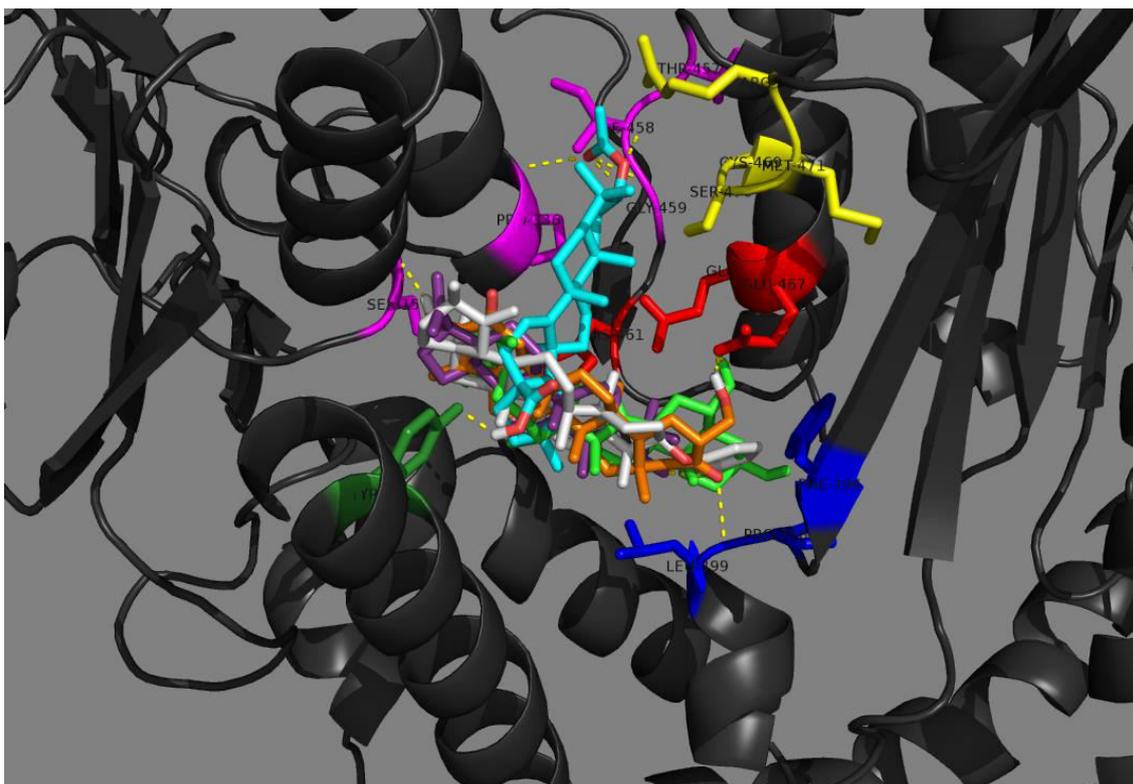


Figura 6. Interações de 4 ligantes do grupo 3 (IGA, IIA, NEA e IBA) e grupo 6 (MIA) do NatProDB¹⁷ (Tabela 2) com os resíduos do sítio ativo da TcTR.⁹ A estrutura da TcTR está representada em *cartoon* (cinza escuro), os resíduos da TcTR e os ligantes em bastões: o sítio γ -Glu⁹ (vermelho), o sítio Z⁹ (azul marinho), o sítio Y²⁷ (amarelo), a Tyr111 da fenda hidrofóbica⁹ (verde escuro), outros resíduos interagentes (magenta), os ligantes IGA (verde claro), IIA (roxo), NEA (laranja), IBA (branco), MIA (ciano). As interações por ligação hidrogênio estão pontilhadas em amarelo. A figura foi gerada pelo programa PyMOL (*The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC*)

Por fim, os ligantes agrupados em 1, 5, 6, 7 e 8 realizam interações polares (Figura 7) com os resíduos do sítio Y, o mais recente sítio de interação na TcTR (Tabela 3), descrito por Pita e colaboradores²⁷ em estudos de Dinâmica Molecular com inibidores peptídicos complexados à TcTR. Esta região, assim como o sítio Z, não é acessada pelo substrato natural da enzima.^{9,27} Logo, interações neste local podem corroborar a

ideia de um novo sítio para acesso pelos inibidores que revelem uma maior afinidade de ligação à TcTR, o que pode contribuir para a descoberta de compostos mais potentes.

Portanto, com base nos resultados anteriores é possível concluir que os valores de energia de ligação calculados na triagem são compatíveis com as interações dos ligantes nos sítios de ligação da TcTR descritos previamente na literatura.^{7,9,26,27}

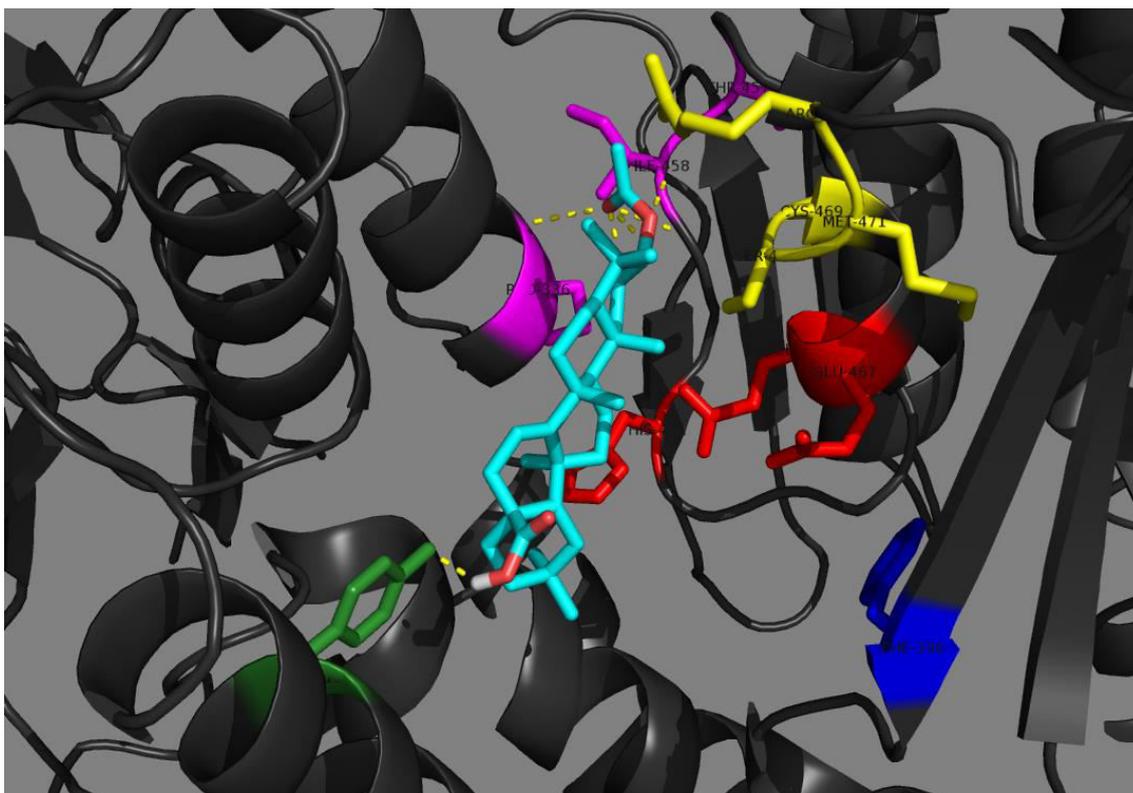


Figura 7. Interações por ligação hidrogênio (pontilhados amarelos) do ligante MIA com os resíduos Cys469', Met471' e Arg472' da TcTR.²⁷ A estrutura da TcTR está representada em *cartoon* (cinza escuro), os resíduos da TcTR e os ligantes estão representados em bastões: o sítio γ -Glu⁹ (vermelho), o sítio Z⁹ (azul marinho), o sítio Y²⁷ (amarelo), outros resíduos interagentes (magenta) e o ligante MIA (ciano). A figura foi gerada pelo programa PyMOL (*The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC*).

4. Conclusões

A doença de Chagas é classificada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das 17 doenças negligenciadas mais prevalentes no mundo e ainda há pouco interesse na descoberta de novos fármacos contra essa doença. Desde a sua descoberta, em 1909, vários esforços vêm sendo empregados na tentativa de encontrar uma terapia mais eficaz e com maior atividade contra todas as formas do parasito. Entretanto, atualmente não há tratamento para a fase crônica da doença, uma vez que o benzonidazol só é efetivo contra as formas sanguíneas do *T. cruzi*.

Através deste estudo empregou-se a Triagem Virtual baseada na estrutura da

Tripanotona Redutase de *Trypanosoma cruzi* (TcTR) selecionando-se as moléculas mais ativas a partir da Base de Dados de Produtos Naturais do Semiárido Baiano, o NatProDB (<http://natprodb.uefs.br/>). As moléculas com as melhores interações com a TcTR, segundo a triagem, conseguiram interagir nas diversas regiões descritas no sítio desta enzima, confirmando, deste modo, que esta técnica pode ser empregada como método de partida para a identificação de novos inibidores da TcTR.

A análise automática das conformações de acoplamento através do mapa de auto-organização (*AuPosSOM*) conseguiu agrupar e discriminar as principais interações envolvendo estes ligantes e seu alvo terapêutico. Portanto, foi possível verificar que todos os ligantes selecionados pela

triagem (Tabela 1), apresentaram interações relevantes frente à TcTR, porém visando a aquisição e avaliação biológica das moléculas mais promissoras, selecionou-se aquelas agrupadas em 1 (TCA), 5 (CLA) e 6 (MIA), pois estas conseguiram interagir com os dois sítios (Z e Y), que não são acessados pelo substrato natural da enzima, o T[S]₂.

Além disso, estes ligantes interagiram com o maior número de resíduos na TcTR (31, 31 e 27 respectivamente, Tabela 2). Logo, estas moléculas poderão, futuramente, serem testadas em ensaios de inibição enzimática visando corroborar os resultados computacionais encontrados neste estudo.

Atualmente, as pesquisas na área de desenvolvimento de fármacos antichagásicos vêm crescendo a cada dia. Contudo, a TcTR é, ainda, um alvo pouco explorado para a pesquisa de candidatos a fármacos e novos estudos precisam ser realizados a fim de esclarecer, de modo mais detalhado, as interações da TcTR com os ligantes do NatProDB.

Referências Bibliográficas

¹ Torres, F. A. E.; Passalacqua, T. G.; Velásquez, A. M. A.; de Souza, R. A.; Colepicolo, P.; Graminha, M. A. S. New drugs with antiprotozoal activity from marine algae: a review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. **2014**, *24*, 265. [CrossRef]

² Rocha, A. de Jesus; *Monografia*, Universidade Federal da Bahia, Brasil, 2012.

³ Schmidt, T. J.; Khalid, S. A.; Romanha, A. J.; Alves, T. Ma.; Biavatti, M. W.; Brun, R.; Da Costa, F. B.; de Castro, S. L.; Ferreira, F. V.; de Lacerda, M. V. G.; Lago, J. H. G.; Leon, L. L.; Lopes, N. P.; das Neves Amorim, R. C.; Niehues, M.; Ogungbe, I. V.; Pohlit, A. M.; Scotti, M. T.; Setzer, W. N.; de N. C. Soeiro, M.; Steindel, M.; Tempone, A. G. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases - part I. *Current Medicinal Chemistry* **2012**, *19*, 2128. [CrossRef] [PubMed]

⁴ PAHO/WHO. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743>. Acessado em: 1 Abril 2015.

⁵ Maccari, G.; Jaeger, T.; Moraca, F.; Biava, M.; Flohé, L.; Botta, M. A fast virtual screening approach to identify structurally diverse inhibitors of trypanothione reductase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011**, *21*, 5255. [CrossRef] [PubMed]

⁶ Fairlamb, A. H.; Cerami, A. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annual Reviews of Microbiology* **1992**, *46*, 695. [CrossRef] [PubMed]

⁷ Pita, S. S. da R.; Pascutti, P. G. Alvos Terapêuticos na Doença de Chagas: a Tripanotiona Redutase como Foco *Revista Virtual de Química*. **2011**, *3*, 307. [CrossRef]

⁸ Dias, L. C.; Dessoy, M. A.; Silva, J. J. N.; Thiemann, O. H. Oliva, G.; Andricopulo, A. D. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. *Química Nova* **2009**, *32*, 2444. [CrossRef]

⁹ Chan, C.; Yin, H.; Garforth, J.; McKie, J. H.; Jaouhari, R.; Speers, P.; Douglas, K. T.; Rock, P. J.; Yardley, V.; Croft, S. L.; Fairlamb, A. H. Phenothiazine Inhibitors of Trypanothione Reductase as Potential Antitrypanosomal and Antileishmanial Drugs. *Journal of Medicinal Chemistry* **1998**, *41*, 148. [CrossRef] [PubMed]

¹⁰ Krieger, S.; Schwarz, M. R.; Ariyanayagam, M. R.; Fairlamb, A. H.; Krauth-Siegel, R. L.; Clayton, C. Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. *Molecular Microbiology* **2000**, *35*, 542. [CrossRef]

¹¹ Oliveira, R. B.; Zani, C. L.; Ferreira, R. S.; Leite, R. S.; Alves, T. M. A.; Silva, T. H. A.; Romanha, A. J. Síntese, avaliação biológica e modelagem molecular de arilfuranos como inibidores da enzima tripanotiona reductase. *Química Nova* **2008**, *31*, 261. [CrossRef]

¹² Krauth-Siegel, R. L.; Comini, M. A. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta* **2008**, *1780*, 1236. [CrossRef] [PubMed]

- ¹³ Montanari, C. A.; Bolzani, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Química Nova* **2001**, *24*, 105. [CrossRef]
- ¹⁴ Rodrigues, P. R.; Mantoani, S. P.; de Almeida, J. R.; Pinsetta, F. R.; Semighini, E. P.; da Silva, V. B.; da Silva, C. H. P. Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos. *Revista Virtual de Química* **2012**, *4*, 739. [CrossRef]
- ¹⁵ Barreiro, E. J.; Bolzani, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Química Nova* **2009**, *32*, 679. [CrossRef]
- ¹⁶ Foye, W. O.; Lemke, T. L.; Williams, D. A.; Eds, 6a. ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2008.
- ¹⁷ Lucchese, A. M.; Vale, A. E. NatProDB page. Disponível em: <<http://natprodb.uefs.br/>>. Acesso em: 10 novembro 2014.
- ¹⁸ Souza, B. C.; Santos, G. C.; Santos Junior, M. C. *Ampliação do NatProDB, uma base virtual de estruturas químicas oriundas do semiárido baiano*. Feira de Santana, Brasil, 2012.
- ¹⁹ Bond, C. S.; Zhang, Y.; Berriman, M.; Cunningham, M. L.; Fairlamb, A. H.; Hunter, W. N. Crystal structure of Trypanosoma cruzi trypanothione reductase in complex with trypanothione, and the structure-based discovery of new natural product inhibitors. *Structure* **1999**, *7*, 81. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁰ Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal Computational Chemistry* **2009**, *30*, 2791. [CrossRef] [PubMed]
- ²¹ Venkatesan, S. K.; Saudagar, P.; Shukla, A. K.; Dubey, V. K. Screening natural products database for identification of potential antileishmanial chemotherapeutic agents. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences* **2011**, *3*, 217. [CrossRef] [PubMed]
- ²² Forli, S. Raccoon|AutoDock VS: an automated tool for preparing AutoDock virtual screenings. Disponível em: <http://mgldev.scripps.edu/raccoon/Raccoon_v1.0_user_manual.pdf>. Acesso em: 23 outubro 2014.
- ²³ Montanari, C. A. *Química Medicinal: Métodos e Fundamentos em Planejamento de Fármacos*. Montanari, C. A., eds., São Paulo: EDUSP, 2011, cap. 9.
- ²⁴ Bouvier, G.; Evrard-Todeschi, N.; Girault J. P.; Bertho, G. Automatic clustering of docking poses in virtual screening process using self-organizing map. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 53. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁵ Mantsyzov, A. B.; Bouvier, G.; Evrard-Todeschi, N.; Bertho, G. Contact-based ligand-clustering approach for the identification of active compounds in virtual screening. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry* **2012**, *5*, 61. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁶ Khan, M. O.; Austin, S. E.; Chan, C.; Yin, H.; Marks, D.; Vaghjiani, S. N.; Kendrick, H.; Yardley, V.; Croft, S. L.; Douglas, K. T. 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* **2000**, *43*, 3148. [PubMed]
- ²⁷ Pita, S. S. da R.; Batista, P. R.; Albuquerque, M. G.; Pascutti, P. G. Molecular Dynamics Simulations of Peptide Inhibitors Complexed With Trypanosoma cruzi Trypanothione Reductase. *Chemical Biology & Drug Design* **2012**, *80*, 561. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁸ Leichus, B. N.; Bradley, M.; Nadeau, K.; Walsh, C. T.; Blanchard, J. S. Kinetic isotope effect analysis of the reaction catalyzed by Trypanosoma congolense trypanothione reductase. *Biochemistry* **1992**, *31*, 6414. [CrossRef] [PubMed]