

Artigo

Análise Farmacofórica da Tripanotiona Redutase (TR) de *Trypanosoma cruzi* Complexada com Inibidores Peptídeo Miméticos

Pita, S. S. R.;* Pascutti, P. G.

Rev. Virtual Quim., 2012, 4 (6), 788-804. Data de publicação na Web: 23 de setembro de 2012

<http://www.uff.br/rvq>

Pharmacophore Analysis of *Trypanosoma cruzi* Trypanothione Reductase (TR) Complexed with Peptide Mimetic Inhibitors

Abstract: The treatment of Chagas disease in its chronic form is inefficient and thus new therapeutic approaches have been studied. Among these, the Trypanothione Reductase (TR) is presented as a selective and specific target for chemotherapy of this disease. We studied, by molecular dynamics (MD) using the program GROMACS, the behavior of a series of six complexes involving *Trypanosoma cruzi* TR and its peptide mimetic inhibitors. This methodology allows the temporal evaluation of multiple conformations of the atoms together with their interactions in each complex. The results revealed some residues in the active site that modulates the enzyme inhibition profile (pharmacophoric groups). From this pharmacophoric analysis, it was possible to select alternative binding sites into the enzyme and we identified some interactions patterns that govern the inhibition of this class of compounds. These informations will be exploited in the rational development of inhibitors of TR aiming to treat Chagas disease.

Keywords: Molecular Dynamics; Chagas' Disease; Trypanothione Reductase; Peptide inhibitors.

Resumo

O tratamento da doença de Chagas em sua forma crônica é ineficiente. Assim, novas abordagens terapêuticas têm sido estudadas. Dentre estas, a Tripanotiona Redutase (TR) apresenta-se como um alvo seletivo e específico para a quimioterapia desta doença. Estudamos, por Dinâmica Molecular (DM) usando o programa GROMACS, o comportamento de uma série de seis complexos envolvendo a TR de *Trypanosoma cruzi* e seus inibidores peptídeo miméticos. Esta metodologia permite o estudo temporal das múltiplas conformações dos átomos em cada complexo conjuntamente às descrições de suas interações. Os resultados obtidos através do mapeamento de átomos do sítio ativo revelaram grupos importantes na modulação do perfil de inibição enzimática (grupos farmacofóricos). A partir desta análise farmacofórica foi possível selecionar sítios alternativos de ligação à enzima e se identificou padrões de interação que regem a inibição da TR pelos peptídeos miméticos. Estes dados serão futuramente aplicados no desenvolvimento racional de fármacos inibidores da TR visando o tratamento da doença de Chagas.

Palavras-chave: Dinâmica Molecular; Doença de Chagas; Tripanotiona Redutase; Inibidores Peptídicos.

*Universidade Federal da Bahia, Av. Barão de Jeremoabo, s/n, Faculdade de Farmácia, Laboratório de Bioinformática e Modelagem Molecular (LaBiMM), Sala 112, Ondina, CEP: 40170-115, Salvador-BA, Brasil.

✉ samuel.pita@ufba.br

DOI: [10.5935/1984-6835.20120057](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20120057)

Análise Farmacofórica da Tripanotiona Redutase (TR) de *Trypanosoma cruzi* Complexada com Inibidores Peptídeo Miméticos

Samuel S. da R. Pita,^{a,b,*} Pedro Geraldo Pascutti^b

^aUniversidade Federal da Bahia, Av. Barão de Jeremoabo, s/n, Faculdade de Farmácia, Laboratório de Bioinformática e Modelagem Molecular (LaBiMM), Sala 112, Ondina, CEP: 40170-115, Salvador-BA, Brasil.

^b Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Carlos Chagas Filho, 393, Centro de Ciências da Saúde, Bloco D, sala 30, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, CEP: 21941-902, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

* samuel.pita@ufba.br

Recebido em 9 de agosto de 2012. Aceito para publicação em 29 de agosto de 2012

1. Introdução

2. Metodologia

- 2.1. Aquisição de Dados
- 2.2. Agrupamento de Conformações (*clusters*)
- 2.3. Construção dos Modelos Farmacofóricos

3. Resultados e Discussão

- 3.1. Estabilidades Estrutural dos complexos
- 3.2. Análise de *Clusters*
- 3.3. Análise dos Modelos Farmacofóricos

4. Conclusões

1. Introdução

A doença de Chagas tem afligido diversas populações no continente americano há mais de 100 anos.¹ Seu agente etiológico é o protozoário flagelado pertencente à classe *Trypanosomatina*, ordem *Kinetoplastida*, espécie *Trypanosoma cruzi*.² Esta ordem filogenética abrange ainda protozoários do gênero *Leishmania* (também patogênico ao

homem) e a *Crithidia fasciculata* (organismo não-patogênico e modelo de estudos de tripanossomatídeos).² Recentes publicações trazem à tona a necessidade de um maior controle terapêutico da doença de Chagas, uma vez que ocorreram micro epidemias as quais revelaram que a doença de Chagas não é mais um mal endêmico, mas sim, uma doença urbana com novos meios globalizados de transmissão e com potencial para se tornar uma ameaça internacional.³⁻⁵

Estas epidemias recentes revelam a patente necessidade de compostos mais ativos para o tratamento da doença de Chagas, posto que os fármacos empregados na clínica foram lançados em 1967, nifurtimox, (5-nitrofurano-[3-metil-4-(5'-nitrofurfulilideamina) tetra-hidro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido], produzido pela Bayer) e 1972, benzonidazol (2-nitroimidazol (N-benzil-2 acetamida de nitroimidazol) manufaturado pela Roche) (Figura 1).

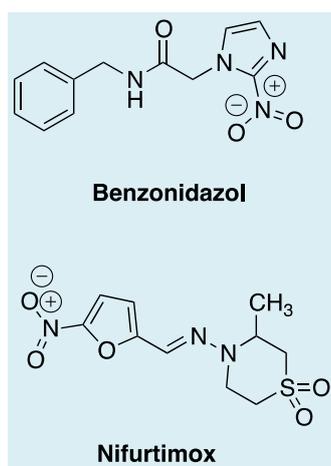


Figura 1. Estruturas químicas dos compostos benzonidazol e nifurtimox. Ambos são fármacos usados na terapia da doença de Chagas

Estes fármacos apresentam sua eficiência terapêutica limitada, devido:^{6,7} a resistência de algumas cepas; a diferença de susceptibilidade ao tratamento entre indivíduos; as reações adversas (anorexia, perda de peso, alterações psíquicas, manifestações digestivas, sonolência ou excitação, náuseas, vômitos, diarreia, hipersensibilidade, dermatite e linfadenopatia). Devido à magnitude desses efeitos adversos, desde 1980, o nifurtimox teve sua comercialização descontinuada nos países do Cone Sul (Brasil, Argentina, Chile e Uruguai), enquanto que o benzonidazol continua a ser usado no tratamento da doença.⁶

Dado o pouco avanço na quimioterapia, associada a inexistência de vacinas ineficazes,^{2,8-10} há a premente necessidade de

que novos fármacos sejam desenvolvidos auxiliando no controle e prevenção da doença de Chagas.¹¹ O planejamento para compostos com atividade anti-*T. cruzi* tem sido empregado nos últimos anos¹² levando ao estudo de inúmeras entidades químicas.¹³ O presente artigo estuda o comportamento dinâmico de complexos enzimáticos envolvendo inibidores peptídeo miméticos e a enzima Tripanotiona Redutase (TR) presente no *Trypanosoma cruzi*, o causador da Doença de Chagas, de modo a revelar resíduos presentes nesta enzima que sejam úteis na construção de mapas de interação farmacofórica.

A análise genômica e proteômica do *T. cruzi*,^{14,15} concomitante a de outros tripanossomatídeos patogênicos, datam de 2005.² Estas determinações revelaram possíveis novos alvos terapêuticos para o tratamento da doença, principalmente as enzimas de reações de oxidação-redução.¹³ Destas enzimas, a Tripanotiona Redutase (TR) foi purificada e caracterizada em 1986¹⁶ e, estudos recentes, mostraram sua presença em outros organismos tão distintos dos tripanossomatídeos (*Trypanosoma sp.*, *Leishmania sp.* e *Crithidia spp.*) como as algas verdes flageladas (*Euglena gracilis*) e as amebas patogênicas (*Entamoeba histolitica* e *Naegleria fowleri*).²

A atividade enzimática da TR consiste na conversão catalítica da TS₂ (tripanotiona oxidada) à sua forma reduzida T(SH)₂ (tripanotiona reduzida, Figura 2), de modo dependente de NADPH.¹⁷ Esta reação é importante uma vez que os radicais livres presentes na célula se ligam ao sítio ativo da TR, sofrem redução pelo NADPH gerando, após contato com O₂ intracelular, ânions radicais superóxidos.⁹ Estas espécies radicalares são responsáveis pela morte dos protozoários.¹³ Assim a T(SH)₂ possui papel fundamental na detoxificação dos parasitos frente às espécies radicalares mantendo assim a homeostase do ambiente intracelular. Por conseguinte, a TR, enzima responsável pela formação da tripanotiona reduzida é de vital importância nestes organismos. Estudos mostraram que os

parasitos com deficiência nas proteínas da via de síntese da TS₂ não se desenvolvem adequadamente num meio contendo espécies oxidantes.¹³ Desta maneira, essas

informações indicam a possibilidade de que fármacos inibidores da TR sejam tripanossomicidas.

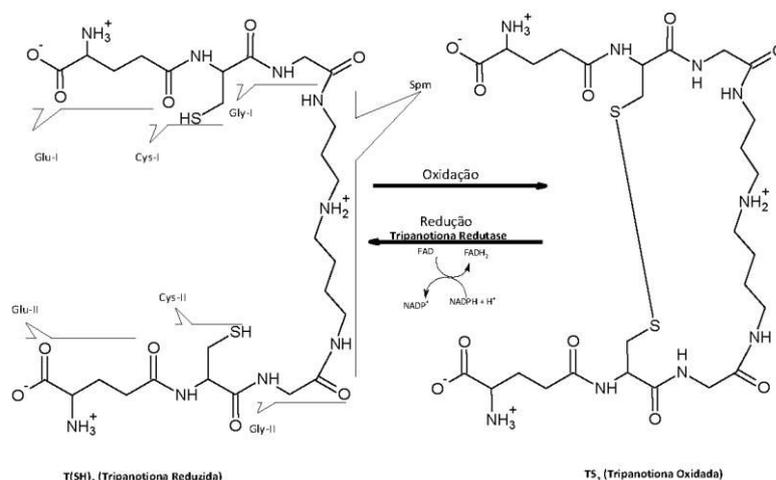


Figura 2. Reação de redução catalisada pela enzima Tripanotona Redutase (TR)

Uma abordagem no desenvolvimento racional de novos fármacos anti-*T. cruzi* é a utilização de compostos que mimetizem a estrutura do substrato natural, TS₂.^{18,19} Esta classe compreende os agentes derivados de peptídeos ou seus análogos (*i. e.*, peptídeo miméticos), os quais se apresentam como um campo inovador para o desenho de fármacos.¹³ Seu mecanismo de ação pode levar a desestabilização da proteína-alvo (TR) ou ao bloqueio de sua atividade catalítica, em ambos os casos afetando o decurso do processo patológico da doença de Chagas.¹⁹

Uma série de derivados peptídicos foi

testada *in vitro* para inibição competitiva e seletiva da TR.²⁰ Seus valores de atividade inibitória (IC₅₀) atingiram 13,8 μM, no caso do composto mais ativo, Benzoil-Leu-Arg-Arg-β-naftilamida²⁰ *apud*.²¹ Posteriormente, foram avaliados outros compostos, igualmente ativos para a enzima, que possuíam diferentes resíduos de aminoácidos, dos quais dois peptídeos miméticos apresentaram valor de inibição igual a 2,4 μM.²¹ Na Tabela 1 estão representados os peptídeos sintetizados por Mc Kie e colaboradores em 2001.²¹

Tabela 1: Valores de IC₅₀ e pIC₅₀ para os peptídeo miméticos testados contra Tripanotona Redutase (TR).²¹ Os seis derivados peptídicos sublinhados foram estudados no presente artigo

Peptídeo	Composto	IC ₅₀ (μM)	pIC ₅₀ ^{a)} (M)
1	Benzoil- Arg- p-nitroanilida	547	3,26
2	Benziloxi carbonil- Arg- p-nitroanilida	394	3,40
3	H- Arg- β naftilamida	1.520	2,82
4	H- Trp- β naftilamida	2 670	2,57
5	Benziloxi carbonil- Lys- 4 metoxi-βnaftilamida	816	3,09
6	H- Trp-OH	2 671	2,57
7	Benziloxi carbonil- Arg- Arg- 4 metoxi-βnaftilamida	38,5	4,41
<u>8</u>	<u>Benzoiloxi carbonil- Arg- Arg- p-nitroanilida</u>	<u>59,9</u>	<u>4,22</u>
<u>9</u>	<u>H- His- Trp- His-OH</u>	<u>1 742</u>	<u>2,76</u>
<u>10</u>	<u>H- His- Trp- Lys-OH</u>	<u>3 911</u>	<u>2,41</u>
11	H- Phe- Arg- Trp-OH	396	3,40
12	H- Phe- Pro- Arg-4 metoxi-β naftilamida	544	3,26
13	<u>Benzoil- Leu- Arg- Arg- β naftilamida</u>	<u>11,8</u>	<u>4,93</u>
14	Boc- Leu- Arg- Arg- 7 amido-metilcumarina	356	3,45
15	Boc- Leu- Lys- Arg- 7 amido-metilcumarina	418	3,38
<u>16</u>	<u>Benzoil- Gly- Arg- Arg- Leu- β naftilamida</u>	<u>510</u>	<u>3,29</u>
17	Benziloxi carbonil- Gly- Gly- Arg- 7 amido-metilcumarina	296	3,53
18	<u>Benzoiloxi carbonil- Ala- Arg- Arg- 4 metoxi-βnaftilamida</u>	<u>10,4</u>	<u>4,98</u>
19	Benzoil- Lys- Phe- Arg- p-nitroanilida	242	3,62
20	Benzoil- Phe- Val- Arg- 7 amido- 4 metilcumarina	247	3,61
21	H- Phe- Met- Arg- Phe- NH ₂	2 740	2,56

$$pIC_{50} = \log(1/IC_{50})$$

2. Metodologia

2.1. Aquisição de dados

O complexo entre a Tripanotona Redutase (TR) de *Tripanosoma cruzi* e seu substrato natural (TS₂)¹⁸ encontra-se depositado no Banco de Dados de Proteínas.²² Os complexos, envolvendo a TR e

os inibidores sintetizados por Mc Kie e colaboradores,²¹ foram obtidos pela metodologia de ancoramento molecular (*docking*).²³ Os resultados do estudo de *docking* possibilitaram a obtenção dos 21 complexos envolvendo a TR e os peptídeos miméticos.²³

De modo a se restringir o número total de sistemas a serem estudados por Dinâmica Molecular (DM) e que serão posteriormente

usados na construção dos mapas farmacofóricos, selecionou-se da lista de 21 complexos os três peptídeo miméticos mais ativos, a saber: **18**, **13** e **08** (Tabela 1), os compostos menos ativos (**09** e **10**, Tabela 1) e o derivado mais volumoso (**16**), totalizando seis complexos.

De posse das informações destes seis complexos, a etapa seguinte foi a parametrização dos ligantes. Esta parte

consiste na descrição das estruturas que não sejam derivadas de biomoléculas (aminoácidos, carboidratos ou ácidos nucleicos), por parâmetros do programa GROMACS.²⁴ A parametrização dos compostos estudados no presente artigo (TS₂ e peptídeos miméticos) foi descrita anteriormente²⁵ e suas estruturas estão representadas na figura 3.

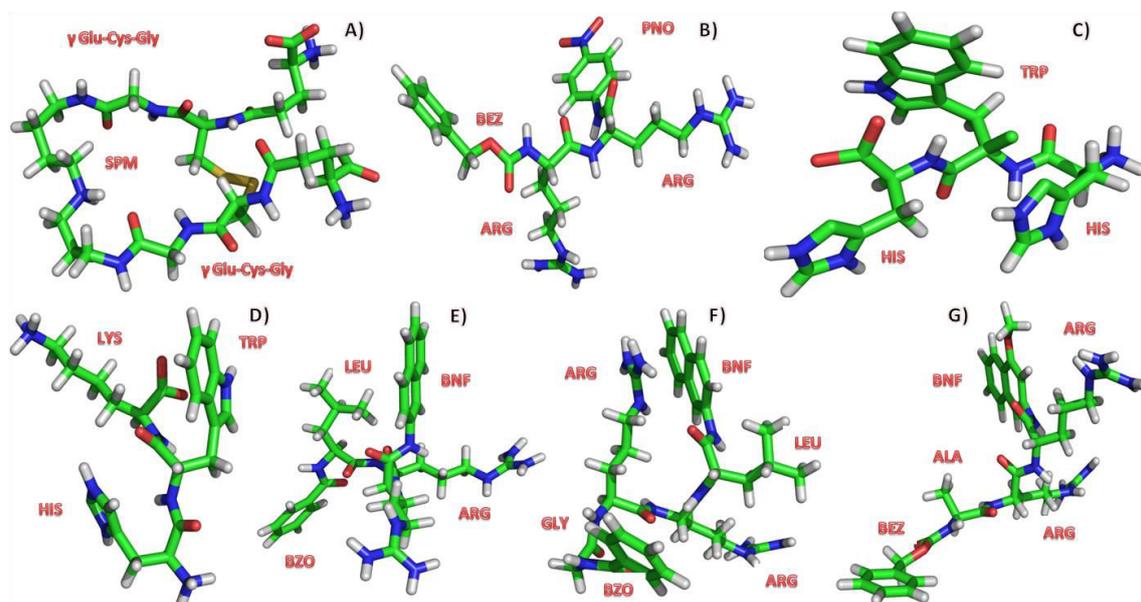


Figura 3. Estruturas químicas dos compostos estudados neste artigo. **A)** tripanotona (TS₂); SPM, cadeia espermidina. **b)** peptídeo mimético 08; BEZ grupo benziloxi carbonil e PNO, para nitro anilida **c)** peptídeo mimético 09, **d)** peptídeo mimético 10, **e)** peptídeo mimético 13; BZO, grupo benzoil e BNF, β- naftil amida **f)** peptídeo mimético 16 e **g)** peptídeo mimético 18

Nos estudos por Dinâmica Molecular (DM) dos seis complexos envolvendo a TR e os ligantes selecionou-se o estado de protonação dos resíduos de acordo com o pH do teste *in vitro* (pH= 7,3¹⁸) e a geometria da caixa de simulação (dodecaédrica).²⁵ Os dados de DM foram obtidos durante uma corrida de **10ns** na temperatura de 298 K,²¹ no *ensemble* NPT, usando condições periódicas de contorno (PBC) e tratamento eletrostático *Particle-mesh Ewald* (PME) com raio de corte simples (*cut-off*) igual a 0,9 nm, tanto para a contribuição de *van der Waals* (rvdw) quanto a de Coulomb (rcoulomb), em

cada um dos seis complexos estudados.²⁵

2.2. Agrupamento de Conformações (*clusters*)

Os resultados de DM para os seis complexos foram publicados anteriormente,²⁵ e a partir dos dados de trajetória foi realizado o agrupamento das conformações semelhantes (*clusters*). Nestes agrupamentos (*clusters*) podem ser verificadas as mudanças na estrutura da proteína (TR), sendo aceitas pequenas

variações dentro de um valor estipulado. Assim, para os sistemas com maiores números de *clusters* (conjuntos de conformações) espera-se maior variação de estruturas durante a DM. A população de cada *cluster* deve ser avaliada de modo a se investigar a representatividade deste conjunto nas inúmeras conformações geradas durante o cálculo de DM.

Para a análise de *clusters* utilizou-se o módulo **g_cluster** incluído no GROMACS.²⁴ Este módulo é capaz de separar as estruturas em grupos de estruturas similares, de acordo com o valor de RMSD (*Root Mean Square Deviation*), cuja população traduz a frequência com que as estruturas aparecem durante a DM. Os resultados dependem da escolha de dois parâmetros: o algoritmo de clusterização e o critério de corte, que separa as estruturas de um grupo em outro. Neste artigo foram testadas diversas combinações desses dois parâmetros (algoritmo e corte), utilizando o total de **1001** estruturas de cada complexo como população. Selecionou-se como algoritmo de clusterização o método **gromos**²⁶ e para valor do corte, o valor de **0,5 nm** de RMSD entre duas estruturas pertencentes ao mesmo grupo.

2.3. Construção dos Modelos Farmacofóricos

Segundo Leach e colaboradores,²⁷ um modelo farmacofórico de um alvo biológico pode ser definido a partir de algumas características comuns, compartilhadas por um grupo de compostos, que interagem com as características complementares no alvo biológico. Estas interações podem ser ligações hidrogênio, transferências de cargas, contatos hidrofóbicos ou interações eletrostáticas.²⁸

O modelo farmacofórico tridimensional é composto por um conjunto de características alinhadas no espaço 3D, que representam as interações essenciais com o receptor.²⁸ Como consequência, este modelo é limitado a representar um único modo de ação, *i. e.*, representa um único modo de ligação dos ligantes no mesmo alvo.²⁸ Estes modelos 3D são construídos baseando-se num conjunto pré-definido de características químicas e vínculos espaciais para o volume, os quais são seletivos para identificar e descrever os modos de ligação e também podem ser aplicados como ferramenta *in silico* na triagem de um banco de dados de compostos.²⁸

O protocolo de construção dos modelos farmacofóricos envolve uma análise das características químicas complementares do sítio ativo e suas relações espaciais.²⁹ Neste processo de construção três passos sequenciais são importantes.²⁸

- 1º. Extração, identificação e interpretação do ligante (seus estados de hibridação, os tipos de ligação);
- 2º. Detecção do farmacóforo;
- 3º. Visualização do modelo, interação do usuário frente às informações obtidas e exportação dos dados.

O programa **LigandScout**²⁸ incorpora estas informações do complexo macromolécula-ligante,²⁹ representando cada característica química do farmacóforo a partir de um conjunto particular de aspectos conforme mostrado na tabela a seguir. Após a análise de *clusters* foram determinadas as estruturas representativas de cada complexo nos **10ns** de DM. A partir de cada estrutura representativa, os modelos farmacofóricos respectivos foram construídos.

Tabela 2: Representação das diversas características químicas presentes num mapa farmacofórico presentes no programa *LigandsScout*²⁸

Representação Gráfica	Característica Farmacofórica
	Doador de Ligação Hidrogênio
	Aceptor de Ligação Hidrogênio
	Área Carregada Positivamente
	Área Carregada Negativamente
	Contatos Hidrofóbicos
	Anel Aromático
	Sítio Ligação a Metais
	Volume de Exclusão

3. Resultados e Discussão

3.1. Estabilidade Estrutural dos complexos

De modo a se obter as coordenadas dos ligantes (Tabela 1) inseridos na enzima Tripanotona Redutase de *T. cruzi* foi aplicada a metodologia de ancoramento molecular (*docking*).²³ Nas simulações de Dinâmica Molecular (DM) destes complexos, mesmo após as etapas prévias de otimização o relaxamento das estruturas ainda continua por tempos que vão além dos picosegundos iniciais. Isto ocorre geralmente devido às diferenças entre o ambiente aquoso da

simulação e o ambiente cristalino experimental.³⁰ A variação das posições atômicas durante a DM é medida através do seu valor de desvio, RMSD (*Root Mean Square Deviation*).

Os desvios presentes numa simulação de DM podem ser relacionados ao dado experimental através do cálculo do fator-B de temperatura (*B-factor*). Os resultados do comportamento das cadeias principais dos complexos em presença dos ligantes (não mostrados na figura) indicaram a estabilidade dos sistemas durante os **10ns** de DM (Figura 4). As regiões em azul escuro correspondem às mais estáveis, ou seja, aquelas sujeitas as menores flutuações térmicas.

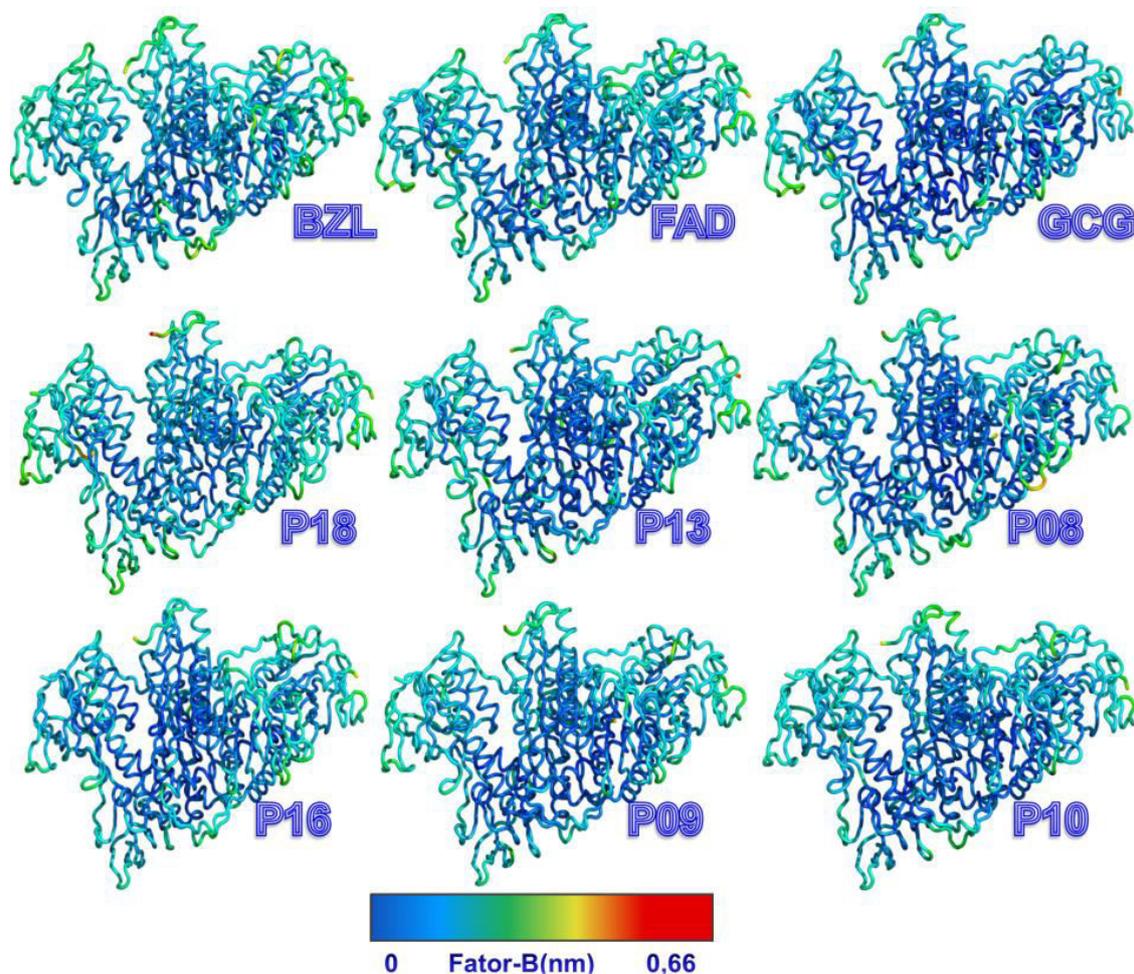


Figura 4. Fator-B da cadeia principal da Tripanotonia Redutase durante a DM de **10ns**. As siglas apresentadas são: **BZL**, grupo controle da simulação (TR e os íons); **FAD**, idem anterior acrescido de duas moléculas do cofator FAD; **GCG**, idem anterior adicionado das moléculas do substrato natural (TS_2). No sistema contendo os peptídeos miméticos, a letra **P** é precedida pela ordem numérica do derivado conforme apresentado na Tabela 1. Por exemplo: o sistema **P09** abrange o sistema FAD acrescido das duas moléculas do peptídeo mimético **09** (Tabela 1, Figura 3)

Conforme apontado pelos estudos anteriores, a TR possui uma estrutura relativamente rígida.³¹ Esta rigidez resulta num sítio ativo com forma e características físico-químicas bem definidas, o que está representado pela pouca variação do fator-B (Figura 4). Os ligantes (derivados peptídicos flexíveis), ao encontrarem esta região rígida da enzima, ajustam-se na correta orientação e na conformação específica de ligação para subsequente catálise.³¹

Durante um estudo de DM as posições de cada átomo são registradas em função do tempo (**trajetória**). Com estes valores de

posição, pode-se calcular a flutuação atômica e, estes valores indicam o quanto determinadas partes da estrutura da proteína, quando em presença dos ligantes, são perturbadas durante a simulação. A maneira de representar a flexibilidade das cadeias proteicas numa DM é através do cálculo de RMSF-3D (*Root Mean Square Fluctuation-3D*). De modo gráfico, o programa **MolMol**³² mostra em maior espessura as subestruturas mais perturbadas nas cadeias. A Figura 5 revela a estabilidade de regiões importantes como o sítio ativo, as regiões intercadeias (parte central das

estruturas) e a região de ligação com o NADPH ou com o FAD.

De modo geral verifica-se que a presença de alguns ligantes favorece a estabilização do sistema TR-ligante principalmente nas regiões do sítio ativo, do sítio de ligação com NADPH e na região de interação com o FAD (Figura 5). Comparando-se as flutuações do esqueleto peptídico da TR durante a DM, revelado pela espessura do gráfico na Figura 5, nota-se que os inibidores mais ativos (**P18** e **P13**, Tabela 1) tendem a induzir menor flexibilidade nas cadeias da TR nos seus

respectivos complexos durante sua interação. Esse dado se torna mais patente quando se comparam os resultados de **P13** (composto mais ativo, Tabela 1), **P10** (peptídeo menos ativo, Tabela 1) e o sistema controle, **GCG**.

Tomando em conjunto os resultados do Fator-B (Figura 4) e do RMSF-3D (Figura 5), ambos revelam a estabilidade dos sistemas durante a DM de **10ns** e a possibilidade de uma aquisição de dados confiável para outras análises objetivando o planejamento de fármacos mais ativos para o tratamento da doença de Chagas.

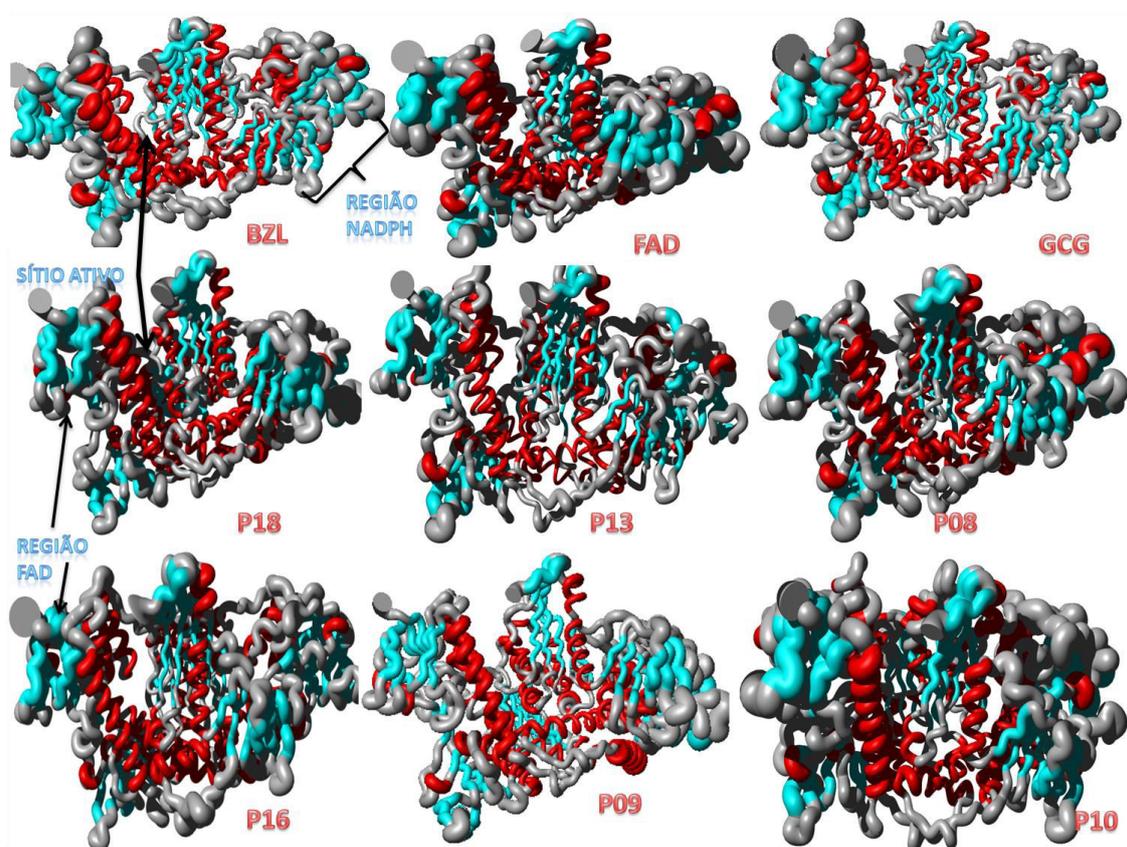


Figura 5. Representações do RMSF-3D de cada complexo da Tripanotonia Redutase e seus ligantes (não mostrados na figura acima). O valor de flutuação é proporcional a espessura das cadeias proteicas. As figuras foram geradas pelo programa *Molmol*.³² As siglas seguem a mesma descrição da Figura 4

3.2. Análise de Clusters

De modo a se estudar o número de conformações geradas em cada sistema após **10ns**, aplicou-se a análise de *clusters*. Esta análise revela, quantitativamente, as conformações mais populadas na DM e quais são as estruturas representativas de todo o

conjunto de milhares de conformações obtidas durante um cálculo. Aplicou-se o módulo *g_cluster* na avaliação das conformações e na seleção das estruturas representativas da DM, segundo definido no item 2.2. Quanto mais *clusters* estiverem presentes num cálculo de DM maior é a variedade conformacional durante a simulação.

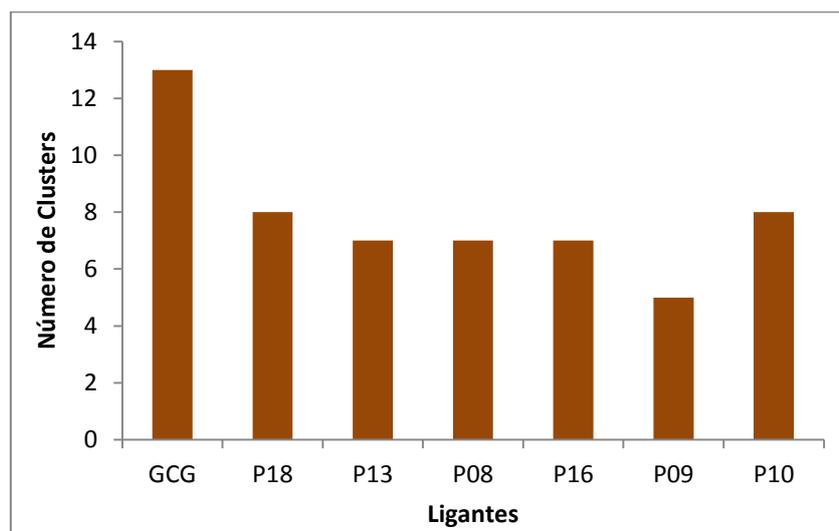


Figura 6: Gráfico do número de *clusters* versus complexos da Tripanotona Redutase e seus ligantes. As siglas seguem a mesma descrição da Figura 4

Nos resultados apresentados (Figura 6), nota-se que o sistema com maior número de *clusters* é aquele envolvendo o complexo natural (GCG), sendo que todos os inibidores peptídicos apresentam valores menores. Esse resultado pode ser explicado pela maior amostragem conformacional do sistema quando o substrato natural (TS₂) se liga a proteína ou pela estrutura dos complexos contendo peptídeos miméticos estarem num mínimo energético local durante a DM.

Como cada posição atômica representa um quadro (“*frame*”) na trajetória de DM, é

possível se obter o valor da estrutura média que seja representativa daquele complexo. Esta seleção, realizada pelo *g_cluster*, indicou quais *frames* foram representativos em cada um dos complexos. Os resultados estão apresentados na tabela abaixo.

Analisando a porcentagem da população representada nos primeiros *clusters* verifica-se que, em todos os casos, a determinação da estrutura representativa da DM é possível. Isso se deve ao fato de que mais de 50% da população está representada com, no máximo, três conformações (Tabela 3).

Tabela 3: Números de *clusters*, RMSD médio e número de indivíduos na população dos *clusters* mais populadas durante a DM de **10ns** dos complexos envolvendo a Tripanotona Redutase e seus ligantes. As siglas seguem a mesma descrição da Figura 4

	GCG	P18	P13	P08	P16	P09	P10
Número de <i>clusters</i>	13	8	7	7	7	5	8
RMSD Médio (nm)	3.04	3.13	2.11	2.05	2.02	2.78	2.33
Populações dos <i>clusters</i> mais populadas	239/ 237/ 190	501/ 160	626/ 216	517	746	441/ 401	719
Porcentagem da População (%)	66	67	84	52	75	84	72

Como apontado anteriormente, o sistema **GCG** apresenta maiores variações conformacionais, as quais estão apresentadas tanto no número de *clusters* (13, Tabela 3) quanto na população que perpassa 50% das estruturas de DM (três conjuntos de conformações contendo 239, 237 e 190 estruturas, Tabela 3). Outro ponto a ser reforçado nessa análise é a estabilidade estrutural de determinados complexos que resultam em menor número de *clusters*, os quais representam grande parte da DM, o que reforça a ideia de que alguns complexos podem estar num mínimo de energia local.

A escolha da estrutura representativa é fundamental para a determinação dos principais grupos que justificam a atividade biológica dos peptídeos miméticos (grupos farmacofóricos) e esta será a etapa seguinte deste trabalho.

3.3. Análise dos Modelos Farmacofóricos

A análise farmacofórica envolve um exame das características químicas complementares do sítio ativo e suas relações espaciais,²⁹ limitadas a um **único** modo de ligação dos ligantes no mesmo alvo.²⁸ Após a seleção das posições atômicas representativas em cada um dos complexos, procedeu-se ao estudo dos grupos farmacofóricos. A construção dos mapas

farmacofóricos no programa **LigandScout**²⁸ seguiu a metodologia explicada no item 2.3 e na Tabela 2. Após a classificação de cada um dos ligantes em seus respectivos complexos, foram analisados os resultados das interações farmacofóricas obtidas.

De maneira geral os resultados demonstram a importância dos diversos tipos de interação entre os inibidores e a TR: ligações hidrogênio, interações eletrostáticas, hidrofobicidade, etc. (Figura 7). É importante ressaltar o papel do solvente revelado nos modelos farmacofóricos através de suas interações por ligações hidrogênio, com os peptídeos miméticos. Em nenhum dos resultados anteriores^{23,25} as moléculas de água foram incluídas na justificativa dos resultados, embora estivessem presentes durante a aquisição dos dados. O papel do solvente nas interações com ligantes é relatado na literatura e vemos que no estudo da inibição da TR essa ação relevante do solvente também acontece, sendo mais preponderante quanto mais ativo (Tabela 1) for o derivado peptídico (Figura 7).

A obtenção da estrutura cristalográfica da TR¹⁸ revelou que os principais resíduos do sítio ativo da enzima em contato com a TS₂ são: E18; W21, Y110 e M113, compondo a fenda hidrofóbica (*hydrophobic cleft*) do sítio;³¹ E466' e E467' (E948 e E949), resíduos formadores do sítio γ -glutâmico³³ (Figura 7). Os resultados das análises farmacofóricas

revelam que as principais interações descritas na literatura entre o substrato natural (TS₂) e a enzima e aquelas apontadas como importantes na inibição da TR foram

ambas reproduzidas nos complexos envolvendo os peptídeos miméticos (Figura 7).

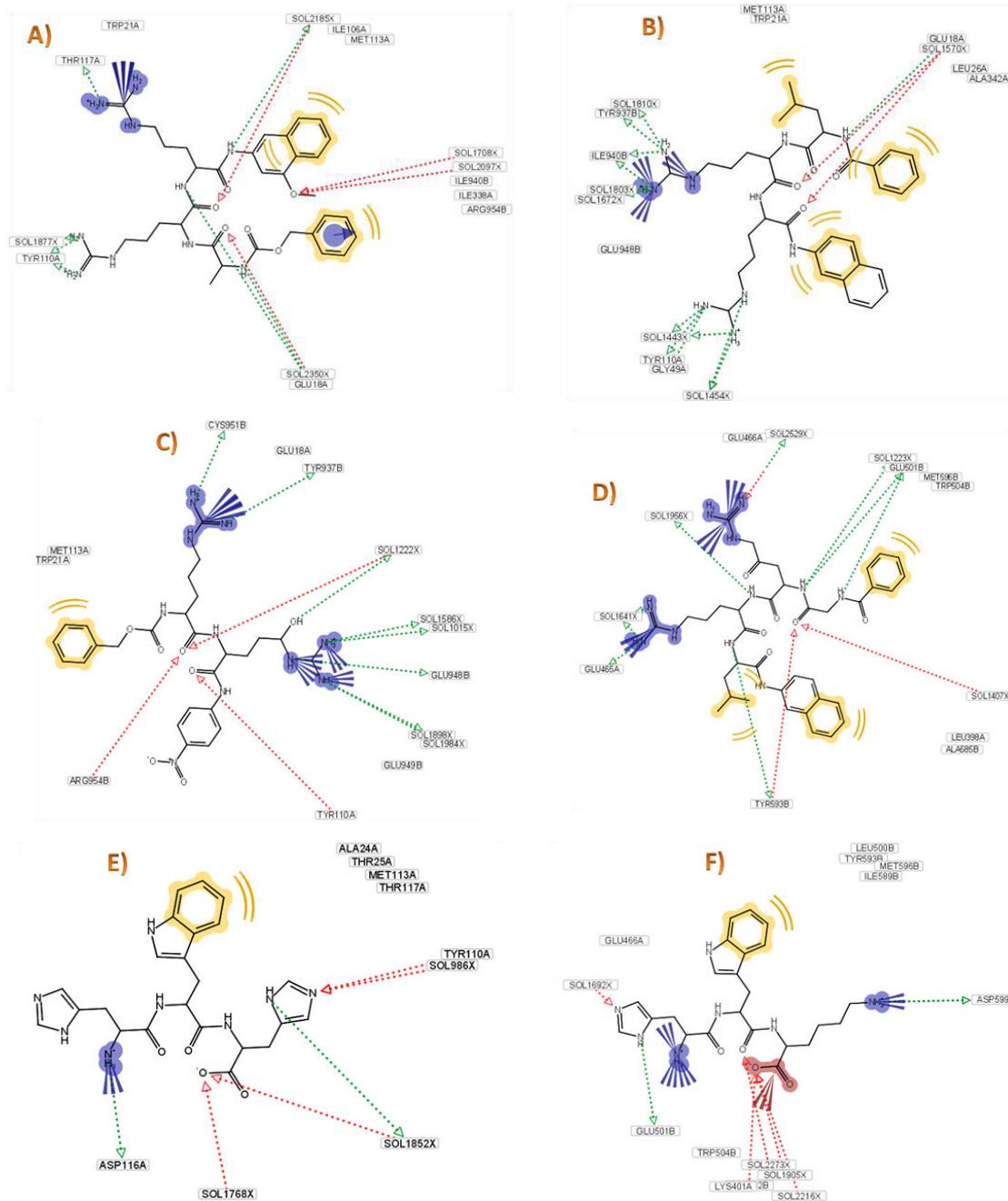


Figura 7: Análise Farmacofórica para os complexos envolvendo da Tripanotona Redutase e seus ligantes. Os resultados de análise farmacofórica foram obtidos pelo programa **LigandScout**.²⁸ A) P18, B) P13, C) P08, D) P16, E) P09 e F) P10. As siglas seguem a mesma descrição da Figura 4 e as interações farmacofóricas seguem a representação da Tabela 2

A ligação hidrogênio com o resíduo E18 representa, na estrutura experimental, as interações entre este resíduo e as cadeias espermidina (SPM, Figura 2 e 3) e Gly-I (Figura 2) da tripanotona (TS₂).^{18,31,34} À exceção de **P09**, todos os inibidores interagem com este resíduo nos mapas farmacofóricos (Figura 7, **P16** e **P10** através de E501). Estes dados corroboram com ideias anteriores^{18,25,31} e mostram a importância desta interação no mecanismo de inibição da TR.

Os resíduos que compõem a fenda hidrofóbica³¹ da TR (W21, Y110 e M113) apresentaram diversos tipos de interações com os inibidores peptídicos (Figura 7). De acordo com a estrutura experimental, a TS₂ apresenta duas ligações hidrogênio com a Y110¹⁸. Este resultado foi reproduzido anteriormente nos estudos por DM²⁵ e reforça a importância deste sítio na inibição da TR. Nas análises farmacofóricas dos peptídeos se nota que todos os compostos interagem de modo semelhante ao substrato natural (TS₂), *i. e.* realizam ligação hidrogênio com a Y110 (Figura 7, **P16** e **P10** através da Y593). Estes resultados confirmam o mecanismo de inibição enzimática proposto no presente trabalho onde, as interações existentes no complexo natural são substituídas pelas interações com os inibidores.

O resíduo de triptofano do sítio hidrofóbico (W21) interage com a cadeia espermidina do substrato (SPM, Figura 2 e 3)^{18,31,34}. Este mesmo resíduo interagiu com todos os ligantes peptídeo miméticos, exceto **P16** e **P09** (Figura 7). A existência desta interação nos mapas farmacofóricos revela a importância do acesso a este sítio pelos inibidores da TR, principalmente para os mais potentes (**P18**, **P13** e **P08**, Tabela 1). Por fim a M113, relatada como a maior contribuição hidrofóbica do sítio^{18,31,33-35}, foi acessada por todos inibidores (Figura 7).

Analisando as interações envolvendo os resíduos do sítio γ -glutâmico³³ (E466' (E948) e E467' (E949), Figura 7), um sítio acessível aos inibidores da TR,¹³ observa-se que **P13**,

P08, **P16** e **P10** interagem com estes resíduos, enquanto **P18** e **P09** não interagem. O comportamento no sítio γ -glutâmico observado para alguns peptídeos pode indicar que um inibidor com alta potência (**P13**, Tabela 1) deverá interagir fortemente com este sítio embora apenas esta interação não seja condição suficiente para um bom perfil inibitório (**P10**, Tabela 1).

Outro sítio de interação descrito anteriormente é aquele que compreende os resíduos C469', S470', M471' e R472'.²⁵ Suas interações, por ligação hidrogênio e por contatos hidrofóbicos, justificaram, nos estudos de Dinâmica Molecular, a atividade inibitória dos peptídeos miméticos.²⁵ No presente trabalho essas interações são reveladas nos mapas farmacofóricos para aos complexos mais potentes, **P18** e **P08** (Figura 7). Tal fato indica a possível relevância deste novo sítio para a inibição seletiva da Tripanotona Redutase corroborando com os dados anteriores.²⁵

Assim, de uma maneira geral, pode-se notar que nas análises farmacofóricas há um equilíbrio entre as interações por ligação hidrogênio e as contribuições hidrofóbicas com os resíduos da TR (Figura 7). Esse equilíbrio é importante ao ressaltar que o comportamento da TR não deve ser avaliado levando-se em conta apenas um tipo de interação (*e. g.*, ligação hidrogênio) e sim, à luz do maior número de ferramentas acessíveis, obter-se uma visão completa do seu mecanismo inibitório. Uma vez que as principais interações descritas na literatura estão presentes nos mapas farmacofóricos, reforça-se a aplicação desta ferramenta no planejamento racional de fármacos anti-*T. cruzi* mais potentes que os atuais.

4. Conclusões

A inibição da Tripanotona Redutase (TR) revela-se um problema complexo e que só poderá ser equacionado quando diferentes técnicas e dados forem analisados de um

modo global. A sua escolha como alvo dos inibidores específicos apresentados neste artigo visa o desenvolvimento de uma quimioterapia antiparasitária tripartite, *i. e.*, com um só fármaco tratar de forma efetiva, a doença de Chagas, as leishmanioses e a doença do sono.³³

Uma vez que qualquer proposta de desenvolvimento racional para a inibição da TR, como os peptídeos miméticos, deve atingir mais de **85%** de atividade antiparasitária,³⁵ as interações entre a TR e os inibidores mostraram-se estáveis o suficiente para propor um mecanismo definitivo de inibição para esta classe de compostos (Figura 4, 5 e 7). Além disso, certas regiões não acessadas por outras classes de inibidores, como os resíduos C469', S470' e R472', foram desvendadas pelos peptídeos miméticos.

O papel do solvente no meio biológico não deve ser desprezado (Figura 7) conforme mostrado anteriormente pelas análises de ligações hidrogênio²⁵ e no presente artigo através dos mapas farmacofóricos (Figura 7). As moléculas de água presentes na simulação estabilizam muitas interações envolvendo a TR e seus inibidores quer de modo direto envolvendo o complexo enzima-inibidor, quer de modo indireto relacionando a proteína-solvente-peptídeo. Este fato deve ser considerado no desenvolvimento racional de fármacos porque os compostos deverão atravessar as membranas biológicas tanto do hospedeiro, quanto do parasita, agindo no citoplasma deste último.

Uma vez que o modelo computacional da TR se encontra estabelecido, posteriores modificações estruturais podem ser aplicadas a outras classes de inibidores mais diversas que os peptídeos miméticos. Deste modo, o planejamento racional de novas entidades químicas pode ser favorecido pela construção do sistema e sua simulação através da Dinâmica Molecular. Num passo posterior, as interações mais marcantes de cada composto, apresentadas no presente artigo, poderão ser reunidas num novo protótipo de modo a auxiliar no planejamento de fármacos contra a doença de Chagas.

Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte financeiro das agências de fomento (CNPq, CAPES e FAPERJ) e ao Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF-UFRJ) pelo suporte computacional na execução dos cálculos do presente artigo.

Referências Bibliográficas

- ¹ Jannin, J.; Villa, L. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2007**, *102*, 95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ² Krauth-Siegel, R. L.; Comini, M. A. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1780*, 1236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³ Bern, C. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2012**, *25*, 450. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴ Igreja, R. P. *Lancet* **2009**, *373*, 1340. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵ Editorial *Lancet* **2009**, *373*, 1820. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶ Rodrigues Coura, J.; de Castro, S. L. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2002**, *97*, 3. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷ Soeiro, M. N.; de Castro, S. L. *Expert Opin. Ther. Targets* **2009**, *13*, 105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁸ Heby, O.; Persson, L.; Rentala, M. *Amino Acids* **2007**, *33*, 359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁹ Linares, G. E.; Ravaschino, E. L.; Rodriguez, J. B. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁰ Muller, I. B.; das Gupta, R.; Luersen, K.; Wrenger, C.; Walter, R. D. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2008**, *160*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹¹ Renslo, A. R.; McKerrow, J. H. *Nature Chem. Biol.* **2006**, *2*, 701. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹² Moreira, D. R.; Leite, A. C.; dos Santos, R. R.; Soares, M. B. *Curr. Drug Targets* **2009**, *10*, 212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

- ¹³ Pita, S. S. R.; Pascutti, P. G. *Rev. Virt. Quim.* **2011**, *3*, 307. [[Link](#)]
- ¹⁴ Atwood, J. A.; Weatherly, D. B.; Minning, T. A.; Bundy, B.; Cavola, C.; Opperdoes, F. R.; Orlando, R.; Tarleton, R. L. *Science* **2005**, *309*, 473. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁵ El-Sayed, N. M.; Myler, P. J.; Bartholomeu, D. C.; Nilsson, D.; Aggarwal, G.; Tran, A. N.; Ghedin, E.; Worthey, E. A.; Delcher, A. L.; Blandin, G.; Westenberger, S. J.; Caler, E.; Cerqueira, G. C.; Branche, C.; Haas, B.; Anupama, A.; Arner, E.; Aslund, L.; Attipoe, P.; Bontempi, E.; Bringaud, F.; Burton, P.; Cadag, E.; Campbell, D. A.; Carrington, M.; Crabtree, J.; Darban, H.; da Silveira, J. F.; de Jong, P.; Edwards, K.; Englund, P. T.; Fazelina, G.; Feldblyum, T.; Ferella, M.; Frasc, A. C.; Gull, K.; Horn, D.; Hou, L.; Huang, Y.; Kindlund, E.; Klingbeil, M.; Kluge, S.; Koo, H.; Lacerda, D.; Levin, M. J.; Lorenzi, H.; Louie, T.; Machado, C. R.; McCulloch, R.; McKenna, A.; Mizuno, Y.; Mottram, J. C.; Nelson, S.; Ochaya, S.; Osoegawa, K.; Pai, G.; Parsons, M.; Pentony, M.; Pettersson, U.; Pop, M.; Ramirez, J. L.; Rinta, J.; Robertson, L.; Salzberg, S. L.; Sanchez, D. O.; Seyler, A.; Sharma, R.; Shetty, J.; Simpson, A. J.; Sisk, E.; Tammi, M. T.; Tarleton, R.; Teixeira, S.; Van Aken, S.; Vogt, C.; Ward, P. N.; Wickstead, B.; Wortman, J.; White, O.; Fraser, C. M.; Stuart, K. D.; Andersson, B. *Science* **2005**, *309*, 409. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁶ Shames, S. L.; Fairlamb, A. H.; Cerami, A.; Walsh, C. T. *Biochemistry* **1986**, *25*, 3519. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁷ Fairlamb, A. H.; Blackburn, P.; Ulrich, P.; Chait, B. T.; Cerami, A. *Science* **1985**, *227*, 1485. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁸ Bond, C. S.; Zhang, Y.; Berriman, M.; Cunningham, M. L.; Fairlamb, A. H.; Hunter, W. N. *Structure* **1999**, *7*, 81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁹ Schirmer, R. H.; Müller, J. G.; Krauth-Siegel, R. L. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **1995**, *34*, 141. [[CrossRef](#)]
- ²⁰ Garforth, J.; Mckie, J. H.; Jaouhari, R.; Benson, T. J.; Fairlamb, A. H.; Douglas, K. T. *Amino Acids* **1994**, *6*, 295. [[CrossRef](#)]
- ²¹ McKie, J. H.; Garforth, J.; Jaouhari, R.; Chan, C.; Yin, H.; Besheya, T.; Fairlamb, A. H.; Douglas, K. T. *Amino Acids* **2001**, *20*, 145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²² Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²³ da Rocha Pita, S. S.; Cirino, J. J.; de Alencastro, R. B.; Castro, H. C.; Rodrigues, C. R.; Albuquerque, M. G. *J. Mol. Graph. Model.* **2009**, *28*, 330. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁴ Lindahl, E.; Hess, B.; van der Spoel, D. *J. Mol. Model.* **2001**, *7*, 306. [[CrossRef](#)]
- ²⁵ da Rocha Pita, S. S.; Batista, P. R.; Albuquerque, M. G.; Pascutti, P. G. *Chem. Biol. Drug Des.* **2012**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁶ Daura, X.; Gademann, K.; Jaun, B.; Seebach, D.; van Gunsteren, W. F.; Mark, A. E. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38*, 236. [[CrossRef](#)]
- ²⁷ Leach, A. R.; Gillet, V. J.; Lewis, R. A.; Taylor, R. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 539. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁸ Wolber, G.; Langer, T. *J. Chem. Inf. Model.* **2005**, *45*, 160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁹ Yang, S. Y. *Drug Discov. Today* **2010**, *15*, 444. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁰ Sousa, G. L. S. C.; Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005. [[Link](#)]
- ³¹ Bailey, S.; Smith, K.; Fairlamb, A. H.; Hunter, W. N. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *213*, 67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³² Koradi, R.; Billeter, M.; Wuthrich, K. *J. Mol. Graph.* **1996**, *14*, 51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³³ 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. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4910. [[CrossRef](#)]

³⁴ Zhang, Y.; Bond, C. S.; Bailey, S.; Cunningham, M. L.; Fairlamb, A. H.; Hunter, W. N. *Protein Sci.* **1996**, *5*, 52.

³⁵ 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. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]