

ARTIGO ORIGINAL

Identificação de potenciais inibidores duais frente a Pteridina Redutase 1 e Diidrofolato Redutase-Timidilato Sintase de *Leishmania major*

Identification of potential dual inhibitors against Leishmania major Pteridine Reductase 1 and Dihydrofolate reductase-thymidylate synthase.

QUÉZIA LORRAINE DOS SANTOS SAMPAIO^{1*}  JANINE FERREIRA DE SOUZA SILVA²  FRANCO HENRIQUE ANDRADE LEITE³ 

^{1,2,3}Departamento de Saúde, Laboratório de Modelagem Molecular, Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, Brasil.

Histórico:

Recebido em 05/08/2023
Revisado em 17/10/2023
Aceito em: 04/12/2023
Publicado em 06/12/2023

Palavras-chave

Pteridina redutase 1;
Dihidrofolato redutase
Timidilato Sintase;
Modelo farmacofórico,
Acoplamento molecular
Triagem virtual

Keywords

Pteridine reductase 1,
Dihydrofolate reductase
Thymidylate synthase,
Pharmacophore model,
Molecular docking
Virtual screening.

Resumo. A leishmaniose cutânea causada por *Leishmania major* é uma das principais doenças infecciosas do ponto de vista epidemiológico. Contudo, apesar de sua relevância para saúde pública, os fármacos existentes para o tratamento de pacientes são insuficientes. Sabe-se que o parasito utiliza duas vias para o processo de manutenção de vida, através das enzimas da Pteridina Redutase 1 (PTR1) e da Dihidrofolato Redutase Timidilato Sintase (DHFR-TS). Desse modo, a inibição dual de PTR1 e de DHFR-TS desempenha um papel importante no tratamento dessa doença. Visto isso, utilizou-se estratégias computacionais a fim de priorizar moléculas com inibição dual. Dez modelos farmacofóricos duais foram construídos utilizando o algoritmo genético implementado no GALAHADTM disponível no programa SYBYL-X 2.0. Etapas de validação foram realizadas juntamente com o somatório de parâmetros estatísticos internos para seleção do melhor modelo farmacofórico. A estrutura 3D de PTR1 (PDB ID 5L42) foi coletada do banco de macromoléculas biológicas (PDB) e o modelo 3D de DHFR-TS, construído por Vadloori et al¹, foi disponibilizado para as etapas de acoplamento molecular. Rotinas de acoplamento molecular foram realizadas nos seguintes programas: GOLD, Surflex-Dock e AutoDock Vina para escolha da melhor métrica para PTR1 segundo o valor da AUC. Selecionados melhor modelo farmacofórico e métrica para acoplamento molecular foram realizadas sucessivas filtragens, seguindo a ordem de alinhamento ao modelo farmacofórico, acoplamento molecular frente a PTR1, acoplamento molecular frente a DHFR-TS, além do uso de filtros físico-químicos e toxicológicos, utilizando os bancos Sigma-AldrichTM, Our Own Chemical Collection (OCCC-UFSJ) e opnME (n=215.725 moléculas) a fim de priorizar moléculas com potencial de inibição dual. Por fim, após construção de dois dendrogramas, para PTR1 e DHFR-TS, e análise dos valores de QFIT e dos valores de energia, foram selecionados três compostos com potencial de inibição dual e que mostraram possuir requisitos estereo-eletrônicos adequados e disponibilidade para compra.

Summary. Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* is one of the main infectious diseases from an epidemiological point of view. However, despite its relevance to public health, existing drugs for the treatment of patients are insufficient. It is known that the parasite uses two pathways for the life maintenance process, through the enzymes of Pteridine Reductase 1 (PTR1) and Dihydrofolate Reductase Thymidylate Synthase (DHFR-TS). Thus, the dual inhibition of PTR1 and DHFR-TS plays an important role in the treatment of this disease. Therefore, computational strategies were used to prioritize molecules with dual inhibition. Ten dual pharmacophore models were built using the genetic algorithm implemented in GALAHADTM available in the SYBYL-X 2.0 program. Validation steps were performed along with summation of internal statistical parameters for selection of the best pharmacophore model. The 3D structure of PTR1 (PDB ID 5L42) was collected from Protein Data Bank (PDB) and the 3D model of DHFR-TS, constructed by Vadloori et al¹, was made available for the molecular docking steps. Molecular docking routines were performed in the following programs: GOLD, Surflex-Dock and AutoDock Vina to choose the best metric for PTR1 according to the AUC value. Once the best pharmacophore model and metric for molecular docking were selected, successive filtering was performed, following the order of alignment to the pharmacophore model, molecular docking against PTR1, molecular docking against DHFR-TS, in addition to the use of physicochemical and toxicological filters, using the Sigma-AldrichTM, Our Own Chemical Collection (OCCC-UFSJ) and opnME (n = 215,725 molecules) banks in order to prioritize molecules with dual inhibition potential. Finally, after construction of two dendrograms, for PTR1 and DHFR-TS, and analysis of QFIT values and energy values, three compounds with dual inhibition potential were selected and shown to have adequate stereoelectronic requirements and availability for purchase.

Introdução

A leishmaniose cutânea, doença de alto impacto epidemiológico, é causada por diversas espécies de protozoários entre os quais está *Leishmania major*, e apresenta como principal sintoma da doença, o aparecimento de feridas na pele. Geralmente, a lesão aparece pequena, de forma arredondada, profunda, avermelhada e cresce progressivamente. Entretanto, quando o parasito abriga a mucosa do indivíduo infectado, as feridas acometem o nariz, a boca ou, em casos mais graves, a garganta e o sistema da laringe do organismo, esses fatores contribuem para a criação de um forte estigma social².

A doença afeta milhões de pessoas em todo o mundo, segundo a Organização Mundial da Saúde (2020), estima-se que 26.000 a 65.000 mortes ocorram anualmente, e calcula-se que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco. De acordo com o Ministério da Saúde, são registrados, em média, 24,5 mil casos de Leishmanioses no Brasil por ano³. Entretanto, apesar do impacto epidemiológico, os fármacos existentes para o tratamento de pacientes com leishmaniose apresentam sérios problemas em termos de segurança, resistência, estabilidade e custo².

A terapia medicamentosa disponível atualmente não distingue as diversas formas clínicas da leishmaniose, os medicamentos utilizados apresentam baixa eficácia, causam uma série de efeitos adversos como nefrotoxicidade, cardiotoxicidade, hepatotoxicidade e além de possuir índices terapêuticos reduzidos, uma vez que apenas a miltefosina é administrada por via oral e os demais são administrados por via endovenosa⁴. A terapêutica contra a leishmaniose baseia-se na utilização de basicamente cinco fármacos: os antimoniais pentavalentes, anfotericina B e sua formulação lipossômica, miltefosina, paromomicina e pentamidina. Com exceção dos compostos antimoniais, todos os outros medicamentos não foram desenvolvidos inicialmente com ação leishmanicida e, portanto, são off-label⁵.

O parasito envolvido na doença é dependente de folatos como cofatores em processos metabólicos necessários para a manutenção da vida, como na síntese de DNA e RNA, vitais para o crescimento⁶. Assim, enzimas que participam dessa via bioquímica de recuperação de folatos são alvos promissores para o desenvolvimento de fármacos leishmanicidas. Nesse contexto, a enzima Dihidrofolato Redutase (DHFR) – em *Leishmania* e outros protozoários está fusionada com a Timidilato Sintase (TS) formando uma proteína bifuncional (DHFR-TS)⁷ – é responsável pela conversão sequencial de ácido fólico em diidrofolato e, posteriormente, em tetraidrofolato (TH4), sendo assim um alvo validado para o desenvolvimento de antitumorais, antiprotozoários e antibióticos⁸.

Apesar disso, inibidores dessa enzima não são eficazes no tratamento da leishmaniose, devido à presença de uma desidrogenase de cadeia curta,

expressa em todas as fases do ciclo de vida de *Leishmania ssp.*, denominada Pteridina Redutase 1 (PTR1), que pode atuar como uma via alternativa catalisando a redução de folato para tetraidrofolato⁸. A PTR1 sob condições fisiológicas é responsável pela redução de 10% do ácido fólico requerido pela célula, mas quando fármacos antifolatos clássicos inibem DHFR-TS, a mesma pode ser superexpressa, permitindo redução das quantidades necessárias de folatos para garantir a sobrevivência do parasito⁷. Esse mecanismo compensatório sugere que o tratamento poderia ser alcançado através da inibição tanto de DHFR e PTR1 por um único fármaco ou uma combinação de fármacos capazes de inibir ambos os alvos⁹.

Uma das alternativas terapêuticas que vem crescendo é o desenvolvimento de fármacos multialvos, seu planejamento pode ser executado racionalmente, através de técnica computacionais, como os modelos farmacofóricos para inibidores duais que utilizam das características estereo-eletrônicas essenciais para inibição de mais de um alvo biológico (farmacóforos)¹⁰. No planejamento de fármacos multialvos, os ligantes interagem com dois ou mais alvos biológicos para combater uma determinada doença. Esta abordagem reduz o tempo e o custo necessários para a realização dos ensaios clínicos^{11,12}.

A busca por novos compostos a partir dos farmacóforos possibilita a identificação de moléculas que compartilhem dos mesmos requisitos estereo-eletrônicos de ligantes ativos presentes em bibliotecas virtuais¹³. Essa busca pode ser feita através do alinhamento flexível de inibidores conhecidos com o auxílio de programas que utilizam algoritmos genéticos para a seleção de conformeros de menor energia e construção de modelos farmacofóricos, como o programa GALAHAD implementado no SYBYL (ECE, 2020)¹⁴. Apesar das vantagens dos modelos farmacofóricos, observa-se algumas limitações, como dificuldade no alinhamento de moléculas flexíveis e a ausência de restrições estereais impostas pelo sítio alvo.

Assim, como forma de auxiliar na priorização de moléculas candidatas a ensaios biológicos, a utilização da técnica computacional de acoplamento molecular pode ser uma alternativa¹⁵ porque permite avaliar os diferentes modos de ligação de uma molécula no sítio alvo e indicar aqueles com maior probabilidade de interação¹⁶. Ao ser aplicada, a técnica visa cumprir três propostas: prever o modo de ligação de uma molécula conhecida, identificar moléculas promissoras para ensaios biológicos e prever a afinidade de ligação relativa de moléculas congênicas¹³. Por esse motivo, o acoplamento molecular pode suprir as limitações do modelo farmacofórico quanto ao volume imposto pelo sítio ativo.

A integração de modelos farmacofóricos com acoplamento molecular pode ajudar a priorizar compostos com maior biodisponibilidade e potencial de

inibição e/ou ligação ao sítio alvo¹⁶. Assim, o emprego de triagem virtual hierárquica (modelos farmacofóricos e acoplamento molecular) pode ser útil para identificar potenciais inibidores duais com maior afinidade¹⁵. Desse modo, o presente estudo tem como objetivo a identificação de potenciais inibidores enzimáticos duais frente a PTR1 e DHFR-TS de *Leishmania major*.

Materiais e Métodos

Inicialmente, para as etapas de construção e validação do modelo farmacofórico, um grupo com 19 inibidores duais frente a PTR1 e DHFR-TS de *L. major* tiveram sua estrutura química coleta da literatura^{8,9}, com valor de atividade biológica ($IC_{50} \leq 50 \mu M$). As moléculas foram reproduzidas com o auxílio do programa Marvin® Sketch 16.9.5¹⁷. Em seguida, as estruturas 2D foram convertidas em 3D através do SYBYL-X 2.0¹⁸. De acordo com o valor do índice de seletividade (entre 0.6 e 1.0), foram escolhidos cinco compostos para construção dos modelos farmacofóricos, utilizando como critério a razão entre o IC_{50} de PTR1 e de DHFR-TS, os demais foram utilizados para a validação dos modelos. Os conformémeros foram gerados através do algoritmo genético implementado no GALAHAD presente no SYBYL-X 2.0. As características farmacofóricas foram geradas por meio do alinhamento dos conformémeros entre si para a construção dos modelos farmacofóricos. Avaliou-se os valores de Pareto (Pareto = 0) e valores de energia (> 100 kcal/mol), a fim de verificar a necessidade de exclusão de algum modelo. Os modelos farmacofóricos remanescentes foram testados quanto sua habilidade de diferenciar estruturas químicas de inibidores reais (verdadeiros positivos) de não inibidores (falsos positivos ou decoys), estes últimos gerados no servidor DUD-E¹⁹. O banco de dados completo (14 moléculas verdadeiro positivas e 700 decoys) foi alinhado a cada modelo farmacofórico, utilizando os parâmetros padrão de GALAHAD e seus valores QFIT. Foi utilizada a curva ROC para avaliar a especificidade e sensibilidade de cada modelo. São considerado moderadamente preditivos modelos com o valor da AUC > 0.70 . Somente a avaliação da curva ROC não foi conclusiva, sendo necessário utilizar como critério de desempate, o somatório de parâmetros estatísticos internos (STERICS, H_bond e MOL_qry). O melhor modelo farmacofórico foi utilizado para filtrar as moléculas presentes nos bancos Sigma-AldrichTM, Our Own Chemical Collection (OCC-UFESJ) e opnME.

Em seguida, para as etapas referentes ao acoplamento molecular, coletou-se a estrutura 3D de Pteridina Redutase 1 (PTR1) de *L. major* (PDB ID 5L42) disponível no PDB, que foi preparada utilizando o servidor H++²⁰. Durante o preparo houve a adição de átomos de hidrogênio e cargas Gaisteiger-Huckel, bem como a exclusão de moléculas de água não estruturais e demais artefatos de cristalização. A eficiência do

acoplamento molecular foi avaliada pela sobreposição das poses do ligante cocrystalizado obtida por acoplamento molecular em relação a pose cristalográfica. Aquelas com desvio médio quadrático (RMSD) $< 2,0$ são ditas satisfatórias e foram avaliadas por outras métricas de enriquecimento. Para validação do melhor parâmetro de busca, foram realizadas rotinas nos seguintes programas: GOLD 3.0²¹ (funções de pontuação: ASP, GoldScore, ChemScore e ChemPLP), Surflex-Dock²² (implementado no SYBYL-X 2.0) e AutoDock Vina 1.1.2²³. Os resultados obtidos foram então utilizados para a geração da curva ROC e cálculo da AUC. A DHFR-TS não possui estrutura cristalográfica para a *Leishmania*. Assim, Vadloori¹ construiu e validou um modelo 3D para DHFR-TS e cedeu para os experimentos de acoplamento molecular. Subsequentemente, os compostos priorizados frente a triagem virtual por modelo farmacofórico foram empregados nas etapas de acoplamento molecular. As moléculas foram acopladas frente a estrutura 3D de PTR1, aquelas com QFIT $> 48,63$ foram então acopladas frente ao modelo 3D de DHFR-TS, apenas as moléculas com QFIT $> 56,76$, foram priorizadas para a etapa de aplicação dos filtros, o cálculo de QFIT foi realizado através da equação matemática da média mais duas vezes o desvio padrão. As moléculas remanescentes das etapas de triagem virtual hierárquica foram avaliadas quanto aos descritores presentes na regra de Lipinski²⁴ e Veber²⁵. As moléculas que atenderam a todos os critérios das regras foram caracterizados com base nos parâmetros de mutagenicidade com o auxílio da plataforma OCHEM. Por fim, aquelas remanescentes foram avaliadas com base na disponibilidade comercial para aquisição.

Com o objetivo de selecionar moléculas com ligações interações catalíticas distintas entre si, foram construídos dois dendrogramas, referente à PTR1 e DHFR-TS, através do programa Dendroscope²⁶. As moléculas selecionadas foram submetidas ao programa Poseview^{27,28,29,30} para a geração e análise dos mapas de interações intermoleculares.

Resultados e Discussão

Por meio do GALAHADTM, foram gerados 10 modelos farmacofóricos utilizando um conjunto de compostos (conjunto de treinamento) que possuíam ação inibitória frente a PTR1 e DHFR-TS^{8,9}. Modelos farmacofóricos que possuem valores de energia elevados ($> 100,00$ Kcal/mol) refletem numa dificuldade para que os inibidores atinjam a conformação necessária para a definição das características farmacofóricas, conferindo conformémeros energeticamente desfavoráveis³¹. Assim, entre os 10 modelos construídos, o modelo 09 foi descartado (Tabela 1).

A análise dos parâmetros estatísticos internos demonstrou que os demais modelos farmacofóricos eram estatisticamente equivalentes, não possuindo nenhum modelo superior aos demais³².

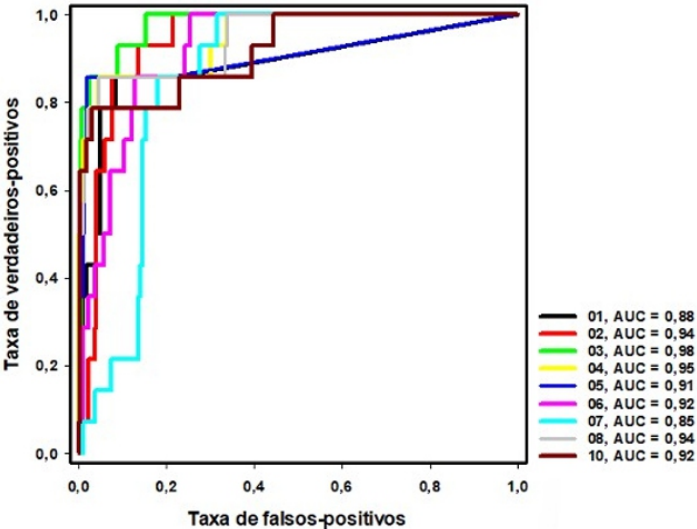
Tabela 1. Parâmetros estatísticos internos dos modelos farmacofóricos para inibidores de PTR1 e DHFR-TS.

Modelo	Energia (kcal/mol)	Sterics	H_bond	Mol_qry	Pareto
01	27,55	345,50	65,20	12,0	0,0
02	33,34	302,40	65,60	13,9	0,0
03	25,64	372,00	64,90	12,0	0,0
04	66,17	268,00	74,80	12,0	0,0
05	22,58	256,00	62,30	12,0	0,0
06	54,34	225,50	74,00	14,2	0,0
07	25,50	239,50	62,90	12,3	0,0
08	64,94	250,50	74,80	12,0	0,0
09	110,71	275,70	74,80	9,3	0,0
10	23,07	300,30	64,80	3,2	0,0

Fonte: os autores, 2023

A fim de corrigir essa limitação, a capacidade de diferenciação dos compostos ativos dos falsos positivos (decoys) por meio da curva ROC foi utilizada como critério de desempate¹⁴. Os modelos farmacofóricos que possuírem AUC < 0,50 são associados a modelos com desempenho pior do que uma seleção aleatória, enquanto os modelos com AUC > 0,70 são moderadamente preditivos³³ (Figura 1).

Figura 1. Curva ROC dos modelos farmacofóricos remanescentes para inibidores duais frente a PTR1 e DHFR-TS de *L. major*.



Fonte: os autores, 2023

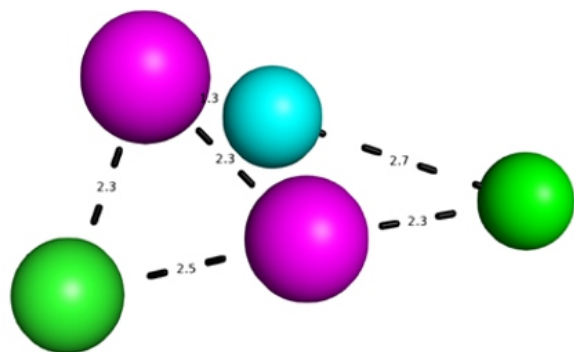
Todos os modelos apresentaram AUC > 0, não sendo possível selecionar o melhor modelo farmacofóricos com as métricas utilizadas. Dessa forma, para que a escolha pudesse ser realizada utilizou-se a somatória dos parâmetros estatísticos internos obtidos pelo GALAHAD (STERICS, H_bond e MOL_qry) (Tabela 2)³⁴.

Tabela 2. Somatório dos parâmetros estatísticos internos (XX, YY e ZZZ) do GALAHAD.

Modelo	Somatório
01	422,70
03	448,90
04	354,80
05	339,30
08	337,30
10	368,40

Fonte: os autores, 2023

Com base nesse somatório, o modelo farmacofórico 03 foi selecionado para a etapa de triagem virtual por atender a todos os critérios de avaliação (Figura 2).

Figura 2. Representação do modelo farmacofórico 03.

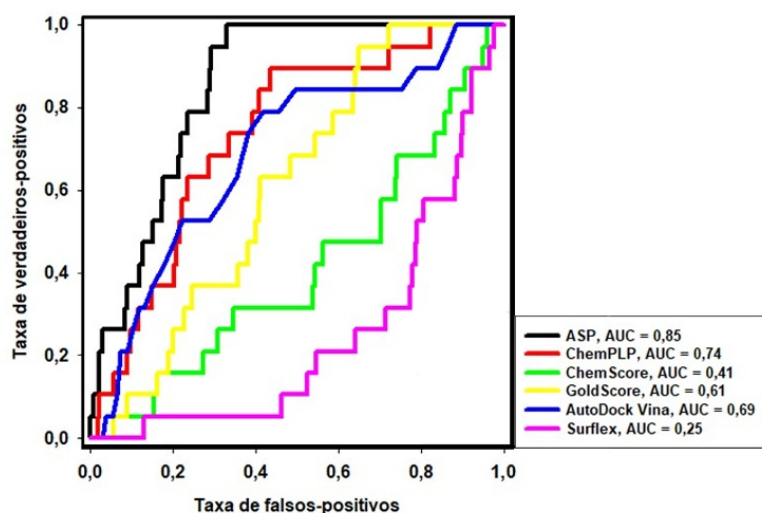
Legenda: Esferas magenta representam sítios aceitadores de ligação de hidrogênio (HBA), esferas verdes representam os doadores de ligação de hidrogênio (HBD) e a esfera em ciano representa centro hidrofóbico (HY).

Fonte: os autores, 2023

Após a identificação de um modelo farmacofórico útil para a etapa de triagem virtual, uma filtragem foi realizada entre os 215.725 compostos presentes nos bancos de dados utilizados, desse total, 10.651 compostos possuíam requisitos estéreo-eletrônicos parciais (QFIT > 0).

Após a rotina de acoplamento molecular em cada programa (reacoplamento molecular), foi possível avaliar a eficiência de acoplamento molecular entre as diferentes métricas analisada, sendo encontrado resultados positivos visto que todas métricas obtiveram valores de RMSD (valor do desvio médio quadrático) inferiores a 2.0 Å.

Visto que não houve diferença entre as os protocolos de acoplamento no critério anterior, procedeu-se com a avaliação da capacidade de diferenciar inibidores verdadeiros em relação a falsos positivos como critério de desempate (Figura 3).

Figura 3. Curva ROC dos parâmetros de acoplamento molecular frente a PTR1 de *L. major*

Fonte: os autores, 2023

Com base nos dados obtidos, o parâmetro de busca escolhido foi a função de pontuação ASP do programa GOLD, já que possui o maior valor da área sob a curva (AUC = 0,85). Não houve necessidade de realizar reacoplamento molecular para avaliar o DHFR-TS, uma vez que, mesmo sem a presença da estrutura cristalográfica para *Leishmania* em humanos cadastrada no PDB, Vadloori¹ construiu e validou um modelo 3D para DHFR-TS. De modo que, o parâmetro de busca validado por Vadloori foi a função de pontuação ChemPLP do programa GOLD, contando com um valor de área sob a curva de 0.94 e sendo capaz de reproduzir a pose do ligante.

Os compostos priorizados na etapa de triagem anterior - modelo farmacofórico - foram utilizados para o acoplamento molecular. Inicialmente, as moléculas foram acopladas no sítio de ligação da PTR1, as 215 selecionadas de acordo com seus valores de QFIT, foram, em seguida, acopladas no sítio de ligação da DHFR-TS conforme parâmetros de busca validados, a fim de selecionar moléculas mais favoráveis a inibição dual, resultando na priorização de 21 moléculas com QFIT > 56,76; através de cálculo de média e desvio padrão.

A fim de aumentar o sucesso na priorização de potenciais moléculas biodisponíveis por via oral, priorizou-se moléculas que respeitassem a regra de Lipinski²⁴: Peso Molecular (PM) < 500 Da; doadores de ligação de hidrogênio (DLH) < 5; aceptores de ligação de hidrogênio (ALH) < 10; e cLog P < 5 e Veber²⁵: área de superfície polar (ASP) < 140Å²; Ligações rotacionáveis < 10; Soma de DLH e ALH < 12; comumente utilizada para essa finalidade. Portanto, os descritores físico-químicos constantes nessas regras e toxicológicos (potencial mutagênico - teste de AMES) foram calculados para as moléculas priorizadas, resultando nas moléculas remanescentes presentes na tabela (Tabela 3).

Essa estratégia resultou na seleção de 10 moléculas sem nenhuma penalidade com base nas regras de Lipinski e Veber, das quais todas possuem disponibilidade comercial.

Na tentativa de selecionar moléculas com modos de ligação diferentes, que possam apresentar propriedades biológicas úteis, foi realizado um agrupamento das moléculas selecionadas com base no perfil de ligação para possibilitar a seleção das melhores moléculas em cada família, foram construídos dois dendrogramas, referente à PTR1 e DHFR-TS, com a finalidade de priorizar duas moléculas, para cada alvo, com perfis de interação distintos. O critério utilizado para a escolha das moléculas foi possuir elevado valor de QFIT e energia de afinidade obtida do cálculo de acoplamento. Assim, as moléculas em diferentes famílias com os melhores valores de QFIT/energia de afinidade foram escolhidas para a caracterização das interações intermoleculares (Tabela 4).

Tabela 3. Filtros físico-químicos e toxicológicos

Composto	MM (g/mol)	DLH	ALH	LogP	ASP (Å) ²	LR	DLH + ALH	AMES
ZINC00036114	329,84	1	5	3,99	140,26	6	6	Negativo
ZINC00352630	326,43	1	6	4,17	138,01	4	7	Negativo
ZINC00521241	205,26	2	6	1,40	78,55	2	8	Negativo
ZINC03160984	205,17	1	6	1,05	84,62	1	7	Negativo
ZINC03646776	277,35	1	5	2,81	115,19	5	6	Negativo
ZINC05248007	229,26	2	5	0,98	90,34	4	7	Negativo
ZINC05796425	260,33	1	5	1,45	108,67	7	6	Negativo
ZINC17206214	241,68	1	4	1,43	98,07	2	5	Negativo
ZINC32951426	315,36	1	7	1,66	130,25	6	8	Negativo
ZINC34555175	315,81	1	5	3,74	133,90	5	6	Negativo

Legenda: MM = massa molecular; DLH = doador de ligação de hidrogênio; ALH = aceitador de ligação de hidrogênio; Log P = coeficiente de partição octanol-água; ASP = Área de superfície polar; LR = Ligações rotacionáveis; AMES = Potencial mutagênico.

Fonte: os autores, 2023

Tabela 4. Valores de QFIT e de energia de afinidade entre os ligantes e o alvo biológico

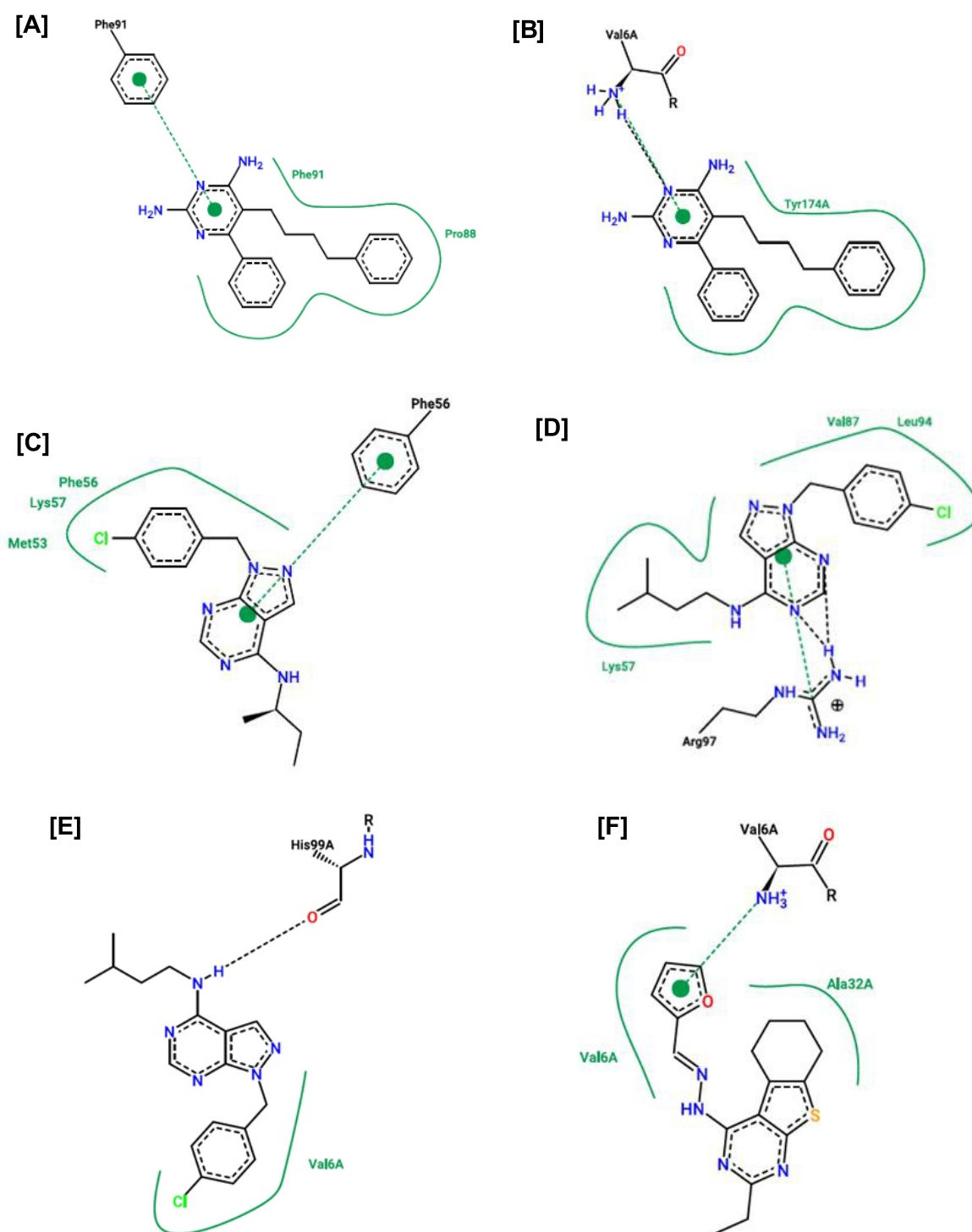
Composto	QFIT	- PTR1 (kcal/mol)	- DHFR-TS (kcal/mol)
ZINC00036114	50,42	62,48	67,65
ZINC00352630	80,50	62,17	63,37
ZINC00521241	80,50	61,97	63,32
ZINC03160984	58,02	56,31	48,43
ZINC03646776	48,71	73,32	50,91
ZINC05248007	77,71	54,75	57,46
ZINC05796425	48,71	56,52	40,93
ZINC17206214	48,71	51,23	50,24
ZINC32951426	48,64	55,03	55,76
ZINC34555175	49,85	40,90	47,71

Fonte: os autores, 2023

As moléculas priorizadas frente a PTR1 foram ZINC05248007 e ZINC00521241 e as priorizadas frente a DHFR-TS foram ZINC00352630 e ZINC00521241. Destaque para ZINC00521241, que possui elevado valor nos indicadores descritos e foi

selecionada frente a ambos os alvos. As moléculas priorizadas possuem interações intermoleculares que já foram visualizadas em pesquisas anteriores frente aos dois alvos³⁵(Figura 4).

Figura 4. Interações intermoleculares das moléculas selecionadas e de uma molécula conhecida (c70) com ação frente a PTR1 e DHFR-TS. [A] Interação da molécula experimental com PTR1, [B] Interação da molécula experimental com DHFR-TS, [C] Interação da molécula ZINC05248007 com PTR1, [D] Interação da molécula ZINC00521241 com DHFR-TS, [E] Interação da molécula ZINC00521241 com PTR1 e [F] Interação da molécula ZINC00352630 com DHFR-TS.



Fonte: os autores, 2023

Analisando as estruturas selecionadas, observa-se a importância de anéis aromáticos e/ou grupamentos aromáticos, sendo a presença desses anéis uma característica hidrofóbica; além de grupos doadores e/ou aceptores de ligação de H. O conjunto de anéis interligados presente nas moléculas selecionadas se assemelha ao conjunto de anéis tricíclico existente na estrutura da molécula experimental¹⁸. Esta estrutura de conjunto de anéis contendo pontos de ligação de hidrogênio também está presente nas moléculas do banco com atividade biológica dual, que foi utilizado anteriormente na validação dos modelos farmacofóricos⁹.

A relevância das interações intermoleculares encontradas foi previamente descrita^{4,8,36,37}. Para as interações frente a PTR1, destaca-se a importância do resíduo Phe-113 para o empilhamento π , representado pelos centros hidrofóbicos e do resíduo His-111 nas ligações de hidrogênio, o que confere maior estabilidade de ligação com as moléculas. Em relação a DHFR-TS, é sinalizada a presença de resíduos de Lys-198, Val-109, Arg-17 e Leu-66, essenciais para a estabilização do substrato, conferindo maior afinidade de interação com as moléculas.

Conclusão

No presente estudo, modelos farmacofóricos foram construídos e validados por meio de parâmetros estatísticos. O melhor modelo farmacofórico (AUC = 0.98) foi utilizado para a seleção de moléculas por meio do alinhamento molecular. O algoritmo presente no programa GOLD, empregado por meio das funções ASP, para acoplamento molecular frente a PTR1 e ChemPLP, para acoplamento frente a DHFR-TS possibilitou o acoplamento molecular e permitiu a seleção de compostos com características estereo-eletrônicas similares bem como requisitos que possibilitam a permeabilidade em membranas biológicas.

Desse modo, as características encontradas nas interações intermoleculares sugerem afinidade de ligação entre as moléculas e os alvos. E através de técnicas *in silico* a priorização dos compostos ZINC00521241, ZINC05248007 e ZINC00352630 se mostra promissora em razão do potencial de inibição dual frente a Pteridina Redutase 1 e Dihidrofolato Redutase-Timidilato Sintase de *Leishmania major*.

Declaração de conflito de interesse: Os autores não declaram conflitos de interesse relevantes ou relações financeiras.

Participação dos autores: Os autores contribuíram de maneira igualitária na elaboração do manuscrito.

Agradecimentos: À Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) e ao PPPG/UEFS pelo apoio institucional, ao CNPq pelo apoio financeiro e ao

Laboratório de Modelagem Molecular (LMM) pelo apoio técnico e operacional.

Referências

1. VADLOORI, B. et al. Homology modelling, molecular docking, and molecular dynamics simulations reveal the inhibition of *Leishmania donovani* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase enzyme by Withaferin-A. BMC Res. Notes. 2018; 11(246).
2. DANTAS, R. F.; TORRES-SANTOS, E. C.; SILVA, F. P. Past and future of trypanosomatids high-throughput phenotypic screening. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2022; 117.
3. PONTE, G. Saiba como prevenir as leishmanioses. Fiocruz. 2022.
4. LEITE, F. H. A. Planejamento e avaliação de novos inibidores de pteridina redutase 1 (PTR1) de *Leishmania major*. 2015. 156 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2015.
5. SANTIAGO, A. S.; PITA, S. S. da R.; GUIMARÃES, E. T. Leishmaniasis treatment, current therapy limitations and new alternative requirements: A narrative review. Res., Soc., Dev. 2021; 10(07).
6. FERNANDES, L. R. M. Leishmaniose: Tratamento atual e perspectivas de novos fármacos. 2014. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Química e Farmácia, Universidade do Algarve, [S.l.], 2014.
7. SIENKIEWICZ, N. et al. Chemical and genetic validation of dihydrofolate reductase-thymidylate synthase as a drug target in African trypanosomes. Mol Micro. 2008; 69(02): 520-533.
8. HARDY, L. W., et al. Biochemical and genetic tests for inhibitors of *Leishmania* pteridine pathways. Exp. parasitol. 1997; 87: 157-169.
9. CAVAZZUTI, A., et al. Discovery of potent pteridine reductase inhibitors to guide antiparasite drug development. PNAS. 2008; 105(05): 1448-1453.
10. BENNIS, I. et al. Control of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* in Southeastern Morocco. Trop. Med. Int. Health. 2015; 20(10): 1297-1305.
11. CORBETT, A., et al. Drug repositioning for Alzheimer's disease. Nat. Rev. Drug Discov. 2012; 11: 833-846.

12. BANSODE, S. B., et al. Molecular investigations of protriptyline as a multitarget directed ligand in Alzheimer's disease. PLoS ONE. 2014; 9: 105-196.
13. BRANDÃO, H. N.; et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. Quim Nova. 2010; 33(06): 1359-1369.
14. SHEPPHARD, J. K.; Æ. R. D. CLARK. A marriage made in torsional space: using GALAHAD models to drive pharmacophore multiplet searches. J. Comput. Aided Mol. Des. 2006.
15. FERREIRA, R. S. et al. Complementarity between a docking and a high-throughput screen in discovering new cruzain inhibitors. J. Med. Chem. 2010; 53(13): 4891-4905.
16. TANG, Y.T.; MARSHAL, G. R. Virtual screening for lead discovery. Drug Des. Discov. 2011; 716: 1-22.
17. CHEMAXON. Marvin Sketch version 2016: ChemAxon, 2020.
18. GASTEIGER, J.; MARSILI, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity-a rapid access to atomic charges. Tetrahedron. 1980; 36(22): 3219-3228.
19. MYSINGER, M. M. et al. DUD Enhanced – better ligands and decoys for better benchmarking. J. Med. Chem. 2012; 55: 6582-6594.
20. ANANDAKRISHNAN R.; AGUILAR B.; ONUFRIEV A. V., H++ 3.0: automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations. Nucleic Acids Res. 2012; 40.
21. GOLD, version 4.0; Cambridge Crystallographic Database: Cambridge, U.K, 2008.
22. TRIPOS. SYBYL-X 2.0, St Louis, MO, USA, p. 190, 2010.
23. TROTT O., OLSON A. J., AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, J Comput Chem. 2010; 31: 455-461.
24. LIPINSKI, C. A., et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. Adv. Drug Deliv. Rev. 1997; 23: 3-26.
25. VEBER et al. Molecular Properties That Influence the oral bioavailability of Drug Candidates. J. Med. Chem. 2002; 45.
26. HUSON, D. H.; SCORNAVACCA, C. Dendroscope 3 - An interactive viewer for rooted phylogenetic trees and networks, Syst. Biol. 2012; 5(28).
27. FRICKER, P. C.; GASTREICH, M.; RAREY, M. Automated drawings of structural molecular formulas under constraints. Journ. Chem. Inform. Comp. Scien. 2004; 44(03): 1065-1078.
28. RAREY, M. et al. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. Journal Mol. Bio. 1996; 261 (03): 470-489.
29. STIERAND, K.; RAREY, M. From modeling to medicinal chemistry: automatic Generation of two-dimensional complex diagrams. Chem. Med. Chem., 2007; 2(06): 853-860.
30. STIERAND, K.; MAAB, P.; RAREY, M. Molecular complexes at a glance: automated Generation of two-dimensional complex diagrams. Bioinform. 2006; 22(14): 1710-1716.
31. LIU, M.; Q. WU; W. HU. Pharmacophore Screening on Piperidinecarboxamides Derivatives Based on GALAHAD and CoMFA Models. Chinese J. Chem. 2011.
32. MASCARENHAS, A. M. S. et al. Pharmacophore-based virtual screening and molecular docking to identify promising dual inhibitors of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. J. Biomol. Struct. Dyn. 2020; 38: 1-10.
33. METZ, C. E. Basic principles of ROC analysis. Semin. Nucl. Med. 1978; 8(04): 283-298.
34. CLARK, R. D.; ABRAHAMIAN, E. Using a staged multi-objective optimization approach to find selective pharmacophore models. JCAMD. 2009; 23(11): 765-771.
35. KAPIL, S., et al. Structure based designing of benzimidazole/benzoxazole derivatives as anti-leishmanial agents. SAR QSAR Environ Res. 2019; 30: 919-933.
36. FERRARI, S., et al. Virtual screening identification of nonfolate compounds, including a CNS drug as antiparasitic agents inhibiting Pteridine Reductase. J. Med. Chem. 2011; 54: 211-221.
37. MCLUSKEY, K., et al. Inhibition of Leishmania major pteridine reductase by 2,4,6-triaminoquinazoline: structure of the NADPH ternary complex. Acta Crystallogr., Sec D: Biol. Crystallogr. 2004; 60(10): 1780-1785.