

Trabalho

Título em Português: Avaliação e Planejamento de Novos Candidatos a Fármacos para a Leishmaniose Visceral e Doença de Chagas

Título em Inglês: Evaluation and Design of New Drug Candidates for Visceral Leishmaniasis and Chagas Disease

Autor: Maynara Afonso

Instituição: Universidade de São Paulo

Unidade: Instituto de Física de São Carlos

Orientador: Adriano Defini Andricopulo

Área de Pesquisa / SubÁrea: Biofísica Molecular

Agência Financiadora: CNPq - PIBIC

AVALIAÇÃO E PLANEJAMENTO DE NOVOS CANDIDATOS À FÁRMACOS PARA A LEISHMANIOSE VISCERAL E DOENÇA DE CHAGAS

Maynara Afonso

Analú Rocha Costa, João Victor Silva-Silva

Prof. Dr. Adriano Defini Andricopulo

Instituto de Física de São Carlos/ Universidade de São Paulo

maynara.afonso@usp.br

Objetivos

(i) Avaliação *in vitro* de compostos sintéticos contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum* (ii) Determinação da citotoxicidade em células de fibroblastos (HFF-1) e macrófagos humanos (THP-1) (iii) Caracterização da estrutura dos compostos promissores por teoria do funcional da densidade (DFT) (iv) Análise das interações dos compostos no sítio ativo da enzima tripanotona redutase por docking molecular (v) Estudo de propriedades farmacocinéticas dos compostos.

Métodos e Procedimentos

A atividade antiparasitária foi realizada contra a forma amastigota intracelular de *T. cruzi* Tulahuen *LacZ*, infectando fibroblastos humanos (linhagem HFF-1). A detecção da atividade foi realizada usando o substrato CPRG (Sigma-Aldrich). Para a forma amastigota intracelular de *L. infantum* (cepa MHOM/MA67/ITMAP-263), monócitos THP-1 diferenciados em macrófagos foram infectados, fixados com metanol e corados com Giemsa (Sigma-Aldrich). A citotoxicidade foi avaliada em células HFF-1, THP-1 e hepatócitos da

linhagem HepG2. Os valores de IC_{50} e CC_{50} foram determinados pelo software GraphPad Prism 8, com índice de seletividade ($IS = CC_{50}/IC_{50}$). Para a análise da teoria do funcional de densidade (DFT) a otimização e a frequência foram calculadas no Orca 5.0.2 [1]. Os ensaios de modelagem molecular foram conduzidos através do software GOLD v.2022.1.0 [2] e os resultados foram analisados visualmente usando o Pymol versão v2.3.2. Os ensaios farmacocinéticos foram realizados usando espectrômetro de massas, modelo LCMS-8045.

Resultados

A investigação destacou os compostos (1 e 2, Figura 1) como promissores para o tratamento da leishmaniose e da doença de Chagas. Ambos apresentaram um perfil não citotóxico ($CC_{50} > 64 \mu M$), $IC_{50} < 10 \mu M$ e $IS > 100$ contra *L. infantum* e *T. cruzi*, atendendo aos critérios para identificação de compostos líderes [3]. Ferramentas computacionais, como DFT e docking molecular, foram utilizadas para investigar propriedades eletrônicas e a interação dos compostos com alvos moleculares. As análises de DFT revelaram uma tendência redutora de elétrons, enquanto o docking molecular mostrou que os compostos

interagem com o sítio ativo da tripanotona redutase (Figura 2). A inibição dessa enzima pode desestabilizar o equilíbrio redox e elevar os níveis de espécies reativas de oxigênio, o que pode explicar os resultados observados nos ensaios *in vitro*.

Além disso, a avaliação *in vitro* das propriedades farmacocinéticas indicou a alta estabilidade metabólica do composto 1, a partir da avaliação em microsomos hepáticos em humanos e determinação de $\log D$. O ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela (PAMPA) identificou o composto 2 com alta permeabilidade além de o mesmo ter apresentado alta solubilidade cinética em pH = 2, enquanto o composto 1 apresentou moderada solubilidade. Boas propriedades farmacocinéticas são imprescindíveis em um fármaco, propriedades como a solubilidade cinética e permeabilidade passiva transcelular estão altamente associadas à biodisponibilidade e à viabilidade de administração oral do fármaco [4].

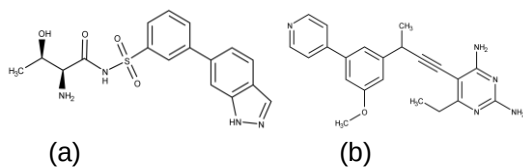


Figura 1: Estrutura compostos 1 (a) e 2 (b)

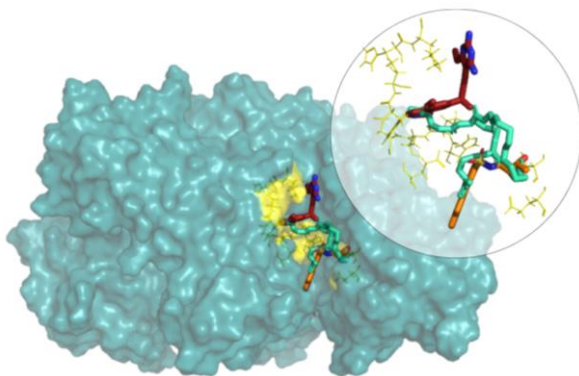


Figura 2: Enzima 1BZL com compostos 1 e 2.

Conclusões

Portanto, foi possível a identificação de dois compostos com propriedades promissoras: o composto 1, IC_{50} de 0,49 μM e composto 2, IC_{50} de 0,14 μM para *L. infantum* e *T. cruzi*, respectivamente. Além disso, a caracterização da atividade através da elucidação do mecanismo é imprescindível para o planejamento racional de novos fármacos.

Agradecimentos

O apoio dos colaboradores Simone Michelan-Duarte, Rafael Consolin Chelucci e Thiago Doring que contribuíram para o desenvolvimento do projeto. Ao apoio da agência de fomento para realização do presente trabalho: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Processo 126372/2023-3.

Referências

- [1] F. Neese, "The ORCA program system," WIREs Comput. Mol. Sci., vol. 2, no. 1, pp. 73–78, Jan. 2012.
- [2] "BdEC." [Online]. Available: bdec.dotlib.com.br/inicio_csds/application/Hermes. [Accessed: 19-Jan-2024].
- [3] Katsuno, K., Burrows, et al. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. Nat Rev Drug Discov 14, 751–758 (2015).
- [4] Komura, H. et al. The Trends and Future Prospective of *In Silico* Models from the Viewpoint of ADME Evaluation in Drug Discovery. Pharmaceutics 2023, 15, 2619.

EVALUATION AND DESIGN OF NEW DRUG CANDIDATES FOR VISCERAL LEISHMANIASIS AND CHAGAS DISEASE

Maynara Afonso

Analú Rocha Costa, João Victor Silva-Silva

Prof. Dr. Adriano Defini Andricopulo

São Carlos Institute of Physics /University of São Paulo

maynara.afonso@usp.br

Objectives

(i) *In vitro* evaluation of synthetic compounds against *Trypanosoma cruzi* Tulahuen and *Leishmania infantum* (ii) Determination of cytotoxicity in human fibroblast cells (HFF-1) and human monocytic leukemia cell line (THP-1) (iii) Characterization of the structure of promising compounds by Density Functional Theory (DFT) (iv) Analysis of the interactions of the compounds at the active site of the enzyme trypanothione reductase through molecular docking (v) Study of the pharmacokinetic properties of the compounds.

Materials and Methods

The antiparasitic activity was performed against the intracellular amastigote form of *T. cruzi* Tulahuen *LacZ*, infecting human fibroblasts (HFF-1 cell line). For activity detection was used the CPRG substrate (Sigma-Aldrich). For the intracellular amastigote form of *L. infantum* (strain MHOM/MA67/ITMAP-263), differentiated THP-1 monocytes into macrophages were infected, fixed with methanol, and stained with Giemsa (Sigma-Aldrich). Cytotoxicity was determined in HFF-1, THP-1, and hepatocytes from the HepG2 cell line. IC_{50} and CC_{50} values were determined using GraphPad Prism 8 software, with selectivity index ($SI = CC_{50}/IC_{50}$).

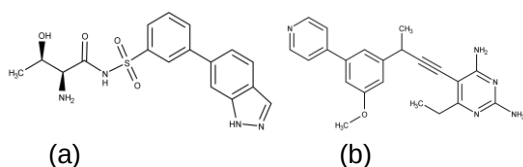
For Density Functional Theory (DFT) analysis, optimization and frequency were calculated in Orca 5.0.2 [1]. Molecular modeling assays were conducted using GOLD v.2022.1.0 software [2], and results were visually analyzed using PyMOL version v2.3.2. Pharmacokinetic assays were performed using a mass spectrometer, model LCMS-8045.

Results

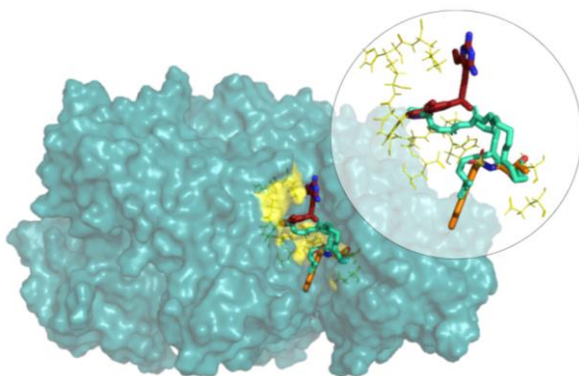
The investigation highlighted compounds 1 and 2 (Picture 1) as promising candidates for the treatment of leishmaniasis and Chagas disease. Both compounds exhibited a non-cytotoxic profile ($CC_{50} > 64 \mu M$), $IC_{50} < 10 \mu M$, and $SI > 100$ against *L. infantum* and *T. cruzi*, meeting the criteria for identifying lead compounds [3].

Computational tools, such as DFT and molecular docking, were used to investigate the electronic properties and interaction of the compounds with molecular targets. DFT analyses revealed a tendency for electron reduction, while molecular docking showed that the compounds interact with the active site of trypanothione reductase (Picture 2). Inhibition of this enzyme can destabilize the redox balance and increase reactive oxygen species levels, which may explain the results observed in the *in vitro* assays.

Additionally, *in vitro* evaluation of pharmacokinetic properties indicated high metabolic stability for compound 1, based on human liver microsome analysis and eLogD determination. The parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) identified compound 2 with high permeability, as well as high kinetic solubility at pH = 2, while compound 1 demonstrated moderate solubility. Good pharmacokinetic properties are crucial in a drug candidate, as properties such as kinetic solubility and passive transcellular permeability are highly associated with bioavailability and the viability of oral administration [4].



Picture 1: Compound structure 1 (a) e 2 (b)



Picture 2: 1BZL with compounds 1 and 2.

Conclusions

Therefore, it was possible to identify two compounds with promising properties: compound 1, with an IC_{50} of 0.49 μM , and compound 2, with an IC_{50} of 0.14 μM for *L. infantum* and *T. cruzi*, respectively. Furthermore, characterizing the activity through

the elucidation of the mechanism is essential for the rational design of new drugs.

Acknowledgements

The support of collaborators Simone Michelan-Duarte, Rafael Consolin Chelucci, and Thiago Doring, who contributed to the development of the project, is greatly appreciated. We also acknowledge the support from the funding agency that made this work possible: the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) – Process 126372/2023-3.

References

- [1] F. Neese, "The ORCA program system," *WIREs Comput. Mol. Sci.*, vol. 2, no. 1, pp. 73–78, Jan. 2012.
- [2] "BdEC." [Online]. Available: bdec.dotlib.com.br/inicio_csds/application/Hermes. [Accessed: 19-Jan-2024].
- [3] Katsuno, K., Burrows, et al. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. *Nat Rev Drug Discov* 14, 751–758 (2015).
- [4] Komura, H. et al. The Trends and Future Prospective of In Silico Models from the Viewpoint of ADME Evaluation in Drug Discovery. *Pharmaceutics* 2023, 15, 2619.