

## INVESTIGAÇÃO E POSSÍVEIS ALVOS MOLECULARES DE NOVOS COMPOSTOS TERPENOIDES COMO CANDIDATOS A FÁRMACOS ANTITUMORAIS

Andre Francisco de Souza<sup>1</sup> (IC), Daniel Henriques Soares Leal<sup>1</sup> (PQ)

<sup>1</sup>Universidade Federal de Itajubá.

**Palavras-chave:** Antitumorais. Docking molecular. Terpenoides. Tipifarnib. Via do mevalonato.

### Introdução

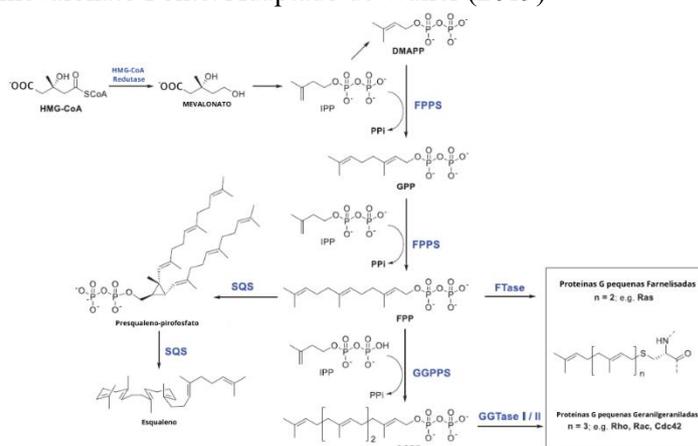
O câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo. As estatísticas relacionadas ao câncer podem variar ao longo do tempo, mas, em 2020, de acordo com a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), estimou-se que ocorreram cerca de 10 milhões de mortes relacionadas ao câncer em todo o mundo (KARLIC, 2019).

O quadro atual do tratamento do câncer é complexo e envolve diversos desafios. O tratamento do câncer atualmente enfrenta dois principais desafios: custos elevados e terapias muitas vezes tóxicas com índice terapêutico reduzido.

Diversas abordagens são consideradas no tratamento do câncer, e uma delas envolve a intervenção na via do mevalonato. Esta via metabólica desempenha um papel crucial na produção de colesterol e de outros compostos essenciais para as células, incluindo precursores de moléculas de sinalização celular chamadas isoprenoides. Alguns candidatos a fármacos anticancerígenos agem inibindo a via do mevalonato, interferindo na produção de isoprenoides fundamentais para a proliferação celular e a sobrevivência das células cancerígenas.

A via do mevalonato (Figura 1) desempenha um papel crítico nas etapas finais de farnesilação da proteína *Ras* e geranylgeranilação da proteína *Rho*, que são oncoproteínas associadas ao câncer. Quando essas proteínas recebem grupos terpênicos, as mesmas são ativadas e desencadeiam eventos celulares que promovem a replicação descontrolada das células cancerosas. Portanto, o bloqueio da via do mevalonato é uma interessante estratégia para combate ao câncer, uma vez que impediria a ativação dessas proteínas-chave envolvidas no processo de crescimento desordenado das células cancerosas. Essa é a razão pela qual compostos capazes de bloquear essas enzimas são vistos como promissores agentes antitumorais (GOLDSTAIN, 2019).

Figura 1 – Representação esquemática da via do mevalonato Fonte: Adaptado de Waller (2019)



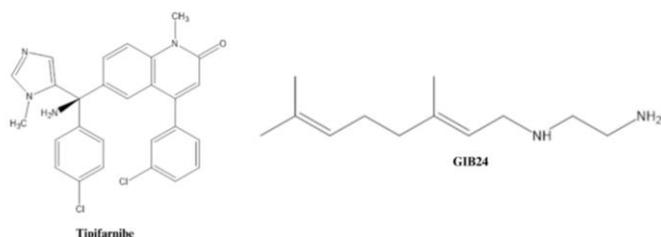
O objetivo proposto com o estudo foi conduzir uma análise computacional de novos compostos terpenoides com potencial para interferir na via do mevalonato, como parte dos esforços para desenvolvimento de novos compostos para combate ao câncer.

O método utilizado envolveu um estudo computacional que incluiu análise conformacional e *docking* molecular de compostos terpenoides. Esse estudo visa compreender como as propriedades estereoeletrônicas desses compostos se relacionam com alguns alvos moleculares previamente identificados na literatura e relacionados à via do mevalonato. Esse tipo de análise computacional é fundamental para avaliar como esses compostos podem interagir com alvos específicos dentro da via do mevalonato, o que pode levar ao desenvolvimento de terapias direcionadas no tratamento do câncer e de outras doenças relacionadas (REID, 2004).

### Metodologia

Os compostos GIB24 (AZEREDO *et al.*, 2020; Figura 2) e tipifarnib (REID, 2004) foram selecionados como modelos para este estudo.

Figura 2 – Estruturas químicas dos compostos GIB24 e tipifarnib, investigados no presente estudo



A estrutura do composto GIB24 foi desenhada e otimizada inicialmente por mecânica molecular utilizando o *software* GaussView 6<sup>®</sup> (DENNINGTON *et al.*, 2016). Posteriormente, foi realizada a análise conformacional por busca sistemática utilizando o *software* Spartan'14<sup>®</sup> na forma de base conjugada (neutra) em fase gasosa por mecânica molecular (campo de força MMFF94). Foram geradas e armazenadas 100 conformações de menor energia. As 10 conformações de menor energia foram selecionadas, representando aproximadamente 66% do total considerando a distribuição de Boltzmann calculada segundo o SPARTAN'14<sup>®</sup>. Em seguida, as 10 conformações foram otimizadas por mecânica quântica com o método DFT, usando o funcional B3LYP e o conjunto de bases 6-31G(d,p) com solvatação implícita em água (método IEFPCM) no *software* Gaussian 09<sup>®</sup> (DENNINGTON *et al.*, 2016).

Posteriormente, as três melhores estruturas otimizadas das bases conjugadas (com uma diferença de energia de até 0,2 Kcal/mol) foram convertidas em seus ácidos conjugados monocatiônicos por adição manual de átomos de hidrogênio a elas no GaussView e salvas separadamente como amônios primário e secundário. Em seguida, estas estruturas dos ácidos conjugados foram otimizadas com B3LYP e 6-31G(d,p) em água (IEFPCM).

A etapa seguinte consistiu na realização das simulações de *docking* molecular com o *software* Molegro Virtual Docker<sup>®</sup> (THOMSEN e CHRISTENSEN, 2006) (MVD<sup>®</sup>), versão 7.0. Foi utilizada a estrutura da enzima farnesiltransferase de proteínas (PFT) humana complexada com o substrato natural farnesil-pirofostato (FPP) e o inibidor tipifarnib (estrutura 1SA4; RCSB, 2022).

O melhor protocolo para as simulações de *docking* foi investigado mediante combinação dos algoritmos de busca e de pontuação disponíveis no MVD<sup>®</sup>. O *redocking* do tipifarnib (ligante cristalográfico)

foi usado como referência e avaliado por meio dos valores de RMSD (*Root Mean Square Deviation*), uma métrica comum para comparar as conformações da molécula obtidas durante o *docking* com a estrutura de referência previamente conhecida.

Foram feitas combinações dos diferentes algoritmos de busca e pontuação. Os algoritmos de busca utilizados disponíveis no MVD<sup>®</sup> são os seguintes: *MolDock Optimizer* (1), *MolDock SE* (2), *Iterated Simplex* (3) e *GPU Screening (CUDA)* (4). Os algoritmos de pontuação disponíveis foram os seguintes: *MolDock Score (A)*, *MolDock Score (GRID)* (B), *PLANTS Score (C)* e *PLANTS Score (GRID)* (D). Combinando-se estes algoritmos, apenas três das 16 combinações totais possíveis puderam ser usadas para avançar com os cálculos.

## Resultados e discussão

Os resultados da análise conformacional estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1: Ranqueamento das conformações do GIB24 determinadas nas análises conformacionais.

Conformações	Energia relativa (kcal/mol)			
	Base conjugada		Ácido conjugado	
	MM*	DFT <sup>††</sup>	Amônio Primário (DFT <sup>†</sup> )	Amônio Secundário (DFT <sup>†</sup> )
<u>1</u>	0,00	0,50	-	-
<u>2</u>	0,02	1,97	-	-
<u>3</u>	0,16	0,00	0,17	2,44
<u>4</u>	0,17	0,91	-	-
<u>5</u>	0,19	0,19	0,13	2,38
<u>6</u>	0,22	0,02	0,00	2,42
<u>7</u>	0,29	0,55	-	-
<u>8</u>	0,31	0,47	-	-
<u>9</u>	0,39	1,53	-	-
<u>10</u>	0,41	1,93	-	-

\*MM: mecânica molecular, campo de força MMFF94 (SPARTAN'14).

<sup>†</sup>Funcional B3LYP, conjunto de bases 6-31G(d,p), água implícita (IEFPCM), correção por ZPE (*zero-point energy*).

<sup>‡</sup>Frequências imaginárias ausentes (exceto a conformação 4).

Pela análise da Tabela 1, pode-se observar que as estruturas dos ácidos conjugados da amina do GIB24 (amônios primários) são mais estáveis do que os amônios secundários, indicando que o grupo amino primário do GIB24 é mais básico do que o secundário.

Nas simulações de *docking* molecular, observou-se que a combinação que apresentou os melhores resultados no *redocking* envolveu os algoritmos de busca MolDock Optimizer e MolDock SE, juntamente com os algoritmos de pontuação MolDock Score e PLANTS Score, entre os diversos cenários testados (Tabela 2).

Tabela 2: Resultados das combinações de algoritmos de busca e pontuação testados.

Esquema*	RMSD (redocking)**	Energia de interação das melhores poses (kcal/mol)			
		Tipifarnib	GIB24		
			Base neutra	Amônio primário	Amônio secundário
1A	0,9891	-157,918	-52,050	-67,948	-65,608
1B	1,1067	-	-	-	-
1C	1,0814	-160,514	-61,872	-70,712	-60,229
1D	1,0599	-	-	-	-
2 <sup>a</sup>	0,8946	-158,093	-58,741	-72,381	-59,943
2B	1,1156	-	-	-	-
2C	1,1562	-	-	-	-
2D	1,0479	-	-	-	-
3 <sup>a</sup>	3,3165	-	-	-	-
3B	3,1611	-	-	-	-
3C	3,1546	-	-	-	-
3D	3,2939	-	-	-	-
4 <sup>a</sup>	4,0500	-	-	-	-
4B	2,3365	-	-	-	-
4C	2,7599	-	-	-	-
4D	3,9113	-	-	-	-

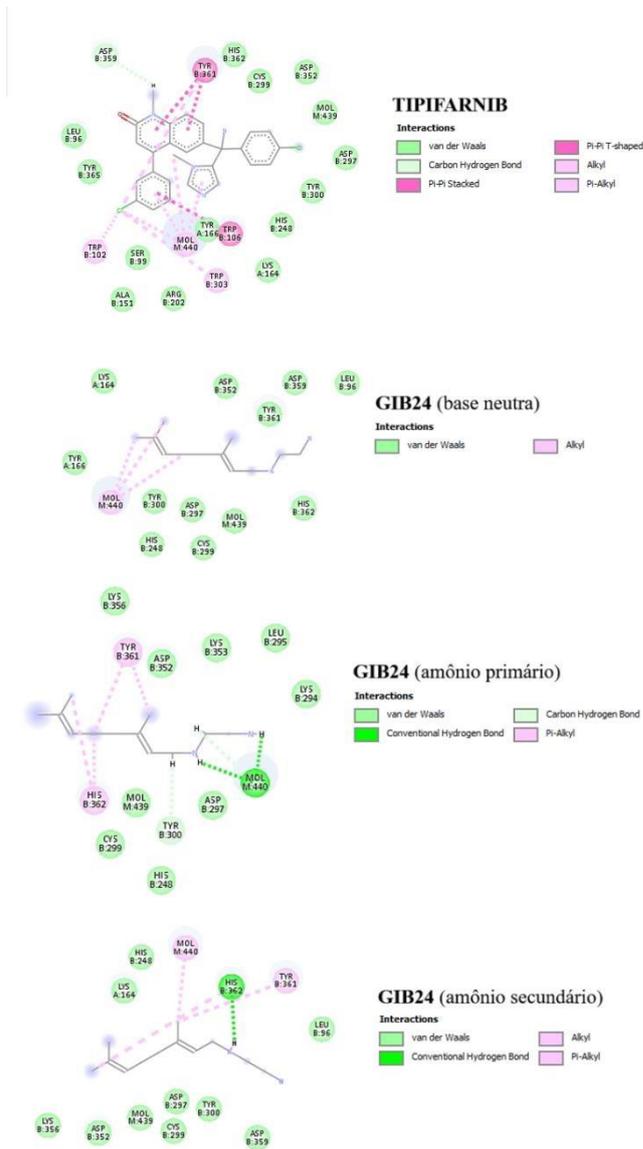
\*Algoritmos de busca: 1 - MolDock Optimizer; 2 - MolDock SE; 3 - Iterated Simplex; 4 - GPU Screening (CUDA). Algoritmos de pontuação: A - MolDock Score; B - MolDock Score; C - PLANTS Score; D - PLANTS Score (GRID).

\*\*RMSD calculado para a pose do tipifarnib com menor RMSD em relação à estrutura cristalográfica.

Nestes cenários, observou-se que a estrutura que apresentou a melhor interação com a enzima PFT foi a do composto tipifarnib. Quanto ao GIB24, as melhores interações foram observadas na forma do ácido conjugado da amina primária (cátion amônio primário), o que está em concordância com os resultados obtidos na análise conformacional.

Na Figura 3 a seguir, são apresentadas as principais interações entre as melhores poses dos ligantes e os resíduos-chave do sítio ativo da enzima PFT.

Figura 3 – Mapas de interações entre os ligantes e o sítio ativo da enzima PFT (criados com o software BIOVIA, Dassault Systèmes, DS Visualizer, DS2021<sup>®</sup>).



A interação dos ácidos conjugados com o resíduo TYR361 (tirosina) desempenhou um papel crucial na diferença observada em relação à forma de base conjugada, indicando que essa interação é significativa.

Além disso, percebe-se que o mesmo resíduo TYR361 estabeleceu interações fortes com o tipifarnib, que é o composto de comparação, demonstrando a importância desse aminoácido. É relevante ressaltar que o GIB24 e seus compostos também apresentaram interações com o FPP (MOL M:440).

Essas observações destacam a importância de investigar mais a fundo as interações específicas entre os ligantes, os aminoácidos e outros componentes do sítio ativo da enzima, pois essas interações podem desempenhar um papel crucial na atividade biológica e no desenvolvimento de terapias direcionadas.

## Conclusões

Apesar de os resultados obtidos com o GIB24 não terem alcançado a expectativa inicial no sentido de apresentar atividade antitumoral, esta pesquisa contribuiu para melhorar nossa compreensão das interações da enzima investigada envolvida na via do mevalonato. As formas de ácidos conjugados dos compostos dinitrogenados, especialmente o amônio primário, apresentaram resultados mais favoráveis no *docking* em comparação com a base conjugada.

Isso sugere que compostos dinitrogenados contendo aminas primárias em sua forma de ácido conjugado podem ter uma interação mais eficaz com a enzima PFT em comparação com as formas de bases conjugada. Os *insights* adquiridos ao longo do estudo podem servir como uma base sólida para investigações futuras.

Este estudo teve um impacto positivo no aprendizado acadêmico e profissional, proporcionando a aplicação prática de princípios teóricos complexos, o aprimoramento das habilidades de pesquisa e análise, bem como estimulando a interdisciplinaridade e uma compreensão mais profunda das relações entre química e biologia.

## Agradecimentos

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a todos que tornaram possível minha pesquisa de iniciação científica na Universidade Federal de Itajubá. Agradeço à minha família pelo apoio incansável ao longo de minha jornada acadêmica, ao meu orientador pela orientação valiosa, à bolsa de pesquisa da PIBIC UNIFEI pelo suporte financeiro e à universidade por fornecer o ambiente e recursos necessários para minha formação e pesquisa. A todos vocês, meu sincero agradecimento por serem parte essencial deste capítulo importante em minha vida acadêmica.

## Referências

AZEREDO, C. M.; SOARES, JOSE, M.; SARAIVA, M. F.; OLIVEIRA, M.; BARBOSA, G.; ALMEIDA, M. V.; SOUZA, M. V. N.; The terpenic diamine GIB24 inhibits the growth of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes and intracellular amastigotes, with proteomic analysis of drug-resistant epimastigotes. **Chem Biol Interact**, [S. l.], v. 330, n. 109165, p. 1-10, 1 out. 2020.

BIOVIA, Dassault Systèmes, DS Visualizer Client, DS2021, San Diego: Dassault Systèmes, 2021.

GOLDSTAIN, J. L.; BROWN, M. S. Regulation of the mevalonate pathway. **Nature**, [s. l.], v. 343, p. 425–430, 1 fev. 1990.

HUCKE, Oliver; GELB, Michael H; VERLINDE, Christophe L M J; BUCKNER, Frederick S. The protein farnesyltransferase inhibitor Tipifarnib as a new lead for the development of drugs against Chagas disease. **Med Chem**, [s. l.], v. 48, ed. 17, p. 5415–5418, Agosto 2005.

KARLIC, H.; VARGA, F. **Enciclopédia do Câncer (Terceira Edição)**, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-geneticsand-molecular-biology/mevalonate-pathway>> Acesso em 01 set. 2023.

REID, T S; BEESE, L. S. Crystal structures of the anticancer clinical candidates R115777 (Tipifarnib) and BMS-214662 complexed with protein farnesyltransferase suggest a mechanism of FTI selectivity. **Biochemistry**, [s. l.], v. 43, ed. 22, p. 6877-6884, 8 jun. 2004.

THOMSEN, René ; CHRISTENSEN, Mikael H. MolDock: A New Technique for High-Accuracy Molecular Docking; **J. Med. Chem.**, 2006, 49(11), pp 3315 – 3321

WALLER, D. D.; PARK, J.; TSANTRIZOS, Y. S. Inhibition of farnesyl pyrophosphate (FPP) and/or geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) biosynthesis and its implication in the treatment of cancers. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 54, n. 1, p. 41–60, 2 jan. 2019.