



Identificação de novos fármacos contra a doença de Chagas através de estratégia de genômica e bioinformática

Juliana Rodrigues ¹
Nayara Rodrigues Alves ²
Fernanda Galdino da Silva ³
Pedro Vitor Lemos Cravo ⁴

RESUMO:

A doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, acarreta elevada mortalidade e morbidade em regiões tropicais e subtropicais. Na ausência de uma vacina eficaz, o seu controle é dependente do tratamento de pacientes. Entretanto, apenas dois fármacos, benznidazole e nifurtimox, são oficialmente utilizados. Contudo, estes são incapazes de gerar cura e apresentam elevada toxicidade. Neste sentido, o trabalho teve como objetivo identificar novas terapias contra a doença de Chagas, fazendo-se uso de uma aproximação bioinformática. Foi primariamente utilizada a base de dados do genoma do *T. cruzi* para selecionar potenciais alvos terapêuticos envolvidos em mecanismos de transporte intracelular. Depois cada um dos alvos terapêuticos selecionados foi introduzido em duas bases de dados que permitiram identificar fármacos baseando-se no critério de homologia com proteínas de outras espécies para as quais já existem drogas eficazes. Este processo permitiu identificar dez novas drogas com o potencial de eliminar ou inibir o crescimento do parasita.

Palavras chave: Chagas; *Trypanosoma cruzi*; Fármacos; Genômica; Bioinformática.

¹ Mestre em Ecologia e Evolução pela Universidade Federal de Goiás. Professora da Universidade Estadual de Goiás e Professora da Faculdade Anhaguera de Anápolis, Brasil. rodriguesbiologa@hotmail.com.

² Graduada em Farmácia pela Faculdade Montes Belos. nayara-alvesfarm@hotmail.com.

³ Mestre em Ciências Ambientais pelo Centro Universitário de Anápolis, UniEVANGÉLICA. Professora da Universidade Estadual de Goiás, Brasil. fernandagaldino@hotmail.com.

⁴ Doutor em Genética pela Universidade de Edimburgo, Reino Unido. Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 2. Professor da Universidade Federal de Goiás, Brasil. pedrovcravo@gmail.com.

Juliana Rodrigues; Nayara Rodrigues Alves; Fernanda Galdino da Silva; Pedro Vitor Lemos Cravo

A doença de Chagas é causada por um parasita intracelular denominado *Trypanosoma cruzi* que é transmitido aos humanos por intermédio da picada de um Triatomíneo hematófago da espécie *Triatominae* (popularmente designado de bicho-barbeiro). A doença de Chagas é endêmica na América do Sul, onde se estima que existam atualmente cerca de 14 milhões de pessoas cronicamente infectadas e de onde resultam 10.000 a 14.000 óbitos anualmente diretamente atribuídos à doença (Rassiet al. 2012). As principais razões de óbito advêm principalmente de complicações cardíacas e gastrointestinais (Rassi et al. 2012).

No Brasil, calcula-se que existam cerca de 3 milhões de indivíduos cronicamente infectados com o *T. cruzi* e que o número de casos agudos da doença esteja aumentando no decorrer dos últimos anos (http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31454). Um fato interessante é que a doença de Chagas, primordialmente uma enzootia, passou a ser considerada uma antropozoonose, devido à domiciliação dos vetores, deslocados de seus ecótopos silvestres originais, pela ação do homem sobre o ambiente.

Pelo fato de ser categorizada como uma doença negligenciada, os esforços de pesquisa e desenvolvimento de novas vacinas e terapias anti-chagásicas têm-se revelado como um processo moroso e ineficaz. Consequentemente, apenas dois fármacos, benznidazole e nifurtimox, são oficialmente empregues para o tratamento da doença. No entanto, ambas as drogas são incapazes de exercer cura radical, além de apresentarem elevada toxicidade (Coura & Borges-Pereira 2012).

No presente trabalho pretendeu-se colmatar essa lacuna de conhecimento, usando recursos bio-computacionais atualmente disponíveis, que combinam uma aproximação de genômica com recursos de química computacional.

A estratégia convencional desenvolvimento de drogas pode envolver tanto a descoberta de drogas de novo e a melhoria de inibidores de alvos validados individualmente (Bispo et al. 2013). Embora este processo represente uma estratégia eficaz para desenvolver novos fármacos é em geral dispendioso e demorado. Uma alternativa e /ou abordagem complementar é avaliar drogas já aprovadas para uso clínico para outras condições que possam também ser eficazes contra a doença de Chagas, acelerando assim a descoberta de novas terapias. Sendo que esses medicamentos já foram aprovados para uso em seres humanos para outros fins, podem mais facilmente entrar em ensaios clínicos de eficácia anti-chagásica sob as diretrizes já existentes de administração (Bispo et al. 2013). Esta estratégia denomina-se “reposicionamento de fármacos” (Sleigh& Barton 2010). Recentemente, o nosso grupo de trabalho usou com sucesso, a estratégia de reposicionamento de fármacos, baseando-se em análises

Juliana Rodrigues; Nayara Rodrigues Alves; Fernanda Galdino da Silva; Pedro Vitor Lemos Cravo
bioinformáticas de quimiogenômica, identificando vários compostos com potencialidade inibitória contra parasitas de malária (Bispo et al. 2013) e equinostomíases (Neves et al. 2014).

Existe um número de bases de dados disponíveis que fornecem informação sobre milhares de alvos proteicos já conhecidos e validados, as doenças em que estão envolvidos, evidências das vias metabólicas em que participam e as drogas correspondentes contra eles dirigidas. Neste projeto foram usadas duas destas bases de dados, DrugBank (Knox et al. 2011) e Therapeutic Target Database (TTD) (Zhu et al. 2012) para identificar proteínas envolvidas em mecanismos de transporte intracelular em *T. cruzi*, que possam ser inibidas por fármacos já aprovados para uso clínico em humanos.

METODOLOGIA

1. ESTRATÉGIA GERAL PARA IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS ALVOS TERAPÊUTICOS DO *TRYPANOSOMA CRUZI*

Na fase de identificação dos alvos terapêuticos, foram usadas três bases de dados: TriTrypDB, DrugBank e TherapeuticTargetsDatabase. Os resultados obtidos em todas as bases de dados foram cruzados de modo a definir os melhores resultados prováveis, que se basearam em critérios de afinidade com o alvo, “essencialidade” do alvo, menor probabilidade de toxicidade para humanos, resultados preliminares de eficácia in vitro (quando disponíveis) e disponibilidade do composto.

1.1. TRI TRYPDB ([HTTP://TRITRYPDB.ORG/TRITRYPDB/](http://tritypdb.org/tritypdb/)): BASE DE DADOS DO GENOMA DO *T. CRUZI*

A base de dados TriTrypDB, do genoma do *T. cruzi*, foi usada para identificar todos os genes e correspondentes peptídeos codificados pelo parasita que se associam a sistemas de transporte celular. Cada uma destas proteínas foi computada em um ficheiro de Excel, onde se registrou o identificador (ID), a anotação funcional e a sequência de cada proteína. Cada uma destas proteínas foi considerada como um potencial alvo terapêutico e a sua sequência foi usada para interrogar as bases de dados de alvos terapêuticos e correspondentes inibidores, tal como descrito nas seções subsequentes.

1.2. DRUGBANK ([HTTP://WWW.DRUGBANK.CA/](http://www.drugbank.ca/)) E THERAPEUTIC TARGETS DATABASE ([HTTP://XIN.CZ3.NUS.EDU.SG/GROUP/CJTTT/TTD.ASP](http://xin.cz3.nus.edu.sg/group/cjttt/TTD.asp))

As bases de dados DrugBank (Knox et al. 2012) e Therapeutic Targets Database (TTD) (Zhou et al. 2011) são repositórios que providenciam informação sobre alvos terapêuticos proteicos já conhecidos e explorados, a respectiva doença alvo, informação sobre via metabólica e sobre as drogas correspondentes a cada um dos alvos terapêuticos. Nestas bases de dados também se incluem ligações a

Juliana Rodrigues; Nayara Rodrigues Alves; Fernanda Galdino da Silva; Pedro Vitor Lemos Cravo
outros repositórios contendo informação sobre a função do alvo, sequência, estrutura 3D, propriedades de ligação dos ligandos, estrutura das drogas, classe terapêutica e estágio de desenvolvimento clínico.

Um dado importante é que estes recursos permitem usar a sequência primária das proteínas para identificar potenciais inibidores através de modelamento por homologia. Por outras palavras, é possível usar a sequência de aminoácidos dos potenciais alvos do *T. cruzi*, para procurar estruturas terciárias homólogas e conhecidas contra as quais já existem inibidores identificados e disponíveis ou em vias de desenvolvimento clínico relativamente a outras doenças.

Assim, cada uma das proteínas com ligação a mecanismos de transporte intracelular identificadas na base de dados TriTrypDB, foram rastreadas usando o DrugBank e TTD no intuito de se identificarem inibidores compatíveis com os critérios anteriormente descritos. Assim, foi gerada uma lista *in silico* dos potenciais melhores alvos e inibidores correspondentes. Esta lista de alvos foi computada em Excel.

1.3. COMBINAÇÃO DOS DADOS DOS DOIS REPOSITÓRIOS

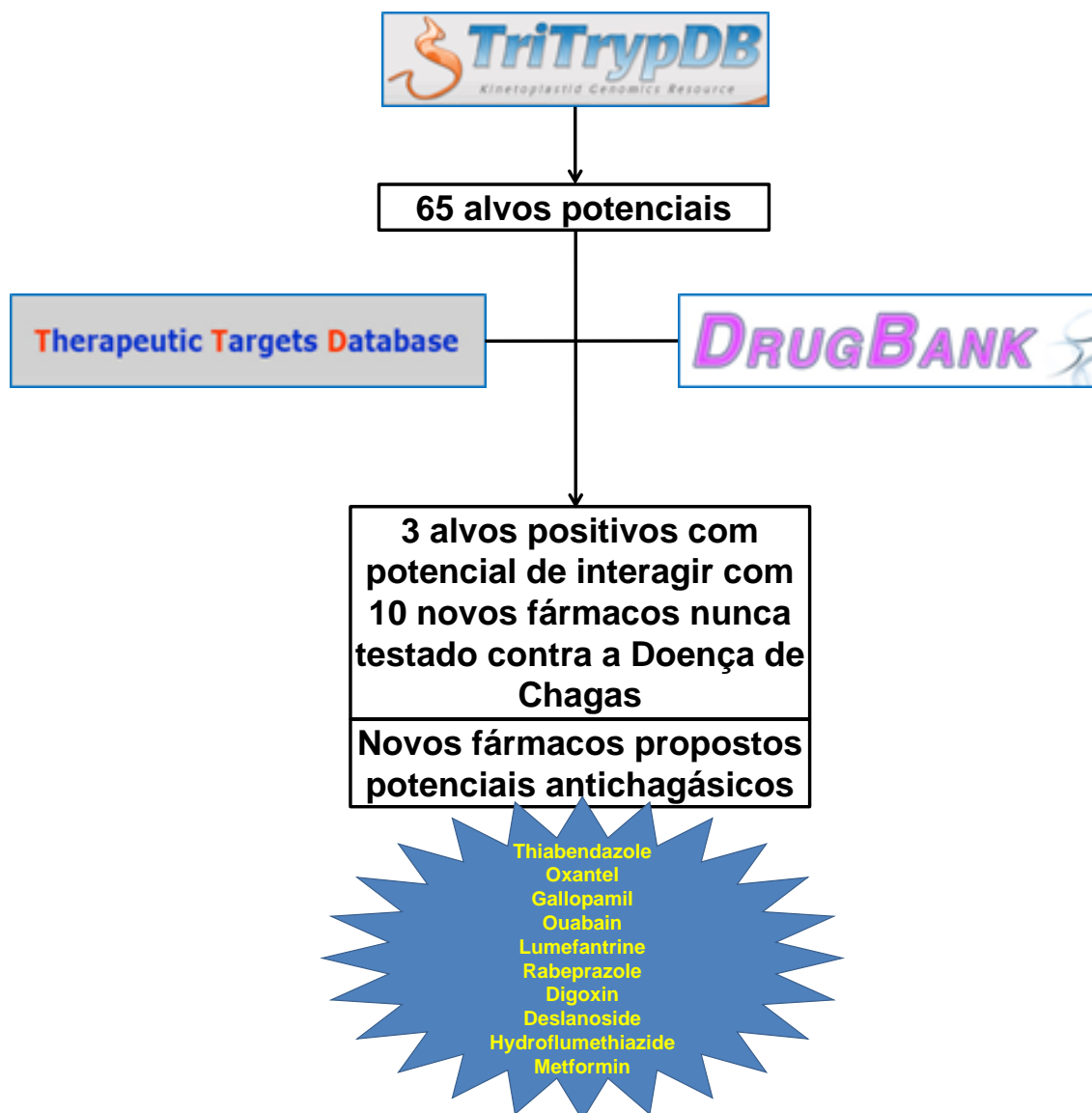
Os resultados obtidos nas bases de dados foram cruzados de modo a definir os melhores *hits* prováveis, que se basearam em critérios de afinidade com o alvo, “essencialidade” do alvo, menor probabilidade de toxicidade para humanos, resultados preliminares de eficácia *in vitro* e disponibilidade do composto. Assim, foi gerada uma lista de alvos e respectivas drogas com potencial atividade anti-chagásica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para facilidade de compreensão dos resultados obtidos, é apresentado um fluxograma (Figura 1). Dados detalhados sobre alvos terapêuticos e respectivos fármacos são fornecidos na Tabela 1.

Cada uma das proteínas prevista para exercer função de transporte celular no *Trypanosoma cruzi*, foi copiada para um único arquivo Excel como descrito em Materiais e Métodos. Uma lista de um total de 65 sequências de proteínas-alvo foram assim compiladas e cada uma dessas sequências na lista foi interrogada por “similaridade com alvo” nas duas bases de dados utilizadas (DrugBank e TTD), produzindo uma lista de um total de três (3) alvos positivos. Decidimos usar todos os três bancos de dados, pois cada um deles pode conter diferentes conjuntos de dados sobre alvo e droga e, conseqüentemente, a probabilidade das metas serem perdidas devido a um rastreio reduzido.

Figura 01. Fluxograma representando os resultados obtidos ao longo das diferentes fases do presente trabalho



Fonte: Os Autores.

Os potenciais alvos identificados foram os seguintes: *vesicule-associatedmembraneprotein, putative, plasma membrane Ca²⁺ ATPase e Glycosomalmembraneprotein, putative*. Os dados relativos a cada um dos alvos e fármacos previstos de interferir com eles estão detalhados na Tabela 1.

Tabela 01. Novos fármacos candidatos contra a doença de Chagas, identificados neste estudo (ND: não determinado)

FÁRMACO	CATEGORIA	TOXICIDADE	ALVO EM <i>T. Cruzi</i> (ID)	ALVO HOMÓLOGO (E-VALUE)
Thiabendazole	Fungicida	Sobredosagem pode resultar em perturbações transiente da visão e	vesicule-associated membrane protein, putative	Vesicle-associated membrane protein (4.0e-7)

		alterações psíquicas.	TcCLB.508779.30	
Oxantel	Parasiticida	ND	vesicule-associated membrane protein, putative TcCLB.508779.30	Vesicle-associatedmembraneprotein (4.0e-7)
Gallopamil	Anti-hipertensivo	ND	plasmamembrane Ca2+ ATPase TcCLB.506401.170	Sarcoplasmic-endoplasmicreticulumcalciumATPase2 (6,00E-60)
Ouabain	Anti-hipertensivo	ND	plasmamembrane Ca2+ ATPase TcCLB.506401.170	Sodium/potassium-transportingATPase alpha-1 chain (1,00E-56)
Lumefantrine	Parasiticida	ND	plasmamembrane Ca2+ ATPase TcCLB.506401.170	Sodium/potassium-transportingATPase alpha-1 chain (1,00E-56)
Rabeprazole	Anti-ulcerante	ND	plasmamembrane Ca2+ ATPase TcCLB.506401.170	Potassium-transportingATPase alpha chain1 (2,00E-51)
Digoxin	Anti-cardíaco	Taquicardia e arritmia	plasmamembrane Ca2+ ATPase TcCLB.506401.170	Sodium/potassium-transporting ATPase alpha-1 chain (P05023 - AT1A1_HUMAN) (5,00E-62)
Deslanoside	Anti-cardíaco	Taquicardia e arritmia	plasmamembrane Ca2+ ATPase TcCLB.506401.170	Sodium/potassium-transporting ATPase alpha-1 chain (P05023 - AT1A1_HUMAN) (5,00E-62)
Hydroflumethiazid e	Anti-cardíaco	Taquicardia e arritmia	plasmamembrane Ca2+ ATPase TcCLB.506401.170	Sodium/potassium-transporting ATPase alpha-1 chain (P05023 - AT1A1_HUMAN) (5,00E-62)
Metformin	Anti-diabético	Desconforto epigástrico, náusea, vômito e dores de cabeça ocasionais	Glycosomal membrane protein, putative TcCLB.507669.150	ND

Fonte: Os Autores.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em sumário, foi determinado que *vesicule-associatedmembraneprotein, putative, plasma membrane Ca2+ ATPase e Glycosomalmembraneprotein, putative*, interagem com dois (2), sete (7) e um (1) fármaco, respectivamente. Concluímos assim que este trabalho de quimiogenômica permitiu identificar dez (10) novas drogas com potencial de inibir o crescimento do *T. cruzi* através de interferência com mecanismos de transporte molecular. Apesar do fato de que a ação biológica destes fármacos necessita ainda ser avaliada experimentalmente, este foi o primeiro trabalho usando uma estratégia de

Juliana Rodrigues; Nayara Rodrigues Alves; Fernanda Galdino da Silva; Pedro Vitor Lemos Cravo
“reposicionamento de fármacos” para identificar novas terapias para a doença de chagas, abrindo assim novas oportunidades para o controle desta doença.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado por uma Bolsa da Fundação Nacional de Desenvolvimento do Ensino Superior Particular (FUNADESP), com o projeto “Identificação de novos fármacos contra a doença de Chagas através de estratégia de quimiogenômica por reposicionamento” coordenada pelo Prof. Pedro Cravo, no Centro Universitário de Anápolis-UniEVANGÉLICA.

REFERÊNCIAS

- Bispo NA, Culleton R, Silva LA, Cravo P 2013. A Systematic In Silico Search for Target Similarity Identifies Several Approved Drugs with Potential Activity against the Plasmodium falciparum Apicoplast. *PLoS ONE* 8(3): e59288. doi:10.1371/journal.pone.0059288
- Coura JR, Borges-Pereira J 2012. American trypanosomiasis (Chagas disease). Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review. *Rev Soc Bras Med Trop*. 45(3):286-96
- Knox C, Law V, Jewison T, Liu P, Ly S et al. 2011. DrugBank 3.0: a comprehensive resource for 'omics' research on drugs. *Nucleic Acids Res*. 39(Database issue):D1035-41.
- Neves BJ, Braga RC, Bezerra JCB, Cravo P, Andrade CH 2014. In Silico Repositioning Chemogenomics strategy identifies New Drugs with potential activity Against Multiple Life Stages of Schistosoma Mansoni. Submetido a *PLoS Neglected Diseases*.
- Rassi A Jr, Rassi A, Marcondes de Rezende J 2012. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin North Am*. 26(2):275-91
- Ribeiro I, Sevcsik A-M, Alves F, Diap G, Don R, et al. 2009. New, Improved Treatments for Chagas Disease: From the R&D Pipeline to the Patients. *PLoS Negl Trop Dis* 3(7): e484.
- Sleigh SH, Barton CL 2010. Repurposing Strategies for Therapeutics. *PharmMed* 24 (3): 151–159
- Solomon CJ 2011. First Century of Chagas' Disease: An Overview on Novel Approaches to Nifurtimox and Benznidazole Delivery Systems. *J Pharmaceutical Sci*. 101, 888-894.
- Zhu F, Shi Z, Qin C, Tao L, Liu X et al. 2012. Therapeutic target database update 2012: a resource for facilitating target-oriented drug discovery. *Nucleic Acids Res*. 40(D1): D1128-1136

Identification of new Drugs Against Chagas Disease through Genomics and Bioinformatics Strategies

ABSTRACT

Chagas disease, caused by the protozoan parasite *Trypanosomacruzi*, is a major cause of mortality and morbidity in tropical and subtropical regions. In the absence of an effective vaccine, its control is highly dependent on the treatment of infected patients. However, only two drugs, nifurtimox and benznidazole, are officially used for treating Chagas disease. Also, these drugs are incapable of generating radical cure and display high toxicity. Under this perspective, this study aimed to identify new therapies against Chagas disease, making use of a bioinformatics approach. Thus, the *T. cruzi* genome database was initially employed for selecting potential therapeutic targets (proteins) involved in intracellular transport mechanisms. In the second phase, each of the selected therapeutic targets was used to interrogate two databases that are able to identify inhibitors (drugs) based on homology with proteins from other species for which effective drugs are already available. This process, called "drug repositioning", allowed the identification of ten (10) new compounds with the potential to eliminate or inhibit the growth of *T. cruzi* parasites. The identification of these drugs may open new perspectives for the treatment of Chagas disease.

Keywords: Chagas; *Trypanosoma cruzi*; Drugs; Genomics; Bioinformatics.