DA INTERAÇÃO GDI-RAB À TRIAGEM VIRTUAL DE MODULADORES: NOVAS PERSPECTIVAS FARMACOLÓGICAS PARA A RESISTÊNCIA À INSULINA

Isabela Vilela Moreli[1]; Hugo Mikael da Silva Ferreira[1]; Laura Donatti Eto[1]; João Marcelo de Castro e Sousa[2]; Guilherme Barroso L. De Freitas[1]
E-mail do orientador: gblfreitas@uem.br

[1]**Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, Paraná, Brasil.**
[2]**Universidade Federal do Piauí (UFPI, Teresina, Piauí, Brasil.**
Grande Área do CNPq: Ciências da Saúde.
Área: Farmácia; Subárea: Química Farmacêutica Medicinal.
Palavras-chave: tráfego vesicular; modelagem molecular; descoberta de fármacos.

Resumo
A resistência à insulina envolve alterações no tráfego de vesículas contendo GLUT4, processo regulado por pequenas GTPases Rab e pela GDI1. Este estudo explorou a GDI1 como alvo molecular ainda pouco investigado nesse contexto, por meio da construção e validação de seu modelo tridimensional, identificação de uma cavidade potencialmente modulável e avaliação de pequenas moléculas por triagem virtual. A estrutura foi modelada por três plataformas, validada por métricas estruturais e empregada em *docking* molecular. Uma biblioteca derivada do ZINC foi filtrada por propriedades físico-químicas e alertas toxicológicos preditivos, seguida de *screening in silico* com exaustividade 8, *redocking* com exaustividade 32, agrupamento por esqueletos de Murcko e *redocking* final para análise dos complexos. O modelo selecionado apresentou TM-score de 0,956 e QMEANDisCo de 0,84. Das 744.726 moléculas inicialmente aprovadas, 337.895 foram submetidas ao *screening*, 3.379 avançaram para *redocking* e 241 foram agrupadas em 13 famílias químicas prioritárias. Dez representantes foram avaliados no *docking* final, com MolDock Score entre -116,819 e -83,309, destacando-se ZINCk900000xYwnB. Os resultados sustentam a GDI1 como alvo exploratório para modulação do eixo Rab–GLUT4 e fornecem candidatos prioritários para validação molecular e celular.

Introdução
A resistência à insulina é um componente central da fisiopatologia do diabetes mellitus tipo 2 e decorre, entre outros mecanismos, da redução da resposta dos tecidos periféricos à insulina. A ativação do receptor de insulina desencadeia uma cascata de sinalização que resulta no aumento da translocação de GLUT4 para a membrana plasmática e, consequentemente, da captação de glicose. Nesse processo, pequenas GTPases Rab (e.g. Rab10), em sua forma ativa ligada a GTP, recrutam proteínas efetoras que promovem a mobilização, o direcionamento e a fusão das vesículas contendo GLUT4 com a membrana plasmática. Após sua atuação, as Rabs são inativadas pela hidrólise de GTP a GDP e permanecem temporariamente associadas à membrana por seu grupo prenil. A GDI1 reconhece a Rab-GDP prenilada, promove sua extração da membrana e forma o complexo solúvel RabGDP-GDI1 no citosol. Enquanto associada à GDI1, a Rab permanece inativa e indisponível para nova ativação por fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEFs). Após sua liberação e reassociação à membrana, a troca de GDP

por GTP mediada por GEFs permite sua reativação e participação em um novo ciclo de tráfego vesicular; para Rab10.

A associação e a dissociação entre GDI e Rab constituem etapas centrais para a disponibilidade espacial dessas GTPases e para a dinâmica do tráfego vesicular (AN et al., 2003). Embora a interface GDI–Rab seja extensa e não apresente um sítio ortostérico clássico, cavidades próximas a regiões funcionalmente relevantes podem representar oportunidades para modulação alostérica. A exploração desses sítios permite investigar compostos capazes de alterar a estabilidade ou a dinâmica do complexo, sem atribuir previamente um efeito biológico específico. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo construir e validar um modelo tridimensional da GDI1 humana, identificar uma cavidade estruturalmente explorável e selecionar potenciais moduladores por meio de triagem virtual de larga escala, análise de relação estrutura–atividade/energia (SAR), identificação de famílias estruturais e docking molecular refinado.

Materiais e Método

A sequência da GDI1 humana foi obtida no UniProt Knowledgebase (P31150; GDIA_HUMAN). Como referência estrutural, utilizou-se a α-GDI de *Bos taurus* complexada com peptídeo geranilgeranilado (PDB 1LV0) (AN et al., 2003). Modelos tridimensionais foram gerados por SWISS-MODEL, trRosetta e I-TASSER, comparados por TM-align e avaliados por Ramachandran/PROCHECK e QMEANDisCo.

As cavidades e regiões funcionais da interface GDI–Rab foram analisadas no Molegro Virtual Docker 5.5. Priorizou-se uma cavidade adjacente ao sulco hidrofóbico, delimitada principalmente por M82, L87, L191, R208, F410, E411 e C414. O docking no AutoDock Vina utilizou caixa de 22 × 22 × 22 Å, centrada em x=26,4683, y=5,0275 e z=30,6806. A biblioteca derivada do ZINC20 foi filtrada por propriedades físico-químicas, deduplicada por SMILES e preparada tridimensionalmente.

O screening inicial empregou exaustividade 8, seguido de redocking dos 3.379 ligantes mais bem ranqueados com exaustividade 32. Os compostos foram avaliados pela relação estrutura–energia e agrupados em famílias por esqueletos de Bemis–Murcko. A priorização integrou energia de docking, recorrência estrutural, propriedades físico-químicas e perfil farmacocinético/toxicológico preditivo, avaliado pelos servidores SwissADME e pkCSM. Dez representantes foram submetidos ao docking refinado no Molegro Virtual Docker, empregando MolDock Score, dez corridas independentes, 1.500 iterações, população de 50 e 300 passos de *simplex evolution* (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

Resultados e discussão

O alinhamento entre a GDI1 humana e a α-GDI bovina revelou 98,4% de identidade, reforçando a elevada conservação estrutural entre as proteínas. Entre os modelos gerados, o trRosetta apresentou o melhor desempenho nas métricas de validação. A cavidade selecionada (Figura 1) localizou-se próxima ao sulco hidrofóbico responsável pela acomodação dos grupos geranilgeranil e de regiões envolvidas no

reconhecimento de Rab. Essa posição estratégica sustenta sua exploração como sítio alostérico ainda pouco investigado para modulação da GDI1.

Na preparação da quimioteca, 744.726 moléculas atenderam aos filtros iniciais. Após desduplicação, foram obtidas 347.048 estruturas únicas, das quais 337.895 geraram conformações tridimensionais válidas e foram submetidas ao screening. Os 3.379 ligantes mais bem ranqueados seguiram para redocking, com energias preditas entre -6,596 e -4,787 kcal/mol. Pela análise do joelho energético, 370 moléculas (10,95%) compuseram a faixa de maior interação predita, 2.954 (87,42%) a faixa intermediária e 55 (1,63%) a faixa de menor interação relativa.

A análise dos descritores revelou ampla sobreposição entre as classes energéticas, indicando que nenhuma propriedade isolada determinou o desempenho no docking (Figura 2). Os ligantes de maior interação concentraram-se principalmente em TPSA de 65–90 Å², massa molecular de 260–315 g/mol e uma a três ligações rotacionáveis. Esses resultados indicam que o melhor desempenho decorreu de uma combinação entre polaridade, tamanho molecular e rigidez estrutural, e não apenas da lipofilicidade, fornecendo parâmetros relevantes para a identificação e priorização de novas famílias químicas moduladoras da GDI1.

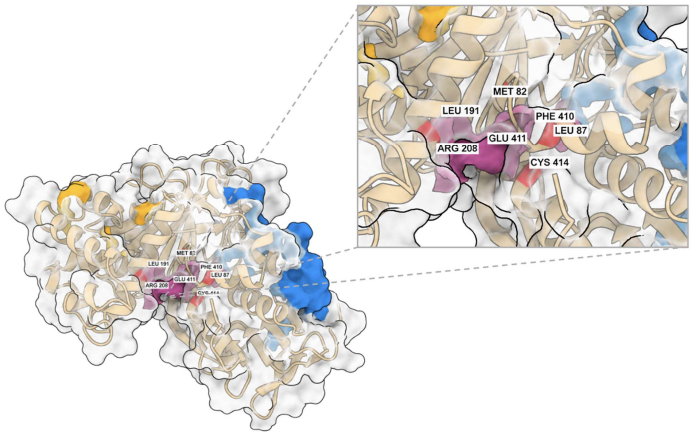


Figura 1. *Cavidade selecionada para docking e regiões funcionais da GDI1. Em rosa, cavidade investigada para ligação de pequenas moléculas, delimitada principalmente por M82, L87, L191, R208, F410, E411 e C414. Em azul, regiões associadas ao reconhecimento de Rab; em amarelo, o bolso hidrofóbico de acomodação dos grupos geranilgeranil. A proximidade entre essas regiões sustenta a exploração da cavidade como potencial sítio alostérico (EDLER; STEIN, 2019).*

O agrupamento estrutural identificou 13 famílias prioritárias, totalizando 241 moléculas. Dez famílias foram selecionadas para o docking final, cada uma representada por um composto, preservando a diversidade química dos candidatos.

Os dez representantes apresentaram MolDock Score entre -116,819 e -83,309, destacando-se o ZINCk900000xYwnB. Já o ZINCm700000ocYey, primeiro colocado no redocking EXH32, não manteve essa posição na avaliação pelo MolDock Score, evidenciando a importância de uma priorização multiparamétrica, baseada na integração de diferentes critérios. Nenhum dos candidatos apresentou alertas preditivos de mutagenicidade, tumorigenicidade, toxicidade reprodutiva ou irritação. Os perfis farmacocinéticos também foram estimados, auxiliando na seleção dos

compostos com características mais favoráveis para futuras etapas pré-clínicas. Além disso, cinco moléculas apresentaram rastreabilidade comercial.

Conclusões

A estratégia computacional identificou uma cavidade potencialmente modulável na GDI1 e priorizou dez moléculas pertencentes a famílias químicas recorrentes, após a redução racional de uma quimioteca de 337.895 estruturas. A integração entre modelagem estrutural, docking em múltiplas etapas, análise SAR, descritores físico-químicos e perfil farmacocinético sustenta uma proposta mecanística inovadora de modulação do ciclo GDI–Rab, com potencial para originar uma nova classe de compostos capazes de interferir na dinâmica de Rab e, consequentemente, no tráfego de GLUT4. Esses achados posicionam a GDI1 como alvo exploratório e alternativa farmacológica potencial para a resistência à insulina, justificando a continuidade com dinâmica molecular, ensaios de interação GDI–Rab e validação celular da translocação de GLUT4.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Oncologia Translacional e Terapias Gênicas (INCT chamada Nº 46/2024) pelo apoio financeiro, à Universidade Estadual de Maringá pela infraestrutura de pesquisa.

Referências

AN, Y. et al. Geranylgeranyl switching regulates GDI-Rab GTPase recycling. Structure, v. 11, n. 3, p. 347-357, 2003. DOI: 10.1016/S0969-2126(03)00034-0.

CHEN, Y. et al. GDI-1 preferably interacts with Rab10 in insulin-stimulated GLUT4 translocation. Biochemical Journal, v. 422, n. 2, p. 229-235, 2009. DOI: 10.1042/BJ20090624.

DU, Z. et al. The trRosetta server for fast and accurate protein structure prediction. Nature Protocols, v. 16, p. 5634-5651, 2021. DOI: 10.1038/s41596-021-00628-9.

IRWIN, J. J. et al. ZINC20: a free ultralarge-scale chemical database for ligand discovery. Journal of Chemical Information and Modeling, v. 60, n. 12, p. 6065-6073, 2020. DOI: 10.1021/acs.jcim.0c00675.

THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. Journal of Medicinal Chemistry, v. 49, n. 11, p. 3315-3321, 2006. DOI: 10.1021/jm051197e.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. Journal of Computational Chemistry, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010. DOI: 10.1002/jcc.21334.