Modulação do Eixo TBC1D1/TBC1D4–Rab como Estratégia para Restaurar a Translocação de GLUT4: Prospecção Estrutural de Moduladores Derivados de Produtos Naturais

Roberta Parise (PIC-UEM), Aline Lisboa Coutes (coautora - UEM), Guilherme Barroso Langoni de Freitas (Orientador). E-mail: gblfreitas@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Maringá, PR.

Farmácia/Química Farmacêutica Medicinal

Palavras-chave: Resistência à Insulina; In silico; RabGTPases

RESUMO

TBC1D1 e TBC1D4 são proteínas Rab-GAP que regulam GTPases Rab envolvidas no tráfego de vesículas contendo GLUT4. Embora seu papel fisiológico seja bem estabelecido, permanecem pouco exploradas como alvos diretos para desenvolvimento de pequenos moduladores farmacológicos na resistência à insulina. Este estudo investigou produtos naturais com potencial de interação com ambos os reguladores do eixo TBC–Rab–GLUT4. As estruturas de TBC1D1 e TBC1D4 foram obtidas do Protein Data Bank, preparadas e analisadas quanto a cavidades exploráveis. Compostos do banco LOTUS foram filtrados por propriedades físico-químicas e submetidos à triagem virtual no AutoDock Vina/PyRx, resultando em 51.940 dockings válidos para TBC1D1 e 51.727 para TBC1D4. O redocking com maior exaustividade confirmou a estabilidade dos rankings. Os candidatos superiores foram avaliados por relação estrutura–energia e diversidade de esqueletos moleculares, permitindo priorizar famílias químicas e selecionar dez representantes por alvo. Esses compostos foram submetidos a redocking refinado, análise das interações proteína–ligante e predição farmacocinética/toxicológica. Os resultados identificam quimiotipos naturais promissores para modulação do eixo TBC–Rab–GLUT4, estabelecendo candidatos para validação mecanística e pré-clínica.

INTRODUÇÃO

A resistência à insulina decorre da redução da resposta tecidual ao hormônio e está associada ao diabetes mellitus tipo 2 (DM2), obesidade, síndrome dos ovários policísticos e outras alterações cardiometabólicas (PETERSEN; SHULMAN, 2018; TEEDE et al., 2023). No músculo esquelético e tecido adiposo, compromete a translocação de GLUT4 para a membrana plasmática, reduzindo a captação periférica de glicose (VAN GERWEN; SHUN-SHION; FAZAKERLEY, 2023).

A sinalização pelo receptor de insulina ativa a via IRS-PI3K-Akt, que regula as Rab-GAPs TBC1D1 e TBC1D4. Sua fosforilação favorece a manutenção de Rabs no estado ativo ligado a GTP, promovendo o tráfego de vesículas contendo GLUT4 (SANO et al., 2003; SAKAMOTO; HOLMAN, 2008). TBC1D4 é fortemente regulada

pela via insulina-Akt, enquanto TBC1D1 também responde à contração muscular e à AMPK, indicando funções complementares na captação de glicose (AN et al., 2010). Na resistência à insulina, a menor atividade da via IRS-PI3K-Akt pode manter essas Rab-GAPs funcionalmente mais ativas, limitando Rab-GTP e a mobilização de GLUT4. Por ocuparem um ponto estratégico entre sinalização metabólica e tráfego vesicular, TBC1D1 e TBC1D4 representam alvos farmacológicos ainda pouco explorados. Assim, este estudo *in silico* buscou identificar produtos naturais com potencial de interação com ambas as proteínas por screening virtual, docking molecular e análises quimioinformáticas, visando novos moduladores do eixo TBC–Rab–GLUT4 para investigação posterior na resistência à insulina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os domínios Rab-GAP humanos de TBC1D1 (PDB 3QYE) e TBC1D4 (PDB 3QYB) foram obtidos do Protein Data Bank. Na TBC1D4, a hélice C-terminal α16′ ausente foi reconstruída no SWISS-MODEL utilizando TBC1D1 como molde. As proteínas foram preparadas no Molegro Virtual Docker, e cavidades internas próximas às regiões de interação TBC–Rab foram selecionadas para docking.

Produtos naturais do LOTUS foram filtrados por MW ≤500 Da, LogP 0,5–3,7, TPSA ≤90 Å², até cinco doadores, dez aceptores de hidrogênio e dez ligações rotacionáveis. Após deduplicação e preparação 3D, realizou-se screening no AutoDock Vina com EXH8. Os 100 primeiros ligantes de cada receptor foram redockados com EXH32 para avaliar a estabilidade do ranking. Na ausência de inflexão energética definida, adotou-se o corte dos 10% superiores para as análises subsequentes.

Os candidatos foram avaliados no DataWarrior quanto à relação estrutura–energia, propriedades físico-químicas e famílias de Murcko. Um score integrado, combinando energia de docking, coerência estrutural e recorrência familiar, selecionou dez compostos por alvo. Os 20 candidatos finais foram submetidos a redocking no Molegro, análise das interações no Discovery Studio Visualizer e predição ADMET pelo SwissADME e ADMETlab 3.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A reconstrução da hélice C-terminal α16′ da TBC1D4 permitiu completar o modelo utilizado nas análises. Para os dois alvos foram selecionadas cavidades internas próximas à interface TBC-Rab, com volumes de aproximadamente 150 Å³, compatíveis com a exploração por pequenas moléculas.

A biblioteca inicial reuniu cerca de 276 mil estruturas; após filtragem físico-química e deduplicação, 63.925 seguiram para preparação. O screening EXH8 gerou 51.727 resultados válidos para TBC1D4 e 51.940 para TBC1D1, com melhores energias de –9,513 e –6,618 kcal/mol, respectivamente. O redocking dos compostos superiores em EXH32 mostrou elevada concordância com o ranking inicial, sustentando o uso do EXH8 para ampliar a análise estrutural.

Na fração de melhor desempenho, TBC1D4 apresentou 4.693 estruturas distribuídas em 1.833 esqueletos de Murcko, com 882 famílias recorrentes. A integração entre energia e propriedades físico-químicas priorizou 303 compostos de 209 famílias,

incluindo 56 recorrentes. Para TBC1D1, 4.692 compostos foram distribuídos em 1.213 esqueletos; 4.047 moléculas (86,3%) integraram 568 famílias recorrentes. A repetição de arcabouços entre os melhores ligantes reforçou que o desempenho não se concentrou em moléculas isoladas, sustentando a seleção por famílias químicas e relação estrutura–energia.

A aplicação do score integrado resultou na seleção de dez moléculas para cada alvo, que passaram por redocking. Isso permitiu caracterizar contatos com os resíduos das cavidades (Figura 1), próximos ao sítio Rab-GAP. As análises em SwissADME e ADMETlab 3.0 forneceram parâmetros farmacocinéticos e de toxicidade que auxiliarão nas próximas etapas in vivo. Em conjunto, o fluxo combinou afinidade predita, diversidade estrutural e propriedades moleculares para reduzir uma biblioteca ampla a um conjunto de candidatos representativos para estudos posteriores.

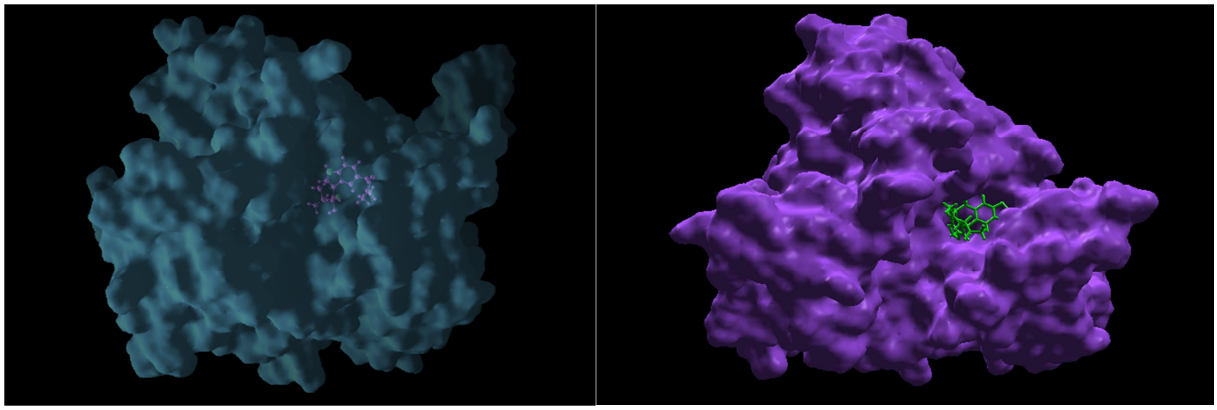


Figura 1 – Redocking TBC1D1 e TBC1D4

A inovação do estudo é fundamentalmente mecanística com proposta de novas classes medicamentosas e modulação de cascatas de sinalização, as quais ainda não possuem medicamentos ou estudos avançados (Figura 2). O processo racional de descoberta permite redução de custo, número de animais em estudos in vivo e torna o filtragem até a escolha das moléculas uma etapa essencial para seleção de moléculas com alto potencial de ligação e modulação dos alvos.

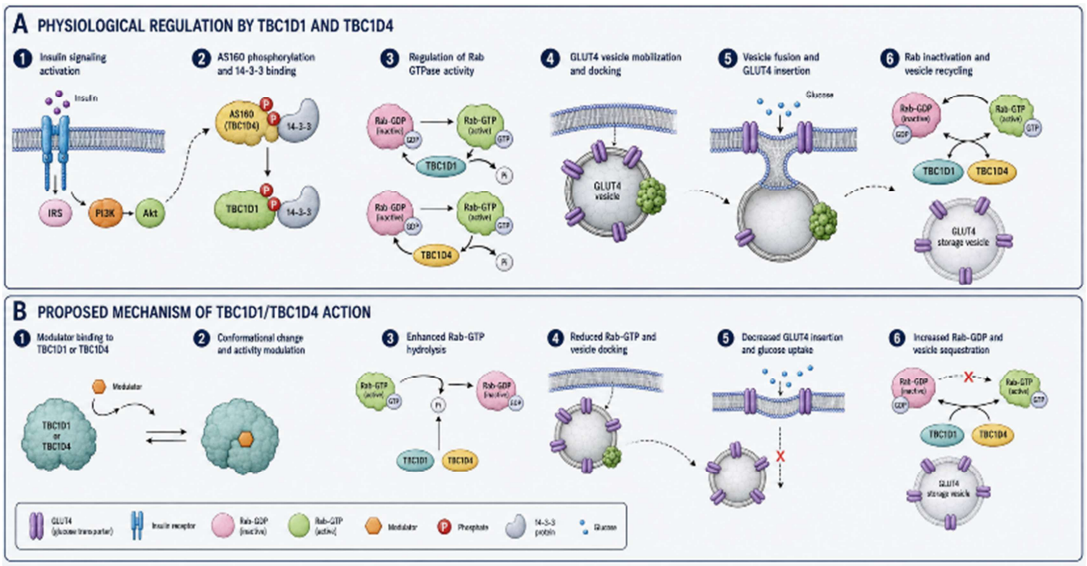


Figura 2 – Mecanismo proposto para nova classe medicamentosa

CONCLUSÕES

A triagem virtual permitiu identificar famílias químicas recorrentes e selecionar 20 representantes prioritários com potencial de interação com TBC1D1 ou TBC1D4. A integração entre docking, SAR, redocking e predição ADMET estabeleceu um conjunto racional de candidatos e uma base estrutural para estudos subsequentes de modulação do eixo TBC-Rab-GLUT4 e validação experimental.

REFERÊNCIAS

AN, D. et al. TBC1D1 regulates insulin- and contraction-induced glucose transport in mouse skeletal muscle. **Diabetes**, v. 59, n. 6, p. 1358-1365, 2010. DOI: 10.2337/db09-1266.

PETERSEN, M. C.; SHULMAN, G. I. Mechanisms of insulin action and insulin resistance. **Physiological Reviews**, v. 98, n. 4, p. 2133-2223, 2018. DOI: 10.1152/physrev.00063.2017.

SAKAMOTO, K.; HOLMAN, G. D. Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 295, n. 1, p. E29-E37, 2008. DOI: 10.1152/ajpendo.90331.2008.

SANO, H. et al. Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 17, p. 14599-14602, 2003. DOI: 10.1074/jbc.C300063200.

TEEDE, H. J. et al. Recommendations from the 2023 International Evidence-based Guideline for the Assessment and Management of Polycystic Ovary Syndrome. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 108, n. 10, p. 2447-2469, 2023. DOI: 10.1210/clinem/dgad463.

VAN GERWEN, J.; SHUN-SHION, A. S.; FAZAKERLEY, D. J. Insulin signalling and GLUT4 trafficking in insulin resistance. **Biochemical Society Transactions**, v. 51, n. 3, p. 1057-1069, 2023. DOI: 10.1042/BST20221066.