

DOCKING DE DERIVADOS DE BENZOFUROXANOS NAS ENZIMAS TRIPANOTIONA REDUTASE DO *T. cruzi* E GLUTATIONA REDUTASE HUMANA. Paulo Roberto Gabbai Armelin, Ignez Caracelli. – Inter-áreas – Exatas – Licenciatura Plena em Ciências Biológicas – Departamento de Física – Faculdade de Ciências – Campus de Bauru.

A doença de Chagas representa um sério problema de saúde pública nos países e zonas em que é endêmica porque não há métodos eficazes de imunoprofilaxia ou quimioterapia. A doença de Chagas é uma doença causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* que mantém 16-18 milhões de pessoas infectadas. A quimioterapia atual, representada pelo Benznidazol[®], é ainda inadequada, pois estas drogas causam indesejáveis efeitos colaterais e são ineficientes. Além disso, vacinas contra as infecções tripanossômicas estão ainda em desenvolvimento^[1].

O objetivo desta pesquisa é o de produzir conhecimento sobre processos biológicos, em nível molecular e através da bioinformática, para que seja possível sugerir compostos que possam atuar como potenciais fármacos.

A glutathione redutase humana (GRh) é uma flavoproteína dependente da nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida (NADPH). Esta enzima é um homodímero funcional, ou seja, é formada por duas subunidades idênticas e os resíduos das duas subunidades participam dos centros catalíticos. Possui 478 resíduos em cada monômero, sendo que os dois monômeros estão covalentemente ligados por uma ligação dissulfeto intermonômeros (Cys90-Cys90'). A GRh contém um grupo prostético, a flavina adenina dinucleotídeo – FAD. O nucleotídeo que contém o anel triplo de isoaloxazina é chamado de flavina. O FAD (Figura 1) se encontra ligado em forma permanente à enzima na região intermediária entre o sítio catalítico e o sítio de ligação do NADPH, participando da transferência de elétrons do NADPH ao sítio catalítico, através da isoaloxazina.

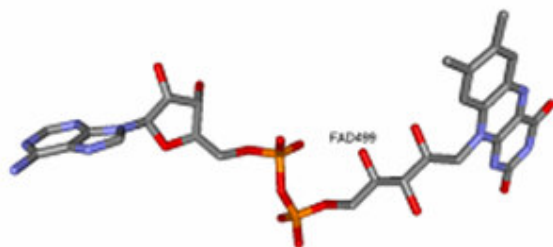
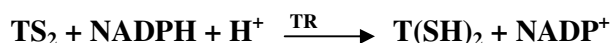


Figura 1 Flavina Adenina Dinucleotídeo (FAD)

O centro catalítico da GRh envolve a ligação dissulfeto redox-ativa intramonômeros Cys58-Cys63, a qual participa na transferência de cargas na reação de redução do substrato, GSSG.

A tripanotiona redutase (TR) é uma flavoproteína homóloga a glutathione redutase. Comparada com a glutathione redutase, esta enzima não só é estruturalmente homóloga, mas também cumpre uma função equivalente. A estrutura química da tripanotiona (TS₂) é similar a glutathione (GSSG), mas as diferenças que apresenta são fundamentais na seletividade que tem cada uma pela sua enzima redutora. A TS₂ também está composta pelas duas cadeias de três aminoácidos (Gly, Cys, γ-Glu) só que neste caso ambos aminoácidos glicina estão conectados através de uma cadeia de espermidina. Esta cadeia apresenta duas ligações tipo amida feita com os extremos carboxílicos, formando assim um ciclo de 24 átomos (Figura 2a).

A função da TR é manter no parasita os níveis celulares dos tióis: monoglutationileespermidina e bis (glutathionil) espermidina (nome químico da tripanotiona), na forma reduzida. A reação global, de forma homóloga à vista em GRh, é a seguinte:



Nota-se que, diferentemente de GSSH, na qual a reação resulta em 2 GSH (Figura 2b), as duas cadeias de aminoácidos da tripanotiona permanecem unidas pela cadeia de espermidina, continuando a ser uma molécula só.

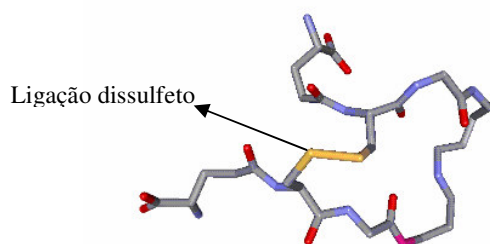


Figura 2a Tripanotiona dissulfeto oxidada (TS₂)

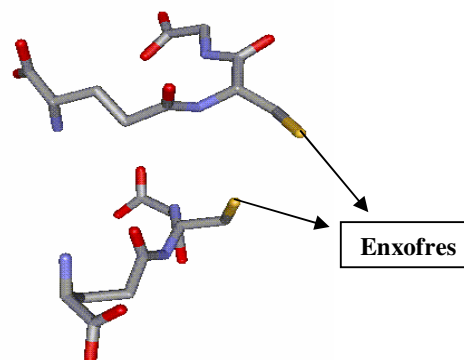


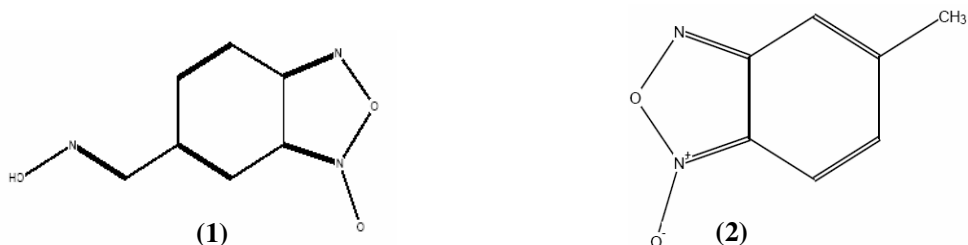
Figura 2b Glutaciona dissulfeto reduzida (2GSH)

A sensibilidade dos protozoários ao estresse oxidativo junto com o fato que os seus mecanismos de defesa dependem do sistema tripanotiona, fazem da TR uma enzima-alvo atrativa para o estudo de novos fármacos. Por este motivo, a TR tem sido objeto de estudos de modelagem com a finalidade de entender o seu mecanismo de ação a nível molecular.

No trabalho, foram utilizadas as estruturas tridimensionais da enzima GRh obtidas no PDB^[2], de códigos 1gre e 1xan. Suas estruturas foram determinadas por difração de raios X e ambas possuem a resolução de 2 Å. A proteína 1gre possui o seu substrato já reduzido (2 GSH) complexado no sítio ativo, enquanto que a proteína 1xan possui o inibidor xantona complexado no sítio da interface. A estrutura tridimensional de TR oxidada de *T.cruzi*, 1nda, obtida sinteticamente e a estrutura da TR complexada com tripanotiona, 1bzl, foram também obtidas do *Protein Data Bank*, com 3,30 e 2,40 Å de resolução, respectivamente^[3].

Os compostos (1) e (2) utilizados foram obtidos do Cambridge Structural Database (CSD)^[4], com os códigos KAWQEF e MBZFZO, respectivamente. Estes compostos são da família dos benzofuroxanos que atuam como possíveis inibidores da enzima tripanotiona redutase (TR) do *T.cruzi*, relacionada com a enfermidade de Chagas e Leishmania. As cargas parciais dos átomos dos ligantes foram adicionadas com o programa MOPAC^[5].

A escolha dos sítios de ligação (sítios ativo-SA e da interface-SI), para o cálculo de *docking*, foi feita baseando-se na mesma metodologia apresentada para nitrofuranos^[6]. Levou-se em conta os resíduos dentro de um raio de 13Å no SA ao redor das Cys58-Cys63 na GRh e Cys52-Cys57 na TR. Já no SI da GRh foram levados em conta os resíduos dentro de um raio de 10Å ao redor das His75-His82 e no SI da TR os resíduos dentro de um raio de 12Å ao redor da His72.



Os complexos proteína-ligante foram obtidos através de estudos de simulação computacional via *docking* no SA e SI feito utilizando-se o programa DOCK 3.5^[7,8]. A análise das interações entre os átomos dos ligantes e os das enzimas foi feita através de visualização gráfica utilizando o programa “O”^[9]. O programa Weblab Viewer^[10] também foi utilizado para visualização gráfica.

Na análise de ambos os compostos, verificou-se que não há possibilidade de formação do complexo proteína-ligante tanto no SI da TR como da GRh. Além disso, o composto (2) não forma complexo com o SA da TR.

O composto (1), no SA da TR, apresenta interações do átomo O2 com os átomos OE1 e N do Glu18, assim como de seu H1 com o OE1 do Glu18. Este aminoácido na entrada do sítio está relacionado ao caráter eletrostático negativo do sítio (Figura 3). No sítio ativo da GRh, ambos os ligantes (1) e (2) interagem com Ser30, Ala34 e Arg347 (Figura 4).

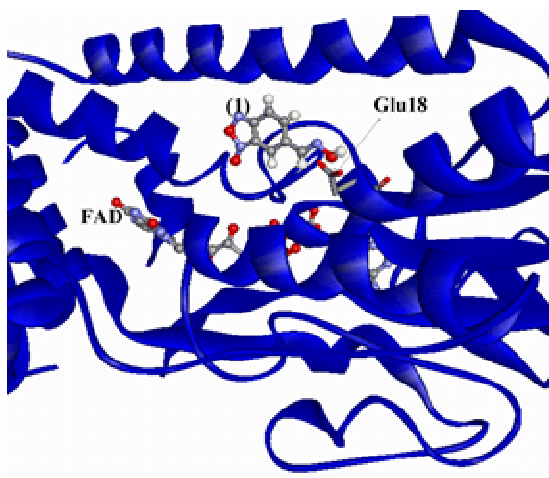


Figura 3 Sítio ativo da TR. A figura mostra uma representação esquemática da proteína, apresentando o FAD, que está próximo ao sítio ativo, e o aminoácido Glu18, que faz interações com o composto (1) no SA da TR.

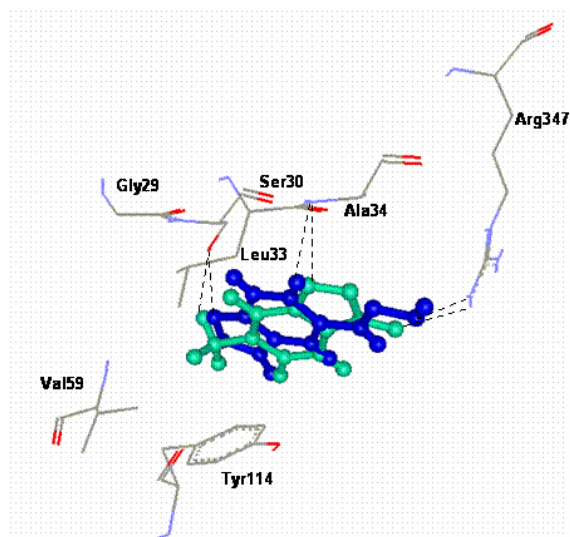


Figura 4 Sítio Ativo da GRh. São apresentados alguns dos aminoácidos do sítio ativo que fazem interações com os ligantes (1) – azul escuro e (2) - verde claro. As linhas tracejadas representam as interações aminoácido-ligante.

Os resultados dos cálculos de docking nos SA e SI, tanto para TR como para GRh, para os compostos (1) e (2) são apresentados nas Tabela 1 e 2 .

Tabela 1. Energias dos complexos TR-(1) e GRh-(1) (kcal/mol)

| | | total | eletrostática | van der Waals repulsão | van der Waals atração |
|-----------|----|---------|---------------|------------------------|-----------------------|
| TR | SA | -15,031 | -1,549 | 7,252 | -20,735 |
| | SI | NR | NR | NR | NR |
| GR | SA | -22,905 | -1,471 | 11,665 | -33,099 |
| | SI | NR | NR | NR | NR |

NR: os resultados obtidos através de cálculos, visualização gráfica e análise de interações, não indicaram a formação do complexo proteína-ligante

Tabela 2. Energias dos complexos TR-(2) e GRh-(2) (kcal/mol)

| | | total | eletrostática | van der Waals repulsão | van der Waals atração |
|-----------|----|---------|---------------|------------------------|-----------------------|
| TR | SA | NR | NR | NR | NR |
| | SI | NR | NR | NR | NR |
| GR | SA | -19,890 | -2,908 | 9,878 | - 26,860 |
| | SI | NR | NR | NR | NR |

NR: os resultados obtidos através de cálculos, visualização gráfica e análise de interações, não indicaram a formação do complexo proteína-ligante

Os estudos para o *sítio ativo* da GRh, mostraram foi possível obter a formação de complexos tanto com o composto (1) como o (2). Ambos os ligantes interagem com os resíduos Ser30, Ala34 e Arg347. Estes aminoácidos, portanto, podem ser importantes para a formação dos complexos. ligante-SA da GRh. Não foram obtidos complexos com o *sítio da interface* da GRh com os compostos (1) e (2).

Os estudos para o *sítio ativo* da TR, mostraram a possibilidade da formação de complexo no caso do composto (1) porém a preferência do composto (1) parece ser a formação de complexo com a GRh. Não foram obtidos complexos com o *sítio da interface* da TR com os compostos (1) e (2).

O próximo passo será o de continuar analisando outros compostos da família dos benzofuroxanos¹, e analisar o seu comportamento em relação a estas proteínas.

Referências Bibliográficas:

- [1] Aguirre, G.; Boiani, L.; Boiani, M.; Cerecetto, H.; Di Maio, R.; González, M.; Porcal, W.; Denicola, A.; Piro, O. E.; Castellano, E. E.; Sant'Anna, C. M. R.; Barreiro, E. J. **New potent 5- substituted benzofuroxans as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* growth: Quantitative structure-activity relationship studies.** (2005). *Bioorg. Med. Chem.* 13, 6336-6346
- [2] Protein Data Bank, [http:// www.rcsb.org/pdb](http://www.rcsb.org/pdb)
- [3] PDBsum. <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/>
- [4] CSD - Cambridge Structural Database - licença concedida ao Prof. Dr. Julio Zukerman Schpector - LaCrEMM - DQ – UFSCar
- [5] STEWART, J. J. P., MOPAC — a semiempirical molecular-orbital program, *J. Comput. Aided Mol. Design* 4 (1), p. 1–45, 1990
- [6] VEGA-TEIJIDO, M., CARACELLI, I., ZUKERMAN-SCHPECTOR, J. **Conformational analyses and docking studies of a series of 5-nitrofurán- and 5-nitrothiophen-semicarbazone derivatives in three possible binding sites of trypanothione and glutathione reductases.** (2006) *J. Mol. Graph. Model.*, 24, 349-355
- [7] JONES, T. A., ZOU, J. Y., COWAN, S. W., KJELDGAARD, M. **Improved methods for building protein models in electron-density maps and the location of errors in these models.** *Acta Crystallogr.* A47, p. 110–11, 1991, O program;
- [8] KUNTZ, I. D., BLANEY J. M., OATLAY S. J., LANDRIDGE R., FERRIN T. E.. *J. Mol. Biol.*, 161, p. 269, 1982.
- [9] JONES, T. A., ZOU, J. Y., COWAN, S. W., KJELDGAARD, M. **Improved methods for building protein models in electron-density maps and the location of errors in these models.** *Acta Crystallogr.* A47, p. 110–11, 1991, O program;
- [10] Weblab Viewer Pro™, in: ATKINS, P. AND JONES, L. **Princípios de Química: Questionando a vida moderna e o meio ambiente**, trad. I. Caracelli *et al.*, Bookman Editora, Porto Alegre, 2001