

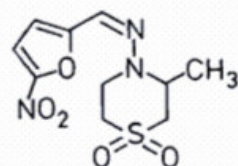
ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS IN SILICO. APLICAÇÃO: ESTUDOS DO COMPOSTO NIFURTIMOX[®] COMO INIBIDOR DE ENZIMAS RELACIONADAS COM ENFERMIDADES DE CHAGAS E LEISHMANIOSE.

Jonathan Resende de Almeida, Ignez Caracelli – Inter-áreas – Exatas – Licenciatura Plena em Ciências Biológicas – Departamento de Física – Faculdade de Ciências – UNESP – Campus de Bauru.

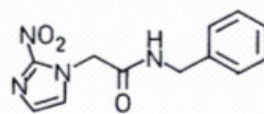
Trypanosoma cruzi é o agente etiológico da doença de Chagas, uma doença crônica que afeta muitas pessoas na América Latina^[1]. Descrita em 1909 por Carlos Chagas, a doença de Chagas também é conhecida como tripanossomíase por *Trypanosoma cruzi* ou tripanossomíase americana (terminologia adotada pela Nomenclatura Internacional de Doenças, NID). O *Trypanosoma* geralmente é transmitido de um hospedeiro a outro por insetos – no caso humano, o principal vetor é um percevejo popularmente conhecido como barbeiro ou chupão (insetos das espécies *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus*)^[2]. A fase crônica sintomática decorre com maior frequência de lesões cardíacas, com aumento do volume do coração, arritmias cardíacas, e comprometimento do trato digestivo, com inchaço do esôfago e do estômago. Uma vez que a fase crônica foi atingida, a doença é essencialmente incurável, e a quimioterapia usual contra doença de Chagas é ainda inadequada. Os dois principais fármacos em uso nessa fase são:

Nifurtimox[®], cujo mecanismo de ação envolve a produção de ânion superóxido, que é altamente tóxico ao parasita.

Benznidazol[®], que atua no sistema respiratório do parasita e também inibe a síntese do DNA.



Nifurtimox[®]



Benznidazol[®]

Estes dois fármacos são efetivos contra a forma sangüínea do parasita (tripomastigota) durante a fase aguda da doença, mas não durante o estado crônico. Adicionalmente, elas produzem sérios efeitos adversos incluindo mutagênese, se usadas em terapias a longo prazo. Ambas as drogas tem efeitos colaterais indesejáveis como hiporexia, perda de peso, alergia cutânea, náuseas, vômitos e neuropatia periférica e são ainda inefficientes no tratamento da doença de Chagas, que pode ser encarada, até o momento, como uma doença sem cura. Tripanossomas e Leishmanias diferem dos hospedeiros mamíferos em um ponto importante. Os parasitas não possuem a proteína glutathione redutase (GR), ao invés disso, usam a tripanotiona redutase (TR) na proteção contra o estresse oxidativo nome dado aos problemas de citotoxicidade que geram os radicais livres derivados da respiração celular e outras vias. GR e TR possuem substratos específicos, enquanto GR catalisa a redução da glutathione, TR catalisa a redução da tripanotiona. Isto abre a possibilidade de estudar fármacos antiparasitários seletivos, em outras palavras, que atuem inibindo só a TR.





No trabalho, foram utilizadas as estruturas tridimensionais da enzima glutationa redutase humana (GRh - Figura 1) obtidas no PDB (Protein Data Bank)^[3], de códigos 1gre e 1xan. Suas estruturas foram determinadas por difração de raios X e ambas possuem a resolução de 2Å. A proteína 1gre possui o seu substrato já reduzido (2 GSH) complexado no sítio ativo, enquanto que a 1xan possui o inibidor xantona complexado no sítio da interface.



Figura 1 Estrutura tridimensional da glutationa redutase humana (1xan). As hélices α aparecem em vermelho, enquanto que as folhas β aparecem em azul. A xantona está mostrada no sítio da interface.

A tripanotiona redutase (TR) é uma flavoproteína estruturalmente homóloga a glutationa redutase e também cumpre uma função equivalente. A estrutura química de TS_2 é similar a GSSG, mas as diferenças que apresenta são fundamentais na seletividade que tem cada uma pela sua enzima redutora. A TS_2 também está composta pelas duas cadeias de três aminoácidos (glicina, cisteína e γ -glutâmico), 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 terminais carboxílicos, formando assim um ciclo de 24 átomos (Figura 2).

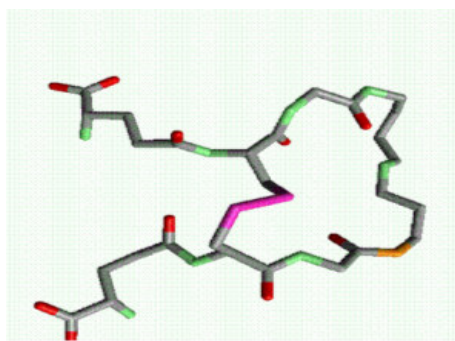


Figura 2 Tripanotiona dissulfeto oxidada (TS_2), substrato da TR

As coordenadas das estruturas tridimensionais das enzimas que estão sendo usadas neste estudo foram obtidas através do PDB^[3] e PDBSum^[4], bancos de dados de informações sobre as estruturas tridimensionais de proteínas.

Para a visualização dessas estruturas, foram utilizados os programas de visualização molecular WebLab Viewer^[5], Swiss-PDBViewer^[6] e “O”^[7]. Utilizando-se o programa DOCK

3.5^[8,9] foi feito o estudo da formação dos complexos. A metodologia utilizada foi a mesma que a utilizada para nitrofuranos^[10].

É importante observar que apenas o valor da energia não é suficiente para determinar qual a orientação do ligante dentro do sítio. O que determina a escolha da orientação dentro do sítio é a energia obtida mais as interações entre o ligante e a enzima, analisadas através de visualização gráfica. Para isso foram utilizados programas gráficos. Dessa forma é possível fazer uma análise das interações (distâncias e tipo de aminoácidos). As interações foram avaliadas e as distâncias entre átomos do ligante e da enzima foram medidos. Para a GR, a orientação selecionada para o ligante no sítio da interface está apresentada na Figura 3.

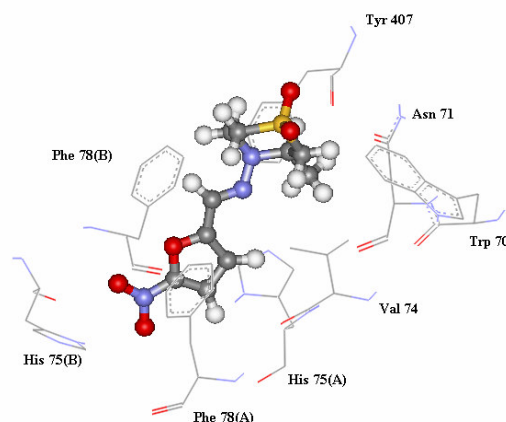


Figura 3 A orientação do Nifurtimox® no sítio da interface da GR. São apresentados apenas os aminoácidos envolvidos nas interações.

Na Tabela 1 são apresentados os resultados do ponto de vista da energia para o complexo selecionado.

Tabela 1 Valores de energia (kcal/mol) para os complexos formados GR-SI		
Sítio da Interface da GR	Total	-31,8
	eletrostática	-1,6
	van der Waals - atração	-58,0
	van der Waals - repulsão	27,7

Na Figura 4, apresenta-se a orientação selecionada para o ligante no sítio da interface (SI) da TR.

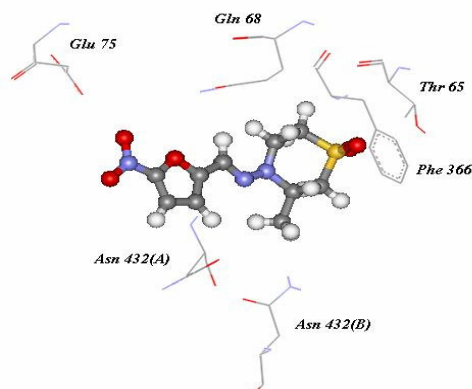


Figura 4 A orientação do Nifurtimox® no sítio da interface da TR São apresentados apenas os aminoácidos envolvidos nas interações.

Na Tabela 2 são apresentados todos os resultados do ponto de vista da energia para o complexo selecionado.

Tabela 2 Valores de energia (kcal/mol) para os complexos formados TR-SI		
Sítio da Interface da TR	Total	-26,9
	eletrostática	-0,2
	van der Waals - atração	-43,9
	van der Waals - repulsão	17,3

Para a GR, através da análise dos resultados de *docking* e de visualização gráfica, observou-se que o Nifurtimox[®] está entre o canal formado pelos aminoácidos das Phe78, portanto esta seria a melhor orientação dentro do sítio da interface da GR (Figura 3). Para o sítio da interface (SI) da TR, a orientação selecionada do Nifurtimox[®] foi aquela que se apresentou mais favorável do ponto de vista energético e das interações com os aminoácidos no sítio da interface (Figura 4). Pelos resultados obtidos podemos observar que o Nifurtimox[®] pode formar complexos nos sítios ativo e da interface da TR e da GR, porém o complexo mais provável deve ser formado com a GR no sítio da interface. Esta preferência deve ser dada pelo fato de o sítio apresentar o canal das Phe78, que reduz a possibilidade de orientações, e torna a GR “melhor” escolha para o Nifurtimox[®] que a TR, o que não é desejável do ponto de vista da atividade, e talvez isso possa explicar os efeitos colaterais provocados pelo fármaco, que inibe melhor a enzima humana.

Referências:

- [1] Maya, J. R., Bollo, S., Nuñez-Vergara, L. J., Squella, J. A., Repetto, Y., Morello, A., Périé, J., Chauvière, G. ***Trypanosoma cruzi*: effect and mode of nitroimidazole and nitrofurantoin derivatives. (2003).** Biochemical Pharmacology 65, 999-1006
- [2] FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz. www.fiocruz.br/ccs/glossario/chagas.htm
- [3] Protein Data Bank, [http:// www.rcsb.org/pdb](http://www.rcsb.org/pdb)
- [4] PDBsum. <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/>
- [5] 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
- [6] SwissPDB Viewer- <http://ca.expasy.org/spdbv/text/tools.htm>
- [7] O - <http://xray.bmc.uu.se/~alwyn/>
- [8] Shoichet B.K., Kuntz I.D., *J. Mol. Biol.*, 1991, **221**, 327.
- [9] Shoichet B.K., Bodian D.L., Kuntz I.D., *J. Comp. Chem.*, 1992, **13**, 380.
- [10] VEGA-TEIJIDO, M., CARACELLI, I., ZUKERMAN-SCHPECTOR, J. **Conformational analyses and docking studies of a series of 5-nitrofurantoin- and 5-nitrothiophen-semicarbazone derivatives in three possible binding sites of trypanothione and glutathione reductases.** (2006) *J. Mol. Graph. Model.*, **24**, 349-355.