

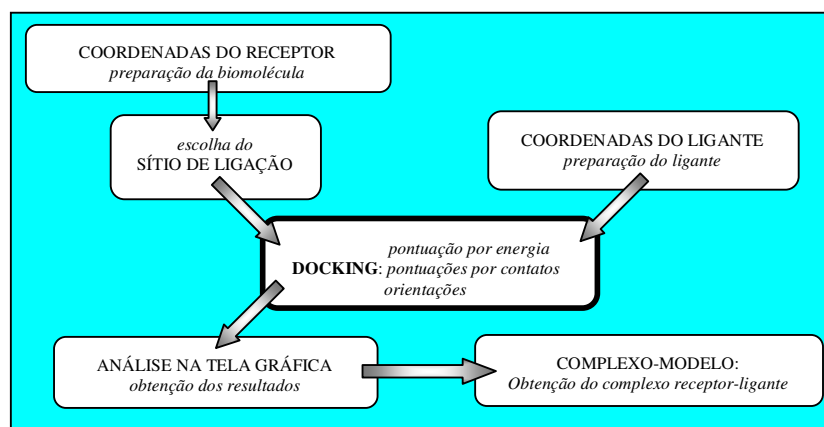
ESTUDO DA FORMAÇÃO DE COMPLEXOS ENZIMAS-INIBIDORES *IN SILICO* APLICADO AO ESTUDO DAS ENZIMAS GLUTATIONA REDUTASE HUMANA E GLUTATIONA REDUTASE DO *Plasmodium falciparum* E DOS INIBIDORES DAS FAMÍLIAS DAS ARILOXAZINAS.

Denis da Silva Corrêa, Ignez Caracelli. –
Exatas – Licenciatura Plena em Ciências Biológicas – Departamento de Física –
Faculdade de Ciências – Campus de Bauru

A malária é, de longe, a doença tropical e parasitária que mais causa problemas sociais e econômicos no mundo, sendo superada em número de mortes apenas pela AIDS^[1]. O parasita *Plasmodium falciparum* é o principal causador das infecções severas e mortes por malária e, devido à alta taxa de mutações do parasita, a resistência à drogas e a distribuição geográfica desta doença está aumentando^[2]. Sabe-se que o este parasita é sensível ao estresse oxidativo e, durante seu estágio eritrocítico, está exposto a esse estresse. Assim, o estudo do aumento do estresse oxidativo se tornou uma atrativa via para o desenvolvimento de novas drogas e a enzima antioxidante glutatona redutase do *P. falciparum* (GRPf) pode ser considerada um alvo interessante para o desenvolvimento de inibidores, que podem atuar como fármacos^[3].

As enzimas glutatona redutase humana (GRh) e do *P. falciparum* apresentam algumas diferenças, o que é desejável, pois se quer inibir apenas a enzima do parasita. Os compostos da família das ariloxazinas foram avaliados para ambas as enzimas, observando as similaridades e diferenças nos complexos formados.

Para se estudar os complexos formados entre as enzimas e os ligantes, foi preciso iniciar pela seleção e análise das estruturas tridimensionais envolvidas. O diagrama abaixo mostra o fluxo para o estudo de *docking*, objetivo final do trabalho.



No lado esquerdo aparece, em primeiro lugar, a caracterização do receptor e, no direito, a dos ligantes. No primeiro momento foi dada importância à caracterização e escolha dos sítios de ligação dos receptores. Para isso, foram selecionadas as estruturas tridimensionais das enzimas que poderiam ser utilizadas como alvos, caracterizando e selecionando seus sítios de ligação. As coordenadas destas estruturas foram obtidas através do PDB^[4] e PDBSum^[5] e, a fim de se verificar diferenças na sequência primária dos aminoácidos das duas enzimas e os resíduos que são conservados entre elas, foi feito o alinhamento *pairwise* destas moléculas, através do programa ClustalW^[6] *on-line*.

Além dessas diferenças na sequência primária, é necessária também a análise das diferenças entre as estruturas tridimensionais destas proteínas. Para que a GRh e a GRPf pudessem ser comparadas do ponto de vista estrutural, foi necessário sobrepor essas moléculas. Para isso, foram feitos alinhamentos estruturais através do programa Swiss-PDB^[7]. Uma vez sobrepostas, foi possível a análise das diferenças estruturais existentes entre as moléculas estudadas, através do programa de visualização molecular WebLab^[8].

Depois, foram eleitos possíveis ligantes para atuar como inibidores – os inibidores da família das ariloxazinas. Para se obter a estrutura tridimensional destes ligantes, foi feita uma busca por moléculas com estruturas semelhantes no CSD^[9], a partir das quais foram modelados os compostos (1) e (2) (Fig. 1), utilizando o programa HyperChem^[10]. A modelagem foi feita a partir de estruturas cristalográficas, com apenas poucas substituições de átomos feitas. Além disso, foram adicionadas cargas parciais aos átomos dos compostos, através do programa MOPAC^[11]. Para a visualização dos ligantes e das enzimas foram utilizados os programas de visualização molecular WebLab, Swiss-PDB e “O”^[12].

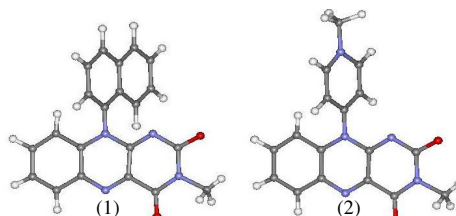


Figura 1 – Composto (1) e (2), modelados a partir de estruturas cristalográficas.

Para se fazer os estudos de *docking*, foi necessária a escolha dos sítios de ligação. Para a GRh, foram considerados, para os cálculos de *docking*, os resíduos encontrados em um raio de 13 Å ao redor do par Cys58-Cys63 no sítio ativo (SA) e 10 Å ao redor do par His75-His75' no sítio da interface (SI)^[13]. Já para a GRPf levou-se em consideração os resíduos presentes em um raio de 12 Å ao redor de Cys39-Cys44 pois, a partir da sobreposição feita entre as enzimas humana e do parasita, verificou-se que os sítios ativos dessas enzimas ficam alinhados quando centrado neste par, e 10 Å ao redor de Phe 68-68' no SI. O estudo de *docking* foi feito, através de simulação computacional, utilizando o programa DOCK 3.5^[14,15]. Com o objetivo de se avaliar as interações entre os átomos dos ligantes com os da enzima, foram utilizados programas gráficos (WebLab e “O”), medindo-se distâncias entre esses átomos.

Da avaliação das diferenças entre as enzimas estudadas, pôde-se concluir que a estrutura geral da GRh e da GRPf é bem conservada em ambas, sem grandes diferenças estruturais. Hélices α e folhas β são bem conservadas entre elas (Fig. 2).



Figura 2 – Sobreposição das estruturas quaternárias da GRh – vermelho – e da GRPf – verde. A estrutura geral das duas enzimas é bem conservada, principalmente as hélices α e folhas β .

A sequência de aminoácidos GRPf mostrou uma identidade geral de 41%, quando comparada com a enzima humana, e a maioria dos resíduos de aminoácidos com função conhecida na enzima são idênticas entre elas. Apesar destas grandes similaridades, existem diferenças importantes entre as proteínas humana e do parasita, as quais ocorrem no SA e no SI, que regiões são de interesse particular, pois representam sítios de ligação de inibidores conhecidos.

Analisando o SA, apenas um resíduo difere entre a GRh e a GRPf, que é Leu419' na GRPf, substituindo Met406' na GRh. Com a exceção desta metionina, os resíduos catalíticos descritos para a GRh possuem equivalentes idênticos na GRPf^[3]. Já o SI da GRh e da GRPf possui diferenças entre eles. O volume da cavidade da interface na GRPf é de 450 Å³, enquanto que na GRh é de 460 Å³. A parte superior da cavidade é menor na GRPf, devido à ocorrência da Asn456 ao invés de Gly439, presente na enzima humana. Além disso, na GRPf a carga resultante nas paredes da cavidade da interface é quase neutra, enquanto que na GRh é altamente negativa, também devido à substituições de resíduos de aminoácidos^[3]. Na enzima do parasita, os aminoácidos Phe78-Phe78' que, sabe-se, são importantes na orientação do ligante no sítio da interface da enzima humana, são substituídos por Ile59.

O estudo de *docking* foi feito e, através de simulação computacional, foram obtidas orientações dos compostos (1) e (2) nos sítios escolhidos das duas enzimas. O passo seguinte foi verificar e selecionar as melhores orientações, cujas energias aparecem na Tabela 1.

Tabela 1 Energias dos complexos proteína-ligante (kcal/mol)

| | energias | | total | eletrostática | van der Waals |
|------|-------------|----|--------------|---------------|---------------|
| GRh | Ligante (1) | SA | -32,6 | -4,2 | -28,4 |
| | | SI | -41,2 | -1,9 | -39,3 |
| | Ligante (2) | SA | -33,2 | -6,9 | -26,3 |
| | | SI | -41,0 | -2,0 | -39,0 |
| GRPf | Ligante (1) | SA | -29,0 | -3,8 | -25,2 |
| | | SI | -19,5 | -1,7 | -17,8 |
| | Ligante (2) | SA | -28,0 | -5,7 | -22,3 |
| | | SI | -24,5 | -3,8 | -20,7 |

Comparando-se apenas as energias totais dos complexos formados (Tabela 1), podemos sugerir que, tanto (1) quanto (2), se acomodam melhor no SI da GRh, já que a energia total dos complexos é mais baixa neste sítio. No entanto, não é apenas o valor das energias que determina as orientações do ligante dentro do sítio, deve-se levar em consideração, também, as interações entre o ligante e a enzima, levando em conta o tipo do aminoácido em que ocorre a interação. Logo, observa-se que no SI da GRh os ligantes (1) e (2) se orientam entre o par de resíduos Phe78-Phe78' e fazem interações com as His75-His75' (Fig. 3), o que ajuda a estabilizar estas orientações dos ligantes, mais do que nos sítios ativos. Além disso, um outro aspecto importante observado em relação ao complexo (1)-SI da GRh é o fato de que este é mais estável do que o complexo (2)-SI da GRh por fazer interações com resíduos carregados, como Asp441.

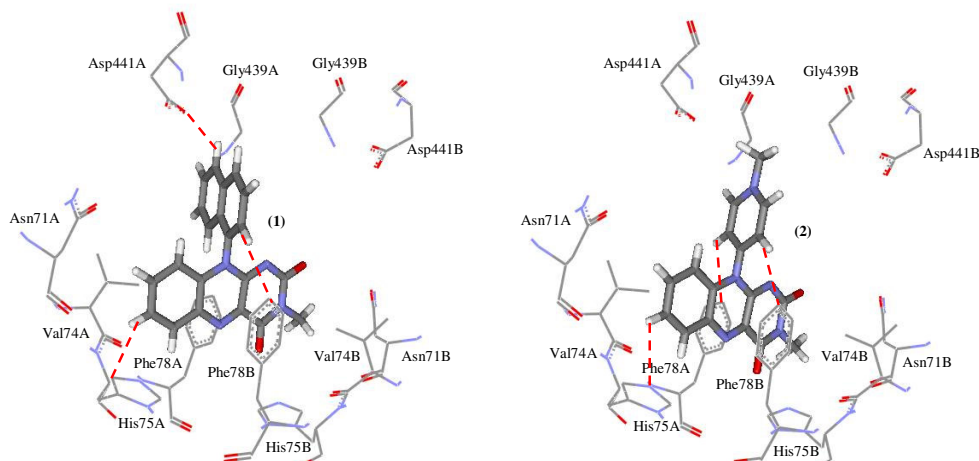


Figura 3 – Orientação dos compostos (1) e (2) no sítio da interface da enzima glutathione redutase humana. Além desses compostos, aparecem na figura os principais aminoácidos que compõem o sítio da interface.

Avaliando as energias obtidas e as interações que os inibidores fazem com a enzima, os resultados indicam um mecanismo de inibição mista, onde os inibidores (1) e (2) podem se ligar tanto ao SA quanto ao SI da enzima. Porém, na GRh estes inibidores se ligam preferencialmente ao SI, enquanto que na GRPf se ligam preferencialmente ao SA. Além disso, conclui-se que o complexo formado entre o composto (1) e o SI da GRh é o mais estável, devido às energias obtidas e às interações que faz com a enzima humana, significando que, entre os dois compostos testados, este é o que se liga preferencialmente e essa ligação é no SI da GRh, o que não é desejável, pois se quer inibir apenas a enzima do parasita.

Referências

- [1] FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz. www.fiocruz.br/ccs/glossario/malária_p.htm
- [3] MÜLLER, S., BECKER K., BERGMANN, B., SCHIRMER H. R., WALTER R. D. ***Plasmodium falciparum* glutathione reductase exhibits sequence similarities with the human host enzyme in the core structure but differs at the ligand-binding sites.**(1995). *Mol. Biochem. Parasitol.*, **74**, 11-18.
- [3] SARMA, G.N., SAVVIDES, S.N., BECKER, K., SCHIRMER, M., SCHIRMER, R.H., KARPLUS, P.A. **Glutathione reductase of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*: crystal structure and inhibitor development.** (2003) *J. Mol. Biol.*, **328**, 893-907.
- [4] PDB – Protein Data Bank. www.rcsb.org/pdb
- [5] PDBsum. <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/>
- [6] ClustalW - <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>
- [7] SwissPDB Viewer - <http://ca.expasy.org/spdbv/text/tools.htm>
- [8] 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.
- [9] CSD - Cambridge Structural Database - licença concedida ao Prof. Dr. Julio Zukerman Schpector - LaCrEMM - DQ - UFSCar
- [10] HyperChem® 5.01 Computational Chemistry, Waterloo, Ont. N2L 3X2, Canada, Hypercube Inc., 1996
- [11] J.J.P. Stewart, MOPAC – a semiempirical molecular-orbital program, *J. Comput. Aided Mol. Design* 4 (1) (1990) 1-45
- [12] T.A. Jones, M. Kjeldgaard, Manual for O, Uppsala, Uppsala University.
- [13] VEGA-TEIJIDO, M., CARACELLI, I., ZUKERMAN-SCHPECTOR, J. **Conformational analyses and docking studies of a series of 5-nitrofuranyl- and 5-nitrothiophenyl-semicarbazone derivatives in three possible binding sites of trypanothione and glutathione reductases.** (2006) *J. Mol. Graph. Model.*, **24**, 349-355.
- [14] SHOICHET, B.K., KUNTZ, I.D. (1991) *J. Mol. Biol.*, **221**, 327-346.
- [15] KUNTZ, I. D., BLANEY J. M., OATLAY S. J., LANDRIDGE R., FERRIN T. E.. *J. Mol. Biol.*, 161, p. 269, 1982.