

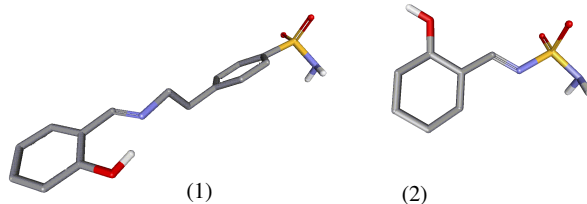
# ESTUDO DE *DOCKING* DE SULFONAMIDAS NOS SÍTIOS DE LIGAÇÃO DA ENZIMA GLUTATIONA REDUTASE HUMANA E GLUTATIONA REDUTASE DE *Plasmodium falciparum*. Sergio Ricardo Pizano Rodrigues, Ignez Caracelli. – Inter-áreas – Exatas – Licenciatura Plena em Ciências Biológicas – Departamento de Física – Faculdade de Ciências – Campus de Bauru.

A malária é uma doença que ocorre em mais de 100 países, apesar de estar confinada principalmente em áreas tropicais pobres da África, Ásia e América Latina. Uma das principais espécies do protozoário causador desta doença é o *Plasmodium falciparum*. Durante seu estágio eritrocítico, ele fica exposto a níveis elevados de espécies oxidativas ( $\text{HO}^\cdot$ ,  $\text{O}_2^\cdot$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) produzidas pelo sistema de defesa do hospedeiro humano e pela degradação da hemoglobina, os quais danificam macromoléculas. Baseado nestes dados, o estudo do aumento do estresse oxidativo se tornou uma via atrativa para o desenvolvimento de novas drogas, devido às evidências sugerindo que isto pode inibir o crescimento do parasita eficientemente. Com a seleção de parasitas resistentes a cloroquina, uma droga muito utilizada nos casos de malária, há a necessidade do desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos, com novos mecanismos de ação. Assim, a enzima antioxidante glutatona redutase do *P. falciparum* (GRPf), que catalisa a redução da glutatona oxidada (GSSG), é essencial para a defesa antioxidante e mecanismos de reparos do parasita<sup>[1]</sup> e pode ser considerada um alvo interessante para o desenvolvimento de inibidores que possam atuar como fármacos. Pode-se descrever a atuação da enzima glutatona redutase (GR) da seguinte forma:



As enzimas GR humana (GRh) e GRPf são homodiméricas e inibidores podem ser testados em, pelo menos, dois sítios: o sítio ativo (SA) e o sítio da interface (SI). Portanto, é interessante o estudo destes compostos em sítios da GRh e GRPf a fim de sugerir seus mecanismos de ação. O objetivo deste trabalho é estudar o comportamento destes ligantes nos SA e SI de tais enzimas.

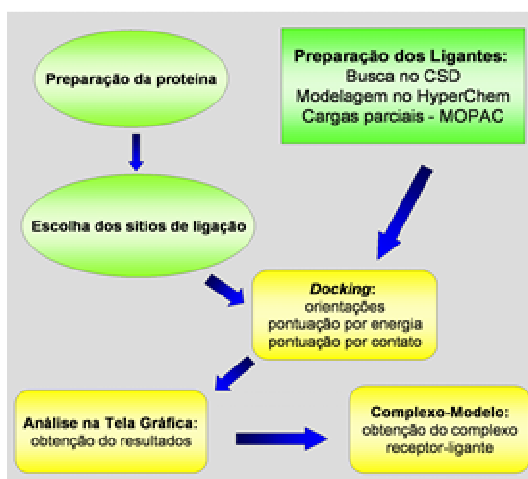
As enzimas GRh e GRPf foram utilizadas como alvo para as sulfonamidas (1) e (2) (Figura 1). Não foram encontrados na literatura simulações computacionais feitas com estas sulfonamidas nos possíveis sítios de ligação das GRs.



**Figura 1.** Estrutura dos compostos sulfonamidas (1) e (2). Código CSD (1) - JAWHOF

As estruturas cristalográficas das enzimas foram obtidas do *Protein Data Bank* (PDB)<sup>[2]</sup> sob códigos 1onf (GRPf); 1xan e 1gre (GRh). A proteína 1xan foi utilizada para a simulação computacional via *docking* no SI, enquanto a proteína 1gre foi utilizada para o estudo no SA. Os compostos sulfonamidas utilizados foram obtidos a partir de busca no *Cambridge Structure Database* (CSD)<sup>[3]</sup>, o qual forneceu as coordenadas cristalográficas do composto (1), sob código JAWHOF. A sulfonamida (2) foi obtida por alterações na estrutura química de (1), utilizando-se o programa de simulação e modelagem molecular HyperChem<sup>[4]</sup>. As cargas parciais dos átomos foram adicionadas com o programa MOPAC<sup>[5]</sup>. Um esquema mostrando os métodos adotados é apresentado na Figura 2. Na primeira etapa, trabalhou-se com as proteínas, adicionando-se os átomos de hidrogênios aos aminoácidos e considerando os resíduos de cisteínas dos sítios ativos

das proteínas no estado oxidado formando a ligação dissulfeto. Os resíduos de histidina foram consideradas como protonadas no átomo ND1. Uma vez preparada a proteína humana, a escolha dos sítios de ligação (SA e SI) foi feita baseando-se em trabalhos anteriores<sup>[6]</sup>. O sítio de ligação correspondente ao sítio ativo considerado leva em conta os resíduos dentro de um raio de 13 Å ao redor das Cys58-Cys63 na GRh. O sítio correspondente ao sítio da interface leva em consideração os resíduos dentro de um raio de 10 Å em volta do par His75-82' para realização do *docking*. Na enzima GRPf, o primeiro passo feito foi o alinhamento estrutural das enzimas humana e do *P. falciparum*, utilizando o programa SwissPDB Viewer<sup>[7]</sup>, para uma avaliação dos sítios ativo e da interface. Através do alinhamento e da visualização gráfica foram selecionados para o SA os resíduos contidos em um raio de 12 Å ao redor de Cys39-Cys44 e, para o SI, foi considerado um raio de 10 Å ao redor dos resíduos Phe 68-68'. Utilizando-se o programa DOCK 3.5<sup>[8]</sup> foi feito o estudo da formação dos complexos. A análise em tela gráfica dos resultados obtidos através do *docking* foi realizada com os programas "O"<sup>[9]</sup> e WebLab Viewer<sup>[10]</sup>. A orientação representativa dos complexos foram escolhidas segundo o índice de repetição da orientação do complexo nos sítios (Tabela 1) e a natureza das interações com os resíduos dos sítios das enzimas. Levou-se em conta também a energia dos complexos.



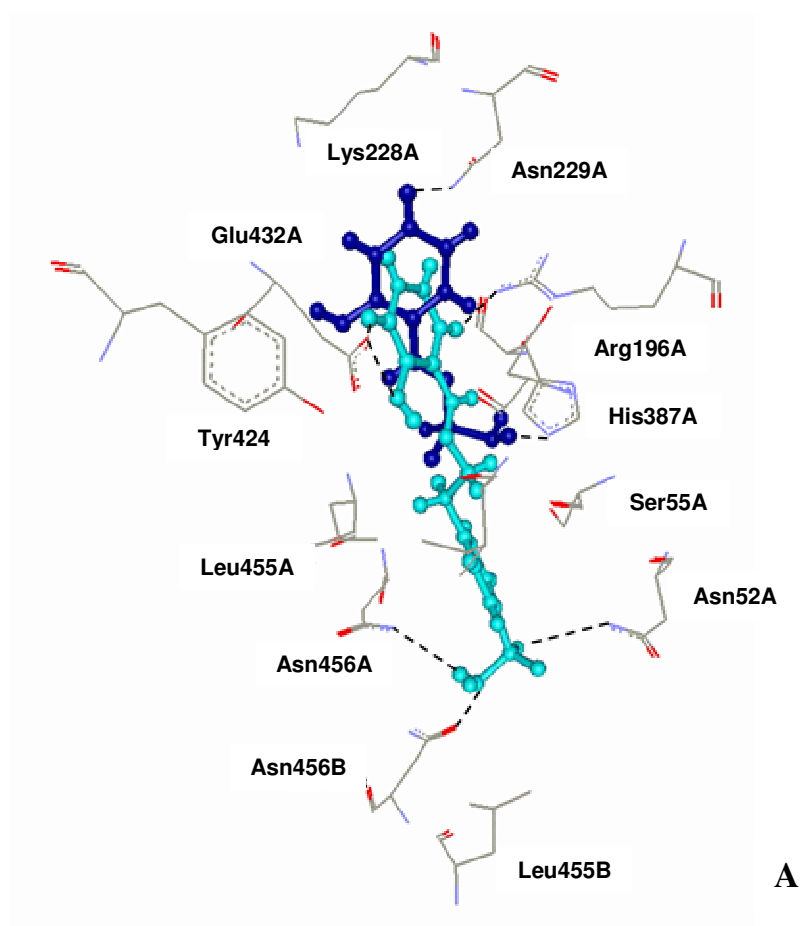
**Figura 2:** Esquema da metodologia utilizada na obtenção dos complexos proteína-ligante

**Tabela 1.** Índice de repetição das orientações produzidas no *docking*.

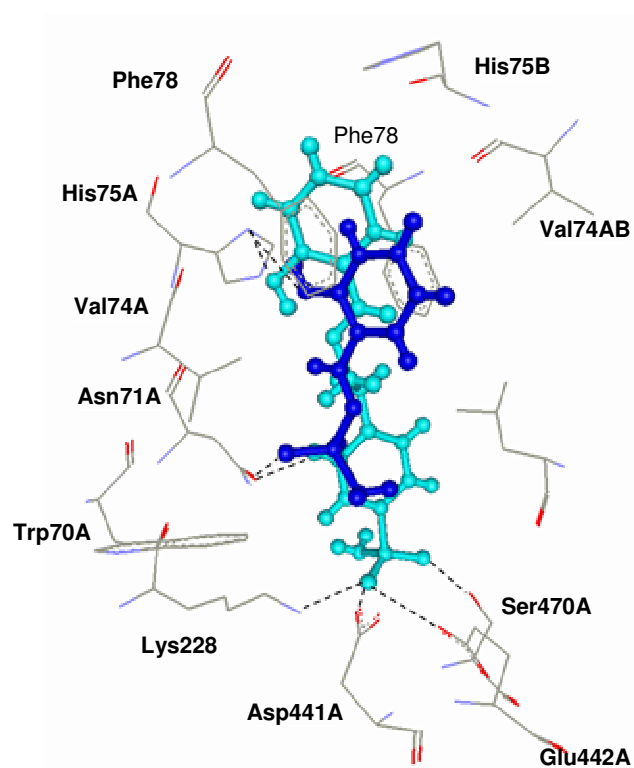
GRh			GRPf	
	(2)	(1)	(2)	(1)
SA	70,6%	68,0%	17,4%	35,3 %
SI	20,0%	63,6%	50,0%	38,5%

**Tabela 2.** Energias dos complexos proteína-ligante (kcal/mol).

energias			totais	eletrostática	van der Waals
GRh	ligante (2)	SA	-28,8	-7,0	-21,8
		SI	-31,0	-10,4	-20,6
	ligante (1)	SA	-25,9	-4,8	-21,1
		SI	-51,3	-22,2	-29,1
GRPf	ligante (2)	SA	-26,4	-15,4	-11,0
		SI	-28,6	-11,2	-17,4
	ligante (1)	SA	-35,1	-8,8	-26,4
		SI	-44,6	-16,3	-28,2



**A**



**B**

**Figura 3:** Sobreposição dos compostos (1) e (2) nos sítios da interface **(A)** da GRh e **(B)** da GRPf. Estão apresentados os aminoácidos do SI que interagem com os compostos. As linhas pontilhadas representam as interações aminoácido-ligante. (1) – azul claro; (2) azul escuro.

Na GRP<sub>f</sub>, os complexos de menor energia ocorreram no SI, particularmente no complexo com (1). Foram observadas interações com Asn456B, Arg196A, Asp58A, Ser55A, Asn52A, Asn229A e Glu432A (Figura 3A). Em uma orientação com energia total de -37,4 kcal/mol encontrada nesse sítio há interações com resíduos carregados, como a interação do Glu432A com a porção NH<sub>2</sub> com uma distância de 2,44 Å, sugerindo uma ligação de hidrogênio entre o OE1 deste resíduo e o nitrogênio de (1). Na Figura 3B é apresentada a orientação selecionada para o ligante no SI da GRP<sub>f</sub>. No SA, (2) se comporta de maneira aleatória, sem um padrão de ligação muito claro, ou seja, não há uma ou mais orientações que se repetem, refletindo a liberdade e, portanto, a instabilidade que o composto tem neste sítio. Isto se reflete no índice de repetição baixo para tal ligante (Tabela 1). Já no sítio ativo da GRP<sub>f</sub>, os resíduos que participam na ligação de (1) são Glu489B e Glu490B, His484B, Ile419B, Tyr94A, Ser11A, Thr486B, Phe416B, uma vez que interações com os mesmos se repetem em várias orientações de (1) nesta cavidade. O composto (2) não mostrou um comportamento eficaz de ligação com a enzima do parasita.

Comparando-se as energias dos dois sítios (Tabela 2), podemos sugerir que (1) se acomoda melhor no SI da enzima humana, já que a energia total do complexo é mais baixa neste sítio. Um outro aspecto importante é o fato de o complexo com (1) ter energias mais baixas do que com (2) nesta enzima. Isto pode ser reflexo de interações de (1) com resíduos carregados do SI, como Asp441 e Glu442 que não ocorrem em (2)-SI. Os dois ligantes têm os mesmos grupos funcionais, como OH e a porção sulfonamida, mas em (1) tais grupos estão separados por uma cadeia alifática de maior comprimento, o que permite interações com esses resíduos carregados. No SA, aparecem várias interações de (2) e (1) com Arg37 e 347; (1) ainda interage com Arg478 em uma interação do tipo O – N.

A sulfonamida (1) apresentou preferência pela enzima humana, o que pode ser explicado pela contribuição das interações eletrostáticas desse ligante no SI, fato refletido nos valores menores de energia em comparação com (2).

Uma apreciação mais precisa do comportamento destes ligantes poderá ser feita quando for avaliado o comportamento de outros compostos do mesmo tipo nesses sítios.

## Referências

<sup>1</sup>FERREIRA, A. L. A., MATSUBARA, L. S. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo.** *Rev. Assoc. Med. Bras.*, v.1, n.43, p. 61-68, 1997.

<sup>2</sup>*Protein Data Bank* <http://www.rsb.org>.

<sup>3</sup>CSD - Cambridge Structural Database - licença concedida ao Prof. Dr. Julio Zukerman Schpector - LaCrEMM - DQ – UFSCar.

<sup>4</sup>HyperChem1 5.01 Computational Chemistry, Waterloo, Ont. N2L 3X2, Canadá, Hypercube Inc., 1996.

<sup>5</sup>STEWART, J. J. P., MOPAC — **A semiempirical molecular-orbital program**, *J. Comput. Aided Mol. Design* 4 (2), p. 1–45, 1990.

<sup>6</sup>VEGA-TEIJIDO, M., CARACELLI, I., ZUKERMAN-SCHPECTOR, J. **Conformational analyses and docking studies of a series of 5-nitrofuran- and 5-nitrothiophen-semicarbazone derivatives in three possible binding sites of trypanothione and glutathione reductases.** (2006) *J. Mol. Graph. Model.*, 24, 349-355.

<sup>7</sup>SwissPDB Viewer - <http://ca.expasy.org/spdbv/text/tools.htm>.

<sup>8</sup>KUNTZ, I. D., BLANEY J. M., OATLAY S. J., LANDRIDGE R., FERRIN T. E.. *J. Mol. Biol.*, 161, p. 269, 1982.

<sup>9</sup>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. 110–111, 1991, O program.

<sup>10</sup>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.