

ESTUDO COMPUTACIONAL DA INIBIÇÃO DE ENZIMAS UTILIZANDO ALCALOIDES.

DAIANE F. DE OLIVEIRA¹, ANA CAROLINA MAFUD², FILIPE C. D. A. LIMA³

¹ Graduando em Licenciatura em Química, Bolsista PIVICT, IFSP, Câmpus Matão, daia.fer2907@gmail.com

² Pós doutoranda, Instituto de Física de São Carlos, USP, carolmafud@gmail.com

³ Professor EBTT de Física, IFSP, Câmpus Matão, fdlima@ifsp.edu.br
Área de conhecimento (Tabela CNPq): 1.06.03.07-7 Química Teórica

Apresentado no
8º Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do IFSP
06 a 09 de novembro de 2017 - Cubatão-SP, Brasil

RESUMO: A busca por novos fármacos Anti-Inflamatórios Não Esteroides (AINEs) visa sempre encontrar substâncias com maior eficácia e menor quantidade de reações adversas. Investigamos no presente trabalho o estudo de inibição da ciclo-oxigenase 2 (COX-2) utilizando o alcaloide epiisopiloturina (EPI), obtido a partir de subprodutos industriais oriundos das folhas de jaborandi (*P. microphyllus*). Utilizamos o método de docking molecular para realizar este estudo, juntamente com dados de raios-X obtidos por meio do banco de dados de proteínas. O estudo de docking foi realizado inicialmente na mesma região foram encontramos fármacos comerciais, como o ibuprofeno (IBP) e o naproxeno (NPS). Os resultados iniciais indicam possíveis ligações de Hidrogênio com a Tyr116 e Lys244, que são distintos em comparação com IBP e NPS, que possuem interações com a Arg120 e Tyr355. Estes estudos apresentam um grande potencial para elucidar o mecanismo de inibição da COX-2 utilizando a EPI, que pode impactar o desenvolvimento como um fármaco comercial.

PALAVRAS-CHAVE: farmacologia; mecanismos de ação; docking molecular; química computacional; bioinformática.

COMPUTATIONAL STUDY OF ENZYME INHIBITION USING ALKALOIDS

ABSTRACT: The search for new non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) always aims to find substances with greater effectiveness and fewer adverse reactions. We investigated here the inhibition study of cyclooxygenase 2 (COX-2) using the alkaloid epiisopiloturine (EPI) obtained from industrial subproducts from jaborandi leaves (*P. microphyllus*). We used the molecular docking method to perform this study, along with X-ray data obtained from the protein databank. The docking study was performed initially in the same region where we found commercial drugs, such as ibuprofen (IBP) and naproxen (NPS). Initial results indicate possible Hydrogen bonds with Tyr116 and Lys244, which are distinct compared to IBP and NPS, which have interactions with Arg120 and Tyr355. These studies present a great potential to elucidate the COX-2 inhibition mechanism using EPI, which may impact development as a commercial drug.

KEYWORDS: pharmacology; action mechanism; molecular docking; computational chemistry; bioinformatics.

INTRODUÇÃO

A busca de AINEs, para melhorar o desempenho da eficiência para o tratamento da dor e de processos inflamatórios, é uma das necessidades da indústria farmacêutica. Em particular, a inibição da COX-2, pois se trata de uma enzima fundamental dentro do processo inflamatório no corpo humano. (KUMMER; COELHO, 2002) Contudo, os AINEs induzem diversas reações adversas, mesmo com diversas pesquisas visando sintetizar novos fármacos. (SOUTO et al., 2011)

O jaborandi (*P. microphyllus*) é um pequeno arbusto muito utilizado pelos nativos sul americanos para mastigação, acreditando que tal ato aumentava a salivação. O segundo alcaloide de

maior massa é a Epiisopiloturina (EPI), e acredita-se que esse alcaloide pode ter uma atividade anti-inflamatória inibidora seletiva da COX-2.(VÉRAS et al., 2013)

Neste presente estudo, foram selecionados os PDBs 3NT1(DUGGAN et al., 2010) e 4PH9 (ORLANDO; LUCIDO; MALKOWSKI, 2015). Estes PDBs são referentes ao NPS e ao IBP que são medicamentos COX-2. Os resultados de raios-X para o NPS indicam que seu grupo carboxilato se liga a Arg120 e Tyr355, sendo a interação com Arg120 feita através de ligação de hidrogênio. A estrutura cristalina do IBP na COX-2 sugere que a ligação entre os dois tem como determinante as interações com a Arg120 e Tyr355. Além disto, uma ponte salina é presente entre a porção carboxilato do inibidor e o grupo guanidínio de Arg-120, o que é necessário para a inibição da COX-2 pelo IBP, e são considerados como caráter hidrofóbico. (ORLANDO; LUCIDO; MALKOWSKI, 2015)

Como a estrutura da EPI é maior em comparação com as demais, provavelmente possui um mecanismo distinto em comparação com as moléculas investigadas na literatura. A estrutura molecular da EPI não tem semelhanças com as moléculas do IBP e do NPS além de ser bem maior, portanto é de extrema necessidade a realização do docking para estudar e analisar os bolsões encontrados na COX-2 e saber os tipos de interações da EPI com a COX-2 nestes bolsões. Além disto é preciso saber os tipos de ligações encontradas através do docking, bom como os mecanismos responsáveis pela inibição da COX durante uma inflamação.

MATERIAL E MÉTODOS

As técnicas de docking molecular fornecem uma estimativa da energia livre da ligação entre uma proteína e um ligante, indicando também os possíveis tipos de interações com os aminoácidos do sítio ativo. Esta estratégia é bastante interessante pois permite que novos fármacos sejam estudados mesmo antes de síntese, e com isto, o custo relacionado ao desenvolvimento de novos fármacos pode ser reduzido. O docking molecular serve para filtrar e descartar os compostos e bolsões que não servem para serem alvo ou ligantes, e encontrar possíveis candidatos de boa interação com o sítio ativo do receptor, funcionando como um complexo chave - fechadura.(ALBERTO MALVEZZI, 2008).

Para tal estudo foram utilizados os *softwares livres*: Pymol(SCHRÖDINGER, LLC, 2015), Autodock Tools(MORRIS et al., 2009), Autodock Vina(TROTT; OLSON, 2009), Chimera(PETTERSEN et al., 2004). O PyMol é um programa de visualização molecular. O Autodock Tools foi utilizado para acrescentar os hidrogênios tanto na COX-2 quanto na molécula de EPI e para visualizar através do autogrid o campo e os bolsões onde seria feito o docking. Após isso, a execução do docking, se dá, única e exclusivamente, através do Autodock Vina (MORRIS et al., 2009)(TROTT; OLSON, 2009). As análises e visualizações dos resultados obtidos das estruturas foram realizadas por meio do Chimera, onde se pode ainda obter as medidas (distâncias, ângulos, áreas de superfície, volume) e cálculos necessários. Além disto o Chimera também pode ser utilizado para praticamente todos demais recursos já citados, embora seja um programa mais avançado para utilização. O avogadro tem sua função para desenhar moléculas para a comparação entre elas(PETTERSEN et al., 2004).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O PDB 4PH9 referente à cristalização do IBP e o 3NT1 referente ao NPS, tem uma grande semelhança entre si quando se trata das interações das mesmas com o sítio ativo da COX-2. Ambas têm interações hidrofílicas sendo o IBP com a ARG 121.A e com TYR 356.A e o NPS com ARG 120.A e com TYR 355.A na entrada do canal da COX-2 responsável pela inibição da mesma. Foram encontradas 9 cavidades na estrutura da COX-2, sendo 2 delas significativamente maiores do que as outras, e como a estrutura da molécula da EPI é uma estrutura de porte grande, o foco foi para essas cavidades maiores encontrados nas regiões periféricas.

Em cada docking realizado, como por exemplo ilustrado pela Figura 1, pode-se observar que existe a possibilidade da EPI se ligar de várias maneiras na cavidade selecionada da COX-2. Houveram o total de pelo menos 6 estruturas viáveis como modos de ligação na COX-2, que, em geral, realizam interações com a Tyr116 e Lys224.

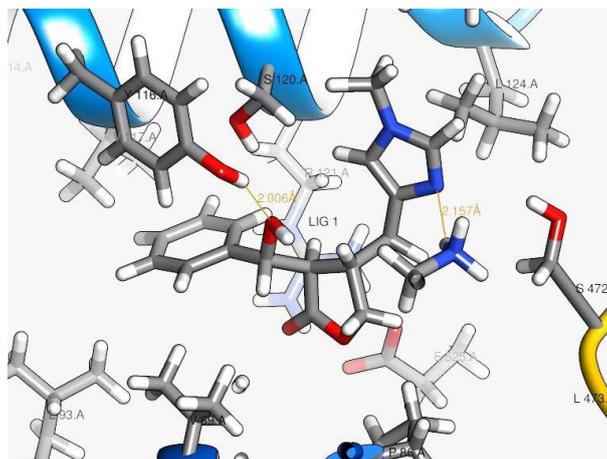


Figura 1: representação da molécula EPI no sítio de ligação da proteína COX-2. Legenda: LIG1 (EPI); os aminoácidos foram abreviados na notação condensada.

CONCLUSÕES

Foram analisadas as moléculas do IBP e NPS dentro do sítio de ligação da proteína 4PH9 e 3NT1 encontradas no PDB e comparados com a molécula EPI e sua possível interação na proteína. Para tal pesquisa foram utilizados alguns softwares de química computacional e bioinformática, e através destes foram encontrados bolsões. Os resultados preliminares aqui apresentados indicam uma possível conformação, bem como interações, da EPI, sugerindo ligações de Hidrogênio como as principais interações com o sítio de inibição da COX-2. Além disto, o estudo constatou que provavelmente os mecanismos de interação são diferentes dos fármacos comerciais IBP e NPS. Nossos futuros estudos neste sistema contarão com a investigação das demais possíveis regiões de interação da COX-2.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o tempo computacional providenciado pelo CENAPAD/Unicamp.

REFERÊNCIAS

- ALBERTO MALVEZZI. **Modelos de Virtual screening de Inibidores da Cruzaína: Desenvolvimento e Validação Experimental**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2008.
- DUGGAN, K. C. et al. Molecular Basis for Cyclooxygenase Inhibition by the Non-steroidal Anti-inflammatory Drug Naproxen. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 45, p. 34950–34959, 5 nov. 2010.
- KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R. B. No TitleAtiinflamatórios Não esteróides inibidores da Ciclooxygenase-2 (COX-2): Aspectos Atuais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, n. 4, 2002.
- MORRIS, G. M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of computational chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, dez. 2009.
- ORLANDO, B. J.; LUCIDO, M. J.; MALKOWSKI, M. G. The structure of ibuprofen bound to cyclooxygenase-2. **Journal of Structural Biology**, v. 189, n. 1, p. 62–66, jan. 2015.
- PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera?A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, out. 2004.
- SCHRÖDINGER, LLC. **The {PyMOL} Molecular Graphics System, Version~1.8**. [s.l.: s.n.].
- SOUTO, A. L. et al. Anti-Inflammatory Activity of Alkaloids: An Update from 2000 to 2010. **Molecules**, v. 16, n. 12, p. 8515–8534, 11 out. 2011.
- TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, p. NA-NA, 2009.
- VÉRAS, L. M. C. et al. Industrial Scale Isolation, Structural and Spectroscopic Characterization of Epiisopiloturine from *Pilocarpus microphyllus* Stapf Leaves: A Promising Alkaloid against Schistosomiasis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. e66702(1-11), 26 jun. 2013.