TRIAGEM VIRTUAL PARA A IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS INIBIDORES DA PROTEASE SUBTILISINA 1 (SUB1) DO *Plasmodium falciparum*

Altino Caetano da Silva Neto¹; Franco Henrique Andrade Leite²

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Farmácia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: altinocaetanoneto@gmail.com

2. Orientador, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: fhpharm@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: *Plasmodium falciparum*; SUB1; Triagem virtual.

INTRODUÇÃO

A malária é uma doença infecciosa caracterizada por episódios febris, causada por protozoários do gênero *Plasmodium ssp*, a qual a espécie *P. falciparum* é responsável pela forma mais grave da doença, a cerebral (Blackman et al., 2012). Em 2015, essa doença foi responsável por cerca de 212 milhões de casos e 429 mil mortes em todo o mundo (WHO, 2015), sendo 99% delas causadas pelo *P. falciparum*. Apesar da relevância em termos de saúde pública, os fármacos disponíveis para o tratamento de pacientes com malária são limitados (quinolínos e derivados da artemisinina), com efeitos adversos graves e eficácia espécie dependente e portanto a busca por novos fármacos antimalários é emergencial (2013; Sudhinaraset et al., 2016; Leite et al., 2014). Uma das formas para alcançar esse objetivo é através da utilização de estratégias computacionais que auxiliam na identificação de moléculas candidatas a ensaios biológicos frente a alvos exclusivos e validados do agente etiológico, como a Subtilisina 1 que é responsável por pela invasão e liberação dos parasitas do interior dos eritrócitos e, portanto, vital para o parasito (Brogi, 2016). Dentre essas técnicas, a triagem virtual por modelo farmacofórico e acoplamento molecular tem possibilitado a priorização de moléculas presentes em bibliotecas de moléculas com taxas de sucesso superior aos ensaios randômicos (Rodrigues et al, 2012). Com base nessas informações, triagem virtual hierárquica por modelo farmacofórico e acoplamento molecular foi utilizada com o objetivo de identificar potenciais inibidores frente a protease subtilisina 1 de *P. falciparum* (PfSUB1) nos bancos OCCC-UFSJ e Sigma-ZINC.

METODOLOGIA

Um conjunto de 37 inibidores não peptídicos com atividade biológica descrita frente à PfSUB1 (IC₅₀ < 50μM) foram coletados da literatura (Giovani, 2014) e posteriormente divididos em treino (n=8) e teste para a geração e avaliação dos modelos farmacofóricos, respectivamente. As estruturas 2D foram obtidas no programa Marvin® Sketch 15.4.20 (Chemaxon, 2015, <https://www.chemaxon.com/>) e convertidas para o formato 3D na plataforma SYBYL®-X 2.0 (Tripos, 2010). Em seguida, as cargas parciais foram calculadas pelo método Gaisteiger-Huckel e as estruturas foram minimizadas por gradiente conjugado com um critério de convergência de 0,001 Kcal/mol, utilizando campo de força Tripos conforme disponível na plataforma SYBYL®-X 2.0. Os modelos farmacofóricos foram gerados em duas etapas: Inicialmente, as conformações dos inibidores foram obtidas através de Algoritmo Genético implementado no módulo GALAHAD, no qual o tamanho da população e o número máximo de gerações para os inibidores de PfSUB1 foram ajustados para 50 e 10, respectivamente. Os demais parâmetros (CRUZAMENTO = 1,0 e MUTAÇÃO = 1,0) foram mantidos nos seus valores padrão. Posteriormente, os conformeros foram alinhados entre si para a construção dos modelos farmacofóricos.

Inicialmente, os modelos farmacofóricos foram avaliados quanto aos parâmetros estatísticos internos do GALAHAD (ENERGY < 100kcal/mol e PARETO ≠ 0). Os modelos remanescentes foram avaliados quanto a capacidade de identificar as moléculas do conjunto treino (N_HITS). Modelos com N_HITS > 4 (>50% do conjunto treino) foram selecionados para a próxima avaliação. A seguir, o modelo com maior valor de MOL_QRY foi considerado como o mais adequado para a etapa de triagem virtual.

O melhor modelo farmacofórico foi utilizado para filtrar as moléculas disponíveis no banco da Sigma-Aldrich (<http://zinc15.docking.org/catalogs/sial/>) implementado na plataforma ZINC¹⁵ e o banco OCCC-UFSJ. Essa etapa foi implementada por meio da opção “alinhamento flexível 3D”, disponível no módulo UNITY® 3D. A qualidade do alinhamento de cada molécula foi expressa pelo valor de QFIT que varia de 0 a 100, em que aquelas com valores maiores que média mais duas vezes o desvio padrão foram escolhidas para a filtragem por acoplamento molecular. A estrutura 3D de PfSUB1 foi obtida do banco de estruturas macromoleculares (<http://www.rcsb.org/pdb/>) (PDB: 4LVN). As moléculas de água foram removidas e átomos de hidrogênio foram adicionados às estruturas de forma a otimizar suas ligações de hidrogênio. A seguir, os resíduos ácidos e básicos tiveram seus pKa calculados, com o programa H++ (<http://biophysics.cs.vt.edu/>). Finalmente, as cargas atômicas parciais Gasteiger-Hückel (Gasteiger; Marsili, 1980) foram atribuídas aos resíduos da proteína com o auxílio do módulo Biopolymer disponível na plataforma SYBYL®-X 2.0 (Tripos, 2010).

As etapas de busca conformacional e avaliação das poses foram realizadas no programa Vega ZZ®. O espaço de busca foi definido com base na região delimitada pelos resíduos catalíticos (Asp372, His428 e Ser606/ cubo de arestas 20 Å). A seguir, esses parâmetros foram testados quanto a habilidade de diferenciar ativos de falsos positivos (*decoys*) construídos com o auxílio do servidor DUD-E (Mysinger, et al. 2012). O banco contendo todas as moléculas (ativos + falso positivo = 508) foi avaliado no sítio ortostérico e os dados de afinidade utilizados para a geração da curva ROC (do inglês, *Receiver Operating Characteristic*) e cálculo da AUC (do inglês, *area under the curve*). Por fim, as duas moléculas melhores ranqueadas foram avaliadas quanto ao perfil de interações intermoleculares com o auxílio do programa PLIP (<https://projects.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/>).

RESULTADO E DISCUSSÃO

Como a quimioterapia é a única alternativa terapêutica para o tratamento de pacientes com malária, os esforços para a busca de novos fármacos é fundamental para o controle da doença e sobrevivência dos pacientes. Uma forma de acelerar esse processo é a utilização de métodos computacionais que utilizem dados oriundos de inibidores conhecidos e estrutura 3D de alvos essenciais para a manutenção da vida do parasito. Por esse motivo, uma filtragem hierárquica por modelo farmacofórico e acoplamento foi executada para a seleção de potenciais inibidores da PfSUB1. Inicialmente, 10 modelos farmacofóricos foram construídos e avaliados conforme os parâmetros estatísticos internos do GALAHAD (Tabela 1).

Tabela 1: Parâmetros internos dos modelos farmacofóricos não-peptídicos disponíveis no GALAHAD.

Modelos	ENERGY (Kcal/mol)	STERICS	HBOND	MOL_QR Y	PARETO	N_HITS
1	22,97	1291,40	253,40	54,15	0	2
2	14,08	1215,70	251,00	55,26	0	5
3	39,66	1289,60	254,00	38,45	0	0
4	102,56	1356,80	258,20	22,92	0	3
5	17,95	1248,00	245,60	62,44	0	4
6	36,24	1238,00	249,00	70,38	0	5
7	16,49	1140,20	256,50	40,77	0	0
8	24,32	1308,70	243,60	42,11	0	5
9	21,21	1154,20	266,70	23,69	0	4
10	17,65	1235,80	246,10	39,20	0	2

A análise dos valores de ENERGY (>100Kcal/mol) mostra que apenas o modelo 4 contém moléculas com ângulos torcionais distorcidos. A comparação estatística dos modelos (valor de PARETO) também não foi útil para reduzir o número de modelos. Por essa razão, a

capacidade de recuperar as molécula que deram origem aos modelos foi avaliada através do valor de N_HITS. Apenas os modelos 2, 6 e 8 conseguem identificar mais de 50% das moléculas do conjunto treino. Contudo, esse parâmetro não foi suficiente para a seleção de um modelo para a etapa de triagem virtual. Assim, o grau de sobreposição das moléculas do conjunto treino aos modelos remanescentes foi avaliado através do valor de MOL_QRY, o qual possibilitou a seleção de um modelo farmacofórico adequado para a triagem virtual (Figura 1, modelo 6).

Figura 1: Melhor modelo farmacofórico para inibidores de PfSUB1. Azul: centros hidrofóbicos, verde: pontos aceptores de ligação de H, rosa: pontos doadores de ligação de H, vermelho: centro positivos. O raio das esferas varia de acordo ao raio de tolerância calculado pelo GALAHAD. As distâncias e raios estão representadas em angstroms.

O modelo farmacofórico 6 possui quatro grupos aceptores de ligação de H, três doadores de ligação de H, seis centros hidrofóbicos e um centro positivo. Esses pontos farmacofóricos são encontrados em inibidores potentes, o que demonstra a capacidade do modelo em identificar os prováveis requisitos para a inibição frente a PfSUB1. A filtragem pelo modelo, possibilitou a seleção de 35 moléculas presentes nos bancos com valores de QFIT > 47,61 e portanto foram destinados a triagem por acoplamento molecular. Como não existem inibidores co-cristalizados na estrutura 3D de PfSUB1, a eficiência do acoplamento molecular foi avaliado com base na curva ROC e cálculo da AUC (Fig. 2).

Figura 2: curva ROC da função de pontuação do acoplamento molecular

A literatura tem demonstrado que programa que apresentam $AUC \geq 0,65$ são considerados satisfatórios e, portanto podem ser uteis para a priorização de moléculas potenciais. Por esse motivo, 35 moléculas previamente filtradas foram acopladas no sítio ortosterico do alvo. A fim de avaliar o perfil de ligação, as duas moléculas com maior valor de afinidade (ZINC05940186; Energia = -7 kcal/mol e ZINC00174021; Energia = -6,8 kcal/mol) (Fig. 3).

Figura 3: Mapa das interações intermoleculares das duas moléculas com maiores valores de afinidade. ZINC05940186 em verde e ZINC00174021 em branco. As ligações de hidrogênio estão representadas por linhas contínuas azuis, e as interações hidrofóbicas estão representadas pelas linhas tracejadas. As distâncias são expressas em angstroms.

As interações descritas por ZINC05940186 (Asp520, Leu461 e Leu602) e ZINC00174021 (His428, Lis465 e Asp520) são realizadas por resíduos catalíticos, o que pode demonstrar potencial perfil de inibição e, portanto deve ser avaliadas por testes *in vitro* para confirmar a atividade biológica.

CONCLUSÃO

A escassez de inibidores não-peptídicos potentes ($IC_{50} < 1\mu M$) e ausência de ligante cristalográfico dificultaram uma validação mais robusta para técnicas empregadas, contudo foi possível a construção de um modelo farmacofórico que pode conter características essenciais para inibição da PfSUB1 e filtragem de bancos moleculares, resultando em compostos que apresentaram interações com resíduos importantes do sítio ativo, que podem ser investigados em testes *in vitro* para avaliação de atividade biológica, corroborando também que as técnicas *in silico* são eficazes na priorização de moléculas que possivelmente possam conter atividade biológica.

REFERÊNCIAS

- BLACKMAN, M. J. et al. Plasmodium subtilisinlike protease 1 (SUB1): Insights into the active site structure, specificity and function of a panmalaria drug target. **International Journal of Parasitology**, [S.l.], v. 42, p. 597-612, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim epidemiológico nacional**, v. 46, n. 25, Brasília, DF, 2015.
- BROGI, Simone et al. In silico study of subtilisin-like protease 1 (SUB1) from different Plasmodium species in complex with peptidyl-difluorostatones and characterization of potent pan-SUB1 inhibitors. **Journal Of Molecular Graphics And Modelling**, [s.l.], v. 64, p.121-130, mar. 2016.
- GIOVANI, Simone et al. Rational design of the first difluorostatone-based PfSUB1 inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 24, n. 15, 2014.
- LEITE, F. H. A. et al. Malaria: from old drugs to new molecular targets. **Biochemistry and Biotechnology Reports**. Londrina, v. 2, n.4, p. 1-7, 2014.
- RODRIGUES, R.P. et al. Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, p. 739-776, 2012.
- SONDERGAARD, C. R. et al. Improved Treatment of Ligands and Coupling Effects in Empirical Calculation and Rationalization of pKa Values. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 7, n. 7, p. 2284-2295, 2011.
- SUDHINARASET, M. et al. Who continues to stock oral artemisinin monotherapy? Results of a provider survey in Myanmar. **Malarial Journal**. v. 15, n. 1, 2016.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Malaria Report 2015. Genebra, 2015.