TRIAGEM VIRTUAL PARA IDENTIFICAÇÃO DE INIBIDORES DA ACETILCOLINESTERASE.

Kryzia Santanada Silva¹; Mariana Borges Botura²; Manoelito Coelho dos Santos Junior³ e Raquel Bianca Marchesine de Almeida⁴

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

2. Orientador, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: mbbotura@hotmail.com
3. Participante do Laboratório de Modelagem Molecular, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: mc2500@gmail.com

4. Doutoranda do programa de pós-graduação em biotecnologia, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: raquelbma87@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: Ocotea, carrapaticida, acetilcolinesterase.

INTRODUÇÃO

Destaque do agronegócio brasileiro no cenário mundial, a bovinocultura tem sua produtividade comprometida por uma espécie de carrapato conhecida como *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (BRASIL, 2015). As investigações com produtos de origem vegetal são métodos alternativos a principal medida de controle utilizada na pecuária bovina, os acaricidas sintéticos (FERREIRA, 2002).

As espécies do gênero *Ocotea*, membros da família Laureceae são apontados como detentores de atividades biológicas como a ação acaricida (SANTOS et al. 2013). A enzima acetilcolinesterase é utilizada como alvo para o controle de infestações por carrapatos, pois sua inibição ocasiona o acúmulo de acetilcolina e consequentemente a morte do parasito (RIBEIRO et al., 2012).

Será construído inicialmente um banco de moléculas oriundas de plantas do gênero *Ocotea*, em seguida a afinidade das mesmas será avaliada por acoplamento molecular frente a enzima acetilcolinesterase, os melhores compostos serão avaliados por ensaios in vitro. Espera-se com isso contribuir para o controle do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e com isso com a bovinocultura.

MATERIAL E MÉTODOS OU METODOLOGIA

Para os estudos de acoplamento molecular será utilizado o programa DOCK 6.5 e acessórios (LANG et al., 2015). A delimitação do espaço de acoplamento molecular será feita com o cálculo da superfície molecular de acesso pelo programa acessório DMS. A partir do DMS será construída a imagem negativa da superfície molecular do sítio ortostérico pelos programas SPHGEN e SPHERE_SELECTOR (KUNTZ et al., 1982). As propriedades moleculares para a região de acoplamento molecular serão calculadas pelo programa GRID (MENG et al. 1992). Para pontuação das moléculas será utilizada a função GridScore. As moléculas serão ordenadas por energia de afinidade e comparadas com inibidores clássicos de cada alvo.

Na criação do banco de ligantes será feito um levantamento sobre estruturas químicas que foram extraídas de plantas do gênero *Ocoteae*. As moléculas serão desenhadas no programa MarvinSketch e preparadas para o acoplamento molecular no programa Chimera 1.9. Para o preparo do banco do receptor a estrutura macromolecular da acetilcolinesterase será coletada no Protein DataBank baseando-se nos fatores de

qualidade cristalográfica e na presença do substrato para a localização das coordenadas do sítio ativo. O preparo do receptor será realizado no programa Chimera 1.9 por meio do módulo DockPrep. A avaliação da atividade da acetilcolinesterase (AChE) será avaliada de acordo com o método de Ellman (1961) modificado por Tan et al. (2014). A enzima utilizada será a acetilcolinesterase (AChE) de *Electrophorus electricus* tipo VI (Sigma®).

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO

Ao avaliar a atividade *in vitro* da fração do extrato etanólico de *O. daphnifolia* obtido, constatou-se que o mesmo promoveu inibição da ação da Acetilcolinesterase (AChE) de forma concentração dependente. Isto aponta para que na etapa do trabalho *in silico*, com o acoplamento molecular a reticulina interaja com a AChE.

Fonte: O autor (2017)

*** $p < 0,001$ comparado ao controle negativo

Figura 1: Atividade inibitória *in vitro* da AChE.

O acoplamento molecular da reticulina foi realizado com enzima AChE presente no PDB com número de identificação 4HA5, que foi escolhida por apresentar 2,15 Å. Os parâmetros do acoplamento molecular do DOCK 6.7 foram avaliados através do valor de RMSD entre a pose gerada pelo acoplamento molecular e a de origem, que quando inferior a 2Å, estima-se que a solução encontrada pelo programa é satisfatória (MIZUTANI et al., 2006). O valor de RMSD = 0,46 Å (Figura 2) indica que o acoplamento molecular obteve sucesso em reposicionar o ligante no local e com orientação espacial adequada (figura 2).

Figura 2. Sobreposição da estrutura cristalográfica do ligante (acetiltiocolina) na AChE (azul) com a pose obtida no reacoplamento molecular (vermelho).

Ao serem avaliadas com a curva ROC e área sob a curva (AUC), com um resultado de AUC = 0,76 (figura 3) mostram razoabilidade na diferenciação dos

compostos ativos em detrimento dos inativos, obtendo uma classificação razoável com base nos intervalos propostos por Matsubara (2008). Com relação a taxa de recuperação, nota-se que o alvo foi razoável, pois conseguiu recuperar em 100% as moléculas verdadeiros positivos, percorrendo em cerca de 90% da base de dados.

Figura 3: Curva ROC com um banco de moléculas contendo 06 ativos e 300 decoys.

Na figura 6 pode-se observar o mapa de interações intermoleculares da reticulina com a AChE, bem como seus valores de energia de afinidade.

Figura 6. Perfil de interações intermoleculares da reticulina com AChE.

Na AChE humana e do rato, a tríade catalítica da enzima consiste nos aminoácidos Ser203, His47 e Glu34. Os resíduos de Ser da AChE mostraram interação com a molécula de reticulina. Os resíduos aromáticos nas posições 330 e 279 eram responsáveis pela ligação e seletividade do composto testado com a AChE, verificando também, interações com o Trp279 à margem do sítio aniônico. Os resíduos Trp86, Asp74, e Trp279 também encontrados no acoplamento da reticulina, no presente estudo, contribuem para estabilização da energia do complexo formado com a AChE (DA SILVA et al., 2006).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos de triagem virtual podem ser utilizados para seleção inicial de ligantes, evitando-se testar moléculas sem potencial inibidor frente a um determinado alvo. Os resultados obtidos na etapa do trabalho com o acoplamento molecular demonstraram que a reticulina interage com a AChE, o que corrobora com os achados nos testes *in vitro*.

A fração do extrato etanólico de *Ocotea daphnifolia* tem potente atividade inibitória *in vitro* frente a enzima AChE. A atividade anticolinesterásicapode estar relacionada a presença do alcalóide reticulina e de diferentes polifenóis neste extrato.

Este trabalho relata sobre atividade biológica e identificação de constituintes químicos da espécie *O. daphnifolia*, contribuindo para relevante conhecimento acerca do potencial farmacológico desta planta. Estudos adicionais *in vivo* e isolamentos das substâncias bioativas tornam-se necessários para melhor conhecimento do potencial uso farmacológico e de segurança de *O. daphnifolia*.

REFERÊNCIAS

- BRASIL. Ministério da Agricultura. **Bovinos e bubalinos**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/portal/page/portal/Internet-MAPA/paginainicial/animal/especies>>. Acesso em 05/10/2015.
- BARBOSA, C. D. S. et al. In vitro activities of plant extracts from the Brazilian Cerrado and Pantanal against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) (ExpApplAcarol, 10.1007/s10493-013-9656-z). **Experimental and Applied Acarology**, v.60, n. 3, p. 431, 2013.
- SANTOS, L. B. DOS et al. Efficacy of extrats from plants of the Brazilian Pantanal against *Rhipicephalus(Boophilus) microplus*. **Revista Brasileita de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 4, p. 532-838, 2013.
- RIBEIRO, V.L.S. et al. Effect of *Calea serrata* Less. n-hexane extract on acetylcholinesterase of larvae ticks and brain Wistar rats. **Veterinary Parasitology**, v. 189,p. 322-326, 2012.
- LANG, P. T. et al. DOCK 6: combining techniques to model RNA-small molecule complexes. **RNA**. 2009; 15(6): 1219–1230.
- MATSUBARA, E. T. **Relações entre Ranking, Análise ROC e Calibração em Aprendizado de Máquina**. 2008. 149f. Tese (Doutorado em Ciências de Computação e Matemática Computacional). Instituto de Ciências Matemáticas e de computação. Universidade de São Paulo. São Carlos.
- MIZUTANI, M. Y. et al. Effective handling of induced-fit motion in flexible docking. **Proteins**. v. 63, n. 4, p. 878-891, 2006.
- FERREIRA. C.A.S. **Clonagem, caracterização e expressão de cDNAs similares a calreticulina e paramiosina isolados de glândula salivar do carrapato Boophilusmicroplus (Canestrini, 1887)**. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica.2002.
- KUNTZ, I. D.et al. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. **Journal of Molecular Biology**. 1982; 161(2):269–288.
- MENG, E. C.; SHOICHET, B. K.; KUNTZ, I. D. Automated docking with grid-based energy evaluation. **J. Comp. Chem**. v. 13, p. 505-524, 1992.METZ, C. E. 1978. Basic principles of ROC analysis. *Seminars in Nuclear Medicine*. 08 (04): 283-298.