



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXIII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA - 2019

Identificação de potenciais inibidores alostéricos frente a Subtilisina 1 de *Plasmodium falciparum*

Jullye Christye Andrade Almeida¹; Bruno Cruz de Souza²; Franco Henrique Andrade Leite³

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Farmácia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: jullyechristye@gmail.com
2. Coorientador, Mestrando em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: bcfarma@gmail.com
3. Orientador, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: fhpharm@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: Alostérico. Dinâmica molecular. SILCS.

INTRODUÇÃO

A malária, doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, é responsável por cerca de 435 mil mortes e 219 milhões de casos clínicos por ano em todo o mundo (WHO, 2017). Apesar da relevância em termos epidemiológicos e de saúde pública, a quantidade de fármacos disponíveis para o tratamento de pacientes com malária é limitada com um perfil de efeitos adversos graves. Adicionalmente, a eficácia é espécie dependente devido ao surgimento de cepas multirresistentes aos fármacos convencionais (CROFT; JACQUERIOZ; JONES, 2010; LEITE et al., 2014; MUKHERJEE; SADHUKHAN, 2016).

Uma forma para atenuar o surgimento de cepas multirresistentes é a utilização de fármacos que agem em outros sítios de modulação (alostérico) frente a alvos exclusivos e do parasito, como a Subtilisina 1 (SUB1) que é responsável pela manutenção do ciclo exo-eritrocítico no hospedeiro humano. (WHITAKER; REINHART, 2016).

Diante do exposto, o objetivo desse estudo é identificar potenciais sítios alostéricos na estrutura 3D da Subtilisina 1 do *P. falciparum* (PfSUB1) e posterior priorização de potenciais inibidores alostéricos presentes no catálogo de compostos naturais da UEFS NatProDB® que serão posteriormente avaliados quanto ao perfil físico-químico.

MATERIAL E MÉTODOS

A estrutura 3D de Subtilisina 1 do *Plasmodium falciparum* (PDB ID 4LVO) foi submetida ao servidor FTMap (<https://ftmap.bu.edu/login.php>), para determinar as cavidades com o auxílio de sondas/fragmentos (etanol, isopropanol, isobutanol, acetona, acetaldeído, éter dimetílico, ciclohexano, etano, acetonitrilo, ureia, metilamina, fenol, benzaldeído, benzeno, acetamida e N, N-dimetilformamida).

Após a seleção do potencial sítio alostérico com base no seu povoamento por sondas como benzeno, ciclohexano, dimetilformamida, etanol e fenol, assim representando uma potencial região modulável devido a sua diversidade de perfis de interação, as moléculas oriundas do NatProDB foram filtradas por acoplamento molecular com o auxílio do programa Autodock Vina, sendo selecionados os três compostos com melhor valor de energia de afinidade.

Os compostos selecionados foram avaliados quanto aos descritores disponíveis na regra de Lipinski e Veber (Doadores de ligação de hidrogênio ≤ 5 ; O peso molecular ≤ 500 Da; O $\log P \leq 5$; Aceptores de ligação de hidrogênio ≤ 10 ; Ligações rotacionáveis ≤ 10 ; Área de superfície polar ≤ 140 Å²), calculados com o auxílio do servidor pkCSM (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsml/>). Aqueles com uma penalidade ou mais foram excluídas.

Por fim, os compostos foram submetidos ao servidor Poseview, com o intuito de analisar as interações ocorridas entre a *Plasmodium falciparum* SUB1 e os compostos selecionados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A busca por sítios alostéricos é uma estratégia útil para a priorização de moléculas com afinidade frente ao alvo. Por esse motivo, a estrutura 3D da PfSUB1 foi submetida ao servidor FTMap. Este servidor usa moléculas orgânicas para modular as cavidades, com a finalidade de determinar com base nas características físico-químicas das sondas, o perfil da cavidade modulável.

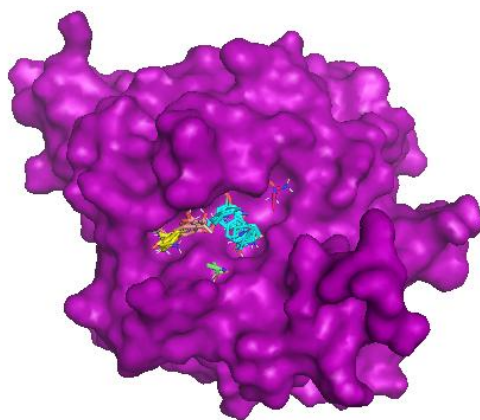


Figura 1: Estrutura 3D da Subtilisina 1 (SUB 1) em *surface* (roxo); sondas em *sticks*. A cavidade encontrada pelo servidor FTMap é evidenciada pela presença das sondas.

O banco NatProDB, foi acoplado nessa região através das rotinas de triagem virtual do software Autodock Vina. Com base nos dados energéticos, as três melhores estruturas foram selecionadas para análise das interações intermoleculares, sendo elas ZINC14855332 (-8,30 kcal/mol), ZINC69482009 (-7,70 kcal/mol) e ZINC69482467 (-7,50 kcal/mol).

As estruturas obtidas foram então submetidas ao servidor Poseview, para avaliar as principais interações intermoleculares (Figuras 2, 3 e 4).

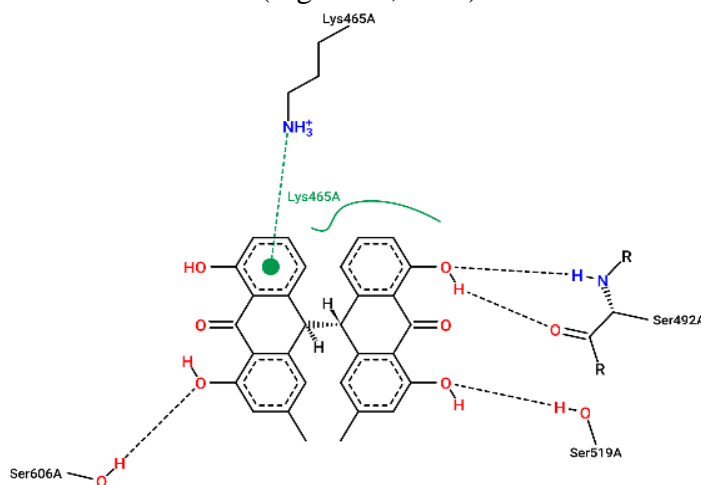


Figura 2: Interações entre molécula (ZINC14855332) e o provável sítio alostérico da SUB1.

Os dados da Figura 2 mostram que ZINC14855332 realiza interações de empilhamento π com o grupamento NH_3 da Lys465A, assim como ligações hidrofóbicas. E ligações de hidrogênio da OH e NH dos aminoácidos Ser492A (doador), Ser519A (doador) e Ser606A (doador) com a hidroxila fenólica (aceptor), as quais representam maior estabilidade.

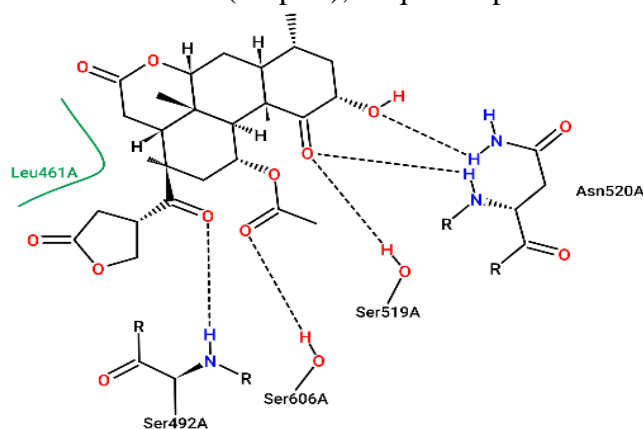


Figura 3: Interações entre molécula (ZINC69482009) e o provável sítio alostérico da SUB1.

ZINC69482009 (Figura 3) realiza ligações de hidrogênio com OH e NH dos aminoácidos Ser492A, Ser519A e Ser606A (doadores), assim como no Asn520A, com hidroxila, carbonila e carboxila (aceptores). No aminoácido Leu416A, foi observado uma ligação hidrofóbica.

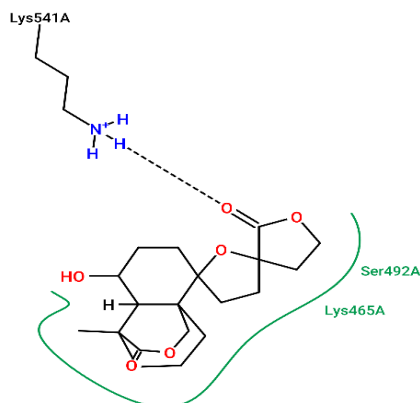


Figura 4: Interações entre molécula (ZINC69482467) e o provável sítio alostérico da SUB1.

Por fim, na figura 4, ZINC69482467 realiza ligação de hidrogênio apenas com a Lys541A com o grupamento NH_3 (doador) e uma carbonila (aceptor), e ligações hidrofóbicas nos aminoácidos Lys465A e Ser492A. Pôde ser observado que todos os resíduos das interações nas três moléculas, com exceção da Leu416, são compatíveis com as encontradas na literatura, onde Ser490, Ser517, Asn520, Thr605 e Ser606, Ser492 e Ser519 são descritas como participantes da catálise enzimática (WITHERS-MARTINEZ et al., 2014).

As propriedades físico-químicas das moléculas influenciam diretamente nos aspectos farmacocinéticos, sendo utilizadas como filtros moleculares em projetos de planejamento de fármacos devido a sua simplicidade conceitual e facilidade de aplicação (FERREIRA; OLIVA; ANDRICOPULO, 2011). Os compostos obtiveram resultados favoráveis às regras de Lipinski e Veber, o que complementa a possibilidade de uso em formulações orais. Tais resultados podem ser analisados pela Tabela 1, tendo os parâmetros reprovados em vermelho.

Tabela 1: Resultados dos cálculos e análise dos compostos selecionados de acordo com as regras de Lipinski e Veber.

Compostos	PM (Da)	cLog P	Ligações rotacionáveis	HB A	HB D	PSA (Å ²)
ZINC14855332	478,50	5,18	1	6	4	206,28
ZINC69482009	504,57	2,01	3	9	1	210,14
ZINC69482467	350,41	1,75	0	6	1	146,74

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pesquisa realizada resultou no reconhecimento de um provável sítio alostérico presente na estrutura da enzima Subtilisina 1 situada no organismo da espécie do protozoário *Plasmodium falciparum*. Foram selecionadas três moléculas com provável capacidade de se ligar ao sítio alostérico. Tais estruturas mostraram-se, *in silico*, capazes de interagir com a enzima Subtilisina 1 por meio de interações de empilhamento π , ligações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio, sendo estas com resíduos que são compatíveis com os encontrados na literatura, os quais se mantem adjacentes ao sítio catalítico da enzima estudada.

REFERÊNCIAS

CROFT, A. M.; JACQUERIOZ, F. A.; JONES, K. L. Human Parasitic Diseases Drugs to prevent Malaria in Travellers: A systematic Review of Randomized controlled Trials. **Human Parasitic Diseases**, v. 2, p. 1–19, 2010.

FERREIRA, R. S.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Integração das técnicas de triagem virtual e triagem biológica automatizada em alta escala: oportunidades e desafios em P&D de fármacos. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1770-1778, 2011.

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.

MUKHERJEE, A. SADHUKHAN, G. C. Anti-malarial Drug Design by Targeting Apicoplasts: New Perspectives. *Journal of Pharmacopuncture*, v. 19, n. 1, p. 007-015, 2016.

WHITAKER, A. M.; REINHART, G. D. The effect of introducing small cavities on the allosteric inhibition of phosphofructokinase from *Bacillus stearothermophilus*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 607, p. 1- 6, 2016.

WITHERS-MARTINEZ, C. et al. The malaria parasite egress protease SUB1 is a calcium-dependent redox switch subtilisin. **Nature Communications**, London, Uk, v. 5, n. 3726, p.1-10, 02 maio 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION.WHO. **World Malaria Report**. Geneva, 2017.