



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

XXVI SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2022

Investigação *in silico* da atividade de metabólitos de plantas frente a glutamato descarboxilase de *Rhipicephalus microplus*

Matheus da Cunha Santos; Mariana Borges Botura²; Amanda Ponce Morais Cerqueira³ Manoelito Coelho dos Santos Júnior⁴

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Farmácia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: mcsmatheuscunha@gmail.com
2. Orientadora, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: mbootura@uefs.br
3. Docente e Participante do Projeto de Pesquisa, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: mc2500@gmail.com
4. Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e participante do Projeto de Pesquisa, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: amandaponcedeleon@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: Ocotea; *Rhipicephalus microplus*; carrapaticida.

INTRODUÇÃO

Atualmente o controle de carrapatos é focado no uso repetido de diferentes classes de acaricidas sintéticos. Entretanto, em virtude da ocorrência de cepas resistentes à maioria dos acaricidas comerciais torna-se necessário o desenvolvimento de novos produtos antiparasitários com diferentes mecanismos de ação (KUMAR et al., 2020). As plantas constituem uma importante fonte de substâncias com diferentes estruturas químicas e com diversas atividades contra parasitos (JAIN et al., 2020).

Os métodos para a descoberta de fármacos podem adotar abordagens mais diretas feitas a partir do entendimento dos processos moleculares envolvidos na doença, para isso, o ponto de partida da pesquisa é o alvo molecular, tais como o receptor, enzima e DNA (WALTERS et al., 1998). As enzimas são alvos moleculares importantes para o planejamento de novos fármacos, em razão do seu papel essencial em diferentes vias bioquímicas dos parasitos. O objetivo do presente estudo foi construir um modelo tridimensional da enzima glutamato descarboxilase de *R. microplus* (RmGAD) e avaliar *in silico* a atividade de metabólitos de plantas frente a RmGAD.

MATERIAL E MÉTODOS

Como não há registro da estrutura tridimensional da enzima glutamato descarboxilase do *R. microplus*, foi elaborado um modelo tridimensional da mesma utilizando dados obtidos através de dados obtidos no *National Center for Biotechnology Information* - NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) com auxílio do módulo BLAST. Em seguida foi utilizado o modelo tridimensional da enzima com melhor resultado do BLAST, através da interface gráfica do CHIMERA (PETTERSEN et al., 2004).

Para os estudos de acoplamento molecular de metabólitos de plantas (substâncias isoladas de espécies de Ocotea por nosso grupo de pesquisa e outros metabólitos descritos

no banco de dados virtual ZINC) com a glutamato descarboxilase foi utilizado o programa DOCK 6.9 e acessórios (LANG et al., 2015).

A delimitação do espaço de acoplamento molecular foi feita inicialmente com o cálculo da superfície molecular de acesso ao solvente do receptor gerada pelo programa acessório DMS. A partir do DMS foi construída a imagem negativa da superfície molecular do sítio ortostérico (região de ligação do ligante cristalográfico) pelos programas SPHGEN e SPHERE_SELECTOR (KUNTZ et al., 1982). As propriedades moleculares para a região de acoplamento molecular foram calculadas pelo programa GRID em sua configuração padrão (MENG et al., 1992).

As moléculas foram ranqueadas pelo valor da pontuação GridScore, e aquelas com melhores resultados foram analisadas de acordo com seu padrão de ligação com a enzima utilizando o programa PLIP (SALENTIN, 2015).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, o alvo escolhido foi a enzima Glutamato descarboxilase (*RmGAD*) do *R. microplus* (503 aa) - AFX68719.1. Essa enzima participa da síntese de ácido γ -aminobutírico (GABA) participando de vários processos incluindo α -descarboxilação, transaminação, racemização e clivagem aldólica (FENALTI et al, 2007).

Devido ao fato dessa proteína não possuir uma estrutura 3D determinada foi realizada uma busca por potenciais estruturas semelhantes a sequência primária da *RmGAD*. Inicialmente a sequência primária da proteína foi obtida no *National Library of Medicine* (NCBI), selecionando-se a com conferência manual. Através do BLASTp (ALTSCHUL et al., 1990) foi realizada uma busca para compara a sequência biológica primária contra um banco de dados de estruturas 3D de GAD, para isso foi utilizado o banco RSCB *Protein Data Bank* (PDB). Entre as 7 melhores proteínas encontradas, foi selecionada a proteína 2OKJ (GAD67), que apresentou maior identidade sequencial, com boa cobertura no alinhamento, além disso, a proteína depositada no PDB possui boa resolução cristalográfica.

A partir do alinhamento das sequências de DNA proteicos realizado entre a proteína escolhida e o molde de *RmGAD* foram levantados dados importantes para análise do posicionamento do sítio ortostérico e paridade entre as sequências, esse alinhamento foi realizado na plataforma online Clustal Omega (SIEVERS et al., 2011) com auxílio da ferramenta Emboss NEEDLE.

Após alinhamento foram estabelecidos parâmetros de interesse: a identidade entre as sequências de 84.2%, similaridade também de 84.2%, e o estado de conservação do sítio catalítico em 100% entre os aminoácidos GLN 98A, LEU 99A, SER 100A (190-192) (Uniprot Q99259).

A 2OKJ é composta por duas cadeias de aminoácidos assimétricas, a parte escolhida para realização do acoplamento de ligantes foi a parte é demonstrada na figura 6. Os substratos para o GAD67 são: o cofator piridoxal 5-fosfato (PLP) molécula que se liga ao resíduo LYS 405A da proteína selecionada formando o complexo ligante LLP, o ácido 4-[(3-hidroxi-2-metil-5-[(fosfonooxi)metil]piridin-4-il)metil]amino]butanoico (PLZ) e ácido gama-amino-butanóico (GABA) (FENALTI et al, 2007).

O sítio ortostérico é formado pelos resíduos presentes na cadeia A e B: GLN 190A, SER 192A, ALA 253A, HIS 291A, ASP 373A, ASN 402A, TYR 434B, CYS 455B, ARG 567A (FENALTI et al, 2007) (Figura 1)

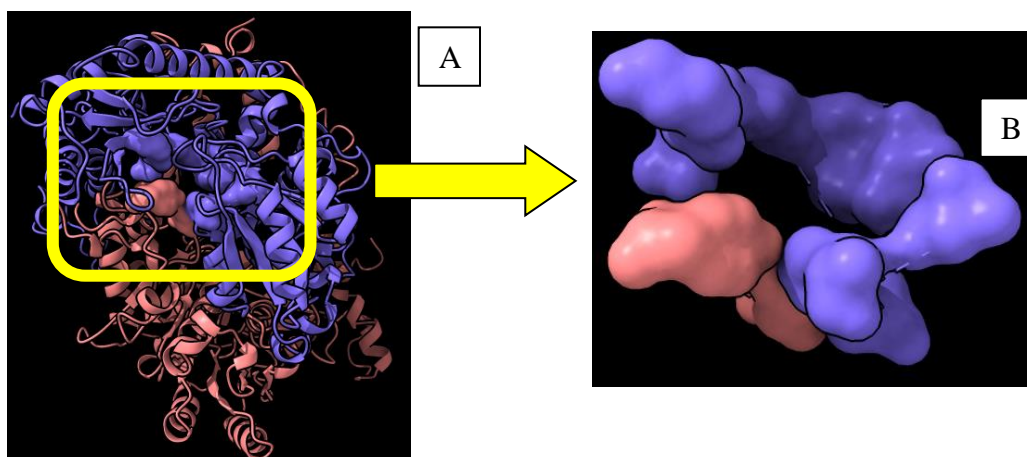


Figura 1: Representação da localização (A) e composição do sítio ortostérico de acordo com as cadeias A e B (B). Em roxo a cadeia A, em vermelho a cadeia B

Os resultados da análise de acoplamento molecular indicam que o Armepavina, apresentou o melhor valor do GridScore seguido pelo Coclorina (Tabela 1). As interações intermoleculares apresentadas pelo complexo Armepavina – GAD podem ser observadas na figura 2.

Tabela 1. Valores do Gridscore (kcal/mol) após o acoplamento molecular de alcaloides com a glutamato descarboxilase

Molécula	GridScore (kcal/mol)
Armepavina	-22,96
Coclorina	-17,80
Reticulina	-2,90
Magncurarina	3,67
Domesticina	34,36

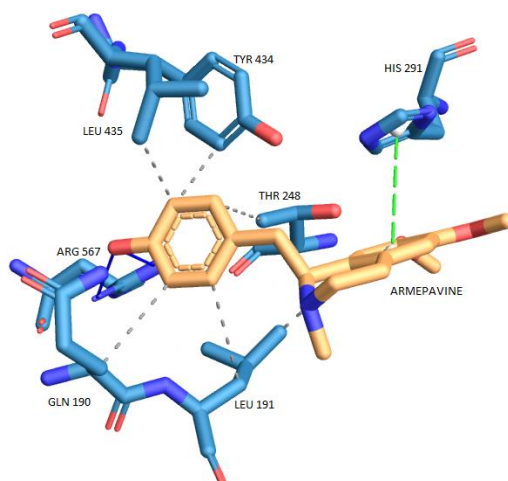


Figura 2: Mapa de interações intermoleculares do complexo Armepavina – GAD67

Foram observadas seis interações hidrofóbicas, com os resíduos GLN 190A, LEU 191A (2), THR 348A, TYR 434B, LEU 435B. Apresentam-se também duas ligações de hidrogênio doadoras com o resíduo ARG 567A, por fim, o ligante realiza um empilhamento π do tipo paralelo com a HIS 291A. Os dados obtidos sugerem que armepavina interage bem com os aminoácidos GLN 190A, THR 348A, TYR 434B, LEU 435B integrantes do sítio ativo (FENALTI et al, 2007), e que pode desencadear efeito inibitório sobre a enzima.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O alvo Glutamato descarboxilase descrito neste trabalho aparenta ser um ótimo objeto de pesquisa para o desenvolvimento de novos acaricidas para controle de *Rhipicephalus microplus*. O alcaloide armepavina apresentou melhor potencial *in silico* de interagir com a enzima glutamato descarboxilase. Estudos *in vitro* serão necessários para a elucidação da eficácia inibitória de alcaloides frente a essa enzima

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F. et al. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215(3): 403-410.
- FENALTI, G. et al. 2007. GABA production by glutamic acid decarboxylase is regulated by a dynamic catalytic loop. *Nature structural & molecular biology* 14(4): 280-286.
- JAIN, P. et al. 2020. *Rhipicephalus microplus*: A parasite threatening cattle health and consequences of herbal acaricides for upliftment of livelihood of cattle rearing communities in Chhattisgarh. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 26.
- KUMAR, R. et al. 2020. Menace of acaricide resistance in cattle tick, *Rhipicephalus microplus* in India: Status and possible mitigation strategies. *Veterinary parasitology* 278: 108993.
- KUNTZ, I.D. et al. 1982. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *Journal Molecular Biological*, 161: 269-288
- LANG, P. T. et al. 2015. DOCK 6.7 Users Manual. *Regents of the University of California*.
- MENG, E.C. et al. Automated docking with grid-based energy evaluation. *Journal of Computational Chemistry*, v.13; p.505-524, 1992.
- PETTERSEN, E. F. et al. 2004. UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* 25(13):1605-1612
- SALENTIN, S. et al. 2015. PLIP: fully automated protein-ligand interaction profiler. *Nucl. Acids Res.* 43: 443-447.
- SIEVERS, et al. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology* 7(539).
- WALTERS, W.P. et al. 1998. Virtual Screening An overview. *Drug Discovery Today* 3:160-178