



Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Departamento de Química
Programa de Pós Graduação em Química

Dissertação de Mestrado

**Estudo teórico do mecanismo de ação da enzima RTA da Ricina com um
ligante análogo ao substrato natural rRNA 28S**

Larissa da Silva Pereira

Orientador: Prof. Dr. Gerd Bruno da Rocha
Coorientador: Dr. Gabriel Aires Urquiza de Carvalho

João Pessoa
-Dezembro de 2020-



Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Departamento de Química
Programa de Pós Graduação em Química

Dissertação de Mestrado

**Estudo teórico do mecanismo de ação da enzima RTA da Ricina com um
ligante análogo ao substrato natural rRNA 28S**

Larissa da Silva Pereira

Dissertação submetida ao Programa de Pós
Graduação em Química da Universidade
Federal da Paraíba, como parte dos requi-
sitos para obtenção do título de Mestre em
Química

Orientador: Prof. Dr. Gerd Bruno da Rocha
Coorientador: Dr. Gabriel Aires Urquiza de Carvalho

João Pessoa
-Dezembro de 2020-

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

P436e Pereira, Larissa da Silva.

Estudo teórico do mecanismo de ação da enzima RTA da Ricina com um ligante análogo ao substrato natural rRNA 28S / Larissa da Silva Pereira. - João Pessoa, 2021.
63 f. : il.

Orientação: Gerd Bruno da Rocha.

Coorientação: Gabriel Aires Urquiza de Carvalho.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. Biotecnologia. 2. RTA - ricina. 3. Sítio ativo. 4. Mecanismo de ação. 5. Dinâmica molecular. 6. Descritores de reatividade. I. Rocha, Gerd Bruno da. II. Carvalho, Gabriel Aires Urquiza de. III. Título.

UFPB/BC

CDU 60(043)

Estudo teórico do mecanismo de ação da enzima RTA da Ricina com um ligante análogo ao substrato natural rRNA 28S

Dissertação de Mestrado apresentada pela aluna Larissa da Silva Pereira e aprovada pela banca examinadora em 14 de dezembro de 2020.



Prof. Dr. Gerd Bruno da Rocha
Orientador/Presidente



Dr. Gabriel Aires Urquiza de Carvalho
(Co- Orientador)



Prof. Dr. Carlos Henrique da Silveira
(Examinador)



Prof. Dr. Wagner de Mendonça Faustino
(Examinador)

Assinaturas da Banca realizadas em modo Webconferência em 14/12/2020, digitalizadas e certificadas pelo Prof. Dr.



Gerd Bruno da Rocha (SIAPE 1520134) em 14/12/2020

À minha mãe.

Agradecimentos

- Em primeiro lugar, ofereço minha mais sincera gratidão ao meu orientador, o Professor Gerd Rocha, que me apoiou ao longo da minha dissertação com seu conhecimento e paciência, ao mesmo tempo que me deu a oportunidade de trabalhar com liberdade no projeto.
- Agradeço ao meu coorientador Gabriel Urquiza, por compartilhar comigo seu vasto conhecimento e notáveis ideias que sempre me estimulam e encantam.
- Agradeço aos meus amigos do Laboratório de Química Quântica Computacional (LQQC), por fornecerem um ambiente estimulante para aprender e crescer. Estou especialmente grata a Cícero, Emerson, Elton, Acássio, Igor, Iran e Eduardo, pelas discussões informativas e interessantes na hora do café, pelas valiosas sugestões e por compartilharem suas experiências no desenvolvimento deste trabalho. Enfim, sou grata pela amizade que construímos ao longo desse período, trocando não só experiências profissionais, bem como experiências de vida.
- A Universidade Federal da Paraíba, juntamente com seu corpo docente, administrativo e estudantil, por me proporcionar uma rica experiência científica, cultural, social e profissional.
- À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.
- Aos meus pais e irmãos, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e me completando como ser humano. Em especial, agradeço a duas mulheres extraordinárias que são a base da minha vida, minha irmã Letícia e minha mãe Maria Angela, meu maior exemplo de força, determinação e amor.

- Ao meu namorado e companheiro de longa data, Tássio Max, por todo apoio emocional e incentivo, que foram fundamentais para seguir lutando mesmo em dias difíceis.
- As amigas que fiz no curso de mestrado, Anna Paula e Bárbara que estiveram comigo do início ao fim nessa jornada.
- Por fim, sou grata ao meu primeiro professor de química, Manoel Santana, por me introduzir no mundo da ciência.

*“Não importa o que aconteça,
continue a nadar”*

Procurando o Nemo

Resumo

A *Ricinus communis*, planta conhecida no Brasil como mamoneira, tem ganhado atenção da indústria, mídia e governos, em razão das propriedades de seus derivados, em especial a ricina e o óleo ricinoleico. Esse último, corresponde 90% do óleo total que é extraído da semente do fruto e apresenta uma importante economia para a indústria química. Já a ricina, é uma potente toxina capaz de inativar de forma eficiente ribossomos eucarióticos. É constituída de duas subunidades, a RTA e a RTB. Funcionalmente a RTB é responsável pelo reconhecimento e internalização da ricina nas células-alvo e a RTA pela catálise da depurinação da adenina 4324 localizada na região *Sarcin-Ricin Loop* do rRNA 28S. Devido a sua citotoxicidade, facilidade de extração e purificação, a ricina é classificada como agente de ameaça biológica de categoria B segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doença (CDC), preocupando autoridades mundiais pelo seu potencial uso como arma biológica. Dessa forma, o desenvolvimento de uma antitoxina seria uma importante conquista farmacêutica e biotecnológica. Porém, a grande dificuldade em projetar inibidores capazes de agir eficientemente como bloqueadores da RTA se atribui a compreensão incompleta do seu mecanismo de reação. Com a finalidade de obter um maior esclarecimento acerca do mecanismo de ação da RTA, foi realizado neste trabalho de dissertação um estudo teórico utilizando a Dinâmica Molecular (DM) para o monitoramento da interação da subunidade catalítica RTA com um análogo do substrato natural. Também foram realizados cálculos de Química Quântica por meio de Descritores de Reatividades (DR) baseados na Teoria Funcional da Densidade Conceitual (CDFT). Em suma, a trajetória de DM revelou as principais ligações de hidrogênio presentes no sítio ativo da RTA entre os resíduos Val81, Arg180 e Gly121 com a adenina alvo do ligante mímico. Além disso, evidenciou a ligação de hidrogênio que ativa a adenina alvo ao longo de toda simulação. As interações atrativas de estabilização da adenina pelos resíduos Tyr80, Tyr123, Val81, Gly121 e Glu208 e interações repulsivas pelos resíduos Glu177 e Trp211, foram identificadas pelo estudo da energia de interação. Foi reconhecido ainda o resíduo 332 como água catalítica do mecanismo. Por fim, os descritores de reatividade apontaram para um mecanismo de ação da RTA onde há uma susceptibilidade ao ataque eletrofílico na adenina alvo por meio do resíduo Arg180, uma estabilização da adenina em um empilhamento π entre os resíduos Tyr80 e Tyr123 e uma propensão do Glu177 em ativar a água catalítica doando densidade de elétrons e recebendo um próton.

Palavras-chave: RTA, Sítio ativo, Mecanismo de ação, Dinâmica molecular, Descritores de reatividade.

Abstract

Ricinus communis, a plant known in Brazil as castor bean, has gained attention from industry, media and governments, due to the properties of its derivatives, especially ricin and ricinoleic oil. The latter corresponds to 90% of the total oil that is extracted from the seed of the fruit and presents an important saving for the chemical industry. Already ricin is a potent toxin capable of efficiently inactivating eukaryotic ribosomes. It consists of two subunits, RTA and RTB. Functionally, RTB is responsible for the recognition and internalization of ricin in the target cells and RTA for the catalysis of the depurination of adenine 4324 located in the Sarcin-Ricin Loop region of rRNA 28S. Due to its cytotoxicity, ease of extraction and purification, ricin is classified as a category B biological threat agent according to the Center for Disease Control and Prevention (CDC), worrying world authorities for its potential use as a biological weapon. Thus, the development of an antitoxin would be an important pharmaceutical and biotechnological achievement. However, the great difficulty in designing inhibitors capable of acting efficiently as RTA blockers is attributed to the incomplete understanding of its reaction mechanism. In order to obtain further clarification about the mechanism of action of RTA, a theoretical study was carried out in this dissertation using the Molecular Dynamics (DM) to monitor the interaction of the RTA catalytic subunit with a natural substrate analog. Quantum Chemistry calculations were also performed using Reactivity Descriptors (DR) based on the Functional Theory of Conceptual Density (CDFT). In short, the DM trajectory revealed the main hydrogen bonds present in the active site of the RTA between the Val81, Arg180 and Gly121 residues with the target adenine of the mimic ligand. In addition, it evidenced the hydrogen bond that activates the target adenine throughout the simulation. The attractive interactions of adenine stabilization by residues Tyr80, Tyr123, Val81, Gly121 and Glu208 and repulsive interactions by residues Glu177 and Trp211, were identified by the study of the interaction energy. Residue 332 was also recognized as catalytic water in the mechanism. Finally, the reactivity descriptors pointed to an RTA mechanism of action where there is a susceptibility to electrophilic attack on the target adenine through the Arg180 residue, a stabilization of the adenine in a π stack between the Tyr80 and Tyr123 residues and a Glu177 propensity to activate catalytic water by donating electron density and receiving a proton.

Keywords: RTA, Active site, Mechanism of action, Molecular dynamics, Reactivity descriptors.

Conteúdo

Agradecimentos	i
1 Introdução	1
2 Objetivos	5
2.1 Objetivo Geral	5
2.2 Objetivos Específicos	5
3 Referencial Teórico	6
3.1 Características Bioquímicas da Ricina	8
3.2 Inibidores da RTA	12
3.2.1 Análogos de Substrato	13
3.2.2 Análogos do Estado de Transição	13
3.2.3 Análogos de Produto	14
3.3 Mecanismo de Ação da RTA	15
3.4 Simulação Molecular	16
3.4.1 Dinâmica Molecular	16
3.4.2 Descritores de Reatividade	18
4 Metodologia	29
4.1 Preparação da estrutura	29
4.2 Dinâmica Molecular	31
4.3 Análise da trajetória	34
4.4 Descritores de Reatividade	34
5 Resultados e Discussão	37
5.1 Dinâmica Molecular	37

6 Conclusão	49
7 Perspectivas	51

Lista de Figuras

3.1	(A) rRNA ribossômico 28S, com destaque para a região SRL. (B) Estrutura tridimensional da região SRL, ilustrando como A* a adenina alvo A4324. Fonte: (A) Ilustração adaptado da referência [11]. (B) Ilustração desenvolvida pela autora, utilizando o software VMD [12] e estrutura tridimensional com código PDB 430D.	7
3.2	(A) Estrutura tridimensional da ricina. Em azul gelo a cadeia A da ricina (RTA), em vermelho a cadeia B (RTB). (B) Domínios da ricina. Os domínios da RTA estão codificados como: domínio I em laranja , domínio II em verde e domínio III em azul. Os domínios da RTB estão codificados como: domínio I em amarelo e domínio II em vermelho. Fonte: Ilustração desenvolvida pela autora, utilizando o software VMD [12] e estrutura tridimensional com código PDB 2AAI.	9
3.3	Resumo representativo do processo de internalização da ricina na célula. Fonte: Retirado da referência [27]	11
3.4	Estrutura química do ligante formicina 5'-monofosfato (FMP). Fonte: Imagem do RCSB PDB [?], PDB ID: 3RTI.	13
3.5	(A) Mecanismo de ação da RTA proposto por Lord e colaboradores [5]. Fonte: Ilustração desenvolvida pela autora.	15
3.6	Mecanismo de ação da RTA proposto por Schramm e colaboradores [44]. Fonte: Ilustração desenvolvida pela autora.	16
4.1	Estrutura química do ligante 9-DA, com destaque para o monômero enumerado de 2. Fonte: Imagem do RCSB PDB [2], PDB ID: 3HIO.	30
4.2	Nomenclatura dos átomos do monômero 2 após a edição e parametrização do ligante. Fonte: Ilustração desenvolvida pela autora, utilizando o software VMD [3] e estrutura tridimensional com código PDB 3HIO.	31

4.3	Caixa cúbica de simulação. Ao centro da caixa está ilustrado o complexo RTA-C2X codificado de acordo com suas estruturas secundárias. Ao redor do complexo estão as moléculas de água (transparente) e os íons Cl^- (verde) e Na^+ (ROXO). Fonte: Ilustração desenvolvida pela autora, utilizando o software VMD [3] e estrutura tridimensional com código PDB 3HIO.	32
5.1	RMSD da simulação de dinâmica molecular em triplicata. Em magenta claro a 1º DM, em azul marinho a 2º DM e a 3º DM em ciano claro. Estão ilustradas também a médias das respectivas dinâmicas. Fonte: Resultado da dissertação, 2020.	38
5.2	(A) Ligações de hidrogênio do domínio I. (B) Ligações do domínio II. (C) Ligações do domínio III. Os átomos ao lado esquerdo do símbolo (- -) são os átomos aceptores de hidrogênio, e os ao lado direito os doadores. O valor médio da distância de ligação de hidrogênio estão indicados ao lado das frações de <i>frames</i> correspondentes a presença de ligação de hidrogênio. Fonte: Resultado da dissertação, 2020.	39
5.3	Ligações de hidrogênio do sítio ativo da RTA com os resíduos Val81, Arg180 e Gly121. Fonte: Resultado da dissertação, 2020.	41
5.4	Energia de interação total entre o ligante C2X com a RTA. Fonte: Resultado da dissertação, 2020.	42
5.5	Energia de interação entre os resíduos do sítio ativo da RTA com o ligante C2X. Fonte: Resultado da dissertação, 2020.	42
5.6	Ilustração da água catalítica orientada entre o Glu177 e C11 da adenosina. Fonte: Resultado da dissertação, 2020. Ilustração desenvolvida pela autora, utilizando o software VMD [9], e estrutura tridimensional com código PDB 3HIO.	44
5.7	Diferença entre susceptibilidades de ataque eletrofílico e nucleofílico para o sítio ativo da RTA. Fonte: Resultado da dissertação, 2020. Ilustração desenvolvida pela autora, utilizando o software Pymol	45
5.8	Dureza por átomos do sítio ativo da RTA, obtido por meio do descritor de reatividade de Dureza local. Fonte: Resultado da dissertação, 2020. Ilustração desenvolvida pela autora, utilizando o software Pymol	46

Introdução

A *Ricinus communis*, popularmente conhecida no Brasil como mamoneira, carrapateira, rícino e palma-de-cristo, é uma planta perene nativa de regiões tropicais e subtropicais do mundo, uma das 7.000 espécies da família das Euforbiáceas, originária da Etiópia, no continente africano. A mamona possui destaque na economia devido à ampla variedade de produtos que pode fornecer. Esses produtos vão desde o óleo de rícino e seus derivados, até produtos gerados da extração desse óleo [1].

O óleo extraído de suas sementes (sem casca) compreende 90% de ácido ricinoleico. Suas características físico-químicas, como a presença de insaturação e hidroxilas em sua estrutura química, lhe confere alta solubilidade em etanol e alto poder de lubricidade, representando na indústria de combustíveis uma importante fonte para produção de biodiesel. Já na indústria química, a fabricação de plásticos, fibras sintéticas, manufaturas de cosméticos, sabões, polímeros, esmaltes, corantes, desinfetantes aderentes, resinas e lubrificantes de aeronaves militares, registraram uma demanda no mercado que chegou a uma valorização de 300% do ácido ricinoleico nos últimos 10 anos.[2].

A extração do óleo ricinoleico gera dois importantes coprodutos, a casca do fruto e a torta (produto do processamento do fruto). Esses coprodutos são de grande interesse industrial pois estudos mostraram que para cada 1 kg de óleo de mamona extraído são gerados aproximadamente 1,31 e 1,13 kg de casca do fruto e torta, respectivamente. Isso torna de extrema relevância a criação de um destino que lhes agregue valor econômico [3], tendo em vista que a produção anual desse óleo aproxima-se de 1,5 milhão de toneladas.

A torta da mamona é utilizada, em geral, como adubo orgânico pois possui um alto teor de nitrogênio, além de ser usada também no controle de nematoides do solo. Outro destino com um maior valor agregado para estes coprodutos seria a produção de ração animal, uma

vez que a torta apresenta um alto teor de proteína bruta de quase 30% e a casca ser uma excelente fonte de fibras [3]. No entanto, o uso da torta vem sendo comprometido devido a presença de uma proteína específica, a ricina. Uma potente citotoxina inibidora da síntese proteica, produzida no endosperma da semente de mamona.

A ricina é uma proteína inibidora de ribossomos (RIP *type-2*). Sua estrutura consiste em duas subunidades, a ricina toxina A (RTA), subunidade catalítica, e a ricina toxina B (RTB), subunidade de lectina. Mediante a sua alta toxicidade, estabilidade, facilidade de extração e disponibilidade, a ricina é classificada como um agente tóxico de categoria B, segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), sendo considerada uma das substâncias mais tóxicas existente [4, 5].

A dose letal em humanos foi estimada em 1,78 mg para um adulto médio, entretanto, sua toxicidade depende da via de exposição: inalação, injeção ou ingestão oral. Sendo a inalação a via mais potente de envenenamento. A dose letal mediana por inalação (DL50) é de 3 a 5 µg/kg, enquanto a DL50 oral é de 20 mg/kg [6].

Ainda sem antídoto conhecido, a ricina é fonte de preocupação para autoridades mundiais em razão do seu potencial uso como arma biológica. Desde a antiguidade há narrativas de envenenamento utilizando a ricina. A história relata seu uso como arma biológica na primeira guerra mundial, segunda guerra mundial, guerra fria e atualmente ela é usada por grupos terroristas e ativistas [7].

Por outro lado, a cadeia A da ricina vem sendo bastante estudada no campo da terapia do câncer com a aplicação de imunotoxinas (ITs). A RTA é a toxina vegetal mais comumente usada na construção de ITs [8, 9]. Os procedimentos tradicionais no tratamento do câncer, como radioterapia, quimioterapia e cirurgia têm algumas limitações e causam efeitos colaterais bem graves. Dessa forma, as imunotoxinas representam uma técnica com possibilidade de aumentar a seletividade de ação, no entanto essa é uma área que ainda se encontra em desenvolvimento [6].

Em vista das dificuldades econômicas bem como o risco à segurança postos pela ricina, o desenvolvimento de uma antitoxina é uma importante meta farmacêutica e biotecnológica. No entanto, a compreensão incompleta do mecanismo de reação resulta na falha em projetar um inibidor eficaz para esta toxina.

Da perspectiva de ensaios *in vitro* e *in vivo*, diversas estruturas químicas já foram testadas como inibidores para a ricina [10], porém estes estudos apresentam alto custo financeiro e são bastante laboriosos. Em contrapartida, a Modelagem Molecular pode auxiliar no esclarecimento de mecanismos de reação, bem como auxiliar na busca por inibidores de uma maneira

rápida e barata em comparação com o método tradicional por síntese química. Os ensaios *in silico* são realizados em terminal computacional, e a energia de ligação entre o ligante e o receptor é utilizada como critério de indicação para diferenciar inibidores ativos de inativos.

Neste trabalho de dissertação, foi utilizado a Dinâmica Molecular para monitorar a interação da subunidade catalítica RTA com um ligante mímico ao substrato natural rRNA 25S. Também foi empregado cálculos de Química Quântica através de Descritores de Reatividades (DR) para caracterizar teoricamente o sítio ativo da ricina com fundamentos químicos da Teoria Funcional da Densidade Conceitual (CDFT).

Referências

- [1] H. Y. Shrirame, N. Panwar, and B. Bamniya, "Bio diesel from castor oil-A green energy option," *Low Carbon Economy*, vol. 2, no. 1, p. 1, 2011.
- [2] J. M. Cangemi, A. M. d. Santos, and S. Claro Neto, "A revolução verde da mamona," *Química Nova na Escola*, vol. 32, no. 1, pp. 3–8, 2010.
- [3] L. S. Severino, D. L. Auld, M. Baldanzi, M. J. Cândido, G. Chen, W. Crosby, D. Tan, X. He, P. Lakshamma, C. Lavanya, *et al.*, "A review on the challenges for increased production of castor," *Agronomy journal*, vol. 104, no. 4, pp. 853–880, 2012.
- [4] T. Berger, A. Eisenkraft, E. Bar-Haim, M. Kassirer, A. A. Aran, and I. Fogel, "Toxins as biological weapons for terror—characteristics, challenges and medical countermeasures: a mini-review," *Disaster and military medicine*, vol. 2, no. 1, pp. 1–7, 2016.
- [5] E. Janik, M. Ceremuga, J. Saluk-Bijak, and M. Bijak, "Biological toxins as the potential tools for bioterrorism," *International journal of molecular sciences*, vol. 20, no. 5, p. 1181, 2019.
- [6] N. Sowa-Rogozińska, H. Sominka, J. Nowakowska-Gołacka, K. Sandvig, and M. Słomińska-Wojewódzka, "Intracellular transport and cytotoxicity of the protein toxin ricin," *Toxins*, vol. 11, no. 6, p. 350, 2019.
- [7] W. P. Bozza, W. H. Tolleson, L. A. R. Rosado, and B. Zhang, "Ricin detection: tracking active toxin," *Biotechnology advances*, vol. 33, no. 1, pp. 117–123, 2015.
- [8] M. Słomińska-Wojewódzka and K. Sandvig, "Ricin and ricin-containing immunotoxins: insights into intracellular transport and mechanism of action in vitro," *Antibodies*, vol. 2, no. 2, pp. 236–269, 2013.
- [9] L. Polito, A. Djemil, and M. Bortolotti, "Plant toxin-based immunotoxins for cancer therapy: a short overview," *Biomedicines*, vol. 4, no. 2, p. 12, 2016.
- [10] P. G. Wahome, Y. Bai, L. M. Neal, J. D. Robertus, and N. J. Mantis, "Identification of small-molecule inhibitors of ricin and shiga toxin using a cell-based high-throughput screen," *Toxicon*, vol. 56, no. 3, pp. 313–323, 2010.

Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar teoricamente as interações do sítio ativo da RTA com um ligante análogo ao substrato natural rRNA 28S, por meio de Dinâmica Molecular e dos Descritores de Reatividades baseados na Teoria Funcional da Densidade Conceitual, afim de avaliar especificidades do mecanismo de ação da RTA.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar uma estrutura PDB da RTA em conformação catalítica;
- Obter um análogo do substrato natural bem posicionado no sítio ativo, por meio da edição de átomos do ligante 9-DA;
- Avaliar interações *in silico* utilizando análises da trajetória da dinâmica molecular;
- Especificar particularidades do sítio ativo da RTA, bem como do seu mecanismo de reação com auxílio dos Descritores de Reatividade.

Referencial Teórico

Proteínas Inativadoras de Ribossomo (RIPs) são um grupo de proteínas catalíticas que atuam no RNA ribossômico (rRNA) de forma destrutiva [1]. As RIPs têm uma ampla distribuição na natureza, entretanto, são encontradas principalmente em plantas. Estudos evidenciam que essas proteínas evoluíram para desempenhar um papel de defesa contra predadores, insetos e patógenos (vírus, bactérias, fungos e vermes) [2, 3]. Essas proteínas tóxicas são subdivididas em duas classes principais, a saber: *RIP-type1*, proteínas monoméricas, que se traduzem em pequenas cadeias polipeptídicas de aproximadamente 30 kDa e atividade enzimática *N*-glicosidase no rRNA; e as *RIP-type2*, proteínas heterodiméricas, compostas de uma cadeia A, também com atividade *N*-glicosidase no rRNA, associada por ligação dissulfeto a uma cadeia B não catalítica, de aproximadamente 35 kDa [4]. A cadeia B das *RIP-type2* possui propriedades de lectina com especificidade para açúcares, além de desenvolver o papel essencial do reconhecimento celular para auxiliar a entrada da cadeia A na célula [5].

O mecanismo de ação e muitos outros recursos estruturais e funcionais das RIPs ainda não foram totalmente compreendidos. No entanto, pesquisas realizadas forneceram algumas informações valiosas com relação a essas questões. Estudos revelaram que as RIPs possuem uma superfície de ligação carregada positivamente, empregadas para reconhecer e se ligar às moléculas de rRNA, que ocorrem negativamente [6]. Essa superfície positiva é composta principalmente por resíduos de ARG, possibilitando inferir que as interações eletrostáticas conduzam o reconhecimento do substrato e a formação do complexo RNA-enzima. Resíduos ácidos como ASP e GLU também são abundantes nessas proteínas [7]. Além das interações eletrostáticas predominantes, foi demonstrado ainda que as interações aromáticas entre as cadeias laterais de TYR, TRP e PHE também estão fortemente envolvidas na ligação RNA-enzima [8].

Dois sítios de ligação foram propostos para as cadeias catalíticas das RIPs [9]. O primeiro sítio é o de identificação do substrato RNA, o segundo sítio é onde ocorre a reação de hidrólise específica. A atividade catalítica das RIPs foi descoberta pela primeira vez com a ricina por Endo e colaboradores [10]. Ambas as RIPs, *type1* e *type2*, mostraram uma atividade catalítica de depurinação comum e específica na adenina 4324 (A4324), inserida no motivo GAGA da região denominada *Sarcin-Ricin Loop* (SRL), localizado na porção 28S do RNA ribossômico, Figura 3.1.

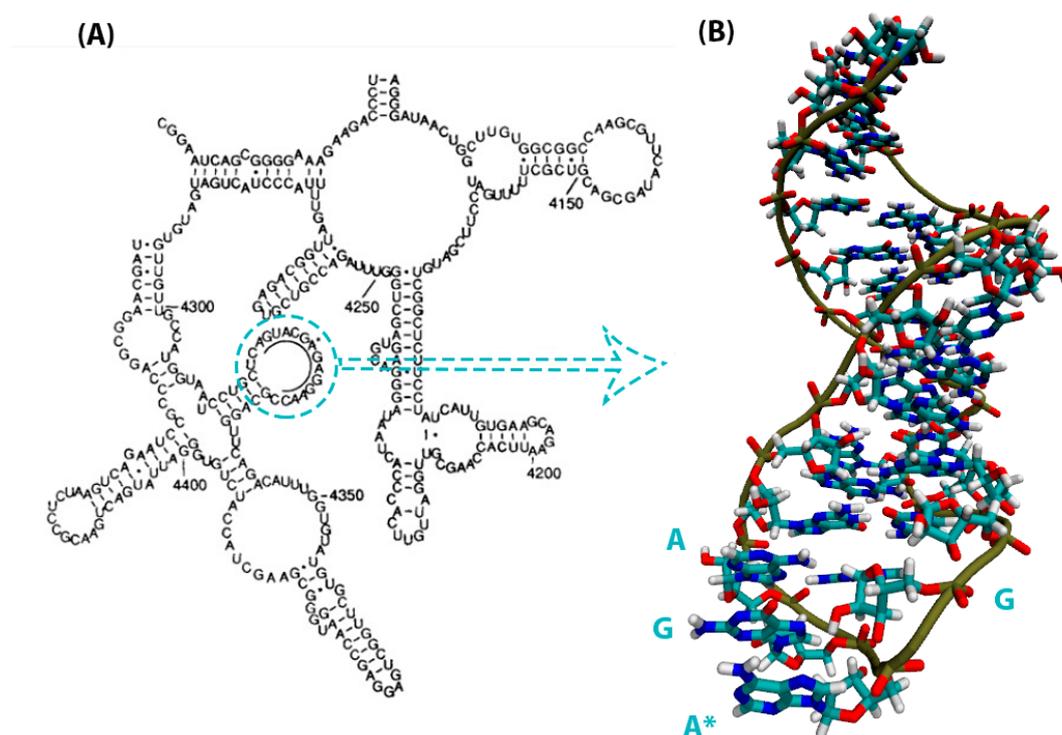


Figura 3.1: (A) rRNA ribossômico 28S, com destaque para a região SRL. (B) Estrutura tridimensional da região SRL, ilustrando como A* a adenina alvo A4324.

Fonte: (A) Ilustração adaptado da referência [11]. (B) Ilustração desenvolvida pela autora, utilizando o software VMD [12] e estrutura tridimensional com código PDB 430D.

A Ricina é a Proteína Inativadora de Ribossomo mais notável, produzida principalmente no endosperma da semente de *Ricinus communis*, popularmente conhecida como mamoneira. Foi identificada pela primeira vez por Peter Hermann Stillmark em 1888 [13]. A sua atividade enzimática no rRNA 28S foi especificada por Endo e colaboradores em 1987 [10], e outros estudos subsequentes [14–16] confirmaram a atividade de depurinação da ricina no rRNA, A4324 especificamente, substrato comum a todas as RIPs.

3.1 Características Bioquímicas da Ricina

Pertencente a família das RIP-*type2*, a ricina é um heterodímero AB, denominado respectivamente de Ricina Toxina A (RTA) e Ricina Toxina B (RTB), que se unem por uma única ligação dissulfeto. Cataliticamente ativa, a cadeia A é uma N-glicosidase e a cadeia B uma lectina específica de galactose e N-acetilgalactosamina [17].

A estrutura tridimensional da ricina foi resolvida por meio de ensaios cristalográficos de raio-X, a priori em 2,8 Å e refinada para 2,5 Å [18, 19]. Ambos os modelos permitiram o entendimento a um nível mais detalhado da estrutura tridimensional da ricina. De forma subsequente, trabalhos envolvendo clonagem e expressão heteróloga proporcionaram a elucidação da estrutura tridimensional da RTA isolada, primeiramente em resolução de 2,5 Å e posteriormente a 2,3 Å e 1,8 Å [20–22].

A RTA possui 267 aminoácidos que se enovelam em três domínios, Figura 3.2. O domínio I compreende os resíduos do 1 ao 117 e é governado pelas folhas- β , os resíduos de 118 ao 210 formam o domínio II e é dirigido pelas α -hélices, e por fim o domínio III que compreende os resíduos de 211 ao 267. O domínio III da RTA interage com os dois domínios da RTB e a ligação dissulfeto é formada entre o resíduo 259 da cadeia A e o resíduo 4 da cadeia B [18].

É possível observar, Figura 3.2, que a RTA contém em sua estrutura 7 α -hélices, totalizando por volta de 80 resíduos de aminoácidos, o que significa que cerca de 30% da proteína é helicoidal e contém 5 folhas- β , sendo cerca de 15% da estrutura [18].

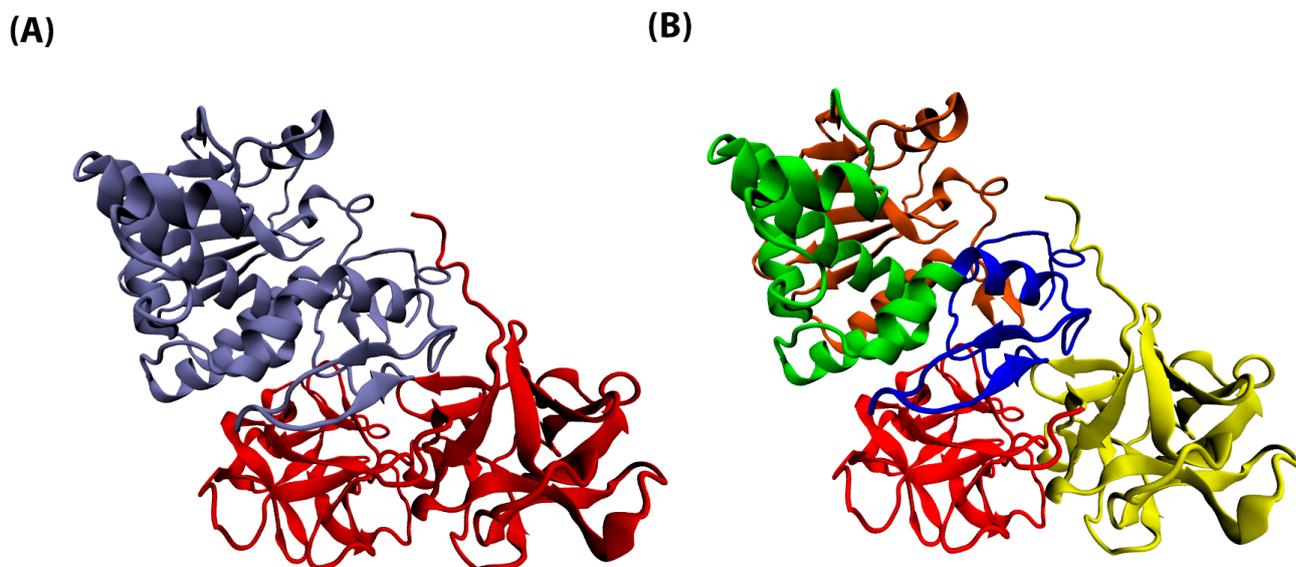


Figura 3.2: (A) Estrutura tridimensional da ricina. Em azul gelo a cadeia A da ricina (RTA), em vermelho a cadeia B (RTB). (B) Domínios da ricina. Os domínios da RTA estão codificados como: domínio I em laranja, domínio II em verde e domínio III em azul. Os domínios da RTB estão codificados como: domínio I em amarelo e domínio II em vermelho.

Fonte: Ilustração desenvolvida pela autora, utilizando o software VMD [12] e estrutura tridimensional com código PDB 2AAI.

Foi demonstrado que uma molécula de RTA é capaz de inativar 1500 ribossomos por minuto em um ensaio com ribossomos livres de células [23, 24]. No entanto, a depurinação em sistemas baseados em células ocorre a uma taxa mais baixa do que em sistemas livres de células. Na célula, há um intervalo de tempo necessário para a captação da toxina e seu transporte intracelular até que seja alcançado o substrato de rRNA. As taxas de depurinação são difíceis de comparar entre experimentos *in vivo* e *in vitro*, além disso, essas podem diferir entre os tipos de células [14, 25, 26]. No entanto, pode-se julgar que a depurinação induzida pela ricina é um processo enzimático muito rápido [27].

A toxicidade da ricina varia de acordo com a rota de entrada no organismo, podendo ser por inalação, injeção intravenosa, injeção peritoneal, injeção subcutânea ou ingestão oral, sendo a inalação a mais letal [17]. No organismo, o transporte intracelular da ricina, Figura 3.3, inicia-se com sua cadeia B no reconhecimento dos receptores de carboidratos presentes na superfície das células eucarióticas. Esses receptores contêm resíduos terminais de N-acetilgalactosamina ou β -1,4-galactose [28]. A maioria das células eucarióticas são sensíveis a ricina, uma vez que os resíduos de galactosil são abundantes nas células. Além disso, essa

toxina também pode ligar-se a células que carregam receptores glicanos do tipo manose [29]. Dessa forma, estima-se que 10^6 - 10^8 moléculas de ricina possam se ligar na superfície da célula [30].

Após a ligação da ricina aos receptores da superfície celular, a toxina é transportada para o interior da célula por endocitose mediada por clatrina ou independente de clatrina para atingir o sistema endossomal. A partir da internalização, a ricina trafega para os endossomos iniciais, podendo seguir por três rotas: (i) a toxina pode ser transportada de volta à superfície da célula em uma forma aparentemente intacta [31], (ii) transportada pelos endossomos tardios chegando ao lisossomos onde é degradada [32] ou (iii) seguir para o seu alvo catalítico. Foi visualizado por microscopia eletrônica que apenas cerca de 5% da ricina endocitada é transportada para o *Trans-Golgi Network* (TGN) [33, 34], sofrendo posteriormente transporte vesicular retrógrado do TGN para o retículo endoplasmático [35].

No retículo endoplasmático ocorre a redução da ligação dissulfeto que conecta as cadeias A e B da ricina [36]. Essa redução é catalisada pela proteína dissulfeto isomerase (PDI) [37], permitindo a liberação de RTA. Sugere-se que a redução auxilia na ativação da atividade catalítica da RTA [38], pois a cadeia A liberada pode sofrer um desenovelamento parcial, provavelmente necessário para a translocação da RTA para o citosol, onde, por vias normais, deveria ser ubiquitinizada e degradada pelo proteassoma. No entanto, de maneira não bem entendida, a RTA evita a degradação pelo proteassoma, sendo, em vez disso, ativada no citosol para exercer seu efeito citotóxico [39].

Funcionalmente, a RTA catalisa a depurinação da adenina 4324, especificamente hidrolisando a ligação N-glicosídica entre a adenina e a ribose. Essa adenina se localiza no motivo GAGA, da região denominada *Sarcin-Ricin Loop* (SRL) no rRNA 28S, subunidade ribossômica eucariótica. A depurinação dificulta a síntese de proteínas, logo, a homeostase da célula fica comprometida [10, 28].

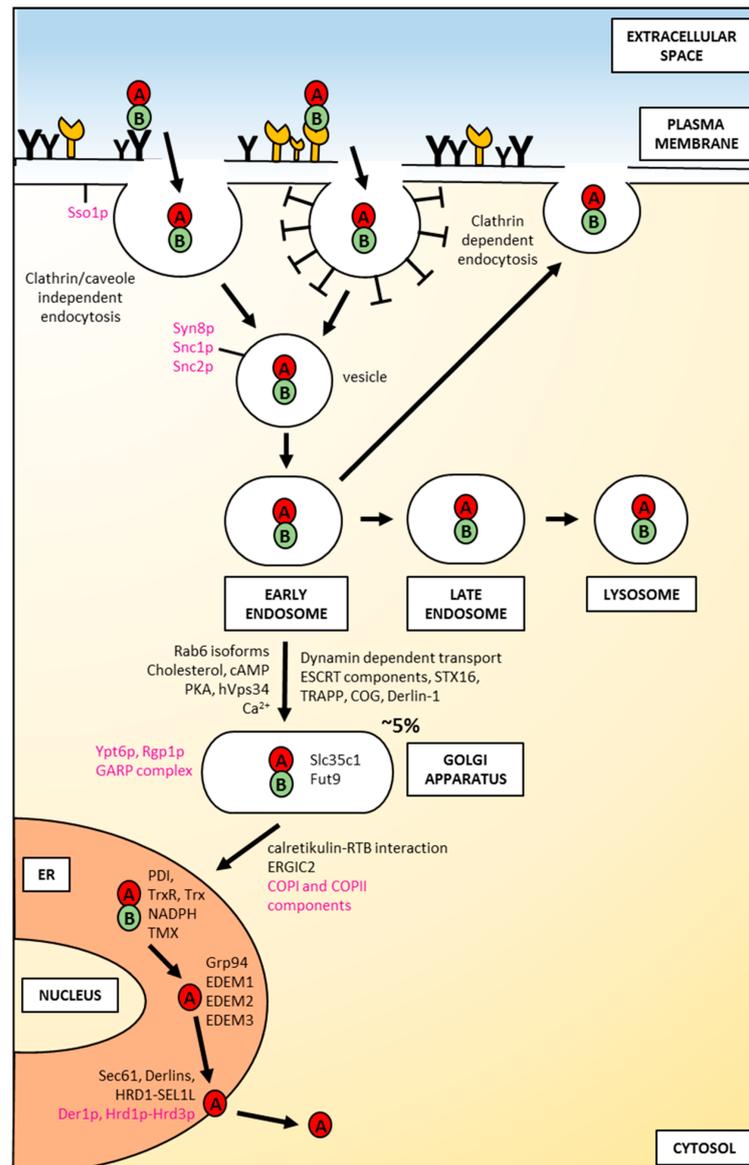


Figura 3.3: Resumo representativo do processo de internalização da ricina na célula.

Fonte: Retirado da referência [27]

Estudos cristalográficos de raios-X [16, 40] e estudos de mutação direcionada [41, 42] identificaram vários aminoácidos importantes no sítio ativo da RTA. Entre eles, os resíduos invariantes comumente relatados são Glu177, Arg180, Trp211, Tyr80 e Tyr123. É afirmado na literatura que os resíduos Tyr80 e Tyr123 realizem interação de empilhamento π com o anel da adenina alvo e que, quando comparados com a conformação nativa (sem ligante), a Tyr80 rotaciona para acomodar o ligante. Este, por sua vez, estabelece interações do tipo ligação de hidrogênio com os resíduos Val81, Gly121, Arg180, Glu177 e Glu208 [16]. O resíduo Trp211 também foi proposto para desempenhar um papel importante no processo catalítico, no entanto, seu papel é definido com uma participação não específica [43].

É significativo relatar que a rotação da Tyr80 define a RTA em duas conformações, denominadas de aberta e fechada. Na forma aberta, a cadeia lateral da Tyr80 rotaciona para

acomodar o substrato, enquanto na fechada essa rotação não ocorre deixando o sítio ativo indisponível para interações [44]. Em sua forma aberta a RTA apresenta dois sítios de ligações, o primeiro apresenta especificidade ao substrato natural, a adenina, já o segundo, ao qual sabe-se, está envolvido no reconhecimento de guanina, acomodando a base guanina da sequência invariante GAGA [16].

3.2 Inibidores da RTA

É necessário o conhecimento exato sobre a ação da ricina nas células para produzir inibidores que funcionem com eficácia. Aparentemente a abordagem mais acessível de controle da citotoxicidade causada pela ricina seria bloqueando a RTB, pois inibiria a absorção da toxina pela célula.

Análises das estruturas de raios-X [19, 45] mostraram que o RTB é composto por dois domínios relacionados: domínio I, resíduos 1 ao 135, e domínio II, resíduos 136 ao 262, Figura 3.2. Cada um desses domínios são compostos por três subdomínios. Os locais de ligação aos resíduos de galactosil são encontrados apenas em um subdomínio de cada domínio, sendo esses localizados nas extremidades opostas da RTB, separados por mais de 50 Å [45, 46]. Além disso, os sítios de ligação da RTB são relativamente pequenos [47] e exibem apenas ligações fracas [48]. Com base nesses fatos, a RTB é um alvo ruim para o projeto de inibidores, uma vez que manifestaria fraca capacidade de ligar-se ao inibidor. Fora isso, os locais de ligação não podem ser bloqueados simultaneamente por moléculas pequenas devido às suas localizações relativas, indicando que projetar inibidores eficazes para esses sítios de galactose polares e superficiais é extremamente difícil.

Em contraste, a RTA tem dois grandes sítios que estão próximos um do outro. Essa característica torna viável que uma molécula com duas metades se encaixe em ambos os sítios simultaneamente. Os inibidores da ricina, como para qualquer outra enzima, podem ser classificados em três classes; (i) análogos de substrato, (ii) análogos de estado de transição e (iii) análogos de produto. Embora inibidores de todas essas classes tenham sido produzidos e testados, ainda não existe um inibidor eficaz para a ricina. No entanto, o estudo desses inibidores forneceram informações valiosas sobre o local de ligação da ricina, resíduos catalíticos, além de realizarem excelentes previsões sobre a natureza e o modo de ligação do substrato natural e do o mecanismo catalítico.

3.2.1 Análogos de Substrato

O formicina 5'-monofosfato (FMP), Figura 3.4, é o inibidor análogo de substrato mais popular para a ricina. Existem algumas diferenças estruturais entre o FMP e o substrato natural da ricina, as quais o torna não hidrolisável e, assim, atuante como inibidor [16]. É importante relatar que em contraste com a ligação N-glicosídica, nitrogênio-carbono, encontrada no substrato natural, o FMP tem uma ligação carbono-carbono entre a base nitrogenada e a fração de açúcar.

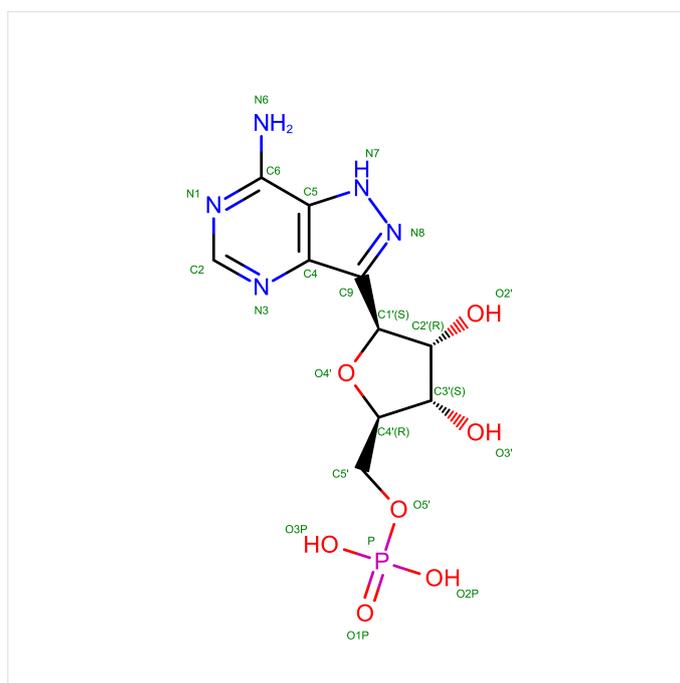


Figura 3.4: Estrutura química do ligante formicina 5'-monofosfato (FMP).

Fonte: Imagem do RCSB PDB [?], PDB ID: 3RTI.

A análise das ligações [16] do FMP ao RTA propôs um padrão de ligações para o substrato natural, em especial revelou muito sobre as interações específicas do anel de adenina. A citar, a interação no anel do FMP semelhante a adenina alvo, na forma de empilhamento π com os resíduos fenil, Tyr80 e Tyr123, a forte interação de ligação de hidrogênio com a Arg180 e, ainda, duas ligações de hidrogênio com a Val81 [16].

Mesmo que o FMP não tenha sido eficaz como um inibidor competitivo no organismo para a ricina, suas ligações forneceram fortes previsões sobre a forma de ligação do substrato natural.

3.2.2 Análogos do Estado de Transição

Os inibidores Análogos do Estado de Transição são considerados a classe mais poderosa de inibidores para enzimas [49]. Com base no estado de transição (ET) dissociativo, proposto para a reação de hidrólise catalítica da RTA [50], foram projetados, sintetizados e testados alguns inibidores para essa toxina [44, 51–54], além do ET permitir o projeto de inibidores para outras RIPs [40]. Contudo, esses inibidores projetados não foram eficazes.

O GA(9-DA)GA 2'-OMe cíclico, referido como 9-DA, é o inibidor análogo do estado de transição utilizado no estudo dessa dissertação. Mimetizador do estado de transição da 2'-desoxiadenosina, o 9-DA consiste em uma sequência de tetranucleotídeos que se assemelha a alça SRL do motivo GAGA, do rRNA natural [44], com a adenina suscetível a RTA substituída pelo mimetizador DADMe-Immucillin-A e metilação nas hidroxilas das riboses. No entanto, esse mimetizador não é um bom inibidor competitivo para a RTA, pois liga-se apenas 320 vezes mais forte que o substrato e tão somente em pH próximo de 4,0 (não sendo eficiente em pH neutro).

Contudo, estudos sobre Análogos do Estado de Transição forneceram pistas muito úteis sobre o mecanismo de reação e sobre os resíduos catalíticos [44]. Foi sugerido, bem como nos Análogos de Substrato, uma ligação de empilhamento π para a adenina do substrato natural com os resíduos Tyr80 e Tyr123, uma forte ligação de hidrogênio entre a Arg180 e a adenina também foi proposta. Na estrutura cristalina, uma potencial molécula de água catalítica foi identificada pela primeira vez, encontrada bem posicionada entre Glu177 e o carbono reativo do substrato. Argumentou-se que o Glu177 atua como a base no mecanismo catalítico para ativar a molécula de água de ataque [44].

3.2.3 Análogos de Produto

A adenina livre é um dos produtos da reação de depurinação catalisada pela RTA. Sabendo que essa toxina possui um sítio ativo específico da adenina 4324, foram explorados vários inibidores compostos de anel único que imitam a porção adenina do substrato natural [55, 56], isto é, o produto de adenina da reação. No entanto, nenhum desses inibidores foi considerado eficaz contra a ricina, por apresentarem pobre interação eletrostática com o local ativo da RTA. Em geral, os inibidores análogos de produtos não foram capazes de revelar informações úteis sobre a ligação natural do substrato da RTA, tão pouco sobre o mecanismo de reação.

3.3 Mecanismo de Ação da RTA

Embora o entendimento completo do mecanismo de reação catalisada pela ricina ainda não tenha sido obtido, alguns mecanismos plausíveis foram propostos e todos eles partilham comumente de algumas características, a citar: (i) participação de uma molécula de água no mecanismo, (ii) ativação da molécula de água gerando um OH^- nucleófilo, por meio de uma desprotonação por um resíduo de aminoácido do domínio catalítico, (iii) protonação da base de saída e (iv) formação do íon oxocarbênio no intermediário de transição.

Existem dois mecanismos amplamente aceitos pela literatura. O primeiro, proposto por Lord e colabores [5], Figura 3.5, sugere-se que o átomo N3 da base é protonado pela Arg180 para facilitar a clivagem da ligação C1-N9. O íon oxocarbênio resultante, ou seja, o intermediário de transição é estabilizado por sua interação de emparelhamento de íons com Glu177. Uma molécula de água é ativada pela Arg180, que extrai um próton e produz o nucleófilo OH^- . Esse, por sua vez, ataca o íon oxocarbênio para completar a reação. Esse mecanismo foi proposto com base em experimentos de mutagênese dirigida [42] e as estruturas cristalinas de análogos de substrato ligados a ricina [16].

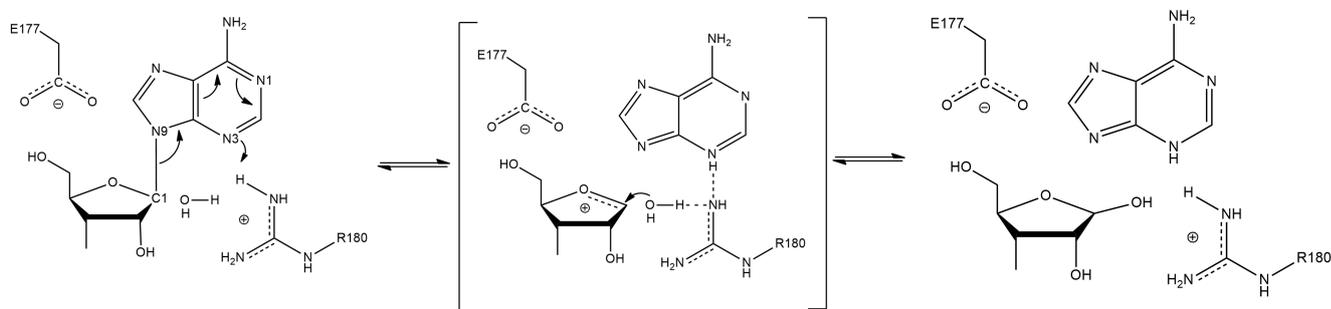


Figura 3.5: (A) Mecanismo de ação da RTA proposto por Lord e colaboradores [5].

Fonte: Ilustração desenvolvida pela autora.

No segundo mecanismo proposto por Schramm e colaboradores [44], Figura 3.6, sugere-se que a base é protonada pela Arg180 em N3, da mesma forma que o primeiro mecanismo. No entanto, nesse mecanismo o Glu177 atua como o gerador de nucleófilo, ativando a água catalítica abstraindo um próton, resultando na formação de ácido glutâmico e de um íon hidroxila. A reação é concluída quando ocorre o ataque em C1 pela hidroxila.

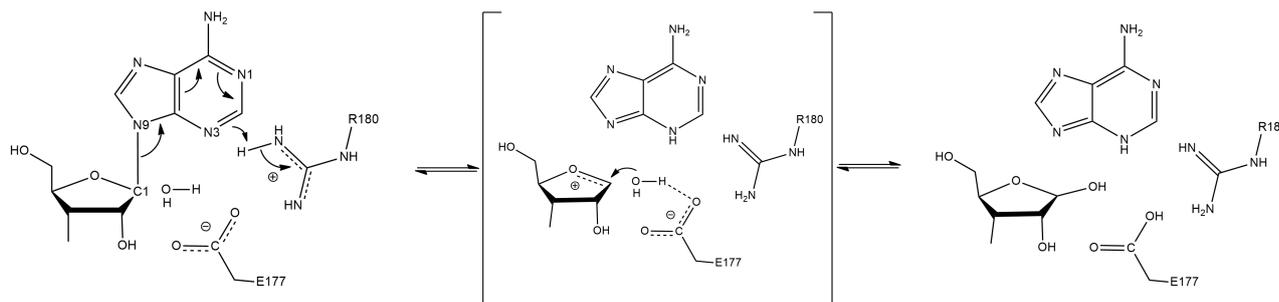


Figura 3.6: Mecanismo de ação da RTA proposto por Schramm e colaboradores [44].

Fonte: Ilustração desenvolvida pela autora.

Evidências de experimentos de efeitos isotópicos cinéticos [44] sugerem que o Glu177 está posicionado para ativar a água em vez de desempenhar o papel de estabilizar o intermediário catiônico oxocarbênio. Esses mecanismos são especulativos, constituídos por resultados experimentais de dispersão, mutagênese, efeito isotópico cinético e difração, cujas conclusões competem entre si. Ao mesmo modo que eles fornecem pistas inestimáveis para a composição do domínio catalítico, o estado de protonação da base, a natureza do estado de transição, além de informações a cerca de resíduos de aminoácidos plausíveis que podem atuar como geradores de nucleófilos.

3.4 Simulação Molecular

A simulação molecular é capaz de prever o comportamento da matéria fornecendo detalhes em nível atômico de sistemas biológicos ou químicos. Para a compreensão das propriedades que originam-se da estrutura eletrônica são necessários métodos de Mecânica Quântica. Esse, por sua vez, são fundamentados em pressupostos teóricos da física quântica. No entanto, a aplicação da mecânica quântica é limitada pelo tamanho do sistema. Quando os fenômenos estruturais são o único foco de um estudo, pode-se utilizar métodos baseados na Mecânica Molecular, tais como a Dinâmica Molecular. Esses, utilizam pressupostos teóricos da física clássica e os átomos são as unidades mínimas para descrever o comportamento da matéria.

3.4.1 Dinâmica Molecular

A Dinâmica Molecular (DM) é compreendida como uma das técnicas computacionais mais versáteis para o estudo de macromoléculas biológicas [57]. A estrutura e função das

biomoléculas são rotineiramente investigados por simulações de DM. Sua aplicação no planejamento de fármacos é de extrema relevância, visto que, por meio da DM pode-se melhorar a interação receptor-ligante, reforçando a complementaridade entre eles [58]. Além disso, a incorporação de moléculas de solvente nas simulações de sistemas receptor-ligante é extremamente importante na compreensão do papel da água e seus efeitos nos complexos proteína-inibidor [58].

A DM determina o movimento das partículas de qualquer sistema, do qual se conhecem o potencial de interação entre as partículas e as equações que regem seu movimento. Fundamentada nos princípios da Mecânica Clássica, a DM permite, portanto, estudar a evolução temporal dos átomos individuais que compõem o sistema e, por meio das sequências de posições geradas é possível determinar as propriedades macroscópicas de interesse com a aplicação da mecânica estatística [59]. As observáveis macroscópicas calculadas pelas funções da mecânica estatística em geral são: pressão, energia interna, volume, temperatura, entropia e energia livre [60].

Nesse método, as partículas são descritas por um conjunto completo de potenciais de interação, Equação 3.2, denominado campo de força [61]. Estes potenciais determinam as forças que atuam em cada partícula e, conseqüentemente, determinarão como o sistema irá evoluir no tempo, para gerar as trajetórias. Com as condições iniciais t_0 , posição e velocidade, pode-se calcular as forças resultantes em cada partícula, Equação 3.1, devido as interações com as demais, e, com as equações de movimento Newtonianas determinar as posições e velocidades em um instante posterior $t_0 + \delta t$. As novas posições são utilizadas para o cálculo de novas forças e então posições e velocidades em $t_0 + 2 \cdot \delta t$. Este procedimento é realizado repetidamente gerando trajetórias moleculares para todo o sistema [59].

$$F_i = -\nabla V_{total}(t) \quad (3.1)$$

sendo,

$$V_{total} = V_{intra} + V_{inter} \quad (3.2)$$

onde, V_{intra} corresponde aos potenciais de interações para os átomos ligados e o V_{inter} para os átomos não ligados. Sendo:

$$V_{intra} = \sum_{lig} k_r (r - r_0)^2 + \sum_{ang} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \frac{1}{2} \sum_{n,diedro} V_n [1 - (-1)^n \cos(\eta\varphi + \gamma_n)] \quad (3.3)$$

e,

$$V_{inter} = \sum_{i,j} 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0 r_{ij}} \quad (3.4)$$

Os potenciais ligados, Equação 3.3, descrevem as deformações moleculares. Onde, o primeiro termo corresponde aos estiramentos de uma ligação química, o segundo e terceiro termos correspondem, respectivamente, as deformações angulares e as deformações dos ângulos diedros. Os estiramentos e deformações angulares são descritos por potenciais harmônicos, onde, os parâmetros r_0 e θ_0 correspondem ao comprimento e ângulo de equilíbrio da ligação, e K_r e K_θ às constantes de força. Essas constantes são obtidas de medidas espectroscópicas ou cálculos quânticos. Já os ângulos diedrais não são adequadamente modelados segundo um potencial harmônico, uma vez que são contínuos em todo intervalo $[0, 2\pi]$. Os parâmetros η , V e γ são respectivamente, a fase da função, a constante de força diedral e a fase do ângulo.

Os potenciais não ligados, Equação 3.4, consistem na soma das interações de van der Waals e eletrostáticas entre pares de átomo de distintas moléculas, i e j . Os potenciais são representados pelos potenciais de Lennard-Jones e Coulomb, primeiro e segundo termo, respectivamente. Os parâmetros ε_{ij} , σ_{ij} e r_{ij} do termo de Lennard-Jones são, respectivamente, a profundidade do poço de energia potencial, a distância de equilíbrio e a distância entre as cargas. No caso do termo de Coulomb, q_i e q_j correspondem a magnitude das cargas pontuais de cada átomo, r_{ij} a distância entre as cargas e ε_0 a permissividade do espaço livre.

Ademais, existem inúmeros campos de força desenvolvidos por diferentes grupos de pesquisa no mundo. Dentre os campos de força bem estabelecidos e usados para biomoléculas em geral destacam-se o AMBER, o GROMOS e o CHARMM [59]. E, para simular um sistema por meio de DM, além do campo de força, são necessárias algumas técnicas específicas que incluem: condições periódicas de contorno, raio de corte para as interações de longo alcance, tempo de integração das equações de movimento, controle de temperatura e pressão (termostato e barostato).

3.4.2 Descritores de Reatividade

Embora a dinâmica molecular seja uma ferramenta importante na exploração de relevantes questões biológicas, ela negligencia contribuições pertinentes provenientes da estrutura eletrônica das moléculas. Essas, por sua vez, podem ser tratadas com uso de métodos de química quântica. Dentro dessa conjuntura, Descritores de Reatividade (DRs) baseados em variáveis de resposta da densidade/energia eletrônica, vêm se mostrando nas últimas duas

décadas um caminho para o estudo de sistemas biológicos [62, 63]. Os DRs são porções matematicamente bem definidas dentro da Teoria Funcional da Densidade Conceitual (CDFT, do inglês *Conceptual Density Functional Theory*), essa, fornece aos químicos conceitos bem estabelecidos que contribuem para a compreensão qualitativa e a previsão quantitativa da reatividade química [64].

A CDFT descreve conceitos de reatividade de dureza e moleza química de Pearson, eletronegatividade, susceptibilidade de ataques eletrofílicos e nucleofílicos, entre alguns outros conceitos [65, 66], sendo empregada com sucesso no estudo teórico de reações envolvendo moléculas comuns a química orgânica [64]. Suas aplicações em sistemas biológicos é mais incipiente e podem ser observadas pela literatura na forma de estudos de protonação [67–69], predição de posição de ligantes em proteínas [70, 71] e regioseletividade de reações enzimáticas [72–74].

Em uma reação química, uma molécula tem seu número de elétrons aumentados (ataque nucleofílico) ou diminuídos (ataque eletrofílico). Além disso, o potencial externo sentido pelos elétrons da molécula muda, uma vez que agora esses elétrons além de serem atraídos pelo núcleo da molécula serão repelidos pelos elétrons do reagente de ataque. Portanto, a susceptibilidade de uma molécula a reações químicas é determinada por sua resposta a mudanças no número de elétrons e no potencial externo. Dessa forma, os descritores globais medem a suscetibilidade geral a ataques eletrofílicos ou nucleofílicos [75], polarizabilidade e interações eletrostáticas [76]. Já os descritores locais indicam onde uma molécula é mais suscetível a diferentes tipos de reagentes, ou seja, são indicadores de regioseletividade capazes de determinar átomos, grupos funcionais ou ligações que são mais reativos.

O principal DR local para entender a regioseletividade das reações é a função de Fukui. Definida como a derivada da densidade eletrônica em relação ao número de elétrons, Equação 3.5.

$$f(r) = \left(\frac{\partial \rho(r)}{\partial N} \right)_v \quad (3.5)$$

Esse descritor atinge seu máximo em regiões onde a densidade eletrônica tende a se concentrar conforme uma influência externa nucleofílica, eletrofílica ou radicalar [77]. A função de Fukui é dividida em dois outros descritores a função Fukui esquerda (f^-) e a função Fukui direita (f^+), sendo o primeiro específico a suscetibilidade a ataque eletrofílico (SAE), Equação 3.6, e o segundo a suscetibilidade a ataque nucleofílico (SAN), Equação 3.7. Assim, para a aproximação do orbital congelado o SAE é aproximado pela densidade do HOMO e o SAN

pela densidade do LUMO.

$$SAE = f_k^- = \sum_{v \in k}^{OA} |C_{vHOMO}|^2 + \sum_{\mu \neq v}^{OA} |C_{vHOMO} \cdot C_{\mu HOMO}| S_{\mu v} \quad (3.6)$$

$$SAN = f_k^+ = \sum_{v \in k}^{OA} |C_{vLUMO}|^2 + \sum_{\mu \neq v}^{OA} |C_{vLUMO} \cdot C_{\mu LUMO}| S_{\mu v} \quad (3.7)$$

Os valores das funções são atribuídos para cada centro atômico k , da molécula, como a soma dos coeficientes quadrados dos orbitais atômicos (OA) que compõe o HOMO ou LUMO, mais o produto vetorial desses coeficientes com o elemento correspondente de matriz de sobreposição atômica ($S_{\mu v}$).

Já os descritores de dureza local identificam as interações duro-duro. Estas, são cruciais na descrição de processos de catálise enzimática como a transferência de grupos com alta densidade de carga, a citar: íons próton, hidreto e fosfatos. Com os DRs de dureza local pode-se estimar as interações controladas por carga nos sítios ativos, uma vez que, esse tipo de interação são pouco polarizáveis e as interação são de natureza eletrostática e de van der Waals [78].

A dureza local possui várias equações de trabalho [79] que podem ser usadas de forma confiáveis para calculá-la. Neste trabalho utilizamos a equação conhecida como potencial Fukui, Equação 3.8.

$$H_K = \sum_{l \neq k}^{atomos} \frac{f^-(l)}{R_{kl}} \quad (3.8)$$

A definição para este descritor se dá pela aproximação da densidade de elétrons pela função de Fukui à esquerda, pois essa contém a densidade de elétrons mais propensa a interagir. O cálculo da dureza local é definido em um centro atômico k pela soma da densidade de elétrons para cada centro atômico l dividido por sua distância euclidiana R_{kl} . Essa equivalência com a dureza é possível quando os núcleos atômicos aproximam-se de zero, $r \rightarrow 0$, representando a variação da reatividade com a variação do potencial externo.

Referências

- [1] F. Stirpe, "Ribosome-inactivating proteins," *Toxicon*, vol. 44, no. 4, pp. 371–383, 2004.
- [2] A. Di Maro, L. Citores, R. Russo, R. Iglesias, and J. M. Ferreras, "Sequence comparison and phylogenetic analysis by the Maximum Likelihood method of ribosome-inactivating proteins from angiosperms," *Plant molecular biology*, vol. 85, no. 6, pp. 575–588, 2014.
- [3] T. Girbés, J. M. Ferreras, F. J. Arias, and F. Stirpe, "Description, distribution, activity and phylogenetic relationship of ribosome-inactivating proteins in plants, fungi and bacteria," *Mini reviews in medicinal chemistry*, vol. 4, no. 5, pp. 461–476, 2004.
- [4] M. J. Walsh, J. E. Dodd, and G. M. Hautbergue, "Ribosome-inactivating proteins: Potent poisons and molecular tools," *Virulence*, vol. 4, no. 8, pp. 774–784, 2013.
- [5] J. M. Lord, L. M. Roberts, and J. D. Robertus, "Ricin: structure, mode of action, and some current applications," *The FASEB journal*, vol. 8, no. 2, pp. 201–208, 1994.
- [6] Y. C. Chen and C. Lim, "Predicting RNA-binding sites from the protein structure based on electrostatics, evolution and geometry," *Nucleic acids research*, vol. 36, no. 5, p. e29, 2008.
- [7] X.-P. Li, J.-C. Chiou, M. Remacha, J. P. Ballesta, and N. E. Tumer, "A two-step binding model proposed for the electrostatic interactions of ricin a chain with ribosomes," *Biochemistry*, vol. 48, no. 18, pp. 3853–3863, 2009.
- [8] D. Lejeune, N. Delsaux, B. Charlotiaux, A. Thomas, and R. Brasseur, "Protein-nucleic acid recognition: statistical analysis of atomic interactions and influence of DNA structure," *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 61, no. 2, pp. 258–271, 2005.
- [9] I. Hirao, K. Madin, Y. Endo, S. Yokoyama, and A. D. Ellington, "RNA aptamers that bind to and inhibit the ribosome-inactivating protein, pepocin," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 7, pp. 4943–4948, 2000.
- [10] Y. Endo, K. Mitsui, M. Motizuki, and K. Tsurugi, "The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. the site and the characteristics of the modification in 28s ribosomal RNA caused by the toxins," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 262, no. 12, pp. 5908–5912, 1987.
- [11] R. B. Wellner, J. F. Hewetson, and M. A. Poli, "Ricin: mechanism of action, detection, and intoxication," *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, vol. 14, no. 4, pp. 483–522, 1995.

- [12] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, *et al.*, "VMD: visual molecular dynamics," *Journal of molecular graphics*, vol. 14, no. 1, pp. 33–38, 1996.
- [13] H. Stillmark, *Ueber Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von Ricinus comm. L. und einigen anderen Euphorbiaceen: Inaugural-Dissertation*. PhD thesis, Dorpat: Schnakenburg, 1888.
- [14] Y. Endo and K. Tsurugi, "The RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. The characteristics of the enzymatic activity of ricin A-chain with ribosomes and with rRNA.," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 263, no. 18, pp. 8735–8739, 1988.
- [15] A. Frankel, P. Welsh, J. Richardson, and J. D. Robertus, "Role of arginine 180 and glutamic acid 177 of ricin toxin A chain in enzymatic inactivation of ribosomes.," *Molecular and cellular biology*, vol. 10, no. 12, pp. 6257–6263, 1990.
- [16] A. F. Monzingo and J. D. Robertus, "X-ray analysis of substrate analogs in the ricin A-chain active site," *Journal of molecular biology*, vol. 227, no. 4, pp. 1136–1145, 1992.
- [17] D. R. Franz and N. K. Jaax, "Ricin toxin," *Medical aspects of chemical and biological warfare*, vol. 3, pp. 631–642, 1997.
- [18] W. Montfort, J. E. Villafranca, A. F. Monzingo, S. R. Ernst, B. Katzin, E. Rutenber, N. H. Xuong, R. Hamlin, and J. D. Robertus, "The three-dimensional structure of ricin at 2.8 Å," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 262, no. 11, pp. 5398–5403, 1987.
- [19] E. Rutenber, B. J. Katzin, S. Ernst, E. J. Collins, D. Mlsna, M. P. Ready, and J. D. Robertus, "Crystallographic refinement of ricin to 2.5 Å," *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 10, no. 3, pp. 240–250, 1991.
- [20] B. J. Katzin, E. J. Collins, and J. D. Robertus, "Structure of ricin a-chain at 2.5 Å," *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 10, no. 3, pp. 251–259, 1991.
- [21] D. Mlsna, A. F. Monzingo, B. J. Katzin, S. Ernst, and J. D. Robertus, "Structure of recombinant ricin A chain at 2.3 Å," *Protein Science*, vol. 2, no. 3, pp. 429–435, 1993.
- [22] S. A. Weston, A. D. Tucker, D. R. Thatcher, D. J. Derbyshire, and R. A. Pauptit, "X-ray structure of recombinant ricin A-chain at 1.8 Å resolution," *Journal of molecular biology*, vol. 244, no. 4, pp. 410–422, 1994.
- [23] S. Olsnes, C. FERNANDEZ-PUENTES, L. Carrasco, and D. Vazquez, "Ribosome Inactivation by the Toxic Lectins Abrin and Ricin: Kinetics of the Enzymic Activity of the Toxin A-Chains," *European journal of biochemistry*, vol. 60, no. 1, pp. 281–288, 1975.

- [24] S. Olsnes, "The history of ricin, abrin and related toxins," *Toxicon*, vol. 44, no. 4, pp. 361–370, 2004.
- [25] J. L. Lewis, K. A. Shields, and D. C. Chong, "Detection and quantification of ricin-mediated 28S ribosomal depurination by digital droplet PCR," *Analytical biochemistry*, vol. 563, pp. 15–19, 2018.
- [26] R. Falach, A. Sapoznikov, Y. Gal, O. Israeli, M. Leitner, N. Seliger, S. Ehrlich, C. Kronman, and T. Sabo, "Quantitative profiling of the in vivo enzymatic activity of ricin reveals disparate depurination of different pulmonary cell types," *Toxicology letters*, vol. 258, pp. 11–19, 2016.
- [27] N. Sowa-Rogozińska, H. Sominka, J. Nowakowska-Gołacka, K. Sandvig, and M. Słomińska-Wojewódzka, "Intracellular transport and cytotoxicity of the protein toxin ricin," *Toxins*, vol. 11, no. 6, p. 350, 2019.
- [28] S. Olsnes, K. Refsnes, and A. Pihl, "Mechanism of action of the toxic lectins abrin and ricin," *Nature*, vol. 249, no. 5458, pp. 627–631, 1974.
- [29] S. Magnusson, R. Kjekken, and T. Berg, "Characterization of two distinct pathways of endocytosis of ricin by rat liver endothelial cells," *Experimental cell research*, vol. 205, no. 1, pp. 118–125, 1993.
- [30] N. Sphyris, J. M. Lord, R. Wales, and L. M. Roberts, "Mutational analysis of the Ricinus lectin B-chains galactose-binding ability of the 2 subdomain of Ricinus communis agglutinin B-chain," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, no. 35, pp. 20292–20297, 1995.
- [31] K. Sandvig, S. OLSNES, and A. PIHL, "Interactions between Abrus Lectins and Sephadex Particles Possessing Immobilized Desialylated Fetuin: Model Studies of the Interaction of Lectins with Cell Surface Receptors," *European Journal of Biochemistry*, vol. 88, no. 1, pp. 307–313, 1978.
- [32] K. Sandvig and B. Van Deurs, "Membrane traffic exploited by protein toxins," *Annual review of cell and developmental biology*, vol. 18, no. 1, pp. 1–24, 2002.
- [33] B. Van Deurs, T. Tønnessen, O. Petersen, K. Sandvig, and S. Olsnes, "Routing of internalized ricin and ricin conjugates to the Golgi complex.," *The Journal of cell biology*, vol. 102, no. 1, pp. 37–47, 1986.

- [34] B. Van Deurs, K. Sandvig, O. W. Petersen, S. Olsnes, K. Simons, and G. Griffiths, "Estimation of the amount of internalized ricin that reaches the trans-Golgi network," *The Journal of cell biology*, vol. 106, no. 2, pp. 253–267, 1988.
- [35] J. Audi, M. Belson, M. Patel, J. Schier, and J. Osterloh, "Ricin poisoning: a comprehensive review," *Jama*, vol. 294, no. 18, pp. 2342–2351, 2005.
- [36] R. A. Spooner, P. D. Watson, C. J. Marsden, D. C. Smith, K. A. Moore, J. P. Cook, J. M. Lord, and L. M. Roberts, "Protein disulphide-isomerase reduces ricin to its A and B chains in the endoplasmic reticulum," *Biochemical Journal*, vol. 383, no. 2, pp. 285–293, 2004.
- [37] R. B. Freedman, T. R. Hirst, and M. F. Tuite, "Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding," *Trends in biochemical sciences*, vol. 19, no. 8, pp. 331–336, 1994.
- [38] P. T. Richardson, M. Westby, L. M. Roberts, J. H. Gould, A. Colman, and J. M. Lord, "Recombinant proricin binds galactose but does not depurinate 28S ribosomal RNA," *FEBS letters*, vol. 255, no. 1, pp. 15–20, 1989.
- [39] J. C. Simpson, L. M. Roberts, K. Römisch, J. Davey, D. H. Wolf, and J. M. Lord, "Ricin A chain utilises the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter the cytosol of yeast," *FEBS letters*, vol. 459, no. 1, pp. 80–84, 1999.
- [40] M. B. Sturm, S. Roday, and V. L. Schramm, "Circular DNA and DNA/RNA hybrid molecules as scaffolds for ricin inhibitor design," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 129, no. 17, pp. 5544–5550, 2007.
- [41] J. A. Chaddock and L. M. Roberts, "Mutagenesis and kinetic analysis of the active site Glu177 of ricin A-chain," *Protein Engineering, Design and Selection*, vol. 6, no. 4, pp. 425–431, 1993.
- [42] M. P. Ready, Y. Kim, and J. D. Robertus, "Site-directed mutagenesis of ricin A-chain and implications for the mechanism of action," *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 10, no. 3, pp. 270–278, 1991.
- [43] J. L. Bradley and P. M. McGUIRE, "Site-directed mutagenesis of ricin A chain Trp 211 to Phe," *International journal of peptide and protein research*, vol. 35, no. 4, pp. 365–366, 1990.
- [44] M.-C. Ho, M. B. Sturm, S. C. Almo, and V. L. Schramm, "Transition state analogues in structures of ricin and saporin ribosome-inactivating proteins," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 106, no. 48, pp. 20276–20281, 2009.

- [45] J. D. Robertus and A. F. Monzingo, "The structure of ribosome inactivating proteins.," *Mini reviews in medicinal chemistry*, vol. 4, no. 5, pp. 477–486, 2004.
- [46] P. J. Hajduk, J. R. Huth, and S. W. Fesik, "Druggability indices for protein targets derived from NMR-based screening data," *Journal of medicinal chemistry*, vol. 48, no. 7, pp. 2518–2525, 2005.
- [47] A. T. Laurie and R. M. Jackson, "Q-Sitefinder: an energy-based method for the prediction of protein–ligand binding sites," *Bioinformatics*, vol. 21, no. 9, pp. 1908–1916, 2005.
- [48] P. G. Wahome, Y. Bai, L. M. Neal, J. D. Robertus, and N. J. Mantis, "Identification of small-molecule inhibitors of ricin and shiga toxin using a cell-based high-throughput screen," *Toxicon*, vol. 56, no. 3, pp. 313–323, 2010.
- [49] V. L. Schramm, "Enzymatic transition states and transition state analog design," *Annual review of biochemistry*, vol. 67, no. 1, pp. 693–720, 1998.
- [50] X.-Y. Chen, P. J. Berti, and V. L. Schramm, "Ricin A-chain: kinetic isotope effects and transition state structure with stem-loop RNA," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 122, no. 8, pp. 1609–1617, 2000.
- [51] X.-Y. Chen, T. M. Link, and V. L. Schramm, "Inhibition of Ricin by an RNA Stem-Loop Containing a Ribo-Oxocarbenium Mimic," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 118, no. 12, pp. 3067–3068, 1996.
- [52] X.-Y. Chen, T. M. Link, and V. L. Schramm, "Ricin A-chain: Kinetics, mechanism, and RNA stem-loop inhibitors," *Biochemistry*, vol. 37, no. 33, pp. 11605–11613, 1998.
- [53] S. Roday, T. Amukele, G. B. Evans, P. C. Tyler, R. H. Furneaux, and V. L. Schramm, "Inhibition of ricin A-chain with pyrrolidine mimics of the oxocarbenium ion transition state," *Biochemistry*, vol. 43, no. 17, pp. 4923–4933, 2004.
- [54] K. S. Tanaka, X.-Y. Chen, Y. Ichikawa, P. C. Tyler, R. H. Furneaux, and V. L. Schramm, "Ricin A-chain inhibitors resembling the oxocarbenium ion transition state," *Biochemistry*, vol. 40, no. 23, pp. 6845–6851, 2001.
- [55] X. Yan, T. Hollis, M. Svinth, P. Day, A. F. Monzingo, G. W. Milne, and J. D. Robertus, "Structure-based identification of a ricin inhibitor," *Journal of molecular biology*, vol. 266, no. 5, pp. 1043–1049, 1997.

- [56] D. J. Miller, K. Ravikumar, H. Shen, J.-K. Suh, S. M. Kerwin, and J. D. Robertus, "Structure-based design and characterization of novel platforms for ricin and shiga toxin inhibition," *Journal of medicinal chemistry*, vol. 45, no. 1, pp. 90–98, 2002.
- [57] T. Hansson, C. Oostenbrink, and W. van Gunsteren, "Molecular dynamics simulations," *Current opinion in structural biology*, vol. 12, no. 2, pp. 190–196, 2002.
- [58] H. Alonso, A. A. Bliznyuk, and J. E. Gready, "Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design," *Medicinal research reviews*, vol. 26, no. 5, pp. 531–568, 2006.
- [59] N. H. Morgon, *Métodos de química teórica e modelagem molecular*. Editora Livraria da Física, 2007.
- [60] A. M. Namba, V. B. da Silva, and C. Da Silva, "Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos," *Eclética Química*, vol. 33, no. 4, pp. 13–24, 2008.
- [61] T. Ackermann, C. Brooks III, M. Karplus, and B. Pettitt, "Proteins: a theoretical perspective of dynamics, structure and thermodynamics, volume LXXI," *advances in chemical physics*, John Wiley & Sons, New York, pp. 96–96, 1988.
- [62] M. V. Putz and D. M. P. Mingos, *Applications of density functional theory to biological and bioinorganic chemistry*, vol. 150. Springer, 2013.
- [63] H. W. Qi, M. Karelina, H. J. Kulik, W. Helena, K. Maria, and J. K. Heather, "Quantifying Electronic Effects in QM and QM/MM Biomolecular Modeling with the Fukui Function," vol. 34, no. 1, pp. 81–91, 2017.
- [64] P. Geerlings, F. De Proft, and W. Langenaeker, "Conceptual density functional theory," *Chemical reviews*, vol. 103, no. 5, pp. 1793–1874, 2003.
- [65] R. G. Parr, R. A. Donnelly, M. Levy, and W. E. Palke, "Electronegativity: the density functional viewpoint," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 68, no. 8, pp. 3801–3807, 1978.
- [66] R. G. Parr and W. Yang, "Density functional approach to the frontier-electron theory of chemical reactivity," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 106, no. 14, pp. 4049–4050, 1984.
- [67] G. Roos, N. Foloppe, K. Van Laer, L. Wyns, L. Nilsson, P. Geerlings, and J. Messens, "How thioredoxin dissociates its mixed disulfide," *PLoS Comput Biol*, vol. 5, no. 8, p. e1000461, 2009.

- [68] J. Frau and D. Glossman-Mitnik, "Chemical reactivity theory study of advanced glycation endproduct inhibitors," *Molecules*, vol. 22, no. 2, p. 226, 2017.
- [69] J. Frau, D. Glossman-Mitnik, *et al.*, "Computational Prediction of the Protonation Sites of Ac-Lys-(Ala) n-Lys-NH₂ Peptides Through Conceptual DFT Descriptors," *Molecules (Basel, Switzerland)*, vol. 22, no. 3, p. 458, 2017.
- [70] J. Khandogin and D. M. York, "Quantum descriptors for biological macromolecules from linear-scaling electronic structure methods," *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 56, no. 4, pp. 724–737, 2004.
- [71] J. Faver and K. M. Merz Jr, "Utility of the Hard/Soft Acid-Base Principle via the Fukui Function in Biological Systems," *Journal of chemical theory and computation*, vol. 6, no. 2, pp. 548–559, 2010.
- [72] S. Rabi, A. H. Patel, S. K. Burger, T. Verstraelen, and P. W. Ayers, "Exploring the substrate selectivity of human sEH and M. tuberculosis EHB using QM/MM," *Structural Chemistry*, vol. 28, no. 5, pp. 1501–1511, 2017.
- [73] I. B. Grillo, G. A. Urquiza-Carvalho, J. F. R. Bachega, and G. B. Rocha, "Elucidating Enzymatic Catalysis Using Fast Quantum Chemical Descriptors," *Journal of Chemical Information and Modeling*, vol. 60, no. 2, pp. 578–591, 2020.
- [74] I. B. Grillo, G. A. Urquiza-Carvalho, E. J. F. Chaves, and G. B. Rocha, "Semiempirical methods do Fukui functions: Unlocking a modeling framework for biosystems," *Journal of Computational Chemistry*, vol. 41, no. 9, pp. 862–873, 2020.
- [75] R. G. Pearson, "Absolute electronegativity and hardness: applications to organic chemistry," *The Journal of Organic Chemistry*, vol. 54, no. 6, pp. 1423–1430, 1989.
- [76] A. Vela and J. L. Gazquez, "A relationship between the static dipole polarizability, the global softness, and the fukui function," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 112, no. 4, pp. 1490–1492, 1990.
- [77] K. Fukui, T. Yonezawa, and C. Nagata, "MO-theoretical approach to the mechanism of charge transfer in the process of aromatic substitutions," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 27, no. 6, pp. 54–66, 1997.
- [78] H.-J. Schneider, "Linear free energy relationships and pairwise interactions in supramolecular chemistry," *Chemical Society Reviews*, vol. 23, no. 4, pp. 227–234, 1994.

- [79] P. K. Chattaraj, D. R. Roy, P. Geerlings, and M. Torrent-Sucarrat, "Local hardness: a critical account," *Theoretical Chemistry Accounts*, vol. 118, no. 5-6, pp. 923–930, 2007.

Metodologia

De maneira geral, a metodologia utilizada para a caracterização do sítio ativo da RTA foi executada em quatro etapas principais: (1) preparação da estrutura; (2) dinâmica molecular; (3) análise da trajetória e (4) descritores de reatividade.

4.1 Preparação da estrutura

Uma vez que a ricina tem como alvo uma única ligação glicosídica, encontrada na A4324, um modelo de substrato interessante para a simulação do sítio ativo é o inibidor análogo ao estado de transição, já mencionado anteriormente, 9-DA, proposto por Schramm e colaboradores [1]. Sua estrutura se assemelha a alça SRL do motivo GAGA, do rRNA natural, sendo uma sequência de tetranucleotídeos, com a adenina alvo substituída pelo mimetizador ADMe-Immucillin-A (9-DA) e as riboses metiladas nas hidroxilas, Figura 4.1.

A estrutura cristalográfica de raio-X desse inibidor ligado ao RTA está disponível no PDB com código de entrada 3HIO (PDB ID). A proposta deste trabalho de dissertação foi utilizar tal estrutura de raio-X como base para construir um alvo ativo para o RTA, dessa maneira o bloqueador 9-DA passou por algumas modificações estruturais.

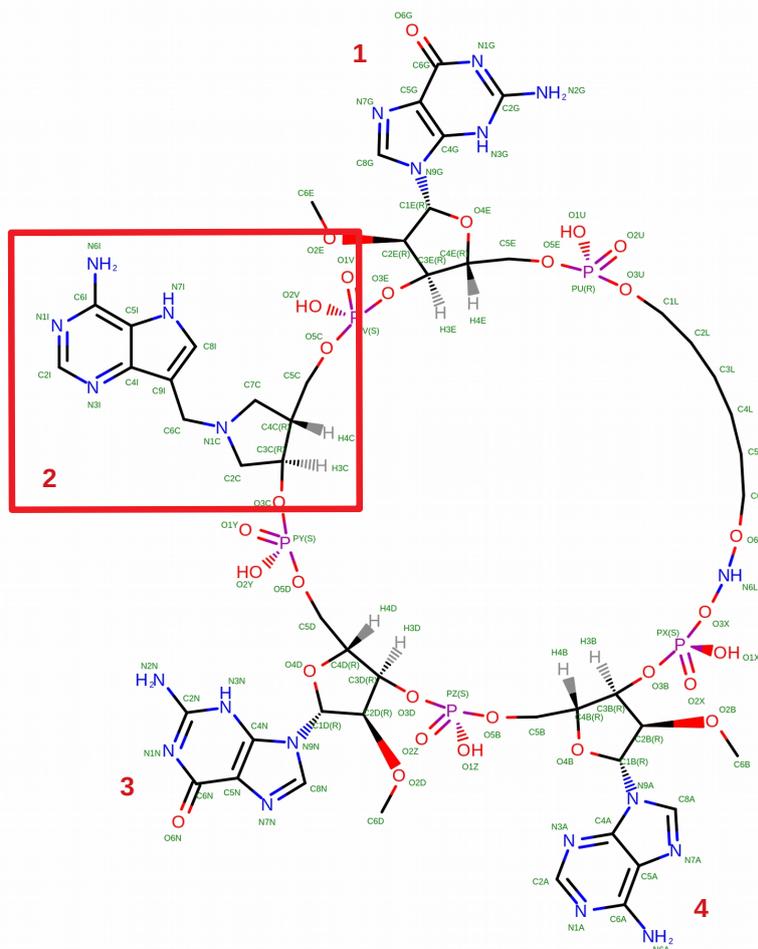


Figura 4.1: Estrutura química do ligante 9-DA, com destaque para o monômero enumerado de 2.

Fonte: Imagem do RCSB PDB [2], PDB ID: 3HIO.

O monômero em destaque é o que confere a ação bloqueadora desse ligante, uma vez que ele se posiciona no lugar da A4324. Desse modo, as modificações necessárias para obter um ligante ativo similar a alça SRL a partir do 9-DA foram:

- A remoção do átomo de carbono **C6C** e posterior conexão do nitrogênio **N1C** ao carbono **C9I**;
- A transformação do átomo de nitrogênio **N1C** em um de carbono;
- A transformação do átomo de carbono **C9I** em um átomo de nitrogênio;
- A transformação do carbono **C7C** em um oxigênio;
- A adição de um átomo de oxigênio ligado ao carbono **C2C**;

- A remoção de todas as metilas ligadas ao oxigênio dos grupos hidroxilas das Riboses. Como a estrutura cristalográfica não possui hidrogênios, apenas removeu-se os átomos de carbono **C6E**, **C6D** e **C6B**.

Com essas edições, foi possível transformar o bloqueador em um substrato predisposto a reagir, de agora em diante mencionado nesse trabalho como C2X. Abaixo segue a imagem do ligante editado com sua a nova nomenclatura de átomos na adenosina alvo.

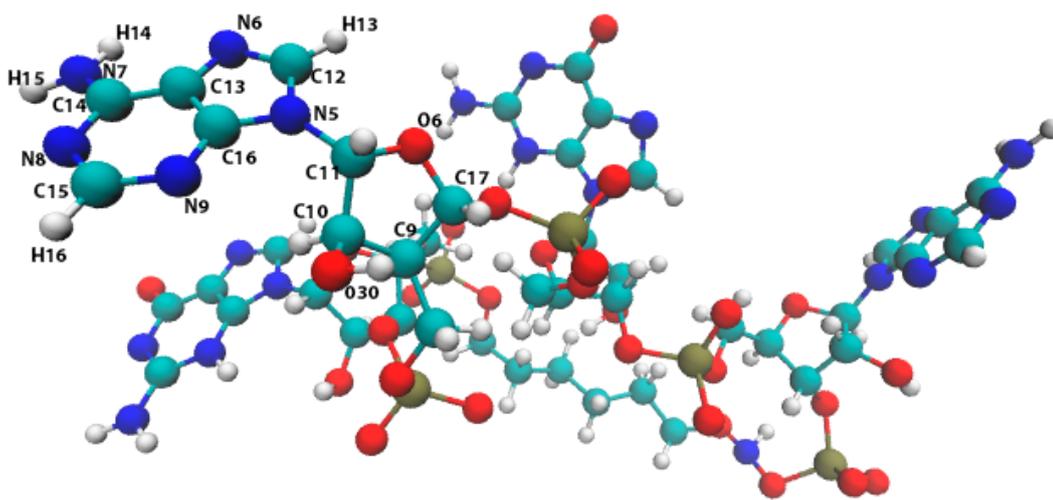


Figura 4.2: Nomenclatura dos átomos do monômero 2 após a edição e parametrização do ligante.

Fonte: Ilustração desenvolvida pela autora, utilizando o software VMD [3] e estrutura tridimensional com código PDB 3HIO.

O ligante C2X ficou apropriadamente posicionado no sítio ativo da RTA, para iniciar os estudos acerca das interações no sítio ativo da RTA. O próprio PDB 3HIO contém a presença de águas cristalográficas no sítio ativo, as quais foram assumidas, *a priori*, como águas catalíticas participantes do ciclo catalítico da RTA [4].

Seguidamente, a adição de hidrogênios a estrutura do completo RTA-C2X foi realizada utilizando o módulo AddH contido no *software* UCSF Chimera [5], considerando o pH fisiológico 7,4.

4.2 Dinâmica Molecular

Após a adição de hidrogênios, o complexo RTA-C2X foi submetido a Dinâmica Molecular, segundo o protocolo de Chaves e colaboradores [6]. Esse passo foi realizado em 7 etapas: (1) parametrização; (2) montagem da caixa de simulação; (3) condições de simulação da dinâmica

molecular; (4) minimização da estrutura de partida; (5) termalização; (6) pressurização e (7) equilíbrio.

Parametrização: Por ser um nucleotídeo, a atribuição de parâmetros e todas as informações de topologia (tipos de átomos, cargas e conectividade) do ligante foi realizada utilizando o CHARMM General Force Field (CGenFF) [7], no servidor online (cgenff.umaryland.edu). Em seguida, o arquivo de parâmetros do C2X foi adicionado ao QwikMD, um plug-in do *software* VMD [3], para ser atrelado a parametrização da proteína RTA, gerado pelo campo de força CHARMM [8]. Ao final, o QwikMD forneceu um arquivo geral PSF (*protein structure file*), com a topologia e parâmetros do ligante, proteína, solvente e sais.

Montagem da Caixa de Simulação: Nessa simulação molecular, imitar o ambiente biológico de forma mais análoga possível é crucial, portanto, no QwikMD, o complexo proteína-ligante foi inserido em uma caixa cúbica com águas do tipo TIP3P (solvente explícito), Figura 4.3. Essa caixa possui uma camada de água de 20 Å do átomo com a maior coordenada em cada direção. Em seguida, para neutralizar a carga total do sistema, foi adicionado cinco íons Na^+ . Por fim, foi adicionado uma concentração do sal NaCl de 0,15 mol/L.

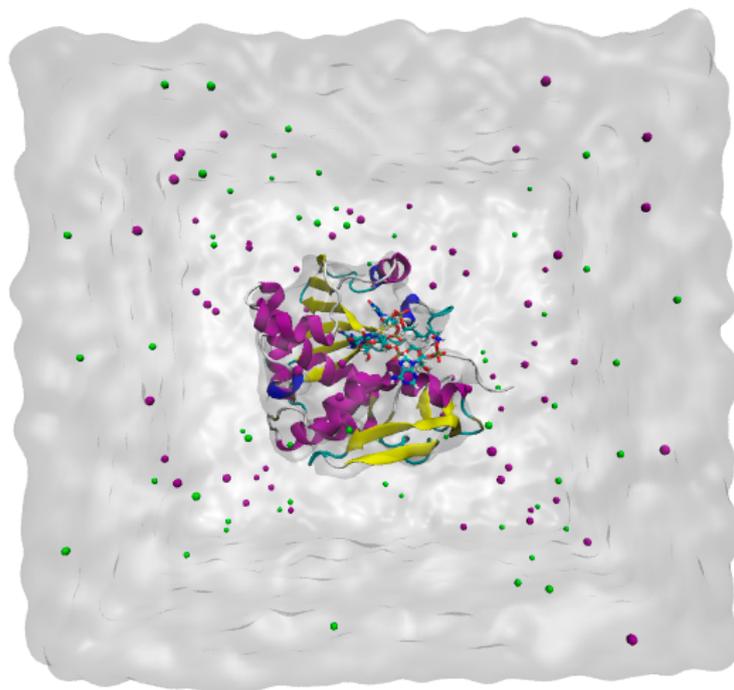


Figura 4.3: Caixa cúbica de simulação. Ao centro da caixa está ilustrado o complexo RTA-C2X codificado de acordo com suas estruturas secundárias. Ao redor do complexo estão as moléculas de água (transparente) e os íons Cl^- (verde) e Na^+ (roxo).

Fonte: Ilustração desenvolvida pela autora, utilizando o software VMD [3] e estrutura tridimensional com código PDB 3HIO.

Condições de Simulação da Dinâmica Molecular: O software utilizado para a simulação clássica das estruturas foi o NAMD v.2.12 [9]. Os parâmetros das condições de simulação foram estabelecidos em um arquivo de configuração com extensão .conf, no qual foram espe-

cificados: condições periódicas de contorno; restrição para vibração da ligação dos átomos de hidrogênio, utilizando o algoritmo SHAKE; interações eletrostáticas, calculadas com o método PME (Particle mesh Ewald) e interações do tipo Van der Waals calculadas num raio de corte de 9 Å para todos os passos da simulação. O cálculo foi realizado com passos de integração de 2 femtossegundos (fs).

Minimização da Estrutura de Partida: A etapa de minimização foi realizada inicialmente por 5000 passos, mantendo apenas a proteína rígida e águas, íons e ligante flexíveis. Em seguida as restrições foram retiradas e realizados 10.000 passos de minimização.

Termalização: Após a minimização, o sistema foi submetido a uma etapa de aquecimento gradual de 0 a 310 K. Esse procedimento foi realizado em três estágios:

(I) 50 picossegundos (ps) de simulação, com aquecimento gradual de 0 a 100 K, aplicando restrições harmônicas no esqueleto peptídico da proteína, com força constante de 30 kcal/mol/Å² nos átomos C α e 10 kcal/mol/Å² nos átomos C e N;

(II) 100 ps de simulação, com aquecimento gradual de 100 a 200 K, aplicando restrições harmônicas com força constante de 20 kcal/mol/Å² nos átomos C α e 5 kcal/mol/Å² nos átomos C e N do *backbone* da proteína;

(III) 200 ps de simulação com aquecimento gradual de 200 a 310 K, aplicando restrições harmônicas mais fracas no *backbone* da proteína, com força constante de 10 kcal/mol/Å² nos átomos C α e 2,5 kcal/mol/Å² nos átomos C e N. Após esse estágio final a temperatura do sistema foi mantida constante utilizando o termostato de Langevin.

Pressurização: Nesta etapa, a temperatura foi mantida constante em 310 K, o sistema foi então submetido a condição de pressão de 1 atm, mantida por meio do barostato de Langevin. Nesse procedimento, as restrições remanescentes dos átomos de C α , C e N do esqueleto peptídico da RTA foram retiradas gradativamente em dois estágios:

(I) 100 ps de simulação, aplicando restrições harmônicas com força constante de 5 kcal/mol/Å² para os átomos de C α e 1,25 kcal/mol/Å² nos átomos C e N;

(II) 200 ps de simulação, com restrição apenas nos átomos de C α , com força constante de 2,5 kcal/mol/Å².

Equilíbrio: Após a etapa de pressurização, o sistema foi conduzido ao protocolo de equilíbrio por 100 nanossegundos (ns), sem restrições, com pressão e temperatura constantes de 1 atm e 310 K, respectivamente, e as coordenadas produzidas foram armazenadas a cada 1 ps.

4.3 Análise da trajetória

A trajetória de 100 ns forneceu um total de 100.000 *frames* e as informações da trajetória foram retiradas por meio da análise de RMSD, ligação de hidrogênio, energia de interação e clusterização, realizadas utilizando o módulo CPPTRAJ [10], incluso na suíte de *softwares* Ambertools 16 [11].

4.4 Descritores de Reatividade

As propriedades de reatividade foram obtidas por meio do cálculo dos descritores implementados no programa PRIMoRDIA [12]. Todos os descritores foram calculados a partir das informações dos cálculos de estrutura eletrônica. O método de estrutura eletrônica utilizado neste trabalho foi o hamiltoniano semi-empírico PM7 [13] com técnica de escalonamento linear de orbitais moleculares localizados MOZYME [14] e o método de solvente implícito COSMO, implementados no programa MOPAC2016 [15].

Referências

- [1] M. B. Sturm, S. Roday, and V. L. Schramm, "Circular dna and dna/rna hybrid molecules as scaffolds for ricin inhibitor design," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 129, no. 17, pp. 5544–5550, 2007.
- [2] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, and P. E. Bourne, "The protein data bank," *Nucleic acids research*, vol. 28, no. 1, pp. 235–242, 2000.
- [3] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, *et al.*, "Vmd: visual molecular dynamics," *Journal of molecular graphics*, vol. 14, no. 1, pp. 33–38, 1996.
- [4] M. J. Lord, N. A. Jolliffe, C. J. Marsden, C. S. Pateman, D. C. Smith, R. A. Spooner, P. D. Watson, and L. M. Roberts, "Ricin," *Toxicological reviews*, vol. 22, no. 1, pp. 53–64, 2003.
- [5] E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, and T. E. Ferrin, "Ucsf chimera—a visualization system for exploratory research and analysis," *Journal of computational chemistry*, vol. 25, no. 13, pp. 1605–1612, 2004.
- [6] E. J. Chaves, I. Q. Padilha, D. A. Araujo, and G. B. Rocha, "Determining the relative binding affinity of ricin toxin a inhibitors by using molecular docking and nonequilibrium work," *Journal of chemical information and modeling*, vol. 58, no. 6, pp. 1205–1213, 2018.
- [7] K. Vanommeslaeghe, E. Hatcher, C. Acharya, S. Kundu, S. Zhong, J. Shim, E. Darian, O. Guvench, P. Lopes, I. Vorobyov, *et al.*, "Charmm general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the charmm all-atom additive biological force fields," *Journal of computational chemistry*, vol. 31, no. 4, pp. 671–690, 2010.
- [8] B. R. Brooks, C. L. Brooks III, A. D. Mackerell Jr, L. Nilsson, R. J. Petrella, B. Roux, Y. Won, G. Archontis, C. Bartels, S. Boresch, *et al.*, "Charmm: the biomolecular simulation program," *Journal of computational chemistry*, vol. 30, no. 10, pp. 1545–1614, 2009.
- [9] J. C. Phillips, R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, C. Chipot, R. D. Skeel, L. Kale, and K. Schulten, "Scalable molecular dynamics with namd," *Journal of computational chemistry*, vol. 26, no. 16, pp. 1781–1802, 2005.
- [10] D. R. Roe and T. E. Cheatham III, "Ptraj and cpptraj: software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data," *Journal of chemical theory and computation*, vol. 9, no. 7, pp. 3084–3095, 2013.

- [11] D. A. Pearlman, D. A. Case, J. W. Caldwell, W. S. Ross, T. E. Cheatham III, S. DeBolt, D. Ferguson, G. Seibel, and P. Kollman, "Amber, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules," *Computer Physics Communications*, vol. 91, no. 1-3, pp. 1-41, 1995.
- [12] I. B. Grillo, G. A. Urquiza-Carvalho, and G. B. Rocha, "Primordia: A software to explore reactivity and electronic structure in large biomolecules," *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2020.
- [13] J. J. Stewart, "Optimization of parameters for semiempirical methods vi: more modifications to the nddo approximations and re-optimization of parameters," *Journal of molecular modeling*, vol. 19, no. 1, pp. 1-32, 2013.
- [14] J. J. Stewart, "Application of localized molecular orbitals to the solution of semiempirical self-consistent field equations," *International Journal of Quantum Chemistry*, vol. 58, no. 2, pp. 133-146, 1996.
- [15] J. J. Stewart, "Stewart computational chemistry," <http://openmopac.net/>, 2007.

Resultados e Discussão

5.1 Dinâmica Molecular

A mobilidade estrutural em uma simulação por DM possui um papel crucial para a interpretação dos dados obtidos, especialmente ao tratar-se de biomoléculas. Dessa forma, neste trabalho foram realizadas análises de *Root Mean Square Deviation* (RMSD), a fim de averiguar a estabilidade estrutural da RTA ao longo da simulação de DM.

O RMSD foi utilizado como análise estatística na simulação em triplicata, sendo aplicado exclusivamente nos átomos do esqueleto peptídico da RTA, empregando a posição inicial como estrutura de referência. Essa análise é uma medida média relativa ao conjunto dos átomos selecionados (esqueleto peptídico), os valores obtidos trazem influencia de diferentes regiões da proteína e indicam o quanto a estrutura da RTA se modificou ao longo da simulação, em relação a estrutura de partida, nesse caso o *frame* 0.

Em ambas as trajetórias, observou-se aumento progressivo do RMSD partindo de 0 até um patamar de aproximadamente 2 Å, Figura 5.1, o que indica a estabilização do sistema. A literatura considera valores até 3 Å [1] aceitáveis, valores acima desse podem indicar perda de estrutura secundária da proteína.

Os resultados dos RMSDs compreendem os microestados obtidos nas etapas de estabilização, podendo ser mais bem observados nos gráficos em histograma.

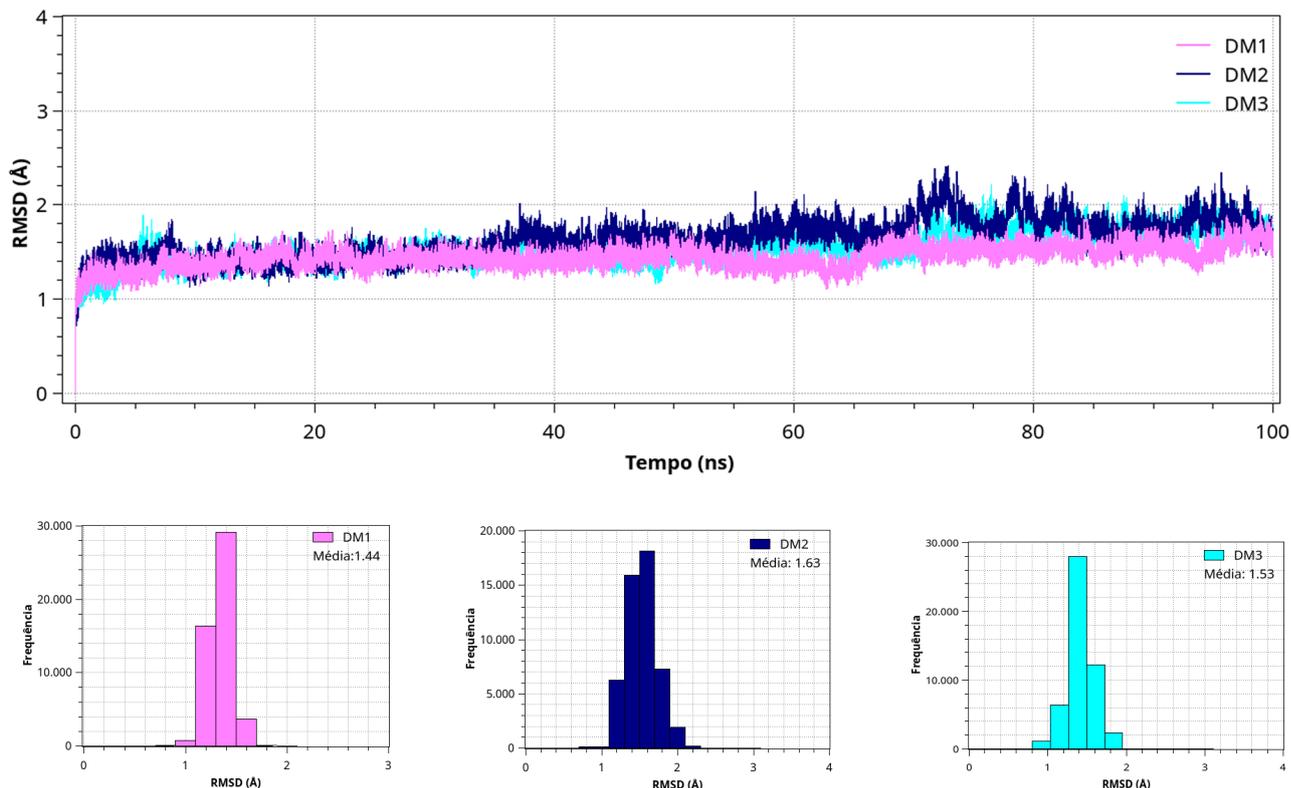


Figura 5.1: RMSD da simulação de dinâmica molecular em triplicata. Em magenta claro a 1^o DM, em azul marinho a 2^o DM e a 3^o DM em ciano claro. Estão ilustradas também a médias das respectivas dinâmicas.

Fonte: Resultado da dissertação, 2020.

Nas três dinâmicas, o tempo usado na simulação forneceu estruturas bem equilibradas, não exprimindo picos ou grandes flutuações. Dentre as três, a primeira dinâmica, intitulada como DM1, gerou menos flutuações (RMSD apresentado em margenta claro). Pode-se observar que a variação da frequência do RMSD da DM1 apresentou uma média de 1,44 Å ao longo do tempo simulado. Por apresentar menor RMSD, essa foi a dinâmica utilizada para os estudos posteriores.

Após averiguar a estabilidade estrutural, o sistema RTA-C2X foi cuidadosamente analisado afim de comparar os resultados obtidos com os padrões de ligação sugeridos pela literatura. Dessa forma, os estudos iniciais foram realizados através dos cálculos de Mecânica Molecular, utilizando a trajetória para extrair informações acerca das ligações de hidrogênio e da energia de interação entre a proteína e o ligante.

Detectou-se um total de 213 ligações de hidrogênio para o complexo RTA-C2X, para um raio de distância de 3 Å e ângulo de ligação de 135°. A análise foi realizada entre cada domínios da RTA com o ligante, Figura 5.2, na qual são apresentadas de forma ilustrativa apenas as ligações de hidrogênios que apresentaram maiores frações de *frames*, ou seja, as que

obtiveram as maiores ocorrências ao decorrer da trajetória.

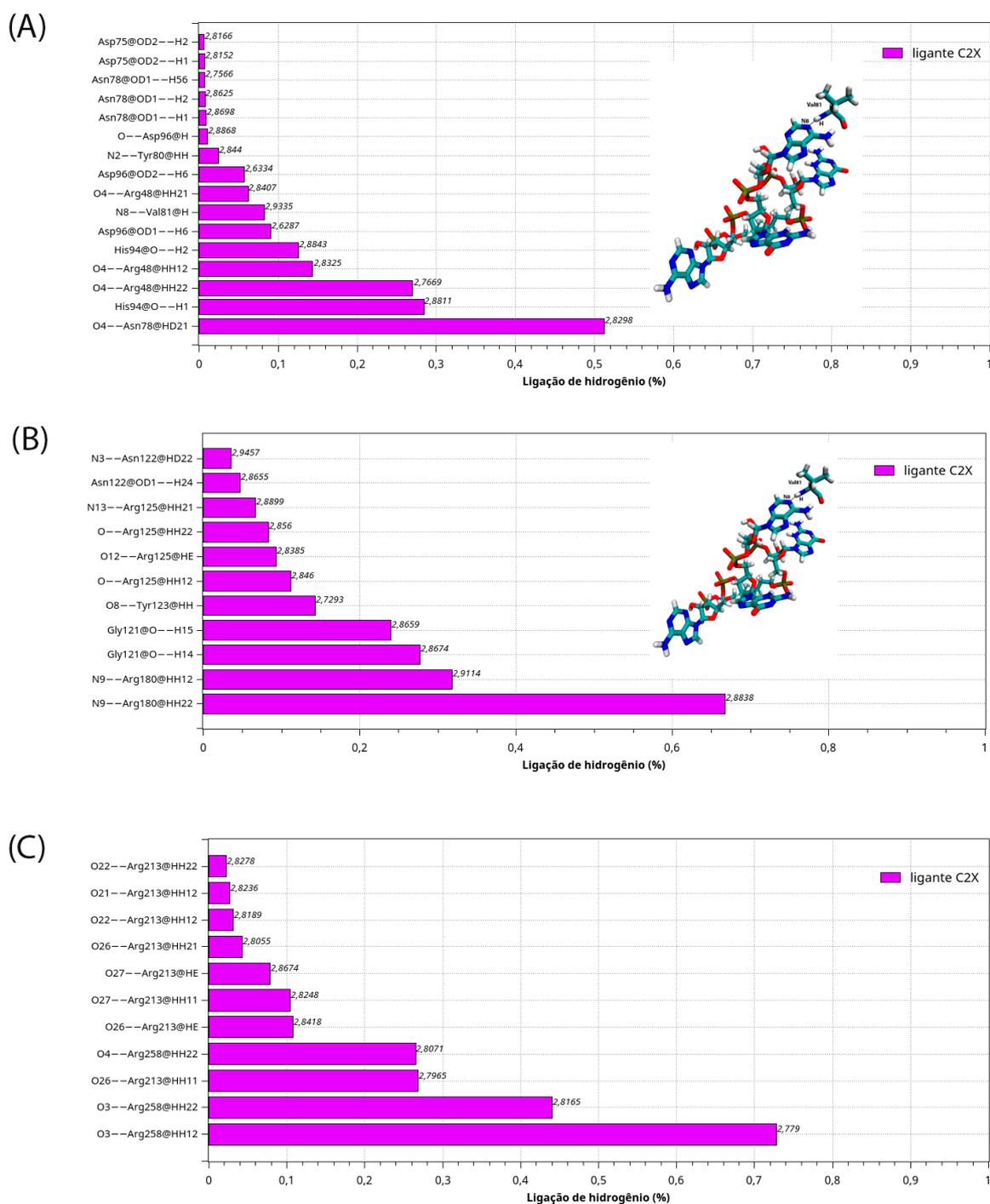


Figura 5.2: (A) Ligações de hidrogênio do domínio I. (B) Ligações do domínio II. (C) Ligações do domínio III. Os átomos ao lado esquerdo do símbolo (- -) são os átomos aceptores de hidrogênio, e os ao lado direito os doadores. O valor médio da distância de ligação de hidrogênio estão indicados ao lado das frações de *frames* correspondentes a presença de ligação de hidrogênio.

Fonte: Resultado da dissertação, 2020.

No domínio I pode-se observar, como sugerido pela literatura [2], que os resíduos Asn78, Asp75 e Asp96 participaram de uma rede de ligações de hidrogênio que inclui suas cadeias laterais de amida e carboxilato. Observou-se, também, uma ligações de hidrogênio no local ativo da RTA por meio do resíduo chave Val81, onde a valina atua como doadora de hidrogênio para o átomo de nitrogênio N8 da adenina alvo. A Tyr80, que é um resíduo sugerido na literatura por participar de interações π com a adenina, forma ligação de hidrogênio com o nitrogênio N2 da guanina, localizada no segundo sítio ativo da RTA. Uma outra ligação de hidrogênio observada neste segundo sítio ativo foi entre o resíduo His94 atuante como aceptor de hidrogênio, alternando entre os hidrogênios H1 e H2 da guanina. Por fim, uma ligação de hidrogênio, variando entre os hidrogênios HH12 e HH22 da Arg48 e o oxigênio O4 do grupo fosfato, foi mensurada ao longo da trajetória de simulação. As ligações de hidrogênio presentes no domínio I da RTA, dos resíduos Tyr80, His94 e Arg48 validadas nesse trabalho, não foram citadas pela literatura.

No que se refere ao domínio II, detectou-se a importante rede de ligações de hidrogênio presente no sítio ativo da RTA através dos resíduos Arg180 e Gly121. A Arg180 atua nessa interação de forma a doar um hidrogênio, alternando entre os hidrogênios HH12 e HH22, ao nitrogênio N9 da adenina, essa ligação é bastante citada na literatura como ativação da adenina. De forma contrária a Arg180, a Gly121 é um aceptor de hidrogênio da adenina, recebendo os hidrogênios H15 e H14. A Tyr123, mencionada na literatura por participar de um empilhamento π com a adenina, forma ligação de hidrogênio com o oxigênio O8 da ribose. Foi possível observar, ainda, uma rede de ligações de hidrogênio entre os resíduos Asn122 e Arg125 com a guanina do segundo sítio ativo, não relatadas na literatura. No entanto, nesse estudo não foi possível observar as ligações de hidrogênio presentes no sítio ativo dos resíduos Glu177 e Glu208 sugeridas por Monzingo e colaboradores [3].

Por fim, no domínio III, não participante do sítio ativo, observou-se a grande interação da RTA com os grupos fosfodiésteres da espinha dorsal do C2X formando fortes ligações de hidrogênio com a Arg258 e a Arg213. Com esse estudo pode-se constatar que o ligante C2X foi capaz de realizar ligações de hidrogênio com os principais resíduos propostas pela literatura [3–6].

Para observarmos como essas ligações se empregavam na trajetória, realizou-se um estudo das ligações de hidrogênio por *frame* ao longo dos 100 ns.

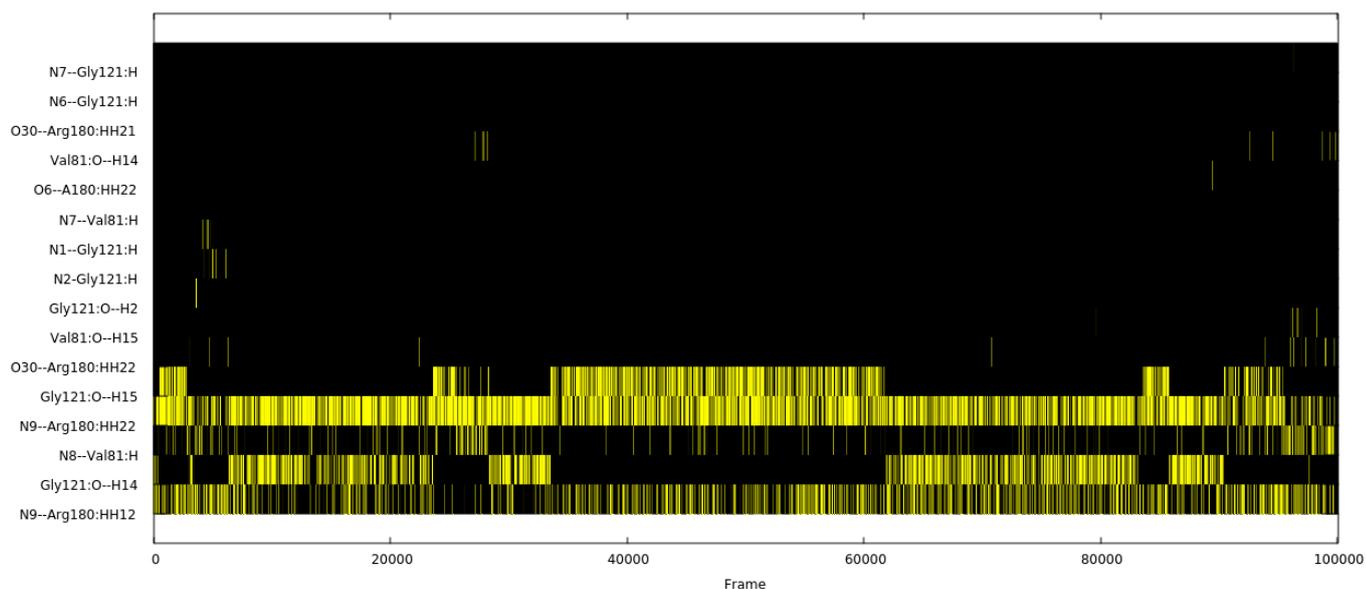


Figura 5.3: Ligações de hidrogênio do sítio ativo da RTA com os resíduos Val81, Arg180 e Gly121.

Fonte: Resultado da dissertação, 2020.

Observou-se na Figura 5.3 que a adenina encontra-se ativada, por meio da ligação de hidrogênio com a Arg180, ao longo de praticamente toda simulação. A ligação de hidrogênio é revesada pelos hidrogênios do grupo amino da Arg180, sendo o HH22 o mais participativo na ligação. As ligações de hidrogênio dos resíduos Gly121 e Val81 já mencionadas anteriormente também estão apresentadas por *frame* na Figura 5.3. É observado, ainda, que as outras ligações de hidrogênio dos resíduos apresentam vida curta, podendo-se assumir que não fornecem estabilidade significativa da interação ligante-proteína.

A força de ligação do C2X à RTA foi investigada por meio de cálculos de Energia de Interação (EI). Essas, são interações clássicas e foram calculadas com o campo de força AMBER.

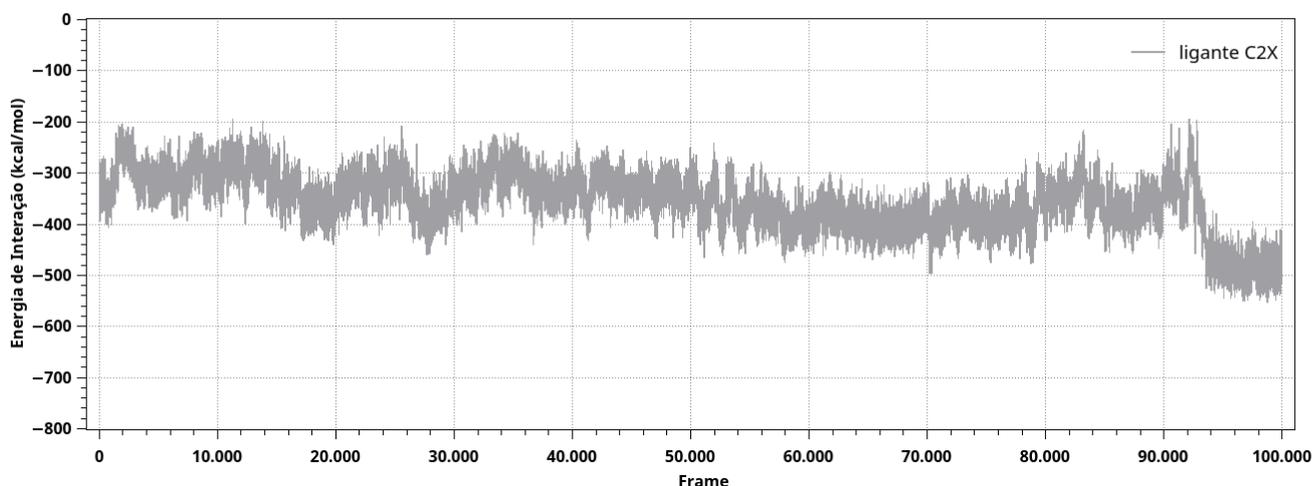


Figura 5.4: Energia de interação total entre o ligante C2X com a RTA.

Fonte: Resultado da dissertação, 2020.

Por meio do gráfico da série temporal da EI apresentado na Figura 5.4 pode-se observar que o ligante C2X apresenta uma forte interação com a RTA, se ligando fortemente com uma EI média total de -350,69 kcal/mol. A EI média total é definida como a média da soma das energias eletrostática e de interação de Van der Waals sobre o tempo total de simulação de 100 ns.

Afim de averiguar as interações específicas do sítio ativo com o ligante C2X, foi realizado cálculo de EI entre a adenosina alvo (adenina mais ribose, ignorando o resto do ligante) e os resíduos Tyr80, Tyr123, Arg180, Glu177, Val81, Gly121 e Glu208, Figura 5.5.

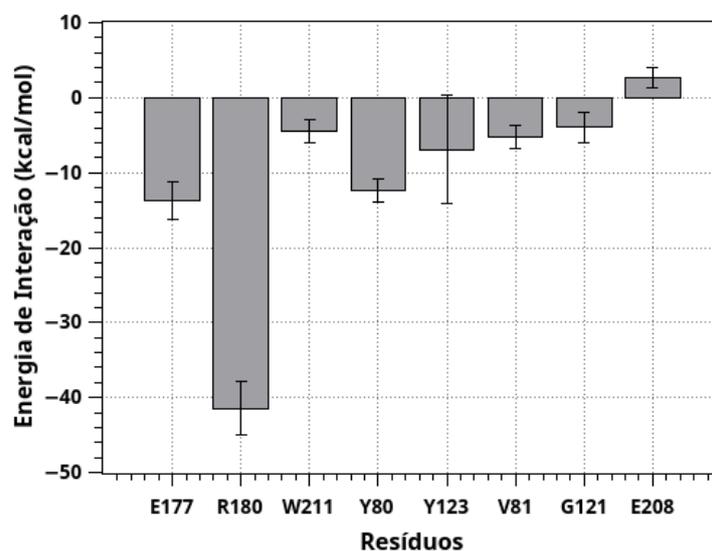


Figura 5.5: Energia de interação entre os resíduos do sítio ativo da RTA com o ligante C2X.

Fonte: Resultado da dissertação, 2020.

Com esse estudo, observou-se que a Arg180 apresentou uma forte energia de interação atrativa de aproximadamente -19,74 kcal/mol. Embora vários papéis tenham sido propostos pela literatura para Arg180, o mais amplamente aceito é o de um doador de ligações de hidrogênio para a posição N9 da adenina [7]. Observou-se, ainda, uma forte interação eletrostática da adenosina com os resíduos Tyr80 e Tyr123, de -8,27 e -6,07 kcal/mol respectivamente. Tal resultado corrobora com a literatura que aponta esses resíduos em uma interação π empilhada com a adenina alvo, desempenhando um papel crucial na ligação do substrato natural ao domínio catalítico da RTA [2, 3, 8]. A Val81, o Gly121 e o Glu208 apresentam energia de interação atrativa com a adenosina de -5,02, -3,58 e -2,62 kcal/mol, respectivamente. Já o Glu177 e o Trp211 apresentam uma interação de repulsão com a adenosina de 4,14 e 0,56 kcal/mol, respectivamente. No que se refere ao Glu177, essa EI pode ser um indicativo de que esse resíduo atue recebendo um próton da água catalítica e não interagindo com o ligante na estabilização do intermediário de transição.s

Afim de uma melhor compreensão do desempenho do Glu177, foram investigadas as moléculas de água presentes em um raio de 3 Å desse resíduo, ao longo da simulação de 100 ns. Foi identificada uma molécula de água catalítica, resíduo 332, a qual permaneceu ao longo de toda simulação orientada entre o carbono C11 da ribose e o Glu177 a uma distância média de 3,2 Å e 1,9 Å, respectivamente, Figura 5.6.

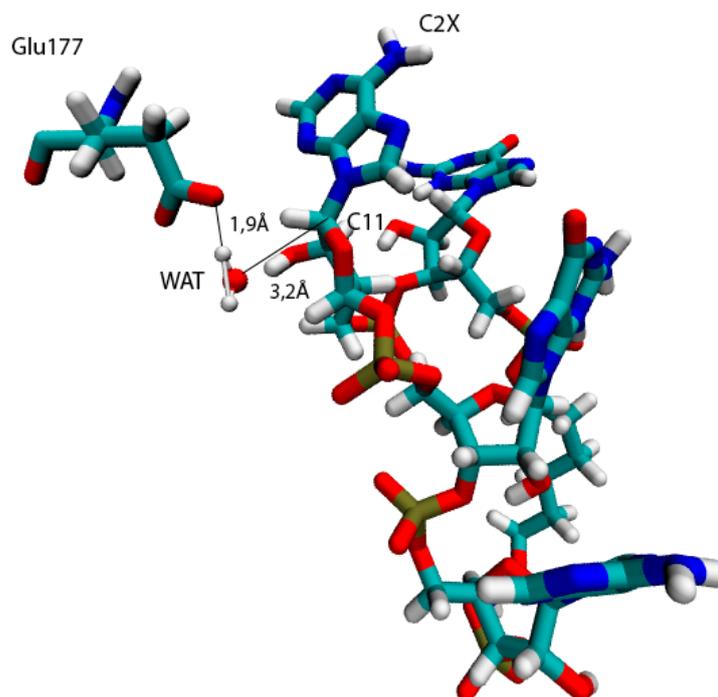


Figura 5.6: Ilustração da água catalítica orientada entre o Glu177 e C11 da adenosina.

Fonte: Resultado da dissertação, 2020. Ilustração desenvolvida pela autora, utilizando o software VMD [9], e estrutura tridimensional com código PDB 3HIO.

Essa água está adequadamente posicionada para um ataque nucleofílico na posição C11 da adenosina, e o Glu177 é considerado um candidato para sua ativação, uma vez que esse glutamato está em uma posição melhor para aceitar um próton da água do que para estabilizar o íon oxocarbênio (intermediário de transição)s.

Para obtermos mais respostas acerca do sítio ativo, foi realizado um estudo quântico computacional através de descritores de reatividade, derivados da estrutura eletrônica, os quais definem a susceptibilidade local para reagir. Para esse estudo, foi executado antes uma clusterização dos 100.000 *frames* da simulação de 100 ns, obtendo-se 21 clusters. Os cálculos de estrutura eletrônica foram calculados utilizando a estrutura mais representativa do *cluster* mais populoso.

As propriedades de reatividade foram obtidas por meio do cálculo dos descritores implementados no programa PRIMoRDiA, que utiliza a estrutura eletrônica convergida do programa MOPAC2016 [10]. O método de estrutura eletrônica utilizado neste trabalho, foi o baseado no hamiltoniano semi-empírico PM7 [11], com técnica de escalonamento linear de orbitais moleculares localizados MOZYME[12].

Os valores dos descritores de reatividade estão apresentados pela representação de átomos condensados e, por meio de inspeções visuais, foram averiguadas as informações de reativi-

dade, para os descritores de susceptibilidade ao ataque eletrofílico (SAE), susceptibilidade ao ataque nucleofílico (SAN) e dureza local. A Figura 5.7 apresenta os valores de SAE e SAN do sítio ativo da RTA. Tomando a diferença de SAN e SAE pode-se estimar a propensão de um átomo atuar como uma base ou ácido de Lewis.

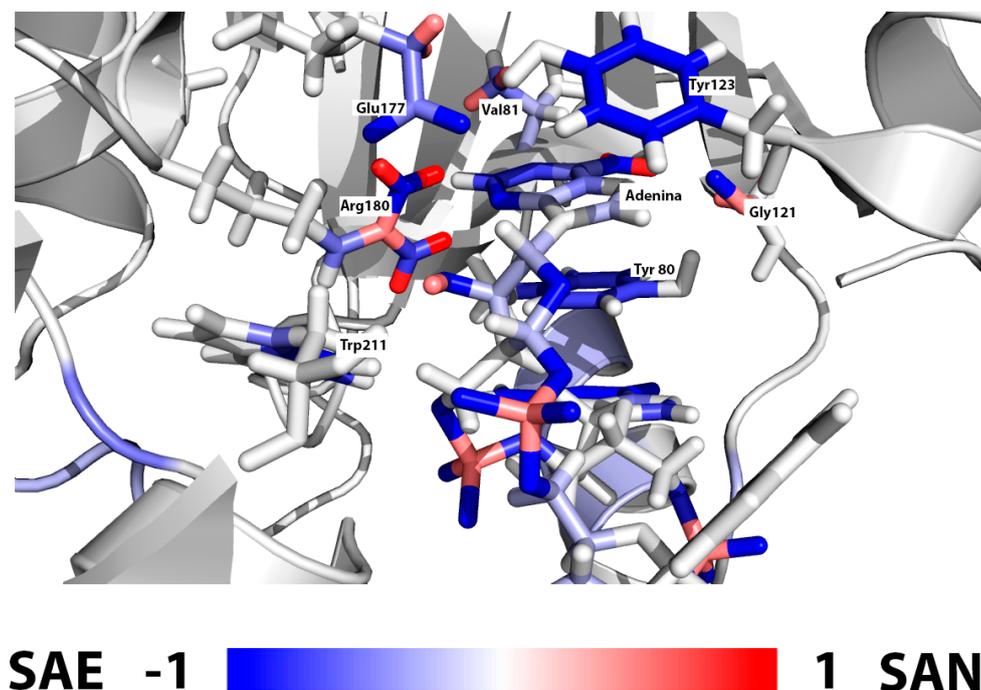


Figura 5.7: Diferença entre susceptibilidades de ataque eletrofílico e nucleofílico para o sítio ativo da RTA.

Fonte: Resultado da dissertação, 2020. Ilustração desenvolvida pela autora, utilizando o software Pymol

Observou-se que os maiores valores de SAE concentra-se nos resíduos Tyr80, Tyr123 e na adenina, sugerindo grupos com alta densidade de elétrons. Esse resultado corrobora com a hipótese de um empilhamento π entre eles, mantendo a tríade unida e fixando a posição do substrato para a ativação, ou seja, a propensão da adenina receber um ataque eletrofílico da Arg180.

O oxigênio da Arg180 é um dos átomos mais nucleofílicos, ou seja, apresenta um dos maiores valores de SAE. Em contrapartida, seus hidrogênios apresentam fortes valores de SAN, o que significa que ele está apto a perder um próton, conforme esperado no mecanismo catalítico.

Constatou-se, também, um alto SAE nos átomos de oxigênios do Glu177, o que significa uma alta propensão para doar densidade de elétrons e receber um próton. Portanto, neste

estudo constatou-se que o Glu177 pode ser considerado uma base no mecanismo catalítico, atuando na ativação da água catalítica.

O resíduo de Gly121 mostrou-se um forte nucleófilo passível a receber um próton da adenina, que apresenta em seus hidrogênios, H14 e H15, alto valor de SAN.

O Trp211 e a Val81 apresentaram valores médios de densidade eletrônica. Por fim, observou-se que todos os átomos de oxigênio dos grupos fosfato apresentam valores bem elevados de SAE, concentrando cargas negativas, o que é responsável pela gigantesca rede de ligações de hidrogênio com o RTA e estabilização do substrato.

Na Figura 5.8 é mostrada a dureza local dos átomos do sítio ativo, calculada com base no potencial de Fukui.

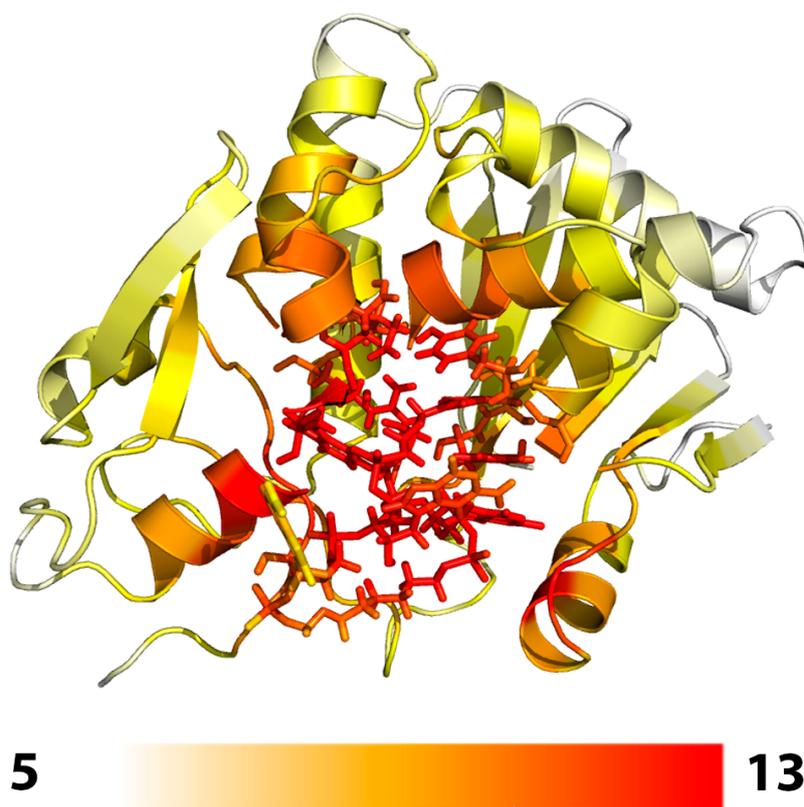


Figura 5.8: Dureza por átomos do sítio ativo da RTA, obtido por meio do descritor de reatividade de Dureza local.

Fonte: Resultado da dissertação, 2020. Ilustração desenvolvida pela autora, utilizando o software Pymol

Verificou-se que o sítio ativo da ricina é regido por interações duro-duro, isso mostra que o descritor de reatividade sugere fortes interações de natureza eletrostática e de van der Waals.

Pode-se inferir, então, que o sítio ativo da RTA se estabiliza minimizando a repulsão eletrônica intermolecular sem a transferência de elétrons entre as moléculas. Por isso, observaram-se inúmeras ligações de hidrogênio no sítio ativo.

Perante as análises realizadas nesse estudo, se constatou que o mecanismo de depurinação do substrato natural, rRNA 28S, catalisado pela RTA toma direção ao mecanismo sugerido por Schramm e colaboradores [2]. Isso, em virtude ao reconhecimento da água catalítica com posição e distância adequada a reagir com o resíduo Glu177, e ainda, a alta capacidade desse resíduo atuar como um gerador de nucleófilo segundo os descritores de reatividade, estando predisposto a abstrair um próton da água catalítica.

Referências

- [1] H. Verli, "Bioinformática: da biologia à flexibilidade molecular," 2014.
- [2] M.-C. Ho, M. B. Sturm, S. C. Almo, and V. L. Schramm, "Transition state analogues in structures of ricin and saporin ribosome-inactivating proteins," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 106, no. 48, pp. 20276–20281, 2009.
- [3] A. F. Monzingo and J. D. Robertus, "X-ray analysis of substrate analogs in the ricin A-chain active site," *Journal of molecular biology*, vol. 227, no. 4, pp. 1136–1145, 1992.
- [4] M. B. Sturm, S. Roday, and V. L. Schramm, "Circular DNA and DNA/RNA hybrid molecules as scaffolds for ricin inhibitor design," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 129, no. 17, pp. 5544–5550, 2007.
- [5] J. A. Chaddock and L. M. Roberts, "Mutagenesis and kinetic analysis of the active site Glu177 of ricin A-chain," *Protein Engineering, Design and Selection*, vol. 6, no. 4, pp. 425–431, 1993.
- [6] M. P. Ready, Y. Kim, and J. D. Robertus, "Site-directed mutagenesis of ricin A-chain and implications for the mechanism of action," *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 10, no. 3, pp. 270–278, 1991.
- [7] J. M. Lord, L. M. Roberts, and J. D. Robertus, "Ricin: structure, mode of action, and some current applications," *The FASEB journal*, vol. 8, no. 2, pp. 201–208, 1994.
- [8] X. Yan, T. Hollis, M. Svinth, P. Day, A. F. Monzingo, G. W. Milne, and J. D. Robertus, "Structure-based identification of a ricin inhibitor," *Journal of molecular biology*, vol. 266, no. 5, pp. 1043–1049, 1997.
- [9] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, *et al.*, "VMD: visual molecular dynamics," *Journal of molecular graphics*, vol. 14, no. 1, pp. 33–38, 1996.
- [10] J. J. Stewart, "Stewart computational chemistry," <http://openmopac.net/>, 2007.
- [11] J. J. Stewart, "Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the nddo approximations and re-optimization of parameters," *Journal of molecular modeling*, vol. 19, no. 1, pp. 1–32, 2013.
- [12] J. J. Stewart, "Application of localized molecular orbitals to the solution of semiempirical self-consistent field equations," *International Journal of Quantum Chemistry*, vol. 58, no. 2, pp. 133–146, 1996.

Conclusão

A simulação por dinâmica molecular de 100 ns forneceu estruturas bem equilibradas, sendo a DM1 a apresentar menor flutuação, variando seu RMSD em torno de 1,44 Å. A trajetória da DM1 foi utilizada para o estudo de ligações de hidrogênio, obtendo o total de 213 ligações de hidrogênio entre o ligante C2X e a RTA. No sítio ativo da RTA foram constatadas ligações de hidrogênio com os resíduos invariantes Val81, Arg180 e Gly121, e comprovado que a adenina alvo encontra-se ativada, por meio da ligação de hidrogênio com a Arg180, ao longo de praticamente toda simulação.

Através dos cálculos da energia de interação, concluiu-se que o ligante C2X, obtido através da edição do análogo do estado de transição, se encontrou bem atracado a proteína, uma vez que apresentou um valor médio de -350,69 kcal/mol. As EI entre os resíduos do sítio catalítico e a adenosina indica uma interação atrativa da adenosina com os resíduos Tyr80, Tyr123, Val81, Gly121, Glu208 e mais expressivamente com a Arg180, e uma interação de repulsão com os resíduos Glu177 e Trp211.

Também se identificou nesse estudo, uma água catalítica orientada ao longo de toda trajetória entre o carbono C11 da ribose e o Glu177, a uma distância média de 3,2 Å e 1,9 Å, respectivamente. Diante do exposto, foi considerado nesse trabalho o Glu177 como candidato para ativação dessa água, uma vez que esse glutamato está em uma posição melhor para aceitar um próton da água do que para estabilizar o íon oxocarbênio.

O estudo dos descritores de reatividade SAE e SAN sugeriram: (a) uma susceptibilidade ao ataque eletrofílico a adenina alvo por meio do resíduo Arg180; (b) a estabilização da adenina pelos resíduos Tyr80 e Tyr123, participando de um empilhamento π e (c) a ativação da molécula de água catalítica pelo Glu177. Já o descritor de dureza local indicou que o sítio ativo da RTA é regido por interações do tipo duro-duro.

Nesse trabalho foi possível identificar as ligações de hidrogênio e as interações eletrostáticas mais importantes para a estabilização do substrato, bem como para a ação da RTA. Ainda foi possível definir entre dois mecanismos aceitos pela literatura, sendo o mecanismo proposto por Schramm e colaboradores o que apresenta uma maior compatibilidade com os resultados desse estudo.

Perspectivas

Como proposta de continuidade a este trabalho, pretende-se realizar a simulação do ciclo catalítico da RTA com o ligante C2X, visando o entendimento completo do mecanismo de reação da RTA, para o desenho de um inibidor que se ligue covalentemente a essa toxina. É imprescindível que o inibidor seja uma molécula capaz de penetrar nas células vivas, dado que a RTA presente no organismo age rapidamente. Dessa forma, uma antitoxina apropriada necessitaria bloquear essa ação de forma ágil. A utilização de um antagonista competitivo pode exigir a constante administração da antitoxina até que o próprio organismo seja capaz de metabolizar a RTA. Uma alternativa mais eficaz é a obtenção de um inibidor que se associe covalentemente à RTA, eliminando tanto a atividade catalítica da enzima quanto a presença da antitoxina, à medida em que ela é consumida na reação. As moléculas de RTA estariam permanentemente inativadas, não sendo necessária a administração constante de novas doses.