



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

**Estudo de modelagem molecular de derivados de
desoxiuridina como inibidores da dUTPase de *Plasmodium
falciparum*.**

FELIPE NÓBREGA SOUSA DE FIGUEIRÊDO

João Pessoa - PB

2013

FELIPE NÓBREGA SOUSA DE FIGUEIRÊDO

Estudo de modelagem molecular de derivados de desoxiuridina como inibidores da dUTPase de *Plasmodium falciparum*.

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à coordenação do curso de graduação em farmácia da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de bacharel em Farmácia.

Orientadora: Dra. Bárbara Viviana de Oliveira Santos

Coorientador: Dr. Gerd Bruno da Rocha

João Pessoa - PB

2013

FELIPE NÓBREGA SOUSA DE FIGUEIRÊDO

Estudo de modelagem molecular de derivados de desoxiuridina como inibidores da dUTPase de *Plasmodium falciparum*.

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à coordenação do curso de graduação em farmácia da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de bacharel em Farmácia.

Aprovado em 05 de setembro de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Bárbara Viviana de Oliveira Santos
Orientadora - UFPB

Prof. Dr. Gerd Bruno da Rocha
Coorientador – UFPB

Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva
Examinadora - UFPB

Profa. Dra. Karen Cacilda Weber
Examinadora - UFPB

F475e Figueirêdo, Felipe Nóbrega Sousa de.

Estudo de modelagem molecular de derivados de desoxiuridina como inibidores da diptase de *plasmodium falciparum* / Felipe Nóbrega Sousa de Figueirêdo. – João Pessoa : [s.n.], 2013.

50 f. : il.

Orientadora: Bárbara Viviana de Oliveira Santos.

Co-orientador: Gerd Bruno da Rocha.

Monografia (Graduação) – UFPB/CCS.

1. Malária. 2. dUTPase. 3. Modelagem - Homologia. 4. *Steered Molecular Dynamics*.

BS/CCS/UFPB

CDU: 616.936 (043.2)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família por todo o apoio que me foi dado em todos os sentidos. Ter uma família tão unida quanto a minha é um grande privilégio.

Ao professor Gerd Bruno da Rocha, pelos quatro anos de orientação, pela confiança e por ter me dado a oportunidade de iniciar na ciência.

À professora Bárbara Viviana de Oliveira Santos por ter aceitado fazer parte desse trabalho.

Aos meus amigos e colegas de curso, em especial a Juliana Monteiro, por toda a amizade ao longo desse tempo.

Aos professores do curso por todo o conhecimento transmitido, ou não.

A Josineide Nunes Nóbrega, minha namorada, por ter conseguido me aturar por todos esses anos.

Enfim, a todos que de alguma maneira se fizeram presentes no decorrer dessa caminhada.

*“A maior parte das pessoas prefere morrer a pensar;
na verdade, é isso que fazem”.*

(Bertrand Russell)

RESUMO

A Malária é uma doença parasitária que continua a ser responsável por um enorme número de mortes em todo o mundo. A doença está presente em 99 países com o alarmante número de mortes ao ano chegando a 655 mil, cerca de 3,3 bilhões de pessoas se encontram em áreas de risco. Entre os agentes causadores de malária, o *Plasmodium falciparum* provoca os quadros mais graves, sendo o responsável por cerca de 90% das mortes por esta doença. Os tratamentos disponíveis atualmente incluem os fármacos cloroquina, primaquina, artemisinina e lumefantrina. Contudo, devido ao seu uso indiscriminado durante anos, a resistência do parasita a esses tratamentos tornou-se um grande problema. A enzima desoxiuridina trifosfato nucleotidohidrolase do *Plasmodium falciparum* (*Pfd*UTPase) (E.C. 3.6.1.23) foi escolhida como alvo molecular para este estudo. Produzimos, por homologia, um modelo estrutural completo da *Pfd*UTPase (PDB ID: 1VYQ), já que a estrutura cristalográfica depositada no banco de dados *Protein Data Bank* apresentava regiões com conformação indeterminada. Neste trabalho utilizamos, além de dinâmica molecular convencional, a metodologia *Steered Molecular Dynamics* para simular a dissociação de quatro derivados de desoxiuridina atuando como inibidores da *Pfd*UTPase. Adotamos a força externa de retirada dos ligantes de 0,2 kcal/mol/Å² à velocidade constante de 0,02 Å/ps. Ligações de hidrogênio se formam entre os ligantes e o resíduo Ile117 em até 90% da trajetória. A molécula de água presente no sítio ativo apresentou *Hbond* de até 68%. Os perfis de força dos cálculos SMD apresentaram coeficiente de correlação linear R² de 0,96 com os dados de *K_i* experimentais. Nossos resultados confirmam de forma quantitativa que o resíduo Ile117 é o principal responsável pelo ancoramento dos ligantes no sítio ativo.

Palavras-chave: Malária, dUTPase, Modelagem por Homologia, *Steered Molecular Dynamics*.

ABSTRACT

Malaria is a parasitic disease that continues to be responsible for a huge number of deaths around the world. The disease is present in 99 countries with the alarming number of deaths per year reaching 655,000; about 3.3 billion people are at risk areas. Among the agents that cause malaria, *Plasmodium falciparum* causes the most severe cases, being responsible for about 90% of deaths from this disease. Currently available treatments include the drugs chloroquine, primaquine, artemisinin and lumefantrine. However, due to its indiscriminate use for years, parasite resistance to these treatments has become a big problem. The enzyme deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase (dUTPase) of *Plasmodium falciparum* (EC 3.6.1.23) was chosen as the molecular target for this study. We produced a complete structural model of *PfdUTPase* (PDB ID: 1VYQ) by homology modeling, since the crystal structure stored in the Protein Data Bank shows regions of undetermined conformation. In this work we used, in addition to conventional molecular dynamics, the Steered Molecular Dynamics technique to simulate the unbinding process of four deoxyuridine derivatives acting as *PfdUTPase* inhibitors. For this purpose, we adopted the external steering force of 0,2 kcal/mol/Å² at a constant velocity of 0,02 Å/ps. Hydrogen bonds are formed between the ligand and the residue Ile117 up to 90% of the trajectory. The water molecule of the active site obtained *Hbond* results up to 68%. The force profiles of the SMD calculations showed linear correlation coefficient R^2 of 0.96 with the K_i experimental data. Our results show quantitatively that the residue Ile117 is the main responsible for the anchoring of the ligands in the active site.

Keywords: Malaria, dUTPase, Homology Modeling, Steered Molecular Dynamics.

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO - REFERENCIAL TEÓRICO.....	10
1.1	A Malária.....	10
1.2	Epidemiologia.....	14
1.3	Diagnóstico.....	15
1.4	Tratamento.....	16
1.5	Atividade das dUTPases.....	18
1.6	Derivados de desoxiuridina.....	20
1.7	Modelagem Computacional.....	21
1.8	Dinâmica Molecular Clássica.....	22
1.9	<i>Seered Molecular Dynamics</i>	24
1.10	Referências.....	27
2	CAPÍTULO II - ARTIGO.....	31
2.1	Introdução.....	32
2.2	Metodologia.....	33
2.3	Resultados e Discussão.....	35
2.4	Conclusões.....	46
2.5	Referências.....	48

CAPÍTULO I

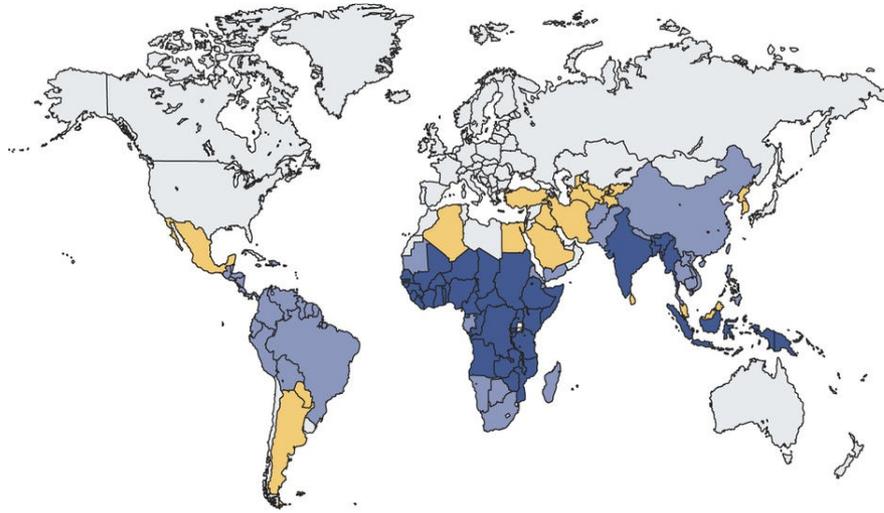
REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 A Malária

A malária é uma doença infecciosa responsável por grande número de mortes a cada ano. É a principal causa de morte por infecção parasitária do planeta (WHO, 2010). Esta doença faz parte de um grupo de doenças conhecidas como doenças negligenciadas, doenças graves endêmicas de áreas tropicais pobres da Ásia, África e América latina (figura 1). Em 2012 atingiu o número absolutamente alarmante de 655 mil mortos. Além disso, 3,3 bilhões de pessoas estão em condição de risco (IOSET; CHANG, 2011).

Embora a busca por novas drogas para o combate à malária venha sendo realizada por diversos grupos de pesquisa ao redor do mundo, a transformação das descobertas de pesquisa básica em novos protocolos clínicos é um processo longo, complexo e custoso. O problema é ainda mais acentuado quando se trata de doenças que afetam populações de regiões pobres, o que acaba por afastar investimentos de grandes companhias que visam à lucratividade.

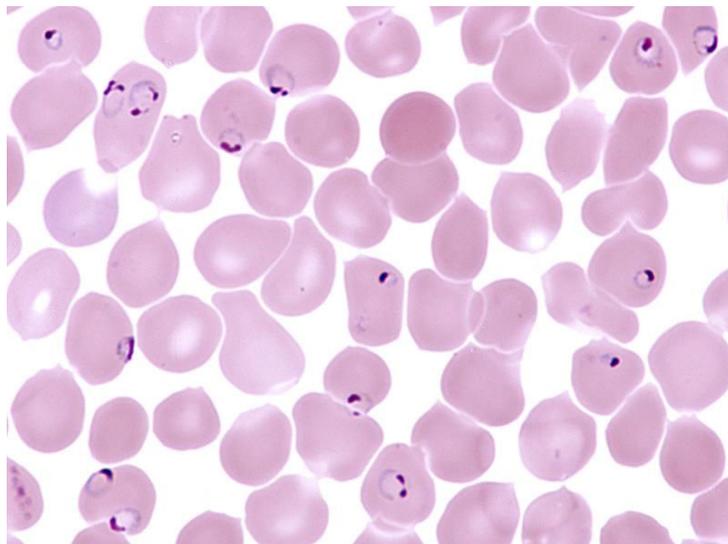
Figura 1 – distribuição da malária no mundo. As áreas em azul escuro representam as maiores contribuições no número global de mortes. As áreas em azul claro representam as áreas com baixo número de mortes. As áreas em amarelo são as regiões onde a doença foi ou está sendo erradicada.



Fonte: <http://www.rbm.who.int/>

A malária é causada por parasitas do gênero *Plasmodium*. Várias espécies de *Plasmodium* foram identificadas como causadoras da doença em humanos, entre elas *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, e *P. knowlesi* (LEE; SEO; CHO, 2013).

Figura 2 – eritrócitos infectados por *Plasmodium falciparum*.



Fonte : www.studyblue.com

Dependendo do agente causador, a infecção pode adquirir diferentes características. O tipo mais grave é causado pelo *Plasmodium falciparum* (figura 2). A transmissão é feita aos humanos pelas fêmeas de mosquito do gênero *Anopheles* (figura 3). (MILLER *et al.*, 2002; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010 HECHT; FOGEL, 2012;)

Figura 3 – Mosquito do gênero *Anopheles*.



Fonte: [HTTP://fineartamerica.com](http://fineartamerica.com)

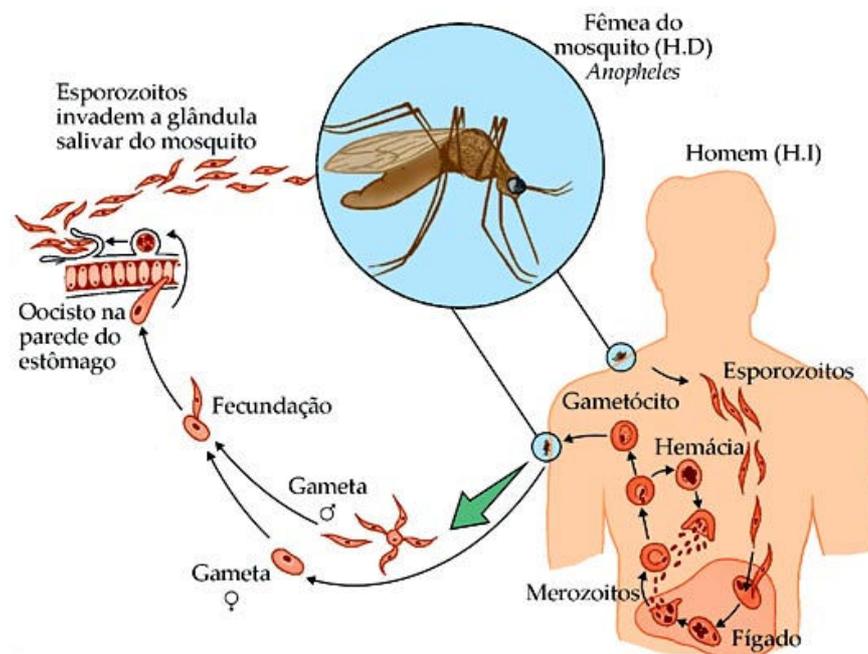
O gênero de mosquito *Anopheles* apresenta ampla distribuição por todo o mundo. Está presente em regiões tropicais e subtropicais, abrangendo Brasil, China, Índia e a África. Frequentemente chamado de mosquito prego, é o agente transmissor da malária e, em alguns casos, da filariose.

O ciclo da doença se inicia quando o mosquito *Anopheles* infectado pica um humano, neste momento ele injeta uma pequena quantidade de saliva contendo esporozoítos nos tecido subcutâneo e, com menos frequência, diretamente na corrente sanguínea (NEVES, 2003). A partir daí a forma parasitária se distribui pelo sangue até penetrar nas células hepáticas, onde se desenvolve em uma forma esférica denominada esquizonte contendo de 2.000 a 40.000 estruturas uninucleadas chamadas merozoítos. Esta estrutura do esquizonte passa por um

processo de maturação até que eventualmente sofre uma ruptura, liberando milhares de merozoítos no sangue.

Dentre as várias formas em que o parasito se apresenta durante seu ciclo biológico, a fase eritrocítica do ciclo, quando o mesmo se encontra na forma de merozoíto, é a principal fase alvo para os quimioterápicos (ACOSTA, 2007).

Figura 4 – Ciclo de infecção da malária resumido.



Fonte: <http://interna.coceducacao.com.br/ebook/pages/664.htm>

Cada merozoíto infecta eritrócitos onde se desenvolve para outro estágio, em forma esférica ou em forma de banana, o gametócito uninucleado. A fase madura do gametócito contém de 8 a 36 merozoítos, cada um deles com 5 a 10 μm de comprimento, os quais são liberados no sangue quando estes gametócitos se rompem. Os merozoítos continuam infectando outras gerações de eritrócitos (REY, 2001).

O tempo de maturação dos gametócitos, que determina o intervalo entre a liberação de sucessivas gerações de merozoítos, varia de acordo com as espécies

de *plasmodium* e é responsável pela periodicidade clássica da febre na malária. O gametócito, o qual é o estágio sexual do *plasmodium*, é infeccioso para mosquitos que ingerem o protozoário enquanto fazem o repasto sanguíneo (NEVES, 2003).

Os primeiros sintomas e sinais de malária estão associados com a lise dos eritrócitos, quando os gametócitos estão maduros. Esta liberação do material parasitário dispara uma resposta imune no hospedeiro. As citocinas, toxinas e outros produtos celulares liberados durante a resposta imune são os prováveis responsáveis pela febre, arrepios, suor e fraqueza e outros sintomas sistêmicos associados com a malária (REY, 2001). No caso da malária causada por *P. falciparum*, eritrócitos infectados aderem ao endotélio dos capilares e veias pós-capilares, levando a obstrução da micro circulação e anóxia do tecido local. Em crianças pode ocorrer necrose tubular aguda e falha renal, e nos intestinos pode causar isquemia e ulceração, levando a hemorragia e bacteremia secundária com a entrada das bactérias intestinais no sistema circulatório, levando à morte (Miller et al. 2002).

1.2 Epidemiologia

No Brasil, cerca de 6,5 milhões de km², correspondendo a 80% do seu território, possui risco de malária. Isso por que em todo esse território há a ocorrência do mosquito trasmissor. A área primitivamente endêmica abrangia todos os estados, total ou parcialmente, excluindo-se apenas o estado do Rio Grande do Sul e o Distrito Federal. Em conseqüência da luta contra a enfermidade e do desenvolvimento socioeconômico, o número de casos e a área de abrangência da malária foram se reduzindo ao longo dos anos (CATÃO et al., 2002).

Atualmente, a incidência da malária no Brasil está restrita quase que exclusivamente à região da Bacia Amazônica, incluindo os estados do Acre, Amazonas, Roraima, Amapá, Rondônia, Pará, Mato Grosso, Tocantins e a região ocidental do Maranhão (TAUIL, 2009).

Em 2009, 99,7% dos casos foram notificados na Amazônia. Dos 308.453 casos registrados no País naquele ano, apenas 804 foram em regiões fora da

Amazônia. Destes, a grande maioria adquiriu a doença na região da Bacia Amazônica. A transmissão fora da Amazônia está praticamente interrompida, limitando-se a alguns pequenos focos residuais e a focos novos de pequena magnitude, resultantes da reintrodução da transmissão por meio de portadores do parasito provenientes da região Amazônica (TAUIL, 2011).

1.3 Diagnóstico

O diagnóstico da malária é baseado na associação de critérios clínicos e epidemiológicos. A tríade sintomática clássica, febre, calafrios e dor de cabeça, é um indicativo importante, principalmente em áreas de risco conhecido. A presença dos sintomas nessas condições precede a solicitação do exame laboratorial confirmatório da infecção (MIROVA; NIKOLAEVA; LUNIAKOVA, 1989).

Normalmente, o diagnóstico confirmatório da malária é feito pelo exame do sangue ao microscópio, visando à detecção e diferenciação das espécies de plasmódios (REGINA et al., 2008).

O exame microscópico do sangue pode ser feito em esfregaço delgado ou gota espessa. A gota espessa é corada pela metodologia de Walker (azul de metileno e Giemsa) e o esfregaço delgado é corado pelo Giemsa. Ambas permitem identificar a espécie do plasmódio. Esses métodos também permitem inferir a intensidade do parasitismo, mediante a determinação da parasitemia por volume de sangue. Na prática, o método da gota espessa é o mais utilizado, uma vez que a concentração do sangue por campo microscópico facilita o encontro do parasito (BARATA; ANDRIGUETTI; MATOS, 1993).

A melhor preparação para o diagnóstico de malária é obtida com amostra de sangue colhida diretamente por punção digital ou venosa sem anticoagulante. Após a coleta, a lâmina deve ser mantida em temperatura ambiente para secagem da gota de sangue.

Embora o exame da gota espessa proporcione inquestionável vantagem para o diagnóstico, uma série de fatores pode intervir nos resultados obtidos, entre eles: a habilidade técnica no preparo da lâmina, seu manuseio e coloração; qualidade ótica e iluminação do microscópio; competência e cuidado por parte do microscopista, entre outros (GARAVELLI, 2002).

Mais recentemente, métodos de diagnóstico rápido da malária foram desenvolvidos utilizando anticorpos monoclonais e policlonais dirigidos contra a proteína Pf-HRP2 e contra a enzima desidrogenase láctica (pDHL) das quatro espécies de plasmódio. Estes testes têm a vantagem e diferenciar o *P. falciparum* das demais espécies, as quais são identificadas como não *P. falciparum* (REGINA et al., 2008).

Após o desenvolvimento da técnica de amplificação do DNA com a reação em cadeia da polimerase (PCR), o diagnóstico baseado na detecção de DNA mostrou grande avanço em termos de sensibilidade. Além disso, com o amplo emprego da PCR para o diagnóstico de outras doenças, as técnicas de extração e purificação de DNA foram aperfeiçoadas (REGINA et al., 2008).

1.4 Tratamento

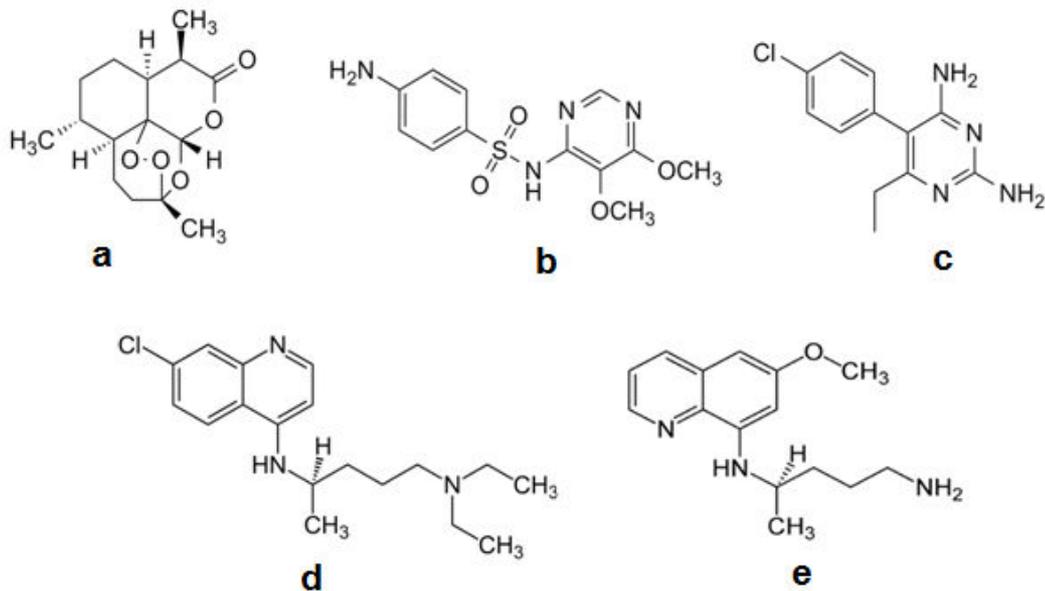
Acredita-se que o uso indiscriminado dos fármacos clássicos no tratamento da malária realizado durante anos, tenha influenciado fortemente no surgimento de cepas de *Plasmodium* altamente resistentes aos tratamentos disponíveis, especialmente o *P. falciparum* (OLIVER et al., 2008).

A Organização Mundial da Saúde preconiza que o tratamento da malária seja realizado com pelo menos dois fármacos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). O tratamento deve ser iniciado o mais rápido possível. O início precoce do tratamento, aliado ao uso de mais de um fármaco contribui para o sucesso do tratamento e evita o desenvolvimento de resistência individual a cada fármaco (FRASSON et al., 2009).

O tratamento de primeira escolha para a malária é feito, principalmente, com os fármacos cloroquina e primaquina (figura 5). A cloroquina atua na fase de esquizonte, enquanto a primaquina atua na fase de gametas (COOPER; MAGWERE, 2008; OLIVER et al., 2008).

Atualmente os medicamentos mais indicados no tratamento da malária são a artemisinina e seus derivados. A OMS sugere a associação de artemeter + lumefantrina (AL), artesunato + mefloquina (AS+MQ), artesunato + amodiaquina (AS+AQ), e artesunato + sulfadoxina e pirimetamina (AS+SP) (WHO, 2010). Na figura 5 estão sumarizados os principais fármacos utilizados e suas fórmulas estruturais.

Figura 5 – Fármacos usados no tratamento da malária. (a) artemisinina; (b) sulfadoxina; (c) pirimetamina; (d) cloroquina; (e) primaquina.



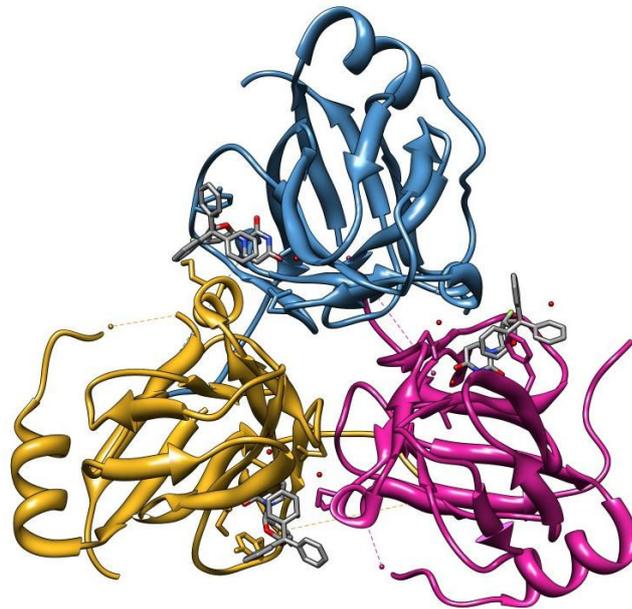
1.5 Atividade das dUTPases

São conhecidas duas maneiras de a uracila aparecer no DNA: desaminação da citosina, que ocorre espontaneamente a uma baixa taxa, e a troca da timidina por uridina. A maioria das DNA polimerases é capaz de incorporar nucleotídeos de uracila tão bem quanto de timina, dependendo apenas da relação de disponibilidade entre dUTP (desoxiuridina trifosfato) ou dTTP (desoxitimidina trifosfato). Sendo assim, na célula é necessário que a relação entre os dois nucleotídeos seja suficiente para que o substrato majoritário na construção do DNA seja o dTTP (ACOSTA, 2007).

A molécula de dUTP é constantemente produzida na via de biossíntese de pirimidina. Para prevenir a sua incorporação ao DNA a enzima dUTPase controla os níveis de dUTP pela hidrólise em dUMP (desoxiuridina monofosfato) e P_{pi} (ânion pirofosfato). Este papel é muito importante, pois dUMP é o único substrato para a síntese de dTMP pela enzima timidilato sintase, deste modo uma redução da quantidade de dUMP também significa um decréscimo nos níveis de dTTP (NELSON, D. L. 2008), ou seja, inibindo a conversão de dUTP em dUMP também é inibida a síntese de dTTP tornando a concentração de dUTP muito alta em relação a dTTP, que por sua vez provoca uma massiva incorporação de uracila ao DNA.

A enzima dUTPase (desoxiuridina 5-trifosfato nucleotidohidrolase, E.C. 3.6.1.23) (figura 6) é a responsável pela manutenção dos níveis de dUTP dentro da célula. Assim como a dUTPase de humanos, a de *Plasmodium falciparum* (*PfdUTPase*) é constituída por um trímero e possui três sítios ativos idênticos, cada sítio formado por aminoácidos localizados na interface entre duas subunidades (PERSSON; CEDERGREN-ZEPPEZAUER; WILSON, 2001). Nos últimos anos foram realizados diversos estudos experimentais *in vitro* com este alvo molecular, onde se demonstrou excelente seletividade de tritil derivados de desoxiuridina como potentes inibidores da *PfdUTPase* (RECIO et al., 2011).

Figura 6 – Estrutura tridimensional da dUTPase de *P. falciparum*. Ilustração renderizada no estilo *new cartoon*.



Na fase intraeritrocítica do ciclo de vida do *Plasmodium*, em que há reprodução assexuada, observa-se que é elevada a expressão de dUTPase. Nesta fase o parasita necessita de grandes quantidades de nucleotídeos para replicar seu DNA (ACOSTA, 2007).

O mecanismo geral para a reparação do dano causado pela incorporação de uridina é iniciado pela enzima DNA-glicosilase. A enzima quebra a ligação glicosídica entre a base alterada e a desoxirribose. O espaço resultante, chamado de sítio AP, é reconhecido pela endonuclease-AP que cliva a ligação fosfodiéster deixando um *primer* de onde a DNA polimerase inicia a síntese para substituir o nucleotídeo errado (THOMPSON, 1993).

Estudos recentes mostram que a incorporação de uridina no DNA é prejudicial para a célula principalmente por dois motivos: A alta concentração de uridina no DNA pode interferir na união de proteínas de ligação específica ao DNA requeridas para a transcrição de genes essenciais. E com a alta concentração de uridina em relação à timidina, uridina será reincorporada pela maquinaria de reparo. Esse hiperativo e inútil ciclo de excisão da uridina conduz à fragmentação da dupla fita de DNA e conseqüente morte celular (ACOSTA, 2007). Por tudo isso a dUTPase de *P.*

falciparium é considerada uma boa plataforma para a descoberta de novos fármacos antimaláricos.

1.6 Derivados de desoxiuridina

Derivados de tritil desoxiuridina são compostos com atividade antimalárica comprovada *in vitro*. São formados basicamente pela substituição da porção trifosfato da molécula de desoxiuridina trifosfato por um grupamento trifenil. Esses compostos inibem de forma seletiva a dUTPase de *Plasmodium falciparum*, mas não demonstraram a mesma atividade na enzima homóloga em humanos (GILBERT et al., 2005). As informações estruturais obtidas a partir de um estudo do complexo ligante-proteína formado com essas moléculas têm sugerido uma explicação para esta inibição seletiva. Na dUTPase de *P. falciparum*, podem acontecer interações específicas entre o grupo de trifenil dos ligantes e as cadeias laterais de resíduos Phe46 e Ile117 que fazem parte de um bolso hidrofóbico que é diferente do sítio de ligação polar do fosfato na equivalente em humanos. Outro resíduo conservado, Lys96, estabelece também interações de *Van der Waals* com os anéis aromáticos do inibidor através dos seus grupos metileno das cadeias laterais. Na dUTPase humana, os resíduos Phe46 e Ile117 são substituídos por Val e Gly, respectivamente (HAMPTON et al., 2011). Há a indicação de que a natureza hidrófoba dos resíduos e a ausência do resíduo fenilalanina aromático neste bolso são as bases para esta seletividade. Neste trabalho, descrevemos ensaios aprimoram o entendimento molecular sobre a inibição por esses compostos.

1.7 Modelagem computacional

O *design* racional de novos fármacos baseado na composição estrutural e no mecanismo de ação de um fármaco em seu receptor é, talvez, a estratégia mais eficiente e menos custosa para o desenvolvimento de fármacos modernos. Essa estratégia é fundamentada no conhecimento dos tipos de interações entre biomoléculas, dentre as quais proteínas e bases nitrogenadas, associadas a diferentes processos biológicos. O conhecimento estrutural do receptor permite o descobrimento e direciona a síntese de moléculas com complementaridade estérica, hidrofóbica e eletrostática ao seu sítio de ligação, os quais podem vir a se tornar fármacos e serem inseridos em novos protocolos clínicos. Essa estratégia define o *design* racional de fármacos baseado na estrutura (ARULMOZHI; RAJESH, 2011).

Entre o reconhecimento do alvo molecular até o desenvolvimento de um novo tratamento, um procedimento que pode levar mais de dez anos, a química computacional vem se tornando imprescindível no planejamento racional de novos fármacos, já com inúmeros casos de sucesso alcançados (BROWN, 2005). De acordo com Manuel Peitsch (PEITSCH, 2004), o processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos é hoje totalmente dependente do emprego de metodologias computacionais.

Para o projeto racional de fármacos baseado em estrutura, a coleta de dados estruturais em relação à proteína selecionada como alvo molecular é de suma importância (PEITSCH, 2004). Embora o banco de dados das estruturas cristalográficas de proteínas no “*Protein Data Bank*” (PDB) (BERMAN et al., 2000) tenha milhares de estruturas resolvidas, ainda não há informação estrutural para a maior parte das proteínas escolhidas como alvos.

O desenvolvimento de fármacos modernos por meio de *design* racional é utilizado sempre que se deseja descobrir um ligante para o qual a estrutura de seu alvo protéico macromolecular ainda não foi determinada experimentalmente. Os exemplos mais relevantes talvez sejam os receptores acoplados à proteína G, que apresentam enorme função em muitos processos patológicos. De muitos anos para

cá, cerca de 50% dos fármacos lançados no mercado tem como alvo esse tipo de proteína (EVERS; GOHLKE; KLEBE, 2003).

Quando não se tem a informação acerca da estrutura tridimensional de um pretendido alvo molecular, pode-se recorrer às técnicas de determinação teórica e computacional da estrutura.

Modelagem por homologia, ou modelagem comparativa é uma metodologia computacional largamente usada para predição de conformação de proteínas (XIANG, 2006). O método se fundamenta na informação de que a conformação de uma proteína é mais conservada que sua seqüência de aminoácidos no decorrer do processo evolutivo. Com isso, baixas mudanças na seqüência de aminoácidos, na maioria das vezes, resultam em pequenas alterações na estrutura tridimensional. Nessa metodologia a possível conformação de uma proteína em estudo pode ser determinada por meio da comparação com outras estruturas já resolvidas, por técnicas experimentais, de outra proteína, desde que possuam certa similaridade na sua seqüência de aminoácidos (XIANG, 2006).

1.8 Dinâmica molecular clássica

Dinâmica é a parte da mecânica que estuda o movimento e suas causas. Partindo dessa premissa, para um sistema molecular a dinâmica é o estudo do comportamento dinâmico de partículas em um espaço tridimensional dependente do tempo (MCCAMMON; PETTITT; SCOTT, 1994).

A dinâmica molecular clássica é o resultado da resolução de equações de movimento de Newton. Falando em linhas gerais, nesse método a posição de cada átomo do sistema é calculada a cada intervalo de tempo, geralmente na ordem de femto segundos. O conjunto de coordenadas resultantes, com as variadas posições no decorrer do tempo, representa a trajetória do sistema (CHOE; KIM, 2000).

Os softwares usados para simulações são capazes de realizar cálculos com toda a estrutura da molécula, utilizando as equações de Newton do movimento, relacionadas com temperatura, pressão e suas coordenadas espaciais. Calculando a energia envolvida entre os diversos graus de liberdade dos átomos do sistema molecular e das interações eletrostáticas e de van der Waals, pode-se conseqüentemente calcular a energia potencial do sistema. Na Equação (1) estão apresentados separadamente os principais termos usados no cálculo dessa energia potencial (PHILLIPS et al., 2005).

$$\begin{aligned}
 U(R) = & \sum_{\text{ligações}} K_r (r - r_{eq})^2 && \text{ligações} \\
 & + \sum_{\text{ângulos}} K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 && \text{ângulos} \\
 & + \sum_{\text{diedros}} \frac{V_n}{2} (1 + \cos[n\phi - \gamma]) && \text{diedros} \\
 & + \sum_{i < j}^{\text{átomos}} \frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} && \text{van der Waals} \\
 & + \sum_{i < j}^{\text{átomos}} \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} && \text{eletrostática}
 \end{aligned} \tag{1}$$

Os métodos de simulação molecular se diferenciam no processo utilizado para gerar configurações. Na Dinâmica Molecular emprega-se um processo determinístico, isto é, a partir de um potencial de interação, as forças que atuam nos átomos são computadas e as equações de movimento são resolvidas para um determinado intervalo de tempo. Neste processo as posições atômicas consecutivas são calculadas e novas configurações são geradas. Por esse motivo, os métodos de dinâmica molecular são usados quando processos dependentes do tempo são necessários, como em investigações cinéticas (MCCAMMON; PETTITT; SCOTT, 1994).

Já o método de Monte Carlo utiliza o processo estocástico nas simulações. Neste tipo de cálculo, a cada passo de simulação são geradas novas coordenadas cartesianas aleatoriamente. Esta nova configuração é relaxada empregando um potencial e, logo após, o processo é repetido, gerando uma nova configuração de

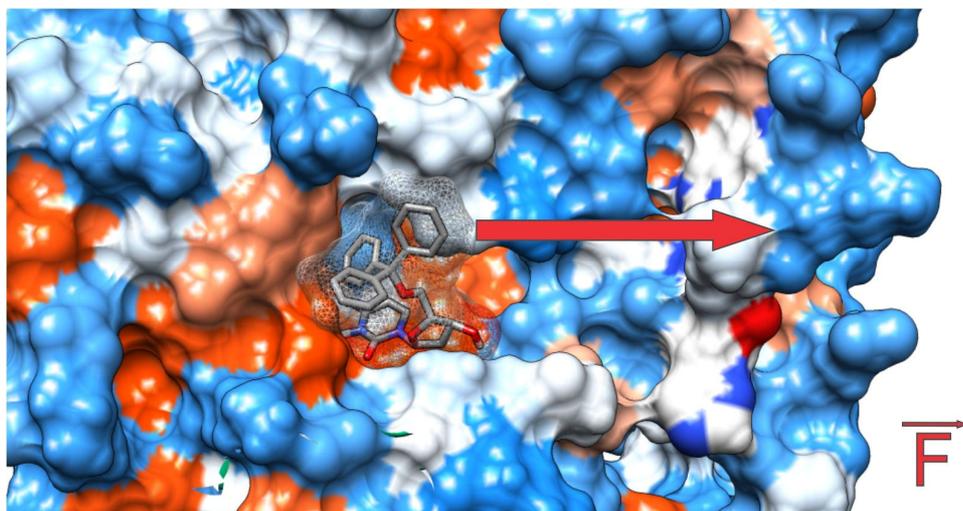
coordenadas aleatórias. Por se tratar de um método estocástico, as simulações de Monte Carlo são úteis para tratar sistemas em que apenas as configurações de equilíbrio são de interesse (KROESE; TAIMRE; BOTEV, 2011).

1.9 *Steered Molecular Dynamics (SMD)*

A especificidade das interações ligante-proteína e a dinâmica das interações intermoleculares são tópicos fundamentais no entendimento de múltiplos processos bioquímicos. O desenho de novas moléculas para um determinado alvo, quase sempre uma proteína, são atividades que se favorecem imensamente desses entendimentos (EISENBERG; LÜTHY; BOWIE, 1997).

Na figura 7 ilustramos o funcionamento da técnica SMD.

Figura 7 - Representação da dinâmica SMD com o ligante do complexo ao centro, onde será aplicada uma força promovendo seu deslocamento.



Embora o uso de metodologias experimentais seja a estratégia clássica para esse tipo de estudo, hoje em dia, técnicas computacionais são empregadas no estudo do mecanismo de ligação desses ligantes às enzimas obtendo excelentes resultados e a um custo muito menor do que métodos experimentais (EVERS; GOHLKE; KLEBE, 2003)

As simulações SMD têm como inspiração a técnica experimental de microscopia de força atômica. Com a técnica pode-se aplicar uma força externa, dependente do tempo, suficiente para promover o desligamento de determinada molécula ligada a uma proteína (ZHANG; ZHENG; ZHANG, 2010). Com base nessa movimentação, podemos analisar a resposta da proteína para a associação/dissociação do ligante mencionado com a proteína.

O exame da influência mútua do ligante com a proteína, da relação entre as forças exercidas e a posição do ligante pode elucidar detalhes do papel do complexo ligante-proteína, bem como do mecanismo de reconhecimento molecular. A força externa aplicada é quase sempre proveniente de um potencial harmônico. Tomando uma coordenada de reação x , o ligante é puxado ou empurrado ao longo dessa coordenada através de uma constante de mola K . A força externa praticada, $F(x, t)$, sobre o sistema e o potencial que conduz a associação são definidos por:

$$f(x, t) = k[x(t_0) - x(t)] \quad (2)$$

$$dU/dx = F(x, t) + \sigma N(t) - \gamma x \quad (3)$$

Onde, $\sigma N(t)$ é uma força estocástica de amplitude σ e média zero e γx é a força de fricção que tem coeficiente γ . Em alguns casos o atrito pode ser desconsiderado por meio da escolha adequada da velocidade com que o ligante é puxado do sítio ativo da proteína.

Muitos estudos vêm obtendo êxito na aplicação das simulações SMD para a compreensão dos eventos de associação/dissociação de biomoléculas envolvidas

em importantes processos biológicos a nível molecular (HE et al., 2013; JITONNOM; SONTAG, 2012; STRZELECKI et al., 2009). O uso da técnica é feito até mesmo como complemento do método experimental, fornecendo detalhes preciosos, corroborando resultados e fornecendo imagens mais representativas de um sistema molecular (STRZELECKI et al., 2009).

Neste trabalho utilizou-se, além de dinâmica molecular convencional, a metodologia SMD para simular a saída de quatro derivados de desoxiuridina atuando como inibidores da dUTPase de *Plasmodium falciparum*, a fim obter informações detalhadas acerca desse sistema que possam contribuir para um posterior desenho racional de novos fármacos que possam ser úteis no combate à malária.

REFERÊNCIAS

ACOSTA, V. M. C. Papel de la desoxiuridina trifosfato nucleótido hidrolasa en la viabilidad celular y la integridad genética en *Trypanosoma brucei*. **Tese de Doutorado, Instituto de Parasitología y Biomedicina “López- Neyra,”** p. 185, 2007.

ARULMOZHI, V.; RAJESH, R. Chemoinformatics A quick review. **2011 3rd International Conference on Electronics Computer Technology**, v. 6, p. 416–419, 2011.

BARATA, L. C. B.; ANDRIGUETTI, M. T. M.; MATOS, M. R. DE. Surto de malária induzida entre usuários de drogas injetáveis. **Rev Saude Publica**, v. 27, p. 9–14, 1993.

BERMAN, H. M. et al. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 235–242, 2000.

BROWN, F. Editorial opinion: chemoinformatics - a ten year update. **Current opinion in drug discovery development**, v. 8, p. 298–302, 2005.

CATÃO, C. et al. Controle da malária no Brasil : 1965 a 2001. **American Journal of Public Health**, v. 11, p. 235–244, 2002.

CHOE, J.; KIM, B. Determination of Proper Time Step for Molecular Dynamics Simulation. **Bull Korean Chem Soc**, v. 21, p. 419–424, 2000.

COOPER, R. G.; MAGWERE, T. Chloroquine: novel uses & manifestations. **The Indian journal of medical research**, v. 127, p. 305–316, 2008.

EISENBERG, D.; LÜTHY, R.; BOWIE, J. U. VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Methods in Enzymology**, v. 277, p. 396–404, 1997.

EVERS, A.; GOHLKE, H.; KLEBE, G. Ligand-supported homology modelling of protein binding-sites using knowledge-based potentials. **Journal of Molecular Biology**, v. 334, p. 327–345, 2003.

FRASSON, A. P. et al. Estratégias e desafios no combate à malária. **Revista Liberato**, v. 10, p. 201–208, 2009.

GARAVELLI, P. L. Diagnosis of malaria with immunochromatographic test The Novara experience. **Recenti Progressi In Medicina**, v. 93, p. 682, 2002.

GILBERT, I. et al. Deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase as a potential antiparasitic drug target. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, p. 5942–5954, 2005.

HAMPTON, S. E. et al. Design, Synthesis, and Evaluation of 5'-Diphenyl Nucleoside Analogues as Inhibitors of the Plasmodium falciparum dUTPase. **Chemmedchem**, v. 6, p. 1816–1831, 2011.

HE, J. et al. Steered molecular dynamics simulation of the binding of the $\beta 2$ and $\beta 3$ regions in domain-swapped human cystatin C dimer. **Journal of molecular modeling**, v. 19, n. 2, p. 825–32, fev. 2013.

HECHT, D.; FOGEL, G. B. Modeling the evolution of drug resistance in malaria. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 26, n. 12, p. 1343–53, dez. 2012.

IOSET, J.-R.; CHANG, S. Drugs for Neglected Diseases initiative model of drug development for neglected diseases: current status and future challenges. **Future medicinal chemistry**, v. 3, p. 1361–1371, 2011.

JITONNOM, J.; SONTAG, C. Comparative study on activation mechanism of carboxypeptidase A1, A2 and B: first insights from steered molecular dynamics simulations. **Journal of molecular graphics & modelling**, v. 38, p. 298–303, set. 2012.

KROESE, D. P.; TAIMRE, T.; BOTEV, Z. I. **Handbook of Monte Carlo Methods Wiley Series in Probability and Statistics**, 2011.

LEE, S. J.; SEO, E.; CHO, Y. Proposal for a new therapy for drug-resistant malaria using Plasmodium synthetic lethality inference. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 3, p. 119–128, dez. 2013.

MCCAMMON, J. A.; PETTITT, B. M.; SCOTT, L. R. Ordinary differential equations of molecular dynamics. **Computers Mathematics with Applications**, v. 28, p. 319–326, 1994.

MILLER, L. H. et al. The pathogenic basis of malaria. **Nature**, v. 415, p. 673–679, 2002.

MIROVA, G. D.; NIKOLAEVA, L. N.; LUNIAKOVA, G. N. Diagnosis and prevention of malaria. **Vrach Delo**, p. 116–117, 1989.

OLIVER, M. et al. New use of primaquine for malaria. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 38, p. 169–179, 2008.

PEITSCH, M. C. Manuel Peitsch discusses knowledge management and informatics in drug discovery. **Drug Discovery Today BIOSILICO**, v. 2, p. 94–96, 2004.

PERSSON, R.; CEDERGREN-ZEPPEZAUER, E. S.; WILSON, K. S. Homotrimeric dUTPases; structural solutions for specific recognition and hydrolysis of dUTP. **Current Protein Peptide Science**, v. 2, p. 287–300, 2001.

PHILLIPS, J. C. et al. Scalable molecular dynamics with NAMD. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, p. 1781–802, 2005.

RECIO, E. et al. Site-directed mutagenesis provides insights into the selective binding of trityl derivatives to Plasmodium falciparum dUTPase. **European journal of medicinal chemistry**, v. 46, n. 8, p. 3309–14, ago. 2011.

REGINA, M. et al. Diagnóstico molecular da malária em uma unidade de atenção terciária na Amazônia Brasileira Molecular diagnosing of malaria in a tertiary care center in the Brazilian Amazon region. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 381–385, 2008.

STRZELECKI, J. et al. AFM Force Spectroscopy and Steered Molecular Dynamics Simulation of Protein Contactin 4. **Acta Physica Polonica A**, v. 116, p. 156–159, 2009.

TAUIL, P. L. **Malária no Brasil: epidemiologia e controleSaúde Brasil 2009 Uma análise da situação da saúde e da agenda nacional e internacional de prioridades em saúde**, 2009.

TAUIL, P. L. The prospect of eliminating malaria transmission in some regions of Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106 Suppl , p. 105–106, 2011.

WHO, W. H. O. **World Malaria ReportWorld Health**, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the treatment of malaria, 2nd edition WHO**, 2010.

XIANG, Z. Advances in homology protein structure modeling. **Current protein peptide science**, v. 7, p. 217–227, 2006.

ZHANG, J.; ZHENG, Q.; ZHANG, H. Unbinding of glucose from human pulmonary surfactant protein D studied by steered molecular dynamics simulations. **Chemical Physics Letters**, v. 484, n. 4-6, p. 338–343, jan. 2010.

CAPÍTULO II

Modelagem molecular de derivados de desoxiuridina como inibidores da dUTPase de *Plasmodium falciparum*.¹

Felipe Nóbrega Sousa de Figueiredo²
Italo Curvelo dos Anjos³
Gerd Bruno da Rocha⁴

ABSTRACT: Malaria is a parasitic disease that continues to be responsible for a huge number of deaths around the world. The disease is present in 99 countries with the alarming number of deaths per year reaching 655,000; about 3.3 billion people are at risk areas. Among the agents that cause malaria, *Plasmodium falciparum* causes the most severe cases, being responsible for about 90% of deaths from this disease. Currently available treatments include the drugs chloroquine, primaquine, artemisinin and lumefantrine. However, due to its indiscriminate use for years, parasite resistance to these treatments has become a big problem. The enzyme deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase (dUTPase) of *Plasmodium falciparum* (EC 3.6.1.23) was chosen as the molecular target for this study. We produced a complete structural model of *PfdUTPase* (PDB ID: 1VYQ) by homology modeling, since the crystal structure stored in the Protein Data Bank shows regions of undetermined conformation. In this work we used, in addition to conventional molecular dynamics, the Steered Molecular Dynamics technique to simulate the unbinding process of four deoxyuridine derivatives acting as *PfdUTPase* inhibitors. For this purpose, we adopted the external steering force of 0,2 kcal/mol/Å² at a constant velocity of 0,02 Å/ps. Hydrogen bonds are formed between the ligand and the residue Ile117 up to 90% of the trajectory. The water molecule of the active site obtained *Hbond* results up to 68%. The force profiles of the SMD calculations showed linear correlation coefficient R² of 0.96 with the *Ki* experimental data. Our results show quantitatively that the residue Ile117 is the main responsible for the anchoring of the ligands in the active site.

Keywords: Malaria, dUTPase, Homology Modeling, Steered Molecular Dynamics.

¹ Artigo que será submetido para publicação na revista "Malaria Journal".

² Graduando do curso de Farmácia – Universidade Federal da Paraíba.

³ Doutorando do programa de pós-graduação em química da Universidade Federal da Paraíba.

⁴ Professor orientador - Universidade Federal da Paraíba.

2.1 Introdução

A Malária é a maior causa de morte por infecção parasitária no mundo. A doença está presente em 99 países com o alarmante número de mortes ao ano chegando a 655 mil, cerca de 3,3 bilhões de pessoas se encontram em áreas de risco (IOSET; CHANG, 2011; WHO, 2010). Entre os possíveis agentes causadores de malária, o *Plasmodium falciparum* é o causador dos quadros mais severos, sendo o responsável por cerca de 90% das mortes (LEE; SEO; CHO, 2013). Os tratamentos disponíveis atualmente incluem os fármacos cloroquina, primaquina, artemisinina e lumefantrina (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010), contudo, atualmente o tratamento com esses fármacos enfrenta grandes problemas como a resistência do parasita e a alta toxicidade em humano.

A enzima desoxiuridina trifosfato nucleotidohidrolase (dUTPase) do *Plasmodium falciparum* (E.C. 3.6.1.23) (MCCARTHY et al., 2009) foi escolhida como alvo molecular para este estudo. A dUTPase é uma enzima ubíqua, presente nas células de praticamente todos os seres vivos. É responsável pela regulação da quantidade de desoxiuridina trifosfato (dUTP) dentro da célula, sua ação é fundamental na manutenção da vida por constituir a principal forma de defesa contra a incorporação de uracila ao DNA (WHITTINGHAM et al., 2005). Assim como a dUTPase de humanos, a de *Plasmodium falciparum* (*PfdUTPase*) é constituída por um trímero e possui três sítios ativos idênticos, cada sítio formado por aminoácidos localizados na interface entre duas subunidades (PERSSON; CEDERGREN-ZEPPEZAUER; WILSON, 2001). Nos últimos anos foram realizados diversos estudos experimentais *in vitro* com este alvo molecular, onde se demonstrou excelente seletividade de tritil derivados de desoxiuridina como potentes inibidores da *PfdUTPase* (RECIO et al., 2011). No entanto, ainda existem poucos estudos com metodologias computacionais que possam contribuir para melhor elucidar os detalhes dinâmicos e energéticos da inibição enzimática por esses compostos.

Modelagem por homologia, ou modelagem comparativa é uma metodologia computacional largamente usada para predição de conformação de proteínas. Nessa metodologia a possível conformação de uma proteína em estudo pode ser determinada por meio da comparação com a estrutura bem resolvida, por técnicas

experimentais, de outra proteína, desde que possuam certa similaridade na sua seqüência de aminoácidos (XIANG, 2006). Produzimos, por homologia, um modelo estrutural completo da *PfdUTPase*, já que a estrutura cristalográfica depositada no banco de dados PDB (*protein data bank*) (BERMAN et al., 2000) apresentava regiões com conformação indeterminada.

A metodologia *steered molecular dynamics* (SMD) é uma técnica computacional utilizada para simular os eventos envolvidos na dissociação de um complexo ligante-receptor, proteína-proteína ou até mesmo no desenovelamento de uma proteína (ISRALEWITZ; GAO; SCHULTEN, 2001). As simulações SMD têm como inspiração a técnica experimental de microscopia de força atômica (MFA). Com a técnica pode-se aplicar uma força externa, dependente do tempo, suficiente para promover o desligamento de determinada molécula ligada a uma proteína (ZHANG; ZHENG; ZHANG, 2010). Muitos estudos vêm obtendo êxito na aplicação das simulações SMD para a compreensão dos eventos de associação/dissociação de biomoléculas envolvidas em importantes processos biológicos a nível molecular.

Neste trabalho utilizamos, além de dinâmica molecular convencional, a metodologia SMD para simular a saída de quatro derivados de desoxiuridina atuando como inibidores da *PfdUTPase*, a fim obter informações detalhadas acerca desse sistema que possam contribuir para um futuro desenho racional de novos fármacos úteis no combate à malária.

2.2 Metodologia

Obtivemos a estrutura cristalográfica da enzima *PfdUTPase* disponível no banco de proteínas dados do *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics* (RCSB). A estrutura cristalográfica depositada no banco de dados apresentava regiões com conformação indeterminada, assim realizamos uma modelagem por homologia para obter o modelo tridimensional completo. A partir da seqüência de aminoácidos, utilizamos o NCBI *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) (MADDEN, 2002) para buscar proteínas do banco de dados PDB. Utilizamos como

molde para nossa proteína a dUTPase de *E. coli* (código pdb: 1EUW) que apresentou graus de identidade e resolução adequados. O alinhamento foi feito com o programa *ClustalW2* (LARKIN et al., 2007). A partir do alinhamento sequencial, o modelo tridimensional da enzima *PfdUTPase* foi construído usando o software *Modeller 8* (SALI; BLUNDELL, 1993).

O modelo gerado foi validado quanto à estereoquímica usando o programa *Procheck* (LASKOWSKI et al., 1993) e os programas *Verify3D* (EISENBERG; LÜTHY; BOWIE, 1997) e o *ERRAT* (COLOVOS; YEATES, 1993) foram utilizados adicionalmente para avaliar a qualidade estrutural.

Utilizaram-se quatro diferentes derivados de desoxiuridina como inibidores. Os três sítios de ligação da enzima foram preenchidos com cada um dos ligantes, totalizando quatro complexos.

Para as simulações foram utilizados computadores portando processadores Intel core i7® e as placas de vídeo *GeForce® GTX-590* com tecnologia *CUDA® (Computer Unified Device Architecture)*. A parte de dinâmica molecular convencional foi realizada com o programa *AMBER v11* (CASE et al., 2005). Usamos campo de força *AMBER ff99SB* para a parte protéica e *gaff* parametrizado com cargas *AM1BCC* para os ligantes. O *LeaP* foi usado para solvatar os complexos em caixas octaédricas com 10 Å de borda, com águas do tipo *TIP3P* e dois íons Na^+ para obter a neutralidade. Os complexos formados resultaram em sistemas contendo 42.572 átomos. Otimizamos a geometria dos complexos solvatados por meio de 6000 passos de gradientes conjugados.

A fase de aquecimento (NVT) se deu partindo-se de $T = 100 \text{ K}$ até atingir a temperatura de 300 K em 500 ps . O tempo de integração de 2 fs foi usado em todos os cálculos. Usamos o algoritmo de *SHAKE* para manter as ligações envolvendo átomos de hidrogênio com um comprimento médio padrão. Usamos condições periódicas de contorno (*cutoff* = 8 Å) e o método de soma de Ewald para contabilizar as interações eletrostáticas. Na regulação de temperatura e pressão usamos o termostato e barostato de Berendsen (BERENDSEN, 2001). Em seguida executamos a etapa de equilíbrio, com duração de 20 ns à temperatura constante de 300K , pressão de 1.0 atm e $\text{pH } 7.0$. As coordenadas foram armazenadas a cada

10 ps. O estado final foi salvo para servir como ponto de partida para as simulações SMD.

Nas simulações SMD usamos o programa *NAMD* v2.9 (PHILLIPS et al., 2005). Nesta etapa o átomo de carbono alfa do resíduo Gly260 foi mantido fixo. Uma força externa de $0,2 \text{ kcal/mol/Å}^2$ foi aplicada para promover a saída do ligante do sítio ativo à velocidade constante de $0,02 \text{ Å/ps}$ durante 4 ns. Os cálculos foram repetidos cinco vezes para cada complexo, partindo de velocidades iniciais aleatórias.

As trajetórias produzidas foram analisadas com os programas *CPPTRAJ* incluída no pacote *AMBERTOOLS* e *VMD* (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996).

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Modelagem por homologia

A seqüência linear *FASTA* da PfdUTPase foi adquirida do *RCSB* *pdb.org*. Realizamos o alinhamento *BLAST* contra o banco de dados PDB. Como resultado, obtivemos uma lista de possíveis *templates* (moldes), entre eles a enzima de código *pdb*: 1EUW, que consideramos a mais adequada com *query coverage* de 84% e identidade de 29% com a nossa seqüência primária.

A partir do alinhamento global das estruturas realizado com o programa *ClustalW2* o modelo foi gerado por meio do programa *Modeller*. O melhor modelo obtido foi validado pelos programas *PROCHECK* e *Verify3D*. O gráfico de Ramachandran (RAMACHANDRAN; VENKATACHALAM, 1968) obtido para nosso modelo pode ser visualizado na figura 1. O resultado demonstrou que 94,9% dos aminoácidos encontra-se em regiões muito favorecidas, 4,5% em regiões favorecidas e apenas 0,6% dos resíduos em regiões desfavorecidas. Portanto, a análise do *PROCHECK* revelou uma ótima qualidade do modelo em termos de

estereoquímica. Na validação do *Verify3D* os valores de *score* da função 1D-3D para os ambientes químicos de cada resíduo são calculados, podendo assim estimar a qualidade da estrutura terciária de proteínas. Para nosso modelo, os escores variaram entre 0,08 e 0,69. De acordo com Carminatti et al. 2008, isso significa que o modelo também teve boa qualidade em relação às cadeias laterais.

Figura 8 - Gráfico de Ramachandran obtido com o *PROCHECK* para o modelo gerado pelo *Modeller*.

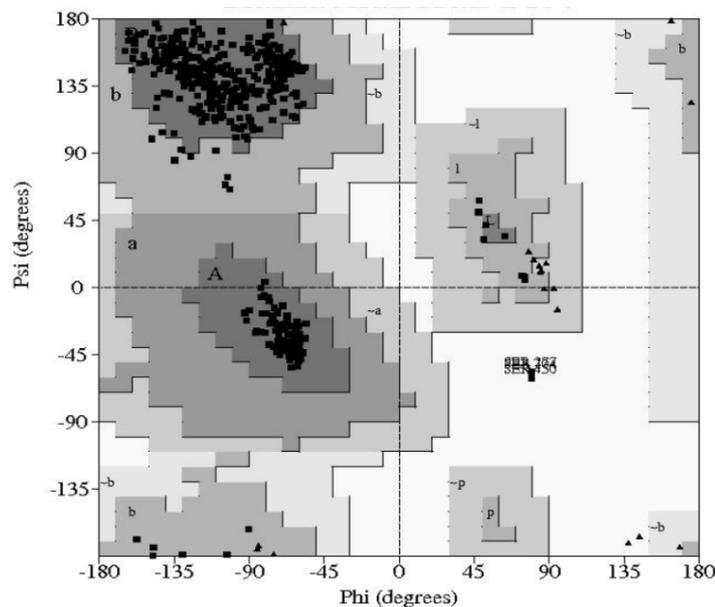


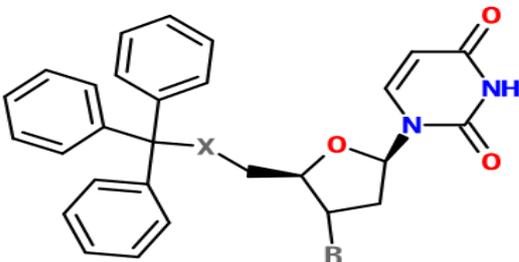
Tabela 1 - Dados numéricos das frações de aminoácidos em regiões determinadas pelo *PROCHECK*.

Regiões	Fração
Regiões muito favorecidas	94,9%
Regiões favorecidas	4,5%
Regiões pouco favorecidas	0,0%
Regiões desfavorecidas	0,6%

O posicionamento dos ligantes foi feito no programa UCSF *Chimera* 2.0 (PETTERSEN et al., 2004) por meio do alinhamento da estrutura original, contendo

os ligantes, com a estrutura proveniente da homologia. Em seguida foram realizadas as modificações de cada átomo substituinte nos três sítios de ligação. Após, guardamos as estruturas complexadas com suas conectividades e coordenadas resultantes. As modificações estruturais dos ligantes é apresentada no quadro 1.

Quadro 1 - Complexos formados por seus respectivos ligantes e suas modificações estruturais.



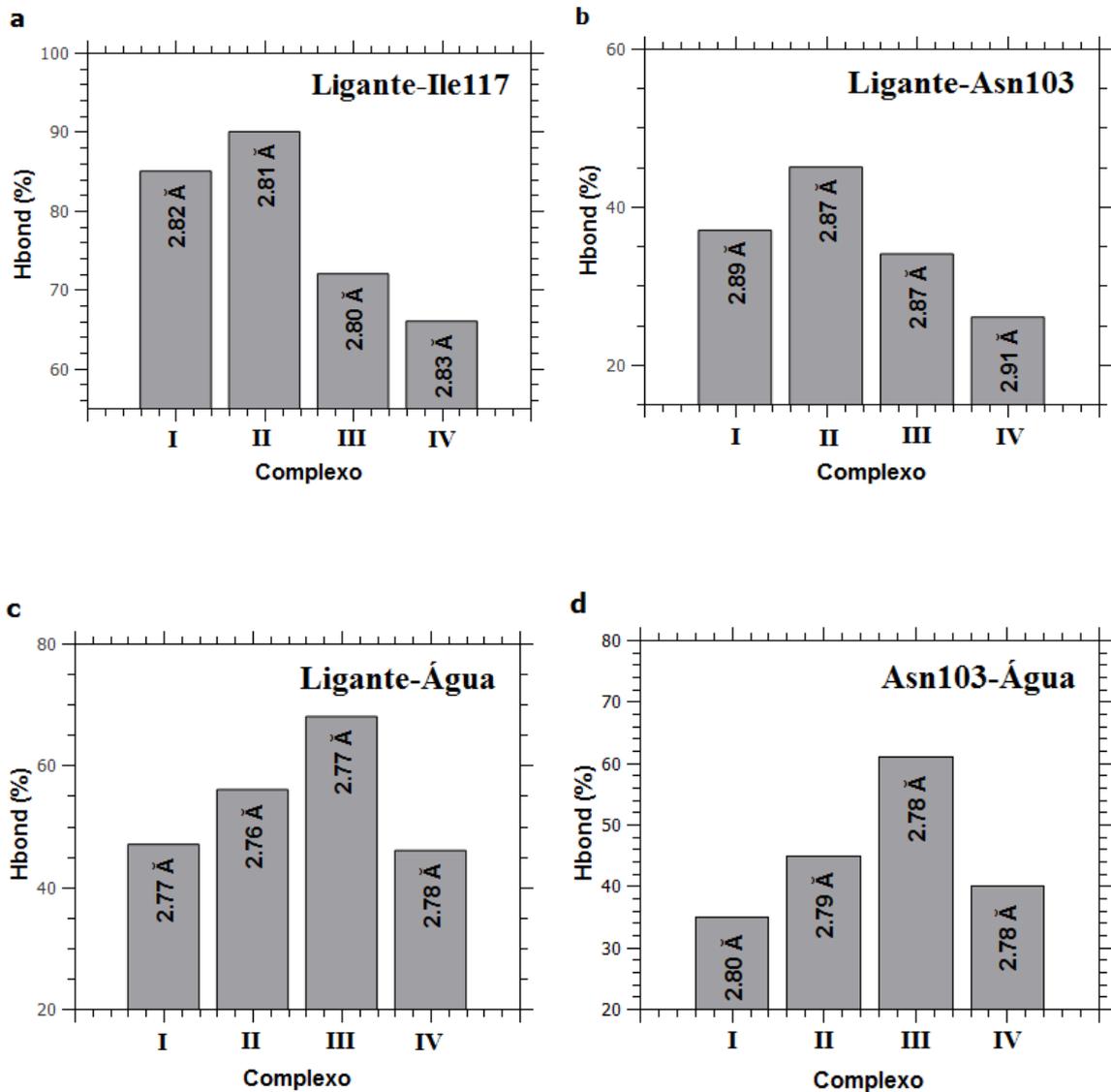
Ligante	X	R
I	O	OH
II	NH	OH
III	O	F
IV	NH	F

2.3.2 Dinâmica Molecular

Depois da minimização, conforme foi descrita na seção de metodologia, que teve como objetivo relaxar a estrutura para evitar maus contatos comuns em modelos recém gerados, executamos as simulações de equilíbrio com o *AMBER* 11.0. Essas simulações resultaram em trajetórias com 2000 *frames* com tempos de simulação de 20 ns para cada complexo. A partir dessas trajetórias pudemos avaliar características das interações intermoleculares mais importantes na formação dos complexos. Em uma dessas investigações nós analisamos a dinâmica da formação das ligações de hidrogênio no decorrer das simulações.

A quantificação das ligações de hidrogênio *Hbond* formadas entre os ligantes e os respectivos aminoácidos foi feita usando a ferramenta *CPPTRAJ*. Os resultados de *Hbond* podem ser observados na figura 9.

Figura 9 – Resultados *Hbond* obtidos para cada complexo. (a) ligações de hidrogênio formadas entre os ligantes e o resíduo Ile117. (b) ligações de hidrogênio formadas entre os ligantes e o resíduo Asn103. (c) ligações de hidrogênio formadas entre os ligantes e a molécula de água presente no sítio ativo. (d) ligações de hidrogênio formadas entre o resíduo Asn103 e a molécula de água presente no sítio ativo. O comprimento médio de cada ligação é mostrado escrito dentro das barras.



Os valores *Hbond* são computados através da razão entre o número total de ligações de hidrogênio formadas durante a trajetória, para um determinado par de átomos, e o número total de frames dessa trajetória. Os resultados, expressos em porcentagem, mostram os resíduos que participam do acoplamento ligante-proteína com a formação dessas ligações.

Conforme já apontado em trabalhos da literatura, as ligações de hidrogênio são o tipo de interação molecular mais importante para o ancoramento dos ligantes no sítio ativo da enzima *PfdUTPase* (RECIO et al., 2011). Além disso, os aminoácidos envolvidos nessas interações são os responsáveis pela seletividade dessas moléculas derivadas de desoxiuridina.

É notável em nossos resultados que todos os quatro ligantes avaliados formaram ligações de hidrogênio com o resíduo Ile117, com *hbond* superior a 65%, sendo o ligante II o que apresentou maior valor dessa quantidade, chegando a 90%. Uma consideração adicional referente ao resíduo Ile117 é que o mesmo pode formar ligações de hidrogênio tanto como doador quanto como acceptor. Na figura 9 podemos observar, ainda, de forma quantitativa, a contribuição que esse resíduo desempenha na formação dessas ligações.

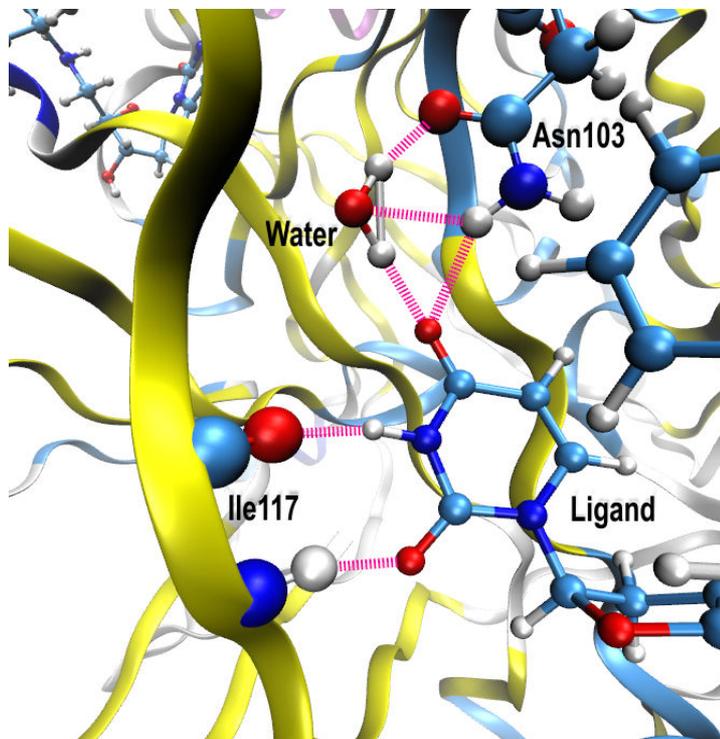
A importância do resíduo Ile117 no projeto racional de fármacos é devido ao fato do mesmo estar presente no sítio ativo da dUTPase de *Plasmodium falciparum* e não na sua equivalente em humanos, o que faz com que possamos otimizar um fármaco como inibidor da atividade da dUTPase de *Plasmodium falciparum* sem consequência prejudicial no funcionamento da enzima que desempenha o mesmo papel em humanos. Além de interações de ligação de hidrogênio, todos os ligantes, em seus respectivos complexos ligante-receptor, ainda interagem com as cadeias laterais do resíduo Ile117 através de interações hidrofóbicas.

Similarmente, o resíduo Asn103 aparece com grande prevalência como doador de ligação para o átomo de oxigênio da porção uracila dos ligantes. Além disso, percebemos a presença de molécula de água no interior da cavidade que compõe o sítio ativo formando diversas ligações durante todas as simulações. Os números indicam que essa molécula de água, oriunda da estrutura cristalográfica, desempenha função fundamental nas interações intermoleculares envolvidas na

formação e estabilização dos complexos. Essa água apresenta grande mobilidade dentro do sítio, interagindo principalmente com os ligantes e com o resíduo Asn103.

Durante a visualização das trajetórias notamos que, em muitos momentos, a água presente no sítio forma uma “ponte” entre o oxigênio da carbonila dos ligantes e o resíduo Asn103 (figura 10). Em outros momentos o ligante é capaz de interagir diretamente com o aminoácido. O *Hbond* correspondente à ligação ligante-Asn103 foi de no máximo 45% no complexo II e no mínimo 26% no complexo IV. Tanto os ligantes como o resíduo Asn103 formaram mais ligações de hidrogênio com a molécula de água do que entre si. O complexo III foi o que apresentou maior afinidade pela molécula de água, atingindo o valor de *Hbond* de 68% para a ligação ligante-água, seguindo a mesma tendência na ligação Asn103-água.

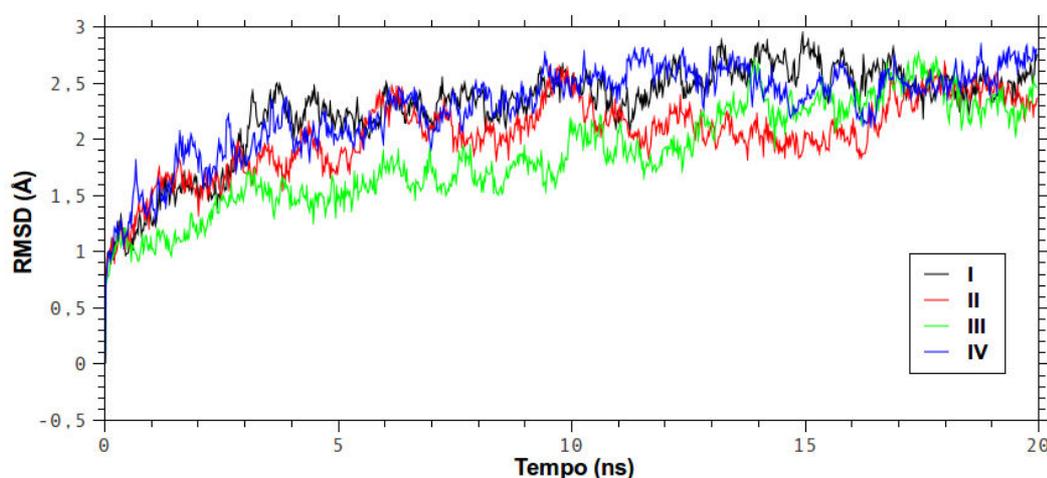
Figura 10: Representação da formação de ligações de hidrogênio no sítio ativo da PfdUTPase, coloridas em magenta, durante a simulação no complexo II. Estamos omitindo nessa figura a cadeia lateral da Ile117 para uma melhor visualização das ligações de hidrogênio.



As estruturas equilibradas obtidas na etapa anterior, usando o programa *AMBER*, foram utilizadas como ponto de partida para os cálculos SMD (*Steered Molecular Dynamics*), desta vez utilizando o programa *NAMD*, já que este software realiza com melhor performance esse tipo de simulação, se aproveitando do elevado paralelismo das GPUs (*Graphical Processing Units*).

É importante que as estruturas dos complexos ligante-receptor estejam equilibradas para a obtenção de resultados mais confiáveis quando se usa a metodologia SMD. Sendo assim, na figura 11 apresentamos o gráfico com os desvios RMSD (*root mean square deviation*) obtidos para as etapas de equilibração dos quatro complexos explorados.

Figura 11 – Desvio RMSD de todos os complexos obtido no decorrer de 20 ns de simulação. As curvas são referentes ao *backbone* da proteína.



A magnitude das forças resultantes nos cálculos SMD, à velocidade constante, é altamente influenciada por dois fatores: (i) a constante de força e (ii) a velocidade da retirada.

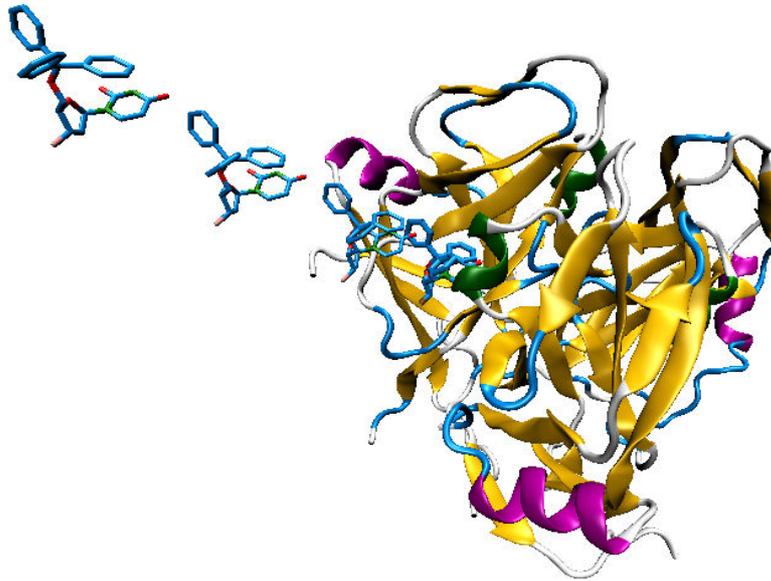
Para escolher a velocidade e a força adequada a cada sistema, precisamos executar diversas simulações com diferentes valores e assim obter elementos que

possam fundamentar essa escolha. Quando se utiliza altos valores de velocidade e força não é possível mimetizar de forma adequada o experimento de AFM, pois ocorre demasiada oscilação nos valores de força, o que significa altos níveis de erro nos resultados, conforme demonstrado por Isralewitz et al. 2001. A força aplicada deve ser a menor possível, mas que seja capaz de promover o deslocamento esperado do ligante para fora do sítio ativo da enzima, dentro do tempo de simulação disponível para a visualização desse evento.

A direção em que o ligante será puxado é determinada pela escolha do átomo que se manterá fixo e o átomo a se deslocar, chamado de átomo SMD. Para determinar a direção de saída foi feita uma análise cuidadosa do sítio de ligação, pela visualização da superfície 3D da proteína e em seguida fizemos a seleção de um aminoácido localizado bem ao centro da cavidade que se forma no sítio ativo. Para isso, o átomo de C_{α} da Gly106 foi o escolhido como sendo o átomo fixo. Outros dois átomos pertencentes aos aminoácidos vizinhos Leu107 e Ile105 foram testados como átomos fixos, entretanto, não resultaram em alterações significativas nos perfis de força.

Após serem definidos os átomos fixo e móvel, é traçado o vetor que indica a direção por onde o ligante será extraído. Na figura 12 ilustramos, de uma forma representativa, a direção de saída dos ligantes.

Figura 12: Representação da direção de saída no cálculo SMD.



Foi realizada uma série de simulações SMD com diferentes valores de constante de força e velocidade, o que chamamos de etapa de calibração. Adotamos a força externa de retirada do ligante de $0,2 \text{ kcal/mol/\text{Å}^2}$ a uma velocidade constante de $0,02 \text{ \AA/ps}$. Nessas condições o tempo de simulação de 4 ns se mostrou adequado para o completo desligamento e a obtenção de perfis de força com baixa flutuação.

Com o intuito de aumentar a confiabilidade dos resultados, a simulação de cada complexo foi repetida cinco vezes a partir de velocidades iniciais aleatórias. Na figura 14 mostramos um gráfico com os valores médios dessas cinco simulações para cada ligante.

Figura 13 – perfil de deslocamento dos ligantes de cada complexo ao longo da dinâmica SMD com duração de 4 ns. Cada curva representa a média de 5 simulações SMD.

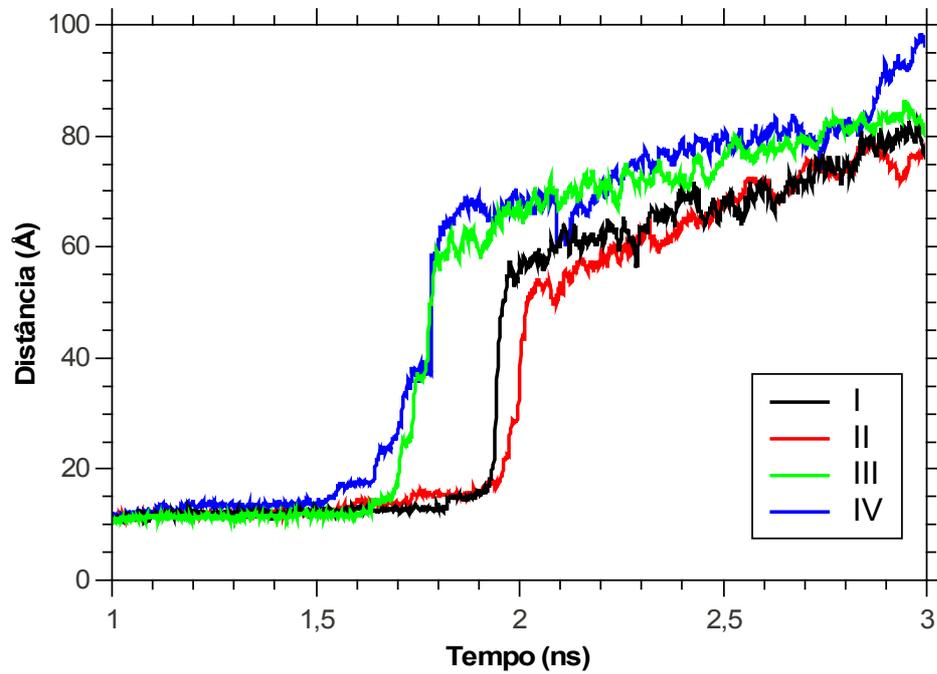
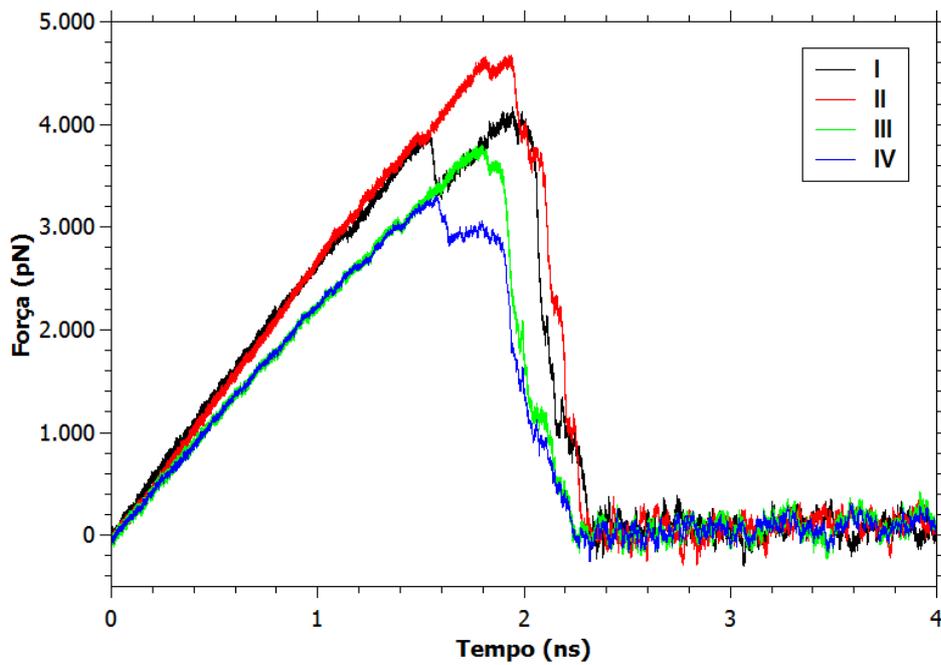


Figura 14 - perfil de forças de cada complexo ao longo da dinâmica SMD com duração de 4 ns. Cada curva representa a média de 5 simulações SMD.

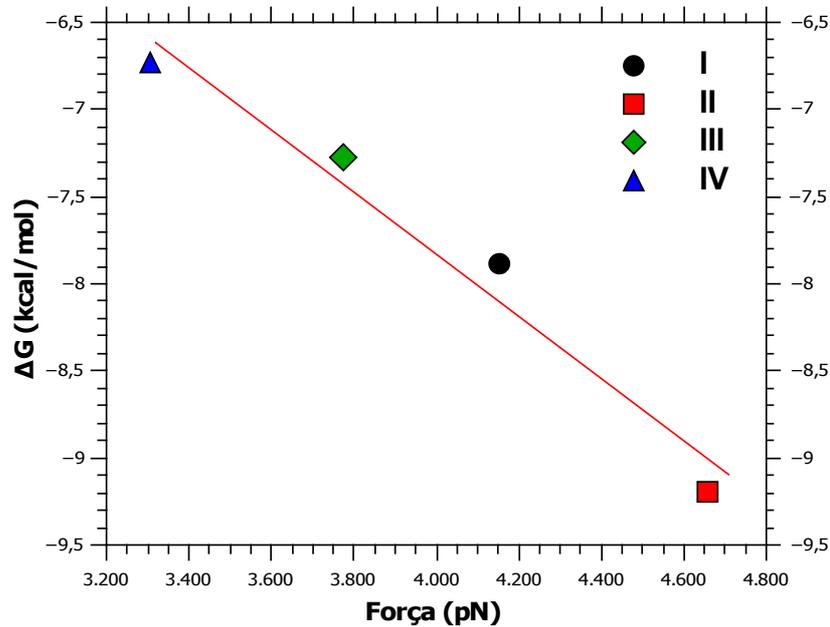


Os perfis força para todos os ligantes se iniciaram de modo semelhante, com um aumento da curva no início das simulações, devido à força aplicada, seguindo a mesma tendência ascendente até o respectivo pico de força. O valor máximo atingido pela força, ou força de pico (F_{max}) necessária para conseguir extrair o ligante do sítio ativo, marca o momento de ruptura das ligações de hidrogênio, com posterior decaimento até a linha de base onde a força oscila em torno de zero.

Em cada uma das curvas há a presença de dois picos, os quais estão associados ao rompimento de ligações de hidrogênio distintas. A primeira ligação de hidrogênio rompida é a formada entre o átomo de oxigênio da porção uracila dos ligantes e o átomo de hidrogênio do grupo amida no resíduo Asn103. Conforme mostrado na figura 9, observamos que esta ligação apresentou um comprimento médio ligeiramente maior que as demais. Além disso, em virtude da posição da Asn103 no sítio ativo ser exatamente a oposta à direção da puxada, naturalmente, esta foi a primeira ligação a se romper completamente. O primeiro pico ocorreu em aproximadamente 1,6 ns no caso dos ligantes **I** e **IV**, e em torno de 1,9 ns para os ligantes **II** e **III**. O segundo pico é referente à ligação formada entre Ile117 e a porção uracila dos ligantes. Nesse caso há a formação de duas ligações, ambos os resíduos atuam como doador e aceptor, não há distinção de pico no rompimento dessas ligações. De qualquer modo, a força necessária para promover o rompimento das ligações em relação ao resíduo Ile117 é consideravelmente maior que aquela formada com a Asn103, isto reforça a indicação de que esta é a interação chave no processo de ligação desses compostos.

O valor de F_{max} pode ser relacionado com a energia livre de ligação, pois quanto maior a afinidade dos ligantes maior a força necessária para extraí-los do sítio ativo e mais negativo será o ΔG de ligação (figura 15). Nossos resultados demonstraram estar de acordo com os obtidos experimentalmente por Whittingham et al. 2005. Para essa comparação, os valores de ΔG de ligação foram calculados a partir dos valores experimentais de K_i usando a expressão: $\Delta G_{lig} = -RT \ln(K_i)$.

Figura 15 – Gráfico de força de pico F_{max} versus ΔG_{lig} experimental para cada um dos complexos.



O que se percebe no gráfico é que os pontos seguem uma relação praticamente linear, onde os complexos que possuem ΔG_{lig} mais negativo apresentaram valores de força proporcionais. O ligante II, para qual o ΔG_{lig} é de -9,2 kcal/mol se destaca entre os demais, com F_{max} de 4.657 pN. A equação calculada para a reta formada foi: $\Delta G_{lig} = -1,81 \times 10^{-3} \text{ Força} - 5,72 \times 10^{-1}$; O valor da correlação linear R^2 de 0,96 confirma boa linearidade alcançada utilizando essa estratégia de simulação.

2.4 Conclusões

A análise dos resultados de *Hbond* mostrou que todos os quatro ligantes avaliados formaram ligações de hidrogênio com o resíduo Ile117, com *hbond*

superior a 65%, sendo o ligante **II** o que apresentou essa ligação com maior frequência, chegando a 90% da trajetória. Ainda sobre a análise *Hbond*, o ligante do complexo **II** foi o que demonstrou maior afinidade pelo sítio ativo neste tipo de interação, seguido pelos complexos **I**, **III** e **IV**.

O resíduo Asn103 demonstrou grande prevalência como doador de ligação para o átomo de oxigênio da porção uracila dos ligantes.

Os resultados indicam que a molécula de água presente no sítio ativo, oriunda da estrutura cristalográfica, desempenha função fundamental nas interações intermoleculares envolvidas na formação e estabilização dos complexos.

As simulações SMD tiveram resultado compatível com a análise *Hbond*. A força necessária para promover o completo desligamento dos derivados de desoxiuridina do sítio ativo da enzima foi maior para o complexo **II**, acompanhada pelos complexos **I**, **III** e **IV**.

REFERÊNCIAS

- BERENDSEN, H. J. C. Simulating the real world. **Simulation**, v. 24 Suppl 1, p. 1–3, 2001.
- BERMAN, H. M. et al. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 235–242, 2000.
- CARMINATTI, C. A. et al. Anthranilate synthase subunit organization in *Chromobacterium violaceum*. **Genetics and molecular research GMR**, v. 7, p. 830–838, 2008.
- CASE, D. A. et al. The Amber biomolecular simulation programs. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, p. 1668–1688, 2005.
- COLOVOS, C.; YEATES, T. O. Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. **Protein Science**, v. 2, p. 1511–1519, 1993.
- EISENBERG, D.; LÜTHY, R.; BOWIE, J. U. VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Methods in Enzymology**, v. 277, p. 396–404, 1997.
- HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, v. 14, p. 33–38, 1996.
- IOSET, J.-R.; CHANG, S. Drugs for Neglected Diseases initiative model of drug development for neglected diseases: current status and future challenges. **Future medicinal chemistry**, v. 3, p. 1361–1371, 2011.
- ISRALEWITZ, B.; GAO, M.; SCHULTEN, K. Steered molecular dynamics and mechanical functions of proteins. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 11, p. 224–230, 2001.
- LARKIN, M. A. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, p. 2947–2948, 2007.
- LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, p. 283–291, 1993.

LEE, S. J.; SEO, E.; CHO, Y. Proposal for a new therapy for drug-resistant malaria using Plasmodium synthetic lethality inference. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 3, p. 119–128, dez. 2013.

MADDEN, T. **The BLAST Sequence Analysis Tool - The NCBI Handbook - NCBI Bookshelf** NCBI Handbook, 2002.

MCCARTHY, O. et al. Design, synthesis and evaluation of novel uracil acetamide derivatives as potential inhibitors of Plasmodium falciparum dUTP nucleotidohydrolase. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 678–688, 2009.

PERSSON, R.; CEDERGREN-ZEPPEZAUER, E. S.; WILSON, K. S. Homotrimeric dUTPases; structural solutions for specific recognition and hydrolysis of dUTP. **Current Protein Peptide Science**, v. 2, p. 287–300, 2001.

PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, p. 1605–12, 2004.

PHILLIPS, J. C. et al. Scalable molecular dynamics with NAMD. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, p. 1781–802, 2005.

RAMACHANDRAN, G. N.; VENKATACHALAM, C. M. Stereochemical criteria for polypeptides and proteins. IV. Standard dimensions for the cis-peptide unit and conformation of cis-polypeptides. **Biopolymers**, v. 6, p. 1255–1262, 1968.

RECIO, E. et al. Site-directed mutagenesis provides insights into the selective binding of trityl derivatives to Plasmodium falciparum dUTPase. **European journal of medicinal chemistry**, v. 46, n. 8, p. 3309–14, ago. 2011.

SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **Journal of Molecular Biology**, v. 234, p. 779–815, 1993.

WHITTINGHAM, J. L. et al. dUTPase as a platform for anti-malarial drug design: structural basis for the selectivity of a class of nucleoside inhibitors. **Structure London England** 1993, v. 13, p. 329–338, 2005.

WHO, W. H. O. **World Malaria Report World Health**, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the treatment of malaria, 2nd edition** WHO, 2010.

XIANG, Z. Advances in homology protein structure modeling. **Current protein peptide science**, v. 7, p. 217–227, 2006.

ZHANG, J.; ZHENG, Q.; ZHANG, H. Unbinding of glucose from human pulmonary surfactant protein D studied by steered molecular dynamics simulations. **Chemical Physics Letters**, v. 484, n. 4-6, p. 338–343, jan. 2010.