

# ESTUDO DE POTENCIAIS INIBIDORES DA SUBTILISINA 1 DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* POR DINÂMICA MOLECULAR

**Thaís das Virgens Cardoso<sup>1</sup>; Franco Henrique Andrade Leite<sup>2</sup>; David Bacelar Costa Junior<sup>3</sup>; Janay Stefany Carneiro Araujo; Larissa de Mattos Oliveira<sup>5</sup>**

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Farmácia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: Thais.v.cardoso@hotmail.com
2. Orientador, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: fhpharm@gmail.com
3. Participante do projeto, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: dbcjunior.uefs@gmail.com
4. Participante do projeto, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: janay@hotmail.com
5. Participante do projeto, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: lare\_oliveira@yahoo.com.br

**PALAVRAS-CHAVE:** Malária, subtilisina 1, dinâmica molecular.

## INTRODUÇÃO

A malária é uma doença infecciosa caracterizada por episódios febris, causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium* ssp. *P. falciparum* é o principal responsável pela forma mais grave da doença, a malária cerebral (BLACKMAN et al., 2012) que pode levar a morte. A terapia antimalárica atual é limitada, devido ao surgimento de cepas multirresistentes aos principais fármacos utilizados na terapêutica, como a mefloquina, cloroquina, artesunato, artemisinina, além do perfil de efeitos adversos graves (ex.: surtos psicóticos e convulsões) (GERMANO, 2005). Assim, torna-se necessária a identificação de potenciais moléculas bioativas para o desenvolvimento de fármacos mais potentes, seletivos e seguros através da exploração de alvos que são importantes para o ciclo de vida do parasita, como a Serino-protease subtilisina 1 do *P. falciparum* (PfSUB1; E.C 4LVN). Para alcançar esse objetivo, técnicas baseadas no conhecimento da estrutura do alvo macromolecular (ex.: acoplamento molecular) podem ser empregadas para a priorização de moléculas candidatas aos ensaios biológicos, juntamente com dinâmica molecular para a identificação do provável modo de ligação e caracterização das interações responsáveis pela estabilização da(s) molécula(s) no sítio de ligação. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar através de simulações de dinâmica molecular a estabilidade e a permanência das moléculas previamente priorizadas no plano anterior (Z174 e Z594; CNPq N° 21, 2016-2017) no sítio ativo da PfSUB1.

## MATERIAL E MÉTODOS OU METODOLOGIA (ou equivalente)

### Preparo do receptor:

A estrutura 3D da PfSUB1 (PDB: 4LVN) foi preparada com auxílio do módulo Biopolymer disponível na plataforma SYBYL®-X 2.0 (TRIPOS, 2012). Moléculas de água foram removidas e átomos de hidrogênio foram adicionados de forma a otimizar suas ligações de hidrogênio. O estado de protonação foi avaliado através do servidor H++ (<http://biophysics.cs.vt.edu>) conforme análise do ambiente químico de cada resíduo e seu pKa e possíveis tautômeros dos resíduos presentes no sítio ativo foram

ajustados manualmente, conforme disponível no módulo Biopolymer da plataforma SYBYL<sup>®</sup>-X 2.0.

### **Parametrização das moléculas:**

Z174 e Z594 (> média mais duas vezes o desvio padrão) obtida na etapa de acoplamento molecular (CNPq N° 21, 2016-2017) foram parametrizadas para as rotinas de dinâmica molecular. Para tal, as coordenadas 3D das poses melhores pontuadas foram submetidas ao servidor ATB 1.0 (MALDE et al., 2011, <http://compbio.biosci.uq.edu.au/atb/>) para a geração da sua topologia, usando o campo de força GROMOS96 53a6 (VAN DER SPOEL et al., 2005).

### **Simulações de Dinâmica Molecular:**

As simulações de DM foram executadas no pacote GROMACS 5.1.2 (VAN DER SPOEL et al., 2005), com os seguintes parâmetros: campo de força GROMOS 53a6 e pressão de 1 bar. Posteriormente, ciclos de minimização energética (1000 ciclos de SteepestDescent (SD) e Gradiente Conjugado (GC), com critério de convergência de força de 1 Kcal/mol/Å), dinâmica de restrição (tempo = 1ns) e dinâmica produtiva de dados foram executados para a forma APO e complexo.

O sistema foi solvatado em caixa cúbica com modelo de água SPC/E(BERENDSEN; GRIGERA; STRAATSMA, 1987) com a proteína posicionada no centro da caixa com a distância 1,4 nm da borda da caixa. Contra-íons (Na<sup>+</sup> ou Cl<sup>-</sup>) foram adicionados para neutralização dos sistemas. O método Lincs (HESS et al., 1997) foi aplicado na restrição de ligações covalentes de forma a permitir um passo de integração a cada 2 femtosegundos (fs). Os dados de dinâmica molecular foram obtidos no *ensemble* isotérmico-isobárico - NPT (número de partículas, temperatura e pressão constante), usando condições de contorno periódicas. As interações eletrostáticas e hidrofóbicas foram descritas pelo método PME (do inglês, *ParticleMeshEwald*) (DARDEN, YORK, PEDERSEN, 1993) com raio de corte igual a 0,9 nm.

A estabilidade do sistema será avaliada pelos parâmetros energéticos (energia total, cinética e potencial), valor do desvio médioquadrático (RMSD, do inglês *Root Mean Square Deviation*), disponível no pacote GROMACS 5.1.2.

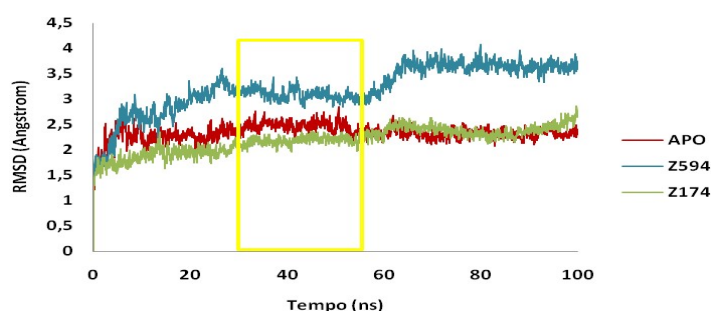
### **Seleção da estrutura representativa:**

A estrutura representativa de cada complexo durante a fase produtiva da DM foi calculada a partir do agrupamento das conformações semelhantes com auxílio do módulo *g\_cluster* disponível no pacote GROMACS 5.1.2. Para tal foi utilizado o método de união GROMOS (DAURA; VAN GUNSTEREN; MARK, 1999) com valores de RMSD de 0,1 0,15 0,2 0,25 0,3e0,35nm, para a definição do ponto de corte. A seguir, a estrutura média no agrupamento mais representativo foi selecionado e utilizada para a avaliação das principais interações intermoleculares das moléculas com

a PfSUB1 com o auxílio do programa PLIP (<https://projects.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>).

## RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO (ou Análise e discussão dos resultados)

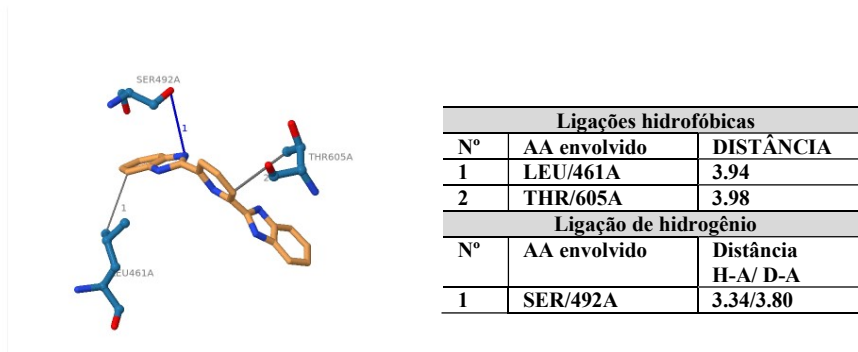
Em estudos anteriores (CNPq N° 21, 2016-2017) Z174 e Z594 foram priorizadas por acoplamento molecular e portanto selecionadas para a etapa de DM. Essa rotina permitiu avaliar o efeito da presença de Z174 e Z594 no sítio de ligação para a estabilização da enzima. Assim foi realizada uma comparação dos gráficos de RMSD das simulações de DM da forma APO, APO- Z174 e APO- Z594 (Figura 1).



**Figura 2.** RMSD das estruturas submetidas a Dinâmica Molecular. Em verde, a estrutura APO, em vermelho, complexo APO-e ligante Z174, em azul, complexo APO-e ligante Z594, em destaque amarelo, o período estabilidade dos três sistemas.

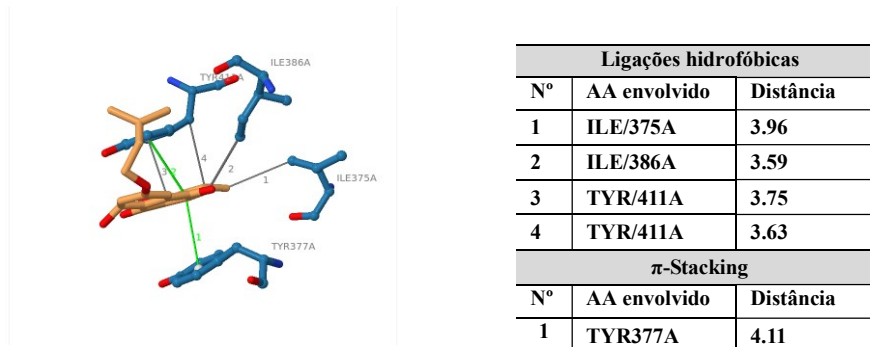
A partir das análises dos RMSD verificou-se uma fase da DM que poderia ser considerada como período de maior estabilidade dos sistemas (30-50 ns). Nesse período a amplitude as variações do sistema foi menor que 2 Å (SOARES,2009). Assim, essa análise permitiu determinar o período de maior estabilidade dos complexos para a obtenção das estruturas mais representativas da DM. Nesse momento foram avaliadas as interações responsáveis pela estabilidade dos complexos.

A estrutura representativa de Z174 apresentou duas ligações hidrofóbicas com a LEU461 e THR605 e uma ligação de hidrogênio com a SER492, que ocorre no ponto doador da Serina com o nitrogênio do ligante Z174 com receptor. Esse aminoácido do sítio ativo é fundamental na atividade da PfSUB1 que é uma Serino protease, sendo, (figura 4.), possivelmente responsável pela resposta observada na DM, complexo APO-Z174 (figura 2).



**Figura 2.** Mapa das interações intermoleculares entre o ligante Z174 (laranja e azul) e o sítio da subtilisina 1 do *Plasmodium falciparum*. Representado em uma liga azul a ligação de hidrogênio e em cinza as ligações hidrofóbicas.  
**Fonte:** Protein-Ligand Interaction Profiler.

A estrutura representativa de Z594 apresentou quatro ligações hidrofóbicas com os aminoácidos, ILE(375, 386), TYR411 e interações por empilhamento  $\pi$ - $\pi$  paralelo entre os com o fenóis da TYR(377, 411) e o grupo fenol da do ligante Z594 (Figura 3.).



**Figura 3.** Mapa das interações intermoleculares entre o ligante Z594 e o sítio da Subtilisina 1 do de *Plasmodium falciparum*. Representado em linhas verdes as interações do tipo empilhamento  $\pi$  e linhas cinza interações hidrofóbicas.

Fonte: Protein-Ligand Interaction Profiler.

As interações com esses resíduos apesar de não serem ligações de hidrogênio podem ter contribuído para a permanência do ligante no sítio ativo, ainda que no período de tempo da simulação o ligante Z594 apresentou um patamar no RMSD maior que a simulação com a APO.

### CONSIDERAÇÕES FINAIS (ou Conclusão)

A análise dos dados da simulação da Dinâmica Molecular com os ligantes Z174 e Z594, permitiu caracterizar o perfil de interações das moléculas promissoras para a inibição da subtilisina 1, observando seu acoplamento quando submetidas a condições mais similares ao meio biológico. Os dois ligantes permaneceram dentro sítio, contudo o ligante Z174 demonstrou-se mais estáveis dentro do sítio ativo durante o tempo de simulação no sistema. Assim, é promissora a continuação do estudo e avaliação do tanto do comportamento do ligante Z174, quanto para o ligante Z954.

### REFERÊNCIAS

- BLACKMAN, M. J. et al. 2011 Global Identification of Multiple Substrates for *Plasmodium falciparum* SUB1, an Essential Malarial Processing Protease. **Infection and Immunity**, 79( 3): 1086-1097.
- CHEMAXON. 2015, **Marvin Sketch** version 15.4.20: ChemAxon.
- DARDEN, T; YORK, D; PEDERSEN, L.. 1993. Particle mesh Ewald: Na  $N \cdot \log(N)$  method for Ewald sums in large systems. 1. **Chem. Phys.** 98.
- GERMANO, N., MENDONÇA, R. P., MURINELLO, A. 2005. Adequação dos fármacos antimaláricos na quimioprofilaxia e tratamento da malária em países não endêmicos. **Medicina Interna**. 12(3).
- SOUZA, R.O.S. 2009. **Dinâmica Molecular de proteínas: estabilidade e renaturação térmica**. Ribeirão preto.: 86
- VAN DER SPOEL, D. ET AL. 2005. GROMACS: Fast, flexible, and free. **Journal of Computational Chemistry**. 26 (16):1701-1718.