

OTIMIZAÇÃO *IN SILICO* DO FÁRMACO ANTICANCERÍGENO L-ASPARAGINASE

Ronaldo Correia da SILVA

SILVA, Ronaldo Correia da. **Otimização *in silico* do fármaco anticancerígeno L-Asparaginase**. Projeto de investigação científica do Curso de Biomedicina – Faculdade Integrada Brasil Amazônia (FIBRA), Belém, 2014.

A proposta desta investigação foi utilizar ferramentas de bioinformática para construir os modelos teóricos, usando modelagem por homologia, de L-Asparaginases de fungos obtidas do banco de dados de genes GenBank. As asparaginases (L-asparagina amidohidrolase E.C. 3.5.1.1, L-ASNase), produzidas por muitas espécies de bactérias, fungos filamentosos, leveduras, actinomicetos, plantas e algas, são enzimas responsáveis pela catálise da reação de hidrólise do aminoácido L-asparagina, que resulta na produção de ácido aspártico e amônia. Desde 1953, essas enzimas são conhecidas por sua atividade anticancerígena (KIDD *et al.*, 1953), devido à dependência que alguns tecidos tumorais têm de L-

asparagina extracelular para sua proliferação celular. Assim, uma vez injetadas na corrente sanguínea, as L-ASNases reduzem a quantidade de asparagina no corpo, impedindo que as células tumorais absorvam esse aminoácido, levando a uma inibição na síntese de DNA e RNA, com conseqüente deterioração da função celular e morte da célula. Grande parte das preparações de asparaginases para uso terapêutico é produzida por *Escherichia coli*, sendo comercializadas sob os seguintes nomes: AsparaginaseMedac© (Medac, KyowaHakko), Crasnitin© (Bayer AG), Ciderolase© (Rhône-PoulencRorer), Elspar© (MSD, Rhône-PoulencRorer), Oncaspar© (Enzon, Rhône-PoulencRorer, Medac). A exceção é o medicamento de nome comercial Erwinase© (Speywood), o qual é produzido pelo microrganismo *Erwiniacrysanthemi*. Apesar de sua importância, as formulações de L-ASNases comercialmente disponíveis apresentam elevadas taxas de reações de hipersensibilidade, que são mediadas provavelmente por IgG e raramente IgE, ou estão relacionadas à ativação de complemento. As reações de hipersensibilidade atingem de 15 a 73% dos pacientes, crianças ou adultos, tratados com a enzima e são acompanhadas de formação de

anticorpos anti-L-asparaginase, o principal fator envolvido na redução da meia vida da enzima no plasma. Entre essas reações, são observadas urticária, edema, febre, erupções na pele e mais raramente choques anafiláticos fatais. Esse cenário demonstra a importância dos estudos de modelagem molecular no planejamento de fármacos a partir de outros microorganismos. A L-asparaginases de fungos, apesar de encontradas em grande parte da diversidade biológica, em especial nos microrganismos, e possuem enorme potencial para o desenvolvimento de novas drogas, especialmente à luz da biologia sintética, a análise de sua diversidade tem sido negligenciada. A proposta pode ser uma importante estratégia para a otimização de L-asparaginases e, em conjunção com as tecnologias de predição estrutural *in silico*, pode racionalizar o desenho de novos fármacos. Os procedimentos adotados no estudo foram: uso de um modelo tridimensional validado da proteína L-Asparaginase do fungo *Aspergillusterreus*; construção de um mapa de potencial eletrostático para estudo da superfície e cavidades da L-Asparaginase de *Aspergillusterreus*; simulação de mutações na proteína em busca das melhores conformações que favoreçam um

melhor modo de ligação da asparagina e glutamina; comparação dos principais resíduos do sitio catalítico da enzima modificada (mutação) com a enzima selvagem. A proposta foi baseada na análise de sequências de fungos *Aspergillusterreus* oriunda do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>). Foram realizadas consultas no banco de dados Pfam, que classifica motivos protéicos funcionais como o intuito de recuperar informações acerca dos domínios catalíticos da proteína estudada para posterior construção de modelo. Foram construídos diversos modelos tridimensionais para cada uma das sequências de L-asparaginases, utilizando-se o programa de modelagem comparativa MODELLER versão 9.10, partindo do alinhamento entre o alvo e a proteína-modelo. A proteína foi predita a partir da técnica de modelagem por homologia e, então, validada. Parâmetros eletrônicos são fatores fundamentais quando se deseja obter informações sobre interações enzima-ligante ou descrever o comportamento de como moléculas complexas interagem umas com as outras (POSKOZIM, 1997). Os Mapas de potencial eletrostático (MPE) são utilizados para interpretar qualitativamente reações eletrofílicas e nucleofílicas, cálculos de cargas

atômicas e para comparar ou estimar a semelhança entre um conjunto de moléculas (TASI, 1993). Foram gerados os MPEs, após a sobreposição de uma partícula carregada positivamente, que, sob a superfície de contato de van der Waals na molécula, revela uma região de repulsão e atração, representando o potencial positivo e negativo, respectivamente, de coloração azulada e avermelhada. Simulações de diversas mutações no sítio catalítico e/ou nos resíduos próximos foram realizadas com o objetivo de alcançar a melhor conformação que favorecesse as interações enzima-substrato (LEACH, 2001; MORGON, 2007; CHEN, 2010), além de comparação das mudanças estruturais com a enzima selvagem. Sugere-se que o modelo construído possui boa disposição espacial quanto aos ângulos de torção de seus resíduos e diversas regiões com baixa energia, o que contribui para a estabilidade e confiabilidade do modelo gerado. O modelo gerado apresenta 9 alfa hélice e 11 betas folhas. Além disso, identificaram-se as extremidades N e C terminal da estrutura. Com o alinhamento entre o alvo e o molde, observou-se um RMSD de 0.12 ângstrons abaixo do limite de 3,5 Å, próximo de 0 (zero), o que significa apenas um pequeno

desvio em relação à construção da estrutura tridimensional. Dos 10 resíduos encontrados no sítio catalítico do da I_Asparginase de *Erwiniacarotovora*(2GVB), 9 se mostram conservados no modelo gerado de *Aspergillusterreus*). Os resíduos Gly11 e Thr12 estão localizados entre β 1 e α 1; Gly58; Ser59 e Pro60 estão localizados entre β 2 e α 3; Gly92; Thr93 e Asp94 estão localizados entre β 2 e α 3; Ala118 estão localizados entre β 3 e α 4; e Lys166 está localizado entre β 6 e β 7. Os aminoácidos Gly58, Ser59, Pro60, Gly92, Thr93, Asp94, Ala118 e Lys166 do alvo são idênticos aos resíduos Gly14, Thr15, Gly61, Ser62, Glu63, Gly94, Thr95, Asp96, Ala120 e Lys168 do molde, exceto o resíduo Pro60 (alvo), que difere da Glu63 (molde). Buscar alternativas aos fármacos já existentes é mais que um desafio, é uma necessidade, tendo em vista os relatos dos efeitos adversos dos medicamentos já comercializados. Compreender a estrutura desses medicamentos ao nível molecular abre precedentes para alternativas a partir de outros micro-organismos fonte. Diante dos bons resultados encontrados, pode-se afirmar que a modelagem molecular por homologia é uma alternativa confiável para predição de estruturas

tridimensionais, além de acelerar o processo de elucidação de proteínas utilizadas como fármacos em curto espaço de tempo e a custos reduzidos. Foi possível visualizar a estrutura completa da enzima L-Asparaginase de *Aspergillus terreus*, incluindo seu sítio de catálise, que se mostrou conservado durante o processo evolutivo. Isso sugere funções semelhantes e expectativas quanto aos estudos de interações com o substrato asparagina, possível apenas por meio de estudo de docagem e dinâmica molecular.

Palavras-chave: *Sílico*. L-asparaginase. Docagem. Dinâmica molecular.

REFERÊNCIAS

KIDD, J.G. (1953) Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum—course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum or rabbit serum. J Exp Med, v. 98, p. 565–582.

CHEN, Y; POHLHAUS, D. T. In silico docking and scoring of fragments, Drug Discov. Today Technologies. 2010;7:149-156.

LEACH, A. R. Molecular modelling: principles and applications. 2001;2^a ed Pearson Education Limited, Edinburgh Gate, 744.

MORGON, N. H.; COUTINHO, K. Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular. 2007;São Paulo, Editora Livraria da Física, 539p.

POSKOZIM, P. S. (1997). *J. Chem. Educ.* 74, 491.

TASI. Calculation of electrostatic potential maps and atomic charges for large molecules, 1993.