

# MODELAGEM DE PROTEÍNAS COM IMPORTÂNCIA FARMACÊUTICA E BIOMÉDICA POR MEIO DE SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL

Ronaldo Correia da SILVA

SILVA, Ronaldo Correia da. **Modelagem de proteínas com importância farmacêutica e biomédica por meio de simulação computacional.** Projeto de investigação científica do Curso de Biomedicina – Faculdade Integrada Brasil Amazônia (FIBRA), Belém, 2015.

Utilizar ferramentas de bioinformática para construir os modelos teóricos, usando modelagem por homologia, de L-Asparaginases de fungos e bactérias obtidas do banco de dados de genes GenBank, foi o objetivo desta investigação científica. O estudo de proteínas utiliza-se de anotações dessas macromoléculas e bancos de dados disponíveis na internet. Embora as informações necessárias para que a vida continue seja codificada pela molécula de DNA, os processos dinâmicos de manutenção da vida, replicação celular, defesa e reprodução são realizados pelas proteínas. A análise das estruturas das proteínas fornece uma visão fundamental

para a maioria das funções bioquímicas e, conseqüentemente, para a causa e tratamento de doenças. Sua estrutura primária é a seqüência linear de aminoácidos, diferenciando-se uns dos outros por meio das cadeias laterais. A função das proteínas está intimamente relacionada com sua forma, e essa é determinada por sua seqüência primária. Determinar a estrutura nativa de uma proteína, a partir de sua seqüência, trata-se de uma questão multidisciplinar, abrangendo diversas áreas como: engenharias, ciência da computação, biologia, matemática e química. 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. 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 consequente deterioração da função celular e morte da célula. Apesar de sua importância, as formulações de L-ASNases comercialmente disponíveis apresentam elevadas taxas de reações de hipersensibilidade mediadas provavelmente por IgG e raramente por 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. Os métodos atuais de predição tridimensional podem ser classificados basicamente em dois tipos: modelagem *ab initio* e modelagem comparativa. Até 2009, os métodos *ab initio* só foram verdadeiramente bem-sucedidos na predição de pequenas proteínas ou polipeptídeos. Os modelos baseados em métodos de modelagem comparativa, no entanto, conseguiram produzir modelos de alta precisão e com

maior número de resíduos. Esse cenário demonstra a importância dos estudos de modelagem molecular no planejamento de fármacos a partir de outros micro-organismos. Apesar de encontradas em grande parte da diversidade biológica, em especial nos micro-organismos e embora possuam enorme potencial para o desenvolvimento de novas drogas, especialmente à luz da biologia sintética, a análise da diversidade de L-asparaginases de fungos 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. Essa investigação foi baseada na análise de sequências de bactérias e fungos oriunda do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>). Foram realizadas consultas no banco de dados Pfam (FINN *et al.*, 2010), que classifica motivos protéicos funcionais, para recuperar informações acerca dos domínios catalíticos da proteína estudada para posterior construção de modelo. A proteína foi predita a partir da técnica de modelagem por homologia e então validada. Foram gerados mapas de potencial eletrostático (MPE),

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 simuladas 50ns de dinâmica molecular em um dos sistemas propostos e estudadas as interações nos modelos. Foi construído um modelo tridimensional da L-Asparaginase de *Aspegillusterreus* e *Pseudomonasfluorecens*, destacando-se o tio ativo da enzima. A sequência da proteína em estudo foi alinhada no servidor *Protein Data Bank* – PDB, com a finalidade de escolher os melhores homólogos ao alvo. A partir de então, foi gerado um banco de dados para posterior alinhamento das sequências no MODELLER versão 9.10 e comparadas entre si. Após a comparação, foi selecionado como *template* estrutura de L-Asparaginase de *Erwiniacarotovora*(código PDB: 2GVN).Em seguida foram gerados vários modelos para serem validados considerando a qualidade estéreo-química e a estabilidade do sistema, por meio do RamachandranRampage e ANOLEA, respectivamente. 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  $\beta$ 1 e  $\alpha$ 1; Gly58, Ser59 e Pro60 estão localizados entre  $\beta$ 2 e  $\alpha$ 3; Gly92, Thr93 e Asp94 estão localizados entre  $\beta$ 2 e  $\alpha$ 3; Ala118 estão localizados entre  $\beta$ 3 e  $\alpha$ 4 e Lys166 está localizado entre  $\beta$ 6 e  $\beta$ 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. 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. Considerando-se que foi possível verificar a estrutura completa da enzima L-Asparaginase de *Aspergillus terreus* e *Pseudomonas fluorescens*, 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:** L-Asparaginases. Simulação computacional. GenBank. Mapas de potencial eletrostático.

## 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.

FINN, R. D. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*, v. 38, p. 211-222, 2010.

TASI, G.; PALINKÓ, I.; NYERGES, L.; FEJES, P.; HORST, F. Calculation of electrostatic potential maps and atomic charges for large molecules.

.