

Estudos de modelagem comparativa da enzima 14 α -esterol desmetilase de *Leishmania major* na busca por novos agentes leishmanicidas

Cleber Camilo de Melo Filho¹, Rodolpho de Campos Braga², Carolina Horta Andrade³

¹ccmf89@gmail.com, ²rcbraga@gmail.com, ³carolandrade@gmail.com

Laboratório de Modelagem Molecular – LabMol, Faculdade de Farmácia

Palavras-chave: Leishmanioses, modelagem comparativa, *docking*

1. INTRODUÇÃO

.1 Leishmaniose

As leishmanioses formam um conjunto de doenças causadas por pelo menos 24 espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, sendo transmitidas por cerca de 30 espécies de insetos vetores pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomya* (HERWALDT, 1999; DESJEUX, 2004). Elas podem ser classificadas em três manifestações clínicas principais, dependendo da espécie de *Leishmania* infectante e da capacidade de resposta imune do hospedeiro (SOARES-BEZERRA *et al.*, 2004; WHO, 2011) :

- (i)Visceral ou calazar, causada principalmente pela *L. donovani*, mas também pela *L. infantum* e *L. chagasi*. Acomete os órgãos internos e é caracterizada por febre irregular, perda de peso, hepatoesplenomegalia e anemia.
- (ii)Mucocutânea, causada pela *L. brasiliensis* e caracterizada por lesões que destroem parcial ou totalmente a mucosa nasal e oral, causando deformidades.
- (iii)Cutânea, causada pela *L. mexicana*, *L. tropicana* e *L. major*, compreendendo lesões ulcerativas em áreas expostas como pernas, braços e outras.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (2011), estima-se que 2 milhões de novos casos de leishmaniose ocorram anualmente e que, em todo o mundo, 12 milhões de pessoas estejam infectadas. Além disso, é importante salientar que o impacto da leishmaniose na saúde pública mundial está subestimado, pois a declaração da doença é compulsória em apenas 32 dos 88 países afetados por essa parasitose.

Orientando: Cleber Camilo de Melo Filho

Colaborador: Rodolpho de Campos Braga

Orientador: Carolina Horta Andrade

Revisado pelo orientador

Dentre as manifestações clínicas, a leishmaniose visceral, também conhecida como calazar, é a mais grave, afetando cerca de 500 milhões de pessoas por ano. As regiões da Índia, Sudão, Nepal, Bangladesh e países da América Latina são as mais atingidas (Figura 1) (WHO, 2011). Em pacientes imunodeprimidos a situação é mais crítica, onde o parasito torna-se um importante agente oportunista. A imunodepressão causada por infecções virais como o HIV aumentou o número de casos da doença em países onde a leishmaniose visceral é rara, como França, Itália, Espanha e Portugal (DESJEUX & ALVAR, 2003; SANTOS *et al.*, 2008). No Brasil, observa-se que, nos últimos anos, a letalidade por leishmaniose visceral tem aumentado gradativamente passando de 3,6% no ano de 1994 para 6,7% em 2003, representando um aumento de 26% na letalidade da doença (Secretaria de Vigilância em Saúde).

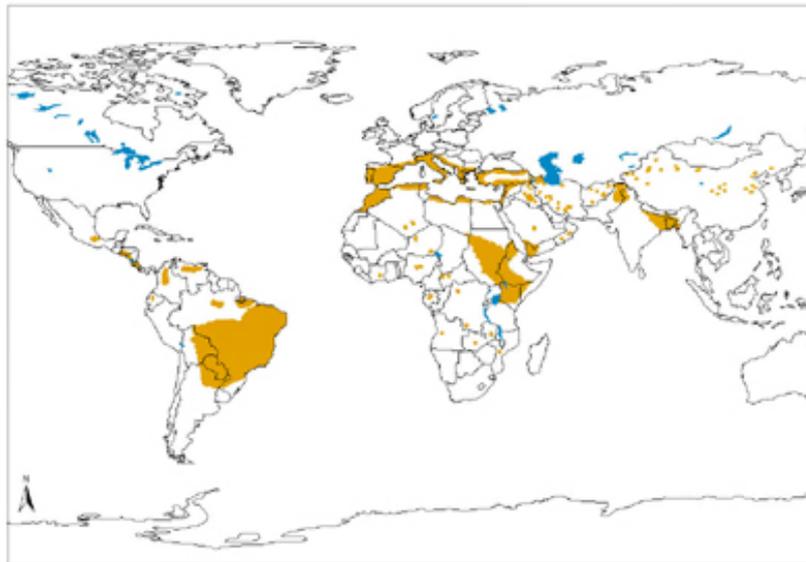


Figura 1: Distribuição geográfica da leishmaniose visceral no mundo.

(http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index.html, acessado em 14/06/2011).

1.2 Ciclo de vida do parasito

O ciclo evolutivo do parasito tem início com o repasto sanguíneo do mosquito flebotomíneo fêmea, o qual leva consigo formas amastigotas da *Leishmania*. Aproximadamente cinco dias após picar o hospedeiro vertebrado, as formas amastigotas adquiridas pelo mosquito flebotomíneo se transformam em promastigotas e migram para as partes superiores do tubo digestivo do inseto, atingindo o aparelho picador (Figura 2) (CHAPPUIS *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2008).

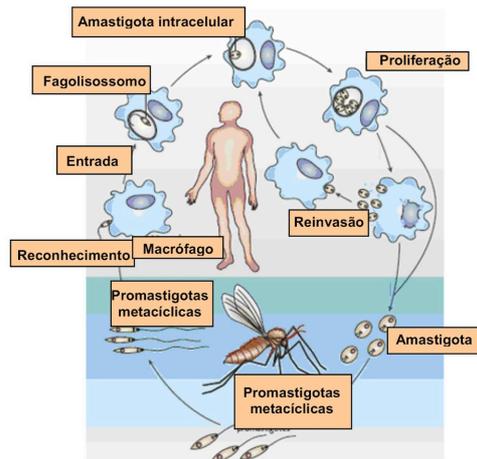


Figura 2: Ciclo evolutivo do parasito (CHAPPUIS *et al.*, 2007).

Assim, ao picar outro animal, o mosquito flebotomíneo transfere ao hospedeiro vertebrado formas promastigotas metacíclicas da *Leishmania* infectante. Estas formas, compridas e com flagelo, tendem a infectar as células fagocíticas do sistema mononuclear do homem, especialmente os macrófagos. No interior dos macrófagos os promastigotas se transformam em amastigotas, forma esférica e sem flagelo, multiplicando-se no interior de fagolisossomos e levando à lise da célula hospedeira. Com o rompimento do macrófago, uma grande quantidade de parasitos é liberada na circulação sanguínea, ocorrendo a infecção de outros macrófagos. O estabelecimento da doença depende do sucesso do parasito em se diferenciar na forma amastigota (SANTOS *et al.*, 2008).

O tropismo acentuado da *Leishmania* na forma promastigota por macrófagos deve-se à presença de um glicocálice espesso, formado por proteínas ancoradas em moléculas de glicosilfosfatidilinositol, fosfoglicanos e lipofosfoglicanos e outros glicolipídeos (NADERER *et al.*, 2004).

1.3 Tratamento

A quimioterapia contra a leishmaniose é constituída pelos antimoniais pentavalentes, principalmente o estibogliconato de sódio e o antimoniato de meglumina (Figura 3), disponíveis na terapêutica desde 1940. Estes fármacos apresentam como principais problemas a elevada toxicidade e os efeitos adversos (SINGH & SIVAKUMAR, 2004), bem como o fato de serem administrados por via parenteral o que dificulta o tratamento,

levando ao abandono da maioria dos pacientes e favorece o aparecimento de cepas resistentes (SINGH & SIVAKUMAR, 2004; SOARES-BEZERRA *et al.*, 2004).

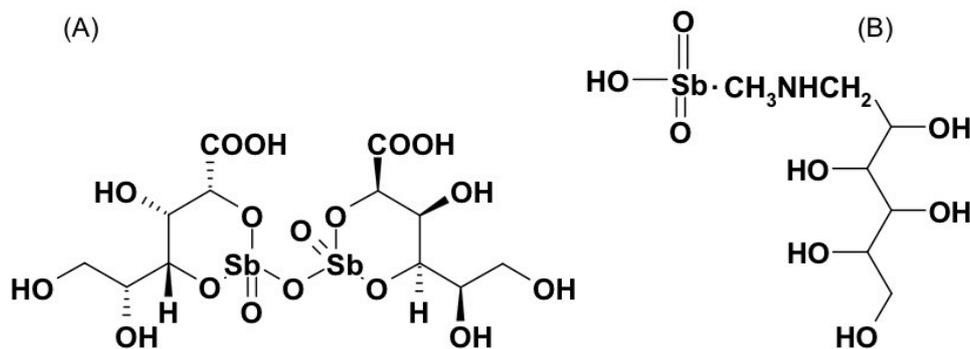


Figura 3: (A) Estibogliconato de sódio e (B) Antimoniato de meglumina

Em casos de resistência, a pentamidina, da classe das diaminas aromáticas, a anfotericina B e a paromomicina (Figura 4), antibióticos poliênicos e aminoglicosídeos, respectivamente, são usados como fármacos de segunda escolha, apesar da elevada toxicidade (SANTOS *et al.*, 2008). Por estas razões, é premente a necessidade de novas e eficazes alternativas terapêuticas.

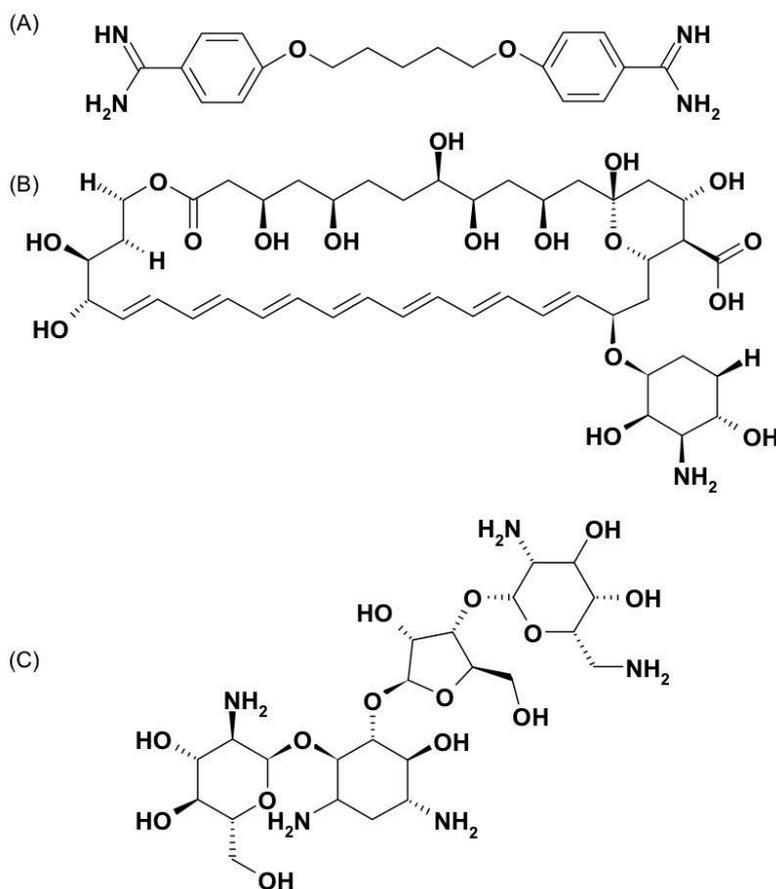


Figura 4: (A) Pentamidina, (B) Anfotericina B e (C) Paromicina.

1.4 Planejamento de novos agentes leishmanicidas

As diferenças nas vias metabólicas entre o agente causador de uma doença e o hospedeiro humano são excelentes alvos terapêuticos para o planejamento racional de fármacos (GUIDO, OLIVA, ADRICOPULO, 2008).

Estudos bioquímicos permitiram o entendimento das vias metabólicas e da composição lipídica da *Leishmania* (BERMAN, 1988). Assim como nos fungos, o ergosterol é um importante esterol de membrana para a *Leishmania*. A biossíntese do ergosterol requer a desmetilação do C-14 do lanosterol, que envolve a enzima citocromo P-450, denominada 14 α -esterol desmetilase, também conhecida por ERG11 ou CYP51 (E.C. 1.14.13.70), alvo dos antifúngicos azólicos (AOYAMA, 2005).

Além disso, vários antifúngicos azólicos apresentam atividade inibitória da biossíntese dos esteróis e do crescimento de várias espécies de *Leishmania sp.* (VANNIER-SANTOS *et al.*, 1995), causando a diminuição nos esteróis endógenos normais (e.g. ergosterol) e acúmulo de esteróis alterados. A importante função na biossíntese dos esteróis de membrana faz da CYP51 excelente alvo para o planejamento de novos agentes leishmanicidas.

A estratégia de planejamento racional de substâncias bioativas candidatas a novos fármacos fundamenta-se no conhecimento prévio do processo fisiológico que leva ao aparecimento de doenças e na seleção de um alvo terapêutico adequado. O alvo macromolecular (e.g., proteína, receptor biológico, DNA ou RNA) pode ter a sua estrutura tridimensional conhecida ou não, fato que determina a estratégia que será utilizada para o processo de descoberta e desenvolvimento de novos ligantes (GUIDO, OLIVA, ADRICOPULO, 2008)

Embora a base de dados das estruturas resolvidas de proteínas no “Protein Data Bank” (PDB) esteja crescendo exponencialmente nos últimos anos, devido aos crescentes avanços alcançados pelas técnicas de determinação estrutural, ainda não há dados estruturais para muitas proteínas eleitas como atrativos alvos terapêuticos (EVERS, GOHLKE, KLEBE, 2003).

Nos casos em que a elucidação estrutural do alvo terapêutico não é possível ou ainda não foi determinada, modelos virtuais do alvo terapêutico (proteína) podem ser elaborados por comparação da similaridade de sua seqüência primária de aminoácidos com as seqüências de proteínas homólogas com estruturas resolvidas e depositadas no PDB. Este procedimento comparativo para a construção de modelos estruturais é conhecido como modelagem molecular por homologia estrutural ou modelagem comparativa (DEANE & BLUNDELL, 2003).

O conhecimento da estrutura tridimensional da CYP51 de *Leishmania major* representa um importante passo para o desenvolvimento de novos fármacos leishmanicidas. Este trabalho propõe um modelo tridimensional para esta enzima baseado na estrutura 3D conhecida de enzimas homólogas, empregando o método da modelagem comparativa por homologia.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Os objetivos do presente trabalho são a aplicação da estratégia de modelagem comparativa para obtenção de modelos homólogos da CYP51 de *Leishmania major* (CYP51_{LM}), e a realização de estudos de *docking* de inibidores conhecidos, que serão utilizados no processo de triagem virtual para a identificação de candidatos a inibidores da CYP51, que possam ser candidatos a protótipos de fármacos leishmanicidas.

.2 Objetivos Específicos

- Identificar e selecionar proteínas-molde para a CYP51_{LM};
- Aplicação da modelagem comparativa para construção do modelo homólogo da CYP51_{LM};
- Validação e refinamento do modelo gerado de CYP51_{LM};
- Realizar estudos de docking molecular entre o modelo de CYP51_{LM} e inibidores ativos conhecidos, como o fluconazol.

3. METODOLOGIA

Todos os estudos foram realizados em estações computacionais disponíveis no Laboratório de Modelagem Molecular (LabMol) da Faculdade de Farmácia, em sistema operacional Linux.

3.1 Identificação e seleção de proteínas-molde

A proteína a ser modelada teve sua sequência obtida através da base de dados de sequência de proteínas UniProt (*Universal Protein Resource*), sendo o código obtido da sequência de CYP51 de *Leishmania major* Q4QGX0, sendo esta denominada de *template*. A etapa de identificação de proteínas-moldes adequadas foi feita através do servidor BLAST de reconhecimento e analogia de estruturas de proteínas. O esquema geral da metodologia de modelagem por homologia está apresentado na Figura 5.

3.2 Alinhamento das seqüências de resíduos de aminoácidos

O alinhamento das seqüências de resíduos de aminoácidos foi feito através do servidor CLUSTAL para detecção de características comuns de proteínas homólogas.

3.3 Construção do modelo homólogo da CYP51 de *Leishmania major*

A construção do modelo homólogo da CYP51_{LM} foi feita através do servidor Swiss Model, utilizando o modo automático, submetendo-se a sequência-molde e o *template* diretamente ao servidor.

3.4 Validação do modelo

A validação do modelo foi realizada através do servidor Swiss Model, que utiliza os programas PROCHECK e QMEAN para estimar a qualidade global do modelo gerado.

3.5 Refinamento do Modelo

O modelo de CYP51_{LM} gerado foi submetido a processo de minimização de energia, utilizando o método de *steepest descent* e campo de força *Optimized Potential for Liquid Simulations* (OPLS-2005), implementado para o pacote de minimização e dinâmica molecular IMPACT 5.6.

3.6 Estudos de *docking* utilizando o modelo homólogo da CYP51 de *Leishmania major*

3.6.1 Preparo da proteína

A proteína homóloga da CYP51_{LM} foi preparada para os estudos de *docking* seguindo-se as etapas: (i) os átomos de hidrogênio foram adicionados na estrutura da proteína sob a condição de pH 7,5; (ii) as cargas da proteína foram calculadas utilizando o campo de

força AMBER99; (iii) a ferramenta *MOEAlpha Site Fider* foi utilizada para determinar a cavidade de interação (sítio ativo).

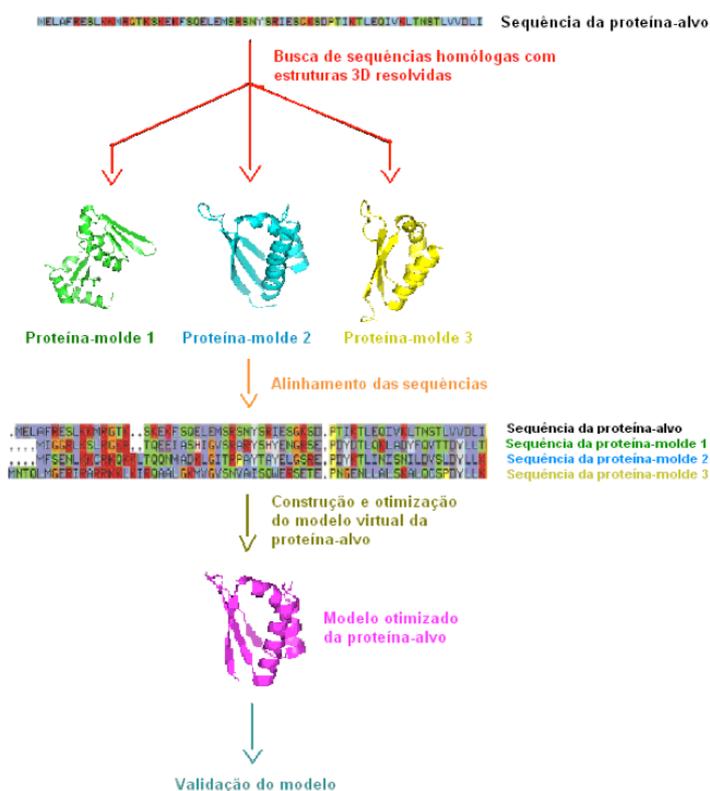


Figura 5. Etapas envolvidas no processo de obtenção de modelos protéicos de proteínas-alvo através da utilização da estratégia de modelagem molecular por homologia estrutural (SILVA & SILVA, 2007).

3.6.2 Parametrização do ligante

O ligante ativo fluconazol foi selecionado inicialmente para os estudos de *docking* com o modelo homólogo construído da CYP51_{LM}. A estrutura cristalográfica do fluconazol foi utilizada para os cálculos (código do PDB: 3L4D). Adicionou-se os hidrogênios e calculou-se as cargas do fluconazol utilizando o método semi-empírico AM1 implementado no pacote MOPAC, no programa *Molecular Operating Environment* (MOE 2008.10; Chemical Computing Group, Inc. Montreal, Canadá).

3.6.3 Estudos de docking

Os estudos de *docking* foram realizados usando o módulo MOE-Dock implementado no programa *Molecular Operating Environment* (MOE) versão 2008. O protocolo que foi usado para os cálculos de *docking* são: função de pontuação ou *scoring* Alpha PMI, rescoring 1 Affinity dG, refinamento Forcefield, rescoring 2 Affinity dG. As 30 melhores soluções foram mantidas e minimizadas utilizando o campo de força MMFF94x e o modelo de solvatação “Generalized Born”, permitindo flexibilidade aos resíduos situados a 6 Å do ligante, até atingir um gradiente inferior a 0,01 kcal/(mol.Å). As soluções finais foram classificadas (*rankeadas*) utilizando a função de score Affinity dG.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A ferramenta mais bem sucedida de predição de estruturas tridimensionais de proteínas é a modelagem por homologia, também conhecida como modelagem comparativa. Esta abordagem baseia-se em alguns padrões gerais que têm sido observados, em nível molecular, no processo de evolução biológica:

- (a) homologia entre seqüências de aminoácidos implica em semelhança estrutural e funcional;
- (b) proteínas homólogas apresentam regiões internas conservadas (principalmente constituídas de elementos de estrutura secundária: hélices- α e fitas- β);
- (c) as principais diferenças estruturais entre proteínas homólogas ocorrem nas regiões externas, constituídas principalmente por alças (“loops”), que ligam os elementos de estruturas secundárias (FILHO & ALENCASTRO, 2003).

A modelagem de uma proteína (proteína-problema) pelo método da homologia baseia-se no conceito de evolução molecular. Isto é, parte-se do princípio de que a semelhança entre as estruturas primárias desta proteína e de proteínas homólogas de estruturas tridimensionais conhecidas (proteínas-molde) implica em similaridade estrutural entre elas.

Os métodos correntes de modelagem de proteínas por homologia implicam basicamente em quatro passos sucessivos (FILHO & ALENCASTRO, 2003):

- identificação e seleção de proteínas-molde;
- alinhamento das seqüências de resíduos;
- construção das coordenadas do modelo;
- validação.

A etapa de identificação de proteínas-moldes adequadas foi feita pelo servidor BLAST de reconhecimento e analogia de estruturas de proteínas. A escolha recaiu sobre a enzima CYP51 de *Leishmania infantum* (código PDB: 3L4D, 98% identidade estrutural). O alinhamento entre as seqüências primárias foi feito no servidor CLUSTAL e os modelos construídos utilizando o modo automático do servidor SWISS-MODEL (ARNOLD *et al.*, 2006). A estrutura obtida foi minimizada utilizando o campo de força *Optimized Potential for Liquid Simulations* (OPLS-2005), implementado para o pacote de minimização e dinâmica molecular IMPACT 5.6. O algoritmo de minimização de energia utilizado foi o *steepest descent*. As estruturas foram validadas através dos programas PROCHECK (LASKOWSKI *et al.*, 1993) e QMEAN (BENKERT *et al.*, 2001).

A estrutura 3D do modelo CYP51_{LM} obtida sobreposta com a proteína-molde 3L4D estão apresentadas na Figura 6. Pode-se observar uma grande similaridade entre as duas.

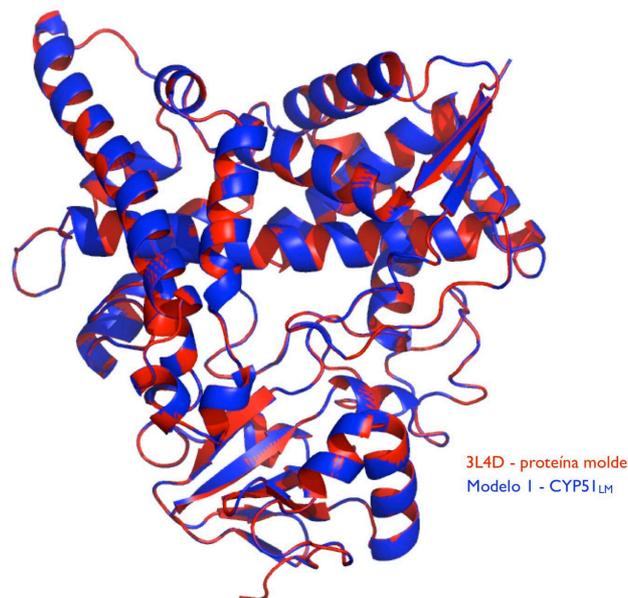


Figura 6. Estruturas sobrepostas do modelo de CYP51_{LM} e a proteína-molde 3L4D.

O modelo gerado foi avaliado com relação a sua qualidade estereoquímica, através do programa PROCHECK. Este programa gerou o gráfico de Ramachandran, que está apresentado na Figura 7.

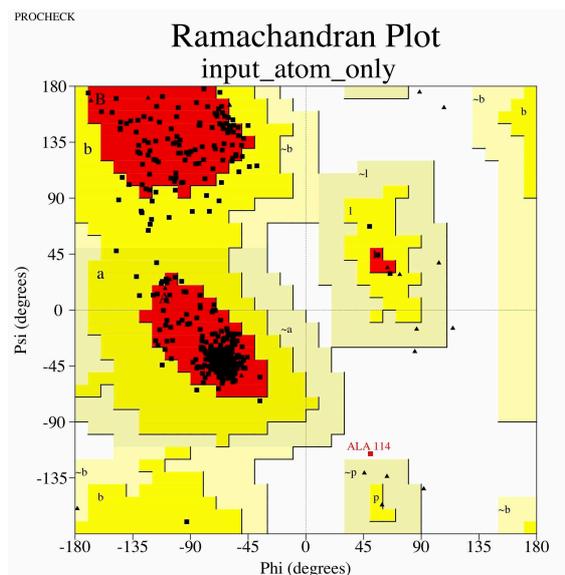


Figura 7. Gráfico de Ramachandran obtido para o modelo homólogo gerado de CYP51_{LM}.

No gráfico de Ramachandran os resíduos de aminoácidos são representados por quadrados, sendo as glicinas representadas por triângulos. As áreas em vermelho: regiões muito favoráveis; amarelo: regiões favoráveis; bege: pouco favoráveis; branco: desfavoráveis (válida para todos os aminoácidos, com exceção da glicina).

Após o refinamento da estrutura 3D do modelo, através da minimização de energia utilizando o campo de força OPLS-2005, realizou-se estudo de *docking* com o ligante ativo fluconazol. Os resultados de *docking* mostraram-se promissores, uma vez que o fluconazol se apresentou posicionado em direção ao heme, e foi acomodado pela interação com importantes resíduos de aminoácidos do sítio ativo da proteína, como Ala290, Tyr102 e Leu355. As interações entre o fluconazol e o modelo de CYP51_{LM} estão apresentadas na Figura 8.

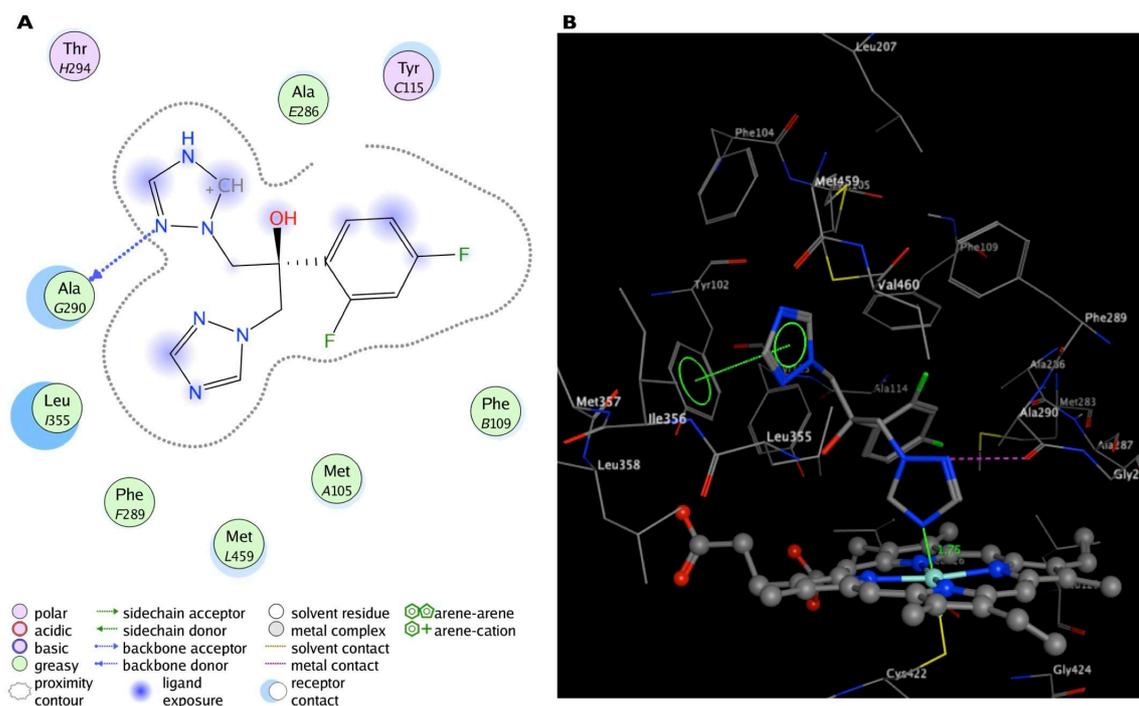


Figura 8. Docking do ligante ativo fluconazol no modelo homólogo de CYP51_{LM}. **(A)** Representação 2D das interações do fluconazol com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da CYP51_{LM}. **(B)** Interações 3D entre o fluconazol, os resíduos de aminoácidos e o heme do sítio ativo da enzima.

5. CONCLUSÕES

Com este trabalho gerou-se um modelo tridimensional da estrutura da enzima CYP51 de *Leishmania major*, um dos principais agentes causadores de leishmaniose cutânea. O modelo gerado foi avaliado com relação a sua qualidade estereoquímica, e este se mostrou satisfatório. Ao final, o modelo de CYP51_{LM} gerado foi utilizado para estudos de docking com o fluconazol, um fármaco ativo contra esta enzima.

Espera-se utilizar o modelo obtido neste trabalho para estudos de triagem virtual, com a finalidade de se descobrir novos compostos capazes de inibir a enzima CYP51_{LM}, que possam vir a ser novos candidatos a protótipos de fármacos leishmanicidas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOYAMA, Y. Recent progress in the CYP51 research focusing on its unique evolutionary and functional characteristics as a diversozyme P450. *Front. Biosci.*, 10,1546–1557, 2005.

- ARNOLD K.; BORDOLI L.; KOPP J.; SCHWEDE T. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22,195-201, 2006.
- BENKERT P.; BIASINI M.; SCHWEDE T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*, 27(3):343-50, 2011.
- BERMAN, J. D. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy and future strategies *Rev. Infect. Dis.*, 10, 560–586, 1988.
- CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R.W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology*, v.5, p.873-882, 2007.
- DEANE, C. M. ; BLUNDELL, T. L. Protein comparative modelling and drug discovery. In WERMUTH, C. G. *The Practice of Medicinal Chemistry*. London : Elsevier Academic Press, 2003.
- DESJEUX, P.; ALVAR, J. Leishmania/HIV. Co-infections: epidemiology in Europe. *Annals of tropical medicine and parasitology*, v.97, p.3-15, 2003.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 27, 305-318, 2004.
- EVERS, A. ; GOHLKE, H. ; KLEBE, G. Ligand-supported homology modelling of protein binding sites using knowledge-based potentials. *J. Mol. Biology*. 334, 327-345, 2003.
- FILHO, O. A. S.; ALENCASTRO, R. B. Modelgem de proteínas por homologia. *Quim. Nova*, Vol. 26, No. 2, 253-259, 2003
- GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Virtual Screening and Its Integration with Modern Drug Design Technologies. *Curr. Med. Chem.*, v.15, p.37-26, 2008.
- HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. *Lancet*, v. 354, p. 1191-1199, 1999.
- LASKOWSKI R. A.; McARTHUR M. W.; MOSS D.; THORNTON, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, 26, 283-291, 1993.

- NADERER, T.; VINCE, J.E.; McCONVILLE, M.J. Surface determinants of *Leishmania* parasites and their role in infectivity in the mammalian host. *Current Molecular Medicine*, v.4, p.649-665, 2004.
- SANTOS, D.O.; COUTINHO, C.E.R.; MADEIRA, M.F.; BOTTINO, C.G.; VIEIRA, R.T.; NASCIMENTO, S.B.; BERNARDINO, A.; BOURGUIGNON, S.C.; CORTE-REAL, S.; Pinho, R.T.; RODRIGUES, C.R.; CASTRO, H.C. Leishmaniasis treatment-a challenge that remains: a review. *Parasitology research*, 2008, 103:1–10.
- SILVA, V. B.; SILVA, C. H. T. P. Modelagem molecular de proteínas-alvo por homologia estrutural. *Revista Eletrônica de Farmácia*. Vol IV (1), 15-26, 2007
- SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J. Infect. Chemother.*, v.10, p.307-315, 2004.
- SOARES-BEZERRA, R.J.; LEON, L.; GENSTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.40, p.139-149, 2004.
- VANNIER-SANTOS, M. A.; URBINA, J.A.; MARTINY, A.; NEVES, A.; DE SOUZA, W. Alterations induced by the antifungal compounds ketoconazole and terbinafine in *Leishmania*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 42, p.337–346, 1995.
- World Health Organization (WHO), Leishmaniasis, Forms of leishmaniasis: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>, acessado em 14/06/2011.
- World Health Organization (WHO), Essential leishmaniasis maps: http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index.html, acessado em 14/06/2011