

Construção e validação da cisteíno-protease de *L. mexicana* (CPB2.8) como alvo bioquímico no planejamento de fármacos

Drielli G. Vital^{1*}(PG), Vínicius G. Maltarollo¹(PQ), Gustavo H. G. Trossini¹(PQ). driellivital@usp.br

¹Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bl. 13 sup., São Paulo, SP.

Palavras Chave: CPB2.8, Modelagem Comparativa, Dinâmica Molecular.

Introdução

Estima-se que a Leishmanioses apresente 1,3 milhões de novos casos ao ano e leve 20 a 30 mil pessoas a morte. Esta parasitose está presente em 98 países, sendo que 350 milhões de pessoas estão em áreas de risco de contaminação¹. O tratamento disponível tem muitos inconvenientes tais como: administração, duração, toxicidade, custo e resistência dos parasitas². Diante disso é premente a necessidade de novos fármacos. Na busca de novos fármacos, a descoberta de alvos biológicos específicos da doença têm se tornado cada vez mais freqüente³. Com o objetivo de empregar a estratégia de Planejamento de Fármacos Baseado na Estrutura do Receptor (SBDD), realizamos nesse trabalho a construção de um modelo da enzima CPB2.8 de *L. mexicana*, por meio de Modelagem Comparativa, e sua validação foi feita por seguida de Dinâmica Molecular (DM).

Resultados e Discussão

O modelo da enzima de *L. mexicana* CPB2.8, foi construído a partir da sequência de aminoácidos desta proteína. Em uma primeira etapa foi realizada uma busca por proteínas com identidade estrutural no servidor HHpred. O alinhamento foi feito por alinhamento global. O modelo da cisteíno-protease de *L. mexicana* CPB2.8 foi obtido utilizando como molde a estrutura cristalográfica da enzima cruzaina (pdb: 3I06) a qual apresenta 60% de identidade de sequência e 100% de probabilidade, *E-value* de $9,1 \times 10^{-62}$ e pontuação de 362,4. A qualidade da estrutura cristalográfica foi analisada por meio dos valores de resolução, *R-free value*, gráfico de Ramachandran, e o fator B. A partir destes resultados, a estrutura da CPB2.8 foi construída no programa Modeller.

A simulação por DM foi realizada com a finalidade do refinamento do modelo de CPB2.8 construído. Utilizando o programa GROMACS 4.5.6, com campo de força AMBER99SB-ILDN e solvatação do sistema considerada explícita, no qual as moléculas de água foram representadas pelo modelo TIP3P, os íons foram adicionados para neutralizar a carga do sistema a uma concentração fisiológica (NaCl a 0,1 M), e a protonação dos resíduos foi ajustada ao pH 5,5 (reservossoma). Foram mantidas temperatura e pressão constantes, em uma caixa cúbica periódica. Inicialmente, foi feito um cálculo

de minimização seguido de equilibração do sistema e, por fim, a simulação com o sistema livre foi realizada por 120 ns. A validação do modelo foi realizada avaliando-se o RMSD, gráfico de Ramachandran. No gráfico de RMSD o modelo mostrou-se estável a partir de 80 ns.

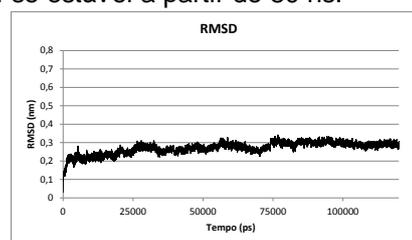


Figura 1. Gráfico de RMSD do modelo obtido

O gráfico de Ramachandran apresentou 94,8% dos resíduos em regiões favoráveis, 5,2% em regiões permitidas e nenhum resíduo em região outlier.

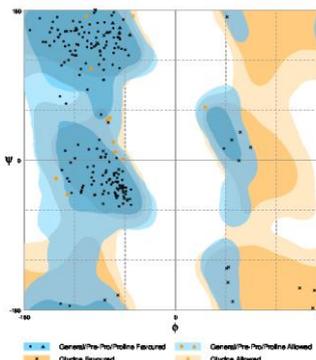


Figura 2. Gráfico de Ramachandran o modelo obtido no tempo 120 ns

Tais resultados indicam que o modelo está estável, possibilitando os próximos passos.

Conclusões

Os resultados obtidos para o modelo de CPB2.8 de *Leishmania* construídos foram satisfatórios e sugerem que o modelo pode ser utilizado em estudos de SBDD na busca de inibidores candidatos a fármacos

Agradecimentos

FAPESP (2013/15650-0), FAPESP (11/11499-0)

¹Who: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acesso em Fevereiro 2015.

²DNDi: <http://www.dndi.org.br/pt/doencas-negligenciadas.html>. Acesso em Fevereiro de 2015.

³Copeland, R. A. *Eval. of Enz. Inhib. in Drug Discov.* **2013**, 1.