

## AValiação DO POTENCIAL INIBITÓRIO DA ENZIMA HGPRT DE *Schistosoma mansoni* POR AÇÃO DE ANÁLOGOS DE PURINA

Autor Principal: José Henrique Santos da Silva<sup>1</sup>; Charles Christophe Du Barrière Mendes<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduando em Farmácia na Faculdade Pernambucana de Saúde - FPS

<sup>2</sup>Docente da Graduação em Farmácia da Faculdade Pernambucana de Saúde – FPS

**Área temática:** Biotecnologia e Inovação em Saúde

**Modalidade:** Poster simples.

**E-mail do autor:** jhss15@outlook.com

### RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A esquistossomose é uma doença negligenciada que atinge cerca de 200 milhões de pessoas anualmente. Devido ao aparecimento de novas linhagens resistentes aos medicamentos disponíveis no mercado atual, se faz necessário o uso de técnicas computacionais para a descoberta de novos compostos líderes. Enzimas da via de salvação de purinas de parasitas vêm sendo investigadas como um possível alvo terapêutico. Desta forma, almeja-se neste trabalho elucidar, por meio de métodos computacionais, potenciais candidatos a fármacos esquistossomicidas da classe dos análogos da purina, bem como calcular as energias de ligação, em kcal/mol, dos análogos com o sítio ativo da SmHGPRT do *Schistosoma mansoni*. **MÉTODOS:** Foram utilizados os softwares *Autodocktools* para a realização do *docking* e o *Discovery Studio Visualizer* para a análise das interações moleculares presentes. **RESULTADOS:** Dentre os análogos de purinas analisados, a azatioprina apresentou a menor energia de ligação (-8,07 kcal/mol), estabelecendo uma ligação de hidrogênio com a Gly146, em N-6, do seu anel purínico, uma interação relevante no acoplamento fármaco-receptor, além de interações  $\pi$ -sigma e  $\pi$ -alquil com os aminoácidos Ile142, Asp144 e Thr148 do sítio ativo. Quanto à pentostatina (-7,37 kcal/mol) houve formação de duas ligações de hidrogênio com o resíduo Thr148 e uma interação carbono-carbono entre o fármaco e a Glu140. A fludabarina (-6,71 kcal/mol) por apresentar de um átomo de flúor e um grupamento fosfato em sua estrutura, apresentou três ligações de hidrogênio com os resíduos Gly146, Thr145 e Lys172, e interações de Van der Waals com a Thr148. **CONCLUSÃO:** Por meio de estratégias de modelagem molecular foi possível avaliar o potencial inibitório da enzima HGPRT por ação de análogos de purinas. Os resultados *in silico* apresentaram caráter satisfatório e podem posteriormente ser refinados, baseado nas diferenças entre a HGPRT humana e a SmHGPRT descritas na literatura.

**Palavras-chave:** HGPRT, *Schistosoma mansoni*, Purinas.

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças tropicais negligenciadas são um grupo de doenças causadas por diversos agentes etiológicos, tais como vírus, bactérias, protozoários e parasitas (OMS, 2019). São frequentemente associadas a países em desenvolvimento e determinantes sociais, econômicos e ambientais, como populações de baixa renda e locais com pouco ou nenhum saneamento básico, baixos níveis de escolaridade e higiene (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ., 2013).

Os fármacos disponíveis no mercado para o tratamento da esquistossomose (praziquantel e oxamniquina) foram desenvolvidos na década de 70, e desta forma, o surgimento de formas resistentes dos parasitas se tornou um potencial perigo de saúde pública, demandando o desenvolvimento de novas terapias medicamentosas para o controle da doença (SIQUEIRA et al., 2017).

Um dos mais importantes avanços no planejamento e na descoberta de novos fármacos tem sido a utilização da modelagem molecular (MM). Atualmente, a MM é uma ferramenta indispensável não somente no processo de descoberta de novos fármacos, mas também na otimização de protótipos já existentes e no planejamento racional de candidatos a fármacos (PATRICK, 2017)

Em geral, os nucleotídeos de purinas podem ser sintetizados pela via *de novo*, que utiliza compostos simples para a síntese de vários nucleotídeos de purinas, e/ou pela via de salvamento, constituída por rotas de reutilização pelas quais as células podem satisfazer a necessidade de purinas a partir de fontes endógenas e/ou exógenas de purinas pré-formadas (EL KOUNI, 2017).

Segundo Romanello (2019), apud Dovey (1984), foi observado que *Schistosoma mansoni* adultos incubados em culturas sem purinas tinham concentrações de ATP reduzidas e não incorporavam resíduos radioativos de glicina nos nucleotídeos purínicos. Essa observação foi importante para constatar que o *Schistosoma* não possui a via *de novo* de formação de purinas (KZIOZEK et al., 2021).

Por outro lado, eles incorporam a adenina ao ATP em velocidade maior do que mamíferos, devido principalmente a grande concentração da enzima adenina fosforibosiltransferase (APRT) e

de hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HGPRT), enzimas chaves para a via de salvamento das purinas (KZIOZEK et al., 2021)

O uso de compostos inibidores enzimáticos é uma importante estratégia para intervenção terapêutica para o tratamento de diversas doenças, das genéticas às infecciosas, podendo modular o funcionamento de uma enzima chave em uma via metabólica (BALBAA, 2012).

Assim, o presente trabalho pretende explorar a via de salvação das purinas, caracterizando novos possíveis inibidores da enzima HGPRT, com o intuito de desenvolver novas opções terapêuticas para o controle do parasita *Schistosoma mansoni*. Para tal, foi realizado o *docking* molecular dos fármacos análogos de purinas frente a hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase do *Schistosoma mansoni* (SmHGPRT), bem como foram estimadas as energias de ligação, em kcal/mol, dos análogos com o sítio ativo da proteína.

## 2. MÉTODO

O processo de docagem envolve quatro etapas básicas: (1) Preparo da estrutura alvo; (2) Escolha dos ligantes; (3) Predição da conformação, posição, orientação do ligante dentro dos sítios e (4) Avaliação da afinidade de ligação.

No presente trabalho a proteína de escolha foi a SmHGPRT, com 2.8 Å de resolução, a qual está catalogada sob o código 5IPF no *Protein Data Bank* (PDB). A proteína foi tratada manualmente lançando-se mão do software *Discovery Studio Visualizer*, no qual foram eliminadas moléculas de água e ligantes interferentes, já presentes na macromolécula 5IPF no PDB. Os fármacos análogos das purinas selecionados para o estudo foram obtidos a partir do banco de dados de ligantes ZINC15: 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, azatioprina, fludabarina e pentostatina. O procedimento de *docking* foi executado pelo software *AutoDockTools* 1.5.6, com a área de docagem molecular (grid box) definida, utilizando as coordenadas cartesianas: X = -3,205 Å; Y = -7,503 Å; e Z = 14,96 Å, com as dimensões de 16 × 16 × 16 Å. Cada um dos ligantes foi testado com 10 poses diferentes, e os melhores resultados foram selecionados para posterior visualização de interações moleculares no *Discovery Studio Visualizer*.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análises comparativas entre a sequência peptídica de SmHGPRT-1 e todas as outras HGPRTs depositadas no PDB indicaram que dez resíduos (Leu74, Gly76, Leu84, Glu140, Asp141,

Thr148, Lys172, Gly196, Asp200 e Arg206) estão conservados entre eles, estando cinco deles localizados no sítio ativo 1 da proteína, como mostrado na figura 1 (ROMANELLO et al, 2019).

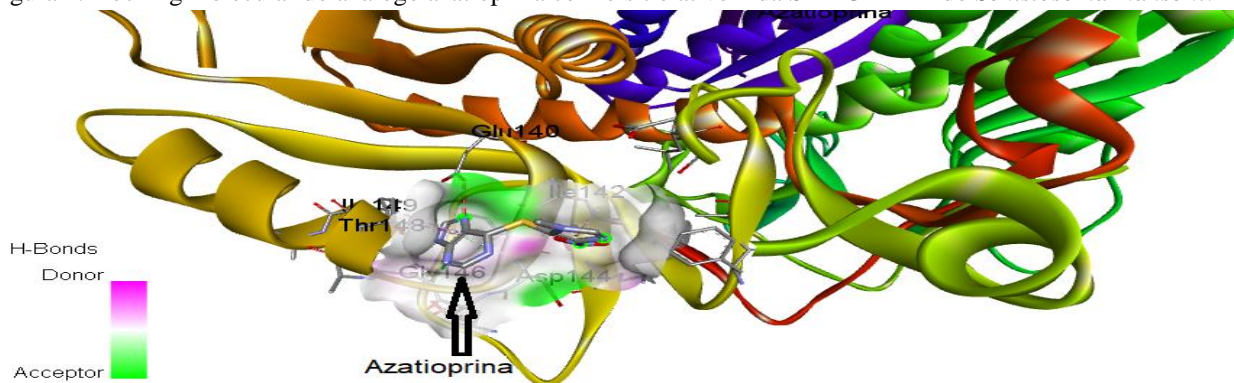
Para atender o objetivo proposto, foram selecionadas as melhores energias de ligação dentre as dez conformações obtidas para cada fármaco no software *AutoDockTools* 1.5.6. As energias estão apresentadas na tabela 1. Os análogos docados com a SmHGPRT-1 do *Schistosoma mansoni* estão exibidos na figura 1, figura 2 e figura 3.

Tabela 1. Energias de ligação, em kcal/mol, dos fármacos (ligantes) com a SmHGPRT-1 do *Schistosoma mansoni*.

Ligante	Energia de ligação (kcal/mol)
Azatioprina	-8,07
Pentostatina	-7,37
Fludabarina	-6,71
6-mercaptopurina	-6,52
6-tioguanina	-6,40

De acordo com Romanello (2019), os aminoácidos Asp144, Gly146 e Val194 são fundamentais no mecanismo de reação enzimática com substratos naturais da HGPRT. Os aminoácidos presentes no sítio de ligação 1 são: Lys172, Gly146, Lys147, Asp144, Asp200, Val194, Phe193, Thr145, Ile142, Glu 140, Asp141 e Thr148.

Figura 1. Docking molecular do análogo azatioprina com o sítio ativo 1 da SmHGPRT-1 do *Schistosoma mansoni*.

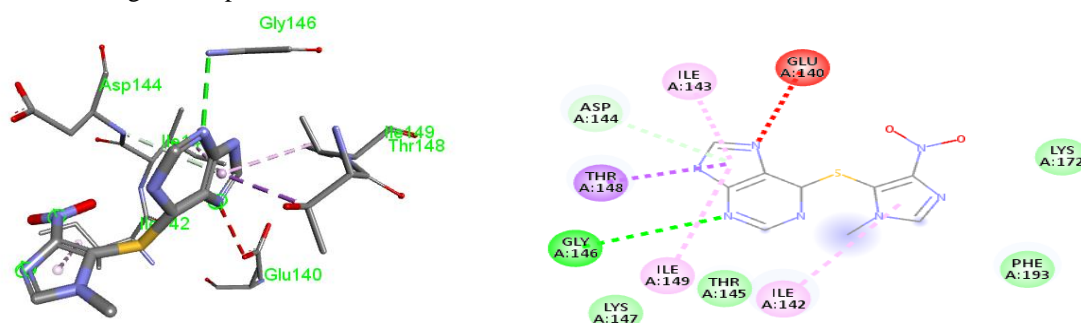


Fonte: Desenvolvido pelo autor no software *Discovery Studio Visualizer* (2022).

Dentre os resultados dos análogos de purinas com o sítio ativo 1 da SmHGPRT, a azatioprina mostrou o melhor resultado como ligante, apresentando a menor energia de ligação (-8,07 kcal/mol), estabelecendo uma ligação de hidrogênio com a Gly146, em N-6, do seu anel purínico, uma interação relevante no acoplamento fármaco-receptor. Também apresentou interações não-covalentes  $\pi$ -Sigma e  $\pi$ -aquil com seis aminoácidos, além de possuir quatro resíduos

interagindo por meio de forças fracas de Van der Waals. Todas as interações relatadas corroboram o melhor resultado apresentado em relação aos outros análogos.

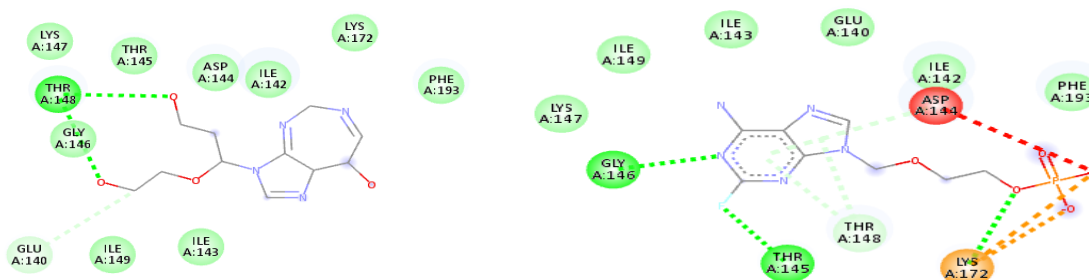
Figura 2. Detalhamento dos aminoácidos do sítio ativo 1 da SmHGPRT-1 do *Schistosoma mansoni* e interações químicas com o análogo azatioprina.



Fonte: Desenvolvido pelo autor no software *Discovery Studio Visualizer* (2022).

Quanto à pentostatina foram observadas duas ligações de hidrogênio ao resíduo Thr148 e uma interação carbono-carbono entre o fármaco e a Glu140. Pelo fato de a pentostatina apresentar um número menor de ligações com o sítio ativo, é de se esperar uma energia de ligação de menor intensidade (-7,37 kcal/mol), como foi verificado nos cálculos de energia no *AutoDockTools*. Notam-se os aminoácidos do sítio ativo presentes na figura 3 à esquerda, incluindo os resíduos Asp144, Gly146, Ile142, Phe193, Lys172, Lys147, e Glu140, ratificando a interação do fármaco com sítio ativo 1 da SmHGPRT-1 do *Schistosoma mansoni*.

Figura 3. Detalhamento dos aminoácidos do sítio ativo 1 da SmHGPRT-1 do *Schistosoma mansoni* e interações químicas com os análogos pentostatina (à esquerda) e fludabarina (à direita).



Fonte: Desenvolvido pelo autor no software *Discovery Studio Visualizer* (2022).

A fludabarina apresentou três ligações de hidrogênio com os resíduos Gly146, Thr145 e Lys172, interações de Van der Waals com a Thr148, e interações atrativas com as cargas do fosfato na porção distal da molécula, mostrada na figura 3, à direita. O átomo de flúor, bem como a porção fosfato deste análogo, contribuem de modo relevante para o perfil energético (-6,71 kcal/mol) e de



seu acoplamento com a enzima, visto que promovem duas ligações de hidrogênio a mais na interação ligante-macromolécula.

Pode-se destacar a importância do resíduo Gly146 para a ancoragem do ligante, presente no *docking* em todos os testes com melhor energia de ligação, confirmando dados da literatura quanto à importância do resíduo no mecanismo de ação enzimático.

#### 4. CONCLUSÃO

Por meio de técnicas de modelagem molecular foi possível avaliar o potencial inibitório da enzima HGPRT por ação de análogos de purinas. Os resultados *in silico* apresentaram caráter satisfatório, principalmente da azatioprina, e podem posteriormente ser refinados, baseado nas diferenças entre a HGPRT humana e a SmHGPRT descritas na literatura.

#### REFERÊNCIAS

BALBAA, M. **Enzyme Inhibitors as Therapeutic Tools**. Biochemistry & Physiology, Egito, v. 01, n. 02, 2012.

EL KOUNI, M. H. **Pyrimidine metabolism in schistosomes: A comparison with other parasites and the search for potential chemotherapeutic targets**. Comparative Biochemistry and Physiology, v. 213, p. 55–80, 2017.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **A saúde no Brasil em 2030** - prospecção estratégica do sistema de saúde brasileiro: população e perfil sanitário [online]. Rio de Janeiro: Fiocruz/Ipea/Ministério da Saúde/Secretaria de Assuntos Estratégicos da Presidência da República, 2013. Vol. 2. 176 p

KZIOZEK, L. **Modelagem molecular comparativa da enzima Adenosina Kinase isoforma 1 (AK1) de *Schistosoma mansoni***, Luminária, União da Vitória, v.23, 2021, n. 02, p. 36-45

PATRICK, G. L. **An introduction to medicinal chemistry**. 6. ed, Oxford: Oxford University Press, 2017.

ROMANELLO, L. et al. **In vitro and in vivo characterization of the multiple isoforms of *Schistosoma mansoni* hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferases**. Molecular and Biochemical Parasitology, v. 229, p. 24–34, 2019.

SIQUEIRA, L. DA P. et al. **Schistosomiasis: Drugs used and treatment strategies**. Acta Tropica, v. 176, p. 179–187, dez. 2017.

**WHO EMRO | Schistosomiasis | Health topics**. Disponível em: <<http://www.emro.who.int/health-topics/schistosomiasis/>>. Acesso em: 19 set. 2022