

ANÁLISE *IN SILICO* DE ANÁLOGOS DE 1,2,3-TRIAZOL CONTRA A LACTATO DESIDROGENASE DE *Plasmodium berghei*

Lara de Azevedo Alves¹, Fernanda Valério Lopes², Clarice Abramo³, Adilson David da Silva⁴, Priscila Vanessa Zabala Capriles Goliatt⁵

¹ Graduanda em Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, alvesazevedolara@gmail.com

² Mestre em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, fernandavaleriolopes@hotmail.com

³ Doutora em Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, clarice.abramo@ufjf.edu.br

⁴ Doutor em Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, david.silva@ufjf.edu.br

⁵ Doutora em Modelagem Computacional, Universidade Federal de Juiz de Fora, priscila.capriles@ufjf.edu.br

Resumo- Devido à resistência adquirida pelos parasitas causadores da malária e a ausência de vacinas para tratamentos preventivos, tem-se visto a necessidade da busca de novos compostos para o tratamento desta doença. Neste trabalho, apresentamos os estudos *in silico* da enzima Lactato desidrogenase de *Plasmodium berghei* (PbLDH), organismo modelo para estudos de malária em humanos. Após a reconstrução da estrutura tridimensional homotetramérica da PbLDH, a enzima foi submetida aos estudos de *docking* molecular com os compostos candidatos a inibidores (5, 6, 8 e 9), derivados de 1,2,3-triazol. Os resultados mostraram que os compostos 8 e 9 apresentam maior afinidade de interação com o sítio alvo da PbLDH. Estudos complementares serão realizados afim de explorar melhor a participação dos resíduos de interação no sítio de ligação desses compostos.

Palavras-chave: Malária; *Plasmodium berghei*; Lactato desidrogenase; Derivados de 1,2,3-triazol; *Docking* Molecular.

Área do Conhecimento: Ciências Exatas e da Terra.

1 INTRODUÇÃO

As doenças parasitárias constituem um grande problema de Saúde Pública e são consideradas endêmicas em populações de baixa renda. São consideradas Doenças Negligenciadas, uma vez que não despertam o interesse de grandes indústrias farmacêuticas em desenvolver pesquisas para o tratamento e cura das mesmas. Dentre essas doenças, pode-se citar como exemplos a esquistossomose, leishmaniose e malária. No estado de Minas Gerais, essas parasitoses atingem vários municípios comprometendo significativamente a saúde da população, principalmente a rural (Codato et al., 2013; Muguande et al., 2011; Almeida et al., 2015).

A malária pode ser causada por cinco espécies de parasitas do gênero *Plasmodium* que afetam os seres humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi*. Estima-se que o número de casos de malária no mundo tenha sido de aproximadamente 212 milhões, em 2015, sendo a região Africana a mais afetada. Crianças menores de cinco anos de idade e mulheres grávidas são as pessoas mais gravemente afetadas (WHO, 2016). No Brasil, *P. vivax* e *P. falciparum* são os principais causadores da doença, representando respectivamente 84% e 16% dos casos notificados no ano de 2014 (MS-SVS, 2015). Até o século passado, o quinino era o principal quimioterápico utilizado no combate à malária. Seu uso só foi reduzido em função da sua alta toxicidade e dificuldade de obtenção (BUTLER, KHAN e FERGUSON, 2010). Devido ao desenvolvimento de resistência pelo parasita e a falta de vacinas, surgiu a necessidade de se obter novos antimaláricos, como os compostos derivados de 1,2,3-triazol (Lopes et al., 2017) (Figura 1).

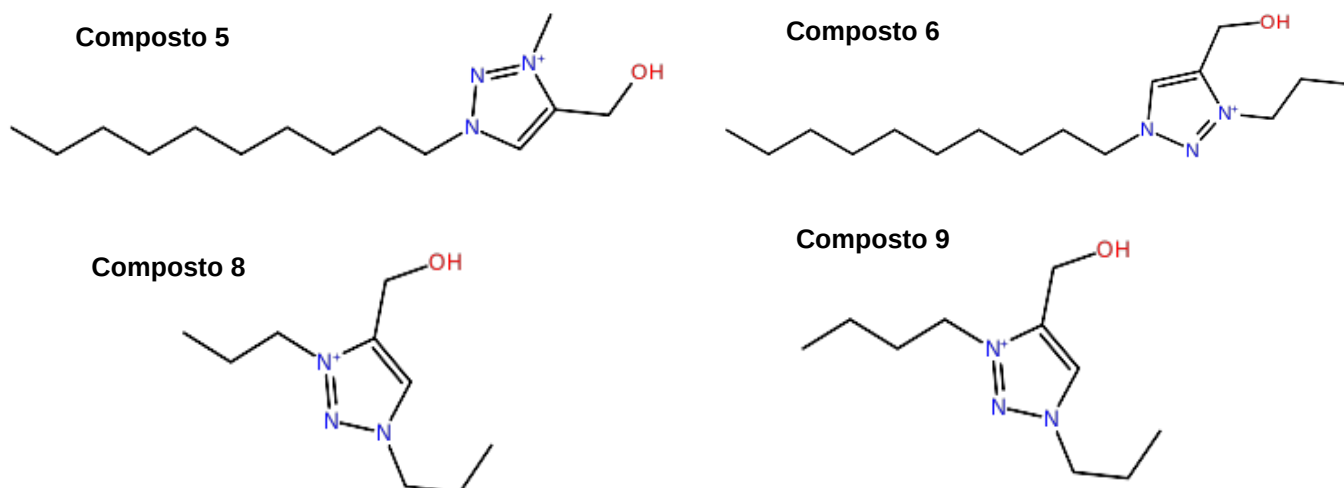
A espécie *Plasmodium berghei* é responsável por infectar roedores e se mostra válida em estudos de rastreamento de drogas com potencial de uso no tratamento de malária humana (PETERS, PORTUS e ROBINSON, 1975).

A enzima Lactato desidrogenase de *Plasmodium berghei* (PbLDH) pode ser considerada um interessante alvo de ação de novos fármacos, pois possui grande diferença estrutural com a enzima

em humanos, demonstrando especificidade de possíveis compostos que possam atuar na *PbLDH* (Read et al., 2001; Oliveira e França, 2011).

O trabalho teve como objetivo conhecer a estrutura tridimensional da enzima Lactato desidrogenase de *P. berghei* e elaborar estudos de *docking* molecular com os compostos 5, 6, 8 e 9, derivados de 1,2,3-triazol.

Figura 1 - Estrutura e classificação química dos compostos 5, 6, 8 e 9, derivados de 1,2,3-triazol, 1,3,4-trissubstituído.



Fonte Lopes et al., 2017, p.37.

2 METODOLOGIA

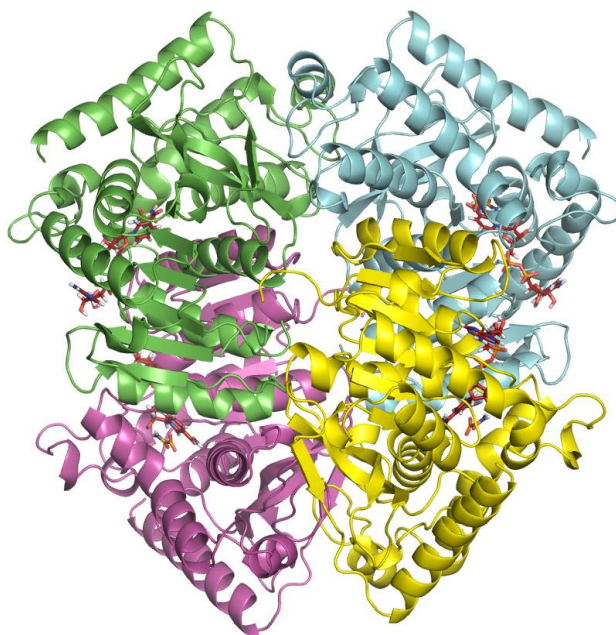
O molde para a construção tridimensional (3D) da enzima LDH de *P. berghei* (*PbLDH*), foi selecionado através do *Protein Data Bank* (PDB) sob o código de 1OC4. A partir do programa PyMOL, versão 1.4.1, foi gerada a conformação 3D da *PbLDH*, como um homotetrâmero (Figura 2). Esta estrutura foi submetida a estudos de *docking* molecular usando o pacote Schrödinger Maestro 9.3.5, e preparada usando o PrepWizard versão 4.0.518.

A *grid* para os cálculos de energia foi construída usando o programa GLIDE versão 5.8.518. O tamanho da *grid* para a enzima foi de 36 Å (22 Å externo, 14 Å interno) e centrada próxima ao resíduo catalítico, a HIS182 (Shoemark, 2007) e um dos anéis do NAD, ambos localizados no sítio ativo. A *grid* para a *PbLDH* foi centrada nas posições X = 23,89, Y = 20,69 e Z = 38,95.

A estrutura dos compostos presentes na Figura 1 foram desenhados no programa ChemSketch versão 11.0 e preparados no campo de força OPLS2005 em pH 7,2 ± 0,2, usando versão 4.0.518 do Ligprep.

Os estudos de *docking* molecular com os respectivos compostos (5, 6, 8 e 9) foram realizados utilizando o pacote Schrödinger Maestro 9.3.5. As imagens foram geradas utilizando o programa PyMOL, versão 1.4.1.

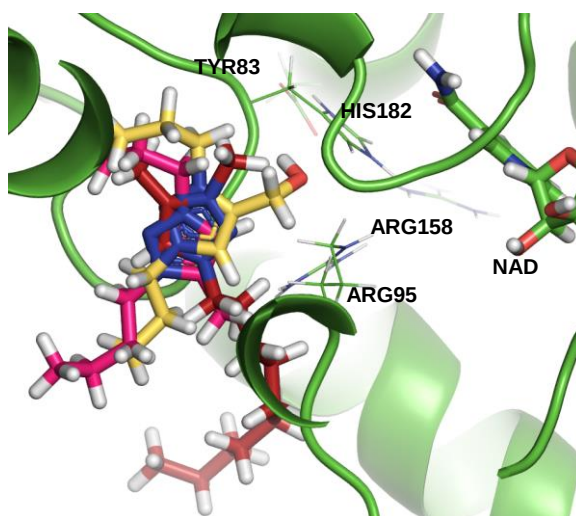
Figura 2 - Estrutura tridimensional da enzima LDH de *P. berguei* contendo o substrato oxamato e cofator NAD. Sendo a cadeia A em verde, B em azul, C em rosa e D em amarelo.



3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foi feito um *docking* com a enzima *PbLDH*, contendo em seu sítio catalítico o cofator NAD, no entanto os compostos obtiveram uma baixa energia de interação, como mostrado na Figura 3.

Figura 3 - Representação gráfica do *docking* molecular entre a *PbLDH*, o cofator NAD e os compostos (5), (6), (8) e (9). Figura gerada pelo PyMOL versão 1.4.1.



Devido a esta baixa energia de interação, os *dockings* foram realizados com os compostos 5 e 6 na enzima sem seu cofator, porém os resultados também não foram satisfatórios, uma vez que os compostos apresentaram uma baixa energia de interação com o sítio do NAD. Os resultados de Glide-Score para os compostos 5 e 6 foi igual a -0,805 Kcal/mol e -1,335 Kcal/mol, respectivamente.

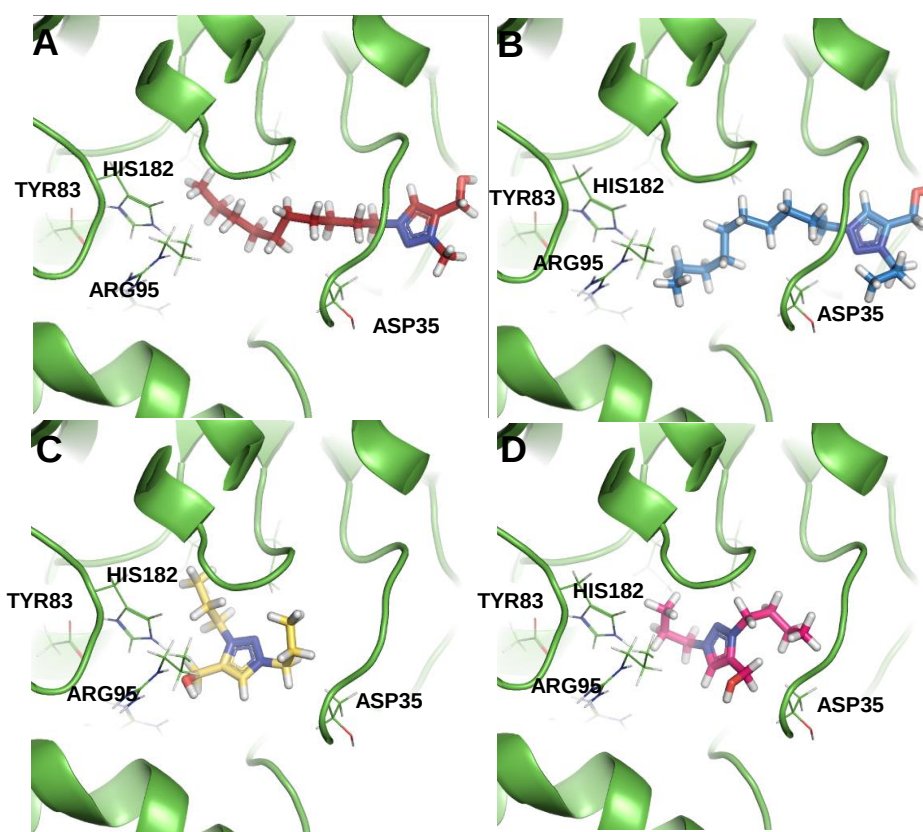
Sendo que ambos os compostos apresentaram ligação de hidrogênio com o resíduo ASP35. Esta baixa afinidade de ligação pode estar relacionada com o comprimento alongado da cadeia lateral dos derivados de triazol selecionados. Por este motivo, foram selecionados os compostos 8 e 9 por possuírem cadeias mais curtas para serem realizados os estudos de *docking* molecular. Os resultados mostraram que os compostos 8 e 9 parecem apresentar maior afinidade de interação. O composto 8 possuiu um valor de Glide-Score igual a -3.561 Kcal/mol e ligação de hidrogênio com os resíduos HIS182 e ARG95. Já o composto 9 apresentou Glide-Score igual a -4.078 Kcal/mol e interação com os resíduos ASN127 e SER234. A Figura 4 e Tabela 1 mostram os valores de energia e interações dos compostos 5, 6, 8 e 9 com a *PbLDH*.

Tabela 1 – Resultados do *docking* molecular entre a enzima *PbLDH* e os compostos 5, 6, 8 e 9, utilizando o programa Schrodinger Maestro 9.3.5.

Compostos	Glide gscore (kcal.mol ⁻¹)	Interações	cKI (μM)
5	-0,805	LigH:ASP35	256914,64
6	-1,335	LigH:ASP35	105077,29
8	-3,561	LigH:HIS182 ARG95	2454,62
9	-4,078	LigH: ASN127 SER234	1024,43

Fonte: Autor

Figura 4 - Representação do *docking* molecular entre os compostos e a enzima *PbLDH*. (A) Composto 5; (B) Composto 6; (C) Composto 8 e (D) Composto 9.



A enzima LDH é de suma importância para a geração de energia e sobrevivência do parasito (GRANCHI et al., 2010), por este motivo a partir dos estudos realizados por Cameron et al. (2004) outros estudos surgiram relacionando a atuação de triazóis e a inibição desta enzima. Uma das hipóteses levantadas é que a inibição realizada por estes compostos deve-se à sua semelhança estrutural com o cofator da enzima, o NADH, podendo levar a uma inibição do tipo competitiva da LDH. Este tipo de inibição não foi possível de se constatar no presente estudo com os derivados de 1,2,3-triazóis.

4 CONCLUSÃO

Com relação a enzima LDH de *P. berghei*, esta parece não ser o melhor alvo para os derivados de 1,2,3-triazóis que mostraram melhor atividade antimalárica no estudo de Lopes *et al.* (2017). No entanto, os derivados merecem ser objeto de futuras investigações contra outros alvos moleculares, principalmente devido à real necessidade por novos medicamentos para o tratamento da malária.

5 REFERÊNCIAS

Codato, J.C.F., Laguardia, S., Rocha, L.H.L., Kashiwabara, Y.B., Kashiwabara, T.G.B., Rocha, L.L.V. (2013). Perfil Epidemiológico Da Leishmaniose No Leste De Minas Gerais, Brasil. Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research, 5(3): 05-10.

Muguande, O.F., Ferraz, M.L., França, E., Gontijo, E.D. (2011). Avaliação da qualidade do Sistema de Vigilância Epidemiológica de Doença de Chagas Aguda em Minas Gerais, 2005-2008. Epidemiologia e Serviços de Saúde, 20(3):317-325.

Almeida, N.C., Jorge, T.A.F., Costa, L.M.R., Santo, L.R.E. (2015). Avaliação das ações de controle da esquistossomose mansônica em município de Minas Gerais. EFDeportes Revista Digital, 19(202).

WHO. World Malaria Report 2016. 2016. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/252038/1/9789241511711-eng.pdf>. Acesso em 05/08/2017.

MS-SVS. 2015. Boletim Epidemiológico - Malária: Monitoramento dos casos no Brasil em 2014.

BUTLER, A. R.; KHAN, S.; FERGUSON, E. A brief history of malaria chemotherapy. J R Coll Physicians Edinb, v. 40, n. 2, p. 172-7, 2010.

LOPES, F. Avaliação da atividade antimalárica e citotóxica de compostos derivados de 1,2,3-Triazóis em modelo murino. 23/02/17. 74p. Dissertação – Universidade Federal de Juiz de Fora.

PETERS, W.; PORTUS, J. H.; ROBINSON, B. L. The chemotherapy of rodent malaria, XXII. The value of drug-resistant strains of *P. berghei* in screening for blood schizontocidal activity. Annual Tropical Medicine Parasitology, v. 69, n. 2, p. 155-171, 1975.

READ, J. A.; WINTER, V. J.; ESZES, C. M.; SESSIONS, R. B.; BRADY, R. L. Structural basis for altered activity of M- and H-isozyme forms of human lactate dehydrogenase. Proteins, v. 43, n. 2, p.175-85, 2001.

OLIVEIRA, A. A.; FRANÇA, T. C. C. Lactato desidrogenase como alvo molecular para quimioterapia antimalarial. Revista Militar de Ciência e Tecnologia, n. 28, p. 24-39, 2011.

Deborah K. Shoemark, Matthew J. Cliff, Richard B. Sessions, Anthony R. Clarke. Enzymatic properties of the lactate dehydrogenase enzyme from Plasmodium falciparum. FEBS J. 2007 Jun; 274(11): 2738–2748.

GRANCHI, C.; BERTINI, S.; MACCHIA, M.; MINUTOLO, F. Inhibitors of lactate dehydrogenase isoforms and their therapeutic potentials. Curr Med Chem, v. 17, n. 7, p. 672-97, 2010.

CAMERON, A.; READ, J.; TRANTER, R.; WINTER, V. J.; SESSIONS, R. B.; BRADY, R. L.; VIVAS, L.; EASTON, A.; KENDRICK, H.; CROFT, S. L.; BARROS, D.; LAVANDERA, J. L.; MARTIN, J. J.; RISCO, F.; GARCÍA-OCHOA, S.; GAMO, F. J.; SANZ, L.; LEON, L.; RUIZ, J. R.; GABARRÓ, R.; MALLO, A.; GÓMEZ, H. F. Identification and activity of a series of azole-based compounds with lactate dehydrogenase-directed anti-malarial activity. J Biol Chem, v. 279, n. 30, p. 31429-39, 2004.