

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

VANESSA PETRY DO CANTO

**ESTUDO DA INTERAÇÃO DA MENADIONA COM AS
MONOAMINOOXIDASES A E B VIA DOCKING E DINÂMICA MOLECULAR**

Porto Alegre

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

VANESSA PETRY DO CANTO

**ESTUDO DA INTERAÇÃO DA MENADIONA COM AS
MONOAMINOOXIDASES A E B VIA DOCKING E DINÂMICA MOLECULAR**

Trabalho de conclusão apresentado junto à atividade de ensino “Trabalho de Conclusão de Curso – QUI” do Curso de Química, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Química.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Augusto Netz

Porto Alegre

2011

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Paulo Netz, pela confiança, por todos os ensinamentos e por me instigar a nunca parar de aprender.

Aos professores e colegas do GQT.

À toda minha família, pelo imenso apoio nas horas difíceis e nos momentos de quase descontrole, por entenderem a minha total ausência nestes últimos semestres. Em especial agradeço aos meus pais por todo apoio financeiro e moral que me permitiram chegar até aqui.

À Elisa, pelo apoio logístico, sem o qual certamente não estaria aqui hoje.

Ao Lorenzo e a Regina por serem exemplos a seguir.

Não tenho como citar aqui todos que contribuíram para a concretização desta etapa da minha vida, mas foram muitas pessoas, as quais sempre estiveram ao meu lado. À todos, muito obrigada.

TRABALHOS RELACIONADOS COM ESTA MONOGRAFIA

Resumo Publicado em Anais de Congresso e apresentação de pôster

NETZ, P.A.; do CANTO, V.P.; FOLLMER, C. Interação da MAO-A e MAO-B com menadiona e 1,4-naftoquinona via Docking e Dinâmica Molecular. In: XVI Simpósio Brasileiro de Química Teórica, 2011, Ouro Preto, MG. Livro de Resumos do XVI SBQT, 2011. p. 466.

Artigo Publicado

CERQUEIRA, E.C.; NETZ, P.A.; DINIZ, C.; do CANTO, V.P.; FOLLMER, C. Molecular insights into human monoamine oxidase (MAO) inhibition by 1,4-naphthoquinone: Evidences for menadione (vitamin K3) acting as a competitive and reversible inhibitor of MAO. *Bioorg. Med. Chem.*, **19**, 7416-7424 (2011).

RESUMO

As monoaminoxidases (MAO) são enzimas que catalisam a desaminação oxidativa de neurotransmissores, como por exemplo, a serotonina e a dopamina, bem como de monoaminas exógenas. Existem duas isoformas da MAO, a MAO-A e a MAO-B, sendo que ambas são flavoenzimas, isto é, apresentam em sua estrutura a coenzima FAD (Flavina Adenina Dinucleotídeo). Os inibidores da MAO podem atuar no tratamento da depressão, no alívio dos sintomas de pacientes com Doença de Parkinson e também tem ação como agentes neuroprotetores. Assim, o estudo de moléculas cuja interação com a MAO-A e MAO-B seja capaz de inibir suas atividades catalíticas, bem como a avaliação da especificidade desta interação, é bastante importante. A Química Computacional, através do estudo da interação enzima-substrato, apresenta grande contribuição na área de planejamento racional de fármacos.

Neste trabalho, foi realizado um estudo da interação da vitamina K3 – menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona) – com a MAO-A e com a MAO-B. As estruturas cristalográficas com as coordenadas das duas enzimas, contendo FAD, foram extraídas do PDB (*Protein Data Bank*) e a estrutura da menadiona foi construída e otimizada com o programa Gaussian. Primeiramente, usando a metodologia de *Docking Molecular*, através dos programas *AutoDock* e *AutoDockTools*, foi realizado o *docking cego* (onde o *grid* abrange quase toda a proteína) da menadiona com a MAO-A e MAO-B. Foram detectadas interações significativas da menadiona com a região do sítio ativo de ambas as enzimas, assim, foi realizado *docking fino*, onde o *grid* foi restrito à região do sítio ativo e adjacências. Os resultados do *docking fino* mostraram que a interação mais favorável da menadiona com a MAO-A, e também com a MAO-B, ocorreu na região do sítio ativo. A partir da estrutura do complexo do *cluster* de menor energia, obtido via *Docking*, foram realizadas simulações de Dinâmica Molecular (DM), dos seguintes sistemas: [MAO-B], [MAO-B + MENADIONA], [MAO-B + FAD], [MAO-B + FAD + MENADIONA] e [MAO-A + FAD + MENADIONA].

Os resultados do *Docking* e da DM mostraram a importância da coenzima FAD no mecanismo de inibição, bem como as interações importantes do ligante menadiona com resíduos do sítio ativo de ambas as enzimas, em concordância com dados experimentais.

Palavras-chave: MAO, MAO-A, MAO-B, FAD, menadiona, sítio ativo, *Docking*, Dinâmica Molecular.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	6
2 OBJETIVOS.....	10
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	11
3.1 PROTEÍNAS – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	11
3.2 ENZIMAS E SUBSTRATOS.....	15
3.3 PLANEJAMENTO RACIONAL DE FÁRMACOS.....	17
3.4 QUÍMICA TEÓRICA E QUÍMICA COMPUTACIONAL.....	18
3.4.1 Docking Molecular	19
3.4.2 Dinâmica Molecular.....	20
4 METODOLOGIA.....	26
4.1 BANCO DE DADOS.....	26
4.2 DOCKING MOLECULAR.....	27
4.3 DINÂMICA MOLECULAR.....	28
4.4 ANÁLISES DOS RESULTADOS.....	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	31
6 CONCLUSÕES.....	49
REFERÊNCIAS.....	50

1 INTRODUÇÃO

As proteínas e os ácidos nucleicos, RNA e DNA, são as moléculas-chave nos processos da vida, assim como os lipídeos, componentes das membranas celulares. Desta forma, entendemos sua importância biológica, sendo que a alta complexidade dessas moléculas motivou pesquisadores de diversas áreas do conhecimento, incluindo a Química, a analisar suas estruturas e também a estudar seus mecanismos de ação. Uma das funções mais importantes das proteínas, por exemplo, é atuando como catalisadores de reações bioquímicas, onde são denominadas enzimas.¹

A monoaminoxidase (MAO) é uma enzima que catalisa a desaminação oxidativa de monoaminas, sejam elas endógenas, como os neurotransmissores serotonina, dopamina, epinefrina e norepinefrina, ou exógenas, como a tiramina. Além da importância para o catabolismo dos neurotransmissores e metabolismo de drogas associadas, como antidepressivos, por exemplo, a MAO também está relacionada a distúrbios neurodegenerativos como Doença de Parkinson e Alzheimer.^{2,3,4}

Existem duas isoformas da MAO, a monoaminoxidase A (MAO-A) e a B (MAO-B), cujas estruturas estão relacionadas e ambas apresentam a coenzima FAD (Flavina Adenina Dinucleotídeo). As duas enzimas têm em comum cerca de 70% dos seus aminoácidos embora sejam codificadas por genes diferentes e apresentem especificidade de substrato e/ou inibidores.² Além disso, associam-se à superfície externa das mitocôndrias e estão distribuídas em proporções variadas nas células do Sistema Nervoso Central (SNC) e dos tecidos periféricos. A MAO-A humana localiza-se, preferencialmente, no fígado e distribuída de maneira dispersa no cérebro, além de estar presente também na placenta.³ Já a MAO-B humana localiza-se especialmente nas plaquetas, linfócitos, fígado e também concentrada em algumas regiões específicas do cérebro.^{5,6,7}

Os principais neurotransmissores que são substratos da MAO e algumas de suas funções estão relacionados abaixo:⁶

- Epinefrina (adrenalina): tem ação sobre o coração e o músculo liso vascular, sendo um poderoso estimulante cardíaco.

- Norepinefrina (noradrenalina): periféricamente, age especialmente na constrição dos vasos sanguíneos, causando aumento da pressão arterial, e no SNC apresenta ação sobre a regulação das emoções, estando relacionada com manifestações de agressividade e depressão.
- Dopamina: é o precursor metabólico imediato da norepinefrina e epinefrina. Além disso, é um neurotransmissor central, particularmente importante na regulação do movimento.
- Serotonina: é regulador do músculo liso do sistema cardiovascular e do trato gastrointestinal, além de neurotransmissor do SNC com grande importância para a regulação da dor e do humor.

A MAO-A metaboliza principalmente a serotonina, a epinefrina e a norepinefrina, já a MAO-B tem como substratos preferenciais a β -feniletilamina e a benzilamina. A clorgilina é um inibidor específico da MAO-A, enquanto a rasagilina e selegilina (*L*-deprenyl) são inibidores seletivos da MAO-B. No cérebro, a MAO-B humana é a responsável pela maior parte do metabolismo oxidativo da dopamina. Fenelzina e tranilcipromina inibem tanto a MAO-A quanto a MAO-B.^{2,6,8}

Na prática, os inibidores seletivos da MAO-A apresentam melhores resultados para tratamento de depressão (relacionada com déficit de serotonina) e como agentes cardioprotetores, uma vez que a MAO-A está associada com a degeneração de células cardíacas. Já os inibidores seletivos da MAO-B são mais usados para o tratamento da Doença de Parkinson em estágio inicial, permitindo um aumento nos níveis de dopamina, bem como diminuição dos danos decorrentes do processo oxidativo da mesma. Inibidores inespecíficos podem causar efeitos indesejáveis, devido ao fato de potencializar a ação de outras monoaminas através da inibição do metabolismo periférico. Um exemplo é a ocorrência de crises hipertensivas em pacientes sob tratamento com inibidores da MAO, decorrente da ingestão de queijo, cerveja ou vinho tinto, uma vez que esses alimentos contêm grandes quantidades de tiramina, convertida no organismo em norepinefrina, cujo metabolismo pode ficar descontrolado.^{6,9,10}

A formação de subprodutos tóxicos no metabolismo oxidativo é um dos fatores que pode levar à degradação neuronal, uma das possíveis causas para os distúrbios neurodegenerativos como Doenças de Parkinson e Alzheimer. Isso ocorre

devido ao fato do metabolismo oxidativo gerar compostos bastante reativos durante o processo, como, por exemplo, peróxido de hidrogênio ou radicais de oxigênio. Esses produtos, se não forem devidamente convertidos, podem causar danos ao DNA e às membranas celulares, com conseqüente morte neuronal. Esses processos são denominados, muitas vezes, de *estresse oxidativo*.^{2,6}

Os maiores desafios para estudos experimentais são decorrentes da dificuldade de obtenção de MAO-A e MAO-B humanas purificadas, uma vez que elas se localizam na membrana externa das mitocôndrias e podem estar presente em vários tecidos ao mesmo tempo, dificultando a separação entre elas. O aprimoramento das técnicas experimentais para obtenção das enzimas purificadas permitiu um avanço na determinação estrutural, sendo a primeira estrutura cristalográfica da MAO-B humana determinada por Binda *et. al.*, em 2002,⁴ e da MAO-A humana, em 2005, por Colibus *et. al.*¹¹ A análise estrutural de biomoléculas é importante para o esclarecimento dos seus mecanismos de ação, bem como para a descoberta de novas drogas, com grau de especificidade cada vez maior.

A MAO-B humana cristaliza como um homodímero, sendo que cada monômero apresenta 520 resíduos de aminoácidos e tem o FAD em sua estrutura.^{9,12} Já a MAO-A humana cristaliza como um monômero.¹¹ As estruturas, representadas nas Figuras 1A e 1B, da MAO-A e MAO-B, respectivamente, podem ser divididas em três regiões distintas e denominadas:^{2,3}

- *domínio de ligação com FAD*: compreende a sequência de resíduos 13-88, 220-294 e 400-462 para MAO-A e 4-79, 211-285, 391-453 para MAO-B;
- *domínio de ligação com substrato/inibidor*: resíduos 89-219 e 295-399 para MAO-A e 80-210, 286-390 e 454-488 para MAO-B
- *domínio de ligação com a membrana, ou C-terminal*: compreende os resíduos 463-506 para MAO-A e 489-500 para MAO-B.

A elucidação estrutural da MAO-A e MAO-B humanas abre caminho para um melhor entendimento dos mecanismos de ação dessas enzimas, tanto do metabolismo oxidativo, quanto dos processos inibitórios.¹³ Além disso, aprimora o desenvolvimento de novas drogas, mais específicas e eficazes, com efeitos colaterais minimizados, não somente para o tratamento e alívio sintomático de

portadores de Doença de Parkinson ou depressão, como também como agentes neuroprotetores.^{2,6,9}

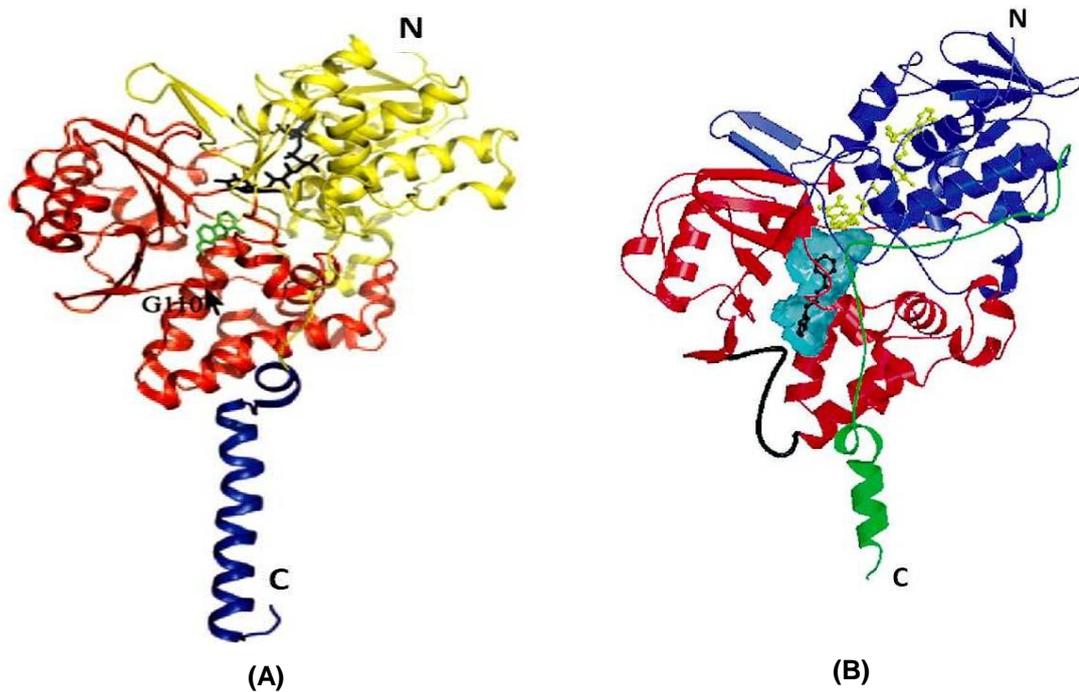


Figura 1: (A) estrutura MAO-A, região FAD em amarelo, do substrato/inibidor em vermelho e região de ligação com a membrana mitocondrial, ou C-terminal, em azul. O inibidor (harmina) é representado em verde.² (B) estrutura da MAO-B, região FAD em azul, do substrato/inibidor em vermelho e em verde a região C-terminal. O sítio de ligação com o inibidor (1,4-difenil-2-buteno, em preto) é representado pela região em ciano.³

No presente trabalho, o estudo da interação da menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona) com as MAO-A e MAO-B é realizado através de metodologias computacionais de *Docking* e Dinâmica Molecular (DM). Estes estudos fornecem, portanto, informações que podem ser utilizadas no desenho racional de novos fármacos inibidores das monoaminoxidases.

A menadiona, conhecida como vitamina K3, é um composto sintético derivado da 1,4-naftoquinona, que apresenta atividade biológica e é precursor de outras formas da vitamina K.⁹ A estrutura da menadiona é apresentada na Figura 2.

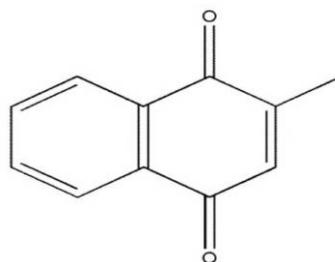


Figura 2: estrutura da menadiona (2-metil1,4-naftoquinona).⁹

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Estudar a interação do ligante menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona) com as duas isoformas da enzima monoaminoxidase (MAO), a MAO-A e a MAO-B, através das metodologias computacionais de *Docking* e Simulação por Dinâmica Molecular (DM).

Objetivos Específicos

Investigar quais resíduos de aminoácidos da MAO interagem com a menadiona.

Comparar a estabilidade dos sistemas: [MAO-B], [MAO-B + FAD], [MAO-B + MENADIONA] e [MAO-B + FAD + MENADIONA].

Verificar a especificidade da interação da menadiona com a MAO-A e com a MAO-B.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Neste capítulo serão abordados alguns temas cujos conteúdos são importantes para um melhor entendimento do presente trabalho, tais como estrutura das proteínas em geral, enzimas e substratos, planejamento de fármacos e alguns conceitos básicos das metodologias de *Docking* e Dinâmica Molecular.

3.1 PROTEÍNAS – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Quase todos os processos que sustentam os organismos vivos são realizados por proteínas. As proteínas são constituídas a partir de um conjunto de 19 α -aminoácidos, que apresentam um grupo amino primário e um grupo carboxila ligados ao mesmo átomo de carbono (Figura 3A), mais a prolina, que apresenta um grupo amino secundário. Na faixa de pH fisiológico (usualmente pH igual a 7,4), os grupos carboxila e amino dos aminoácidos encontram-se na forma ionizada (Figura 3B), também chamada de forma *zwitteriônica*, ou íon dipolar, pois apresentam grupos com cargas elétricas opostas na mesma molécula. Sendo assim, os aminoácidos podem atuar como base ou como ácido.¹



Figura 3: (A) fórmula geral para α -aminoácidos. (B) forma zwitteriônica em pH fisiológico.

Os 20 aminoácidos “padrão” apresentam diferenças nas cadeias laterais (R), podendo ser apolar, polar sem carga ou polar com carga. A grande variação de algumas propriedades físico-químicas entre esses aminoácidos pode ser uma das explicações para a versatilidade das proteínas.¹⁴ Os aminoácidos também podem ser classificados de acordo com a afinidade entre sua cadeia lateral e a água, ou seja, são hidrofóbicos ou hidrofílicos de acordo com propriedades da cadeia lateral.

Esta afinidade é uma propriedade muito importante para a estrutura tridimensional das proteínas.

O átomo de carbono- α dos 20 aminoácidos “padrão”, com exceção da glicina, é assimétrico (quiral), ou seja, apresenta quatro substituintes diferentes, que podem ocupar posições espaciais distintas. Isso gera moléculas que são imagem especular uma da outra, denominadas de estereoisômeros. Essas moléculas que apresentam um centro quiral possuem a propriedade de desviar a luz polarizada, ou seja, são opticamente ativas. Em geral, as biomoléculas com centro quiral ocorrem na natureza em uma única configuração, sendo os aminoácidos das proteínas designados por *L*-aminoácidos.^{14,15}

A condensação de dois ou mais α -aminoácidos, por meio da eliminação de moléculas de água e formação de uma ligação entre o grupo carboxílico de um com o grupo amino de outro, resulta em um polímero que apresenta desde poucos resíduos de aminoácidos, chamados de dipeptídeos, tripeptídeos, etc, até milhares de resíduos, designados como polipeptídeo. Esta ligação entre o carbono α -carboxílico de um aminoácido e o nitrogênio do grupo α -amino de outro é chamada de *ligação peptídica*.¹⁴

As proteínas são moléculas que apresentam uma ou mais cadeias polipeptídicas, isto é, são compostas por cadeias que variam de 40 a 33.000 resíduos de aminoácidos, no entanto, a maioria apresenta menos de 1.500 resíduos.¹⁴

A organização estrutural de uma proteína, Figura 4, pode ser descrita em quatro níveis:^{14,16}

- I. Estrutura primária – sequência de aminoácidos, conjunto de ligações químicas primárias;
- II. Estrutura secundária – arranjo espacial do *esqueleto* do polipeptídeo, padrões regulares dos dobramentos, atribuição de hélices, folhas e voltas, de acordo com o padrão de ligações de hidrogênio da cadeia principal;
- III. Estrutura terciária – conformação tridimensional, dobramento dos elementos de sua estrutura secundária, agrupamentos e interações das hélices, folhas β e alças, que se associam através de interações não-covalentes, ou pontes dissulfeto (em alguns casos), formando subunidades ou monômeros;

IV. Estrutura quaternária – arranjo espacial das proteínas compostas por mais de uma subunidade.

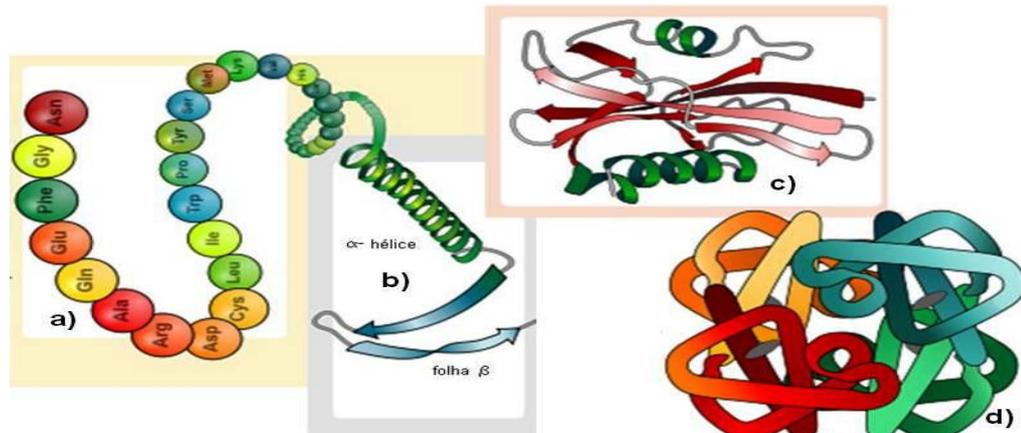


Figura 4: estruturas de uma proteína – **a)** primária, resíduos de aminoácidos; **b)** secundária, hélice e folha; **c)** terciária, cadeia protéica completa; **d)** quaternária, várias cadeias formando um oligômero.¹⁷

O arranjo espacial que determina a estrutura secundária de uma proteína apresenta basicamente três estruturas:¹⁴

- Hélices – é caracterizado pela torção regular da cadeia polipeptídica, que se mantém unida por ligações de hidrogênio; a α -hélice é um tipo de estrutura helicoidal particularmente rígido;
- Folhas- β – estrutura secundária de uma proteína em que as ligações de hidrogênio ocorrem entre cadeias polipeptídicas vizinhas.
- Estruturas não-repetitivas – são estruturas irregulares, que geralmente aparecem na superfície das proteínas e podem conectar outras estruturas secundárias, sendo designadas como alças ou voltas reversas, também chamadas de curvaturas β . As curvaturas- β são elementos da estrutura secundária, em geral com uma sequência de quatro resíduos, que mudam a direção de uma cadeia (folha- β) em 180° , algumas vezes chamada também de “grampo”. Esses segmentos podem ter um papel importante no mecanismo de interação de uma proteína com uma molécula específica.

Na Tabela 1, estão listados os 20 aminoácidos “padrão”, com suas abreviações de três letras e de uma letra, além da representação de suas estruturas, com a cadeia lateral predominante em pH fisiológico destacada.¹⁵

Tabela 1: 20 aminoácidos “padrão”, abreviaturas e estruturas.

aminoácido	estrutura	aminoácido	estrutura	aminoácido	estrutura
ÁCIDO ASPÁRTICO ASP D		ÁCIDO GLUTÂMICO GLU E		ALANINA ALA A	
ARGININA ARG R		ASPARAGINA ASN N		CISTEINA CYS C	
FENILALANINA PHE F		GLICINA GLY G		GLUTAMINA GLN Q	
HISTIDINA HIS H		ISOLEUCINA ILE I		LEUCINA LEU L	
LISINA LYS K		METIONINA MET M		PROLINA PRO P	
SERINA SER S		TIROSINA TYR Y		TREONINA THR T	
TRIPTOFANO TRP W		VALINA VAL V			

Para a compreensão do mecanismo molecular e elucidação da estrutura de uma proteína é necessário o conhecimento da sua sequência de aminoácidos. Em 1953, Frederick Sanger realizou a primeira determinação da sequência completa de aminoácidos de uma proteína, a do hormônio polipeptídico insulina bovina, que contém 51 resíduos.¹⁸ Em 1976 havia no *Protein Data Bank* (PDB) 13 estruturas¹⁹ de proteínas definidas. Hoje, são conhecidas 70.218 estruturas¹⁹ de proteínas (incluindo aquelas repetidas ou de mutantes pontuais), de acordo com dados do PDB de setembro de 2011, sendo que a maioria foi determinada por cristalografia por Difração de Raios X (DRX) ou por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

As proteínas têm um papel fundamental nos processos biológicos, onde desempenham inúmeras funções, entre elas: catálise, regulação, transporte e armazenagem, estruturais, reconhecimento.¹⁶

A função desempenhada por uma dada proteína é determinada, em geral, pelas características do modo de ligação entre essa proteína e seu substrato, isto é a molécula a qual sofre a ação da proteína. Apesar de uma proteína ser composta, em geral, por inúmeros resíduos de aminoácidos, em muitos casos uma pequena porção desta estrutura, o *sítio ativo*, é o responsável pelas suas principais propriedades.

3.2 ENZIMAS E SUBSTRATOS

As enzimas são proteínas que atuam como catalisadores das reações bioquímicas, promovendo um aumento considerável de suas velocidades. Elas atuam sobre um único substrato, ou sobre um pequeno número de substratos relacionados. O conhecimento das estruturas tridimensionais das proteínas é importante para entender o modo de ligação enzima-substrato e também o processo catalítico em si.¹

Muitas hipóteses foram propostas para explicar como as enzimas catalisam as reações. Contudo, uma característica comum é a de que a reação catalisada por uma enzima é iniciada pela formação de um complexo enzima-substrato, a partir da qual a catálise ocorre. Os modelos usados para descrever interações entre enzimas e seus substratos podem ser estendidos a outros sistemas biológicos, denominados genericamente de receptor-ligante. Assim, podemos definir *receptor* como o

componente do organismo com o qual uma dada substância (endógena ou exógena) interage. Dentre os receptores farmacológicos, as proteínas/enzimas e os ácidos nucléicos são os grupos mais importantes.^{6,20}

Em 1894, Emil Fischer propôs um modelo, conhecido como *chave-fechadura*¹⁴ em que a alta especificidade de uma enzima (*fechadura*) com seu substrato (*chave*) é devido a fatores geométricos complementares. O modelo chave-fechadura apresenta algumas falhas, especialmente porque não considera a flexibilidade dos sistemas biológicos. Com isso, um modelo mais aprimorado, a hipótese do *encaixe induzido*, foi proposto inicialmente por Koshland²⁰. Neste modelo, o receptor na ausência do substrato apresenta uma estrutura conformacional, a qual sofre modificações induzidas pela interação com o ligante, com a finalidade de aumentar a afinidade entre receptor-substrato. Em geral, esta mudança conformacional ocorre em um sítio específico do receptor, que recebe o substrato, porém, outras regiões também podem sofrer mudança estrutural influenciadas por esta interação receptor-ligante, regulação chamada de *efeito alostérico*.^{14,21}

A interação de um substrato com seu receptor ocorre através de forças não-covalentes, entre elas, interações eletrostáticas, hidrofóbicas e ligações de hidrogênio, da mesma forma que essas forças mantêm a conformação estrutural de uma proteína.^{14,21}

➤ *interações eletrostáticas*

- *forças iônicas* – essas interações, chamadas de par iônico ou ponte salina, ocorrem entre grupos iônicos de cargas opostas e são bastante fortes, porém, não estabilizam o sistema, uma vez que em soluções aquosas, esses íons estão altamente solvatados.
- *forças de van der Waals* (VDW) – interações dipolo-dipolo, permanentes ou induzidos.
 - dipolo-dipolo: ocorre por exemplo entre os grupo carbonila e amida da cadeia peptídica, influenciando o dobramento de uma proteína, e pode ser de atração como também de repulsão.
 - dipolo-dipolo induzido: mais fracas que as primeiras, mas são sempre forças atrativas.
 - dipolo induzido-dipolo induzido: chamadas de forças de dispersão de London, resultando em interação atrativa também. Embora fracas, essas

forças de dispersão no interior de uma proteína (cuja estrutura, em geral é bastante empacotada e, por isso, promove muitos contatos interatômicos) são muito importantes, seja na determinação conformacional da proteína ou mesmo na sua interação com um substrato.

- *ligações de hidrogênio* – embora também de natureza eletrostática, as ligações de hidrogênio apresentam um caráter covalente maior que as forças de van der VDW. É indiscutível a importância das ligações de hidrogênio e detalhes sobre sua natureza podem ser encontrados em publicações atuais, como em ARUNAN *et. al.*^{22,23}
- *forças hidrofóbicas* – substâncias apolares tendem a se organizar de maneira a minimizar sua interação com a água, por exemplo, através da formação de micelas. Neste arranjo estrutural ocorre liberação de água de solvatação e conseqüente aumento de entropia. As proteínas nativas apresentam uma estrutura do tipo micela intramolecular, com regiões predominantemente hidrofílicas e outras hidrofóbicas, de modo que este tipo de interação tende a ser importante na sua estrutura conformacional, determinando seu padrão de dobramento, por exemplo.

3.3 PLANEJAMENTO RACIONAL DE FÁRMACOS

O avanço na resolução de estruturas de macromoléculas biológicas através de Difração de Raios-X (DRX) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) permitiu o surgimento de um novo processo para a predição de novas drogas, conhecido como *desenho racional de drogas* ou *planejamento racional de fármacos*.¹⁴

Uma das etapas deste processo é a investigação da relação entre a estrutura de um possível fármaco (composto natural ou sintético) e sua atividade biológica, seguido do estudo de sua interação com diversos receptores, incluindo enzimas, membranas e DNA. Uma das maneiras de observar mudanças conformacionais devido ao encaixe induzido em receptores biológicos é através da comparação entre estruturas cristalográficas de um determinado receptor com diversos ligantes diferentes. Porém, a obtenção dos receptores purificados, bem como sua cristalização com os ligantes nem sempre é uma tarefa fácil.²⁰

A primeira dificuldade na descoberta de uma nova droga é a identificação do composto 'líder', ou seja, um composto cuja estrutura possa apresentar potencial interação biológica. Esta busca é realizada com base na semelhança estrutural do composto alvo com outras substâncias de atividade farmacológica previamente conhecida. Isto é, sobre o *esqueleto molecular* de um determinado composto, é construída uma nova molécula.^{20,24} Muitas moléculas que agem sobre receptores biológicos são derivadas de substâncias químicas originárias de espécies vegetais, incluindo alguns fármacos prescritos para o tratamento do câncer.⁶ Neste contexto, a Química Medicinal, através de metodologias computacionais, entre outras, contribui muito para o desenvolvimento de novos fármacos.^{21,25,26}

3.4 QUÍMICA TEÓRICA E QUÍMICA COMPUTACIONAL

O emprego de ferramentas computacionais ocorre em diversas áreas do Conhecimento, inclusive naquelas que são essencialmente experimentais, como a Química, por exemplo. É possível diferenciar a *Química Teórica*, que baseia-se especialmente no desenvolvimento de metodologias matemáticas ou modelos físicos que descrevam propriedades químicas, da *Química Computacional*, que emprega os métodos computacionais disponíveis nos estudos dos sistemas químicos. Porém, aqui, ambas as terminologias serão tratadas como sinônimos.

Diversas metodologias foram desenvolvidas a fim de entender sistemas químicos, sendo que no presente trabalho serão abordadas duas delas, o *Docking Molecular* e a simulação por *Dinâmica Molecular* (DM). Essas duas metodologias são amplamente usadas para estudos de sistemas bioquímicos, tais como avaliação conformacional de macromoléculas de interesse biológico e análise da interação enzima-substrato, bem como outras biomoléculas e substratos específicos. Como o *Docking*, em geral, não considera a flexibilidade da macromolécula, sua combinação com simulações por DM permite um estudo dinâmico, com avaliação do sistema através da evolução temporal.

3.4.1 *Docking Molecular*

Docking Molecular é um método computacional que “*encaixa*” um ligante, geralmente pequeno, em um alvo macromolecular, como uma proteína, por exemplo. Além disso, avalia a intensidade da interação entre eles. Essa metodologia tem um papel importante no planejamento de fármacos.^{26,27}

Para o *Docking*, são necessários dois princípios básicos: um método de busca para o espaço conformacional disponível e um método para avaliar a energia de cada conformação. Assim, um programa de *docking* é composto, basicamente, por um *algoritmo de busca* e por uma *função de escore*. Dentre os algoritmos de busca, os métodos estocásticos são bastante usados nos programas de docking. Eles realizam alterações aleatórias, as quais são aceitas ou não, de acordo com a avaliação realizada em cada etapa pelas funções de escore. Os algoritmos genéticos são exemplos de algoritmos estocásticos.²⁸

Os algoritmos genéticos são baseados na evolução natural das espécies, onde cada indivíduo representa uma determinada posição do ligante e a solução adaptativa corresponde à melhor conformação ligante-receptor. Inicialmente é gerada uma população de ligantes posicionados aleatoriamente no espaço, após é realizada uma estimativa da energia de interação entre um indivíduo com o receptor, desta análise são selecionados os progenitores, isto é, aqueles cujas interações são as melhores. Esses progenitores sofrerão mutação ou *crossing-over*, a partir da aplicação dos operadores genéticos. Se a interação deste novo indivíduo com o receptor for melhor do que aquela do seu progenitor, ele será selecionado para substituir os indivíduos da geração anterior cujas interações sejam menos favoráveis. Esse processo é realizado sucessivamente até chegar ao número máximo de gerações ou avaliações de energia, definidos previamente.²⁶

O algoritmo de busca, ‘*varre*’ o espaço de fases em busca das possíveis conformações entre o ligante e a macromolécula, sendo que os resultados são avaliados pela *função de escore*, que pontua cada modo de ligação (conformação), da melhor interação à pior, ordenando-as em um *ranking*. Essa metodologia permite identificar as melhores conformações do ligante em relação à macromolécula, as quais podem apresentar potencial atividade biológica, e assim, o composto poderá ser um alvo para o planejamento de um novo fármaco.²⁸

Em geral, os programas de *docking* consideram a macromolécula rígida (alguns levam em conta a flexibilidade de alguns resíduos escolhidos previamente), sendo assim, o uso das metodologias de simulação por DM combinada com docking permite uma melhor avaliação da flexibilidade da macromolécula, o que pode ser fundamental para entender mudanças conformacionais de enzimas quando ligadas a substratos ou inibidores.

3.4.2 Dinâmica Molecular

O comportamento de um dado sistema pode ser estudado a partir da análise do comportamento das partículas que o compõem, sendo a simulação por Dinâmica Molecular (DM) uma importante ferramenta computacional que permite este estudo.²⁹

A simulação por DM resolve a equação do movimento de Newton, para N átomos interagindo. A configuração inicial de um sistema deve ser pré-determinada, o movimento das partículas é então descrito através de interações, de acordo com a Mecânica Clássica, onde são calculadas as trajetórias – posições e velocidades – de todas as partículas sob a influência de potenciais intra e intermoleculares, cujas equações devem ser conhecidas.

Programas computacionais que realizam simulações por DM resolvem as equações do movimento simultaneamente em passos de tempo pequenos, durante um tempo pré-determinado, sendo as coordenadas escritas em um arquivo de saída a intervalos regulares. As coordenadas em função do tempo representam a trajetória do sistema. Através das médias das trajetórias, muitas propriedades macroscópicas podem ser extraídas. A partir da evolução temporal do sistema é possível a determinação de algumas propriedades macroscópicas, através de princípios da Mecânica Estatística.^{25,29} Essas propriedades são determinadas a partir de médias temporais sobre um intervalo de tempo suficientemente longo na escala atômica, o que corresponde a cerca de 10^{-11} a 10^{-8} segundos de tempo real. Os processos dinâmicos e a convergência das propriedades de interesse determinam o tempo total de uma simulação.²⁹

O uso da equação do movimento de Newton implica no uso da Mecânica Clássica para descrever os movimentos atômicos. A fim de minimizar equívocos

decorrentes desta abordagem, algumas aproximações podem ser feitas, tais como: manter os comprimentos das ligações fixos ao longo da simulação e desconsiderar os movimentos eletrônicos, uma vez que estes são ajustados instantaneamente devido ao fato de serem muito mais rápidos do que os dos núcleos (aproximação Born-Oppenheimer).³⁰

Através de simulações por DM, processos que ocorrem a energias da ordem de $k_B T$ (k_B = constante de Boltzmann e T = temperatura em Kelvin, numa faixa de 100 a 800 K) como interações entre átomos, moléculas ou íons e mudanças conformacionais podem ser bem compreendidos. A temperatura ambiente, $k_B T$ é aproximadamente igual a 200 cm^{-1} , portanto, processos que ocorram a frequências maiores, como, por exemplo, reações químicas ou transições eletrônicas, não podem ser descritos por DM convencional. Os potenciais de interação molecular utilizados nas simulações por DM convencionais, embora essencialmente clássicos, são, em geral, derivados de aproximações de potenciais quânticos. Hoje existem alguns métodos híbridos, que combinam comportamento quântico e clássico, porém no presente trabalho a abordagem será essencialmente clássica, isto é, não serão consideradas quebras de ligações, interações entre orbitais ou efeitos de deslocalização eletrônica.

Um das vantagens das simulações por DM é que diversos sistemas podem ser estudados, desde os mais simples, como gases ou líquidos puros ou em misturas homogêneas, até sistemas mais complexos, como biomembranas e proteínas. Além disso, resultados de DM mostraram-se coerentes com dados obtidos experimentalmente.²⁵

A realização de uma simulação por DM envolve algumas etapas essenciais:^{29,31}

inicialização – determinação da configuração inicial do sistema. Em geral, as moléculas que compõem o sistema a ser simulado são inseridas em uma caixa de simulação, que pode ser cúbica ou com outra geometria. São aplicadas as *condições periódicas de contorno*, bem como a *convenção da imagem mínima* ou *raio de corte esférico*. As coordenadas iniciais das moléculas na caixa devem ser organizadas de modo a evitar sobreposições. Para simulação de sistemas biológicos, a configuração inicial da macromolécula é obtida, normalmente, a partir de banco de dados de estruturas (PDB), sendo as moléculas de solvente e contra-

íons adicionadas posteriormente à caixa de simulação. Nesta etapa também pode ser efetuada uma minimização da energia do sistema, através da reorganização das moléculas dentro da caixa. Além disso, as velocidades iniciais das partículas devem ser especificadas, bem como a definição do ensemble a ser utilizado.

cálculo das forças – parte da DM que mais consome tempo. Deve ser determinada a distância de cada átomo i a um vizinho j , bem como o raio de corte para as interações intermoleculares, se duas partículas estão próximas o suficiente para interagir, são computadas as forças resultantes sobre cada uma.

Integração das equações de movimento – é o cálculo das novas posições e velocidades, ou seja, a atualização da trajetória. Esta etapa é realizada por algoritmos integradores, sendo que um dos melhores e mais simples é o algoritmo de Verlet.

Amostragem – a cada número de etapas e passos de integração (por exemplo, 10^6 etapas e Δt de 10^{-15} s) predeterminados, são gravadas as trajetórias para o cálculo das propriedades de interesse, que devem ser expressas em função das posições e velocidades atômicas.

Campo de Força

Uma das prioridades de uma simulação DM é a escolha adequada do *campo de força* a ser utilizado, uma vez que os potenciais de interação inter e intramoleculares determinarão as trajetórias ao longo do tempo, a partir do cálculo das forças que atuam em cada molécula. Denomina-se *Campo de Força* como sendo o conjunto de todos os parâmetros que descrevem as interações intra e intermoleculares.²⁹

Diversos *campos de força* foram desenvolvidos por vários grupos de pesquisa, com aplicabilidade variada, dentre eles, destacam-se AMBER³², CHARMM³³, GROMOS³⁴ e OPLS³⁵ que apresentam uma boa parametrização para utilização em simulações por DM para biomoléculas em geral.

Em geral, os *campos de força* mais simples consideram os átomos como pontos de massa que se movem, e estes podem ser descritos explicitamente (*all-atom*) ou agrupados (*united atom*), onde um grupo CH₃, por exemplo, é considerado um único *sítio* na molécula.³⁶

A construção de um *campo de força* é feita a partir de dois componentes: o *conjunto de equações* (ou *funções potenciais*) e os parâmetros usados nestas equações. Essas equações podem ser divididas em *potenciais ligados* e *potenciais não-ligados*.

Os *potenciais ligados*, ou interações intramoleculares, descrevem as deformações moleculares, tais como: estiramento da ligação química (interação entre dois átomos), deformação angular da ligação (três átomos), torção de ângulos diedros *próprios* e diedros *impróprios* (quatro átomos), sendo os últimos devido às interações por deformação fora do plano ou à conversão de um isômero na sua imagem especular.^{30,36} Os termos de estiramento entre dois átomos *i* e *j* ligados covalentemente, e de deformação angular entre três átomos *i*, *j* e *k* são descritos, normalmente, por potenciais harmônicos. O potencial de torção de diedros próprios (ou diedral) é dado por uma função periódica e é contínuo no intervalo de torção de 0 a 2π . Alguns *campos de força* usam potenciais harmônicos para descrever os diedros impróprios.

Os *potenciais não-ligados*, ou interações intermoleculares, representam as interações dispersivas e eletrostáticas. Eles são calculados, geralmente, através da soma das interações entre cada par de átomos (ou grupos de átomos) de cada uma das moléculas e apresentam termos de repulsão, dispersão e de interação eletrostática. Um modelo típico para o cálculo das interações intermoleculares é dado pelo potencial de Lennard-Jones (LJ) somado com o potencial de Coulomb.^{29,36}

A definição dos *átomos ligados* sobre os quais serão calculados os respectivos potenciais é feita previamente através dos arquivos de topologia. Os *potenciais não-ligados* são computados em relação aos átomos não-ligados dentro de um determinado raio, o *raio de corte*, o qual delimita a ação destes potenciais.

Interações de longo alcance

As interações de longo alcance (eletrostáticas), que decaem lentamente com a distância, podem ser substituídas por uma força efetiva, obtida por métodos de soma infinita, como por exemplo, soma de Ewald e variantes. Uma das variantes da soma de Ewald é o método *PME* (do inglês, *Particle Mesh Ewald*), que apresenta boa eficiência em termos de precisão e velocidade de processamento.²⁹

Condições Periódicas de Contorno

Para minimizar os efeitos de superfície, decorrentes do fato de que o do sistema a ser simulado é muito menor que o sistema real, são empregadas *condições periódicas de contorno*, cujo princípio é dado pela eliminação das fronteiras, através da replicação do sistema nas três dimensões.³⁷ A *caixa de simulação*, que pode ser cúbica ou não, é replicada inúmeras vezes, criando uma rede periódica, de modo que o sistema tende ao limite termodinâmico, isto é, o número de moléculas (N) e o volume (V) tendem a infinito, mas a razão N/V deve ser constante. As coordenadas das partículas na caixa podem ser expressas no sistema de coordenadas cartesiano. Para muitos sistemas, especialmente proteínas em solvente, a melhor célula unitária é aquela com o menor volume, porém, a distância entre qualquer átomo da proteína e qualquer átomo da vizinhança deve estar dentro de um valor mínimo estabelecido. Assim, a interação entre imagens é minimizada, bem como o custo computacional.³⁶

Associada às *condições periódicas de contorno*, utiliza-se a *convenção da imagem mínima*, na qual, considerando-se os termos das interações de curto alcance, uma determinada partícula pode interagir com uma única imagem (a mais próxima). Os potenciais de curto alcance, como Lennard-Jones, tendem a zero a partir de uma determinada distância, por isso, define-se um *raio de corte*, a partir do qual esta interação é considerada nula, porém, as interações de longo alcance devem ser consideradas.³⁷ Devido à *convenção da imagem mínima*, o *raio de corte* não pode ser maior que a metade da caixa de simulação.^{29,30}

Ensemble

Segundo Martinez *et. al.*, “*ensemble* é um grande conjunto de réplicas de um sistema de interesse que diferem entre si nas atribuições das coordenadas e do movimento às partículas”.²⁹

A escolha do ensemble a ser usado em uma simulação DM depende dos fenômenos que se deseja estudar, ou seja, dependendo da função termodinâmica a ser calculada, certos parâmetros macroscópicos são mantidos constantes ao longo da simulação.

No *ensemble* microcanônico (*NVE*), o número de partículas (N), o volume (V) e a energia total do sistema (E) são conservados ao longo da simulação. Já no *ensemble* canônico (*NVT*), ao invés da energia total do sistema, a temperatura é mantida constante, assim como N e V . O *ensemble* isobárico-isotérmico (*NPT*), onde N , T e a pressão (P) são mantidos constantes ao longo da simulação, é bastante usado para sistemas biológicos, visto que os processos reais geralmente ocorrem a P e T constantes.²⁹

Termostato e Barostato

O *ensemble* escolhido para as simulações realizadas no presente trabalho foi o *NPT*. Neste *ensemble*, a pressão (P) e a temperatura (T) são controladas através do acoplamento de um barostato e de um termostato, enquanto o volume do sistema flutua.²⁹

Uma das maneiras de manter a temperatura fixa é multiplicar as velocidades instantâneas por um coeficiente fazendo a temperatura instantânea $[T(t)]$ convergir progressivamente para a temperatura desejada $[T_{\text{fixa}}]$ ao longo da simulação. O termostato de Berendsen³⁸ é um exemplo de termostato de escalonamento das velocidades com acoplamento fraco, cuja taxa de escalonamento é controlada, ou seja, o desvio de $T(t)$ em direção a T_{fixa} é lentamente corrigido.³⁰

De forma similar ao controle de temperatura descrito acima, a pressão no *ensemble* *NPT* também pode ser controlada, escalonando as dimensões da caixa de simulação, alterando seu volume de maneira controlada.

4 METODOLOGIA

O estudo da interação da menadiona com as monoaminoxidases MAO-A e MAO-B, objetivo deste trabalho, foi realizado através das metodologias computacionais de *Docking* e Simulação por Dinâmica Molecular (DM), cujos fundamentos foram descritos no capítulo 3. A sistemática empregada compreendeu as etapas de obtenção das estruturas das enzimas a partir de banco de dados, experimentos de *docking*, simulação DM, análise dos resultados, sendo todas elas realizadas no Laboratório do Grupo Química Teórica da UFRGS.

4.1 BANCO DE DADOS

As coordenadas atômicas da maioria das estruturas das macromoléculas biológicas conhecidas estão arquivadas em bancos de dados,¹⁴ que também são responsáveis pela distribuição desses conjuntos de coordenadas. O principal banco de dados é o *Protein Data Bank (PDB)*¹⁹, gerenciado pela organização norte-americana *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB)*.

Com o objetivo de unificar o arquivamento e a distribuição de estruturas macromoleculares biológicas, existe hoje uma colaboração, denominada *Worldwide Protein Data Bank (wwPDB)*, entre três bancos de dados: *Protein Data Bank* dos EUA, da Europa e do Japão.

No *PDB*¹⁹ cada estrutura determinada recebe um identificador de quatro dígitos, o *PDB ID*, sendo que o arquivo *PDB* contém diversas informações, tais como, identificação da proteína e a qual espécie ela pertence, quem determinou a estrutura, referências para publicações, detalhes experimentais, sequência de aminoácidos, moléculas adicionais que aparecem na estrutura, incluindo cofatores, inibidores e solvente e coordenadas atômicas.¹⁶

As estruturas da MAO-A e da MAO-B usadas no presente trabalho foram obtidas a partir de estruturas cristalográficas extraídas do *PDB*, código (*PDB ID*) 2Z5X e 2Z5Y para MAO-A e 2XFU, 2VRL e 3PO7 para MAO-B.

4.2 DOCKING MOLECULAR

Os programas usados para a realização dos *dockings* foi o *AutoDock 4.0* e o *AutoDockTools 1.5.4* (ADT).^{39,40} Usando o ADT, foram retiradas as águas de hidratação e ligantes presentes nas estruturas da MAO-A (PDB ID 2Z5X e 2Z5Y) e MAO-B (2VRL e 3PO7), bem como foi selecionada somente a cadeia A de ambas as enzimas. A coenzima FAD, presente em todas as estruturas cristalográficas foi mantida. A estrutura do ligante menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona) foi construída e otimizada com os programas *GaussView*⁴¹ e *Gaussian 98*⁴², sendo as cargas adicionadas pelo programa *Babel*⁴³.

Primeiramente, foi realizado *docking cego*, onde o tamanho da caixa do *grid* compreendeu quase toda a enzima. Após, para avaliar a interação do ligante diretamente no sítio ativo da enzima, foi realizado *docking fino*, com *gridbox* menor, limitando-se à uma região em torno do sítio ativo. Os mapas de afinidade entre os átomos do ligante e da enzima foram gerados com o módulo *AutoGrid 4.0*. O algoritmo de busca global escolhido foi o LGA (do inglês, *Lamarckian Genetic Algorithm*) e os parâmetros usados, tanto para *docking cego* quanto *fino*, estão listados abaixo. Parâmetros cujas descrições não estão citadas foram mantidos com os valores padrão do programa.

- Adição de hidrogênios polares e cargas de Gasteiger-Marsili⁴⁴
- Malha de afinidade – resolução de 0,375 Å, centrada na macromolécula.
 - 80x120x80 pontos para *docking cego*
 - 70x40x70 pontos para *docking fino* MAO-A
 - Offset x = -5, y = 2 e z = 2
 - 70x60x70 pontos para *docking fino* MAO-B
 - Offset x = -5, y = 2 e z = 2
- Algoritmo genético lamarckiano
- 100 corridas
- População inicial de 50 indivíduos
- 50.000.000 avaliações de energia
- Passo translacional de 0,2 Å e passos orientacional e torsional de 5°

As conformações com diferenças em RMSD menores que 2,0 Å foram agrupadas, pelo próprio programa, em um mesmo conjunto, *cluster*, representado pela conformação de energia mais favorável.

4.3 DINÂMICA MOLECULAR

O primeiro sistema submetido à simulação foi da MAO-B (PDB ID 2XFU, somente cadeia A, sem FAD) com a menadiona, denominado [MAO-B + MENADIONA]. Foi realizada também simulação por DM da MAO-B, mesmo PDB ID, sem a menadiona, sistema [MAO-B].

Devido ao fato da MAO ser uma flavoenzima, uma nova simulação foi realizada, desta vez com o cofator FAD na estrutura MAO-B, PDB ID 2VRL. A estrutura escolhida como ponto de partida foi a obtida do *cluster 1* do *docking fino*, e o sistema denominado [MAO-B + FAD + MENADIONA]. A escolha foi feita devido ao fato das interações da MAO-B com a menadiona no *cluster 1* eram as mais favoráveis e estavam situadas na região do sítio ativo, a qual é bem definida para a MAO-B. Também foi realizada simulação de outro sistema, [MAO-B + FAD], com objetivo de avaliar o comportamento da enzima na sua forma biológica livre, sem a interferência de substratos e/ou inibidores e com o cofator presente. Para as simulações de DM, a topologia do FAD teve que ser modificada, sendo incluídas cargas de acordo com dados da literatura.⁴⁵

A fim de verificar a interação da menadiona com a MAO-A (PDB ID 2X5Y), foi realizada também uma simulação por DM do sistema [MAO-A + FAD + MENADIONA], o qual foi obtido a partir do *cluster 1* do *docking fino*, escolha justificada pelos motivos explicitados acima.

O programa usado em todas as simulações foi o *GROMACS*⁴⁶ e o campo de força escolhido foi o *GROMOS 53A6*.⁴⁷ Este campo de força foi desenvolvido na Universidade de Groningen e é aplicado basicamente para macromoléculas biológicas.

Os arquivos de entrada, incluindo a topologia do sistema, foram obtidos a partir da estrutura obtida pelo *docking* através de programas do pacote *GROMACS*. O sistema foi centrado numa caixa cúbica, com as faces a pelo menos 1 nm da enzima. A caixa foi preenchida com moléculas de água do tipo SPC (*Simple Point*

Charge)⁴⁸, cerca de 36.000 moléculas para os sistemas com a MAO-B e 61.936 moléculas de água para o sistema [MAO-A + FAD + MENADIONA]. Os sistemas então foram submetidos à minimização de energia (método *Steepest Descent*³⁰). O próximo passo foi a inserção de eletrólitos, cerca de 100 íons Na⁺ e 100 Cl⁻, a fim de aproximar os sistemas às condições fisiológicas. Novamente foi realizada minimização de energia.

Inicialmente, foi realizada uma simulação com restrição de posições, isto é, somente as moléculas do solvente tinham liberdade de movimento. Foram realizados 10.000 passos, com 1 fs cada, totalizando 10 ps de simulação. Esta etapa promove a relaxação das interações desfavoráveis entre soluto-solvente.

A seguir, foi realizada a simulação DM propriamente dita, onde todos os graus de liberdade são amostrados. As simulações tiveram duração total de 25 ns cada, o que correspondente a cerca de 18 dias de tempo real para os sistemas com a MAO-B e em torno de 30 dias para o sistema [MAO-A+FAD+MENADIONA]. Todos os cálculos foram realizados em computador QUAD CORE, processador AMD Phenom™ II X4 810. O passo de integração foi de 2 fs para cada um dos sistemas e as trajetórias foram salvas a cada 1 ps. Os parâmetros abaixo relacionados foram comuns à todas as simulações:

- Raio de corte de 1,4 nm para interações do tipo LJ e 1 nm para as do tipo Coulomb
- Correção das interações eletrostáticas de longo alcance pelo método PME⁴⁹.
- Temperatura de 300 K mantida com termostato de Berendsen³⁸
- Pressão de 1 atm mantida com barostato de Parrinello-Rahman⁵⁰

4.4 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados do *docking* foram obtidos a partir de análises de cada um dos *clusters* gerados pelo *AutoDock*, realizadas com auxílio do programa ADT, as quais incluíram energia e modo de interação enzima-ligante.

A partir das trajetórias obtidas ao término 25 ns de simulação, foram realizadas as seguintes análises, através de módulos do pacote *GROMACS*: evolução da estrutura média (RMSD), mobilidade relativa de segmentos (RMSF), análise do padrão de estrutura secundária (*DSSP*)⁵¹, ligações de hidrogênio intermolecular,

distância entre resíduos da enzima, ligante (menadiona) e cofator (FAD) e diedros do resíduo ILE199. Os gráficos e figuras contidos neste trabalho foram gerados pelos programas *Rasmol*⁵² e *xmgrace*⁵³.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

De acordo com a metodologia citada no capítulo anterior, foram realizados *docking cego* e *fino* para ambas as enzimas, MAO-A, estruturas PDB ID 2Z5X e 2Z5Y e MAO-B 2VRL e 3PO7. Os dados obtidos para as duas estruturas cristalográficas da MAO-A, assim como para as duas da MAO-B foram equivalentes, sendo assim, serão apresentados no presente trabalho somente os resultados de *docking* do PDB ID 2Z5Y para a MAO-A e PDB ID 2VRL para MAO-B. Além disso, estas estruturas foram usadas como ponto de partida para as simulações de DM.

As conformações enzima-ligante resultantes no *docking* são avaliadas de acordo com similaridade geométrica (rms de 2,0 Å) e de energia, e são agrupadas em *clusters*, sendo que o *cluster 1* é aquele que apresenta a conformação mais favorável, ou seja a energia mais negativa. Os resultados do *docking cego* e *fino* para a MAO-A e MAO-B estão listados nas Tabelas 2, 3, 4 e 5.

As interações entre a menadiona e resíduos da MAO das conformações cuja localização é na superfície não foram analisadas, uma vez que dados experimentais de DRX mostraram que vários ligantes estavam posicionados na região do sítio ativo nas estruturas cristalográficas da MAO inibida.⁵⁴ No entanto, as interações do tipo ligação de hidrogênio (destacadas pelo sobrescrito HB) estão listadas, para todas as conformações. Para as conformações de localização interna ou no sítio ativo, estão listadas todas as interações, marcadas com (HB) aquelas do tipo ligação de hidrogênio, sendo as demais do tipo van der Waals.

A partir de estruturas cristalográficas das enzimas MAO-A e MAO-B, descritas na literatura, foram determinados os resíduos de aminoácidos que fazem parte do sítio ativo dessas enzimas, sendo que desses 20 resíduos, 7 são diferentes para MAO-A e MAO-B (em negrito na relação abaixo).¹¹

- MAO-A: TYR69, GLN74, VAL91, **VAL93**, LEU97, **ILE180**, **ASN181**, ILE207, **PHE208**, SER209, **VAL210**, GLU216, **CYS323**, ILE325, **ILE335**, LEU337, MET350, PHE352, TYR407 e TYR444.
- MAO-B: TYR60, GLN65, VAL82, **GLU84**, LEU88, **LEU171**, **CYS172**, ILE198, **ILE199**, SER200, **THR201**, GLU207, **THR314**, ILE316, **TYR326**, LEU328, MET341, PHE343, TYR398 e TYR435.

Alguns *clusters* apresentaram interações do ligante com as enzimas localizadas numa região interna das mesmas, cujos resíduos também são considerados do sítio ativo, porém, no presente trabalho, para os resultados de *docking*, a denominação de sítio ativo será atribuída à região onde houver interação também com o cofator FAD, além daquelas com os resíduos específicos da MAO-A ou MAO-B.

Tabela 2: Resultados do *Docking cego* da menadiona com a MAO-A.

Cluster	População (%)	Energia (kcal/mol)	Localização	Interações
1	2	-5,94	Superfície	LYS102 ^(HB) , GLU329 ^(HB)
2	5	-5,43	Sítio Ativo	FAD ^(HB) , TYR69, ASN181, GLN215, LEU337, PHE352, TYR407, TYR444
3	43	-5,35	Superfície	ARG356 ^(HB)
4	1	-5,19	Superfície	ARG76 ^(HB) , GLU475 ^(HB)
5	1	-5,18	Superfície	ASP328 ^(HB)
6	2	-5,14	Superfície	ASP328 ^(HB)
7	1	-5,08	Interno	ILE180, ASN181, PHE208, GLN215, CYS323, ILE335, LEU337, PHE352
8	9	-5,08	Superfície	ARG206 ^(HB)
9	4	-4,98	Superfície	LYS199 ^(HB)
10	16	-4,90	Superfície	ARG206 ^(HB)
11	1	-4,67	Superfície	LYS199 ^(HB)
12	1	-4,52	Superfície	ARG217 ^(HB)
13	10	-4,43	Superfície	***
14	1	-4,35	Superfície	HIS187 ^(HB)
15	2	-4,10	Superfície	THR88 ^(HB) , ARG217 ^(HB)
16	1	-4,01	Superfície	***

*** sem interação do tipo HB.

A localização do ligante no *cluster 1* (o de menor energia) obtido no *docking cego* (Tabelas 2 e 3), foi na superfície para ambas as enzimas, porém, houve uma pequena diferença de energia, -6,00 kcal/mol para MAO-B e -5,94 kcal/mol para a MAO-A. Comparando-se os *clusters* onde a interação foi na região do sítio ativo, a diferença de energia foi maior, sendo a interação da menadiona com a MAO-B a mais favorável, com -5,83 kcal/mol (*cluster 3*) e -5,54 kcal/mol (*cluster 4*) contra -5,43 kcal/mol para a MAO-A (*cluster 2*).

Tabela 3: Resultados do *Docking cego* da menadiona com a MAO-B.

Cluster	População (%)	Energia (kcal/mol)	Localização	Interações
1	22	-6,00	Superfície	LYS136 ^(HB) , ARG415 ^(HB)
2	6	-5,84	Superfície	LYS136 ^(HB) , ARG412 ^(HB)
3	2	-5,83	Sítio Ativo	FAD, LEU171, CYS172, TYR188, TYR398, GLY434, TYR435
4	3	-5,54	Sítio Ativo	FAD ^(HB) , TYR60, GLN206, TYR326, TYR398, TYR435
5	10	-5,29	Superfície	LYS81 ^(HB) , GLU84 ^(HB)
6	29	-4,77	Superfície	LYS271 ^(HB)
7	4	-4,72	Superfície	***
8	2	-3,64	Superfície	ARG67 ^(HB)
9	1	-3,64	Superfície	ARG67 ^(HB) , THR430 ^(HB)
10	1	-3,56	Superfície	ARG67 ^(HB)
11	11	-3,40	Superfície	LEU291 ^(HB)
12	6	-3,38	Superfície	ARG100 ^(HB)
13	3	-3,03	Superfície	LEU291 ^(HB)

*** sem interação do tipo HB.

Os resultados do *docking fino*, Tabelas 4 e 5, mostraram que as interações mais favoráveis entre a menadiona com MAO-A e com a MAO-B foram as situadas na região do sítio ativo. Novamente a interação da menadiona com a MAO-B (-5,80 kcal/mol) foi mais forte do que para MAO-A (-5,40 kcal/mol) .

Tabela 4: Resultados do *Docking fino* da menadiona com a MAO-A.

Cluster	População (%)	Energia (kcal/mol)	Localização	Interações
1	61	-5,40	Sítio Ativo	FAD ^(HB) , TYR69, GLN215, LEU337, PHE352, TYR407, TYR444
2	34	-5,14	Interno	ILE180, ASN181, ILE207, PHE208, GLN215, ILE335, LEU337, MET350, PHE352
3	3	-5,06	Interno	ILE180, PHE208, GLN215, ILE335, LEU337, MET350, PHE352
4	1	-4,19	Superfície	***
5	1	-3,13	Superfície	***

*** sem interação do tipo HB.

Resultados de *docking*, reportados na literatura, realizado com a MAO-B e a rasagilina (um inibidor seletivo da MAO-B já aprovado para tratamento de Doença de Parkinson)⁵⁴, foram análogos aos obtidos no presente trabalho, onde foi constatada também a interação do ligante na região do sítio ativo da enzima, com energia de -8,24 kcal/mol.⁵⁵

Tabela 5: Resultados do *Docking fino* da menadiona com a MAO-B.

Cluster	População (%)	Energia (kcal/mol)	Localização	Interações
1	44	-5,80	Sítio Ativo	FAD, LEU171, CYS172, TYR188, TYR398, GLY434, TYR435
2	2	-5,54	Sítio Ativo	FAD ^(HB) , GLN206, TYR326, PHE343, TYR398, TYR435
3	5	-4,35	Interno	PHE168, LEU171, CYS172, ILE199, TYR326
4	6	-4,17	Superfície	HIS347 ^(HB) , LYS348 ^(HB)
5	30	-2,91	Superfície	SER293 ^(HB) , ARG350 ^(HB)
6	5	-2,87	Superfície	LEU291 ^(HB)
7	4	-2,87	Superfície	LEU291 ^(HB)
8	4	-2,52	Superfície	TYR401 ^(HB)

A metodologia de *docking*, usualmente, não considera a flexibilidade da macromolécula. O objetivo principal desta técnica no presente trabalho foi verificar as melhores conformações entre MAO-menadiona, para posterior simulação por DM, onde podem ser amostrados explicitamente todos os graus de liberdade do sistema. Além disso, o conhecimento prévio da interação da menadiona com alguns resíduos específicos da MAO serve como ponto de partida para análises posteriores que foram realizadas a partir dos resultados da DM.

A Figura 4 mostra as estruturas da MAO-A e MAO-B, complexadas com o ligante menadiona, na conformação mais favorável do *docking fino*. Essas estruturas foram usadas como ponto de partida para as simulações de DM, cujos resultados serão abordados mais adiante.

Os resíduos em vermelho mostrados na Figura 4 formam o chamado *sanduíche aromático*, resíduos TYR407 e TYR444, para MAO-A, e TYR398 e TYR435, para MAO-B.⁹ Esses resíduos, juntamente com o FAD formam a chamada “gaiola aromática” no sítio ativo de ambas as enzimas. Esta região hidrofílica⁵⁶ é

importante no reconhecimento do grupo amino dos substratos da MAO, consequentemente para os processos enzimáticos ou inibitórios.^{4,11}

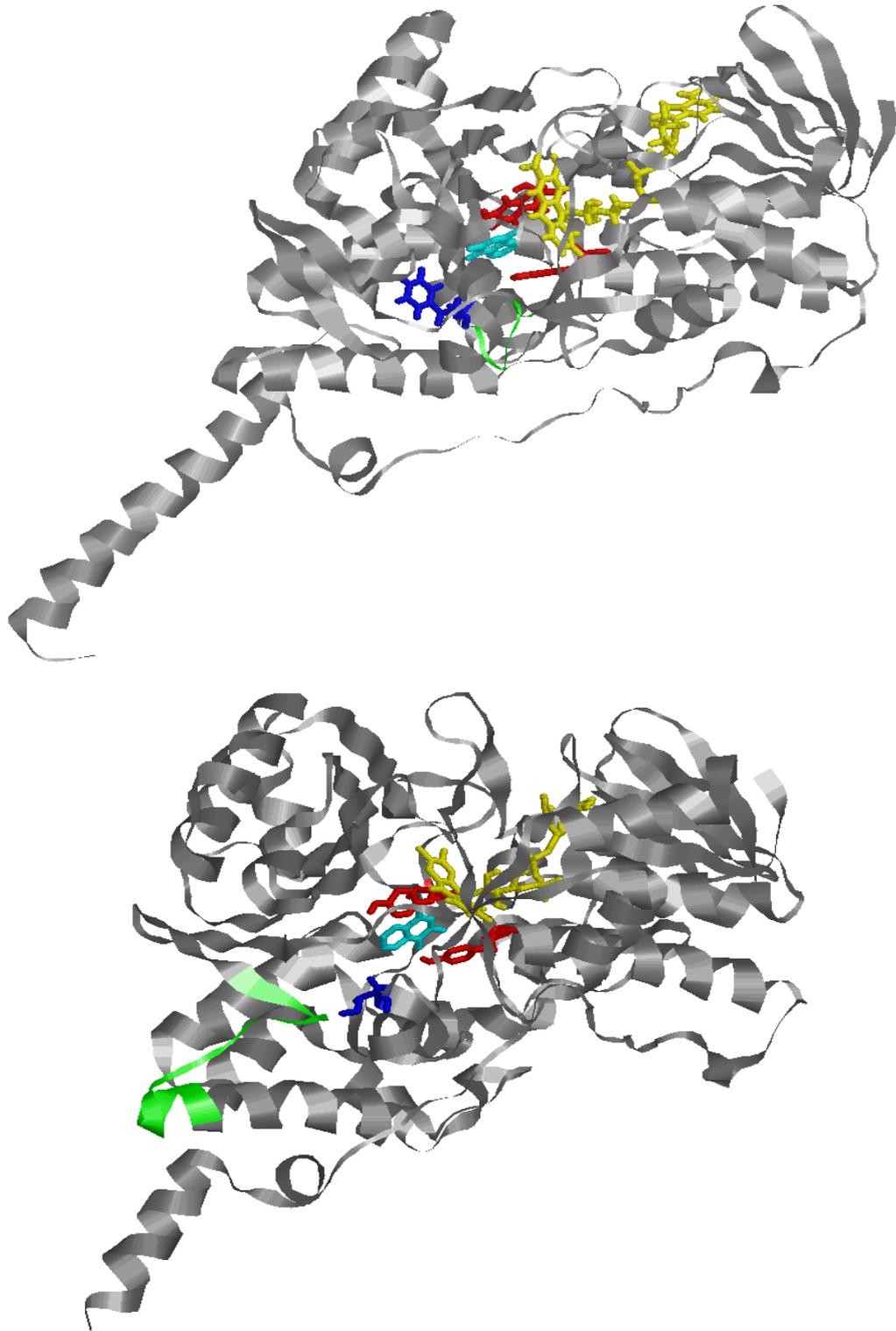


Figura 5: Estruturas da MAO-A (superior) e da MAO-B (inferior) com a menadiona (em ciano), obtida no *docking fino, cluster 1*. Em verde, o *loop* do sítio ativo, em azul o resíduo PHE208 para MAO-A e ILE199 para MAO-B, em vermelho, TYR407 e TYR444 para MAO-A e TYR398 e TYR435 para MAO-B e em amarelo o FAD.

O *loop* do sítio ativo (em verde na Figura 5) é considerada a região de entrada para o sítio ativo, e compreende os resíduos de 210-216 (VAL210, THR211, ASN212, GLY213, GLY214, GLN215 E GLU216) para MAO-A e 99-112 (PHE99, ARG100, GLY101, PRO102, PHE103, PRO104, PRO105, VAL106, TRP107, ASN108, PRO109, ILE110, THR111 e TYR112) na MAO-B.^{4,11} Os resíduos situados do lado oposto ao FAD no sítio ativo (em azul na Figura 5) são considerados como os responsáveis pelo reconhecimento dos substratos no sítio ativo, e não são análogos para MAO-A, resíduo PHE208, e MAO-B, resíduo ILE199. Além disso, outros resíduos importantes no reconhecimento dos substratos no sítio ativo não são correspondentes para MAO-A (ILE335) e MAO-B (TYR326) o que pode explicar a especificidade de substratos e inibidores.^{2,11,13}

A evolução da estrutura média para os sistemas foi analisada através do desvio médio quadrático RMSD (do inglês *Root Mean Square Deviation*) das posições atômicas, em relação a uma estrutura de referência.

Para MAO-A foram realizados 10 ns de simulação, e vemos que o RMSD ainda não convergiu neste intervalo de tempo.

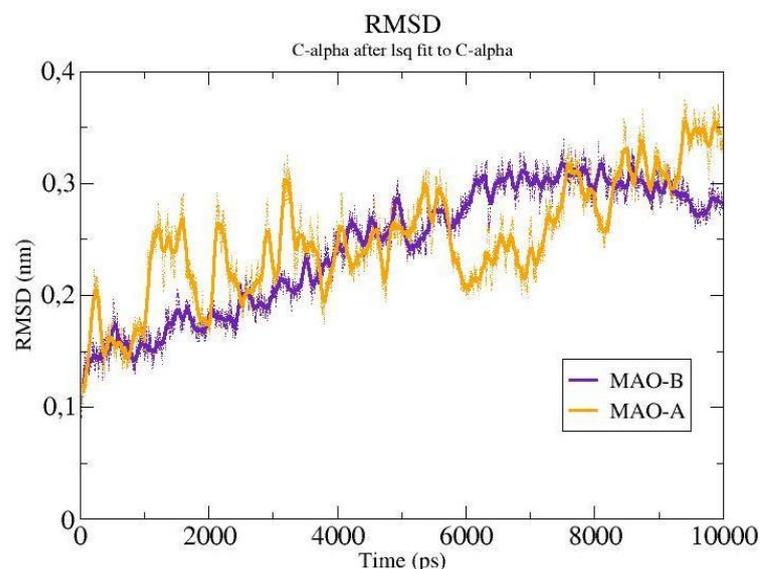


Figura 6: RMSD $C\alpha$ para o sistema [MAO-A + FAD + MENADIONA] em comparação com [MAO-B + FAD + MENADIONA] .

Comparando-se os RMSD para MAO-A e MAO-B, Figura 6, ambas no sistema [MAO+FAD+LIGANTE], vemos que o comportamento da MAO-B é mais estável.

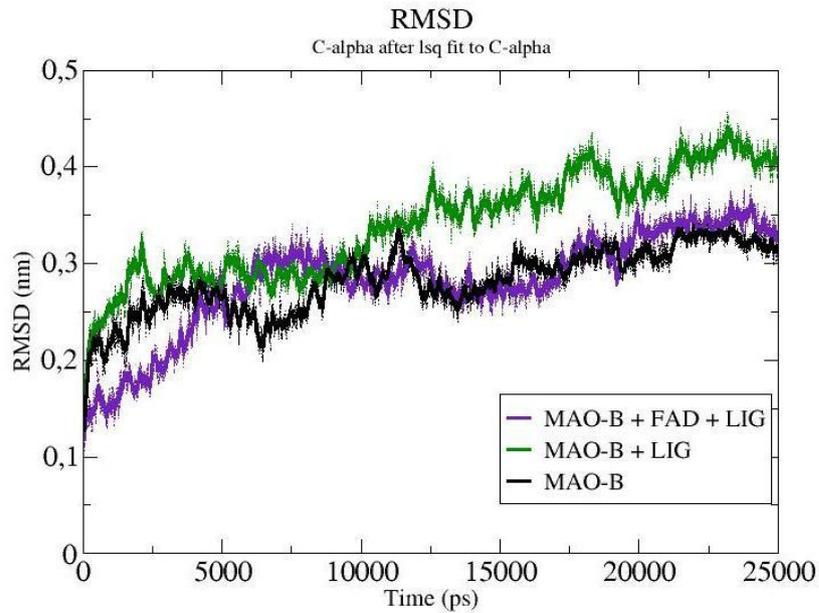


Figura 7: RMSD para os sistemas [MAO-B], [MAO-B + MENADIONA] e [MAO-B + FAD + MENADIONA].

Através da Figura 7 vemos que o RMSD apresenta convergência para os sistemas [MAO-B] e [MAO-B + FAD + LIG] apenas após 20 ns, com valores em torno de 0,33 nm e 0,35 nm, respectivamente. Nota-se também que o comportamento para dos dois sistemas é muito similar a partir de 10 ns. Já para o sistema [MAO-B + LIG], a oscilação do RMSD ainda é visível, mesmo após 25 ns. Com isso, é reforçada a idéia de que o cofator FAD é importante nos processos enzimáticos da MAO.

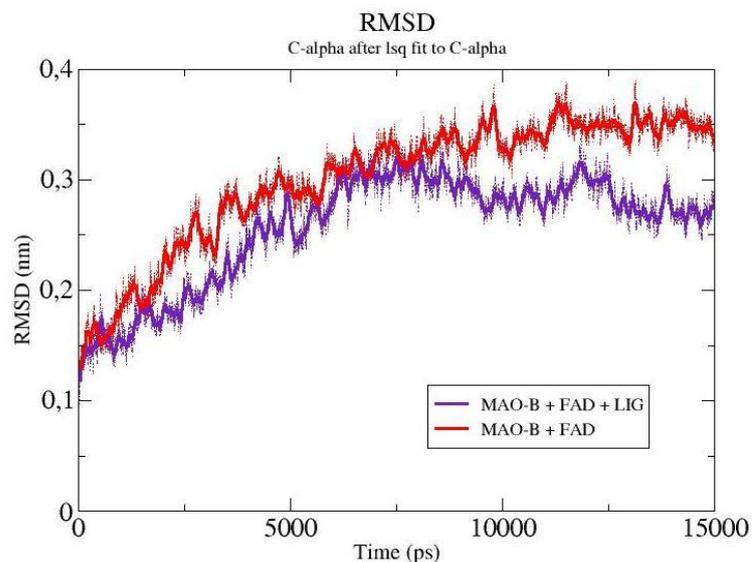


Figura 8: RMSD para o sistemas [MAO-B + FAD].

O sistema [MAO-B + FAD] foi simulado durante 15 ns, e o RMSD mostrado na Figura 8 apresenta uma boa convergência após 10 ns de simulação, ao contrário dos sistemas mencionados acima.

A análise da estrutura secundária para MAO-B, sistema [MAO-B + FAD + MENADIONA], demonstrou que houve pouca alteração ao longo de 25 ns de simulação (Figura 9). As alterações mais significativas ocorreram na região C-terminal como era esperado, ocorrendo mudança conformacional após 1 ns de simulação, com a perda da estrutura de α -hélice. Porém, outra alteração também foi verificada, na região do resíduo ILE199.

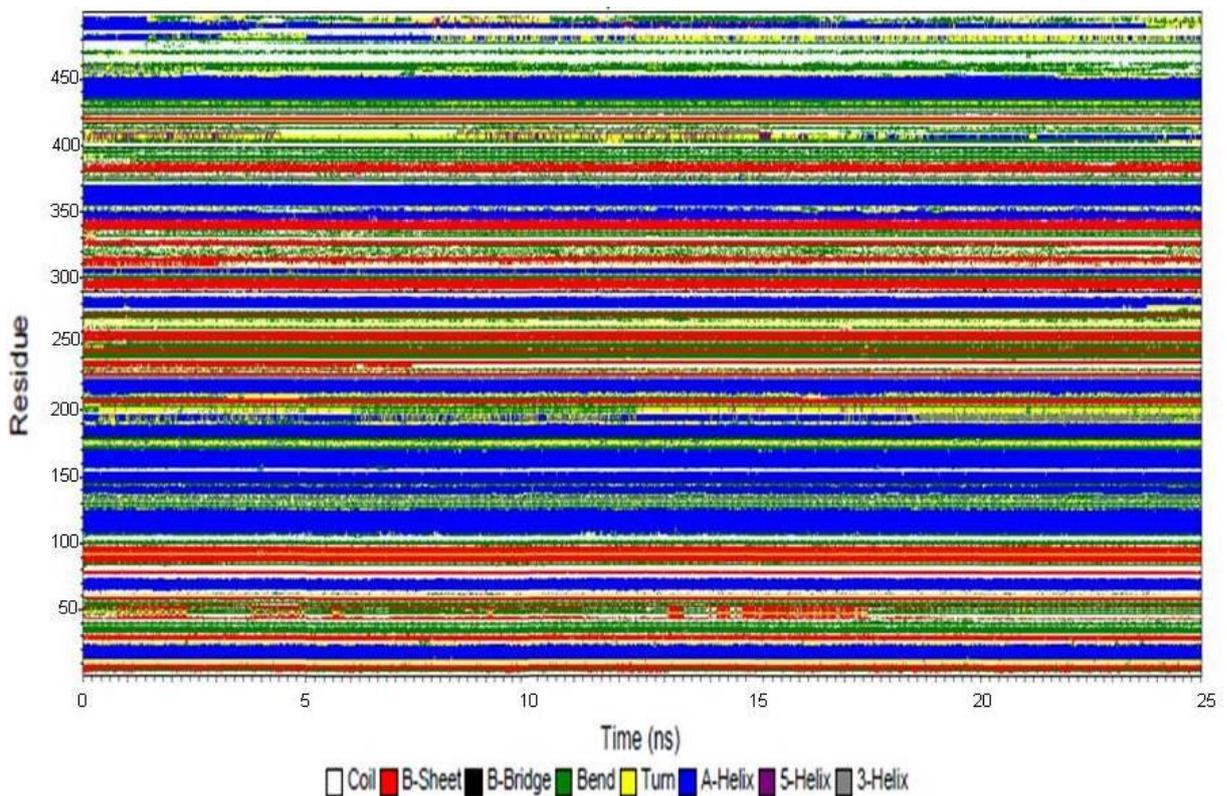


Figura 9: estrutura secundária da MAO-B, resíduos em função do tempo.

Através das análises da mobilidade relativa (RMSF) de alguns resíduos do sítio ativo dos sistemas com a MAO-B, vemos que os quatro sistemas estudados apresentam algumas diferenças entre eles (Figura 10). Os resíduos que foram considerados como do sítio ativo nas simulações de DM foram os seguintes: TYR60, LEU171, CYS172, ILE198, ILE199, GLU206, TYR326, PHE343, TYR398 e TYR435.

A partir das Figuras 10A e 10B, constata-se que os sistemas [MAO-B] e [MAO-B + MENADIONA] apresentaram o resíduo TYR435 como o de maior mobilidade. Para os sistemas com a presença do FAD, [MAO-B + FAD], Figura 10C, e [MAO-B + FAD + MENADIONA], Figura 10D, o resíduo ILE199 apresentou a maior mobilidade.

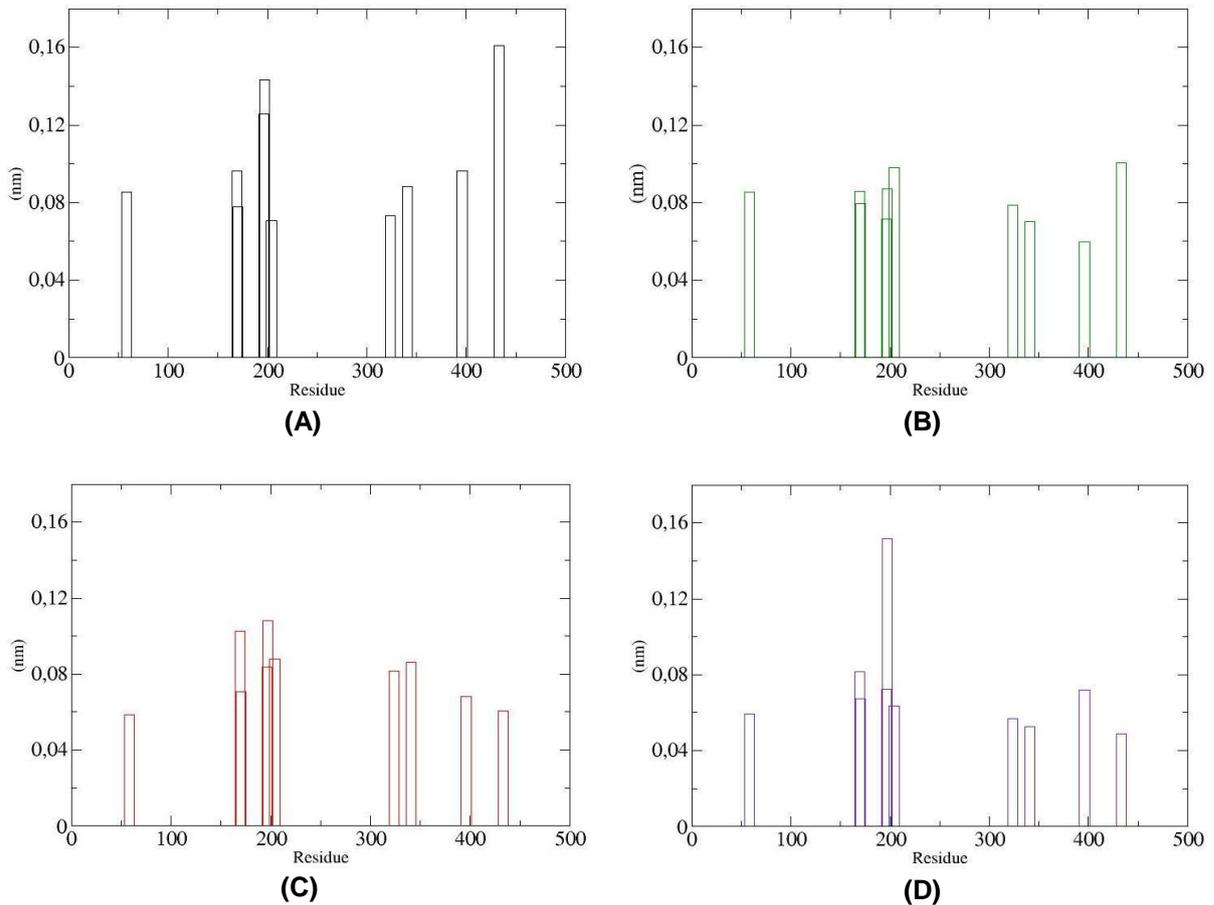


FIGURA 10: comparação do RMSF dos resíduos do sítio ativo para os sistemas: **(A)** – [MAO-B], **(B)** – [MAO-B + MENADIONA], **(C)** – [MAO-B + FAD] **(D)** – [MAO-B + FAD + MENADIONA]

O sítio da MAO-B é dividido em duas cavidades, a de entrada e do substrato.¹² Essas duas cavidades podem estar fundidas, formando uma só. Este processo de fusão das duas cavidades ocorre devido à uma mudança conformacional do resíduo ILE199, cuja mobilidade, mostrada na Figura 10D, é quase duas vezes maior que a de outros resíduos do sítio ativo da MAO-B para o sistema [MAO-B+FAD+LIG].^{13,54}

Com o objetivo de verificar a mudança conformacional da ILE99, foi monitorado o ângulo diedro 1, representado na Figura 11, em função do tempo. A

Figura 12 mostra os valores do diedro 1 em função do tempo, e a esquerda do gráfico, a distribuição para cada um.

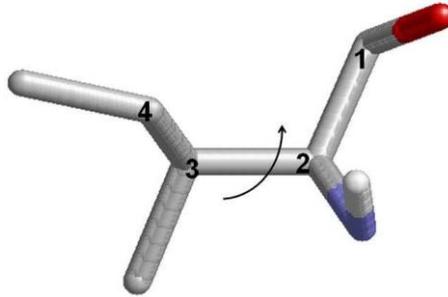


Figura 11: representação do diedro 1, formado pelos carbonos 1, 2, 3 e 4, do resíduo ILE199.

Avaliando-se o diedro 1 da ILE199, através da Figura 12, podemos notar uma diferença significativa na distribuição, em função do sistema estudado.

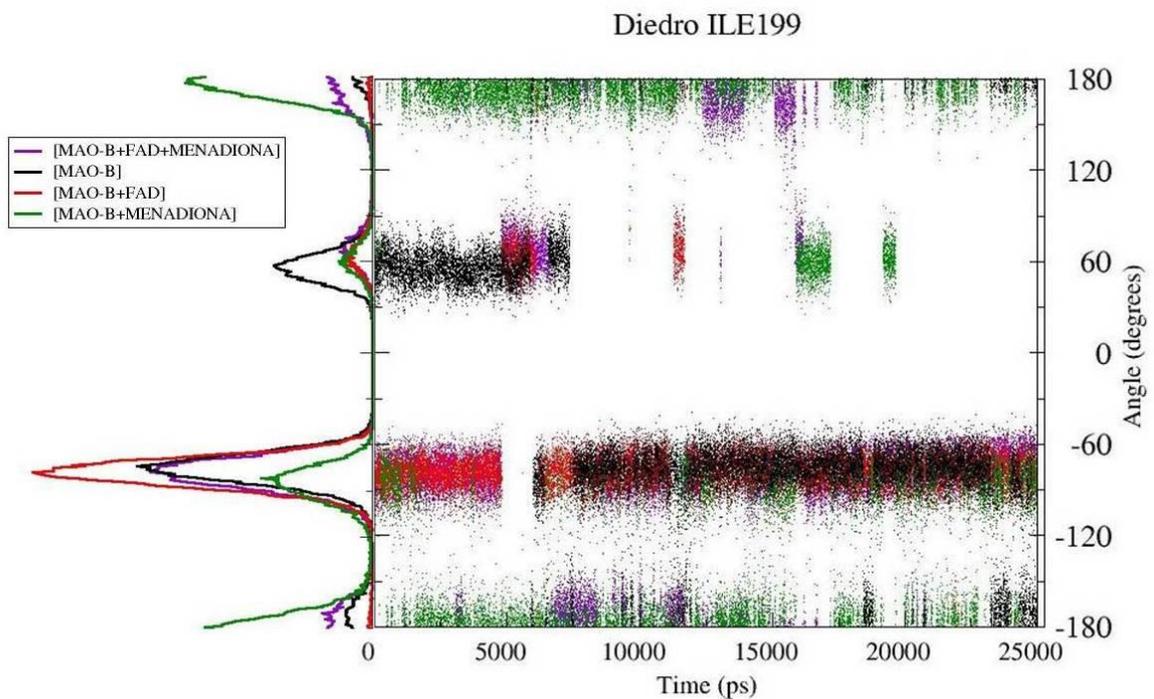


Figura 12: valores do diedro 1 da ILE199 em função do tempo e distribuição das conformações.

Como já foi mencionado, a MAO é uma flavoenzima, ou seja, depende do cofator FAD para desempenhar suas funções.^{2,4,9} A importância do FAD na estrutura da MAO foi verificada nos resultados do *docking*, e além disso, observando a Figura

13, fica evidente que o sistema [MAO-B + FAD + MENADIONA] apresenta menor flutuação ao longo dos 25 ns de simulação do que o sistema sem o FAD, ou seja o cofator estabiliza o complexo formado pela enzima com o ligante. Também podemos verificar que a menadiona, após 5 ns de simulação, se afastou do resíduo TYR398, permanecendo estável pelo restante do tempo.

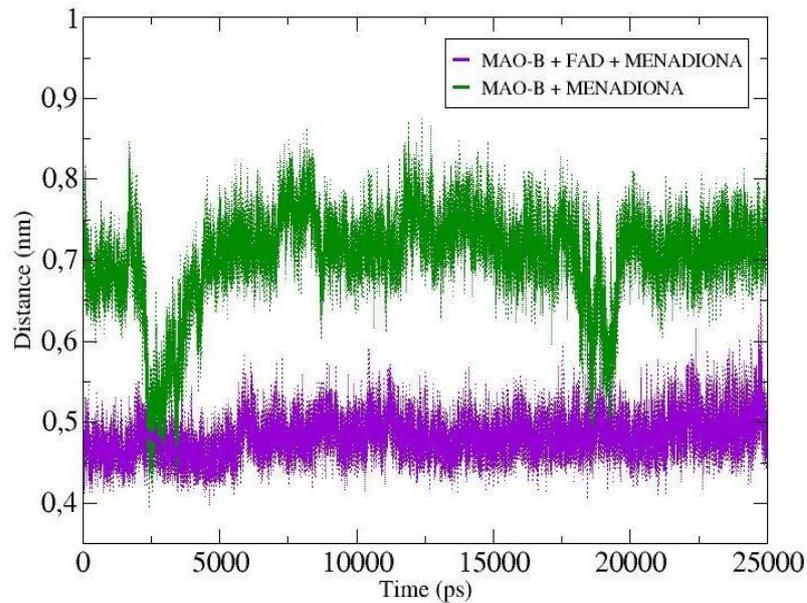
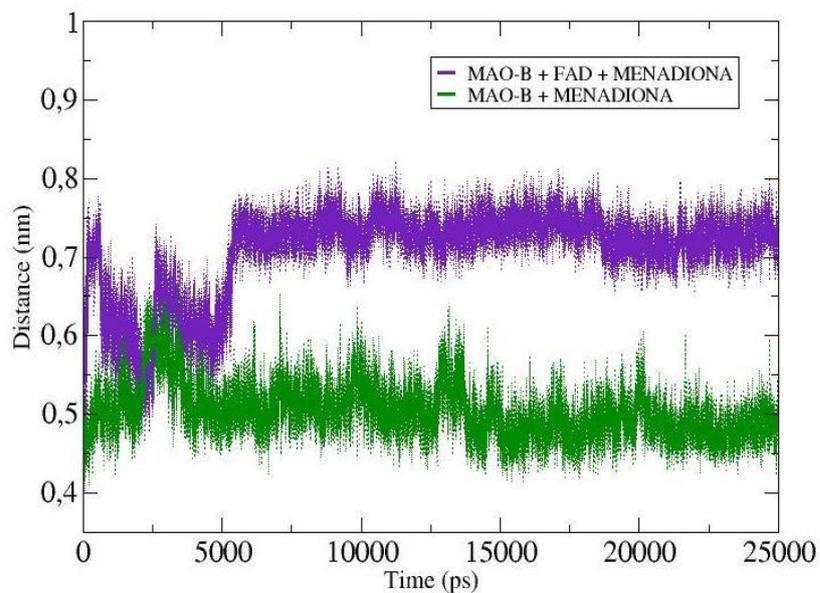
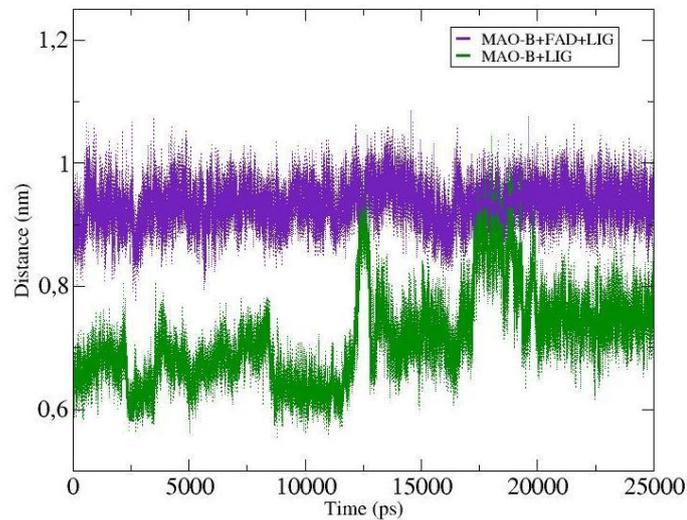
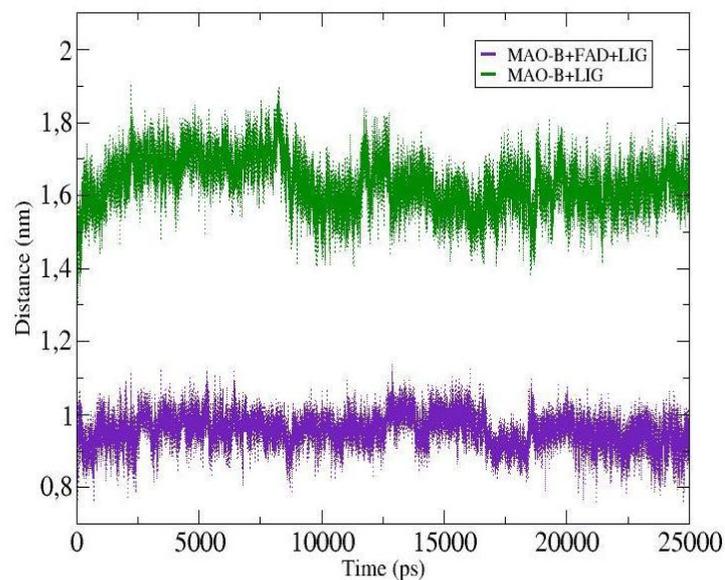
**(A)****(B)**

FIGURA 13: distância do ligante menadiona aos resíduos do “sanduíche aromático”, TYR435 **(A)** e TYR398 **(B)**.

As Figuras 14A e 14B, que mostram as distâncias do ligante aos resíduos TYR60 e ILE199, respectivamente, também mostram a flutuação maior para o sistema [MAO-B + MENADIONA].



(A)



(B)

FIGURA 14: distância do ligante menadiona ao resíduos TYR60 (A) e ILE199 (B).

Outras distâncias entre o ligante e alguns resíduos da MAO-B foram monitorados, sendo os valores dessas distâncias listados na Tabela 6. Como já foi constatado através das Figuras 13 e 14, a variação nas distâncias entre o ligante e

resíduos da MAO-B foi mais significativa para o sistema sem o FAD, ou seja, além de importante para o reconhecimento dos substratos da MAO, o FAD estabiliza o complexo formado entre enzima-inibidor.

TABELA 6: distâncias (nm) entre o ligante e alguns resíduos importantes da MAO-B.

	MAO-B + LIGANTE			MAO-B + FAD + LIGANTE		
	inicial	final	variação*	inicial	final	variação*
TYR 398	0,53	0,48	0,05	0,62	0,72	0,10
TYR 435	0,65	0,72	0,07	0,47	0,49	0,02
TYR 60	0,66	0,75	0,09	0,92	0,94	0,02
PHE 343	0,83	0,80	0,03	1,01	1,01	0,00
GLN 206	1,01	0,93	0,08	0,79	0,80	0,01
LEU 171	1,05	1,07	0,02	0,60	0,57	0,03
CYS 172	1,18	1,17	0,01	0,52	0,52	0,00
TYR 326	1,24	1,13	0,11	1,05	0,98	0,07
ILE 198	1,41	1,35	0,06	0,63	0,65	0,02
ILE 199	1,66	1,61	0,05	0,96	0,94	0,02
PHE 99	2,61	2,60	0,01	1,96	1,99	0,03
TYR 112	3,33	3,14	0,19	2,64	2,73	0,09

*em módulo

A Figura 15 mostra o monitoramento da distancia entre o resíduo ILE199 e o FAD para os sistemas [MAO-B + FAD + MENADIONA] e [MAO-B + FAD].

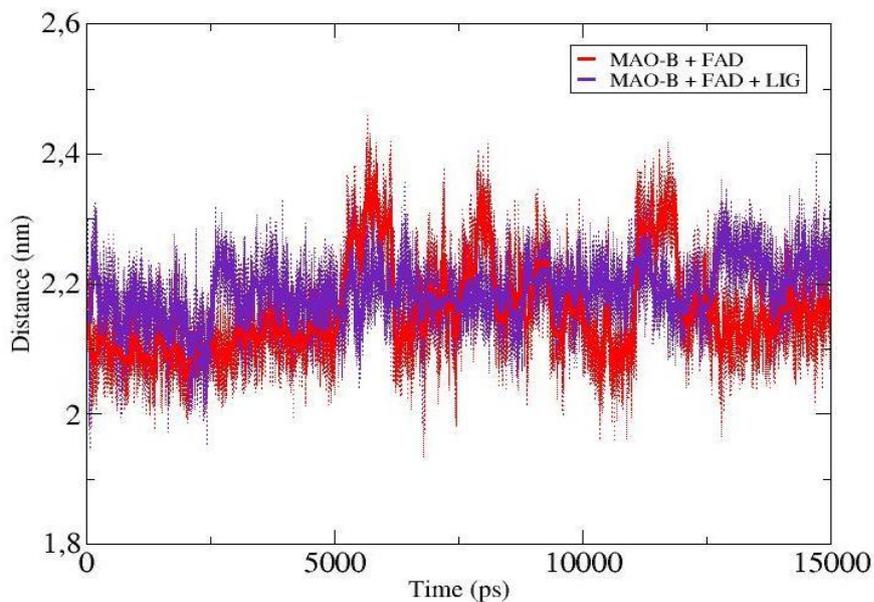


FIGURA 15: distância do entre o resíduo ILE199 e o FAD.

Na Figura 15, vemos que a distância entre o FAD e o resíduo ILE199 é quase igual para ambos os sistemas, porém, no sistema [MAO-B + FAD + MENADIONA] a flutuação é um pouco menor do que no sistema [MAO-B + FAD]. Comparando-se com a Figura 10, no qual a mobilidade da ILE199 foi maior para estes sistemas, podemos inferir que esta é apenas uma mobilidade torcional, e não um deslocamento no espaço.

Na Figura 16, podemos ver claramente que a presença do ligante no sítio ativo da MAO-B, no sistema com o FAD, provoca um afastamento dos resíduos do “sanduíche aromático”.

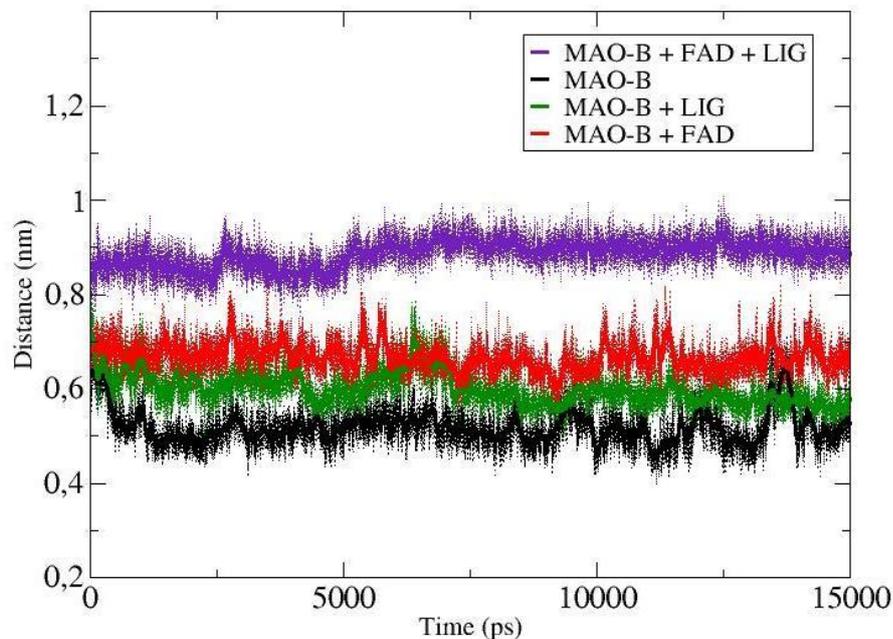


FIGURA 16: distância entre os resíduos TYR398 e TYR435 para os quatro sistemas estudados com a MAO-B: [MAO-B] em preto, [MAO-B+LIG] em verde, [MAO-B +FAD] em vermelho e [MAO-B + FAD + MENADIONA] em roxo.

Além disso, o sistema [MAO-B + FAD + MENADIONA] é o que apresenta a menor flutuação, corroborando a hipótese de estabilização do sistema enzima-ligante através da presença da coenzima FAD.

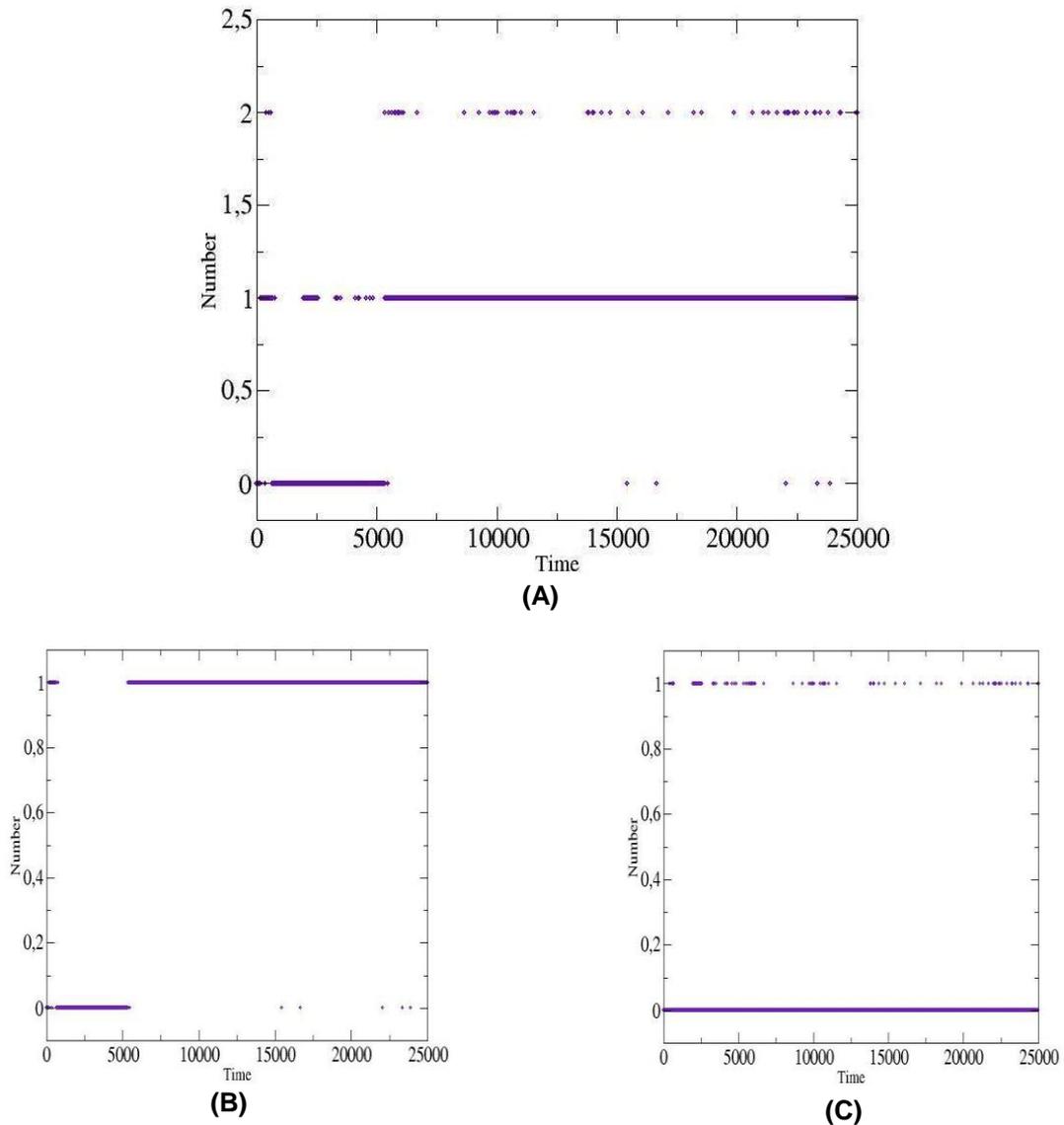


Figura 17: ligações de hidrogênio (HB) do ligante menadiona com a MAO-B, sistema [MAO-B + FAD + MENADIONA] **(A)** número de HB total do ligante com a enzima; **(B)** número de HB do ligante com o resíduo TYR398 e **(C)** número de HB do ligante com o resíduo TYR435.

A partir da Figura 17A, podemos notar que o número de ligações de hidrogênio (HB) intermoleculares entre o ligante menadiona e a MAO-B, para o sistema [MAO-B + FAD + MENADIONA], varia de zero a dois, sendo que na maior parte do tempo de simulação observa-se uma HB. Foram analisados os resíduos do sítio ativo, uma vez que através das análises descritas acima, observou-se que o ligante não se afastou desta região da enzima. Foi constatado, através das Figuras 17B e 17C, que as HB ocorreram com os resíduos do *sanduíche aromático*, TYR398 e TYR435, salientando a importância desta região para as interações enzima-inibidor.

Já para o sistema [MAO-B + MENADIONA], o número de HB varia de zero a três, oscilando na maior parte do tempo entre zero e um, Figura 18A. Novamente, foram analisados os resíduos do sítio ativo, porém, foi constatado HB do ligante com o resíduo TYR60, Figura 18B, em poucos instantes da simulação (entre 2,3 a 3,5 ns e entre 12,7 e 13 ns) e também com o resíduo TYR398, em um único instante 15,4 ns.

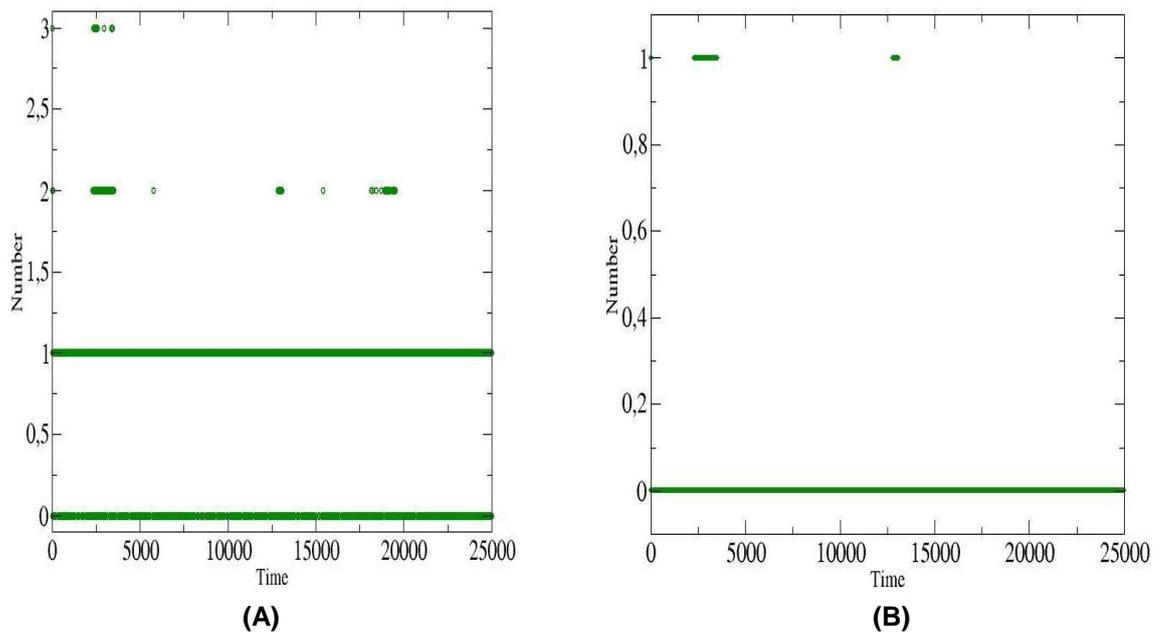


Figura 18: ligações de hidrogênio (HB) do ligante menadiona com a MAO-B, sistema [MAO-B + MENADIONA] **(A)** número de HB total do ligante com a enzima; **(B)** número de HB do ligante com o resíduo TYR60

As figuras a seguir apresentam estruturas da MAO-B com a menadiona obtidas a partir dos resultados da DM, após 1 ns, Figura 19 e ao término da simulação, após 25 ns, Figura 20. Para todas elas, o ligante menadiona está destacado em ciano, em azul o resíduo ILE199, em vermelho os resíduos do sanduíche aromático (TYR398 e TYR435) e em amarelo o FAD.

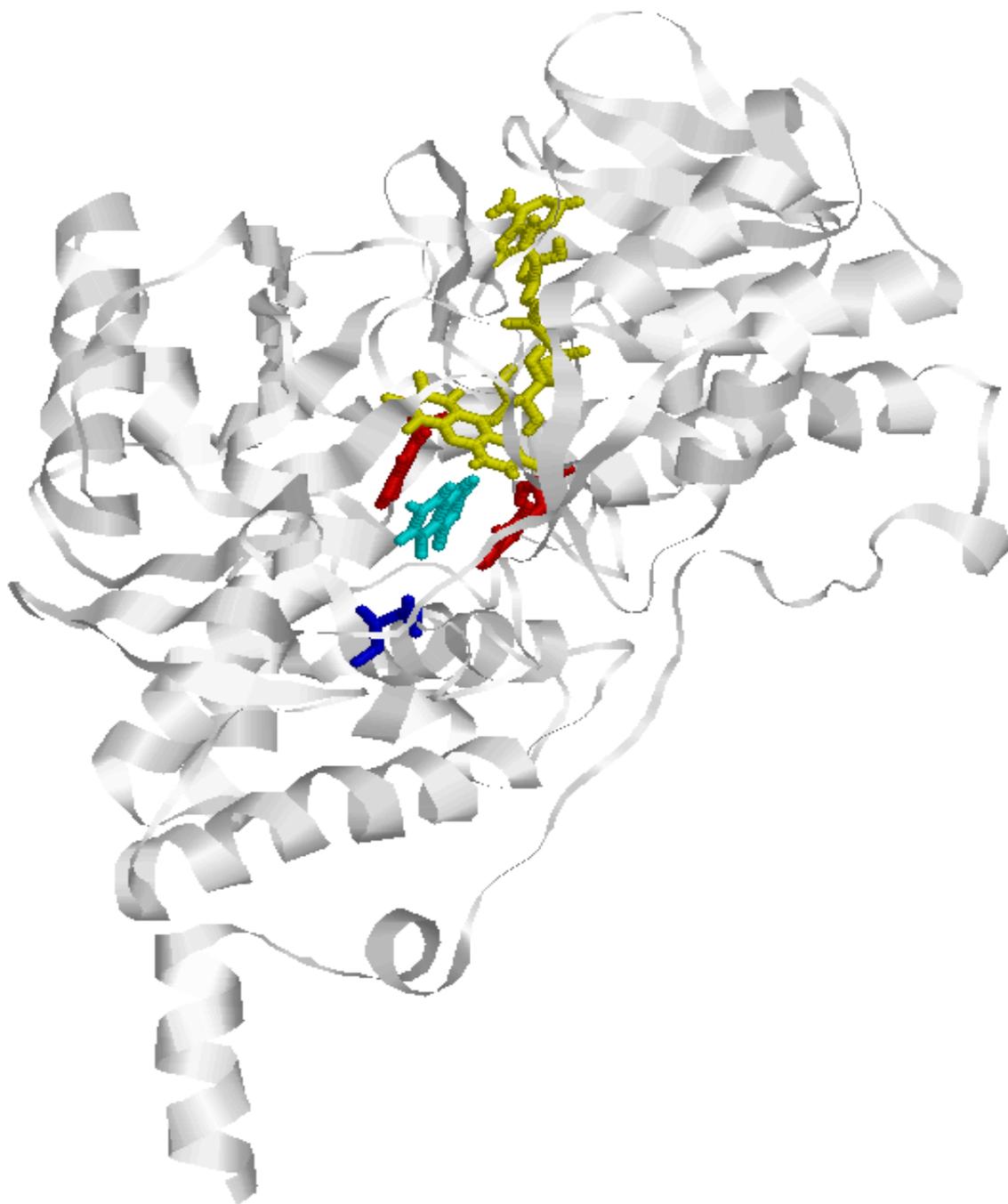


Figura 19: Estruturas da MAO-B complexada com a menadiona, após 1 ns de simulação por DM. Em amarelo, o FAD, em vermelho resíduos TYR398 e TYR435, em azul resíduo ILE199 e em ciano a menadiona.

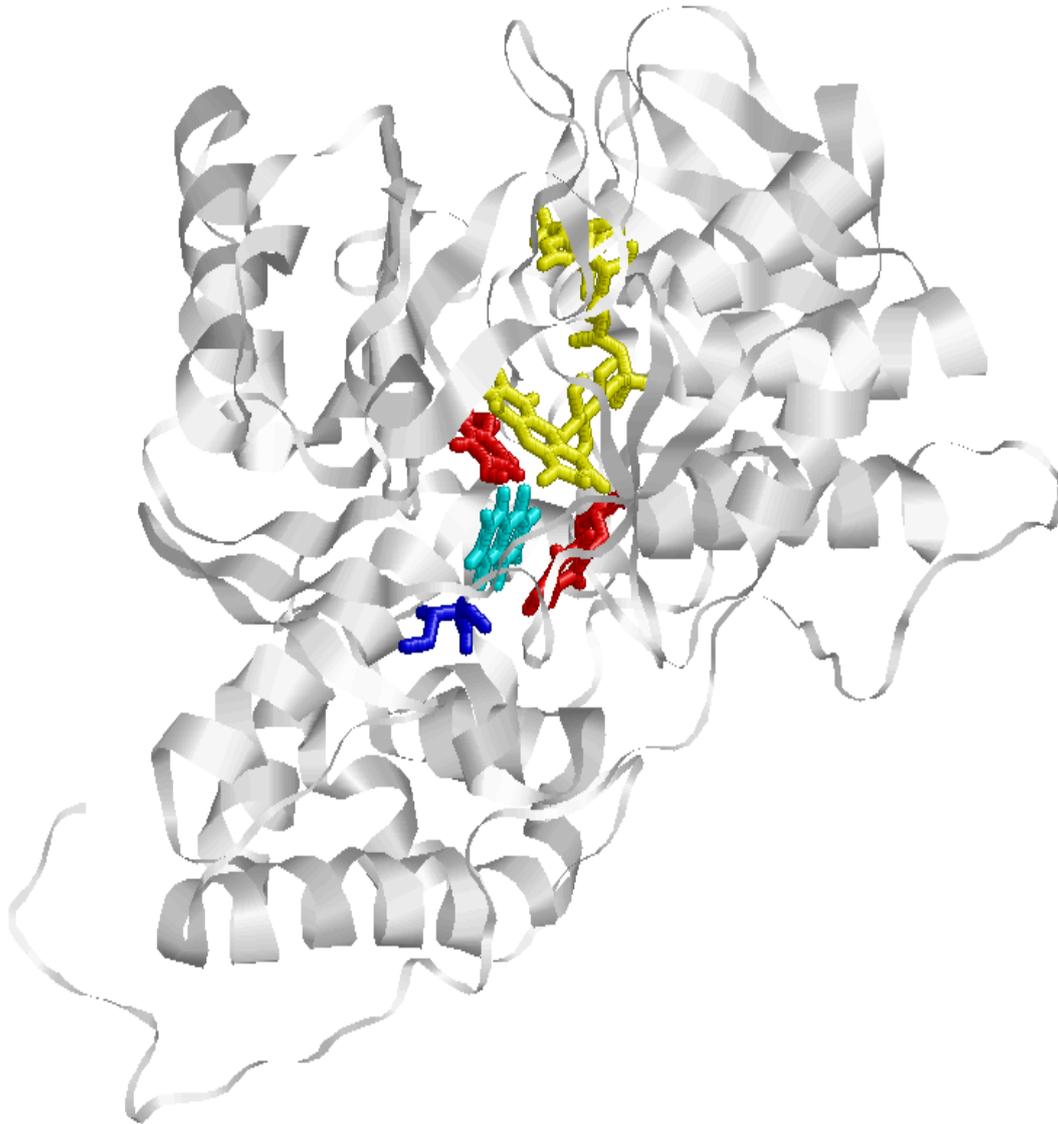


Figura 20: Estruturas da MAO-B complexada com a menadiona, após 25 ns de simulação por DM. Em amarelo, o FAD, em vermelho resíduos TYR398 e TYR435, em azul resíduo ILE199 e em ciano a menadiona.

Conforme verificado na análise da estrutura secundária (Figura 9), a região C-terminal perde a estrutura de hélice, fato que é visualizado nas imagens da Figura 20. Também podemos ver que o resíduo TYR398, em vermelho à esquerda do ligante menadiona (em ciano), altera sua posição em relação às coordenadas iniciais. Entretanto, pode-se dizer que o sistema [MAO-B + FAD + MENADIONA] apresentou uma estabilidade relativa, uma vez que o ligante permaneceu durante todo o tempo de simulação dentro da região do sítio ativo da MAO-B.

CONCLUSÕES

As monoaminoxidases A e B, MAO-A e MAO-B, apresentam um sítio ativo (determinado experimentalmente¹¹) bastante definido, como foi constatado nos resultados obtidos via *Docking*. Foram observadas interações significativas do ligante menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona) com as enzimas MAO-A e MAO-B na região específica do sítio ativo. Os resíduos do *sanduíche aromático*, TYR407 e TYR444 para a MAO-A e TYR398 e TYR435 para MAO-B, juntamente com a coenzima FAD representam uma importante região de interação dessas enzimas com seus inibidores, formando a chamada *gaiola aromática*.⁵

O sítio ativo da MAO-B é dividido em duas cavidades, a de entrada e do substrato, e o resíduo ILE199 é considerado o “*portão*” de entrada para a cavidade do substrato. Mudanças conformacionais deste resíduo podem levar a fusão das duas cavidades.⁵

A importância do FAD no processo de inibição foi verificada através da comparação entre os sistemas [MAO-B + FAD] e [MAO-B + FAD + MENADIONA] submetidos a simulação por Dinâmica Molecular. Os resultados obtidos mostraram que a presença do FAD estabiliza o sistema enzima-inibidor.

A diferença na energia de interação, obtida a partir dos resultados do *Docking Fino*, entre a menadiona e a MAO-A e a MAO-B, -5,40 kcal/mol e -5,80 kcal/mol, respectivamente, sugere que este ligante pode ser um provável inibidor seletivo da MAO-B. Isto está de acordo com resultados experimentais, que mostraram que o “*esqueleto*” 1,4-naftoquinona pode ser um alvo para o desenvolvimento de novos inibidores específicos da MAO-B.⁹

O estudo das interações entre enzimas e inibidores/substratos é muito importante para o desenvolvimento racional de fármacos, sendo as metodologias computacionais de *Docking* e Dinâmica Molecular ferramentas importantes para a compreensão destas interações.

REFERÊNCIAS

1. DOONAN, S. **Peptides and Proteins**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2002.
2. SON, S.; MA, J.; KONDOU, Y.; YOSHIMURA, M.; YAMASHITA, E.; TSUKIHARA, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 5739-5744 (2008).
3. EDMONDSON, D.E.; BINDA, C.; MATTEVI, A. *NeuroToxicology*, **25**, 63-72 (2004).
4. BINDA, C.; NEWTON-VINSON, P.; HUBALEK, F.; EDMONDSON, D.E.; MATTEVI, A. *Nat. Struct. Biol.*, **9**, 22-26 (2002).
5. MILEZEK, E. M., BONIVENTO, D., BINDA, C., MATTEVI, A., MCDONALD, I. A., EDMONDSON, D. A.; *J. Med. Chem.*, **51**, 8019-8026 (2008).
6. BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. (Eds). **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 11.ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2007.
7. ROMEIRO, L. A. S., FRAGA, C. A. M., BARREIRO, E. J.; *Quim. Nova*, **26**, 347-358 (2003).
8. La REGINA, G.; SILVESTRI, R.; GATTI, V.; LAVECCHIA, A.; NOVELLINO, E.; BEFANI, O.; TURINI, P.; AGOSTINELLI, E. *Bioorg. Med. Chem.*, **16**, 9729-9740 (2008).
9. CERQUEIRA, E.C.; NETZ, P.A.; DINIZ, C.; do CANTO, V.P.; FOLLMER, C.; *Bioorg. Med. Chem.*, **19**, 7416-7424 (2011).
10. BINDA, C., WANG, J., LI, M., HUBALEK, F., MATTEVI, A., EDMONDSON, D.; *Biochemistry*, **47**, 5616-5625 (2008).
11. De COLIBUS, L.; LI, M.; BINDA, C.; LUSTIG, A.; EDMONDSON, D.E.; MATTEVI, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 12684-12689 (2005).
12. ALLEN, W.J., BEVAN, D.R., *Biochemistry*, **50**, 6441-6454 (2011).
13. HUBALEK, F.; BINDA, C.; KHALIL, A.; LI, M.; MATTEVI, A.; CASTAGNOLI, N.; EDMONDSON, D.E. *J. Biol. Chem.*, **280**, 15761-15766 (2005).
14. VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**; tradução Ana Beatriz Gorini da Veiga *et al.* 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.
15. LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1995.

16. LESK, A. M. **Introdução à Bioinformática**; tradução Ardala Elisa Breda Andrade *et al.* 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.
17. http://en.wikipedia.org/wiki/File:Main_protein_structure_levels_en.svg. Acesso em 28/09/2011 às 15h17min.
18. SANGER, F.; THOMPSON, E.O.P, *Biochem. J.* **53**, 353 (1953). SANGER, F.; THOMPSON, E.O.P, *Biochem. J.* **53**, 366 (1953).
19. PDB <http://www.rcsb.org>. Acessado em 20/09/2010.
20. SILVERMAN, R. B. **The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action**, 2. ed. USA: Elsevier Academic Press, 2004.
21. VERLI, H.; BARREIRO, E.J. *Quim. Nova*, **28**, 95-102 (2005).
22. ARUNAN, E.; DESIRAJU, G.R.; KLEIN, R.A.; SADLEJ, J.; SCHEINER, S.; ALKORTA, I.; CLARY, D.; CRABTREE, R.H.; DANNENBERG, J.J.; HOBZA, P.; KJAERGAARD, H.G.; LEGON, A.C.; MENNUCCI, B.; NESBITT, D.J. *Pure Appl Chem*, **83**, 1619-1636 (2011).
23. ARUNAN, E.; DESIRAJU, G.R.; KLEIN, R.A.; SADLEJ, J.; SCHEINER, S.; ALKORTA, I.; CLARY, D.; CRABTREE, R.H.; DANNENBERG, J.J.; HOBZA, P.; KJAERGAARD, H.G.; LEGON, A.C.; MENNUCCI, B.; NESBITT, D.J. *Pure Appl. Chem.*, **83**, 1637–1641 (2011).
24. GUIDO, R.V.C.; ANDRICOPULO, A.D. *Revista Processos Químicos – Senai*, **2**, 24-36 (2008).
25. NAMBA, A. M., da SILVA, V. B., da SILVA, C. H. T. P.; *Ecl. Quím.*, **33(4)**, 13-24 (2008).
26. KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. *Nature Reviews Drug Discovery*, **3**, 935 (2004).
27. MORRIS, G. M.; HUEY *Journal of Computational Chemistry*, **28**, 1145-1152 (2007).
28. RICCI, C. G. **Investigação computacional dos mecanismos de interação entre bases de Tröger e DNA**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Química, UFRGS, Porto Alegre, 2010.
29. MARTINEZ, L.; BORIN, I. A.; SKAF, M. S. **Fundamentos de Simulação por Dinâmica Molecular**. In MORGON, N.; COUTINHO, K. (Eds). Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular. São Paulo: Editora Livraria da Física, 2007.
30. van der SPOEL, D., LINDAHL, E., HESS, B., van BUUREN, A. R., APOL, E., MEULENHOF, P. J., TIELEMAN, D. P., SIJBERS, A. L. T. M., FEENSTRA,

- K. A., van DRUNEN, R., BERENDSEN, H. J. C. **Gromacs User Manual version 4.5**, www.gromacs.org (2010).
31. FRENKEL, D.; SMIT, B. **Understanding Molecular Simulation – From Algorithms to Applications**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2002.
 32. CORNELL, W.D.; CIEPLAK, P.; BAYLY, C.I.; GOULD, I.R.; MERZ JR, K.M.; FERGUSON, D.M.; SPELLMEYER, D.C.; FOX, T.; CALDWELL, J.W.; KOLLMAN, P.A.; *J. of Am. Chem. Soc.*, **117**, 5179 (1995).
 33. BROOKS, B.R.; BRUCCOLERI, R.E.; OLAFSON, B.D.; STATES, D.J.; SWAMINATHAN, S.; KARPLUS, M. *J. Comp. Chem.* **4**, 187 (1983).
 34. van GUNSTEREN, W.F.; BILLETER, S.R.; EISING, A.A.; HUNENBERGER, P.H.; KRUGER, P.; MARK, A.E.; SCOTT, W.R.P.; TIRONI, I.G. **Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide**. Groningen (1996).
 35. JORGENSEN, W.L.; TIRADO-RIVERS, J. *J. of Am. Chem. Soc.*, **110**, 1657 (1988).
 36. BERENDSEN, H. J. C. **Simulating the Physical World: Hierarchical Modeling from Quantum Mechanics to Fluid Dynamics**. Cambridge: Cambridge University Press, 2007.
 37. de ANDRADE, J. **Líquidos Iônicos: Desenvolvimento de Campo de Força e Estudo das Propriedades Físicas e Estruturais**. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Química, UFRGS, Porto Alegre, 2008.
 38. BERENDSEN, H.J.C., POSTMA, J.P.M., DINOLA, A., HAAK, J.R. *J. Chem. Phys.*, **81**, 3684 (1984).
 39. AUTODOCK/AUTODOCKTOOLS. Disponível em <http://autodock.scripps.edu/>
 40. MORRIS, G.M.; HUEY, R.; LINDSTRON, W.; SANNER, M.F.; BELEW, R.K.; GOODSEL, D.S.; OLSON, A.J. *J. Comput. Chem.*, **30**, 2785-2791 (2009).
 41. DENNINGTON II, R.; KEITH, T.; MILLAM, J.; **GaussView**, Version 4.1, Semichem Inc., Shawnee Mission, 2007.
 42. FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; ZAKREWSKI, V. G.; MONTGOMERY Jr, J. A.; STRATMANN, R. E.; BURANT, J. C.; DAPPRICH, S.; MILLAM, J. M.; DANIELS, A. D.; KUDIN, K. N.; STRIAN, M. C.; FARKAS, O.; TOMASI, J.; BARONE, V.; COSSI, M.; CAMMI, R.; MENUCCI, B.; POMELLI, C.; ADAMO, C.; CLIFFORD, S.; OCHTERSKI, J.; PETERSSON, G. A.; AYALA, P. Y.; CUI, Q.; MOROKUMA, K.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; MALICK, D. K.; RABUCK, A. D.; RAGHAVACHARI, K.; FORESMAN, J. B.; CIOSLOWSKI, J.; ORTIZ, J. V.; BABOUL, A. G.; STEFANOV, B. B.; LUI, G.; LIASHENKO, A.; PISKORZ, P.; KOMAROMI, I.; GOMPERS, R.; MARTIN, R. L.; FOX, D. J.; KEITH, T.; AL-LAHAM, M. A.; PENG, C. Y.; NANAYAKKARA, A.

- CHALLACOMBE, M.; GILL, P. M. W.; JOHNSON, B.; CHEN, W.; WONG, M. W.; ANDRES, J. L.; GONZALEZ, C.; HEAD-GORDON, M.; REPLOGLE, E. S.; POPLE, J. A. **Gaussian 98** (Revision A.1x), Gaussian Inc., Pittsburgh, 2001.
43. WALTERS, P.; STAHL, M. Disponível em:
<http://www.eyesopen.com/babel.html>
44. SANNER, M.F. *J. Mol. Graph. Model.* **17**, 57 (1999).
45. LEMKUL, J. A., ALLEN, W. J., BEVAN, D. R., *J. Chem. Inf. Model.*, **50**, 2221-2235, (2010).
46. GROMACS. Disponível em <http://www.gromacs.org>
47. OOSTENBRINK, C.; VILLA, A.; MARK, A.E.; van GUNSTEREN, W.F. *J. Comput. Chem.*, **25**, 1656-1676 (2004).
48. BERENDSEN, H.J.C., POSTMA, J.P.M., van GUNSTEREN, W.F., HERMANS, J. **Interaction models for waters in relation to protein hydration**. Intermolecular Force, Reidel: Dordrecht: 1981.
49. DARDEN, T., YORK, D., PEDERSEN, L. *J. Chem. Phys.*, **98**, 10089 (1993).
50. PARRINELLO, M., RAHMAN, A. *J. Appl. Phys.*, **52**, 7182 (1981).
51. KABSCH, W., SANDER, *Biopolymers*, **22**, 2577-2637 (1983)
52. SAYLE, R.A.; MILNER-WHITE, E.J. *Trends in Biochemical Sciences*, **20**, 374-376 (1995). Disponível em <http://www.umass.edu/microbio/rasmol>
53. TURNER, P. J.; STAMBULCHIK, E. Disponível em: <http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace>
54. BINDA, C., HUBALEK, F., HER-ZIG, Y., STERLING, J., EDMONDSON, D., MATTEVI, A.; *J. Med. Chem.*, **48**, 8148-8154 (2005).
55. TOPRAKÇI, M.; YELEKÇI, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**, 4438-4446 (2005).
56. BINDA, C.; LI, M.; HUBALEK, F.; RESTELLI, N.; EDMONDSON, D.E.; MATTEVI, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 9750-9755 (2003).