

## Artigo

## Estudando Interações Fármaco-Receptor com o *Protein Data Bank* (PDB) e Programas Gratuitos

Brito, M. A.\*

Rev. Virtual Quim., 2011, 3 (6), 467-483. Data de publicação na Web: 5 de janeiro de 2012

<http://www.uff.br/rvq>

### Studying Drug-Receptor Interactions With the Protein Data Bank (PDB) and Freeware

**Abstract:** Computational tools are important to help students to understand the concepts of drug-receptor interactions and to visualize 3D structures of ligand-macromolecule complexes in the Medicinal Chemistry course. In this work some computational practices are performed using drug-receptor structures available in PDB, the largest database of proteins, and a freeware viewer program for 3D structures, for a better understanding of students' concepts of intermolecular drug-receptor interactions. The complexes selected were chosen in line with the complexes covered in classroom lectures. Thus, the course fundamentals were contextualized and the new approach proved to be an important tool in the teaching-learning process.

**Keywords:** Education; Medicinal Chemistry; Drug-receptor interactions; Protein Data Bank.

### Resumo

As ferramentas computacionais constituem importante meio para auxiliar o entendimento de conceitos de interações fármaco-receptor e visualização de estruturas 3D de complexos ligante-macromolécula na disciplina de Química Medicinal. Neste trabalho foram realizadas aulas práticas computacionais utilizando as estruturas de complexos disponíveis no PDB, o maior banco de dados de proteínas, e um programa de visualização das estruturas 3D gratuito, objetivando melhor entendimento por parte dos alunos dos conceitos de interações intermoleculares fármaco-receptor. Os complexos selecionados foram escolhidos em consonância com os complexos abordados em sala nas aulas teóricas. Assim, os fundamentos da matéria foram contextualizados e a nova abordagem mostrou-se uma ferramenta importante no processo ensino-aprendizagem.

**Palavras-chave:** Ensino; Química Medicinal; Interações Intermoleculares Fármaco-Receptor; *Protein Data Bank*.



\* Universidade Federal Fluminense, Laboratório de Química Medicinal Computacional, Faculdade de Farmácia, Rua Dr. Mário Viana, 523, Santa Rosa, Niterói, RJ. CEP 24241-000.

✉ [moniquebrito@id.uff.br](mailto:moniquebrito@id.uff.br)

DOI: [10.5935/1984-6835.20110051](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20110051)

## Estudando Interações Fármaco-Receptor com o *Protein Data Bank* (PDB) e Programas Gratuitos

Monique Araújo de Brito\*

Universidade Federal Fluminense, Laboratório de Química Medicinal Computacional, Faculdade de Farmácia,  
Rua Dr. Mário Viana, 523, Santa Rosa, Niterói, RJ. CEP 24241-000.

\* [moniquebrito@id.uff.br](mailto:moniquebrito@id.uff.br)

*Recebido em 9 de junho de 2011. Aceito para publicação em 5 de janeiro de 2012*

### 1. Introdução

### 2. Materiais e métodos

### 3. Resultados e discussão

#### 3.1. Estudo das interações do complexo F-R

#### 3.2. Estudo da albumina e da glicoproteína ácida alfa-1

### 4. Conclusões

## 1. Introdução

---

Visando a melhoria no processo de ensino-aprendizagem de Química Medicinal, novas estratégias vêm sendo incorporadas às aulas práticas desta disciplina tão importante do currículo farmacêutico em diversas Universidades.<sup>1-4</sup> Posto que inúmeras transformações e melhorias vem marcando a área de Química Medicinal nos últimos anos, é importante que os alunos de Graduação sejam inseridos nessas novas abordagens da área, com o uso de recursos tecnológicos necessários e fundamentais. O uso de métodos e metodologias de modelagem molecular é um exemplo de inovação incorporada às aulas práticas da disciplina, como descrito por alguns autores.<sup>3,4</sup>

Nas aulas de Química Medicinal são abordados diversos conteúdos que envolvem o estudo de proteínas e enzimas (macromoléculas) receptoras de fármacos. Nesse sentido, as aulas tornam-se mais atrativas e os conteúdos são mais facilmente absorvidos pelos alunos quando eles podem pesquisar e observar as estruturas desses receptores, uma vez que muitos destes tiveram suas estruturas

tridimensionais (3D) elucidadas experimentalmente. Aliado a isso, eles podem visualizar possíveis interações fármaco-receptor (F-R) de complexos estudados em sala de aula.

Neste trabalho mostra-se a utilização do uso de ferramentas e aplicativos do maior banco de dados *on line* de proteínas, o *Protein Data Bank*, PDB.<sup>5</sup> O PDB é mantido no Laboratório Nacional Brookhaven, em Upton, New York, e contém estruturas obtidas através de experimentos de difração de raios-X e de nêutrons em cristais e de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de milhares de proteínas. Quando começou, em 1971, havia apenas 12 estruturas. A partir de 1980 esse número aumentou muito devido tanto à melhoria de tecnologias de obtenção das estruturas quanto à visão da comunidade científica no sentido de compartilhá-las. Hoje, há mais de 65 mil estruturas de proteínas de interesse biológico e de complexos F-R depositados no PDB ([www.pdb.org](http://www.pdb.org)).

As aulas práticas de Química Medicinal têm sido ministradas aos alunos do sexto período do curso de Farmácia da Universidade Federal Fluminense (UFF), paralelamente às aulas teóricas, no laboratório de informática da faculdade (InfoLab). Analisando as diferentes abordagens que poderiam ter sido

utilizadas, as atividades práticas no computador foram direcionadas ao estudo de complexos F-R, explorando as bases químicas das interações intermoleculares com o auxílio de programas e técnicas computacionais. Os objetivos específicos foram:

(a) Apresentar aos alunos este importante banco de dados de proteínas;

(b) Permitir que eles aprendam a acessá-lo e a procurar as estruturas de proteínas;

(c) Visualizar as estruturas 3D de fármacos e complexos F-R e analisar possíveis interações químicas no próprio site do PDB através do aplicativo *PDB Ligand Explorer v. 3.8*;

(d) Aprender a obter as estruturas para o computador e visualizá-las com um programa de visualização gráfica 3D, para analisar possíveis interações químicas F-R.

As aulas práticas foram ministradas em consonância com os conteúdos específicos das aulas teóricas. É importante ressaltar que além do site do PDB, as práticas foram realizadas utilizando programa gratuito de fácil acesso pelos alunos, a fim de facilitar sua aplicação por outras Instituições de ensino do país.

## 2. Materiais e Métodos

Na primeira aula foi estudado o complexo do fármaco sildenafil (do medicamento Viagra®) com o seu receptor, a enzima fosfodiesterase 5 (PDE5). No primeiro contato dos alunos com o site do PDB foi chamada atenção para alguns tópicos relevantes, como:

- O código usado pelo PDB;
- A citação primária do trabalho, onde constam o título, os nomes dos autores e um pequeno resumo da citação no PubMed;
- A descrição bioquímica da macromolécula;
- Os compostos químicos (ligantes, íons e pequenas moléculas) presentes no cristal juntamente com a macromolécula;
- Os arquivos FASTA e PDB;
- A estrutura 2D e 3D da macromolécula;
- O aplicativo *Ligand Explorer* do PDB.

Os alunos foram orientados a abrir o complexo F-R no aplicativo *PDB Ligand Explorer* e no programa *Rev. Virtual Quim.* |Vol 3| |No. 6| |467-483|

gráfico 3D Molegro Molecular Viewer (MMV) (Molegro Aps, Aarhus, Denmark),<sup>6</sup> gratuito e de rápido aprendizado, que pode ser baixado do site após prévia identificação do usuário (<http://www.molegro.com>). Há versões disponíveis para Windows, Linux e Mac.

Além disso, eles deveriam executar rotações e translações do complexo F-R, observar o local de ligação do fármaco na macromolécula e inferir possíveis interações químicas através da análise visual e das distâncias entre os átomos do fármaco e resíduos de aminoácidos da macromolécula. Estas interações poderiam ser ligações de hidrogênio, interações iônicas, interações de van der Waals e hidrofóbicas, assuntos discutidos nas aulas teóricas de Química Medicinal quando se fala sobre fármacos estruturalmente específicos e a fase farmacodinâmica.<sup>7</sup> Além das interações supracitadas, e uma vez que a PDE5 possui como co-fatores em seu sítio ativo dois átomos de metal, o zinco ( $Zn^{2+}$ ) e o magnésio ( $Mg^{2+}$ ), possíveis interações com os metais poderiam ser exploradas.

Na segunda aula, os alunos tiveram a chance de estudar complexos novos e aprofundar o que viram na primeira, pesquisando as estruturas das proteínas plasmáticas de transporte albumina e glicoproteína ácida alfa-1. O principal objetivo desta segunda prática foi mostrar os vários sítios de ligação a fármacos que a albumina possui e expor a diversidade de estruturas complexadas com essa proteína existentes no PDB, além de comparar essa diversidade com a escassez de estruturas da outra proteína de transporte relatada nos livros, a glicoproteína ácida alfa-1.

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1. Estudo das interações do complexo F-R

#### 3.1.1. Escolha do complexo sildenafil-PDE5 e busca no PDB

O complexo sildenafil-PDE5 foi escolhido porque o fármaco sildenafil foi abordado como exemplo na aula teórica de Química Medicinal como um fármaco estruturalmente específico, que necessita interagir com receptor para elicitar uma atividade biológica. O sildenafil foi originalmente desenvolvido por cientistas britânicos e lançado no mercado pela indústria farmacêutica Pfizer, em 1988, para o

tratamento da disfunção erétil.<sup>8</sup> Pesquisando no PDB os complexos através da palavra-chave “sildenafil” (Figura 1), foram obtidos como resultado 24

complexos, entre eles o sildenafil com as PDEs 4, 5 e 6. A Figura 1 mostra a página de entrada do PDB com o resultado da busca pelo sildenafil.

The screenshot shows the PDB website interface. At the top, it says 'An Information Portal to Biological Macromolecular Structures'. Below that, a search bar contains 'SILDENAFIL' (circled in red). The search results show '24 Structure Hits' (circled in red). The first result is '3JWQ' (circled in red), titled 'Crystal structure of chimeric PDE5/PDE6 catalytic domain complexed with sildenafil'. The authors listed are Barren, B., Gakhar, L., Muradov, H., Boyd, K.K., and Ramaswamy, S., with Artemyev, N.O. as the corresponding author. The release date is 2009-10-13, and the classification is Hydrolase. The experiment used X-RAY DIFFRACTION with a resolution of 2.87 Å. The compound is a polymer with 1 polymer, 3 ligands, and 1 polymer. The citation is 'Structural basis of phosphodiesterase 6 inhibition by the C-terminal region of the gamma-subunit (2009) Embo J. 28: 3613-3622'.

Figura 1. Resultados obtidos no site do PDB com a palavra-chave “sildenafil”

O PDB organiza as estruturas com um código de 4 dígitos, entre letras e números, como pode ser observado na Figura 1 (3JWQ, circulado em vermelho).

No site há uma ferramenta de busca mais avançada em que se especificam vários parâmetros, como, por exemplo, o tipo de macromolécula que se deseja (proteína, DNA, RNA), o peso molecular, o tipo de estrutura secundária, o limite de afinidade de ligação ( $K_i$ ) de determinado ligante por sua macromolécula, o método experimental de obtenção da estrutura, entre outros.

### 3.1.2. Características gerais do trabalho publicado

O complexo escolhido para análise foi o de código PDB:1UDT, pois continha apenas o sildenafil e a enzima PDE5. O trabalho foi intitulado “Crystal structure of Human Phosphodiesterase 5 complexed with Sildenafil (Viagra)” e a descrição da estrutura do complexo foi publicada na revista Nature em 2003.<sup>9</sup>

### 3.1.3. Descrição da macromolécula

A PDE5 é uma hidrolase com especificidade para o substrato GMPC (guanosina monofosfato cíclica) (Figura 2), com peso molecular de *c.a.* 38 kDa e uma cadeia polipeptídica composta por 324 aminoácidos.

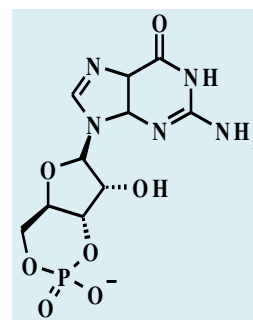
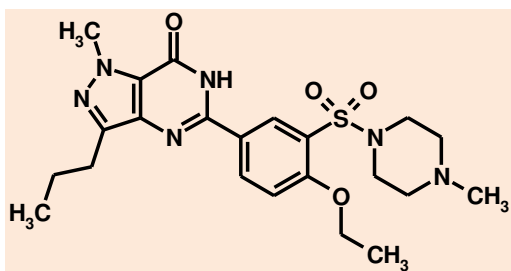


Figura 2. Estrutura química do GMPC, substrato da PDE5

### 3.1.4. Descrição do complexo PDB:1UDT

O complexo escolhido para observação contém, além do fármaco sildenafil (Figura 3), os íons  $Zn^{2+}$  e  $Mg^{2+}$ , co-fatores da PDE5. Ao passar o *mouse* em cima dos ligantes na página do complexo no PDB, aparecem suas respectivas estruturas químicas em 2D na tela.



**Figura 3.** Estrutura química do fármaco sildenafil

### 3.1.5. Os arquivos FASTA e PDB

No arquivo FASTA encontra-se a sequência primária de aminoácidos de um polipeptídeo ou proteína, representada pelo código de uma letra, onde K representa uma lisina, W um triptofano, etc (Figura 4). O FASTA é um arquivo texto, que pode ser visualizado em qualquer editor de texto.

O PDB (Figura 5) é um arquivo que contém as

coordenadas da proteína e dos ligantes, e pode ser visualizado tanto em editores de texto, quanto em programas gráficos, gerando a imagem 3D. Nas primeiras linhas vem a descrição da macromolécula: a classificação bioquímica, o código utilizado no PDB, o título do trabalho publicado. Abaixo começa a descrição da proteína e dos ligantes que foram cristalografados com ela: ATOM é a designação dada para todos os átomos da proteína e HETATM é a descrição conferida para os átomos dos ligantes, inclusive os metais, e do solvente, que frequentemente é a água.

### 3.1.6. A estrutura 3D do complexo F-R

A estrutura tridimensional em formato pdb do complexo sildenafil-PDE5 pode ser visualizada tanto no próprio *site* do PDB, através do aplicativo *Ligand Explorer*, quanto com auxílio de algum programa gráfico.

### 3.1.7. Usando o aplicativo do PDB Ligand Explorer

Ao clicar no *link Ligand Explorer* ao lado da sigla do sildenafil (Sigla VIA na Figura 6) na página do complexo do PDB, o aluno é direcionado para o aplicativo de visualização 3D.

```
>1UDT:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE
TRELQSLAAAVVPSAQLKITDFSFDFELSDLETALCTIRMFTDLNLVQNFQMKHEVLCRWILSVKKNYRKNVAYHNWRHAFNT
AQCMFAALKAGKIQNKLTDLLEILALLIAALSHDLDRGVNNSYIQRSEHPLAQLYCHSIMEHHHFDQCLMILNSPGNQILSGLSIEE
YKTLKIIKQAILATDLALYIKRRGEFFELIRKNQFNLEDPHQKELFLAMLMTACDLSAITKPWPIQQRIAELVATEFFDQGDREKE
LNIEPTDLMNREKKNKIPSMQVGFIDAICLQLYEALTHVSEDCFPLLDGCRKNRQKWQALAEQQ
```

**Figura 4.** Arquivo FASTA do complexo PDB:1UDT



|        |   |     |                |        |        |        |      |       |
|--------|---|-----|----------------|--------|--------|--------|------|-------|
| HEADER | HYDROLASE   |     | 06-MAY-03 1UDT |        |        |        |      |       |
| TITLE  | CRYSTAL STRUCTURE OF HUMAN PHOSPHODIESTERASE 5 COMPLEXED  |     |                |        |        |        |      |       |
| TITLE  | 2 WITH SILDENAFIL(VIAGRA)                                 |     |                |        |        |        |      |       |
| COMPND | MOL_ID: 1;  |     |                |        |        |        |      |       |
| COMPND | 2 MOLECULE: CGMP-SPECIFIC 3',5'-CYCLIC PHOSPHODIESTERASE; |     |                |        |        |        |      |       |
| COMPND | 3 CHAIN: A;   |     |                |        |        |        |      |       |
| ...    |   |     |                |        |        |        |      |       |
| ATOM   | 1   | N   | THR A 537      | -3.982 | 28.215 | 83.642 | 1.00 | 43.46 |
| ATOM   | 2   | CA  | THR A 537      | -2.685 | 28.492 | 84.329 | 1.00 | 42.15 |
| ATOM   | 3   | C   | THR A 537      | -2.853 | 28.484 | 85.842 | 1.00 | 42.35 |
| ATOM   | 4   | O   | THR A 537      | -3.963 | 28.599 | 86.365 | 1.00 | 40.95 |
| ATOM   | 5   | CB  | THR A 537      | -2.104 | 29.875 | 83.957 | 1.00 | 39.76 |
| ATOM   | 6   | OG1 | THR A 537      | -2.892 | 30.899 | 84.577 | 1.00 | 34.38 |
| ATOM   | 7   | CG2 | THR A 537      | -2.100 | 30.080 | 82.451 | 1.00 | 30.89 |
| ATOM   | 8   | N   | ARG A 538      | -1.731 | 28.366 | 86.536 | 1.00 | 43.46 |
| ATOM   | 9   | CA  | ARG A 538      | -1.722 | 28.343 | 87.987 | 1.00 | 44.97 |
| ATOM   | 10  | C   | ARG A 538      | -2.256 | 29.661 | 88.522 | 1.00 | 43.58 |
| ATOM   | 11  | O   | ARG A 538      | -3.086 | 29.680 | 89.429 | 1.00 | 46.01 |
| ATOM   | 12  | CB  | ARG A 538      | -0.298 | 28.122 | 88.487 | 1.00 | 40.05 |
| ATOM   | 13  | CG  | ARG A 538      | -0.201 | 27.865 | 89.964 | 1.00 | 41.34 |
| ATOM   | 14  | CD  | ARG A 538      | 1.239  | 27.622 | 90.373 | 1.00 | 43.47 |
| ATOM   | 15  | NE  | ARG A 538      | 1.299  | 26.928 | 91.652 | 1.00 | 50.75 |
| ATOM   | 16  | CZ  | ARG A 538      | 2.415  | 26.694 | 92.323 | 1.00 | 46.85 |
| ATOM   | 17  | NH1 | ARG A 538      | 3.577  | 27.101 | 91.835 | 1.00 | 63.89 |
| ATOM   | 18  | NH2 | ARG A 538      | 2.367  | 26.062 | 93.484 | 1.00 | 49.99 |
| ...    |   |     |                |        |        |        |      |       |
| HETATM | 2544  | ZN  | ZN A1001       | -4.452 | 56.769 | 81.496 | 1.00 | 33.15 |
| HETATM | 2545  | MG  | MG A1002       | -3.709 | 57.206 | 77.758 | 1.00 | 27.93 |
| HETATM | 2546  | C34 | VIA A1000      | -0.132 | 61.467 | 80.120 | 1.00 | 52.65 |
| HETATM | 2547  | C33 | VIA A1000      | -0.169 | 61.792 | 81.589 | 1.00 | 38.29 |
| HETATM | 2548  | C32 | VIA A1000      | -1.261 | 62.864 | 81.927 | 1.00 | 38.55 |
| HETATM | 2549  | C30 | VIA A1000      | -1.114 | 63.031 | 83.405 | 1.00 | 36.46 |
| HETATM | 2550  | N29 | VIA A1000      | -1.798 | 62.280 | 84.370 | 1.00 | 36.25 |
| HETATM | 2551  | N28 | VIA A1000      | -1.414 | 62.696 | 85.612 | 1.00 | 32.60 |
| HETATM | 2552  | C31 | VIA A1000      | -1.948 | 62.111 | 86.845 | 1.00 | 26.92 |
| HETATM | 2553  | C24 | VIA A1000      | -0.495 | 63.700 | 85.440 | 1.00 | 33.71 |
| HETATM | 2554  | C23 | VIA A1000      | 0.260  | 64.519 | 86.346 | 1.00 | 30.27 |
| HETATM | 2555  | O27 | VIA A1000      | 0.180  | 64.422 | 87.549 | 1.00 | 37.49 |
| ...    |   |     |                |        |        |        |      |       |

**Figura 5.** Parte do arquivo pdb do complexo PDB:1UDT. Nas primeiras linhas vem a descrição da macromolécula. A descrição ATOM é para todos os átomos da proteína e a descrição HETATM é conferida para os átomos dos ligantes, inclusive metais, e do solvente

| Source           |              | Hide         |   |
|------------------|--------------|--------------|---|
| Polymer: 1       |              |              |   |
| Scientific Name: | Homo sapiens | Common Name: | Human Expression System: Escherichia coli |

| Related PDB Entries |   | Hide |  |
|---------------------|---|------|--|
| Id                  | Details   |      |  |
| 1UDU                | the same protein complexed with tadalafil(Cialis) |      |  |

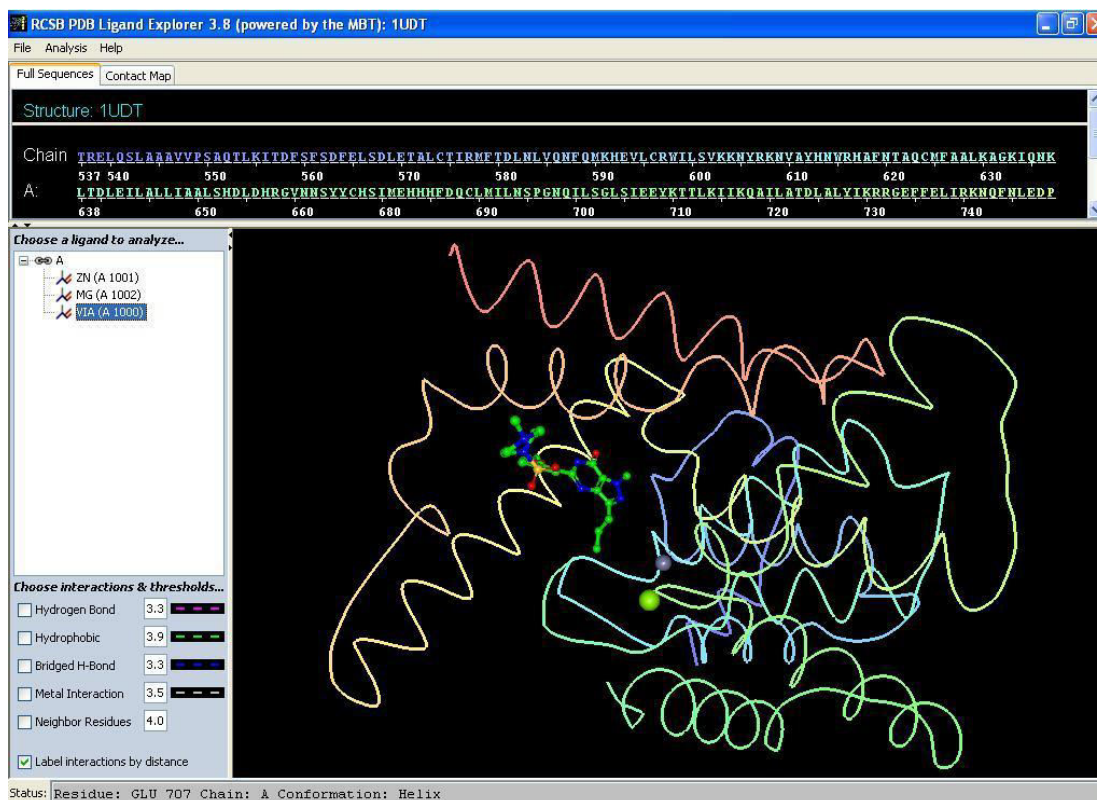
  

| Ligand Chemical Component |   |   |                                 | Hide |  |
|---------------------------|---|---|---------------------------------|------|--|
| Identifier                | Name  | Formula   | Interaction View                |      |  |
| MG                        | MAGNESIUM ION   | Mg  | <a href="#">Ligand Explorer</a> |      |  |
| VIA                       | 5-{2-ETHOXY-5-[(4-METHYLPIPERAZIN-1-YL)SULFONYL]PHENYL}-1-METHYL-3-PROPYL-1H,6H,7H-PYRAZOLO[4,3-D]PYRIMIDIN-7-ONE | C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> S | <a href="#">Ligand Explorer</a> |      |  |
| ZN                        | ZINC ION  | Zn  | <a href="#">Ligand Explorer</a> |      |  |

**Figura 6.** Parte do site do PDB onde se chega à função de visualização das interações F-R (*Ligand Explorer*)

Na parte superior da tela do *Ligand Explorer* aparece o código PDB da estrutura (seta amarela, Figura 7) e a sequência primária de aminoácidos da proteína (seta rosa, Figura 7), onde o aluno clica e o aminoácido é ressaltado na estrutura do complexo. É interessante observar que a forma prevalente de organização da estrutura secundária da PDE5 são as hélices alfa, em diferentes cores na Figura 7. O aplicativo só permite a visualização da proteína em

modelo fita. O sildenafil aparece em modelo bola e bastão com os átomos de carbono em verde, átomos de nitrogênio em azul, átomos de oxigênio em vermelho e átomo de enxofre em amarelo. Os metais aparecem um pouco afastados do sildenafil, o átomo de Zn<sup>2+</sup> em cinza e o de Mg<sup>2+</sup> em verde. Os átomos de hidrogênio do ligante foram omitidos para melhor visualização.



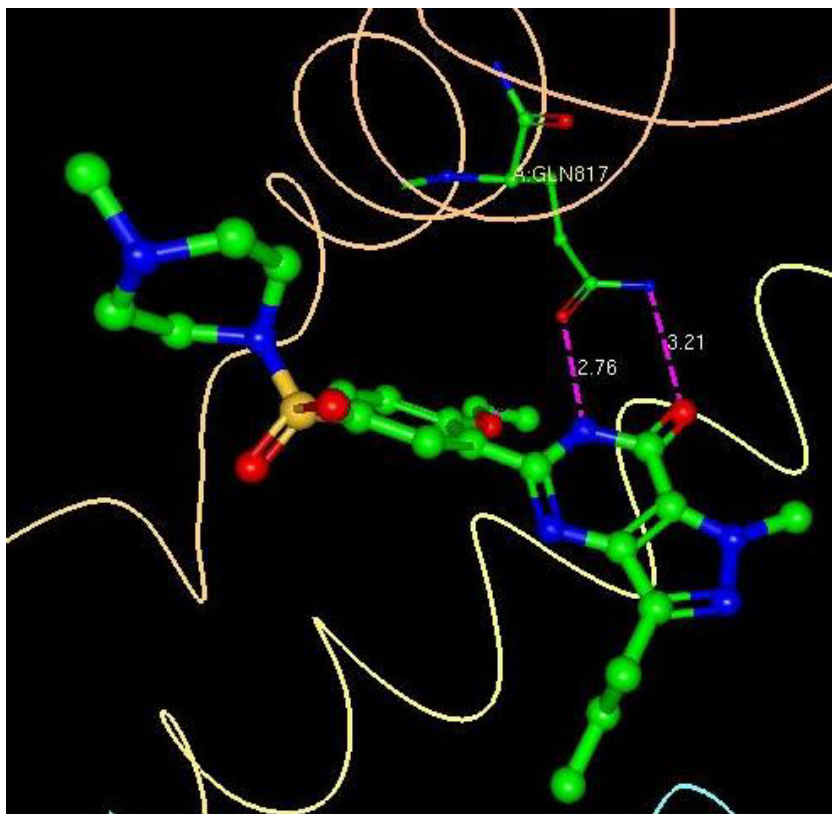
**Figura 7.** Estrutura do complexo sildenafil-PDE5 visualizado no aplicativo *Ligand Explorer* do PDB. O sildenafil está em modelo bola e bastão colorido por elemento

Na parte inferior esquerda da Figura 7 (seta verde) o aluno pode marcar as interações que deseja visualizar e especificar as distâncias para cada uma; entre elas estão as ligações de hidrogênio, hidrofóbicas, interações mediadas pela água e interações com metais. Para melhor visualizar as interações ele pode ainda restringir um raio em torno do ligante para que somente aqueles resíduos que estão dentro do raio especificado apareçam na tela.

Ao clicar na sigla VIA que representa a estrutura do sildenafil (Figura 7, seta marrom) e na interação por ligação de hidrogênio com distância de 3,3 Å (esta

distância pode ser modificada) pode-se observar duas interações (Figura 8), uma entre o átomo de hidrogênio do nitrogênio polar do sistema pirazolo-pirimidinona do sildenafil e o átomo de oxigênio da carbonila da cadeia lateral do resíduo Gln817 a 2,76 Å, o que caracteriza uma ligação hidrogênio de intensidade forte; e outra interação com distância de 3,21 Å entre o átomo de oxigênio da carbonila do sistema pirazolo-pirimidinona do sildenafil e o átomo de nitrogênio do grupo amida da cadeia lateral do mesmo resíduo, Gln817.

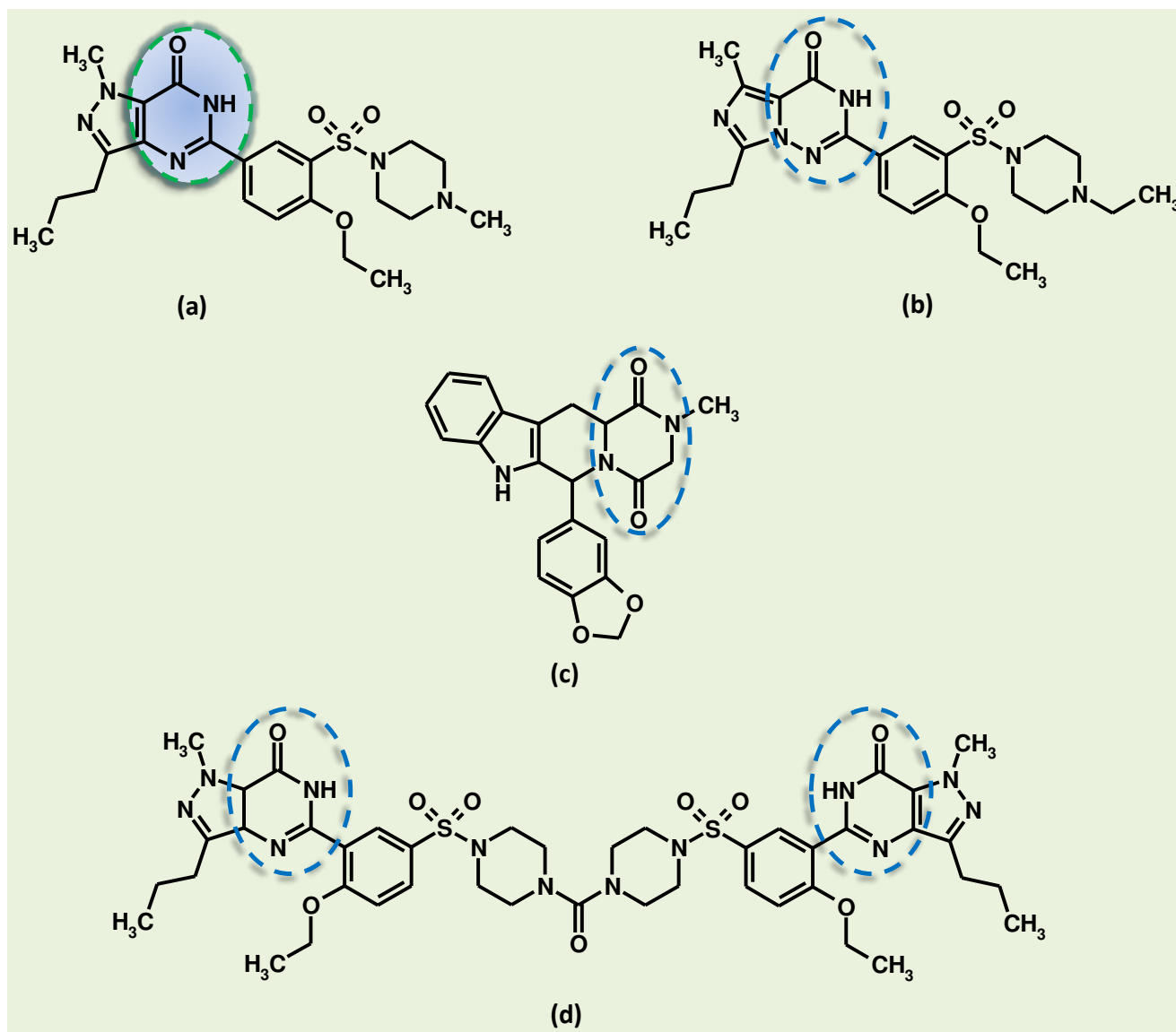




**Figura 8.** Interações por ligação de hidrogênio entre átomos do sistema pirazolo-pirimidinona do sildenafil (em modelo bola e bastão mais grosso) e do resíduo de Gln817 (em modelo bola e bastão mais fino) da enzima PDE5 visualizadas através do aplicativo *Ligand Explorer* do PDB

Estas ligações de hidrogênio do fármaco com o resíduo Gln817 da PDE5 mostram a importância do anel heteroaromático que existe no substrato (GMPC, Figura 2) da PDE5 e que aparece na estrutura do fármaco sildenafil. Outros fármacos da mesma classe, como o vardenafila, o tadalafila e o lodenafila - este um fármaco desenvolvido no Brasil pelo laboratório Cristália - possuem anéis

heteroaromáticos bioisómeros ao do substrato (embora o tadalafila não apresente hidrogênio polar capaz de fazer ligação de hidrogênio) (Figura 9). O objetivo foi preservar as ligações de hidrogênio com o resíduo Gln817, uma vez que as ligações de hidrogênio são muito importantes nos sistemas biológicos e nessa enzima mostra uma justificativa importante.



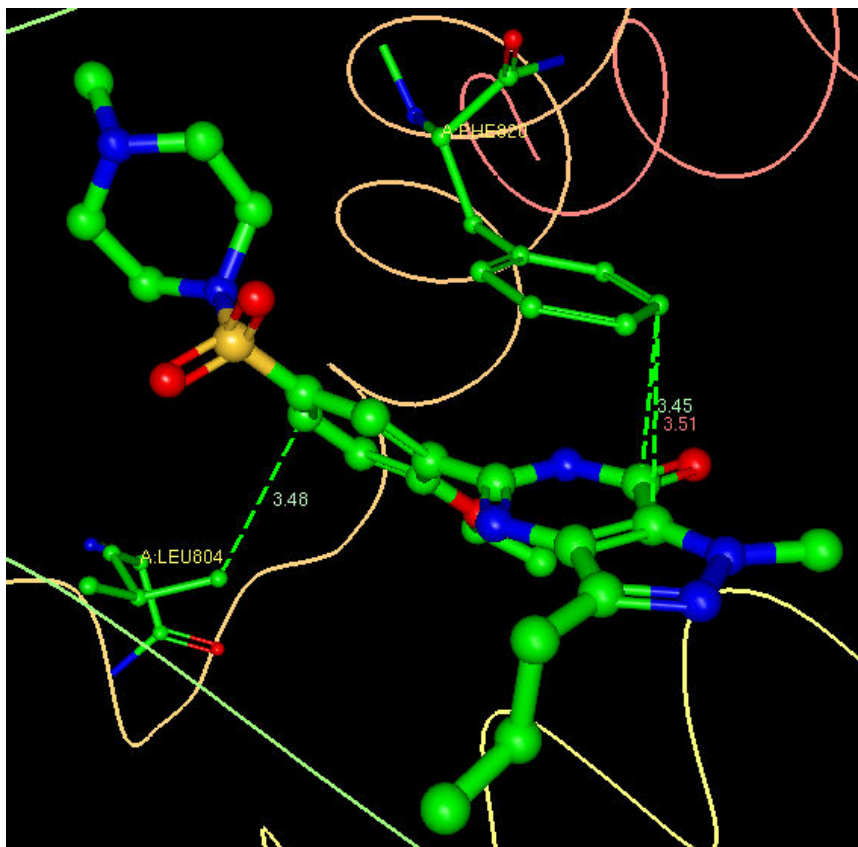
**Figura 9.** Estruturas químicas dos fármacos inibidores seletivos de PDE5. (a) sildenafil, (b) vardenafil, (c) tadalafil, e (d) lodenafil. Em destaques os grupos bioisósteros do anel pirimidinona do fármaco protótipo da classe, sildenafil

As interações hidrofóbicas e de van der Waals identificadas pelo programa com até 3,6 Å compreenderam: (i) o anel pirimidinona do sildenafil e o anel fenila de Phe820, em uma interação hidrofóbica do tipo empilhamento- $\pi$  ( $\pi$ -stacking) (Figura 10); (ii) o anel fenila do sildenafil e o grupo propil da cadeia lateral de Leu804, em uma interação de van der Waals (Figura 9).

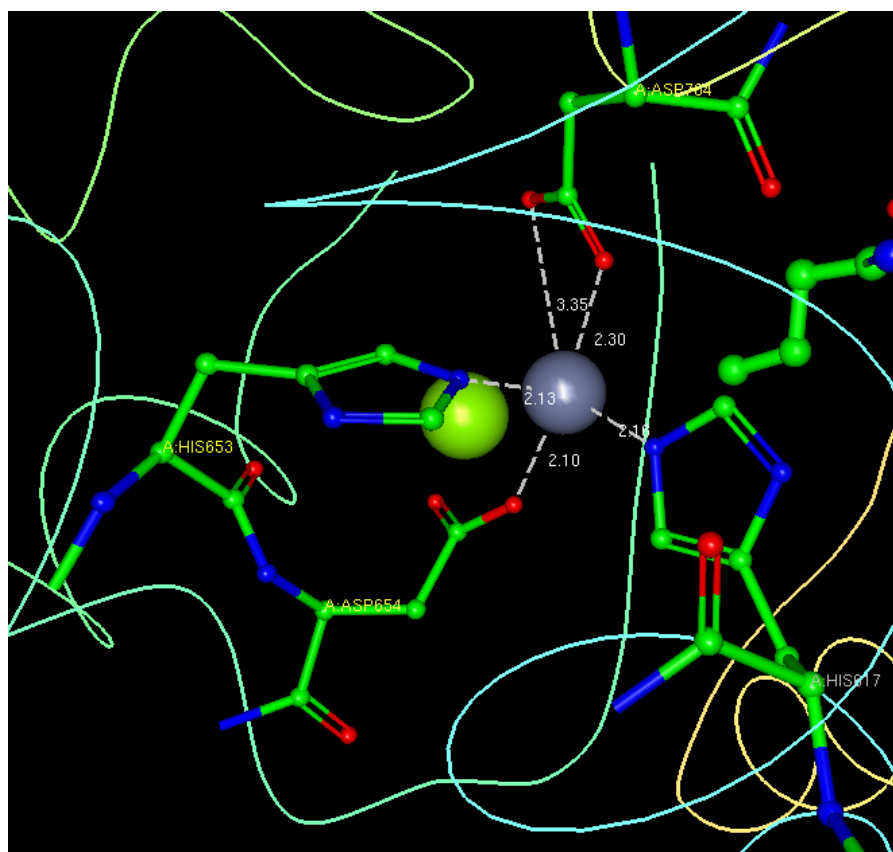
Além das interações F-R pode-se observar também as interações entre os átomos de metais ( $Zn^{2+}$  e  $Mg^{2+}$ )

e resíduos da proteína. Analisando as interações do átomo de  $Zn^{2+}$  (em cinza) com a proteína com distância de até 3,6 Å, observamos interações com os grupos polares imidazola (His617 e His653) e carboxilato (Asp704 e Asp654) das cadeias laterais dos aminoácidos (Figura 11).

É importante enfatizar que o complexo F-R escolhido não possui água estrutural mediando interações entre o ligante e a macromolécula, mas para alguns complexos estas águas são importantes.



**Figura 10.** Interações hidrofóbica e de van der Waals entre grupos do sildenafil (em modelo bola e bastão mais grosso) e os resíduos Phe820 e Leu804 (em modelo bola e bastão mais fino) da enzima PDE5 visualizadas através do aplicativo *Ligand Explorer* do PDB

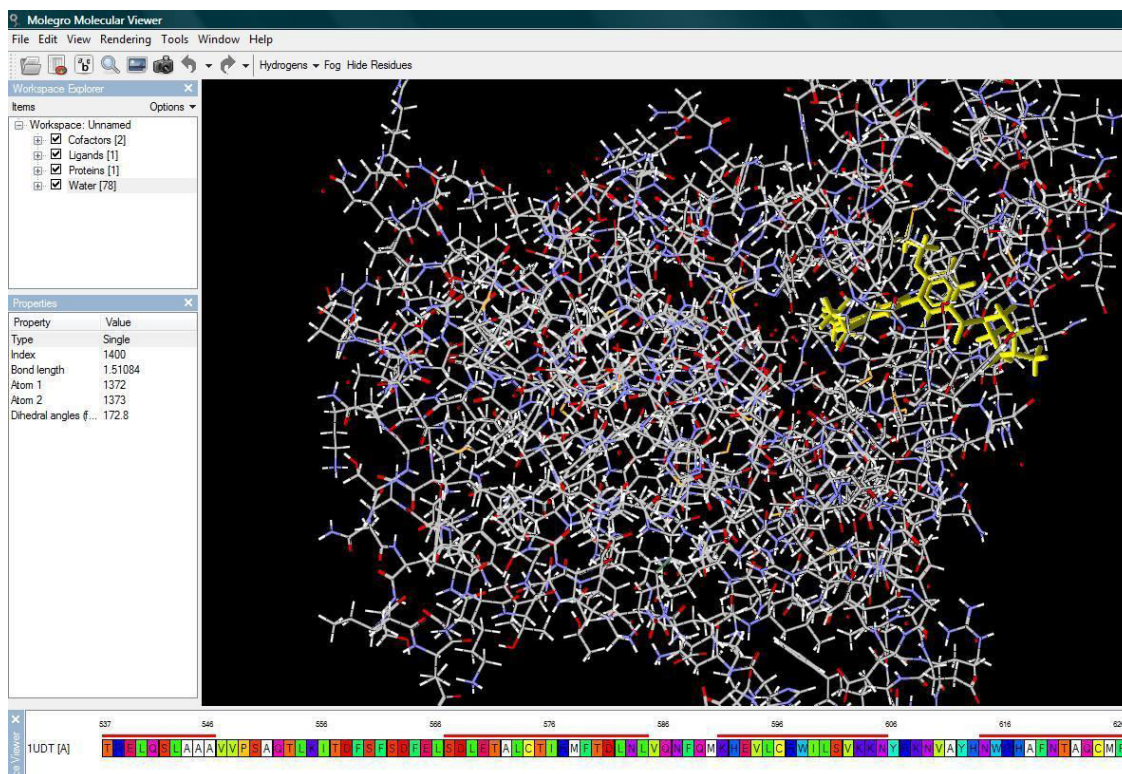


**Figura 11.** Interações entre o átomo de zinco (em cinza) e os resíduos Asp704, His653, Asp654 e His617 (coloridos por elemento) da enzima PDE5, visualizadas através do aplicativo *Ligand Explorer* do PDB

### 3.1.8. Usando o programa Molegro Molecular Viewer (MMV)

Ao fazer o *download* do arquivo pdb do complexo F-R o aluno pode observá-lo também pelo programa MMV. A visualização inicial do complexo pelo MMV é diferente do *Ligand Explorer*, pois aparecem todos os

hidrogênios da proteína e do ligante e os oxigênios da água da estrutura cristalografada. A Figura 12 mostra a janela inicial do programa MMV, onde se observa a proteína colorida de acordo com os átomos e o sildenafil colorido em amarelo (destaque da autora). Na parte inferior da tela observa-se a sequência primária da proteína, em diferentes cores.



**Figura 12.** Tela inicial do programa MMV com o complexo PDB:1UDT (sildenafil em amarelo)

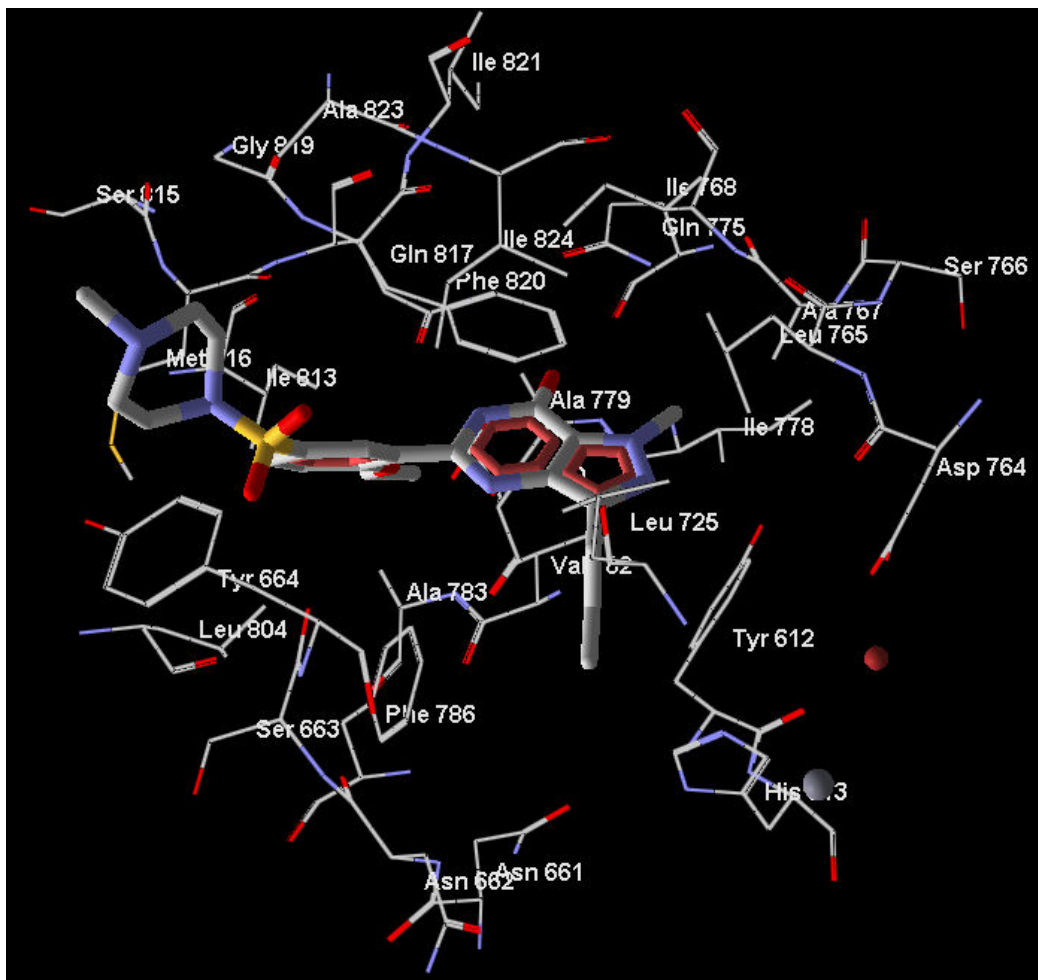
No MMV pode-se, também, estipular um corte para os resíduos ao redor do ligante. Na Figura 13 foi feito um corte de 4,0 Å em torno do inibidor e os aminoácidos foram identificados pela sigla de 3 letras e a numeração correspondente a cada um na proteína. Nessa Figura pode-se observar o predomínio de resíduos com cadeia lateral apolar/hidrofóbica, próximos ao sildenafil, como fenilalanina (Phe), valina (Val), leucina (Leu), isoleucina (Ile) e alanina (Ala), o que reforça a importância dessas interações entre o fármaco e a macromolécula.

O MMV tem recursos diferentes em relação ao aplicativo *Ligand Explorer*, como, por exemplo, as diversas formas de visualização da estrutura secundária da proteína, a possibilidade de mudar as cores tanto do ligante quanto da proteína e a

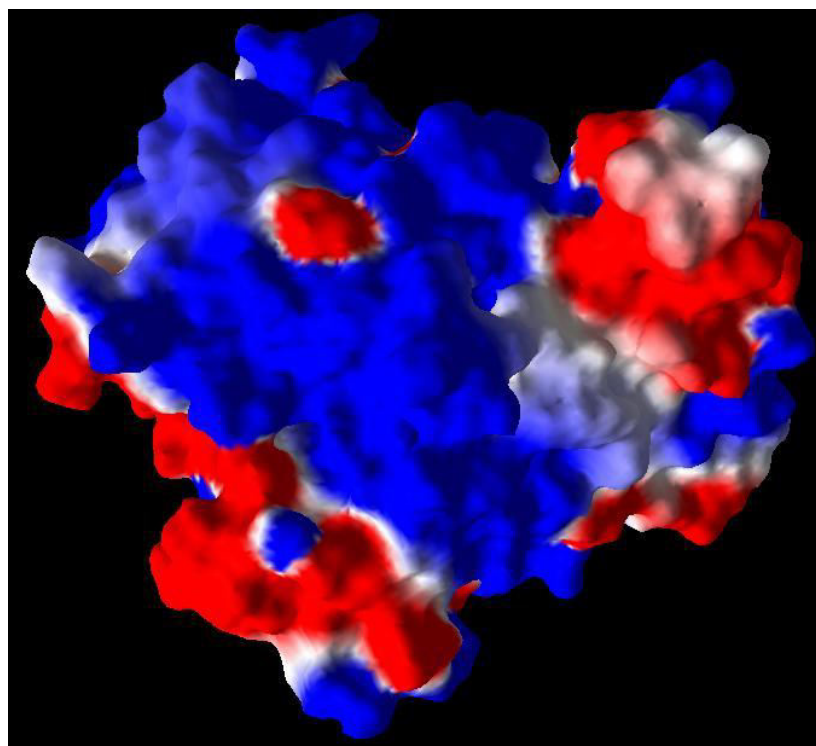
possibilidade de gerar superfície eletrostática de ambos (Figura 14). Nessa superfície observam-se as regiões da proteína carregadas positivamente (em azul), as regiões carregadas negativamente (em vermelho) e as regiões apolares, não-carregadas (em branco). Ela é uma ferramenta importante quando se quer estudar a distribuição superficial de cargas na proteína.

Há outros programas gratuitos e de fácil acesso em que se pode visualizar estruturas 3D de proteínas, de complexos F-R e visualizar interações, entre eles estão PyMOL Molecular Viewer (<http://www.pymol.org/>), Visual Molecular Dynamics (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>) e Swiss-PDB Viewer (<http://spdbv.vital-it.ch/>).





**Figura 13.** Sildenafil (em modelo bastão) e resíduos a 4,0 Å de distância (em modelo arame)



**Figura 14.** Superfície eletrostática da enzima PDE5

### 3.2. Estudo da albumina e da glicoproteína ácida alfa-1

A segunda prática computacional envolveu a pesquisa e a observação de complexos com a albumina e a glicoproteína ácida alfa-1. A albumina é a proteína presente em maior concentração no plasma sanguíneo e em espaços extravasculares, desempenhando papel na ligação e transporte de fármacos e uma variedade de outros compostos orgânicos endógenos e xenobióticos.<sup>10</sup> Por esse motivo ela exerce forte influência na fase farmacocinética de muitos fármacos (na etapa de distribuição), contribuindo para uma maior ou menor biodisponibilidade, e sua importância é ressaltada nas aulas de Química Medicinal. A flexibilidade estrutural da albumina permite que ela se adapte a uma variedade de ligantes.<sup>11</sup>

O principal objetivo desta prática foi mostrar aos alunos os vários sítios de ligação a fármacos que a albumina possui e a diversidade de estruturas complexadas com essa proteína existentes no PDB, e comparar essa diversidade com a escassez de estruturas da outra proteína de transporte, a glicoproteína ácida alfa-1.<sup>12</sup>

#### 3.2.1. Busca no PDB

Os alunos ao procederem a busca no PDB com as palavras-chaves "serum albumin", encontraram 99 estruturas. Eles puderam ver a diversidade de fármacos complexados com esta proteína, como o anestésico local lidocaína (PDB:3JQZ), o AZT, inibidor nucleosídeo da transcriptase reversa do HIV-1 (PDB:3B9L), os anti-inflamatórios não-esteroidais ácido salicílico (PDB:2I30), ácido acetil salicílico (PDB:2I2Z), diflunisal (PDB:2BXE), ibuprofeno (PDB:2BXG) e indometacina (PDB:2BXK), o anti-coagulante oral varfarina (PDB:2BXD), o hipnótico-sedativo diazepam (PDB:2BXF), os anestésicos gerais propofol (PDB:1E7A) e halotano (PDB:1E7B), entre outros.

#### 3.2.2. Escolha dos complexos e visualização dos sítios de ligação dos fármacos na albumina

Foram escolhidos seis complexos para observar e analisar, com o requerimento de que pertencessem a diferentes classes terapêuticas para que os alunos acumulassem maior número de informações sobre os fármacos. Os complexos escolhidos foram da albumina com lidocaína (PDB:3JQZ),<sup>10</sup> AZT (PDB:3B9L),<sup>13</sup> ibuprofeno (PDB:2BXG),<sup>14</sup> varfarina (PDB:2BXD),<sup>14</sup> diazepam (PDB:2BXF),<sup>14</sup> e propofol (PDB:1E7A).<sup>15</sup> As estruturas químicas dos fármacos estão mostradas na Figura 15.

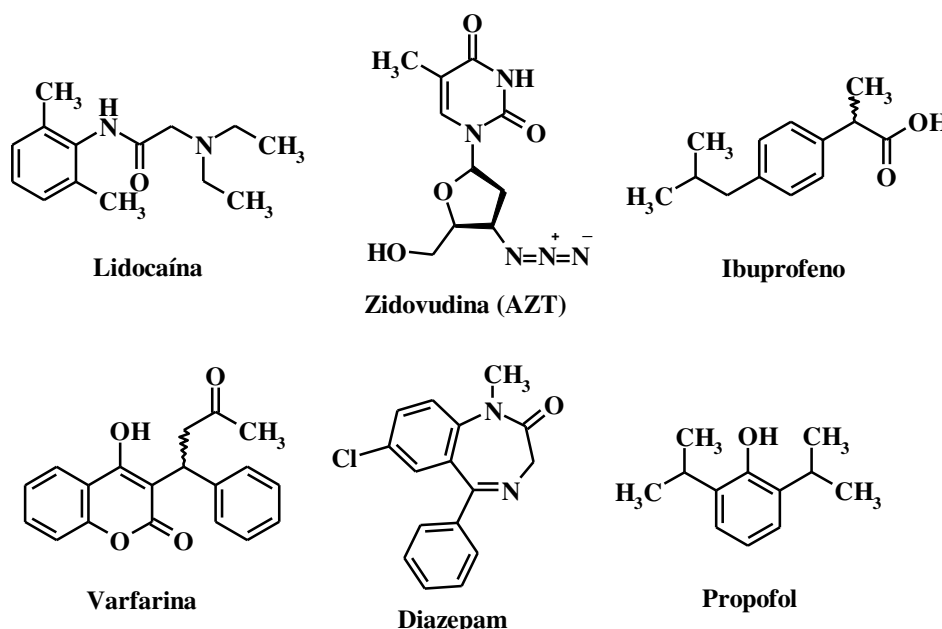


Figura 15. Estruturas químicas dos fármacos complexados com a albumina escolhidos para análise

Os fármacos zidovudina, ibuprofeno e varfarina são quirais, portanto apresentam isomeria óptica. Embora não seja mencionado que enantiômero

encontra-se complexado nem no PDB, nem nos artigos que reportam a obtenção dos complexos F-R, sabe-se que a atividade do ibuprofeno deve-se quase

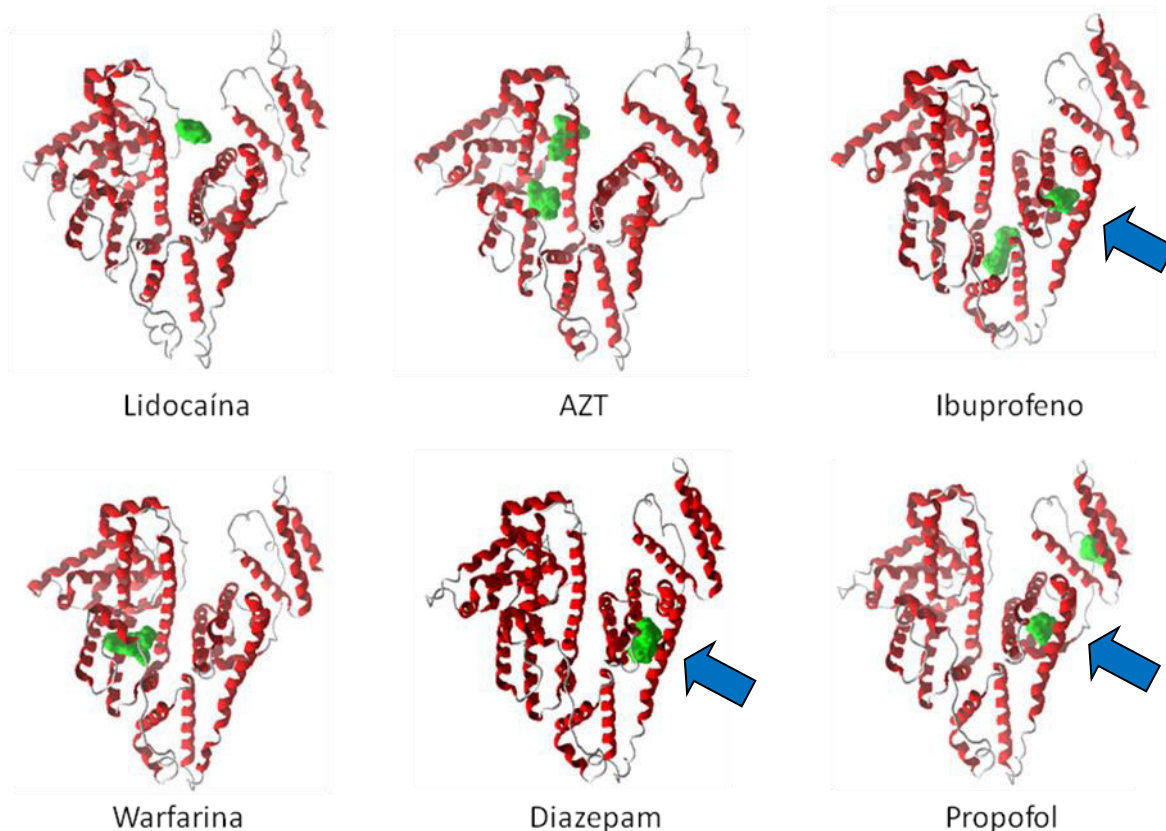


que inteiramente ao enantiômero (S), embora ele seja comercializado na forma racêmica.<sup>16</sup> O eutômero da varfarina também é o de configuração (S), quatro vezes mais potente do que o distômero (R), mas este fármaco também é comercializado em sua forma racêmica.<sup>17</sup> Em relação ao AZT não há menção à potência dos enantiômeros.<sup>18</sup>

Após escolha e leitura cuidadosa dos títulos dos trabalhos de cada complexo, os alunos fizeram o *download* dos mesmos e abriram cada estrutura no programa MMV, que mostra as estruturas secundárias da proteína e permite a mudança de cor no ligante, o que seria importante na visualização. A Figura 16 ilustra os complexos de cada fármaco escolhido com a albumina.

Pela observação dessa Figura pode-se identificar as

diferentes regiões de ligação a fármacos na albumina, ao contrário de outras proteínas, principalmente as enzimas, que possuem sítios determinados de ligação a fármacos, seja o sítio catalítico ou o alostérico. Esta diversidade de sítios de ligação (também denominada promiscuidade) é o que faz a albumina ligar-se a tantos compostos orgânicos diferentes. Analisando a Figura 16 detecta-se pelos menos sete locais diferentes de ligação, considerando que uma molécula de ibuprofeno, o diazepam e uma molécula do propofol ligaram-se a regiões visualmente muito próximas na proteína (setas azuis), que podem ser consideradas como a mesma região. Além disso, os alunos puderam ver que mais de uma molécula do fármaco pode se ligar à proteína e que a única forma de organização secundária da albumina são as hélices alfa (Figura 16, em vermelho).



**Figura 16.** Estruturas da proteína sérica humana albumina (hélices alfa em vermelho) complexada com diferentes fármacos (em verde)

Após a procura e visualização das estruturas de fármacos complexados com a albumina, eles procederam à busca de estruturas da glicoproteína ácida alfa-1 com as palavras “alpha1-acid glycoprotein”, o que resultou em apenas uma

estrutura, de código PDB:3KQ0. A estrutura não tem fármaco ligado e essa proteína, tem outra forma de organização secundária além das hélices alfa, as folhas beta (Figura 17, em azul).

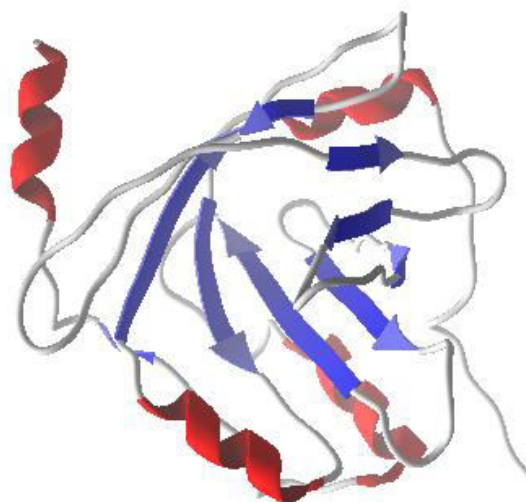


Figura 17. Estrutura da glicoproteína ácida alfa-1

## 4. Conclusões

As aulas computacionais utilizando as ferramentas do PDB foram muito atraentes para os alunos, que desenvolveram as atividades com desenvoltura e consolidaram melhor o conhecimento adquirido nas aulas teóricas da disciplina. No início houve dificuldade de entender as interações, mas a integração com as aulas teóricas proporcionou melhor entendimento. Os relatórios entregues mostraram boa sedimentação do conhecimento e amadurecimento sobre o tema das aulas. Na avaliação interna informal sobre as práticas, todos os alunos disseram que a utilização dessas ferramentas contribuiu muito para seu entendimento acerca do assunto e que o uso de ferramentas computacionais deveria ser incorporado a outras disciplinas. Sobre as dificuldades encontradas, a mais citada foi conseguir ver as interações. Certamente as aulas contribuíram para uma melhor relação ensino-aprendizagem.

Foi observado que ambos os programas tem vantagens e desvantagens. A vantagem do *Ligand Explorer* é que o aluno pode alterar os valores de corte das distâncias de interação. A vantagem do MMV é se poder alterar as cores dos aminoácidos e dos ligantes, ocultar trechos da proteína mais distantes do inibidor e gerar o mapa de superfície eletrostática da proteína, acessando as regiões de cargas negativas ou positivas e as regiões neutras.

É importante enfatizar para os alunos que as estruturas baixadas do PDB são estáticas e que algumas vezes possuem contatos estéricos ruins, que necessitam de refinamento (otimização de geometria e minimização de energia) para qualquer estudo mais

aprofundado com os complexos. Além disso, em estudos de modelagem molecular com proteínas devemos averiguar se a estrutura da proteína está completa, se ela tem mutação, e os estados de protonação dos resíduos ácidos e básicos da proteína. O programa gratuito PROPKA (<http://propka.ki.ku.dk/>) é uma ferramenta para prever o pKa dos resíduos de aminoácidos de um receptor.

## Agradecimento

A Autora agradece à Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós Graduação e Inovação (PROPPi) da UFF.

## Referências Bibliográficas

- <sup>1</sup> Brito, M. A. *Rev. Eletr. Farm.* **2011**, *8*, 88. [Link]
- <sup>2</sup> Brito, M. A. *Rev. Eletr. Farm.* **2010**, *7*, 22. [Link]
- <sup>3</sup> Andrade, C. H.; Trossini, G. H. G.; Ferreira, E. I. *Rev. Eletr. Farm.* **2010**, *1*, 1. [Link]
- <sup>4</sup> Carvalho, I.; Pupo, M. T.; Borges, A. D. L.; Bernardes, L. S. C. *Quim. Nova* **2003**, *26*, 428. [CrossRef]
- <sup>5</sup> Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>6</sup> Sítio da empresa Molegro Bioinformatics Solutions. Disponível em: < <http://www.molegro.com> >. Acesso em: 17 novembro 2011.

- <sup>7</sup> Maher, T. J.; Johnson, D. A. Em *Foye's principles of medicinal chemistry* Lippincott Williams & Wilkins: New York, 2008, cap. 4.
- <sup>8</sup> Boolell, M.; Allen, M. J.; Ballard, S. A.; Gepi-Attee, S.; Muirhead, G. J.; Naylor, A. M.; Osterloh, I. H.; Gingell, C. *Int. J. Impot. Res.* **1996**, *8*, 47. [[PubMed](#)]
- <sup>9</sup> Sung, B. J.; Hwang, K. Y.; Jeon, Y. H.; Lee, J. I.; Heo, Y. S.; Kim, J. H.; Moon, J.; Yoon, J. M.; Hyun, Y. L.; Kim, E.; Eum, S. J.; Park, S. Y.; Lee, J. O.; Lee, T. G.; Ro, S.; Cho, J. M. *Nature* **2003**, *425*, 98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>10</sup> Hein, K. L.; Kragh-Hansen, U.; Morth, J. P.; Jeppesen, M. D.; Otzen, D.; Møller, J. V.; Nissen, P. *J. Struct. Biol.* **2010**, *171*, 353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>11</sup> Ascenzi, P.; Bocedi, A.; Notari, S.; Fanali, G.; Fesce, R.; Fasano, M. *Mini Rev. Med. Chem.* **2006**, *6*, 483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>12</sup> Buxton, I. L. O. Em *Goodman & Gilman As Bases Farmacológicas da Terapêutica*; Brunton, L. L.; Lazo, J. S.; Parker, K. L., eds.; McGrawHill: New York, 2006, cap. 11.
- <sup>13</sup> Zhu, L.; Yang, F.; Chen, L.; Meehan, E. J.; Huang, M. *J. Struct. Biol.* **2008**, *162*, 40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>14</sup> Ghuman, J.; Zunszain, P. A.; Petitpas, I.; Bhattacharya, A. A.; Otagiri, M.; Curry, S. *J. Mol. Biol.* **2005**, *353*, 38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>15</sup> Bhattacharya, A. A.; Curry, S.; Franks, N. P. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 38731. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>16</sup> Borne, R.; Levi, M.; Wilson, N. Em *Foye's principles of medicinal chemistry*; Lippincott Williams & Wilkins: New York, 2008, cap. 36.
- <sup>17</sup> Lu, M. C.; Lemke, T. L. Em *Foye's principles of medicinal chemistry*; Lippincott Williams & Wilkins: New York, 2008, cap. 31.
- <sup>18</sup> Woster, P. M. Em *Foye's principles of medicinal chemistry*; Lippincott Williams & Wilkins: New York, 2008, cap. 43.