

ESTUDOS DE ACOPLAMENTO MOLECULAR ENTRE O LIGANTE β -BIXINA E A PROTEÍNA NS1 DO VÍRUS DA DENGUE

Jacilene Silva (1); Márcia Machado Marinho (2); Emmanuel Silva Marinho (3)

1-Universidade Estadual do Ceará, jacilene.silva@aluno.uece.br; 2-Universidade Federal do Ceará, marinho.marcia@gmail.com; 3-Universidade Estadual do Ceará, emmanuel.marinho@uece.br

Resumo: Atualmente, foram registrados 214.990 casos prováveis de dengue no Brasil com uma incidência de 104,3 casos/100 mil habitantes. A dengue é uma enfermidade causada por um arbovírus da família Flaviviridae, gênero Flavivírus, que inclui quatro tipos imunológicos diferentes: DENV1-4. O genoma do DENV possui uma única fase aberta de leitura, codificando uma longa poli proteína, na qual, a mesma é clivada por proteases virais e celulares, gerando três proteínas estruturais: C (capsídeo), prM/M (pré-membrana/membrana) e E (envelope); e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5). Dentre as proteínas do Dengue vírus, destaca-se a glicoproteína não-estrutural NS1, sendo esta a primeira proteína não estrutural com 353 a 354 aminoácidos, atuando na fase precoce da replicação viral, estando envolvida na morfogênese viral, e associada à virulência. A NS1 é a proteína não-estrutural mais conservada apresentando elevado grau de reação cruzada entre os quatro sorotipos do DENV. Entre as diversas técnicas que estão sendo estudadas para o controle do *Aedes aegypti*, mosquito vetor na transmissão do DENV, encontra-se o desenvolvimento de novas fórmulas à base de princípios ativos de plantas. A Bixina é um carotenoide encontrado na planta *Bixa orellana L.* mais conhecida no Brasil como urucum, pertencente à família Bixaceae, gênero *Bixa*. Essa planta evidencia-se por produzir um pigmento avermelhado, retirado de suas sementes, que era constantemente usado pelos índios como protetor (repelente) para pele contra picadas de insetos. Nesta perspectiva, o presente trabalho teve como objetivo identificar a β -bixina, como possível inibidor da proteína viral NS1 do vírus da Dengue tipo I. O presente estudo desenvolveu-se em quatro etapas: (1) Obtenção da estrutura do ligante no repositório ChemIdplus e caracterização do mesmo no *software* Avogadro e obtenção da proteína NS1 no repositório *Protein Data Bank*; (2) Preparação do ligante utilizando o campo de força clássico MMFF94; (3) Preparação da proteína para o *docking*; (4) *Docking* Molecular proteína-ligante utilizando o *software* UCSFChimera®. Foram encontradas as menores ligações de Hidrogênio para o complexo ligante-proteína, sendo elas, 2,0 Å no *docking* molecular *RMSD l.b.*: 1,050 Å; 1,9 Å na 1ª repetição do *docking RMSD l.b.*: 1,488 Å; 1,8 Å na 2ª repetição do *docking RMSD l.b.*: 19,296 Å e 2,2 Å na 3ª repetição do *docking RMSD l.b.*: 1,426 Å. Em que três das quatro ligações se encontram na cadeia E da proteína, destacando assim, a maior afinidade do ligante beta bixina aos resíduos de aminoácidos presentes na cadeia E da proteína NS1 do DENV. A partir de simulações computacionais de modelagem molecular a nível quântico semi-empírico, foi possível identificar o possível sítio de ligação entre a β -Bixina e a proteína do NS1 do DENV, identificando as menores ligações de hidrogênio encontradas com valores de 1,8 Å e 1,9 Å, 2,0 Å e 2,2 Å, que evidenciam a estabilidade do complexo ligante-proteína, que reflete o potencial desse ligante para o desenvolvimento de um novo fármaco, larvicida ou repelente contra a dengue, assim como também contra o seu principal vetor, o mosquito *Aedes aegypti*.

Palavras-chave: DENV, NS1, β - Bixina, *Docking* Molecular.

INTRODUÇÃO

Atualmente, foram registrados 214.990 casos prováveis de dengue no Brasil com uma incidência de 104,3 casos/100 mil habitantes, sendo a região Nordeste a que apresentou o maior número de casos (80.447 casos; 37,4%) (SVS/MS, 2017). A dengue é uma enfermidade

causada por um arbovírus da família Flaviviridae, gênero Flavivírus, que inclui quatro tipos imunológicos diferentes: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (PIRES NETO et al., 2005). Os arbovírus são classificados como zoonoses, isto é, dependem de outra espécie animal além do homem para serem mantidos na natureza, requerendo no mínimo dois hospedeiros (GUBLER, 1998). O vírus da dengue tem formato esférico, diâmetro entre 40 e 60 nanômetros e genoma RNA de fita simples e polaridade positiva, sendo este, infeccioso, comportando-se como um RNA mensageiro (RNAm) (Chambers, 1990). O genoma do DENV possui uma única fase aberta de leitura, codificando uma longa poli proteína, na qual, a mesma é clivada por proteases virais e celulares, gerando três proteínas estruturais: C (capsídeo), prM/M (pré-membrana/membrana) e E (envelope); e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) (ROTHMAN, 2004; LINDENBACH et al., 2007; GUARDIA & LLEONART, 2014).

Dentre as proteínas do Dengue vírus, destaca-se a glicoproteína não-estrutural NS1, sendo esta a primeira proteína não estrutural com 353 a 354 aminoácidos (BARTENSCLAGER e MILLER, 2008), atuando na fase precoce da replicação viral, estando envolvida na morfogênese viral, e associada à virulência (HENCHAL e PUTNAK, 1990). A NS1 é a proteína não-estrutural mais conservada apresentando elevado grau de reação cruzada entre os quatro sorotipos do DENV (ZAINAH et al., 2008).

Entre as diversas técnicas que estão sendo estudadas para o controle do *Aedes aegypti*, mosquito vetor na transmissão do DENV, encontra-se o desenvolvimento de novas fórmulas à base de princípios ativos de plantas, em que o uso de substâncias fotossensibilizadores (FSs) ou fotoinseticidas, tornam-se ferramentas favorável ao combate de insetos vetores (SCHUITMAKER et al., 1996; KARUNARATNE et al., 2005; FABRIS et al., 2012).

Estima-se que pelo menos metade das plantas contenham substâncias chamadas de princípios ativos, as quais possuem propriedades curativas e preventivas para muitas doenças (LORENZI & MATOS, 2002). Os extratos de plantas são fontes de substâncias bioativas que podem ter efeito no comportamento de insetos como repelência, inibição da deposição de ovos e da alimentação, distúrbios no crescimento das larvas, deformações, infertilidade e mortalidade (CORREA & SALGADO, 2011). A Bixina é um carotenoide encontrado na planta *Bixa orellana* L. mais conhecida no Brasil como urucum, pertencente à família *Bixaceae*, gênero *Bixa*. Essa planta evidencia-se por produzir um pigmento avermelhado, retirado de suas sementes, que era constantemente usado pelos índios como protetor

(repelente) para pele contra picadas de insetos (BARBOSA FILHO, 2006). A partir da bixina, são obtidos os pigmentos: Norbixina, Annatto, β -Bixina e mais seis pigmentos, sendo que ambos são isômeros da Bixina (SILVA et al., 2017). Nesta perspectiva, o presente trabalho teve como objetivo identificar a β -bixina, como possível inibidor da proteína viral NS1 do vírus da Dengue tipo I.

METODOLOGIA

Para a realização deste trabalho, foram utilizados os *softwares* Avogadro® e UCSFChimera®, sendo estes de acesso gratuito, baseados no Sistema Operacional Windows 7 Ultimate 64 Bits. O *hardware* utilizado, tem processador Intel® Core™ i3-5005U CPU @ 2.0 GHz, 4 GB de memória RAM e 1000 GB de HD (SILVA et al., 2017). A partir do repositório Chemidplus® (<https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/>) foi obtida a estrutura do ligante com número de registro 39937-23-0. Em seguida, as propriedades da molécula β -Bixina foram calculadas utilizando o *software* Avogadro®. A estrutura protéica foi obtida no repositório *Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>), onde estava depositada com o código 4OIG, sendo esta gerada a partir de difração de raio X, com resolução de 2,69 Å, R-Value Free de 0.268, R-Value Work de 0,220, Space Group C 1 2 1, com célula unitária com a= 109,18 Å, b = 81,96 Å, c = 97,19 Å, $\alpha = 90.00^\circ$, $\beta = 97,78^\circ$, $\gamma = 90,00^\circ$, classificada como proteína não-estrutural viral, expressa em *Escherichia coli*, constituída por quatro cadeias (A, B, D e E), cristalizada com o ligante íon sulfato (EDELING et al., 2014). A preparação da proteína para o *docking* molecular foi realizada pelo *software* UCSFChimera® (PETTERSEN et al., 2004), em que foram retirados os resíduos (H₂O e SO₄) que poderiam influenciar no resultado satisfatório do acoplamento, em seguida, a estrutura foi salva no formato Mol2; após a preparação do ligante β -bixina e da proteína NS1 do vírus da dengue, o *docking* molecular foi realizado por meio do *software* UCSFChimera®, utilizando o ligante flexível e a proteína rígida (SILVA et al., 2017).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O *software* Avogadro é um editor e visualizador de moléculas avançadas, projetado para uso multiplataforma em química computacional, modelagem molecular, bioinformática, ciência de materiais e áreas relacionadas (HANWELL et al., 2012). Logo, para otimizar a conformação inicial do ligante β -bixina com menor potencial de energia, esta foi submetida a

modelagem utilizando o campo de força clássico MMFF94, que nos permitiu obter um valor estacionário de energia igual a 88,8143 kJ/Mol (Figura 1) e plotar o mapa de superfície de Van der Waals (Figura 2).

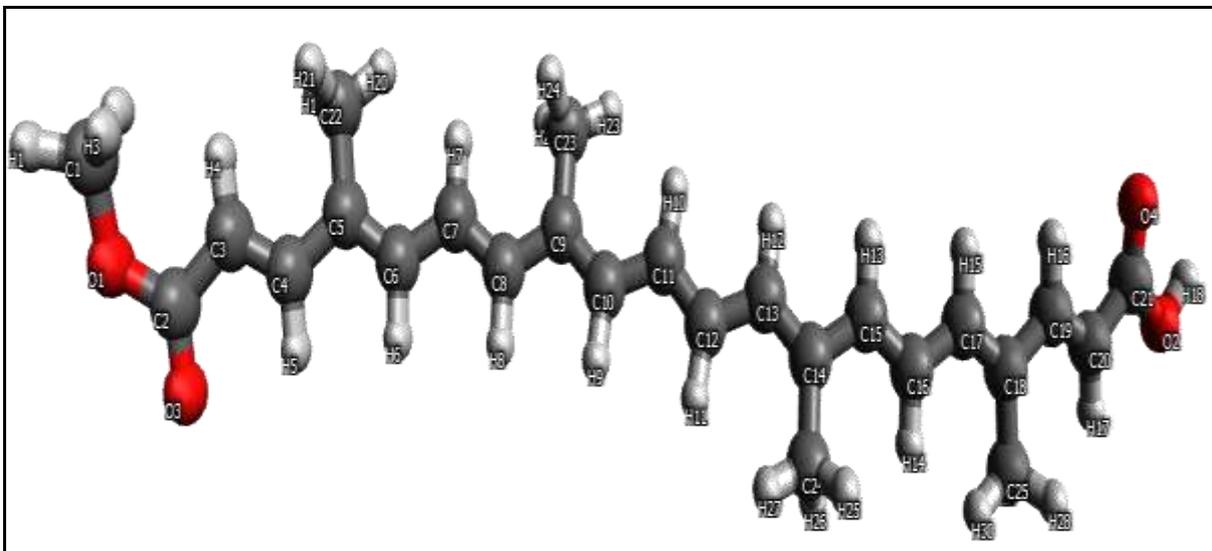


Figura 1. Estrutura otimizada do β -Bixina pelo Avogadro.

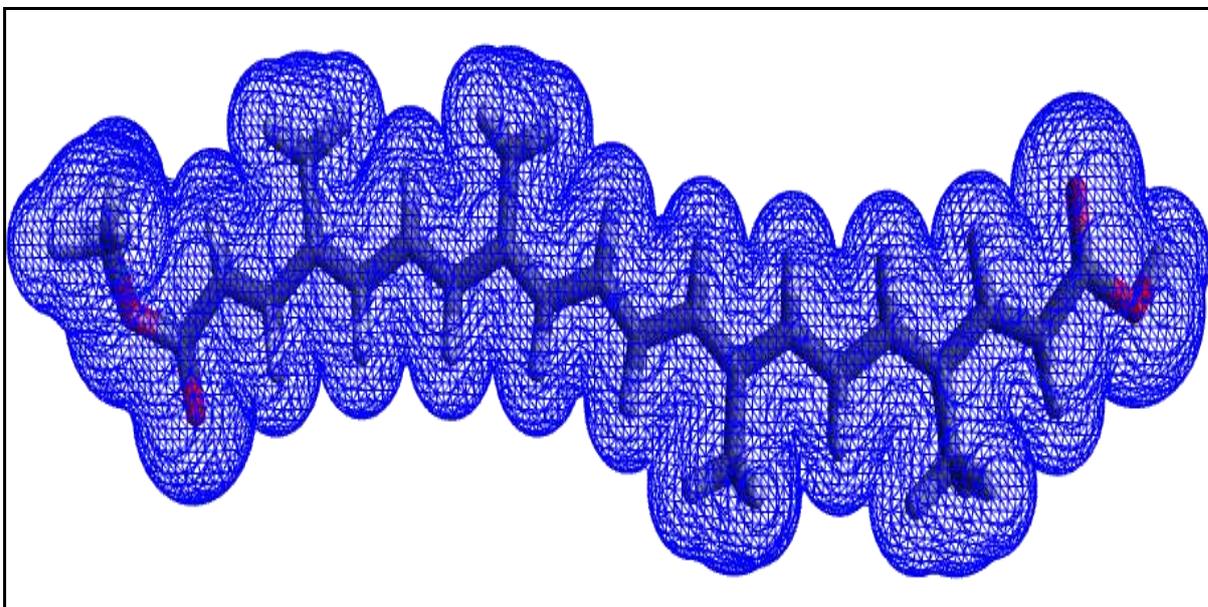


Figura 2. Representação do mapa de Van der Waals do β -Bixina.

Utilizando o *software* UCSFChimera® foi possível visualizar a proteína NS1 do DENV (Figura 3), em que a mesma possui quatro cadeias de aminoácidos, sendo elas, a

cadeia A (representada pela cor azul), B (representada pela cor turquesa), D (representada pela cor verde limão) e E (representada pela cor vermelha).

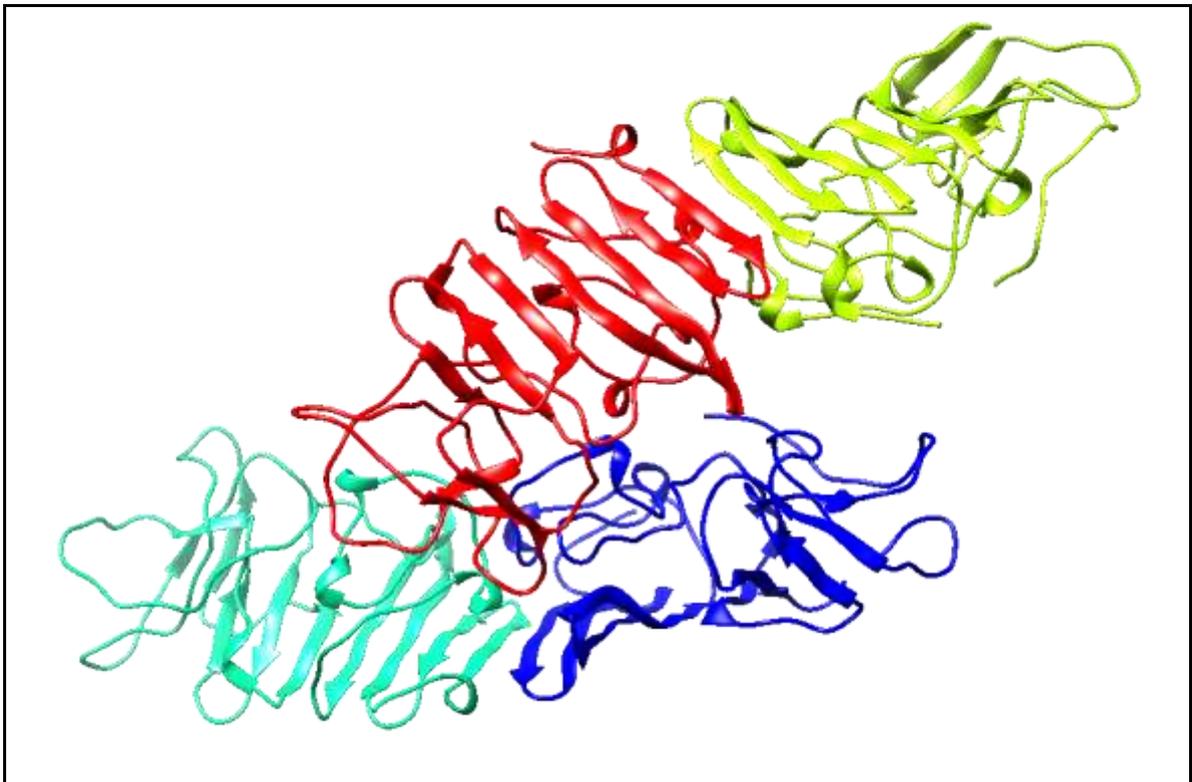


Figura 3. Estrutura da proteína NS1 do DENV.

A ligação de hidrogênio é a mais intensa de todas as forças intermoleculares, constitui uma das forças de estabilização mais importantes na estrutura das proteínas (DE ALENCAR, 2010). Deste modo, na figura 4 é possível observar as menores ligações de Hidrogênio encontradas no complexo ligante-proteína, sendo elas, 2,0 Å no *docking* molecular, 1,9 Å na 1ª repetição do *docking*, 1,8 Å na 2ª repetição de *docking* e 2,2 Å na 3ª repetição de *docking*. Em que três das quatro ligações se encontram na cadeia E (representada pela cor vermelha), destacando assim, a maior afinidade do ligante β -bixina aos resíduos de aminoácidos presentes na cadeia E da proteína NS1 do DENV.

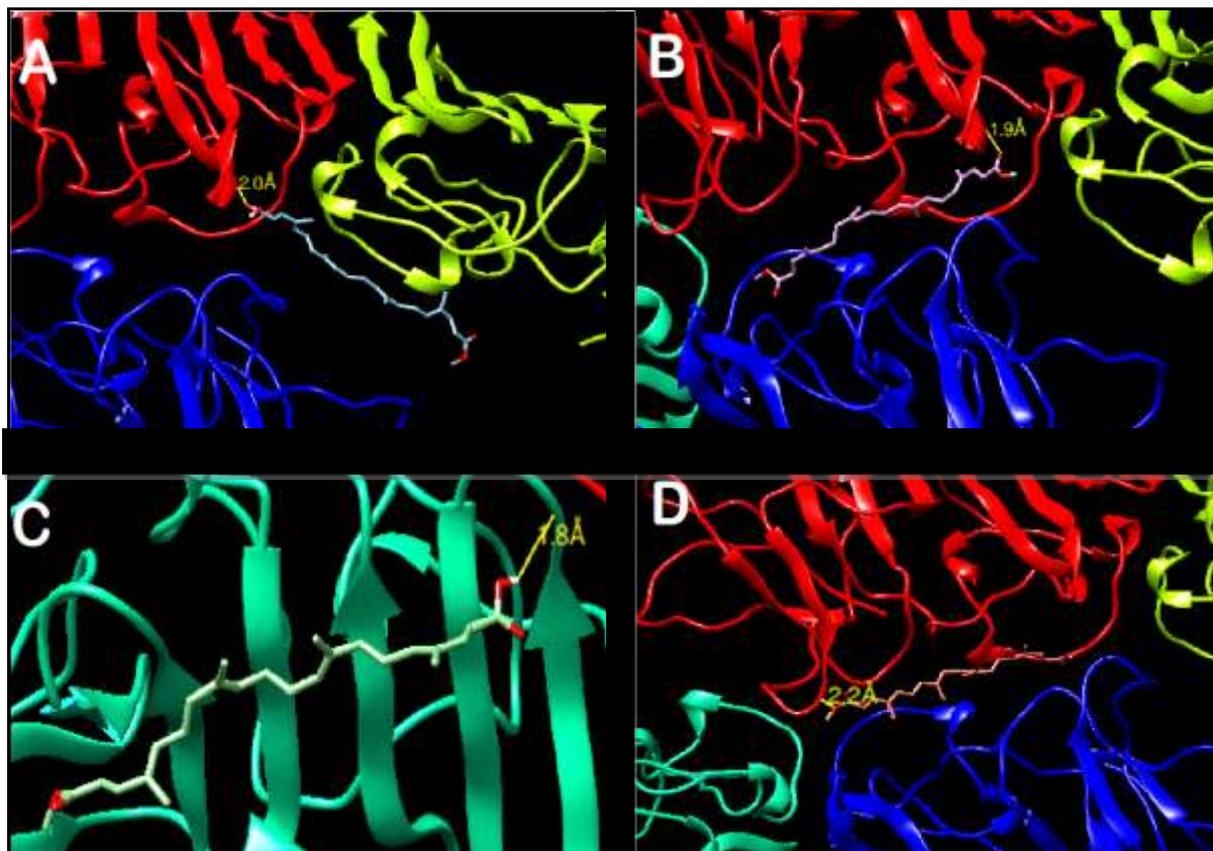


Figura 4. Menores ligações de Hidrogênio. (A) *Docking* molecular β -bixina com 4OIG; (B) 1^a repetição do *docking*; (C) 2^a repetição do *docking*; (D) 3^a repetição do *docking*.

No *docking* molecular proteína-ligante, um bom parâmetro para medir a qualidade da estrutura encontrada pelo *software* é o *RMSD* (Desvio quadrático médio da raiz) entre as estruturas obtidas pelo programa e as estruturas experimentais; em que um valor de *RMSD* menor que 2 Å indica que o modo de ligação do complexo proteína-ligante foi previsto corretamente, e valores de *RMSD* menor que 2.5 Å também são considerados bons resultados (PHILOT, 2010). Logo, dentre os valores de *RMSD l.b.* (Tabela 1) calculados foi possível observar que apenas o valor da segunda repetição não foi favorável, sendo encontrado um valor muito acima de 2,5 Å. Demonstrando assim, que o modo de ligação do β -bixina à proteína do DENV-1 foi previsto corretamente nas demais simulações computacionais.

Tabela 1. Menores valores de *RMSD l.b.* do ligante β -Bixina para o *docking* molecular com a proteína NS1 do DENV.

Simulação computacional	Menores valores de <i>RMSD</i> l.b.
<i>Docking</i> Molecular	1,050 Å
1ª Repetição do <i>docking</i>	1,488 Å
2ª Repetição do <i>docking</i>	19,296 Å
3ª Repetição do <i>docking</i>	1,426 Å

O *docking* molecular é o processo que visa posicionar o ligante em diferentes orientações no sítio ativo do receptor e, usualmente, em diferentes conformações, com o intuito de se obter a melhor interação. Este procedimento permite o estabelecimento de uma classificação entre os compostos de maior e de menor afinidade a um determinado receptor (DE ALENCAR, 2010). Portanto, a figura 5 mostra todas as possíveis posições de *docking* entre o ligante β -Bixina e a proteína NS1 do vírus da dengue, sendo estas com valores de *Score* e *RMSD* diferentes. Apesar das diferenças dos valores, pode-se observar uma aglomeração dessas posições do ligante em uma determinada região, inferindo a possibilidade que a mesma seja o sítio de ligação da proteína do DENV, uma vez que o acoplamento molecular foi mais frequente na referida região.

Após as análises dos resultados obtidos, foi possível perceber que no *docking* molecular a menor ligação de H de 2,0 Å está entre o átomo de O4 do ligante β -bixina e o átomo de H do aminoácido TRP 558 (Tryptofano) cadeia E; na 1ª repetição do *docking* pôde-se observar a mesma ligação, sendo esta a 1,9 Å; na 2ª repetição do *docking* a menor ligação de H de 1,8 Å está entre o átomo de H18 do ligante β -bixina e o átomo de O do aminoácido ASP 195 (Ácido Aspártico ou Aspartato) cadeia B; já na 3ª repetição a menor ligação de H de 2,2 Å se encontra entre o átomo de O1 do ligante ao átomo de H do aminoácido GLU 637 (Ácido Glutâmico ou Glutamato) cadeia E. Notou-se também que as menores ligações de hidrogênio do *docking* molecular, 1ª e 3ª repetição foram encontradas na cadeia E da proteína NS1 do DENV. Apesar disto, tanto o *docking* quanto as suas repetições produziram 12 torções ativas.



Figura 5: Possíveis posições de *docking* entre o ligante β -Bixina e a proteína NS1 do vírus da dengue.

CONCLUSÕES

A partir de simulações computacionais de modelagem molecular a nível quântico semi-empírico, foi possível identificar o possível sítio de ligação entre a β -Bixina e a proteína NS1 do DENV, identificando as menores ligações de hidrogênio encontradas com valores de 1,8 Å e 1,9 Å, 2,0 Å e 2,2 Å, que evidenciam a estabilidade do complexo ligante-proteína, que reflete o potencial desse ligante para o desenvolvimento de um novo fármaco, larvicida ou repelente contra a dengue, assim como também contra o seu principal vetor, o mosquito *Aedes aegypti*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOSA FILHO, J.M. Bixa orellana: retrospectiva de usos populares, atividades biológicas, fitoquímicas e emprego na fitocosmética no continente americano. In: Simpósio Brasileiro do Urucum. João Pessoa, PB. Anais... João Pessoa: Emepa, 2006.

BARTENSCLAGER, R.; MILLER, S. Molecular aspects of Dengue virus replication. *Future Microbiology*, London, v.3, n.2, 2008. Disponível em: <http://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/17460913.3.2.155?journalCode=fmb>. Acesso: 06 de setembro de 2017.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO. Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde – Brasil. V.48, N°27–2017. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/agosto/29/2017-026-Monitoramento-dos-casos-de-dengue-febre-de-chikungunya-e-febre-pelo-virus-Zika-ate-a-Semana-Epidemiologica-33-de-2017.pdf>. Acesso: 05 de setembro de 2017.

CHAMBERS, T.J.; HAHN, C.S.; GALLER, R.; RICE, C.M. Flavivirus genome organization, expression and replication. *Annu Rev Microbiol.*;44:649-88,1990.

CORREA, J.C.R.; SALGADO, H.R.N. Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. *Rev.bras. plantas med.* 13: 500–506, 2011.

DE ALENCAR, S.A. Utilização de ferramentas computacionais para o estudo do impacto funcional e estrutural de nsSNPs em genes codificadores de proteínas (Doctoral dissertation, Universidade Federal de Minas Gerais.,2010.

EDELING, M.A.; DIAMOND, M.S.; FREMONT, D.H. Structural basis of Flavivirus NS1 assembly and antibody recognition..2014.

FABRIS, C. et al. Efficacy of sunlight-activatable porphyrin formulates on larvae of *Anopheles gambiae* M and S molecular forms and *An. arabiensis*: A potential novel biolarvicide for integrated malaria vector control. *Acta Tropica*, v. 123, n. 3, p. 239- 243, Sep 2012.

GUARDIA, C.D.L.; LLEONART, R. Progress in the identification of dengue virus entry/fusion inhibitors. *BioMed Research International*, v. 2014, 2014.

GUBLER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin. Microbiol.* 1998.

HANWELL, M.D.; CURTIS, D.E.; LONIE, D.C.; VANDERMEERSCH, T.; ZUREK, E.; HUTCHISON, G.R. "Avogadro: uma plataforma de análise, visualização e análise química semântica avançada" *Journal of Cheminformatics* 2012.

HENCHAL, E.A.; PUTNAK, J.R. The dengue viruses. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 3, n. 4, p. 376-396, 1990.

KARUNARATNE, V. et al. Phototoxic effect of some porphyrin derivatives against the larvae of *Aedes aegypti*, a major vector of dengue fever. *Current Science*, v. 89, n. 1, p. 170-173, 2005.

LINDENBACH, B.D.; THIEL, H.J.; RICE, C.M. Flaviviridae: the viruses and their replication. In Knipe DM & Howley P.H. *Fields Virology*, Filadélfia, 4 ed., p. 1101–1152, 2007.

LORENZI, H.C.; MATOS, F.J.A. *Plantas medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas*. Nova,Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

PETTERSEN, E.F.; GODDARD, T.D.; HUANG, C.C.; COUCH, G.S.; GREENBLATT, D.M.; MENG, E.C.; FERRINHO, T.E. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* ;25(13):1605-12. 2004.

PHILOT, E.A. Desenvolvimento de um método/software (PL-DOCK) para o Docking Proteína-Ligante usando Algoritmos Genéticos e Biblioteca de Rotâmeros. *Sistemas Alvos: protease do HIV-1 e Diidrofolato Redutase*. [Dissertação] Universidade Federal do ABC; Santo André – SP, 2010.

PIRES NETO, R.J.; LIMA, D.M.; PAULA, S.O.; LIMA, C.M.; ROCCO, I.M.; FONSECA, B.A.L. Molecular epidemiology of type 1 and 2 dengue viroses in Brazil from 1988 to 2001. *Brazilian J Med Biol Res*. 2005.

ROTHMAN, A.L. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. The Journal of Clinical Investigation, Ann Arbor, v. 113, n. 7, p. 946-951, 2004.

SCHUITMAKER, J. et al. Photodynamic therapy: A promising new modality for the treatment of cancer. Journal of Photochemistry and Photobiology B-, v. 34, n. 1, p. 3- 12, Jun. 1996.

SILVA, J.; LIMA, A.R.; BEZERRA, L.L.; MARINHO, M.M.; MARINHO, E.S. (2017). Bixinoids potentially active against dengue virus: a molecular docking study International Journal of Scientific Research & Engineering, Volume 8, Issue 4, 2017.

SILVA, J.; LIMA, A. R.; BEZERRA, L. L.; MARINHO, M. M.; MARINHO, E. S.(2017) Molecular coupling study between the potential inhibitor of dengue fever, Annatto and Protein E (DENV-4). International Journal of Scientific Research & Engineering, Volume 8, Issue 7, 2017.

ZAINAH, S.; WAHAB, A.H.; MARIAM, M.; FAUZIAH, M.K.; KHAIRUL, A.H.; ROSLINA, I.; SAIRULAKHMA, A.; KADIMON, S.S.; JAIS, M.S.; CHUA, K.B. Performance of a commercial rapid dengue NS1 antigen immunochromatography test with reference to dengue NS1 antigen capture ELISA. J Virol Methods.. 155:157-160. 2009.