

PEPTÍDEOS PRO-GLN-LEU E GLN-ASP-PHE DERIVADOS DO FEIJÃO ADZUKI APRESENTAM INTERAÇÕES MOLECULARES COM A HMG-COA REDUTASE SIMILARES À SINVASTATINA, *IN* *SILICO*

Victória Cruz de Souza¹
Biane Oliveira Philadelpho²
Johnnie Elton Machado dos Santos³
Mariana Barros de Cerqueira e Silva⁴
Ederlan de Souza Ferreira⁵

INTRODUÇÃO

As doenças crônicas não-transmissíveis (DCNTs) representam a principal causa de morte no mundo. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), as DCNTs foram responsáveis por 68% das mortes ocorridas no mundo, em 2012. Estima-se que haverá um aumento de 38 milhões em 2012 para 52 milhões em 2030 do número de mortes em decorrência desses agravos. As doenças cardiovasculares, cânceres, doenças respiratórias crônicas e diabetes representam os maiores índices, respectivamente (WHO, 2014). Evidentemente, as doenças cardiovasculares (DCVs) representam a principal causa de morte (48%) entre as DCNTs, principalmente nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo que os episódios coronarianos e cerebrovasculares são os mais frequentes e representam aproximadamente 80% desse número (BLOOM *et al.*, 2012).

A hipercolesterolemia (concentração sérica > 200 mg/dL) é considerada a principal causa do desenvolvimento das DCVs. A síntese endógena representa a principal fonte (em torno de 75%) de colesterol do organismo. A partir da acetil-CoA uma série de reações ocorrem até a formação da estrutura isoprênica, e depois do colesterol. Nesse processo, a conversão do substrato 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) a mevalonato pela enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA redutase) é considerada etapa limitante da síntese do colesterol. Portanto, o principal alvo das drogas hipolipemiantes (estatinas), por inibição competitiva ao substrato (BERGMANN *et al.*, 2011).

¹ Graduanda pelo Curso de Farmácia da Universidade Federal da Bahia - UFBA, victoriacruz.29@outlook.com;

² Mestranda do Curso de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Federal da Bahia - UFBA, biane_philadelpho@hotmail.com;

³ Graduando do Curso de Farmácia da Universidade Federal da Bahia - UFBA, johnnie.machado25@gmail.com;

⁴ Doutoranda pelo Curso de Pós-Graduação de Biotecnologia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" IQ/UNESP, marianabarros.cs@gmail.com;

⁵ Professor orientador: Doutor, Faculdade de Farmácia - UFBA, ederlan.ferreira@ufba.br

Estudos têm atribuído uma propriedade hipocolesterolêmica a peptídeos derivados de proteínas encontradas em grãos de leguminosas, tais como sojas, feijões, grão-de-bico e tremoços. Resultados de estudos anteriores demonstraram que a proteína beta-conglicinina (FERREIRA *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2010) e a glicinina (FASSINI *et al.*, 2012; FASSINI *et al.* 2011) da soja administradas por via oral exercem um efeito redutor da concentração sérica de colesterol total e triacilglicerídeos em ratos que foram alimentados com dieta hipercolesterolêmica por 28 dias. Por outro lado, quando em combinação, a proteína associada ao tratamento farmacológico com rosuvastatina e/ou fenofibrato mostrou exercer efeitos distintos sobre as concentrações de colesterol e triacilglicerídeos plasmático e hepático, aparentemente uma interferência da proteína na ação da droga ou vice-versa foi notada (FASSINI *et al.*, 2012; FERREIRA *et al.*, 2012). Posteriormente, outros estudos sugeriram que proteínas e/ou hidrolisados proteicos de outras espécies também apresentam efeitos sobre os níveis séricos de colesterol total e frações (AMARAL *et al.*, 2014; FERREIRA *et al.*, 2015; AMARAL *et al.*, 2017).

Contudo, ficou evidente que o elemento responsável pelos efeitos observados é de natureza proteica. Portanto, recentemente os estudos têm buscado identificar os peptídeos derivados dessas proteínas com propriedade hipocolesterolêmica, sobretudo, àqueles que exercem a capacidade de inibir a enzima HMG-CoA redutase (SILVA *et al.*, 2018; Marques *et al.*, 2015). Assim, este estudo realizou um “*screening*” a partir de peptídeos derivados da proteína beta-vignina do feijão adzuki, com capacidade de interagir com a região catalítica da enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), através de análises *in silico*.

METODOLOGIA

Os ensaios de hidrólise *in silico* foram realizados através da ação sequencial das enzimas pepsina (EC 3.4.23.1), tripsina (EC 3.4.21.4) e quimiotripsina (EC 3.4.21.1), sobre a sequência de aminoácidos da proteína β -vignina do feijão adzuki, obtida a partir do GenBank (NCBI/GenBank Blast: AB292246.1; UniProtKB: A4PI98_PHAAN) através do web software BIOPEP® (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>).

Os peptídeos gerados a partir da hidrólise foram submetidos à análise para predição da probabilidade de bioatividade, através do web software PeptideRanker Score®, (http://bioware.ucd.ie/~compass/biowareweb/Server_pages/peptideranker.php). Os peptídeos com potencial bioativo foram definidos como àqueles que apresentaram score \geq a 0,500

(variabilidade de 0,000 a 1,000). Em seguida, os peptídeos selecionados foram preditos quanto a interação com o complexo catalítico da enzima HMG-CoA redutase, a partir dos modelos de interação dos inibidores comerciais, sinvastatina (PDB ID: 1HW9), mevastatina (PDB ID: 1HW8), rosuvastatina (PDB ID: 1HWL), atorvastatina (PDB ID: 1HWK), fluvastatina (PDB ID: 1HWI), cerivastatina (PDB ID: 1HWJ) e lovastatina (PDB ID: 1T02) através do web software PepSite 2 (<http://pepsite2.russelllab.org>), sendo a significância estatística de $p < 0,2500$, como previamente validado (TRABUCO *et al.*, 2012).

Os peptídeos com elevada predição de interação ($p \leq 0,1000$) tiveram seu modo de interação predito por meio da análise de acoplamento molecular, utilizando o protocolo de encaixe de ajuste induzido. A região de interação foi definida a partir das coordenadas cristalográficas ($X = 3,93$, $Y = -9,20$, $Z = -11,33$) da sinvastatina (PDB ID: 1HW9). As influências das dimensões da caixa foram analisadas a partir do “redocking” da sinvastatina (10 Å a 14 Å, caixa cúbica) utilizando o programa AutoDock-VINA[®] (versão 4.2.6), sendo que a dimensão que resultou no menor desvio entre a sinvastatina cristalográfica e a sinvastatina reacoplada ($RMSD \leq 2,0$ Å), foi utilizada para o acoplamento dos peptídeos previamente selecionados (TROTT; OLSON, 2010). As posições com menor RMSD e maior energia de ligação foram analisadas visualmente através do software PyMOL 0.99r.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Peptídeos derivados de alimentos têm demonstrado exercer efeitos promissores para o desenvolvimento de novos fármacos. A integração de ferramentas que simulam ou que predizem possíveis eventos químicos e biológicos (a serem avaliados posteriormente em caso positivo) como os de bioinformática tem contribuído para acelerar o processo de identificação de moléculas bioativas. O uso de modelos *in silico* têm evoluído com os avanços notáveis nas áreas de correlação, predição, simplificação, automatização, entre outros aspectos relevantes (CIEMNY *et al.* 2018; GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010).

A partir da sequência primária da β -vignina do feijão adzuki foram obtidos 99 estruturas primárias, os quais tiveram sua predição de bioatividade analisada. Os peptídeos que apresentaram score $\geq 0,500$ foram selecionados para avaliação da predição de interação com o complexo da porção catalítica da HMG-CoA redutase humana, a partir dos modelos de interação de inibidores comerciais: sinvastatina (1HW9), mevastatina (1HW8), rosuvastatina (1HWL), atorvastatina (1HWK), fluvastatina (1HWI), cerivastatina (1HWJ) e lovastatina

(1T02. Os peptídeos selecionados foram: PF, GF, AF, GR, QDF, ADADF, QM, PIY, DSDF, EW, DVF, PH, SSQDEPF, PQL, GH e GSL.

A partir dos resultados foi observado uma ótima probabilidade de bioatividade dos resíduos PF (Pro-Phe) e GF (Gly-Phe), apresentando score de 0,99 (\geq a 0,500). Dentre eles, apenas o resíduo PF mostrou uma grande probabilidade de interação com o sítio catalítico da HMG-CoA redutase *in silico* (0,0170), considerando o modelo de interação do inibidor comercial, sinvastatina (PDB ID: 1HW9). Os resíduos QDF (Gln-Asp-Phe), PH (Pro-His) e PQL (Pro-Gln-Leu) também apresentaram predição de interação com o sítio, apesar de menor probabilidade bioatividade em relação ao resíduo PF. Por isso, esses quatro peptídeos (PF, QDF, PH, PQL) foram selecionados para análise de acoplamento molecular.

Para que o programa realizasse a predição de interação entre HMG-CoA redutase e seus ligantes, os ligantes da estrutura 1HW9 foram removidos e o encaixe da sinvastatina foi predito através do *redocking* pelo software Autodock-Vina[®]. A ligação predita para a sinvastatina utilizando as dimensões para a caixa de busca de 12 Å x 12 Å x 12 Å permitiu encontrar um baixo desvio em relação a estrutura cristalográfica, RMSD = 1,76 Å ($<$ 2,0 Å). Esses resultados garantem que tanto o anel decalina, como a carboxila e as hidroxilas realizem as interações moleculares esperadas.

As três conformações que apresentaram maiores ranks de cada peptídeo acoplado tiveram análise visual realizada. Os peptídeos PF e PH apresentaram interações desfavoráveis, como por exemplo, anel benzênico direcionado para região de interações polares. Os peptídeos QDF (conformação 3), já retratado na literatura como promissor (SILVA *et al.*, 2018), e o peptídeo PQL (conformação 1) apresentaram um perfil de interação similar ao realizado pela sinvastatina. Desta forma foi realizada a análise visual do acoplamento para estes peptídeos.

A análise visual do peptídeo QDF demonstrou que o anel aromático da fenilalanina (F) ocupa a região do sítio correspondente ao anel decalina da sinvastatina, apresentando o mesmo perfil hidrofóbico. A carboxila da cadeia lateral do aspartato (D) demonstrou realizar interações polares semelhantes às encontradas no grupo carboxila da sinvastatina. Uma diferença encontrada em relação as interações da sinvastatina quando comparada ao peptídeo QDF é que a asparagina (Q) apresenta uma distância mais favorável (2.9 Å) para realizar ligação de H (2.7 – 3.2 Å) com o resíduo Ser684, devido à presença de um grupo apolar da sinvastatina nessa região do sítio ativo, tornando-a incapaz de realizar esse tipo de interação.

Ao analisar o acoplamento molecular do peptídeo PQL foi observado que o anel pirrolidina da prolina (P) está localizado na região ocupada pelo anel decalina da sinvastatina.

O grupo amida da asparagina (Q) do PQL demonstrou realizar interações polares, semelhantes às encontradas no grupo carboxila e hidroxilas da sinvastatina. Além disso, a carboxila da leucina (L), assim como o QDF, apresenta uma distância (3.0 Å) capaz de realizar ligação de H com o resíduo Ser684, diferentemente da sinvastatina.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados encontrados foi possível indicar quatro sequências de peptídeos (QDF, PQL, PH e PF) derivados da proteína beta-vignina do feijão adzuki com predição de interação na região catalítica da enzima HMG-CoA redutase. Contudo, as estruturas QDF e PQL demonstram perfil de interação similar à sinvastatina. Dessa forma, sugere-se que esses peptídeos poderiam exercer uma ação hipocolesterolêmica, devido às possíveis modificações na dinâmica-função da enzima que levariam a redução e/ou inibição da atividade. Estudos subsequentes com os peptídeos PQL e QDF sintetizados estão sendo realizados (*in vitro*) a fim de confirmarmos a capacidade de inibição da enzima HMG-CoA redutase.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, A. L.; FERREIRA, E. S.; SILVA, M. A.; NEVES, V. A.; DEMONTE, A. The Vicilin protein (*Vigna radiata* L.) of mung bean as a functional food. **Nutr Food Sci.**, v. 47, p. 907-916, 2017.
- AMARAL, A. L.; FERREIRA, E. S.; SILVA, M. A.; NEVES, V. A.; DEMONTE, A. Legumin from chickpea: hypolipidemic effect in the liver of hypercholesterolemic rats. **Nutr Food Sci.**, v. 44, p. 378-388, 2014.
- BLOOM, D. E. *et al.* **The global economic burden of noncommunicable diseases**. Geneva: World Economic Forum. 2011.
- CIEMNY, M. *et al.* Protein-peptide docking: opportunities and challenges. **Drug discovery today**, v. 23, p. 1530-1537, 2018.
- FASSINI, P. G.; FERREIRA, E. S.; SILVA, M. A.; NEVES, V. A.; DEMONTE, A. Soybean glycinin (11S) increases HDL-cholesterol in hypercholesterolemic rats. **Nutr Food Sci.**, v. 42(2), p. 102-110, 2012.
- FASSINI, P. G.; NODA, R. W.; FERREIRA, E. S.; SILVA, M. A.; NEVES, V. A.; DEMONTE, A. Soybean glycinin improves HDL-C and suppresses the effects of rosuvastatin on hypercholesterolemic rats. **Lipids Health Dis.**, v. 10, p. 165, 2011.
- FERREIRA, E. S. *et al.* Hypocholesterolaemic effect of rat-administered oral doses of the isolated 7S globulins from cowpeas and adzuki beans. **J Nutr Sci.**, v. 4, p. doi:10.1017/jns, 2015.
- FERREIRA, E. S. *et al.* Hypocholesterolaemic effect of rat-administered oral doses of the isolated 7S globulins from cowpeas and adzuki beans. **J Nutr Sci.**, v. 4, p. 1-9, 2015.

- FERREIRA, E. S. *et al.* Hypocholesterolemic Effect of Rat-administered Oral Doses of the Isolated 7S Globulins from Cowpea and Adzuki Beans. **British J Nutr.**, v. 4, p. 1-9, 2014.
- FERREIRA, E. S. *et al.* New molecular features of cowpea bean (*Vigna unguiculata*, l. Walp) β -vignin. **Biosc Biot Bioch.**, v. 82, p. 10.1080/0916845, 2018.
- FERREIRA, E. S.; SILVA, M. A.; DEMONTE, A.; NEVES, V. A. conglycinin combined with fenofibrate or rosuvastatin have exerted distinct hypocholesterolemic effects in rats. **Lipids Health Dis.**, v. 11, p. 11, 2012.
- FERREIRA, E. S.; SILVA, M. A.; DEMONTE, A.; NEVES, V. A. conglycinin (7S) and glycinin (11S) exert a hypocholesterolemic effect comparable to that of fenofibrate in rats fed a high-cholesterol diet. **J Func Foods.**, v. 2, p. 275-283, 2011.
- FERREIRA, E.; SILVA, M. A.; DEMONTE, A.; NEVES, V. A. Soy conglycinin (7S globulin) reduces plasma and liver cholesterol in rats fed hypercholesterolemic diet. **J Med Food.**, v. 14, p. 94-100, 2010.
- GOLDBERG, A. P. *et al.* Soybean protein independently lowers plasma cholesterol levels in primary hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**, v. 43, p.355-368, 1982.
- GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, v. 24, p.81-98, 2010.
- HAN, K. H. *et al.* Adzuki resistant starch lowered serum cholesterol and hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA mRNA levels and increased hepatic LDL-receptor and cholesterol 7 α -hydroxylase mRNA levels in rats fed a cholesterol diet. **British J Nutr.**, v. 94, p. 902-908, 2005.
- ITOH, T.; FURUICHI, Y. Lowering serum cholesterol level by feeding a 40% ethanol-eluted fraction from HP-20 resin treated with hot water extract of adzuki beans (*Vigna angularis*) to rats fed a high-fat cholesterol diet. **Nutr.**, v. 25, p. 318-321, 2009.
- KANG, Y. J. *et al.* Draft genome sequence of adzuki bean, *Vigna angularis*. **Scientific reports**, v. 5, p. 8069, 2015.
- MAKI, K. C. *et al.* Effects of soy protein on lipoprotein lipids and fecal bile acid excretion in men and women with moderate hypercholesterolemia. **J clin lipid.**, v. 4, p. 531-542, 2010.
- MARQUES, M. R. *et al.* Proteolytic hydrolysis of cowpea proteins is able to release peptides with hypocholesterolemic activity. **Food Res Intern.**, v. 77, p. 43-48, 2015.
- NEVES, V. A.; SILVA, M. A.; LOURENÇO, E. J. Caracterização e hidrólise in vitro da globulina principal de grão-de-bico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 24, p. 139-145, 2004.
- SILVA, M. B. C. *et al.* In vitro and in silico studies of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase inhibitory activity of the cowpea Gln-Asp-Phe peptide. **Food Chem.**, v. 259, p. 270-277, 2018.
- SILVA, M. B. C. *et al.* In vitro and in silico studies of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase inhibitory activity of the cowpea Gln-Asp-Phe peptide. **Food Chem.**. v. 259, p. 270-277, 2018.
- TJAHJADI, C.; LIN, S.; BREENE, W. M. Isolation and characterization of adzuki bean (*Vigna angularis*) proteins. **J Food Sci.**, v. 53, p. 1438-1443, 1988.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO).** Global status report on noncommunicable diseases 2014. WHO Press, 2014. 302 p.