

2.08.01 - Bioquímica / Química de Macromoléculas

## ESTUDO *IN SILICO* DE UMA FOSFOLIPASE<sub>2</sub> DA SERPENTE DO GÊNERO *Bothrops Asper* COM POTENCIAL ANTIBACTERIANO

Odaias Pereira de Almeida Filho<sup>1\*</sup>, Ludovico Migliolo<sup>1,2</sup>

1. Graduando Biomedicina Universidade Católica Dom Bosco (UCDB)

2. Pesquisador do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia- UCDB/ Orientador

### Resumo

A saúde mundial enfrenta um grande problema causados por infecções geradas por bactérias multirresistentes, o desenho racional é uma alternativa viável para estudar maneiras para combater a problemática. O objetivo principal do trabalho é desenhar racionalmente alterando parâmetros físico-químicos peptídeos antimicrobianos análogos a toxinas da serpente *Bothrops*, visando selecionar candidatos para síntese e testes *in vitro* no futuro. Para o trabalho primeiramente as sequências foram procuradas no Antimicrobial Peptide Database, após isso foi feito um alinhamento múltiplo usando ClustalW e foi realizada a caracterização físico-química avaliando hidrofobicidade, hidrofiliabilidade, carga e *gravy*. O diagrama de hélice, estrutura tridimensional e a validação foram avaliadas pelos programas Helical Wheels, I-TASSER e Procheck14 e Prosa-web respectivamente. Diante dos resultados obtidos foi possível identificar padrões físico-químicos com potencial antibacteriano para os peptídeos.

**Palavras-chave:** Bioinformática; Desenho racional; Microbiologia

**Apoio financeiro:** CNPQ; UCDB

### Introdução

A descoberta de substâncias bacteriostáticas e bactericidas foram essenciais para a manutenção da vida humana, desde que a sociedade começou a utilizar esses compostos o número de óbitos devido a infecções bacterianas diminuiu (Oliveira et al., 2017). Com o advento dessas moléculas é possível realizar cirurgias, transplante de órgãos e tecidos, fazer a manutenção da qualidade de vida de pacientes imunodeprimidos (pacientes HIV positivos, vítimas de câncer), melhorar setores da indústria alimentícia como o setor de criação de aves e bovinos e suínos (Cars et al., 2011; Lucena et al., 2013; Loureiro et al., 2016).

Entretanto a população realiza o uso indiscriminado e inadequado de substâncias antibióticas e isso faz com que se desenvolva bactérias super-resistentes, organismos que são capazes de resistir o tratamento com antibióticos de última geração que somente são utilizados em ambientes hospitalares em último caso (Peter Vikesland et al., 2019). Instituições de todo o mundo alertam que caso nada seja feito o número de mortes por esses organismos irão crescer demasiadamente (Mei-TingGuo & CenKong, 2019).

Uma das respostas para o combate dessa problemática pode ser encontrada na bioinformática, pois com ela é possível construir moléculas que possam atuar como potenciais candidatos a antibióticos. Alterando parâmetros como hidrofobicidade e carga é possível obter uma molécula proteica que seja capaz de ter efeito antibiótico (Migliolo et al., 2016). O trabalho pretende por meio dessas ferramentas analisar *in silico* o desenvolvimento de moléculas análogas a fosfolipase<sub>2</sub> presentes na toxina da serpente pertencente ao gênero *Bothrops*, a molécula possui propriedades citotóxica e antibacteriana. O trabalho visa assim selecionar candidatos que possam combater essas enfermidades que acometem a saúde global.

### Metodologia

A pesquisa foi realizada na Universidade Católica Dom Bosco (UCDB) nos laboratórios de bioquímica e biologia molecular e no laboratório de informática pertencentes ao programa de pós graduação em Biotecnologia. Participaram da pesquisa o acadêmico de biomedicina Odaias Pereira e o Pesquisador Dr. Ludovico Migliolo. Primeiramente foi feita uma pesquisa de sequências primárias de proteínas no banco de dados Antimicrobial Peptide Database (APD), após o processo as sequências foram submetidas ao alinhamento múltiplo no software Clustal Omega. As regiões conservadas foram submetidas ao software de predição de padrões por hidrofobicidade Antimicrobial Pattern Prediction (aplica <http://rzlab.ucr.edu/scripts/wheel/wheel.cgi>) em processo de proteção pelo INPI). Uma vez com as sequências alvo de estudo foi feita a caracterização físico-química pelo APD sendo os parâmetros carga, hidrofobicidade, hidrofiliabilidade e *gravy*. Os conhecimentos acerca dos aminoácidos e como esses podem interagir na cadeia peptídica, alguns resíduos de aminoácidos foram excluídos ou trocados. Uma vez realizada o desenho racional das moléculas essas foram avaliadas pelo programa Helical Wheels (<http://rzlab.ucr.edu/scripts/wheel/wheel.cgi>) gerando o diagrama de hélice. A estrutura tridimensional obtida foi visualizada pelos programas I-Tasser (site) e Pymol, respectivamente. A estrutura resultante foi em  $\alpha$ -hélice. Obtidas as estruturas tridimensionais os modelos tridimensionais tiveram suas validações feitas pela plataforma Procheck 14 por meio do Gráfico de Ramachandran. Em adição foi avaliado a qualidade geral do modelo comparando com dados obtidos em banco de dados de proteínas resolvidas por metodologias *in vitro*, para isso foi utilizado o valor de z-score obtido pelo gráfico prosa web (site) que calcula o valor de z-score indicando um valor de normalidade da cadeia peptídica.

## Resultados e Discussão

Após a pesquisa no Antimicrobial Peptide Database (APD), foram encontradas três sequências análogas a fosfolipase<sub>2</sub> (AP02667; AP02668; AP02669) ao ser submetidas ao alinhamento foram encontradas regiões com forte similaridade e o padrão “HHHKHHK” foi encontrado pelo programa Antimicrobial Pattern Prediction, a letra “H” representa um aminoácido hidrofóbico e a letra “K” é a representação de um aminoácido hidrofílico.

Após triagens dos padrões foram obtidas 4 sequências todas apresentando 15 resíduos de aminoácidos denominadas: >cro\_cr; >cro\_01; >cro\_02; >cro\_03. Todas foram submetidas a caracterização físico-química pelo software APD (Tabela 1), avaliando os valores de hidrofobicidade, carga e gravity (grau de apatia).

Tabela 1. Predição de características físico químicas dos peptídeos gerado pelo software APD (Antimicrobial peptide database).

Análise computacional	>Cro_cr	>Cro_01	>Cro_02	>Cro_03
Sequência	SLFELGKMILQETGK	SLFKLGKMILQKTGK	SLFELGKMILQKTGK	SLFKLGKMILQETGK
Resíduos	15	15	15	15
Carga	0	+4	+2	+2
Hidrofobicidade	40%	40%	40%	40%
Gravy	-1.77	-0.053	-0.026	-0.026
Massa teórica	1694.021	1692.129	1693.075	1694.021





Não é aconselhável o peptídeo ter uma carga muito alta ou baixa pois pode influenciar e deixar a molécula hemolítica e citotóxica (Dathe et al., 2001), a hidrofobicidade é de 40% não tornando as amostras citotóxicas e a carga varia de 0 a +4, indicando parâmetros dentro da média encontrada na literatura.

O potencial gravity é o valor de apatia a soma da hidrofobicidade de cada aminoácido dividido pela hidrofobicidade total da amostra o valor aconselhável é mais próximo a 0 pois caracteriza uma maior confiabilidade (Chellasamy; Devarajan, 2019), a sequência cro\_cr obteve o maior valor de gravity, enquanto das três outras sequências apresentaram valores mais próximos a 0.

Foi utilizado o helical wheels para visualização espacial dos aminoácidos, foram gerados 4 diagramas de hélice uma conformação  $\alpha$ -helicoidal conformação que melhora a interação com membranas e conseqüentemente a atividade antimicrobiana (Migliolo et al., 2016).

Para visualização da estrutura tridimensional dos peptídeos foi utilizado a plataforma I-Tasser(Tabela 2). Todas sequências apresentaram estrutura tridimensional de  $\alpha$ -hélice. O valor de c-score representa a confiabilidade do modelo e varia de -5 a +2 quanto mais próximo ao valor máximo mais confiável o modelo pode ser. Os valores variaram entre -0,02 e -0,06 para as 4 sequências indicando assim uma boa confiabilidade. TM-score avalia a acurácia do modelo medindo a similaridade entre estruturas o valor de 0,5 a 1 indica uma topologia correta e um valor abaixo de <0,17 indica uma similaridade aleatória, o cálculo do RMSD é feita pela distância média de todos os pares de resíduos em duas estruturas, caso a estrutura apresente um erro local o valor desse parâmetro pode aumentar ((Yang; Yan; Roy; Xu; Poisson; Zhang, 2015)). Os modelos apresentaram topologia correta os valores de TM-score variaram entre 0,71±0,12 e não indica um erro local pois o valor do RMSD variou de 0.7±0.7Å.

Tabela 2: Estruturas tridimensionais construídas pelo servidor I-TASSER para o peptídeo controle e os três análogos. Visualização pelo programa PyMol. Adicionar porcentagem de hélice

Modelo 3D	Qualidade do modelo		
	C-Score	TM-Score	RMSD
Cro_cr 	-0,04	0.71±0.12	0.6±0.6Å
Cro_01 	-0,06	0.71±0.12	0.7±0.7Å
Cro_02 	-0,04	0.71±0.12	0.6±0.6Å
Cro_03 	-0,02	0.71±0.12	0.6±0.6Å

\* A extremidade em azul nos cartoons indicam o N-terminal enquanto as extremidades em laranja indicam o C-terminal. Os valores do TM-score e RMSD estão indicados por média e desvio padrão da média.

O gráfico de Ramachandran (Figura 1) concede a validação dos modelos preditos ao realizar uma análise dos ângulos phi e psi, a partir desses valores os dados são distribuídos em um gráfico com quatro quadrantes. O primeiro quadrante representa a estrutura  $\alpha$ -hélice esquerda, o segundo  $\beta$ , o terceiro quadrante  $\alpha$ -hélice direita e o terceiro quadrante as curvas ou laços (*loops*). O gráfico é também separado em regiões permitidas, favorecidas, permitidas e não permitidas podendo elucidar um erro estrutural (Ramachandran; Ramakrishnan; Sasisekharan, 1963). Em todas as sequências 100% dos aminoácidos estão em regiões permitidas ou favorecidas indicando validação dos modelos.

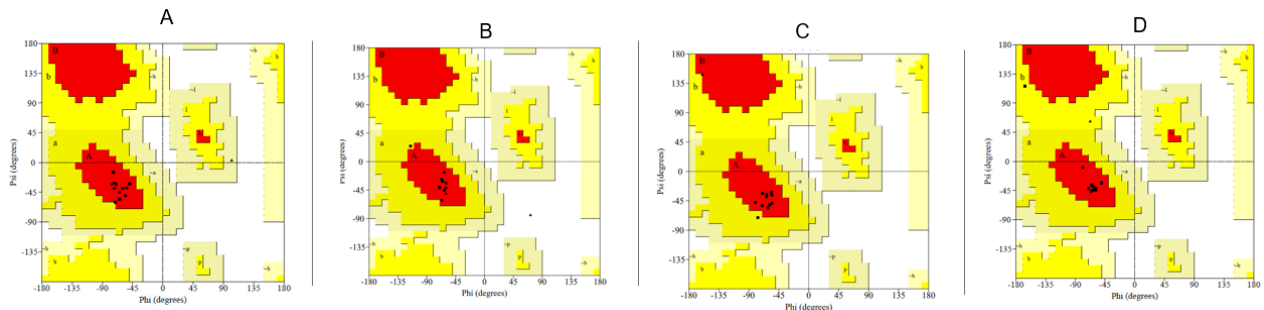


Figura 1. Resultado do gráfico de Ramachandran para os peptídeos cro\_cr(A), cro\_01(B), cro\_02(C), cro\_03(D), desenhados racionalmente. Os quadrados negros representam os aminoácidos comuns e os triângulos negros representam o aminoácido glicina e prolina. Legenda: Vermelho: Região favorecida; Amarelo forte: Amarelo pálido; RG: Região generosamente permitida; Branco: Região isolada.

O gráfico Prosa-web gera um gráfico em que é possível observar o valor de z-score de diversas proteínas derivadas de diferentes fontes como Raio-X e RMN (Figura 2).

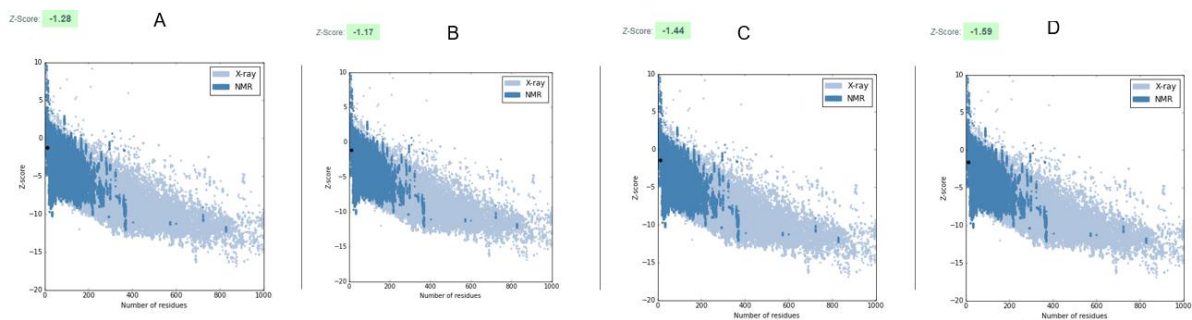


Figura 2. Gráfico exibindo z-score gerado pela plataforma *Prosa-web* dos peptídeos cro\_cr(A), cro\_01(B), cro\_02(C), cro\_03(D), desenhados racionalmente.

Assim é possível obter um valor de normalidade comparadas com moléculas nativas (Wiederstein; Sippl, 2007). Todas as sequências apresentaram valores de z-score dentro do valor permitido assim não indicando erro estrutural.

## Conclusões

Portanto foi possível identificar padrões físico-químicos com potencial antibacteriano para os peptídeos análogos desenhados racionalmente, a metodologia utilizada é suficiente ao desenvolvimento de candidatos do ponto de vista teórico. É necessário para a próxima etapa a síntese e a realização dos testes antibacterianos.

## Referências bibliográficas

A Roy, A Kucukural, Y Zhang. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. **Nature Protocols**, v.5, n.1, p.725-738, 2010.

Berman, H. M. et al. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, london, v.28, n.1, p.235- 242, 2000.

Chellasamy SK; Devarajan S. Identification of Potential Lead Molecules for Zika Envelope Protein from In Silico Perspective. **Avicenna Journal of edical Biotechnology**, United States, n.11, v.1, p.94-103, 2019.

Cars Otto, Liselotte Diaz Hogberg, M. M. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. **Current computer-aided drug design**, v. 7, n. 2, p. 146–157, 2011.

Dathe, M. et al. Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. **FEBS letters**, v. 501, n. 2–3, p. 146–150, 2001.

J, Yang; R Yan, A Roy, D Xu, J Poisson, Y Zhang. The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. **Nature**

**Methods**, v.12, n.1, p.7-8, 2015.

Loureiro, Rui João et al. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, Brasil, n.1, v.34,p.1-1, 2016.

Lucena, Amália de Fátima et al. Complicações infecciosas no transplante renal e suas implicações às intervenções de enfermagem : revisão integrativa. **Revista de enfermagem**, Brasil, v.7, n.1 ,p. 953-959, 2013.

Migliolo et al. Structural and functional evaluation of the palindromic alanine-rich antimicrobial peptide Pa-MAP2. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, United states, v.1858, n.7, p.1488-1498, 2016.

Oliveira, K. S. et al. Purified citritin in combination with vancomycin inhibits VRE in vitro and in vivo. **Microbiology Society Journals**, United States, v.163, n.1, p.1523-1531, 2017.

Ramachandran, G. N.; Ramakrishnan, C.; Sasisekharan, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. **Journal of molecular biology**, v. 7, n. 1, p. 95–99, 1963.

Silveira, Ana Carolina Portella. **Atividade Antimicrobiana da BthTx-I e seu uso como melhorar de desempenho alternativo na avicultura**. f.94. (Doutorado em Genética e Bioquímica)-UFU, Uberlândia,2013.

Schiffer, Marianne; Edmundson, Allen B. Use of Helical Wheels to Represent the Structures of Proteins and to Identify Segments with Helical Potential. **Biophysical Journals**, United States, n.7, v.2, p.121-135, 1967.

Sippl, M.J. **Recognition of Errors in Three-Dimensional Structures of Proteins**. *Proteins* 17, 355-362, 1993

Wang, G., Li, X. and Wang, Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. **Nucleic Acids Research**, 44, D1087-D1093, 2016.

Wang, G., Li, X. and Wang, Z. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. **Nucleic Acids Research**, 37, D933-D937, 2009.

Wang, Z. and Wang, G. APD: the antimicrobial peptide database. **Nucleic Acids Research**, 32, D590-D592, 2004.

Y Zhang. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC Bioinformatics**, v.9, n.1 p.40, 2008.