

## MODELAGEM TRIDIMENSIONAL DA ESTRUTURA DA PROTEÍNA BIFUNCIONAL GLUPHO de *Plasmodium falciparum*: APLICAÇÕES E INSIGHTS PARA ESTUDOS DE FÁRMACOS ANTIMALÁRICOS

Olavo S. Júnior<sup>1</sup>; Ladson F. A. Oliveira<sup>1</sup>; João M. Galúcio<sup>1</sup>; Carlos G. S. Falabelo<sup>1</sup>; Isabela K. C. Santana<sup>1</sup>; Sérgio A. S. Farias<sup>1</sup>; Kauê C. Santana<sup>1</sup>; Adrian M. Pohlit<sup>2</sup>; Khayth M. R. Nagata<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal do Oeste do Pará.

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

**Palavras-Chave:** pentose fosfato; estresse oxidativo, química computacional.

### Introdução

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a malária continua sendo uma das doenças infecciosas mais letais no mundo, com 249 milhões de novos casos e 608 mil mortes registradas em 2022 (OMS, 2024). Essa doença é causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, sendo *Plasmodium falciparum* a espécie responsável pelos casos mais graves. A patogênese da malária está intimamente ligada ao ciclo replicativo do *P. falciparum* nos eritrócitos do hospedeiro, onde o parasita degrada a hemoglobina dos glóbulos vermelhos para obter aminoácidos essenciais ao seu crescimento e multiplicação. Durante esse processo, a hemoglobina é degradada em um vacúolo alimentar ácido, resultando na formação de heme livre tóxico, conhecido como ferri/ferroprotoporfirina IX (FP), além de espécies reativas de oxigênio (ROS). Esses compostos aumentam os níveis de estresse oxidativo no ambiente intraeritrocítico, comprometendo a sobrevivência do parasita dentro das células do hospedeiro (Tilley et al., 2001; Allen et al., 2015).

Para sobreviver ao estresse oxidativo, o *P. falciparum* depende de mecanismos antioxidantes sustentados pela via das pentoses fosfato (PPP), uma rota metabólica crucial para a produção de NADPH e ribose-5-fosfato. O NADPH é vital para a manutenção do equilíbrio redox celular, atuando na regeneração da glutatona reduzida e na estabilização da catalase, dois mecanismos fundamentais de defesa antioxidante nos eritrócitos (Wajcman & Galacteros, 2004). A via das pentoses fosfato inicia-se com a ação da enzima glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), que converte a glicose-6-fosfato em 6-fosfogluconolactona, gerando NADPH, essencial para neutralizar as espécies reativas de oxigênio. A *PfGluPho*, uma enzima bifuncional que combina as atividades de G6PD e 6-fosfogluconolactonase, desempenha um papel central nesse processo, tornando-se um alvo terapêutico promissor para o desenvolvimento de novos fármacos antimaláricos. Estudos recentes indicam que a *PfGluPho* é um alvo atraente para novas abordagens terapêuticas, pois a interrupção dessa via pode comprometer a sobrevivência do parasita em ambientes ricos em estresse oxidativo (Allen et al., 2015). Dado o papel crucial da *PfGluPho* na fisiologia do *P. falciparum*, o objetivo deste estudo é realizar a modelagem por homologia da proteína *PfGluPho* (Uniprot ID: Q8IKU0) utilizando o servidor Swiss-Model. Essa modelagem permitirá entender melhor a estrutura tridimensional da proteína e fornecerá a base para estudos futuros para docagem molecular com o ácido elágico e seus derivados, visando avaliar o potencial desse composto como inibidor da *PfGluPho*.

### Material e Métodos

Figura 1: - Etapas envolvidas na predição tridimensional de proteínas utilizando a metodologia Modelagem por homologia.



Fonte: Autor, 2024

Obtenção das Sequências de Aminoácidos de *PfGluPho*: As sequências de aminoácidos da proteína bifuncional glicose-6-fosfato desidrogenase-6-fosfogluconolactonase (*PfGluPho*) foram obtidas a partir do banco de dados UniProt (ID: Q8IKU0) (The Uniprot Consortium, 2019), uma fonte abrangente de informações sobre proteínas.

Modelagem Estrutural In Silico: A estrutura tridimensional da *PfGluPho* foi predita por modelagem por homologia utilizando o servidor Swiss-Model (Waterhouse et al., 2018). A estrutura homóloga da proteína de *Leishmania donovani* (PDB ID: 7ZHY, cadeia B, resolução 1,99 Å) foi selecionada como molde, e o alinhamento das sequências foi realizado automaticamente pelo servidor.

Refinamento e Minimização: Após a modelagem, o modelo foi refinado usando o ModRefiner (Xu & Zhang, 2011), e a minimização energética foi realizada no software Amber22 (Case et al., 2023) utilizando o método da descida mais íngreme seguido pelo gradiente conjugado, com 1000 ciclos cada. Esses procedimentos melhoraram a qualidade estereoquímica da proteína modelada.

Validação Estrutural: A estrutura proteica modelada foi validada utilizando dois principais métodos: análise estereoquímica no servidor Swiss-model e a avaliação de conservação estrutural pelo UCSF Chimera.

## Resultados e Discussão

A avaliação estereoquímica da estrutura modelada foi realizada através do gráfico de Ramachandran (Figura 2) utilizando o programa MolProbity disponível no servidor Swiss-model. O gráfico ilustra as conformações possíveis dos ângulos phi ( $\phi$ ) e psi ( $\psi$ ) de uma cadeia polipeptídica. Neste gráfico, o ângulo phi representa o eixo X e o ângulo psi o eixo Y, com regiões específicas indicando conformações energeticamente favoráveis, permitidas e desfavoráveis para os resíduos de aminoácidos da proteína.

As regiões favoráveis são aquelas onde os ângulos phi e psi resultam em conformações estereoquímica ideais, geralmente associadas a estruturas bem definidas, como hélices alfa e folhas beta. As regiões aceitáveis incluem conformações que, embora não sejam ideais, são consideradas aceitáveis para a estrutura da proteína. Por outro lado, as regiões fora do ideal

indicam conformações que podem ser energeticamente desfavoráveis e que, em altas proporções, podem comprometer a estabilidade da proteína.

O percentual de resíduos que se encontram em regiões favorecidas é fornecido pelo gráfico e se baseia no seguinte cálculo:

$$\text{Percentual de resíduos em regiões favoráveis} = \frac{(\text{n}^\circ \text{ de res. em regiões fav.})}{(\text{n}^\circ \text{ total de res.})} \times 100$$

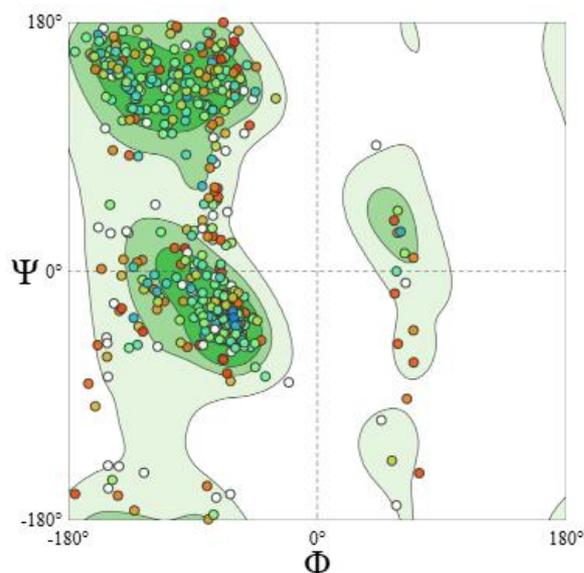
Os dados mostram que:

- 82% dos resíduos estão localizados em regiões favorecidas (indicadas em verde escuro), sugerindo que a maioria destes possui conformações estereoquímica válidas e esperadas.
- Apenas 3% dos resíduos estão em regiões fora do ideal, indicando que uma pequena fração pode apresentar conformações menos favoráveis. Isso é comum em estruturas de proteínas e aceitável, desde que a maioria dos resíduos esteja em conformações permitidas.
- 97% dos resíduos estão em regiões permitidas, reforçando a adequação da conformação global da proteína.

A distribuição geral dos resíduos segue o padrão esperado para proteínas bem estruturadas, com concentrações significativas nas regiões de hélices alfa e folhas beta, sugerindo uma estrutura proteica bem dobrada e estável. A qualidade estereoquímica da estrutura modelada segue um percentual que está alinhado com os padrões de qualidade para modelagem por homologia. Geralmente, considera-se aceitável uma porcentagem acima de 80% em regiões favorecidas (Laskowski et al., 1993).

A análise da energia de interação entre os resíduos é fundamental para entender a estabilidade e a funcionalidade da proteína. Essa análise permite identificar interações favoráveis que contribuem para a conformação estável do modelo tridimensional, além de ajudar a prever como alterações na sequência de aminoácidos podem afetar a estrutura e a atividade da proteína. Embora não tenha sido realizada uma análise detalhada da energia de interação neste estudo, sua inclusão poderia fornecer insights valiosos sobre as interações intermoleculares e as forças que estabilizam a estrutura.

**Figura 2:** Gráfico de Ramachandran



Fonte: Autor, 2024.

A conservação estrutural entre a estrutura modelada (*PfGluPho*) e a estrutura de referência (7zhy.pdb, cadeia A) foi avaliada utilizando o alinhamento estrutural no Chimera. O score de alinhamento de sequência foi de 1019,9, indicando uma boa correspondência entre as sequências das duas proteínas. O RMSD (Root Mean Square Deviation) para os 316 pares de átomos podados foi de 1,078 Å, sugerindo alta similaridade estrutural nas regiões mais conservadas, já o RMSD considerando todos os 461 pares de átomos foi de 5,117 Å, o que indica maior variação nas regiões menos conservadas ou flexíveis da estrutura.

A análise de conservação estrutural revelou uma alta similaridade nas regiões principais da proteína modelada, com um RMSD de 1,078 Å para os átomos conservados, indicando uma boa correspondência estrutural. O RMSD de 5,117 Å para todos os átomos reflete variações em regiões mais flexíveis ou menos conservadas, que podem não impactar significativamente a função da proteína. No geral, a estrutura modelada é adequada para estudos adicionais, com potencial para refinamento em áreas com maior discrepância.

## Conclusões

A modelagem por homologia da proteína *PfGluPho* apresentou resultados satisfatórios, evidenciados pelas análises estereoquímicas e de conservação estrutural. A avaliação estereoquímica realizada pelo MolProbity indicou boa qualidade geral da estrutura, com poucas colisões estéricas e conformações adequadas na maioria dos resíduos. Embora alguns outliers de Ramachandran e rotâmeros tenham sido identificados, esses desvios são aceitáveis em modelos por homologia e não comprometem a integridade global da estrutura.

A análise de conservação estrutural revelou alta similaridade com a estrutura de referência. O aumento do RMSD, ao considerar todas as regiões, aponta variações em áreas mais flexíveis, comuns em regiões periféricas ou em alças.

Esses resultados indicam que o modelo gerado é adequado para estudos adicionais sobre a *PfGluPho*, como simulações de dinâmicas, avaliação de mutantes e docagem molecular com potenciais inibidores. A qualidade estrutural sugere que as regiões essenciais da proteína estão bem representadas, o que é crucial para compreender sua função biológica e para o desenvolvimento de novos fármacos antimaláricos.



Além disso, a realização do Docking e Simulações de dinâmica molecular que serão as próximas etapas, fará análise da energia de interação entre os resíduos, que é fundamental para entender a estabilidade e a funcionalidade da proteína. Essa análise permitirá identificar interações favoráveis que contribuem para a conformação estável do modelo tridimensional, além de prever como as alterações na sequência de aminoácidos podem afetar a estrutura e a atividade da proteína, permitindo uma análise precisa das interações entre ligantes e proteínas, fornecendo informações sobre a energia de ligação e simulação do comportamento de moléculas em tempo real.

## Referências

- ALLEN, S. M. et al. Plasmodium falciparum glucose-6-phosphate dehydrogenase 6-phosphogluconolactonase is a potential drug target. *The FEBS Journal*, v. 282, n. 19, p. 3808-3823, 2015.
- GUEX, N., Peitsch, M. C., & Waterhouse, A. M. Swiss-Model: A protein structure homology-modeling server. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3381-3385, 2009.
- JORTZIK, Esther et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase-6-phosphogluconolactonase: a unique bifunctional enzyme from Plasmodium falciparum. *Biochemical Journal*, v. 436, n. 3, p. 641-650, 2011.
- KIEFER, F., Arnold, K., Künzli, M., & Bordoli, L. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Research*, 37(suppl\_1), D387-D392, 2009.
- LASKOWSKI, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., & Thornton, J. M. PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 26(2), 283-291, 1993.
- NKHOMA, E. T. et al. The global prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a systematic review and meta-analysis. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, v. 42, n. 3, p. 267-278, 2009.
- SOH, P. N. et al. In vitro and in vivo properties of ellagic acid in malaria treatment. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 53, n. 3, p. 1100-1106, 2009.
- WAJCMAN, Henri; GALACTÉROS, Frédéric. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency: a protection against malaria and a risk for hemolytic accidents. *Comptes rendus biologiques*, v. 327, n. 8, p. 711-720, 2004.