



CENTRO UNIVERSITÁRIO LUTERANO DE PALMAS

Recredenciado pela Portaria Ministerial nº 3.607, de 17/10/05, D.O.U. nº 202, de 20/10/2005
ASSOCIAÇÃO EDUCACIONAL LUTERANA DO BRASIL

RAPHAEL LOPES DE SOUZA

**APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE ANCORAGEM MOLECULAR NA OTIMIZAÇÃO DO
FÁRMACO HIPOGLICEMIANTE METFORMINA**

Palmas – TO
2015

RAPHAEL LOPES DE SOUZA

**APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE ANCORAGEM MOLECULAR NA
OTIMIZAÇÃO DO FÁRMACO HIPOGLICEMIANTE METFORMINA**

Monografia apresentada como requisito parcial da disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) em Ciências Farmacêuticas do curso de Farmácia, coordenado pela Prof.^a MSc. Grace Priscila Pelissari Setti, no Centro Universitário Luterano de Palmas (CEULP/ULBRA).

Orientadora: Prof.^a MSc. Walkiria Regis de Medeiros.

**Palmas – TO
2015**

RAPHAEL LOPES DE SOUZA

APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE ANCORAGEM MOLECULAR NA OTIMIZAÇÃO DO
FÁRMACO HIPOGLICEMIANTE METFORMINA

Monografia apresentada como requisito parcial da disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) em Ciências Farmacêuticas do curso de Farmácia, coordenado pela Prof.^a MSc. Grace Priscila Pelissari Setti, no Centro Universitário Luterano de Palmas (CEULP/ULBRA).

Aprovado em: ____/____/2015.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof.^a MSc. Walkiria Regis de Medeiros
Centro Universitário Luterano de Palmas

Prof.^a Esp. Emília Jacinto Trindade
Centro Universitário Luterano de Palmas

Prof.^o MSc. Isis Prado Meirelles de Castro
Centro Universitário Luterano de Palmas

PALMAS – TO
2015

À minha mãe Joana Ferreira de Almeida
e à todos que possam se beneficiar
com os conhecimentos gerados
por esse estudo. Dedico.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, por ter me dado forças para prosseguir, superando cada obstáculo.
- A toda minha família, que sempre me fortaleceram com palavras, gestos e provas de amor.
- A minha mãe Joana Ferreira de Almeida, grande guerreira, por não ter medido esforços, fazendo o possível e o impossível por mim.
- A Sara Valério da Silva, minha estimada alma gêmea, por toda paciência e carinho dedicado a mim.
- A minha querida orientadora Walkiria Regis Medeiros, por aceitar o desafio desse projeto e por todos os conhecimentos transmitidos, que me acompanharão pelo resto da vida.
- A Wanessa Miranda e toda sua família por terem me acolhido e cuidado tão bem de mim nesse período.
- Aos meus colegas de trabalho por entenderem minha ausência durante o preparo deste projeto, e por todo apoio prestado, em especial Joeuma Calixto de Barros, Priscylla Karolina Almeida e Halynne Lima Lins Pego.
- Ao meu querido amigo Jamison Nascimento.
- Aos meus amigos, por todo o apoio.
- A toda equipe de TI do complexo de informática do CEULP/ULBRA, em especial ao Gabriel do Couto Seabra Gusmão de Paula.
- A todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, trouxeram contribuições para que esse trabalho se realizasse.

*“Se eu morrer Deus dá um jeito, pois a vida é muito bela.
Não vai faltar no ranchinho pra mulher e os filhinhos,
O franguinho na panela...”*

Lourenço e Lourival

RESUMO

SOUZA, Raphael Lopes. **APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE ANCORAGEM MOLECULAR NA OTIMIZAÇÃO DO FÁRMACO HIPOGLICEMIANTE METFORMINA**. 41p. Trabalho de conclusão de curso – Curso de Farmácia, Centro Universitário Luterano de Palmas, Palmas/TO, 2015.

A metformina, um fármaco pertencente a classe de hipoglicemiantes orais, é um dos medicamentos mais utilizados no mundo para o tratamento da *Diabetes Mellitus*. Por apresentar efeitos adversos tais como náuseas, diarreia, dor abdominal e anorexia, torna-se necessária a otimização de sua estrutura. O presente trabalho teve como objetivo a utilização da técnica de Ancoragem Molecular, para a obtenção de energias livres de ligação entre o ligante natural, a metformina e ligantes propostos com a proteína AMPK, descrita na literatura como o provável sítio de ação. Para a proposição de ligantes, a estrutura do fármaco foi tomada como base, e foram feitas modificações, levando em conta as formações de ligações de hidrogênio, aumento ou diminuição da eletronegatividade e ainda formação de forças de London na posição R1, para verificar se afetariam a força de ligação entre ligante-proteína. Os experimentos realizados com a proteína rígida e os ligantes flexíveis foram ancorados no sítio de ligação da molécula de metformina, utilizando o pacote computacional Autodock 4.2. Com isso a pesquisa pode demonstrar que, para os ligantes propostos, as energias de ligação proteína-ligante obtidas nos experimentos, não trazem contribuições significativas para o melhoramento da estrutura do fármaco.

Palavras-chave: Metformina. Efeitos adversos. Otimização. Docking Molecular.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação das subunidades α , β e γ da enzima AMPK.....	21
Figura 2: Estrutura Adenosina Monofosfato.....	22
Figura 3: Estrutura do fármaco Metformina.....	22
Figura 4: Estrutura cristalográfica da proteína AMPK complexada com o AMP.....	24
Figura 5: Estrutura tridimensional da Metformina, sinalizado o local de permissão de dez graus de liberdade.....	25
Figura 6: Diagrama das etapas envolvidas na realização do presente trabalho	26
Figura 7: Estrutura base para os compostos estudados.....	27
Figura 8: Representação gráfica das melhores energias de ligação obtidas para cada ligante ancorado.....	31
Figura 9: Locais de interação ligante-proteína. A) Sítio ativo da AMPK B) Local de interação entre AMP e AMPK C) Local de interação entre Metformina e AMPK D) Local de interação entre Ligante 1 e AMPK E) Local de interação entre Ligante 2 e AMPK F) Local de interação entre Ligante 3 e AMPK G) Local de interação entre Ligante 4 e AMPK H) Local de interação entre Ligante 5 e AMPK.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Banco de dados de ligantes	27
Tabela 2: Valores de energias de interação entre AMP e AMPK.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPK – Proteína Quinase Ativada por AMP
IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada
AZT – Azidovudina
DNA – Ácido desoxirribonucleico
QSAR – “*Quantitative Structure Actived Relationship*”
AMP – Adenosina Monofosfato
ATP – Adenosina Trifosfato
UKPDS – “*United Kingdom Prospective Diabetes Study*”
PDB – “*Protein Data Bank*”

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVO GERAL	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3 REFERENCIAL TEÓRICO	13
3.1.2 MODELAGEM MOLECULAR NO ESTUDO DE FÁRMACOS	13
3.1.4 TÉCNICAS DE MODELAGEM MOLECULAR EMPREGADAS NA QUÍMICA MEDICINAL	15
3.1.4.1 ANCORAGEM MOLECULAR	17
3.2 <i>DIABETES MELLITUS</i>	19
3.3 HIPOGLICEMIANTES ORAIS	20
4 METODOLOGIA	24
4.1 PREPARO DO ALVO BIOLÓGICO (EDIÇÃO DO ARQUIVO PDB)	28
4.2 PREPARO DOS LIGANTES	29
4.3 AUTOGRID	29
4.4 AUTODOCK	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
6 CONCLUSÕES	34
REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

Há cerca de dois séculos, a humanidade dispunha apenas de medicamentos vindos de fontes naturais. As plantas medicinais eram largamente utilizadas em várias terapias, e também alguns produtos medicamentosos continham substâncias de origem animal ou mineral. Com o avanço das ciências, muitos aspectos sofreram mudanças, não só em relação à tecnologia em si, mas também aos fatores ligados à saúde (EDLER, 2006).

O interesse por substâncias que curassem determinados tipos de doenças começou de forma empírica, observando apenas os efeitos causados. Não se sabia o porquê, se sabia apenas que aquela planta era indicada para uma determinada enfermidade. Ao serem isolados compostos nos laboratórios químicos, os interesses por suas ações farmacológicas também foram despertados. Na maioria das vezes, era realizado um grande número de experimentos para ser encontrada a ação farmacológica ou toxicológica da substância. Isso desperdiçava tempo e material, tornando a pesquisa custosa. Precisava-se, então, aperfeiçoar todo o processo envolvido na descoberta de fármacos, em busca de maior eficiência. A técnica de Ancoragem Molecular surgiu como uma alternativa interessante para esse aprimoramento (RODRIGUES et al., 2012).

No decorrer dos anos o Brasil teve um aumento considerável para a expectativa de vida, que estimulou a transição epidemiológica, ocasionando aumento na incidência de doenças crônicas. Então, as indústrias farmacêuticas começam a investir em pesquisas e desenvolvimento de novas técnicas, afim de aumentar a rapidez na descoberta e produção de novos medicamentos, além de proporcionar melhorias em produtos já lançados no mercado (PALMEIRA FILHO et al., 2012).

Atualmente o *Diabetes Mellitus* está presente entre as doenças crônicas de maior prevalência entre a população mundial. No Brasil, estima-se cerca de quatro milhões de óbitos por ano provenientes dessa doença (BRASIL, 2012). Por se tratar de uma doença que não tem cura, seu portador necessitará de terapia medicamentosa continuamente.

Dentre os fármacos hipoglicemiantes orais mais utilizados para o tratamento do *Diabetes Mellitus* no mundo está a metformina, fármaco derivado da guanidina (*Galega officinalis*), que tem como ações principais a supressão da gliconeogênese e glicólise hepática e utilização periférica da glicose pelas células musculares. No entanto, a terapia à base desse fármaco apresenta grande incidência de reações

adversas, contribuindo para não adesão ao tratamento pelos pacientes (ZHOU et al., 2001; SILVA, 2012).

Hoje, a ciência dispõe de uma série de ferramentas para o estudo dos efeitos causados pelos mais diversos tipos de substâncias no organismo. Ao descobrir uma patologia, a busca pelo medicamento geralmente se inicia com o planejamento racional do fármaco. Com recursos computacionais podem ser feitos experimentos *in silico*, reproduzindo o ambiente biológico. São eleitos os melhores protótipos para passarem para a etapa de síntese, e logo em seguida, são, por fim, realizados os ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo* (BARREIRO, 2009).

A Metformina é um fármaco bastante utilizado para o tratamento de pacientes com *Diabetes Mellitus*, porém apresenta efeitos adversos que devem ser levados em consideração para uma melhor adesão ao tratamento. Por isso se torna necessária a busca por possíveis alterações em sua estrutura, que resultem em melhores valores de energia livre de ligação com o seu alvo biológico. Dessa maneira os efeitos adversos serão minimizados, pois o ligante passará mais tempo associado à proteína alvo, e menos tempo disponível para interagir com outras moléculas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a ancoragem molecular do ligante natural AMP, Metformina e ligantes modificados na posição R1 com a proteína quinase AMPK.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Propor modificações na molécula de Metformina.
- Obter valores de energia de ligação (Ligantes propostos x AMPK).
- Discutir as energias de ligação encontradas para propor melhoramentos na molécula da metformina.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

Nos últimos anos, a busca por maiores lucros e inserção no mercado farmacêutico, incentivou a contínua busca por avanços científicos tecnológicos, que possibilitam a produção em larga escala, além da possibilidade de produção para grupos distintos em curto espaço de tempo (MARINHO; SEIDL; LONGO, 2008).

Alinhado aos avanços da indústria farmacêutica, outro fator de grande relevância para as inovações na busca por moléculas com maior eficiência, que apresentem maior especificidade e menor prevalência de efeitos adversos, é o aumento da qualidade de vida do paciente, que terá melhor adesão ao tratamento (PIERONI et al., 2014).

Na história de evolução da indústria farmacêutica, temos o desenvolvimento da Aspirina® como um marco importante. Onde, por vários anos, partes do salgueiro (*Salix alba*) foram utilizados para combater febre e dor, e somente anos depois, a substância responsável pela ação farmacológica foi isolada, a salicilina. Devido à grande presença de efeitos adversos, em 1898, com o uso da síntese química, cientistas da Bayer conseguiram produzir uma molécula semelhante com menor toxicidade, o ácido acetil salicílico (YUNES; CALIXTO, 2001).

Com a chegada dos primeiros computadores, ocorreu o desenvolvimento de técnicas virtuais na química medicinal. Também foram criados vários bancos de dados, tal qual o *Protein Data Bank* (banco de dados utilizado para arquivar estruturas proteicas já descobertas), que permitiram o acesso de informações para embasar o desenvolvimento de vários medicamentos. O primeiro fármaco anti-hipertensivo (captopril, inibidor da enzima conversora de angiotensina) foi desenvolvido a partir da modelagem molecular (LIMA, 2007). Desde então as indústrias farmacêuticas vem seguindo uma tendência tecnológica, utilizando técnicas como as de modelagem molecular para a busca de novos fármacos e melhoramentos de outros já existentes no mercado.

3.1.2 MODELAGEM MOLECULAR NO ESTUDO DE FÁRMACOS

A modelagem molecular consiste na construção e manipulação dos elementos estudados. Envolve representações estruturais mais próximas o possível do real, através de um conjunto de cálculos, utilizando a química teórica como instrumento matemático e a computação gráfica para manusear os modelos obtidos.

Deste modo, facilita a interpretação da relação entre a estrutura e atividade biológica (BIELSKA et al., 2011).

A química teórica, como dito a cima, atua como ferramenta de apoio em análises e interpretação de dados experimentais. Ela tem grande importância no planejamento racional de fármacos, já que este envolve análise conformacional de sistemas complexos, como por exemplo o estudo da interação entre fármaco-proteína (MILLER, 2012).

Os métodos utilizados na química teórica para o estudo de sistemas, geralmente são divididos em duas grandes classes: Métodos Quânticos e Métodos Clássicos. Os Métodos Quânticos são utilizados para obter a energia do sistema através da resolução da equação de Schrödinger. Vários graus de aproximação são executados nos cálculos, e dependendo das variáveis ou dados experimentais incluídos nos algoritmos ainda podem ser subdivididos em outras subclasses. Em geral, existem métodos que tratam todos os elétrons do sistema, como é o caso dos *ab initio*, enquanto outros consideram somente os elétrons de valência, como é o caso dos métodos semiempíricos. Na prática, os métodos quânticos *ab initio* só conseguem tratar sistemas com poucos átomos devido ao grande número de equações que são usadas nas suas construções. Dessa forma, os métodos semiempíricos podem ser considerados uma estratégia bastante interessante para o estudo de sistemas biológicos por conterem parametrizações específicas e bem menos equações a serem resolvidas (CRAMER, 2004).

Nos Métodos Clássicos as interações entre os componentes do sistema são tratadas através das Leis da Física Clássica, ou seja, desprezando a quantização da energia. Através de equações, pode ser obtida uma trajetória do sistema no espaço de fase escolhido. Com a trajetória, várias propriedades termodinâmicas podem ser calculadas utilizando as ferramentas da Mecânica Estatística. Existem dois métodos que podem ser categorizados como métodos de simulação molecular: Monte Carlo e Dinâmica Molecular. O método Monte Carlo explora o espaço de fases de forma estocástica, perdendo-se assim a evolução temporal do sistema, porém as propriedades termodinâmicas do sistema podem ser calculadas. Já no método de Dinâmica Molecular as equações são integradas em função do tempo, além da obtenção das propriedades termodinâmicas, com isso pode-se estudar os movimentos das partículas em função do tempo (CRAMER, 2004).

A energia de ligação entre o fármaco e o sítio ativo provém da composição química dos grupos funcionais presentes na molécula bioativa e da conformação tridimensional destes grupos (ANDREI et al., 2012). A escolha entre o método clássico ou quântico depende do sistema a ser estudado e também das propriedades a serem

obtidas. Se também os custos computacionais forem levados em conta, os métodos clássicos são mais adequados.

A relação entre a estrutura e a atividade farmacológica é inteiramente dependente, visto que, mesmo com a presença de dois fármacos praticamente idênticos em sua estrutura, diferenciando-se apenas pela alteração da posição de um átomo na molécula, teremos assim duas respostas biológicas distintas, tanto qualitativa como quantitativamente. Por isso, surge a necessidade de estudos das relações entre estrutura e atividade biológica, desenvolvendo conhecimentos expressos por modelos matemáticos (TAVARES, 2004).

Os sistemas de planejamentos de fármacos, demonstram forte capacidade de prever a força de interação entre fármaco e alvo terapêutico. Devem conter ferramentas que viabilizem o processo, sendo capazes de calcular propriedades físico-químicas de cada molécula distinta (exemplo: pKa; energias de ligação; interações atômicas; ponto de fusão), de moléculas associadas, descrevendo suas interações (solvatação; interação fármaco-receptor), além de possibilitar relações qualitativas e quantitativas entre representações de moléculas e atividades biológicas (CARVALHO et al., 2003).

3.1.4 TÉCNICAS DE MODELAGEM MOLECULAR EMPREGADAS NA QUÍMICA MEDICINAL

A Química Medicinal tem papel crucial para um completo planejamento, identificação, preparação e entendimento dos efeitos farmacológicos e toxicológicos de compostos-protótipos. Permite de forma didática a elucidação do mecanismo de ação a nível molecular e a construção das relações entre a estrutura química e a atividade farmacológica, viabilizando o processo de desenvolvimento e otimização de fármacos (WERMUTH et al., 1998). Em outras palavras, a química medicinal, é utilizada como estratégia racional para a descobertas de novos fármacos.

Vários medicamentos, disponíveis hoje ao alcance de todos, foram desenvolvidos através de estratégias racionais. Nos últimos trinta anos, os avanços ligados às técnicas utilizadas nessa área da ciência têm relatado histórias de sucesso. Uma delas é a cimetidina (BARREIRO; FRAGA, 2015), que foi o primeiro antagonista seletivo de receptores da histamina, subtipo 2. Este composto compete com a histamina pelo sítio ativo dos receptores das células gástricas, responsáveis pela produção de ácido clorídrico. A cimetidina foi também o protótipo de vários outros medicamentos utilizados para o tratamento de úlcera gástrica e duodenal, tais como ranitidina, famotidina, nizatidina e roxatidina.

Os antirretrovirais do vírus da imunodeficiência humana (HIV), disponíveis no mercado, também foram desenhados através de técnicas racionais. O zidovudina (AZT), foi identificado a partir de algas marinhas (BARREIRO; FRAGA, 2015). É largamente utilizado para o tratamento da imunodeficiência adquirida, geralmente combinado com outros medicamentos, e atua no nível da enzima transcriptase reversa do vírus.

A cristalografia de raios X é uma técnica que permite a identificação da estrutura tridimensional de proteínas, e identifica a posição tridimensional que cada átomo ocupa no polímero proteico. Com a cristalografia de proteínas do vírus, vários outros fármacos puderam ser desenhados utilizando-se técnicas de ancoragem molecular. O efavirenz e a lamivudina são exemplos, e em associação com o AZT, são recomendados pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2008) para a terapia de pacientes com Aids. O entendimento dos mecanismos de ação das enzimas virais permitiu a modelagem de ligantes que ajudam a controlar a replicação do vírus, controlando a carga viral e aumentando a expectativa de vida dos indivíduos soro positivos.

A modelagem molecular tem fundamental importância para a análise dos aspectos que regem as interações de fármacos com seus alvos. A regulação dos processos biológicos se dá principalmente através da combinação de fatores: estruturais, incluindo estrutura geométrica e estrutura eletrônica, energéticos, dinâmicos e cinéticos. Em se tratando da parte estrutural, os aspectos tridimensionais, que antes não eram considerados, agora trazem indícios do comportamento da substância no ambiente biológico. Trouxeram, principalmente, ampliação da visão sobre a conformação bioativa do ligante no momento da interação com a proteína-alvo. As ferramentas disponíveis para a modelagem de fármacos, foram desenvolvidas por Cohen (1995) e são baseadas, principalmente, por técnicas que fazem:

♦ *Desenho de drogas de forma direta:* quando se tem à disposição a estrutura tridimensional do alvo biológico (enzima, receptor ou DNA). Aqui se pode fazer uso de ferramentas de modelagem por homologia de proteínas, ancoragem molecular, dinâmica molecular e cálculos quânticos. Uma das maiores barreiras para estudos desse tipo tem sido a disponibilidade da estrutura tridimensional do alvo biológico em bancos de dados. Quando esse desafio é vencido, uma segunda barreira que geralmente encontra-se é o tamanho do sistema a ser modelado. Trata-se de biomoléculas que facilmente passam dos mil átomos em sua constituição. Felizmente, vários grupos de pesquisa têm trabalhado para desenvolver métodos computacionais que tornem possíveis esses estudos. Com todas as condições, os estudos atômico-moleculares das interações do protótipo e o alvo biológico podem ser iniciados. O

planejamento de agentes terapêuticos através desses entendimentos fornece bases bem mais sólidas para esclarecer vários detalhes do mecanismo de ação.

♦ *Desenho de drogas de forma indireta*: geralmente essas técnicas são utilizadas quando não se sabe o alvo biológico de atuação do composto. As estratégias para as investigações, a nível molecular, podem se iniciar a partir de estudos feitos sobre as relações qualitativas e quantitativas entre a estrutura química e a atividade biológica do composto-protótipo, cuja sigla é QSAR (do inglês, *Quantitative Structure-Activity Relationship*). Várias propriedades moleculares são calculadas e matematicamente relacionadas a índices de atividade, medidos em experimentos biológicos. Nesses estudos, são necessários menos recursos computacionais que os anteriores, o que pode ser uma vantagem. Porém, aqui a dinâmica do comportamento do complexo proteína-ligante não é bem esclarecida. As técnicas mais utilizadas são cálculos de propriedades moleculares e análise estatística por quimiometria.

♦ *Buscas em bases de dados*: as coordenadas estruturais e espaciais de grupos farmacofóricos dos compostos-protótipos são usadas como entrada para buscas de substâncias semelhantes em bases de dados;

♦ *Desenho tridimensional automatizado de drogas*: de posse da estrutura tridimensional do sítio ativo da proteína são desenhados compostos com fragmentos farmacofóricos com encaixe ideal, através de ensaios computacionais;

♦ *Mimetismo molecular*: uma molécula com ação conhecida é adotada como modelo, e vários protótipos são desenhados a partir dela.

As técnicas utilizadas nesse trabalho foram a de Desenho de drogas de forma direta combinada com Desenho tridimensional automatizado de drogas, que associadas fornecem melhores resultados da energia livre de ligação entre proteína-ligante através de estudos com a ancoragem molecular.

3.1.4.1 ANCORAGEM MOLECULAR

As técnicas de ancoragem molecular (*docking* molecular) fornecem estimativas da energia livre de ligação entre a proteína e o ligante, antes mesmo que esses sejam sintetizados. Os custos computacionais com esses estudos são bem menores, se comparados aos gastos laboratoriais despendidos ao sintetizar e testar farmacologicamente várias substâncias. Esta importante ferramenta tem sido usada

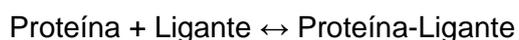
para filtrar compostos que não servem para serem designados como alvo, e desenhar os possíveis candidatos que apresentariam uma boa interação com o sítio ativo do receptor (RODRIGUES et al., 2012).

A partir da ancoragem molecular, são obtidas diferentes conformações espaciais do ligante, possibilitando ao analista identificar qual dentre estas é a mais provável na interação ligante alvo. A partir de cada conformação espacial, são obtidas energias livres de ligação (entre ligante e alvo), onde a menor energia é considerada a mais provável para justificar a conformação da interação (KITCHEN, 2004).

O preparo das estruturas químicas a serem testadas, compreende uma das partes mais importantes nas propostas de novos ligantes, pois as moléculas devem ser projetadas com cuidado, mantendo disposições parecidas dos átomos da molécula primária. Através de varredura conformacional e alinhamento tridimensional com o ligante original podem ser propostas moléculas melhoradas (GOODARZI; FREITAS; FERREIRA, 2009).

As interações entre o fármaco e alvo proteico se dão através de forças intermoleculares do tipo dipolo dipolo induzido e permanente. Dentre as forças dipolo dipolo permanente as mais comuns nesses sistemas são as ligações de hidrogênio, As dipolo dipolo induzidos podem ser forças de Van Der Waals ou London (FLORENCE; ATTWOOD, 2011).

O principal objetivo destes métodos é o cálculo da energia livre de ligação não-covalente entre duas moléculas. No caso do presente projeto, o objeto de estudos é a proteína quinase ativada por AMP (AMPK) e ligantes modificados. Essa interação pode ser representada como:



Onde Proteína-Ligante representa o complexo com as modificações estruturais que ocorrem em ambos durante a interação. A energia livre de ligação pode ser obtida por:

$$\Delta G_{\text{Ligação}} = G_{\text{Proteína-Ligante}} - G_{\text{Proteína}} - G_{\text{Ligante}} \quad (1)$$

A contribuição da energia livre é expressa como:

$$G = U - TS \quad (2)$$

Sendo U a energia interna da molécula, T a temperatura absoluta do sistema (309K) e S a entropia da molécula estudada (SMITH, 2007).

Existem vários tipos de funções para avaliar a energia livre de ligação do receptor-ligante utilizadas pelos pacotes computacionais de ancoragem (RODRIGUES et al., 2012). Para classificá-las, pode-se agrupá-las em três classes principais: primeira, funções baseadas em campos de força, que através de simulações computacionais, o campo de força cria uma representação física do sistema estudado,

e suas equações procuram mimetizar o potencial de interação entre os átomos. Segundo, funções empíricas, onde as equações utilizam coeficientes pré-otimizados vindos de dados experimentais de interações proteína-ligante. E por fim, funções baseadas em conhecimento, que utilizam informações vindas de estruturas determinadas experimentalmente, para se basear e criar possíveis geometrias assumidas pelos ligantes no sítio ativo (OLIVEIRA et al., 2006).

Além de avaliar quais as funções mais adequadas, o investigador também pode escolher como deve ser montado o experimento. A metodologia de ancoragem molecular permite a montagem do experimento através de quatro maneiras: ligante rígido e proteína rígida, ligante rígido e proteína flexível, ligante flexível e proteína rígida, e ligante flexível e proteína flexível. Enquanto mais opções de flexibilidade, mais funções ou variáveis são incluídas para os cálculos, mais custoso computacionalmente fica o experimento (LIPKOWITZ et al., 2008).

Essa nova realidade de pesquisas e desenvolvimento busca a molécula ideal, que apresente eficácia, especificidade e o mínimo possível de reações não desejáveis, tendo enfoque para doenças com maior incidência e com maior expectativa de retorno. Como por exemplo, as doenças crônicas não transmissíveis, que atingem indivíduos de todos os perfis socioeconômicos (PALMEIRA FILHO et al., 2012).

3.2 DIABETES MELLITUS

Diabetes Mellitus (DM) é uma doença metabólica crônica, caracterizada pelo aumento do nível glicêmico sanguíneo (hiperglicemia). Ela pode ser classificada em tipo I, quando o organismo apresenta defeitos na secreção da insulina, causados pela destruição de células beta do pâncreas; em tipo II, quando o organismo apresenta resistência à insulina, geralmente está relacionada com fatores hereditários e obesidade; em *insipidus*, quando há falha ou destruição da glândula hipófise; em gestacional, quando há resistência insulínica, causada pelo aumento de hormônios produzidos pela placenta; e em medicamentosa, quando o aumento glicêmico está ligado ao uso de medicamentos (corticoides, diuréticos tiazídicos e betabloqueadores) (MARCILIO et al, 2011).

Dentre os diabéticos, cerca de 5 a 10% são do tipo I, denominados insulino dependentes, já que o tratamento para esse tipo de DM, consiste em reposição insulínica diária. Os outros 90% dos pacientes diabéticos são acometidos pelo tipo II, sendo este o de maior incidência entre a população. Para o tratamento para esse tipo de DM, os hipoglicemiantes orais estão na linha de primeira escolha, pois possuem

boa adesão ao tratamento pelo paciente e simplicidade na administração (YOUNG, 2014).

Se não tratado corretamente, o DM pode desenvolver agravos e risco para a vida do paciente. As complicações provenientes do DM podem ser classificadas em dois grupos, o primeiro em Macro vasculares, onde ocorrem complicações cardíacas e o fluxo sanguíneo para as extremidades do corpo é comprometido, e o segundo em Microvasculares, que são pequenos danos nos vasos sanguíneos de alguns órgãos comprometendo sua função, dentre os principais órgãos acometidos estão os olhos, rins e nervos (OLIVEIRA; MILECH, 2006).

Segundo dados contidos no departamento de informática do Sistema Único de Saúde do Brasil (DATASUS), o número de óbitos provenientes do *Diabetes Mellitus* é crescente, chegando em 2011 com uma taxa de trinta óbitos para cada cem mil habitantes, onde a maioria dos óbitos é observado na população de maior idade. Este fator requer atenção especial pelo governo federal, que continuamente desenvolve estratégias para prevenção e melhor adesão ao tratamento pelo paciente (BRASIL, 2012).

3.3 HIPOGLICEMIANTES ORAIS

Os hipoglicemiantes orais são compostos por 5 classes: biguanidas, sulfoniluréias, inibidores da α -glicosidase, tiazolidinedionas e glinidas. Elas agem diminuindo os níveis séricos da glicemia por aumentarem a sensibilização das células à insulina. São tratamentos de primeira escolha para o DM tipo II, já que a maior parte dos medicamentos dessa categoria, dependem de células beta funcionantes (HOWLAN; MYCEK, 2009).

Dentre os sensibilizadores de insulina, o mais utilizado mundialmente desde a década de 1950, é a metformina, pertencente a classe das biguanidas, obtida a partir da síntese da guanidina, que era uma droga altamente hepatotóxica. Ela é responsável por desencadear uma cascata de reações no organismo, dentre as principais estão, a supressão da gliconeogênese e glicogenólise hepática e a redução de absorção da glicose (SILVA, 2010). Contribui também através de mecanismos que ainda permanecem desconhecidos com o controle dos triglicerídios, regulação do tônus vascular e prevenção da aterosclerose (OLIVEIRA; MILECH, 2006).

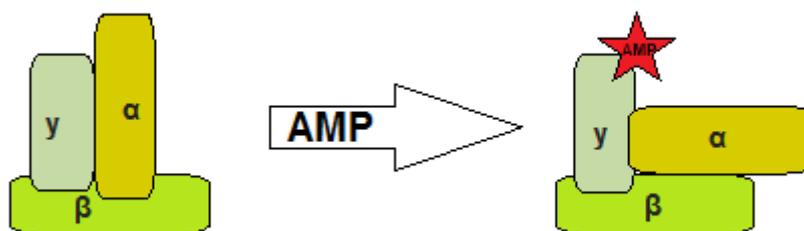
Apesar de todos esses efeitos observados pela administração da metformina, ainda não se sabe ao certo seu mecanismo de ação (RANG; DALE; RITTER, 2001; SILVA, 2010). Alguns estudos descobriram uma forte relação entre a Metformina

e a proteína quinase ativada por AMP (AMPK), sendo esta hoje a principal explicação para a ação deste fármaco.

Os efeitos resultantes da administração da metformina são explicados pela ativação da enzima quinase AMPK, que é responsável por grande variedade de efeitos fisiológicos, incluindo o aumento da captação de glicose pelos músculos esqueléticos, redução dos níveis plasmáticos de glucagon e aumento do catabolismo de lipídios. Além do tratamento para o *Diabetes Mellitus* tipo II, isso torna-o interessante também para o tratamento de ovários policísticos (anovulação relacionada a resistência à insulina) (JUNIOR et al., 2008).

A AMPK é um complexo proteico heterotrimérico, ou seja, um complexo que apresenta três subunidades distintas, sendo uma subunidade α catalítico, β reguladora e γ , que estão representados na Figura 1 (ARAD; SEIDMAN; SEIDMAN, 2007).

Figura 1: Representação das subunidades α , β e γ da enzima AMPK e sua respectiva ativação pela Adenosina Monofosfato (AMP).

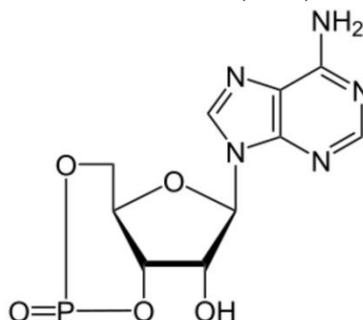


Fonte: Baseado em HAWLEY et al., 2003.

A ativação da AMPK está diretamente ligada a interação da AMP à sua subunidade γ . Que uma vez ligadas proporciona a mudança conformacional no complexo AMPK, ativando alostericamente a subunidade catalítica α . Inibindo desta maneira a ação de proteínas fosfatases, que são responsáveis por processos de desfosforilação e consequente inibição da AMPK (HAWLEY et al., 2003).

O AMP é um nucleosídeo de adenosina monofosfato, produzido a partir da desfosforilação oxidativa da adenosina trifosfato (ATP). Geralmente tem um aumento acentuado quando há uma situação de baixa energética celular extrema (MURRAY et al., 2014). Sua estrutura está representada na figura 2. Entre sua composição se encontra uma base nitrogenada heterocíclica, um grupamento fosfato e um açúcar.

Figura 2: Estrutura da Adenosina Monofosfato (AMP).

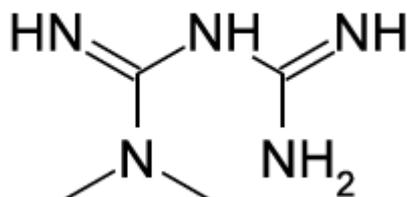


Fonte: Baseado em MURRAY et al., 2014.

A enzima quinase AMPK tem ativação fisiológica por qualquer tensão que provoca um aumento do AMP celular, como por exemplo: a diminuição do ATP. Por outro lado, sua inativação é causada pela presença de concentrações fisiológicas de fosfocreatina. A ativação da AMPK fornece uma explicação unificada para os efeitos desencadeados pela administração da metformina (ZHOU et al., 2001).

Mesmo após tantos anos de uso da metformina, ainda não se encontram na literatura informações sobre os grupos farmacofóricos de sua estrutura (Figura 3) e o seu real mecanismo de ação. Todos os experimentos se deparam em uma mesma hipótese, que a administração da metformina está diretamente ligada à ativação da AMPK, o que justifica os efeitos desencadeados por este fármaco. Em estudos realizados por Zhou et al. (2001) e Mirsa (2007), constataram a ativação da AMPK em ratos tratados com a metformina. Já Zang et al. (2004) obteve os mesmos resultados em culturas de hepatócitos humanos insulinoresistentes.

Figura 3: Estrutura do fármaco Metformina.



Fonte: Souza, 2015.

A metformina possui tempo de meia vida de cerca de três horas, ela não se liga a proteínas plasmáticas, e também não sofre metabolismo, sendo excretada de maneira inalterada. Apresenta efeitos colaterais significantes, que faz com que cerca de 5 a 10% de seus usuários abandonem o tratamento. Dentre os efeitos adversos de maior incidência estão náuseas, anorexia, diarreia e vômito. (KATZUNG, 2003; OLIVEIRA; MILECH, 2006; SILVA, 2010).

Além de náuseas, anorexia, diarreia e vômito, o uso da Metformina também está associado com uma maior probabilidade de desenvolvimento de taquicardia ventricular. Costa e colaboradores (2008), constataram um aumento considerável na dispersão do intervalo QT (parâmetro que mede o tempo gasto para despolarização e repolarização ventricular, representando a duração da contração cardíaca) em ratos tratados com metformina, o que justifica a relação entre o fármaco e o desenvolvimento de taquicardia, pois quanto maior a dispersão do intervalo QT, maior o risco de desenvolver esse agravo.

Em estudo realizado por Claudio (2009), foi constatado que a Metformina também está associada com o reparo de lesões do DNA. Dessa maneira, pacientes com DM tratados com a metformina, apresentam menor probabilidade de desenvolver patologias resultantes de mutações no DNA, dentre elas, a de maior importância, o câncer.

Diante de tantas suposições e teorias relacionadas ao uso da metformina, estudos sobre a sua estrutura e elucidação de sua ação no meio biológico, é de suma importância, tanto para aumentar a segurança na administração, como para propostas de melhoramento de sua estrutura, dando maior conforto para os diabéticos tratados com este fármaco.

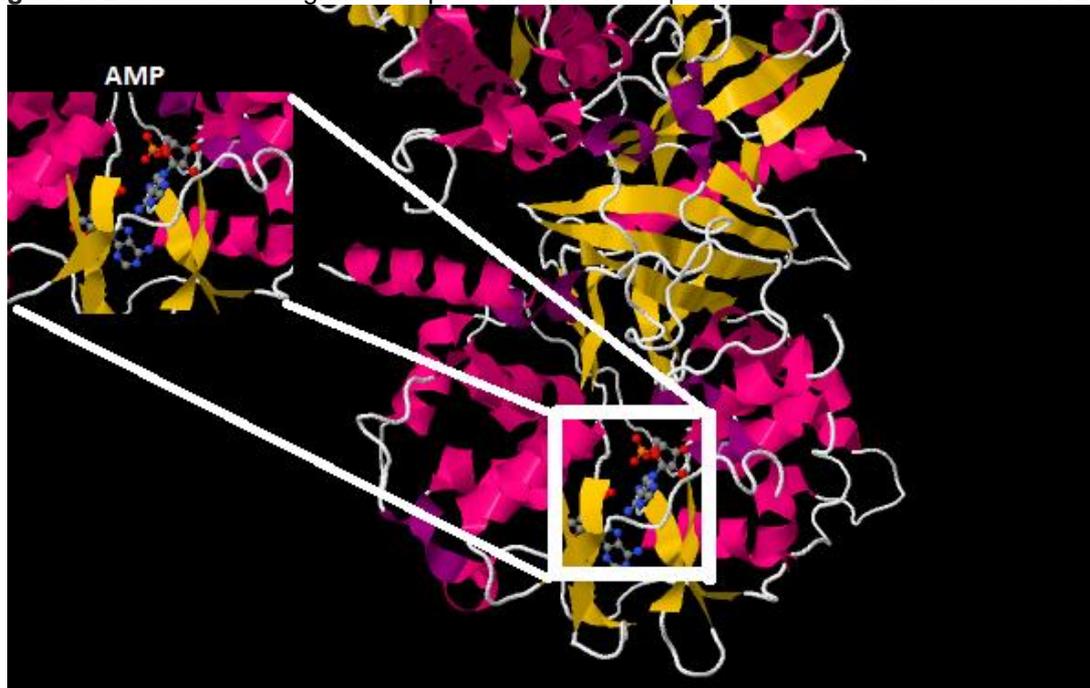
4 METODOLOGIA

O presente trabalho foi desenvolvido no complexo de informática nas dependências do Centro Universitário Luterano de Palmas (CEULP/ULBRA), no período de agosto a outubro do ano de 2015. Inicialmente realizou-se a pesquisa do referencial teórico tomando como base bibliografias da área de química medicinal desenvolvidas por pesquisadores nacionais e internacionais.

As equações utilizadas para cálculos de ancoragem molecular, foram desenvolvidas por pesquisadores no século passado e implementadas em pacotes computacionais utilizados nos dias atuais. Referências a respeito desses algoritmos desenvolvidos geralmente datam entre a metade do século passado e os dias de hoje.

A ferramenta metodológica utilizada para a modelagem, adotada pelo trabalho foi a de ancoragem molecular, tomando como ponto de partida a estrutura cristalográfica da proteína AMPK complexada com o AMP representados na Figura 4 (código PDB: 4CFH) disponível no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB). A resolução da estrutura cristalográfica depositada no PDB é de 2,4Å (resoluções ideais estão entre os valores de 1,8Å – 3,2Å), e a proteína é de origem da espécie humana (*Homo sapiens*) (XIAO et al., 2013).

Figura 4: Estrutura cristalográfica da proteína AMPK complexada com o AMP extraída do PDB.



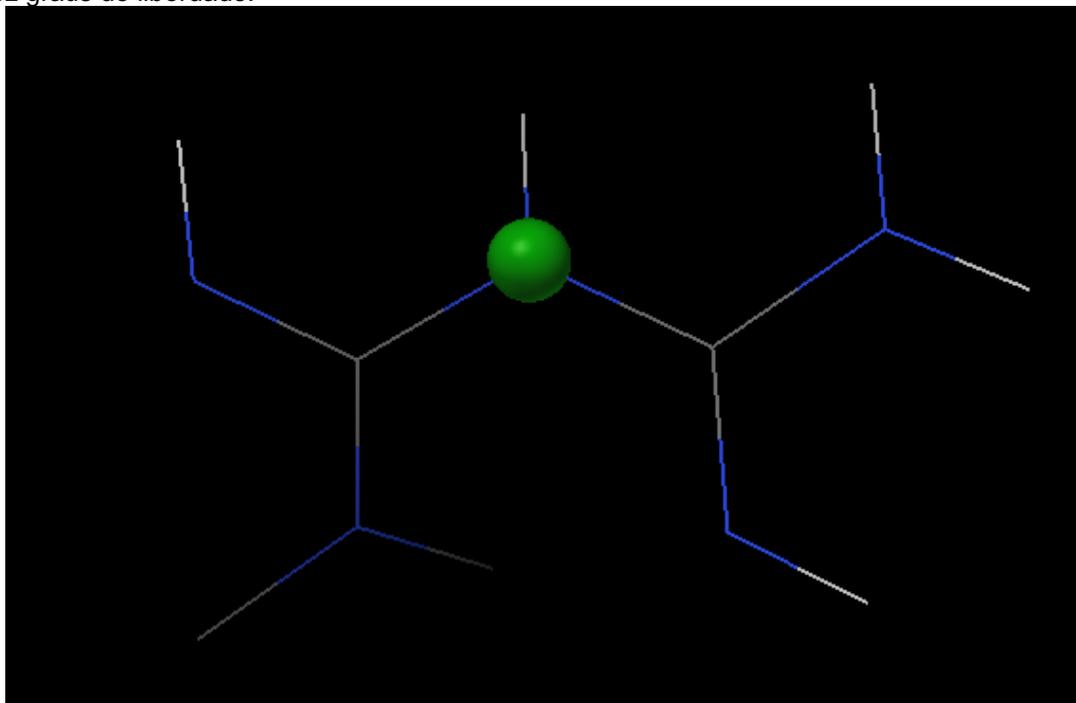
Fonte: Xiao et al., 2013 (adaptado).

O ancoramento foi realizado através do pacote computacional Autodock 4.2 desenvolvido por Bowie, Luthy e Eisenberg (1991) que, além de ser de livre acesso, é

um dos mais bem recomendados pela comunidade científica (disponível para download em: <http://autodock.scripps.edu/downloads/autodock-registration/autodock-4-2-download-page/>). Os computadores utilizados para instalar o pacote computacional, apresentavam configuração com processador intel® i4, memória interna 4Gb e HD de 500Gb.

O procedimento adotado foi o de ancoramento com a proteína rígida (sem mudanças nas posições dos átomos) e ligantes flexíveis, com a permissão de dez graus de liberdade para a amina central sinalizada com a esfera verde na figura abaixo.

Figura 5: Estrutura tridimensional da Metformina, sinalizado o local de permissão de dez graus de liberdade.

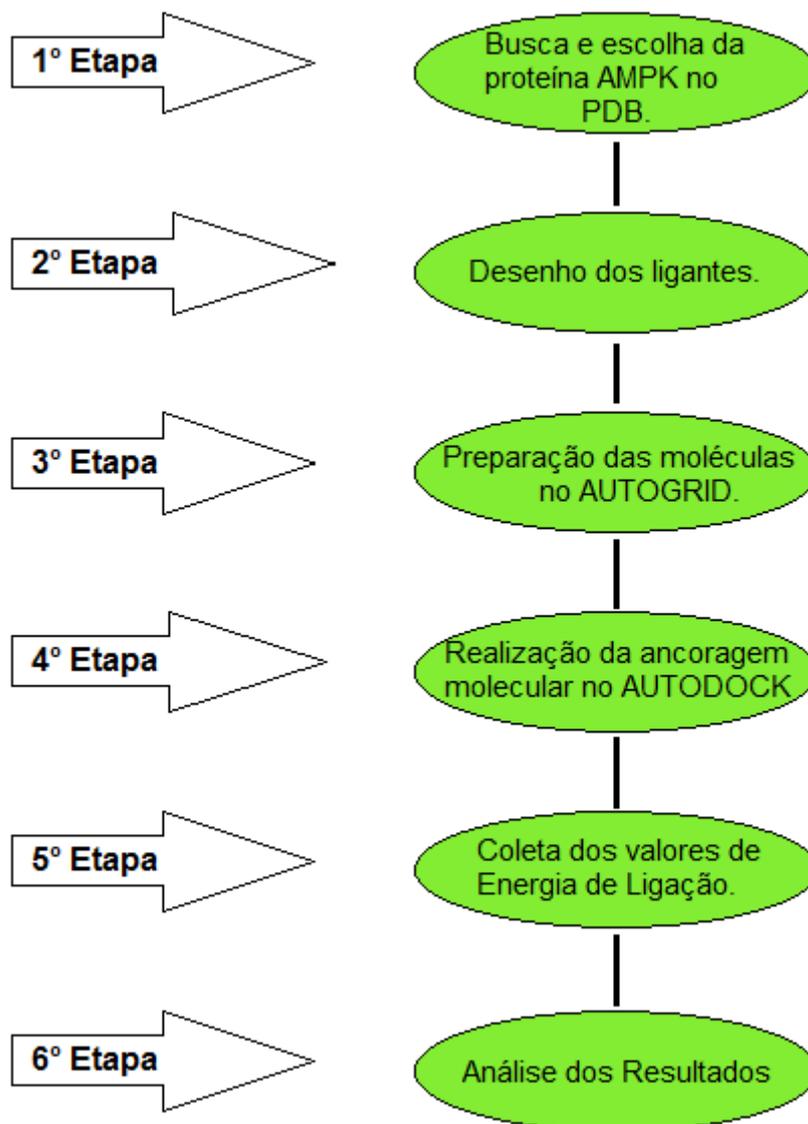


Fonte: Souza, 2015.

Enquanto maior a quantidade de graus de liberdade, maior também o tempo computacional gasto. Por isso deve ser escolhido uma quantidade ideal tanto para realização dos estudos quanto para minimizar esses gastos. O método escolhido diminui o tempo de cálculo, diminuindo também o custo computacional, sem maiores danos à estimativa da energia de interação entre proteína-ligante.

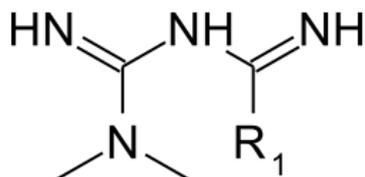
Na figura 6 é mostrado um diagrama com as sequências das etapas que foram realizadas para este trabalho.

Figura 6: Diagrama das etapas envolvidas na realização do presente trabalho.



Fonte: Souza, 2015

Inicialmente foi realizada a confecção dos ligantes, para isso utilizou-se o programa Autodock 4.2, tomando como base as coordenadas cartesianas X, Y, Z do sítio ativo da proteína AMPK e do ligante natural AMP. Foram propostos cinco ligantes devido ao tempo disponível para a realização do trabalho, porém com variações suficientes para investigar fatores importantes que interferem nas energias de ligação. A partir de alterações na posição R1 da molécula do fármaco metformina, apresentada na figura 7, foram obtidos os novos ligantes. A estrutura do fármaco foi utilizada como base, para garantir um melhor desenvolvimento do padrão farmacofórico.

Figura 7: Estrutura base para os compostos estudados

Fonte: Souza, 2015

Na literatura não foram encontradas informações sobre os grupos farmacofóricos da metformina, por isso a posição escolhida (R1) para a variação dos substituintes foi de modo aleatório. Já para a escolha dos substituintes foram levadas em conta as formações de ligações de hidrogênio, aumento ou diminuição da eletronegatividade e ainda formação de forças de London. Todas essas interações podem acontecer entre a molécula do ligante e os aminoácidos do sítio ativo da proteína. Na tabela 1 estão descritos os substituintes escolhidos.

Tabela 1: Banco de dados de ligantes

MOLÉCULA	R1
METFORMINA	NH
LIGANTE 1	OH
LIGANTE 2	Cl
LIGANTE 3	Br
LIGANTE 4	CH ₃
LIGANTE 5	CH ₂ CH ₃

Fonte: Souza, 2015.

Foram investigados ao todo sete ligantes (seis descritos na tabela acima e o ligante natural AMP) devido ao tempo disponível para a realização do trabalho. Os ligantes propostos possuem grupos retiradores (ligantes 1, 2 e 3) e grupos aceptores de elétrons (ligantes 4 e 5).

Além do estudo sobre a influência de grupos retiradores de elétrons, outros aspectos também foram analisados. Na metformina, a posição R1 possui o grupo NH, e para investigar a influência da eletronegatividade do átomo ligado ao hidrogênio, foi substituído pelo grupo OH. Nos estudos realizados por Li et al (2010) e Xiaolim et al (2012) utilizando a técnica de ancoragem molecular, todos concordam em um mesmo

ponto, que a formação de ligações de hidrogênio conduz melhores valores de atividade biológica. Para elucidar se na posição R1 existe formação de ligação de hidrogênio, o grupo NH da metformina foi substituído por Cloro (Cl) e Bromo (Br). Dentre os átomos de Cl e Br existe diferença de eletronegatividade que também podem influenciar nas interações dessa posição (MORGON, 2007).

Os ligantes 4 e 5 possuem grupos doadores de elétrons, que também podem estar relacionados à formação de forças de London nessa posição (R1). A mudança do grupo original NH da metformina para esses alifáticos nos permite observar o grau de influência desse tipo de interação para energia livre de ligação. Com o grupo NH observa-se normalmente formação de ligação de hidrogênio, enquanto que com os grupos alifáticos observa-se formação de forças de London (MORGON, 2007).

Todas as estruturas construídas foram submetidas às análises de alinhamento no espaço tridimensional através do programa Autogrid contido no pacote computacional Autodock 4.2.

Além dos ligantes acima representados, o ligante natural AMP também foi utilizado para comparação das energias de interação, e será apresentado na seção resultados.

Com o banco de dados de ligantes definido, uma nova etapa se iniciou: a construção dos complexos. Para tanto, como dito anteriormente, foi utilizado a técnica de ancoragem molecular. Todos os experimentos foram realizados obedecendo os passos indicados no tutorial do pacote computacional Autodock 4.2 (HUEY; MORRIS, 2006).

4.1 PREPARO DO ALVO BIOLÓGICO (EDIÇÃO DO ARQUIVO PDB)

É importante ressaltar que os arquivos obtidos no *protein data bank* não são prontos para o processo de ancoragem, pois geralmente apresentam problemas potenciais em sua estrutura, tais como: átomos ausentes, resíduos de água, quebras de correntes e etc. Diante disto, a molécula foi submetida a um processo de correção, onde foram removidos os resíduos de água, adicionados átomos de hidrogênio e respectivos átomos de acordo com a biblioteca do programa. Feito isso, a proteína foi salva em extensão “pdbqt”, onde duas colunas foram adicionadas no arquivo original, uma que define a carga de cada átomo e a segunda coluna que define os tipos dos átomos.

4.2 PREPARO DOS LIGANTES

Para o preparo das moléculas dos ligantes a serem ancorados, foi adotado o mesmo procedimento que foi utilizado para o alvo biológico, salvando também em extensão “pdbqt”.

4.3 AUTOGRID

Nesta fase, também chamada de pré-ancoragem foi preparado o sistema para realização dos experimentos de ancoragem. Os hidrogênios polares foram adicionados e as cargas de Gasteiger de cada átomo do sistema foram calculadas.

A caixa de interação foi definida no programa AUTOGRID, sendo de tamanho 126Åx126Åx126Å (direções x, y e z), mapeando energias de interação para diversos tipos de átomos dos ligantes com o sítio ativo da macromolécula (proteína). O tamanho escolhido foi suficiente para envolver todos os aminoácidos do sítio ativo e adjacentes, juntamente com o ligante. Estes mapas foram utilizados posteriormente pelo programa AutoDock para a determinação da energia total de interação entre a macromolécula e o ligante.

4.4 AUTODOCK

Esta fase foi a responsável por reunir todos os arquivos obtidos nos passos anteriores e realizar a ancoragem propriamente dita. Além da ancoragem, o Autodock calculou a energia livre de ligação de cada posição do ligante com a macromolécula, a partir dos mapas que foram gerados na fase Autogrid.

Para o procedimento foi realizada a ancoragem rígida para o receptor e flexível para o ligante, e aplicado o algoritmo *Lamarckian GA*, no qual um algoritmo genético tradicional é usado para busca conformacional global, combinado com o algoritmo de busca conformacional local (EISENBERG; LÜTHY; BOWIE, 1997).

Ao fim da ancoragem, para cada um dos sete ligantes ancorados com o modelo proteico, foram selecionados os complexos com melhores conformações e valores de energia, e suas estruturas tridimensionais salvas em formato PDB. Essas escolhas levaram em consideração os menores valores de energia de ligação, por serem as mais prováveis para justificar a interação proteína-ligante.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos cálculos de ancoragem molecular, foram obtidos valores de energias de ligação entre ligantes e proteína para diversas posições. O algoritmo genético fez uma busca de ao todo 100 posições assumidas pelos ligantes no sítio ativo da AMPK. As dez melhores energias de ligação são apresentadas na saída do cálculo. Porém, foram consideradas apenas as três posições com melhores energias de ligação por terem melhores valores, conforme consta na tabela abaixo:

Tabela 2: Valores de energias de interação entre AMP e AMPK

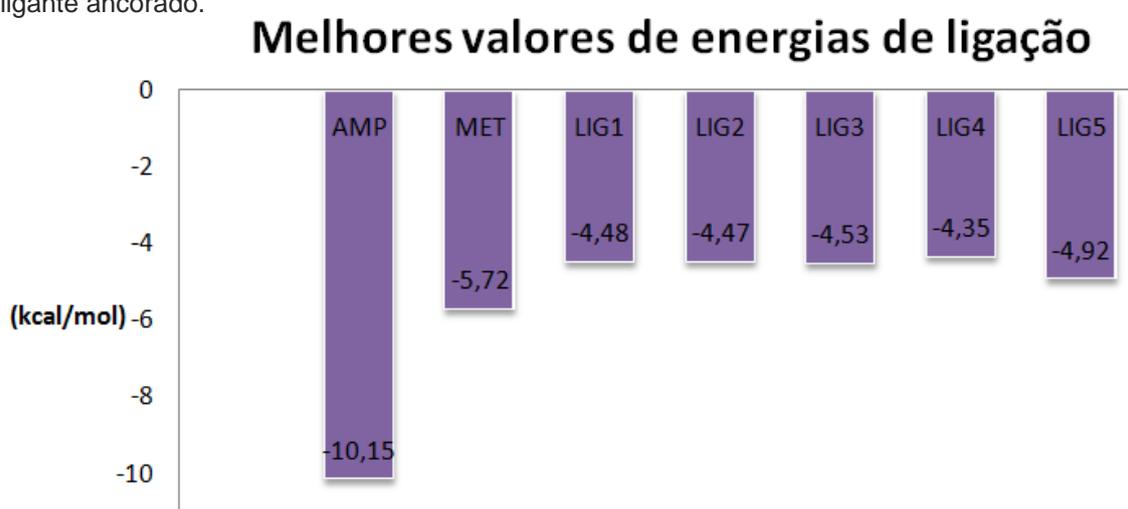
POSIÇÃO	ENERGIA DE INTERAÇÃO (kcal/mol)
AMP	
6	-10,15*
1	-9,7
5	-9,02
METFORMINA	
10	-5,72*
8	-4,95
1	-4,93
LIGANTE 1	
3	-4,48*
6	-4,43
7	-4,01
LIGANTE 2	
10	-4,47*
5	-4,35
8	-4,35
LIGANTE 3	
6	-4,53*
8	-4,46
2	-4,34
LIGANTE 4	
8	-4,35*
4	-4,33
3	-4,3
LIGANTE 5	
8	-4,92*
4	-4,53
5	-4,41

* Melhores valores de energias de ligação

Fonte: Souza, 2015.

Diante dos valores obtidos para cada substituição, foi constatado que a melhor energia de interação obtida foi para o ligante natural da proteína, e em sequência para a metformina. Já as alterações propostas para o fármaco não contribuíram para melhoria significativa da energia de interação. Os valores marcados com asterisco (*) são as melhores energias que, como consta da literatura, são os valores mais prováveis para explicar a interação fármaco-proteína (por serem os mais possíveis, termodinamicamente). Quanto menor a energia obtida, melhor o encaixe. Na figura 8 são apresentados os melhores valores de energia de ligação.

Figura 8: Representação gráfica das melhores energias de ligação obtidas para cada ligante ancorado.



Fonte: Souza, 2015

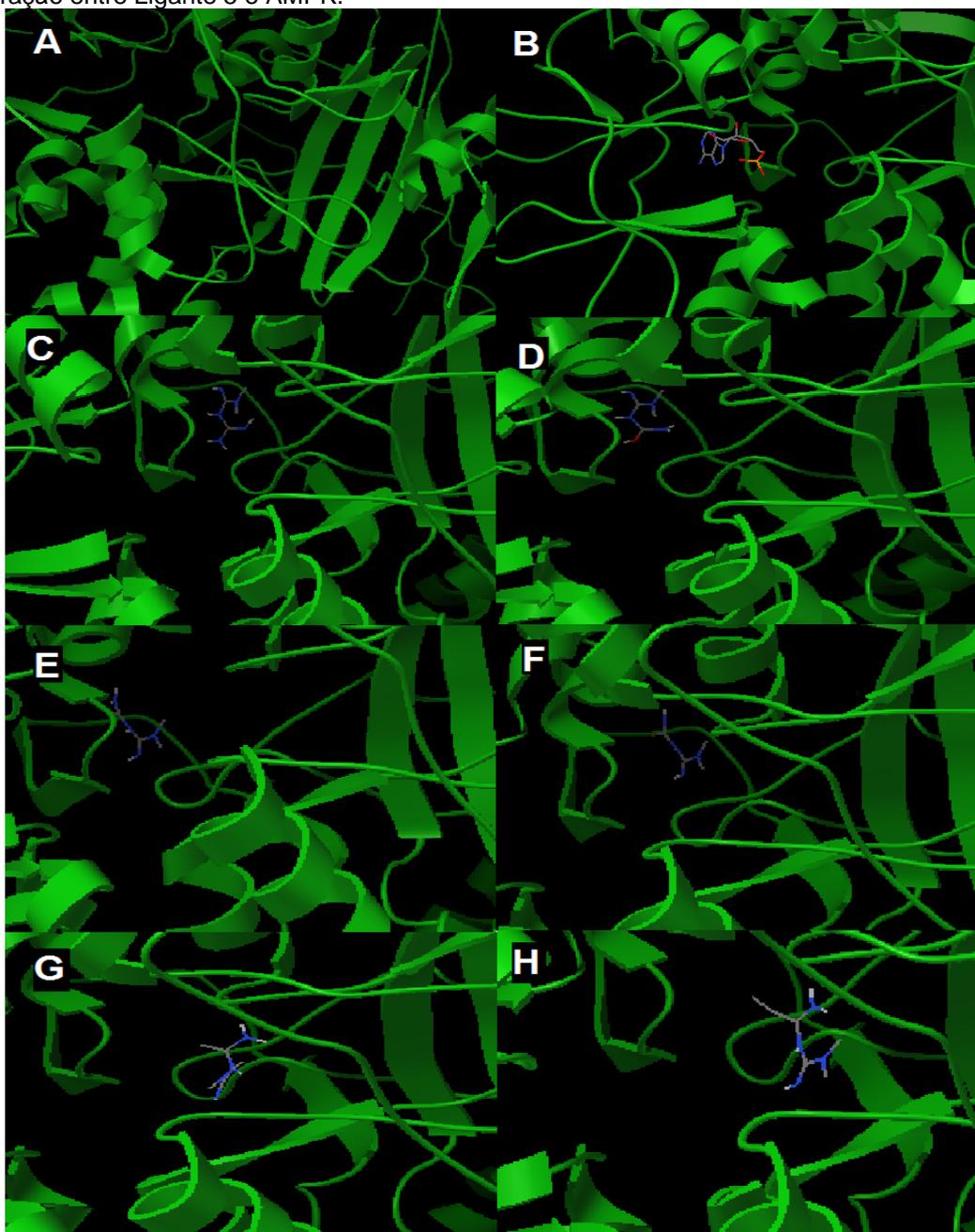
Através de comparação observa-se que há pouca variação da energia de ligação entre as moléculas modificadas e a estrutura base do fármaco. Provavelmente isso indica que as alterações realizadas nesse ponto da molécula não influenciam positivamente para o melhoramento da interação proteína-ligante.

O valor de ligação do AMP com a proteína, é aproximadamente duas vezes maior que o da metformina, confirmando que a associação do fármaco não é tão boa quanto a do ligante natural. Isso pode, em parte, explicar a quantidade de efeitos adversos associados à administração da metformina, uma vez que a molécula do fármaco ficaria livre interagindo com outras moléculas no meio biológico.

Dentre os ligantes propostos, o de número cinco é o que apresenta melhor valor de energia de ligação. Isso pode estar associado à aminoácidos do sítio ativo que formem interações do tipo forças de London nessa posição. Os ligantes de um a quatro apresentaram energias de ligação muito próximas, o que não possibilita relacionar claramente que as modificações estruturais contribuíram para a formação de melhores associações, explorando as diferenças de eletronegatividade entre os átomos.

As posições assumidas pelos ligantes no sítio ativo permitem interações com os aminoácidos aí presentes. Cada posição assumida pode levar a associações com aminoácidos locais diferentes. Enquanto melhores as energias de ligação, mais fortes são as interações que acontecem entre as moléculas dos ligantes e os aminoácidos. Dentre as posições testadas as melhores energias de ligação, provavelmente também serão as posições assumidas no meio biológico. A seguir será apresentada a imagem com as posições de melhor energia de interação obtida para cada ligante.

Figura 9: Locais de interação ligante-proteína. A) Sítio ativo da AMPK B) Local de interação entre AMP e AMPK C) Local de interação entre Metformina e AMPK D) Local de interação entre Ligante 1 e AMPK E) Local de interação entre Ligante 2 e AMPK F) Local de interação entre Ligante 3 e AMPK G) Local de interação entre Ligante 4 e AMPK H) Local de interação entre Ligante 5 e AMPK.



Fonte: Souza, 2015.

As imagens do sítio ativo nos permitem observar que a metformina e os ligantes 1, 2 e 3 estão associados com aminoácidos presentes no lado esquerdo do sítio ativo (como demonstrados na figura 9 em C, D, E e F). Já para os ligantes 4 e 5 e o AMP percebemos uma aproximação maior com os aminoácidos do lado direito (observados na figura 9 em B, G e H). Provavelmente os aminoácidos presentes nas posições supracitadas formam melhores associações através de forças de London e/ou com grupos aceptores de elétrons.

Para obtermos resultados mais conclusivos sobre essas associações, é necessário um estudo, utilizando outras técnicas de modelagem molecular, a respeito dos aminoácidos que participam do sítio ativo da proteína AMPK, assim como o desenho tridimensional dessa região da proteína.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho foram estudadas as energias de ligações obtidas entre a proteína AMPK, da espécie humana, seu ligante natural AMP, o fármaco metformina e cinco ligantes propostos, através da técnica de ancoragem molecular. Substituições na posição R1 da estrutura base foram realizadas com o objetivo de avaliar as energias de ligação para a proposição de um melhoramento na molécula do fármaco. Foram analisadas as possíveis formações de ligações de hidrogênio, associações através de forças de London e dipolo permanente.

As energias de ligações obtidas para os ligantes modificados indicam que as alterações propostas não contribuíram para um melhoramento efetivo das energias de ligação com a proteína. Isso pode nos indicar que, a posição escolhida para fazer as substituições pode não ser um grupo farmacofórico, ou as alterações com os grupos propostos podem não ter contribuído significativamente para melhorar a energia de ligação.

Os estudos de ancoragem molecular não consideram o efeito explícito do solvente biológico (água), que deve ser considerado sua presença para estudos posteriores. Podem ser acrescentados cálculos de simulação molecular para identificar os aminoácidos do sítio ativo e predir suas interações com moléculas propostas. Além disso, propriedades físico-químicas de cada um dos ligantes podem ser calculadas através de cálculos quânticos para relacioná-las estatisticamente com seus efeitos biológicos ou com suas energias de ligação.

REFERÊNCIAS

- ANDREI, C. C.; FERREIRA, D. T.; FACCIÓN, M.; FARIA, T. J., **Da Química Medicinal à Química Combinatória e Modelagem Molecular: Um Curso Prático**, São Paulo: Manole, 2012.
- ARAD, M.; SEIDMAN, C. E.; SEIDMAN, J.G., AMP-Activated Protein Kinase in the Heart Role During Health and Disease, **Circulation Research**, p. 474 – 488, 2007.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M., **Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**, 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2015. 608 p.
- BARREIRO, E. J. A química medicinal e o paradigma do composto-protótipo. **Revista Virtual de Química**. Rio de Janeiro, v.1, n.1, p.26-34, 2009.
- BIELSKA, E.; LUCAS, X.; CZERWONIEC, A.; KASPRZAK, J. M.; KAMINSKA, K. H.; BUJNICKI, J. M.; Virtual screening strategies in drug design – methods and applications, **Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology**, v. 92, n. 3, p. 249-264, 2011.
- BOWIE, J. U; LUTHY, R. ; EISENBERG, D., A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure, **Science**, v. 253, n. 5016, p.164-170, jul., 1991.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Rede Interagencial de Informações para a Saúde, **Data SUS**, 2012. Disponível em:< <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2012/c12.def>>. Acesso em: 29 de nov. de 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids, **Recomendações para Terapia Anti-retroviral em Adultos Infectados pelo HIV**, Brasília – DF, 2008.
- CARVALHO, I.; PUPO, M. T.; BORGES, A. D. L.; BERNARDES, L. S. C., Introdução a Modelagem Molecular de Fármacos no Curso Experimental de Química Farmacêutica, **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p.428-438, 2003.
- CLAUDIO, I. L. P., **Efeito da metformina em sistemas de reparo de DNA**. 103f. 2009. Tese Doutorado. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas, 2009.
- COHEN, N. C., **Guidebook on Molecular Modeling in Drug Design**, Academic Press Inc. An Imprint of Elsevier, 1995.

COSTA, E. C. S.; GONÇALVES, A. A.; AREAS, M. A.; MORGABEL, R. G. B., Os Efeitos da Metformina sobre a Dispersão do Intervalo QT e QTc de Ratos Diabéticos, **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 90, n. 4, p. 254-260, 2008.

CRAMER, C. J.; Essentials of computational chemistry : **theories and models**, 2ª ed., Inglaterra, John Wiley & Sons Ltda, 2004.

EDLER, F. C., Boticas e Farmácias: **Uma história ilustrada da farmácia no Brasil**, Rio de Janeiro: Casa da Palavra, 2006.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D., **Princípios Físico-Químicos em Farmácia**, 2ª ed., São Paulo: Pharmabooks, 2011.

GOODARZI, M.; FREITAS, M. P.; FERREIRA, E. B., Influence of Changes in 2-D Chemical Structure Drawings and Image Formats on the Prediction of Biological Properties Using MIA-QSAR, **Qsar e Combinatorial Science**, v. 28, n. 4, p.458-464, 2009.

HAWLEY, S.; BOUDEAU, J.; REID, J. L.; MUSTARD, K. J.; UDD, L.; MÄKELÄS, T. P.; ALESSI, D. R.; HARDIE, G. D.; Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD α/β and MO25 α/β are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. **Journal Of Biology**, v. 2, n. 4, p.1-28, 2003.

HOWLAND, R. D.; MYCEK, M. J., **Farmacologia Ilustrada**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

HUEY, R.; MORRIS, G. M.; Using AutoDock with AutoDockTools: **A Tutorial**, Torrey Pines RD. La Jolla, Califórnia, EUA, 2006.

JUNIOR, A. C. S.; UGOLINI, M. R.; SANTOMAURO, A. T.; SOUTO, R. P.; Metformina e AMPK: um antigo fármaco e uma nova enzima no contexto da síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 1, p. 120-125, 2008.

KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J., Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews**, v. 3, p. 935-949, nov. 2004.

LI, F.; XIE, Q.; LI, X.; LI, N.; CHI, P.; CHEN, J.; WANG, Z.; HAO, C., Hormone Activity of Hydroxylated Polybrominated Diphenyl Ethers on Human Thyroid Receptor- β : *In Vitro* and *In Silico* Investigations, **Journal Environmental Health Perspectives**, v. 118, n. 5, p. 602-606, 2010.

LIMA, L. M. Química medicinal moderna: desafios e contribuição brasileira. **Revista Química Nova**. Rio de Janeiro, v.30, n.6, p.1456-1468, 2007.

LIPKOWITZ, K. B.; CUNDARI, T. R.; BOY, D. B.; **Reviews in Computational Chemistry**, Nova Jersey: John Wiley & Sons Inc., v. 26, 2008.

LÜTHY, R.; BOWIE, J. U.; EISENBERG, D., Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Nature PublishingGroup**, v. 356, p. 83-85, 1997

MARCILIO, R.; MOREIRA, R. F. A.; MARIA, C. A. B., **Bioquímica do Diabetes Melito**, Interciência, 2011.

MARINHO, V. M. C.; SEIDL, P. R.; LONGO, W. P., A diversidade biológica: uma potencial fonte de vantagem competitiva para a indústria farmacêutica brasileira. **Espacios: Revista Arbitrada de Gestión Tecnológica**, Brasil, v. 29, n. 01, p. 49-67, 2008.

MILLER, W. H., Perspective: Quantum or classical coherence?, **The Journal of Chemical Physics**, v. 136, p. 1-6, 2012.

MISRA, P.; CHAKRABARTI, R., The role of AMP kinase in diabetes, **Indian Journal of Medical Research**, V. 125, n. 3, p. 389-398, mar.2007.

MORGON, N. H.; COUTINHO, K. **Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular**. São Paulo: Livraria da Física, 2007.

MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; RODWELL, V. W. **Bioquímica ilustrada de Harper**, 29º, ed., Porto Alegre: Editora AMGH, 2014.

OLIVEIRA, F. G.; SANT'ANNA, C. M. R. CAFFARENA, E. R.; DARDENNE, L. E.; BARREIRO, E. J., Molecular docking study and development of an empirical binding free energy model for phosphodiesterase 4 inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 6001-6011, 2006.

OLIVEIRA, J. E. P.; MILECH, A., Diabetes Mellitus: **Clínica, Diagnóstico e Tratamento Multidisciplinar**, São Paulo: Editora Atheneu, 2006.

PALMEIRA FILHO, P.; PIMENTEL, V.; GOMES, R.; LANDIM, A.; PIERONI, J., Saúde como desenvolvimento: perspectivas para atuação do BNDS no complexo industrial da saúde, **BNDS Setorial – Complexo Industrial da Saúde**, p. 301-332, 2012.

PIERONI, J.P.; GOMES, R.; PIMENTEL, V.; LOUSADA, M.; O novo cenário de concorrência na indústria farmacêutica brasileira, **BNDS Setorial – Complexo Industrial da Saúde**, v. 39, p. 97-134, 2014.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M., **FARMACOLOGIA**, 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RODRIGUES, R. P.; MANTOANI, S. P.; DE ALMEIDA, J. R.; PINSETTA, F. R.; SEMIGHINI, E. P.; DA SILVA, V. B.;* DA SILVA, C. H. P., Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos, **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, p.739-736, dez., 2012.

SILVA, P.; **Farmacologia**, 8ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

SMITH, J. M.; VAN NESS, H. C.; ABBOTT, M. M., **Introdução à Termodinâmica da Engenharia Química**, Editora LTC, 2007.

TAVARES, L. C.; **QSAR: a abordagem de hansch**, **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 4, p. 631-639, 2004.

WERMUTH, C. G.; GANELLIN, C. R.; LINDBERG, P.; MITSCHER, A. L., Glossary of terms used in Medicinal Chemistry (IUPAC Recommendations 1998), **Pure and Applied Chemistry**, v. 70, n. 5, p. 1129-1143, 1998.

XIAO, B.; SANDERS, M. J.; CARMENA, D.; BRIGHT, N. J.; HAIRE, L. F.; UNDERWOOD, E.; PATEL, B. R.; HEATH, R. B.; WALKER, P. A.; HALLEN, S.; GIORDANETTO, F.; MARTIN, S. R.; CARLING, D.; GAMBLIN, S. J., Structural Basis of AMPK Regulation By Small Molecule Activators, **Nature Communications**, 2013.

XIAOLIM. L.; YE, L.; WANG, X.; WANG, X.; LIU, H.; ZHU, Y.; YU, H., Combined 3D-QSAR, molecular docking and molecular dynamics study on thyroid hormone activity of hydroxylated polybrominated diphenyl ethers to thyroid receptors β , **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 265, p. 300–307, 2012.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B., **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna: métodos de estudo, fitoterápicos e fitofármacos, biotecnologia, patente**, Editora Argos, 2001.

YOUNG, W. F. J., **Sistema Endócrino**, 2ª ed., Rio de Janeiro: Elsevier, v. 2, 2014.

ZANG, M.; ZUCCOLLO, A.; HOU, X.; NAGATA, D.; WALSH, K.; HERSCOVITZ, H.; BRECHER, P.; RUDERMAN, N. B.; COHEN, R. A., AMP-activated Protein Kinase Is Required for the Lipid-lowering Effect of Metformin in Insulin-resistant Human HepG2 Cells, **Journal Of Biological Chemistry**, v. 279, n. 46, p. 898-905, set., 2004.

ZHOU, G.; MYERS, R.; LI, Y.; CHEN, Y.; SHEN, X.; FENYK-MELODY, J.; WU, M.; VENTRE, J.; DOEBBER, T.; FUJII, N.; MUSI, N.; HIRSHMAN, M. F.; GOODYEAR, J.; MOLLER, D. E.; Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. **Journal Of Clinical Investigation**, v. 108, n. 8, p.1167-1174, out., 2001. American Society for Clinical Investigation.