

1. Introdução

1.1 Posicionamento e abordagem do problema

As pesquisas sobre a interação entre as macromoléculas biológicas e drogas envolvem um dos mais importantes tópicos no campo das ciências da vida devido a que os sítios de ligação provêm informação importante sobre o transporte e o metabolismo de moléculas no corpo humano.

A albumina sérica humana é a proteína mais abundante no soro sanguíneo. Sua estrutura obtida por difração de Raios X encontra-se no banco de dados de proteínas, RCSB Protein Data Bank (PDB). Aparece como molécula do mês de janeiro de 2003, nesse site, junto com um resumo sobre sua importância, escrito por David S. Goodsell.

Pensemos o quanto é conveniente sermos capazes de comer. Cada uma das nossas dez trilhões de células precisam de um constante suprimento de nutrição. Mas não temos que nos preocupar com isso – nós simplesmente comemos nossa refeição e nosso corpo faz o resto. O alimento é digerido e os pedaços úteis são distribuídos às células de todo o corpo, usando o fluxo sanguíneo como sistema de transporte. A distribuição de moléculas solúveis em água, como açúcares, é fácil. Elas circulam na corrente sanguínea e são capturadas pelas células ao longo do caminho. Outros nutrientes importantes, no entanto, não são solúveis em água e precisam de carreadores especiais para levá-los até as células famintas.

A albumina sérica (estrutura 1e7i do PDB) tem o papel de carregar ácidos graxos no sangue. Ácidos graxos são essenciais para duas funções principais em nosso corpo. Eles são os blocos para construção dos lipídios, que formam todas as membranas ao redor e dentro das células; são também ricas fontes de energia e podem ser quebrados dentro das células para formar adenosina trifosfato (ATP). Então, nosso corpo mantém uma reserva de ácidos graxos, armazenados como gorduras. Quando o corpo precisa de energia ou de materiais para construção das

suas estruturas, células de gordura liberam ácidos graxos no sangue. Aí, eles são capturados pela albumina sérica e distribuídos a partes do corpo distantes.

A albumina humana é uma proteína versátil. Cada molécula dessa proteína pode carregar sete moléculas de ácidos graxos, que se ligam a fendas profundas na proteína, enterrando suas caudas ricas em carbono, hidrofóbicas, a salvo da água circundante. A albumina sérica também se liga a muitas outras moléculas insolúveis em água. Associa-se, por exemplo, a moléculas de inúmeros fármacos e pode afetar fortemente a maneira como eles são distribuídos através do corpo.

Como a albumina sérica é muito abundante no sangue e tão fácil de purificar, ela foi uma das primeiras proteínas a serem estudadas pelos cientistas. Atualmente, a proteína similar do sangue de boi - albumina sérica bovina ou BSA (do inglês bovine serum albumin) – é largamente utilizada em pesquisa quando se necessita de uma proteína genérica.

A heme (protoporfirina IX complexada com Fe^{+3}) liberada durante a nucleação das células vermelhas ou através da hemólise é capturada pela Albumina Sérica Humana (Human Serum Albumin – HSA) a qual tem uma alta constante de afinidade para este ligante ($K_b \sim 10^8 \text{ M}^{-1}$) (Wardell et al., 2002). Esta forte afinidade tem estimulado esforços para desenvolver albumina como uma hemoproteína artificial para mimetizar, por exemplo, a capacidade de ligação de oxigênio da hemoglobina (Hb) e mioglobina (Mb). O heme, grupo prostético das hemoproteínas, é a protoporfirina IX com um íon Fe^{2+} no centro.

Sérios esforços para desenvolver substitutos do sangue começaram na década de 1980. Esta necessidade se viu aumentada com a aparição do HIV além de vírus como o da hepatite C e outros vírus presentes no sangue de doadores. Diferentemente das células vermelhas do sangue, os substituintes artificiais podem ser esterilizados por pasteurização, ultrafiltração e métodos químicos. Isto elimina os agentes responsáveis pelas infecções, além de permitir armazenamento por longos períodos de tempo.

Pesquisas recentes têm demonstrado que derivados artificiais do heme associados com HSA fornecem uma significativa capacidade de ligação com oxigênio (Tsuchida et al., 1997), representando uma linha promissora no desenvolvimento de substitutos artificiais do sangue. Um dos estudos mais importantes no sentido de criar compostos artificiais da sangue usando albumina estão baseados na mutação da micro-vizinhança molecular do complexo HSA-

heme (Komatsu et al., 2005), mas o problema ainda não resolvido é fazer com que a ligação do oxigênio ao heme seja reversível no micro entorno do heme em HSA.

Na Ressonância Magnética Nuclear (RMN) outra ferro porfirina, a Tetrafenilporfirina Sulfonatada complexada com Fe (FeTPPS₄) é usada como marcador e na Terapia Fotodinâmica (FDT) as porfirinas são usadas para destruir tumores.

Por outro lado a Protoporfirina IX (PPIX) é o precursor de muitas porfirinas que dela se derivam, por conseguinte um adequado conhecimento dos sítios de ligação com a HSA nos forneceria informação importante sobre a natureza das ligações nesse entorno.

Até o momento se sabe que o heme tem um sítio de ligação principal no sub domínio IB de HSA e que poderia ter outros sítios secundários e que a PPIX poderia ter características similares (Zunzain et al., 2003; Zhang et al., 2002), mas até agora não se tem a estrutura cristalina que mostre estes sítios secundários. O presente trabalho tenta revelar essa interrogação e propõe os possíveis sítios secundários.

Sem dúvida devemos saber que nos processos *in vivo* se dão maiores complicações devido a interações entre drogas e ligantes endógenos, para o HSA. Isto é especialmente importante no caso de ácidos graxos os quais ocorrem em níveis de 0.1 e 2 mol por mol de HSA e podem competir ou cooperar com drogas nos sítios de ligação da proteína. (Zunzain et al., 2003)

1.1.1 As Porfirinas

As porfirinas são moléculas importantes em vários aspectos da vida, muito se tem escrito sobre elas, nos tomaremos a descrição que delas se da em <http://pt.wikipedia.org/wiki/Porfirina> .

A estrutura da porfirina é um macrociclo tetrapirrólico (formado por quatro anéis pirrol), ligados por ligações metínicas (-CH-), que possui no seu centro um espaço apropriado para acomodar um íon metálico (Fig. 1.1). Este íon pode-se ligar aos átomos de nitrogênio presentes na parte central da estrutura. Os representantes mais comuns desta classe de compostos são o grupo heme, que contém ferro, a clorofila, que contém magnésio, e os pigmentos biliares. O principal local de síntese de porfirinas é o fígado, nos hepatócitos.

A aumento no nível de porfirinas em nosso organismo geram patologias como a porfiria,

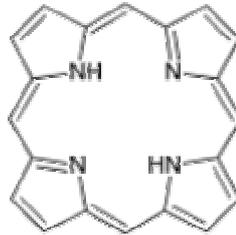


Figura 1.1 Estrutura básica da porfirina (<http://pt.wikipedia.org/wiki/Porfirina>)

Características Fundamentais

Devido a sua estrutura em anel tetrapirrol, um sistema de enlaces duplos conjugados, as porfirinas se caracterizam por uma intensa banda de absorção perto de 400 nm, (com coeficiente de absorção molar maior do que 200.000) conhecida como banda de Soret, propriedade que permite sua detecção e quantificação em laboratórios. Quando irradiada com luz deste comprimento de onda, as porfirinas livres mostram uma intensa fluorescência no vermelho. No caso da PPIX a fluorescência não é muito intensa e quando é complexada com Fe a fluorescência desaparece. A Banda de Soret é seguida por outras bandas de absorção mais fracas (bandas Q), em comprimentos de ondas maiores (450 a 700 nm).

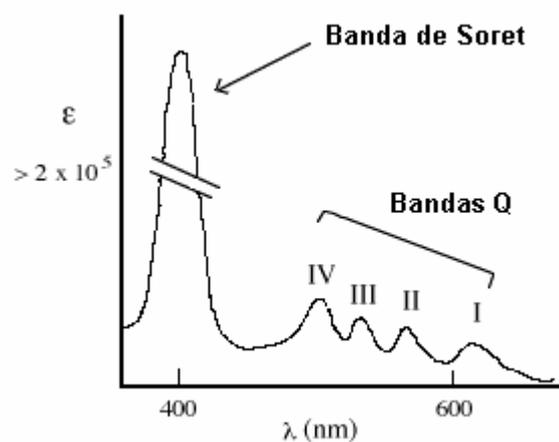


Figura 1.2 Bandas de Soret e bandas Q no espectro de absorção da porfirina.

As variações dos substitutos periféricos no anel da porfirina, causam mudanças de menor importância na intensidade e no comprimento de onda destas absorções. A protonação de dois dos átomos internos de nitrogênio ou a inserção

de um metal na cavidade da porfirina também muda o espectro de absorção visível. Estas variações no espectro de absorção podem ser muito proveitosas na determinação de propriedades características da porfirina.

Importância Biológica

Os complexos de porfirina são essenciais para a vida e têm múltiplas aplicações. O heme (protoporfirina IX-Fe²⁺, Fig. 1.3), por exemplo, é o grupo encarregado de fazer a ligação do oxigênio à hemoglobina e, daí, transportá-lo às diversas partes do corpo.

O precursor na síntese do heme é a protoporfirina IX (PPIX, Fig. 1.3). A inserção do ferro II na PPIX é realizada por meio da enzima ferroquelatase.

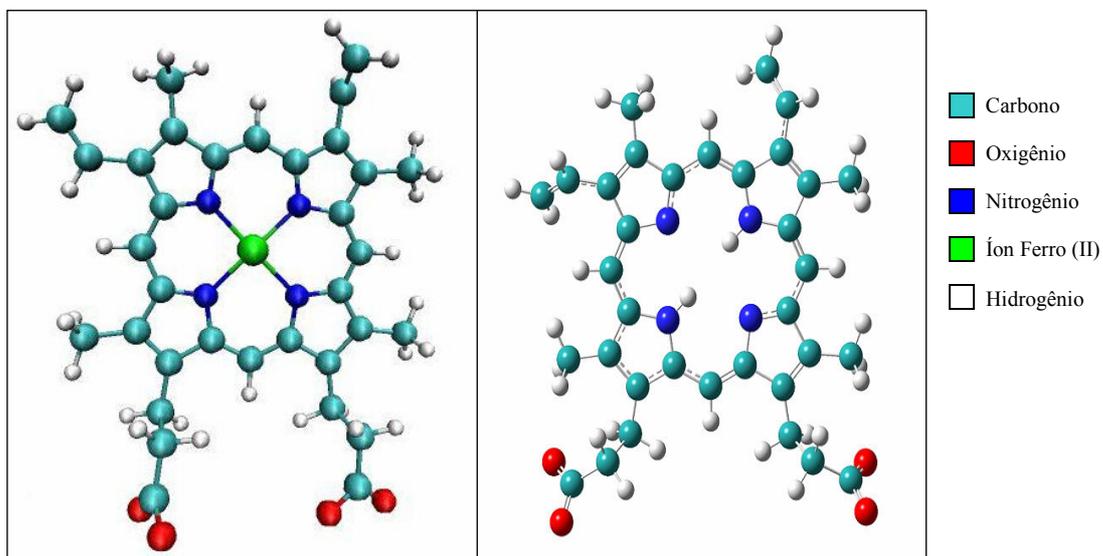


Figura 1.3 Heme (esquerda), PPIX (direita) (Gráfico realizado com o programa Ghemical)

Quando o ciclo de síntese do grupo heme é interrompido se produz o aumento das porfirinas precursoras do heme, isto termina gerando uma grave doença chamada porfíria. A porfíria, pode-se classificar como hepática e eritropoiética, é responsável por ataques neurológicos agudos e problemas de pele, geralmente erupções de bolhas sensíveis à luz solar e crescimento aumentado de pêlos.

As propriedades óticas das porfirinas são responsáveis por sua grande aplicação na área de eletrônica molecular assim como sua incorporação na forma sintética em células solares.

Aplicações das Porphirinas

Materiais Químicos

Porfirinas e metaloporfirinas têm uma ampla aplicação como fotosensores, particularmente para aplicações opto-eletrônicas. Por exemplo, a fácil substituição dos componentes periféricos das porfirinas tem gerado uma série de materiais líquido-cristalinos incomuns (Chou et al., 2000).

As propriedades óticas não lineares destes materiais são de especial interesse, em parte pela transferência de energia com controle molecular, e em parte por aplicações em comunicação óptica, armazenamento de dados e processamento de sinais eletro-ópticos. (Chou et al., 2000)

As porfirinas têm presença relevante na nanotecnologia devido à possibilidade de construir nanotubos por auto agregação. Nesse sentido numerosos estudos vêm se desenvolvendo. Tem sido demonstrado que os nanotubos contendo Sn porfirinas são fotocatalíticos e podem reduzir íons metálicos em solução aquosa (Rotomskis et al., 2004).

Metaloporfirinas como catalisadores para síntese macromolecular

Em 1978 Inoue Takeda e colaboradores em seus estudos de fixação de dióxido de carbono com metaloporfirinas descobriram o potencial utilidade de metalo-proteínas como catalisadores para a síntese controlada de macromoléculas. (Takeda et al., 1978). Em várias metaloporfirinas, estudaram compostos de alumínio ou zinco no anel central para fixação química do dióxido de carbono.

Terapia Fotodinâmica (PDT, Photodynamic Therapy)

Devido ao comportamento particular das porfirinas sob ação da luz, estas têm sido aplicadas para combater o câncer. Nos anos 70 (Diamond et al., 1972; Dougherty et al; 1978) mostrou-se através de probas in vitro e in vivo que derivados de hemoporfirina (HpD) irradiados com luz têm capacidade de destruição dos tumores. Atualmente diferentes tipos de porfirinas são investigados e utilizadas na luta contra o câncer.

1.1.2 A albumina Serica Humana

A albumina sérica é a mais abundante proteína do plasma humano, produzida no fígado, é um monômero de 66 kDa. Estruturalmente, a albumina é composta de vários segmentos em alfa hélice, que se agrupam para formar dois subdomínios (A e B). Três pares idênticos destes subdomínios se unem para formar a albumina (Fig. 1.4).

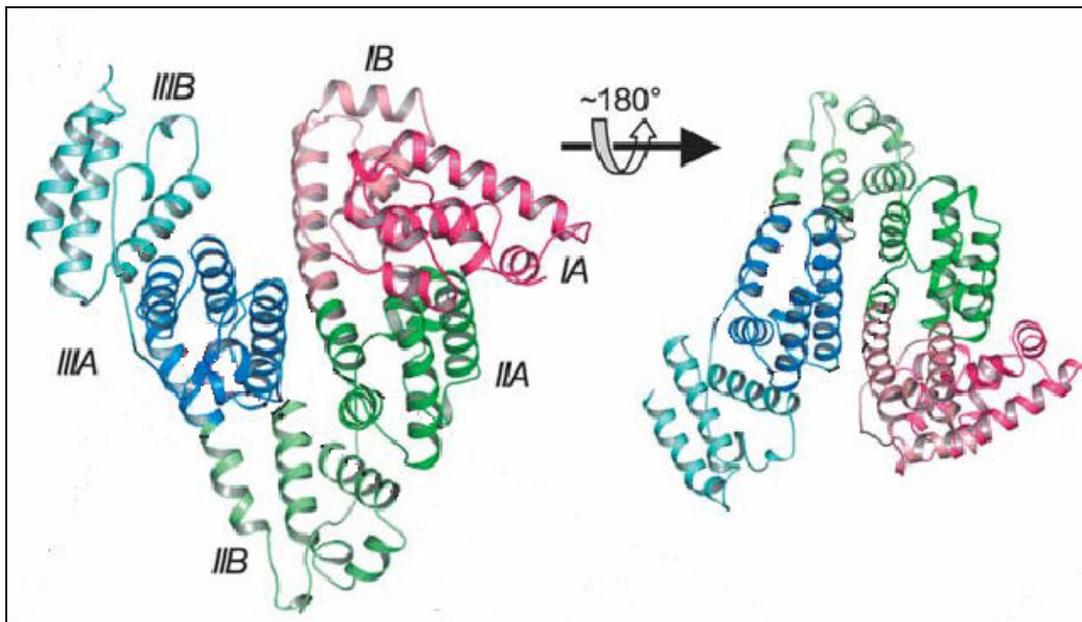


Figura 1.4 Esquema da estrutura secundária de HSA com subdomínios codificados por cores da seguinte forma: IA,vermelho; IB – vermelho claro; IIA,verde; IIB – verde claro; IIIA, azul; IIIB – azul claro. (Obtido de Ghuman et al., 2005)

O HSA tem características específicas que são importantes para a estrutura e função: 18 resíduos de tirosina, 6 resíduos de metionina, 1 resíduos de triptofano, 59 resíduos de lisina, 1 resíduo de cisteína (Cys-34), e 17 pontes dissulfetos. (Wong et al., 2007).

A cisteína livre tem um sulfidril reduzido que é responsável por mais de 75% dos grupos tiol no plasma. O tiol é envolvido em várias reações bioquímicas que inativam as espécies reativas de oxigênio, dando à albumina um papel antioxidante importante em nosso corpo (Wong et al., 2007).

A albumina tem uma concentração plasmática típica de 35 - 45 g/l, que representa 30 a 40% da albumina sintetizada no fígado. O restante encontra-se

distribuído entre os músculos e a pele. Sua principal função fisiológica é manter a pressão osmótica.

Esta proteína é caracterizada por sua habilidade de ligar uma ampla variedade de moléculas hidrofóbicas, ácidos graxos, bilirrubina, hemina, tiroxina e esteróides. Serve como um solubilizador e transportador destes compostos. HSA tem alta afinidade pelo heme, sendo a constante de dissociação ~ 10 nM em uma mistura 3:5 de dimetil sulfóxido e água (Zunzain et al., 2003). Na Fig 1.5 pode se observar os sítios de ligação principais de diversos ligantes.

Estudos de ligação indicam um só sítio de ligação para a hemina, no subdomínio IB, o qual corresponde a um dos sítios de ligação para ácidos graxos (Zunzain et al., 2003).

Um dos fatores mais importantes que afetam a distribuição e a concentração ativa de muitas drogas no organismo é a afinidade pela HSA. Um grau de afinidade pela albumina é desejável, para ajudar a solubilizar substâncias que de outra forma poderiam agregar-se e ser pobremente distribuídas. No caso oposto, drogas com uma grande afinidade pela proteína requereriam grandes doses para atingir uma concentração efetiva in vivo, seriam lentamente distribuídas aos sítios de ação e poderiam não ser eficientemente eliminadas.

Funções fisiológicas da albumina

Pressão Osmótica Coloidal

A função mais importante da albumina é manter a pressão osmótica coloidal. A albumina provê 60% da pressão osmótica coloidal. A proteína é negativamente carregada e, por conseguinte atrai íons de sódio, os quais por sua vez retêm a água. A albumina também atrai outros íons positivos osmoticamente ativos (efeito Gibbs-Donnan) os quais aumentam a retenção da água (Nguyen et al., 2006).

Associação de ligantes

A organização estrutural globular da HSA dá a possibilidade de se ligar com várias substâncias em múltiplos sítios da molécula, unindo-se assim a vários componentes endógenos e exógenos. Estes compostos incluem ácidos graxos, bilirrubina, metal, tiroxina e triptofano, assim como drogas que têm características ácidas ou eletronegativas (e.g. warfarina, diazepam e ibuprofeno). Estas

características fazem com que a HSA seja um dos maiores transportadores de fármacos no sangue (Fig 1.5).

A HSA pode facilitar a ativação de várias substâncias, tais como hormônios ou drogas, ou diminuir a presença de toxinas no plasma. Por exemplo, a ligação do triptofano a HSA regula a deposição deste nos tecidos. Em pacientes com uma avançada cirrose e hipoalbuminemia, a diminuição dos sítios de ligação gera uma quantidade adicional de triptofano livre o qual pode gerar o desenvolvimento de encefalopatia hepática (Greco et al; 2000).

A ligação de HSA também afeta a farmacocinética e eficácia de muitas drogas. Por exemplo, drogas com alta afinidade pelo HSA têm que ser administradas em altas doses para atingir uma efetiva concentração in vivo; sua distribuição nos sítios de ação poderia ser reduzida ou mesmo eliminada. Apesar disso, uma alta ligação da droga com a HSA poderia ser desejável porque ajudaria a solubilizar compostos que de outra forma formariam agregados e seriam pobremente eliminados.

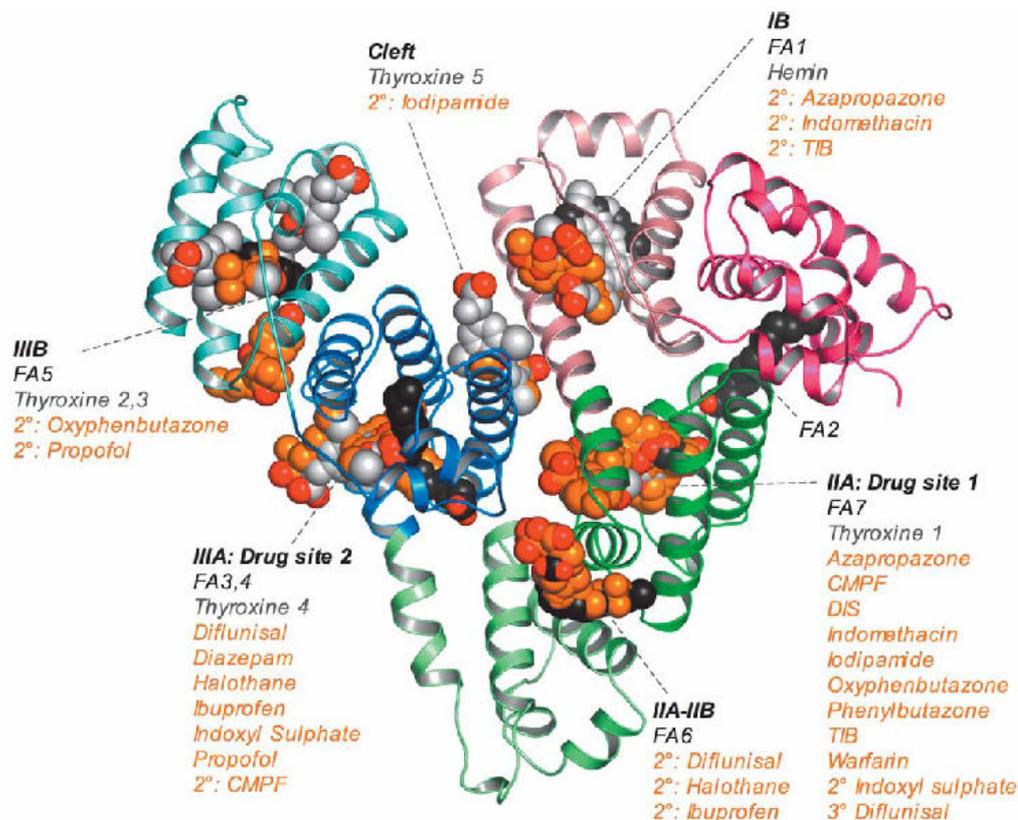


Figura 1.5 Esquema mostrando os sítios de vários ligantes da albumina sérica humana (Ghuman et al., 2005).

Efeitos Antioxidantes

Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são extremamente voláteis e capazes de reagir com outras moléculas, que dão origem à acumulação de produtos tóxicos finais e dano celular. Estudos in vivo têm mostrado que o HSA pode ligar e, por conseguinte, remover neutrófilos derivados de espécies reativas de oxigênio, regulando a sinalização celular que é ativada nos processos inflamatórios (Kouoh et al., 1999).

HSA também influencia o status redox do plasma ao ligar metais como o ferro e o cobre que de outra forma se transformariam em formas redox-ativas (Kragh-Hansen et al., 2002).

Desta forma o HSA tem um papel antioxidante importante em situações de inflamação.

Patologia

Hipoalbuminemia

Baixos níveis de HSA (hypoalbuminemia) podem ser causados por:

- Doenças no fígado/ Cirrose do fígado (a mais comum)
- Decréscimo na produção de HSA (má nutrição/má absorção)
- Excessiva excreção pelos rins (síndrome nefrótica)
- Excesso de perda no intestino (Redistribuição hemodiluição, como na gravidez, incremento da permeabilidade vascular).

Hyperalbuminemia

- Sinal de desidratação

1.2 Objetivos

Essa dissertação tem os seguintes objetivos principais:

- i. Determinar a relação estrutura-solvente das porfirinas, as camadas de solvatação e seu comportamento hidropático.
- ii. Caracterizar, usando técnicas de Dinâmica Molecular, o sítio principal de ligação, determinando os aminoácidos que compõem estes sítios e seu rol na estabilidade do ligante.
- iii. Determinar possíveis sítios secundários de ligação das porfirinas PPIX, PPIX-Fe²⁺ na HSA, usando técnicas de *Docking* Molecular.
- iv. Determinar o padrão de correlação do HSA e como este muda pela presença das porfirinas.

1.3 Estrutura dos Capítulos

No capítulo 2 apresentam-se uma descrição da Metodologia e Técnicas Computacionais usadas no presente estudo. As principais técnicas que usamos são: Cálculo Quântico, Dinâmica Molecular e Docking Molecular,

O desenvolvimento deste capítulo nos itens 2.1-2.4 e 2.6-2.9 está baseado no manual do GROMACS (van der Spoel et al., 2005) e no trabalho de Baanden M. (Baanden M., 2003). Quando as informações apresentadas sejam tomadas de outras fontes, se fará a respectiva citação.

No capítulo 3 apresentam-se os Resultados e Discussão do presente trabalho

No capítulo 4 apresentam-se as Conclusões e Perspectivas.

