

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ESTUDO COMPUTACIONAL DAS MONOAMINOXIDASES A E B COM
SUBSTRATOS E INIBIDORES**

VANESSA PETRY DO CANTO

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

VANESSA PETRY DO CANTO

**ESTUDO COMPUTACIONAL DAS MONOAMINOXIDASES A E B COM
SUBSTRATOS E INIBIDORES**

Dissertação apresentada como
requisito parcial para a obtenção do
título de Mestre em Química.

Prof. Dr. Paulo Augusto Netz
Orientador

Porto Alegre, fevereiro de 2014.

A presente dissertação foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre 04/2012 e 02/2014, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação do Professor Doutor Paulo Augusto Netz. A dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Química pela seguinte banca examinadora:

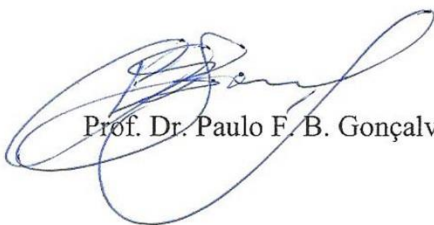
Comissão Examinadora:



Prof. Dr. Ricardo B. de Alencastro



Prof. Dr. Rafael A. Caceres



Prof. Dr. Paulo F. B. Gonçalves



Prof. Dr. Paulo Augusto Netz
Orientador



Vanessa Petry do Canto
aluna

“Tudo vale a pena se a alma não é pequena.”

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Paulo Netz, pelo apoio, compreensão, paciência e pelos valiosos ensinamentos.

Aos professores e colegas do GQT e da UFRGS.

À CAPES, pelo suporte financeiro.

Ao Centro Nacional de Supercomputação – CESUP/UFRGS, pelo suporte operacional.

À toda minha família, pelo apoio material e emocional.

À todos que me ajudaram, de uma forma ou de outra, na finalização deste trabalho.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	OBJETIVOS	5
1.1.1	<i>Objetivos Gerais</i>	5
1.1.2	<i>Objetivos Específicos</i>	5
2	MONOAMINOXIDASES	6
2.1	IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA	6
2.2	ASPECTOS ESTRUTURAIS.....	6
2.2.1	<i>Cofator FAD</i>	13
2.2.2	<i>Sítio Ativo</i>	15
2.3	SUBSTRATOS	17
2.4	INIBIDORES	18
2.5	CONSIDERAÇÕES MECANÍSTICAS.....	19
3	METODOLOGIAS	22
3.1	DOCKING.....	22
3.2	DINÂMICA MOLECULAR	23
3.3	ENSEMBLE DOCKING.....	25
4	PROCEDIMENTOS COMPUTACIONAIS	28
4.1	OBTENÇÃO DAS ESTRUTURAS.....	28
4.2	DOCKING.....	28
4.3	DINÂMICA MOLECULAR	31
4.4	ENSEMBLE DOCKING	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1	DOCKING.....	36
5.2	DINÂMICA MOLECULAR	46
5.3	ENSEMBLE DOCKING.....	74
6	CONCLUSÕES	80
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: "Esqueleto" 1,4-naftoquinona	3
Figura 2: Estrutura dos ligantes estudados	4
Figura 3: Arquivo <i>FASTA</i> da enzima MAO-A, <i>PDB-ID</i> 2BXR	7
Figura 4: Arquivo <i>FASTA</i> da enzima MAO-B, <i>PDB-ID</i> 1GOS.....	7
Figura 5: Alinhamento das sequências de aminoácidos da MAO-A e MAO-B.	8
Figura 6: Estrutura cristalográfica da MAO-A e da MAO-B.	9
Figura 7: Estrutura da MAO-A, com <i>zoom</i> no sítio ativo.....	11
Figura 8: Estrutura da MAO-B, com <i>zoom</i> no sítio ativo.....	12
Figura 9: Estrutura completa do cofator FAD	13
Figura 10: Estrutura do anel isoaloxazina do FAD	14
Figura 11: Estrutura do anel flavina do FAD, oxidada (a) e reduzida (b).....	14
Figura 12: "Gaiola aromática" do sitio ativo, (a) MAO-A e (b) MAO-B.	16
Figura 13: Mecanismos de ação da MAO.....	20
Figura 14: Mecanismo de abstração de hidreto.....	20
Figura 15: Esquema das etapas essenciais de uma simulação por DM.	24
Figura 16: Esquema do <i>Ensemble Docking</i>	26
Figura 17: Visualização do <i>grid</i> , centrado na enzima.	29
Figura 18: Estrutura dos ligantes no estado de protonação usado no <i>docking</i>	30
Figura 19: Sistemas selecionados para as simulações de Dinâmica Molecular.....	31
Figura 20: Estruturas de partida para DM, MAO-A, com os diferentes ligantes... ..	33
Figura 21: Estruturas de partida para DM, MAO-B, com os diferentes ligantes	34
Figura 22: Interações entre o ligante A2 (azul) com resíduos da MAO-A.....	40
Figura 23: Interações entre o ligante A2 (azul) com resíduos da MAO-B.....	40
Figura 24: Interações entre o ligante menadiona com resíduos da MAO-A.	41
Figura 25: Interações entre o ligante menadiona com resíduos da MAO-B.	41
Figura 26: Interações entre o ligante dopamina com resíduos da MAO-A.	44
Figura 27: Interações entre o ligante dopamina com resíduos da MAO-B.	44
Figura 28: Interações entre o ligante serotonina (ciano) com resíduos da MAO-A. .	45
Figura 29: Interações entre o ligante serotonina (ciano) com resíduos da MAO-B. .	45
Figura 30: Sobreposição da estrutura inicial da MAO-A sem ligante (cinza), após 10 ns (roxo), 50 ns (verde) e 100 ns (laranja).....	47

Figura 31: Sobreposição da estrutura inicial da MAO-B sem ligante (cinza), após 10 ns (roxo), após 50 ns (verde) e após 100 ns (laranja).	48
Figura 32: <i>RMSD</i> do complexo para os diferentes sistemas com a MAO-A.....	49
Figura 33: <i>RMSD</i> do complexo para os diferentes sistemas com a MAO-B.....	49
Figura 34: <i>RMSD</i> do complexo para os diferentes sistemas com a MAO-A, sem porção C-terminal.	50
Figura 35: <i>RMSD</i> do complexo para os diferentes sistemas com a MAO-B, sem porção C-terminal	51
Figura 36: Ligações de hidrogênio entre o FAD da MAO-B e os ligantes dopamina, serotonina e A2.	52
Figura 37: Ligações de hidrogênio entre a MAO-A e os ligantes (a) dopamina, (b) menadiona, (c) serotonina e (d) A2.	53
Figura 38: Ligações de hidrogênio entre a MAO-A e os ligantes (a) dopamina, (b) menadiona, (c) serotonina e (d) A2.	54
Figura 39: Visualização da alça da superfície do sítio ativo, em verde, e alça da cavidade do sítio ativo, em preto.	54
Figura 40: Distância entre os resíduos Gly110 e Asn117, extremidades da alça da superfície do sítio ativo, para MAO-A.	56
Figura 41: Distância entre os resíduos Gly101 e Asn108, extremidades da alça da superfície do sítio ativo, para MAO-B.	56
Figura 42: Distância entre os resíduos Ser209 e Glu216, da alça da cavidade do sítio ativo.....	57
Figura 43: Distância entre os resíduos Ser200 e Glu207.	57
Figura 44: Distância entre o FAD e o resíduo Phe112	58
Figura 45: Distância entre o FAD e o resíduo Phe103	58
Figura 46: Distância entre o FAD e o resíduo Gly213	59
Figura 47: Distância entre o FAD e o resíduo Gly204	59
Figura 48: Alguns resíduos do sítio ativo da MAO-A (a) e da MAO-B (b).....	60
Figura 49: <i>RMSF</i> ligantes do sítio ativo da MAO-A	60
Figura 50: <i>RMSF</i> ligantes sítio ativo da MAO-B.	61
Figura 51: Distância entre FAD e o resíduo Leu97, MAO-A.....	63
Figura 52: Distância entre o FAD e o resíduo Leu88 MAO-B.....	64
Figura 53: Distância entre os ligantes Glu216 e Phe352, MAO-A.....	65
Figura 54: Distância entre os resíduos Glu207 e Phe343, MAO-B.....	66

Figura 55: Distância entre os resíduos do "sanduíche aromático" Tyr407 e Tyr444, MAO-A.....	67
Figura 56: Distância entre os resíduos do "sanduíche aromático" Tyr398 e Tyr435, MAO-A.....	67
Figura 57: Distância entre os resíduos Ile335 e Phe208, MAO-A.	68
Figura 58: Distância entre os resíduos Tyr326 e Ile199, MAO-B.....	68
Figura 59: MAO-A sem ligante – sobreposição das estruturas inicial (cinza), após 10 ns (roxo), 50 ns (verde) e 100 ns (laranja).....	69
Figura 60: MAO-A + A2 – sobreposição das estruturas inicial (cinza), após 10 ns (roxo), 50 ns (verde) e 100 ns (laranja).	70
Figura 62: MAO-A + menadiona – sobreposição das estruturas inicial (cinza), após 10 ns (roxo), 50 ns (verde) e 100 ns (laranja).....	71
Figura 63: MAO-B sem ligante – sobreposição das estruturas inicial (cinza), após 10 ns (roxo), 50 ns (verde) e 100 ns (laranja).....	71
Figura 64: MAO-B + A2 – sobreposição das estruturas inicial (cinza), após 10 ns (roxo), 50 ns (verde) e 100 ns (laranja).	72
Figura 66: MAO-B + menadiona – sobreposição das estruturas inicial (cinza), após 10 ns (roxo), 50 ns (verde) e 100 ns (laranja).....	73
Figura 67: Sítio ativo da MAO-A (a) e da MAO-B (b) complexadas com a MENADIONA.....	74
Figura 68: <i>Ensemble Docking</i> – triplicatas para os sistemas (a) MAO-A + A2, (b) MAO-A + MENADIONA, (c) MAO-B + A2 e (d) MAO-B + MENADIONA.	75
Figura 69: <i>Docking</i> da MAO-A com os ligantes (a) A2, (b) dopamina, (c) menadiona e (d) serotonina.	76
Figura 70: <i>Docking</i> da MAO-B com os ligantes (a) A2, (b) dopamina, (c) menadiona e (d) serotonina, receptores obtidos por <i>snapshots</i>	77
Figura 71: <i>Docking</i> da MAO-A com os ligantes (a) A2, (b) dopamina, (c) menadiona e (d) serotonina, receptores obtidos por <i>cluster</i>	78
Figura 72: <i>Docking</i> da MAO-B com os ligantes (a) A2, (b) dopamina, (c) menadiona e (d) serotonina, receptores obtidos por <i>cluster</i>	79

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Sequência de resíduos que fazem parte dos domínios do FAD, substrato e C-terminal.....	10
Tabela II: Resíduos do sítio ativo da MAO-A e da MAO-B*	15
Tabela III: Resultados <i>docking</i> MAO-A e MAO-B, energias e ligações de hidrogênio (HB).	37
Tabela IV: Relação das interações entre os ligantes derivados da 1,4-NQ, A2, B2, C2, menadiona, lapachol e norlapachol, com a MAO-A.	38
Tabela V: Relação das interações entre os ligantes derivados da 1,4-NQ, A2, B2, C2, menadiona, lapachol e norlapachol, com a MAO-B.	39
Tabela VI: Relação das interações entre os ligantes clorgilina, dopamina, selegilina e serotonina, com a MAO-A.	42
Tabela VII: Relação das interações entre os ligantes clorgilina, dopamina, selegilina e serotonina, com a MAO-B.	43
Tabela VIII: Número médio de ligações de hidrogênio	52
Tabela IX: Sequência de resíduos representantes da alça da superfície e da alça da cavidade do sítio ativo, para MAO-A e MAO-B.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,4-NQ	"esqueleto" 1,4-naftoquinona
<i>ADT</i>	programa <i>AutoDock Tools</i>
Ala	alanina
Arg	arginina
Asn	asparagina
Asp	ácido aspártico
Cys	cisteína
DM	Dinâmica Molecular
E+L	complexo ENZIMA + LIGANTE
E+S	complexo ENZIMA + SUBSTRATO
FAD	cofator Flavina Adenina Dinucleotídeo
FADH2	cofator FAD na forma reduzida
Gln	glutamina
Glu	ácido glutâmico
Gly	glicina
HB	ligação de hidrogênio
His	histidina
Ile	isoleucina
Leu	leucina
<i>LGA</i>	algoritmo genético lamarckiano
Lys	lisina
MAO	monoaminoxidase
MAO-A	monoaminoxidase isoforma A
MAO-B	monoaminoxidase isoforma B
Met	metionina
<i>PDB</i>	<i>Protein Data Bank</i>
<i>PDB-ID</i>	código de identificação da estrutura no <i>PDB</i>
Phe	fenilalanina
<i>PME</i>	<i>Particle Mesh Ewald</i>
Pro	prolina
<i>RMSD</i>	desvio médio quadrático
<i>RMSF</i>	flutuação média quadrática

<i>ROS</i>	espécies reativas de oxigênio
Ser	serina
SNC	sistema nervoso central
<i>SPC</i>	modelo de água <i>Simple Point Charge</i>
Thr	treonina
Trp	triptofano
Tyr	tirosina
Val	valina
VDW	van der Waals
<i>VINA</i>	programa AutoDock Vina

RESUMO

A monoaminoxidase (MAO) é uma enzima importante, que pode atuar como alvo terapêutico. Inibidores da MAO-A apresentam atividade no tratamento de distúrbios de humor, enquanto os inibidores seletivos da MAO-B tem uso, especialmente, no tratamento da Doença de Parkinson. O conhecimento das interações ENZIMA-INIBIDOR é importante no planejamento de fármacos. Nesse contexto, foram realizados estudos das enzimas MAO-A e MAO-B com diferentes ligantes, através da combinação das metodologias de *docking*, Dinâmica Molecular e *Ensemble Docking*. Foram escolhidos os ligantes derivados da 1,4-naftoquinona (1,4-NQ), lapachol, menadiona, norlapachol, A2, B2 e C2, os inibidores comerciais clorgilina (MAO-A) e selegilina (MAO-B) e os substratos naturais serotonina (MAO-A) e dopamina (MAO-B). Os resultados do *docking* mostraram interação de todos os ligantes com algum dos resíduos da "gaiola aromática" (FAD, Tyr407/Tyr444 para MAO-A, Tyr398/Tyr435 para MAO-B), uma importante região catalítica da MAO. Além disso, a seletividade observada experimentalmente da menadiona com a MAO-B também foi observada no *docking*. Através da DM, foi possível observar algumas diferenças conformacionais entre as estruturas da MAO-A e MAO-B, que podem explicar a seletividade entre as duas isoformas, como por exemplo, distâncias entre resíduos do sítio ativo e ligações de hidrogênio. A partir do *Ensemble Docking*, foi verificado que a conformação do receptor influencia significativamente o escore das interações ENZIMA+LIGANTE para ligantes volumosos.

Palavras-chave: MAO-A, MAO-B, FAD, *docking*, Dinâmica Molecular e *Ensemble Docking*.

ABSTRACT

Monoamine oxidase (MAO) is an important enzyme that acts as therapeutic target. MAO-A inhibitors show pharmacological activity in the treatment of mood disorders, whereas MAO-B inhibitors are used especially in treatment of Parkinson's Disease. Knowledge of enzyme-inhibitor interactions is important in drug design. Therefore, studies of MAO-A and MAO-B enzymes with different ligands were performed by combining *docking*, Molecular Dynamics and Ensemble Docking methodologies. Ligands derived from 1,4-naphthoquinone, lapachol, menadione, nor-lapachol, A2, B2, C2, commercial inhibitors clorgyline (MAO-A) and selegiline (MAO-B) and the natural substrates serotonin (MAO-A) and dopamine (MAO-B) were chosen. The docking results shows interactions of all ligands with some residue of the "aromatic cage" (FAD cofactor, Tyr407/Tyr444 for MAO-A and Tyr398/Tyr435 for MAO-B), an important catalytic region of MAO. Furthermore, the experimentally observed selectivity of menadione with MAO-B was also observed by Docking. In Molecular Dynamics results, conformational differences were observed between MAO-A and MAO-B structures, which could explain the selectivity observed between isoforms, e.g. distances between residues of the active site and hydrogen bonds. Ensemble Docking results shows that the conformation of the receptor significantly influence the score of ENZYME+LIGAND interactions for bulky ligands.

Keywords: MAO-A, MAO-B, FAD, docking, Molecular Dynamics and Ensemble Docking.

1 INTRODUÇÃO

A indústria farmacêutica, bastante inovadora, requer altos investimentos em pesquisa e desenvolvimento na busca por novos fármacos. Ao mesmo tempo, este setor é um dos mais rentáveis, tanto a nível nacional, quanto mundial, conseqüentemente, bastante competitivo. A construção do conhecimento científico, desenvolvido especialmente na academia, atrelada à busca por inovações terapêuticas, foco da indústria farmacêutica, faz com que a parceria entre indústria e academia seja cada vez maior.¹

Atualmente, a identificação de novas drogas é auxiliada por métodos *in silico*, isto é, por computador.^{2,3} A Química Computacional, associada ao desenvolvimento dos computadores a partir da década de 50, é uma ferramenta que pode ser usada na interpretação e previsão de estruturas moleculares e suas propriedades, mesmo de espécies que ainda não foram sintetizadas, isto é, são apenas “virtuais”. O constante aumento da capacidade computacional, juntamente com o aprimoramento de *softwares* específicos, faz com que os métodos *in silico* sejam ferramentas cada vez mais importantes no planejamento de fármacos.⁴

Dentre essas metodologias estão o *docking*^a e a simulação por Dinâmica Molecular (DM), sendo que uma das estratégias dessas metodologias é o estudo das interações de diversos ligantes, ou drogas em potencial, com um determinado alvo macromolecular, também denominado de receptor. A combinação dessas metodologias permite uma análise estática (rígida) e também dinâmica da interação receptor-ligante, avaliando não só aspectos energéticos, mas sobretudo, informações estruturais.^{5,6,7,8}

A busca por “novos” fármacos pode ser realizada através da construção de uma espécie nova, que atue sobre um determinado alvo já conhecido, mas também pode ser através do uso de moléculas já existentes, que possam ter ação sobre um alvo ainda não explorado. Um exemplo disso é a investigação do uso da pioglitazona (Actos®), que é um fármaco originalmente antidiabetes, mas também apresentou ação como inibidor da monoaminoxidase.⁹

^a O termo *docking*, cujo correspondente em português ainda não é consensual (docagem ou ancoragem), será mantido, no presente trabalho, devido ao seu uso estar bastante difundido, inclusive em obras de referência 3, além do termo estar associado com a metodologia de *Ensemble Docking*.

As enzimas são catalisadores biológicos que atuam em praticamente todas as reações bioquímicas responsáveis pela vida. A atividade enzimática pode ser controlada, tanto através da disponibilidade da enzima (balanço entre síntese e degradação), quanto através de mudanças estruturais, ou conformacionais, que podem ser induzidas quando complexadas com outras moléculas (ligantes). Isso faz com que as enzimas sejam importantes alvos farmacêuticos, sendo que muitas drogas são inibidores enzimáticos.^{10,11} Um exemplo bastante importante são os estudos com as enzimas relacionadas com o vírus causador da AIDS, como a *HIV protease*, em que metodologias computacionais auxiliaram na otimização de fármacos com atividade inibitória.^{3,12,7,13} Os estudos experimentais requerem a obtenção das enzimas isoladas e purificadas, o que nem sempre é possível. Já para os estudos *in silico* são utilizadas, geralmente, estruturas depositadas em bancos de dados, como o *PDB*, (do inglês *Protein Data Bank*), por exemplo. Atualmente, no *PDB* estão depositadas 89969 estruturas de proteínas, a maioria (89,2%) determinada por difração de raios X.¹⁴ Nesse contexto, o planejamento de fármacos assistido por computador é uma ferramenta que pode beneficiar a busca por inovações terapêuticas, reduzindo tempo e custos.²

A importância biológica das monoaminoxidases faz com que também sejam importantes alvos terapêuticos. As monoaminoxidases A (MAO-A) e B (MAO-B) são enzimas que catalisam a desaminação oxidativa de monoaminas endógenas, como alguns neurotransmissores, ou exógenas, como a tiramina.¹⁵ Ambas são flavoenzimas, isto é, tem o cofator FAD em suas estruturas.

Essas enzimas apresentam especificidade de substratos, assim, os inibidores seletivos da MAO-A são associados, geralmente, ao tratamento de distúrbios de humor (associados com a serotonina), enquanto os inibidores seletivos da MAO-B tem papel importante na Doença de Parkinson (associada com a dopamina). Além disso, devido à associação com o processo de *stress oxidativo*, seus inibidores também podem estar relacionados com possíveis efeitos neuroprotetores.^{16,17} O papel da MAO em distúrbios neurodegenerativos, especialmente relacionados com o envelhecimento, renovou o interesse dessas enzimas como alvo para agentes neuroprotetores.¹⁸ O tratamento da Doença de Parkinson envolve, em geral, reposição de dopamina através de seu precursor L-dopa, cujo efeito pode ser potencializado pela administração conjunta de inibidores seletivos da MAO-B. Assim,

apesar dos avanços já verificados no desenvolvimento de inibidores da MAO, o planejamento de novas drogas pode contribuir de forma significativa no aumento da qualidade de vida nos pacientes com Doença de Parkinson.

O estudo dessas enzimas, assim como das suas interações com moléculas com potencial atividade inibitória é importante, especialmente na busca de inibidores com alta seletividade e menores efeitos colaterais. Vários estudos relacionados a inibidores da MAO tem sido realizados.^{9,19,20} Entre eles, resultados obtidos por Follmer e colaboradores,²¹ mostraram que a menadiona ou vitamina K3 (2-metil-1,4-naftoquinona) age como um inibidor seletivo da MAO-B, com seletividade de cerca de 60 vezes maior para MAO-B do que para a MAO-A. Este valor é comparável à seletividade da rasagilina, um inibidor seletivo da MAO-B usado clinicamente para Doença de Parkinson. Além disso, a menadiona age como inibidor reversível da MAO-B, ao contrário da rasagilina e selegilina, que são inibidores irreversíveis.¹⁵ Esses resultados sugerem que a estrutura 1,4-naftoquinona, Figura 1, presente na menadiona, pode ser usada como "esqueleto" para o desenvolvimento de novos inibidores seletivos da MAO-B.

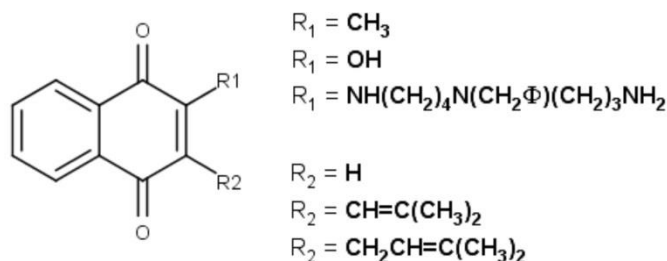


Figura 1: "Esqueleto" 1,4-naftoquinona

O conhecimento das interações enzima-inibidor é importante no planejamento de fármacos, sendo assim, no presente trabalho serão realizados estudos das enzimas MAO-A e MAO-B com diferentes ligantes, através da combinação das metodologias de *docking*, Dinâmica Molecular e *Ensemble Docking*. Foram selecionados os ligantes derivados da 1,4-naftoquinona (1,4-NQ) lapachol, menadiona, norlapachol, e seus respectivos derivados com grupo benzil-espermidina na posição R1, mostrada na Figura 1, denominados A2, B2 e C2. Também foram selecionados os inibidores comerciais da MAO-A e da MAO-B, clorgilina e selegilina, respectivamente, assim como os substratos naturais

serotonina (MAO-A) e dopamina (MAO-B). Suas estruturas, construídas no *MarvinSketch*,²² são mostradas na Figura 2.

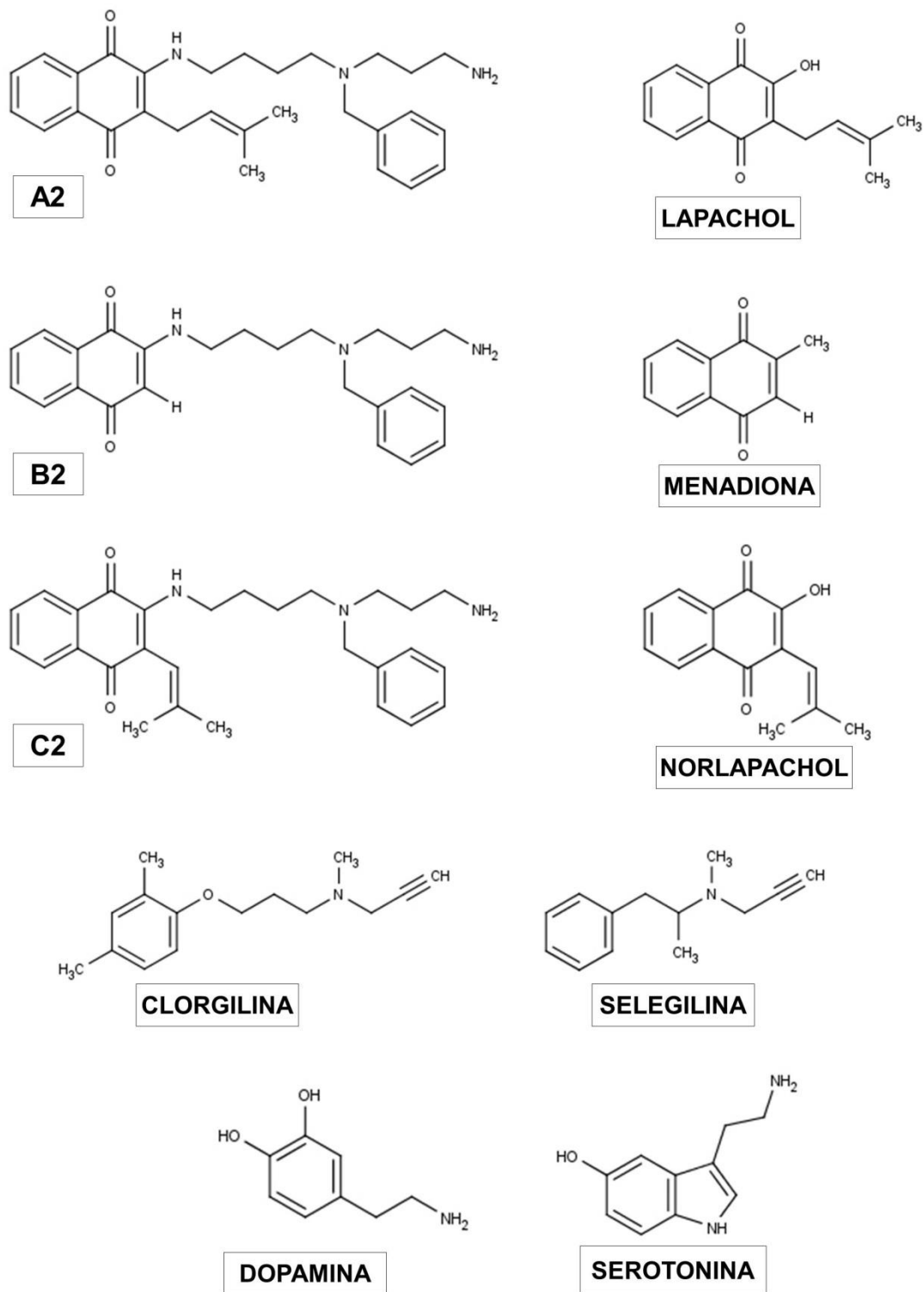


Figura 2: Estrutura dos ligantes estudados

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivos Gerais

Estudar a MAO-A e a MAO-B humanas e suas interações com diferentes ligantes – substratos ou inibidores, através de metodologias computacionais de *docking*, Dinâmica Molecular clássica e *Ensemble Docking*.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Analisar o modo e a intensidade das interações dos diferentes ligantes com cada uma das enzimas;
- Identificar resíduos da MAO-A e MAO-B que sejam importantes nas interações com os diferentes ligantes;
- Comparar as interações das enzimas com substratos e inibidores;
- Analisar propriedades dos sistemas, como distâncias, mobilidade relativa de resíduos, ligações de hidrogênio, em função do tempo;
- Avaliar aspectos estruturais de cada uma das enzimas, comparando diferenças entre a MAO-A e MAO-B, especialmente na região do sítio ativo;
- Avaliar a influência da conformação do receptor na intensidade das interações E+L.

2 MONOAMINOXIDASES

2.1 IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA

A monoaminoxidase (MAO) é uma enzima que catalisa a desaminação oxidativa de monoaminas endógenas, como os neurotransmissores adrenalina, noradrenalina, dopamina e serotonina, além de monoaminas exógenas, como por exemplo, a tiramina.¹⁵

A MAO apresenta duas isoformas, a monoaminoxidase A (MAO-A) e a monoaminoxidase B (MAO-B). Ambas são flavoenzimas, isto é apresentam em sua estrutura o cofator FAD (flavina adenina dinucleotídeo),^{10,19} Além disso, estão associadas à membrana mitocondrial externa de células distribuídas em todo o Sistema Nervoso Central (SNC), além de outros órgãos e tecidos, como o fígado, intestino, pulmões, placenta e plaquetas. No entanto, a proporção na distribuição de MAO-A e MAO-B não é igual em todos os tecidos do corpo humano, sendo que a MAO-A é mais abundante, em humanos.^{15,17,23}

O aumento anormal da expressão, ou da atividade, da MAO pode estar associado com a formação indireta, no SNC, de radicais livres citotóxicos, processo muitas vezes denominado de *stress oxidativo*,^{19,21} que está associado com distúrbios neurodegenerativos, como Doenças de Parkinson, Alzheimer e Huntington.^{24,15} Pacientes com Doença de Alzheimer apresentaram níveis elevados de MAO-B, assim como a população mais idosa, na qual foi constatado um aumento da expressão da MAO (MAO-A e MAO-B) em cerca de três vezes.²⁵ Assim, a MAO pode ser um alvo para drogas com atividade neuroprotetora.²⁶

Apesar de serem codificadas por diferentes genes, a MAO-A e MAO-B compartilham cerca de 70% de identidade na sequência de aminoácidos. No entanto, exibem diferentes especificidades de substrato e inibidores, o que pode ser explicado por diferenças estruturais na região da cavidade do sítio ativo das duas enzimas, como por exemplo, diferentes aminoácidos em posições equivalentes.²⁵

2.2 ASPECTOS ESTRUTURAIS

O conhecimento da estrutura tridimensional de uma proteína é fundamental para o entendimento de sua função biológica. O estudo da interação da MAO-A ou

MAO-B com possíveis inibidores, ou mesmo das enzimas com seus substratos, requer a análise dos aspectos estruturais envolvidos nesses processos. A primeira estrutura cristalina da MAO-B humana (*PDB-ID* 1GOS) foi determinada por Binda e colaboradores, em 2002,²⁵ enquanto a da MAO-A humana (*PDB-ID* 2BXR) foi elucidada por De Colibus e colaboradores, em 2005.²⁷

A sequência de aminoácidos de uma proteína pode ser dada através de um arquivo simples, em formato *FASTA*, com os resíduos listados na forma abreviada de uma letra. Na Figura 3, aparece a sequência de aminoácidos da MAO-A, código *PDB-ID* 2BXR,²⁷ cuja estrutura apresenta um total de 527 resíduos.

```
>2BXR:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE
MENQEKAS IAGHMFV VVIGGGI SGLSAAKLLTEYGVSVLVLEARDRVGGRTY TIRNEHVDY
VDVGGAYVGP TQNRILRLSKELGIET YKVNVSERLVQYVKGKTY PFRGAFPPVWNPIAYLDY
NNLWRTIDNMGKEI PTDAPWEAQHADKWDKMTMKELIDKICWTKTARRFAYLFVNINVTSEP
HEVSALWFLWYVKQCGGTTRIFSVTNGGQERKFVGGSGQV SERIMDLLGDQVKLNHPVTHVD
QSSDNI I IETLNHEHYECKYVINAI PPTLTAKIHFPELPAERNQLIQRLPMGAVIKCMMYY
KEAFWKKKDYCGCMI IEDEDAPISITLDDTKPDGSLPAIMGFILARKADRLAKLHKEIRKKK
ICELYAKVLGSQ EALHPVHYEKNWCE EQYSGGCYTAYFPPGIMTQYGRVIRQPVGRIFFFAG
TETATKWSGYMEGAVEAGERAAAREVLNGLGKVTEKD IWVQEPESKDVPAVEITHTFWERNLP
SVSGLLKIIGFSTSVTALGFVLYKYKLLPRS
```

Figura 3: Arquivo *FASTA* da enzima MAO-A, *PDB-ID* 2BXR, cadeia A, domínio de ligação com o FAD (laranja), domínio de ligação com substrato (verde) e domínio de ligação com a membrana (azul).

A sequência de aminoácidos da enzima MAO-B, *PDB-ID* 1GOS,²⁵ contendo um total de 520 resíduos, é mostrada na Figura 4.

```
>1GOS:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE
MSNKCDVV VVGGGI SGMAAKLLHDSGLNVVVLEARDRVGGRTY TLRNQKVYVDLGGSYVG
PTQNRILRLAKELGLET YKVNEVERLIHHVKGKSY PFRGPFPPVWNPI TYLDHNNFWRTMDD
MGREIPSDAPWKAPLAE EWDNMTMKELLDKLCWTESAKQLATLFVNLCVTAETHEVSALWFL
WYVKQCGGTTRII STTNGGQERKFVGGSGQV SERIMDLLGDRVKLERPVIYIDQ TRENVLVE
TLNHEMYEAKYVISAI PPTLGMKIHFN PPLPMMRNQMITRVPLG SVIKCIVYYKEPFWRKKD
YCGTMIIDGEEAPVAYT LDDTKPEGNYAAIMGFILAHKARKLARLTKEERLKKLCELYAKVL
GSLEALEPVHYEKNWCE EQYSGGCYTTFPPGILTQYGRVLRQPVDR IYFAGTETATHWSG
YMEGAVEAGERAAARE IILHAMGKIPEDEIWQSEPE SVDVPAQPI TTTTFLERHLPSVPGLLRLI
GLTTIF SATALGFLAHKRGLLVRV
```

Figura 4: Arquivo *FASTA* da enzima MAO-B, *PDB-ID* 1GOS, cadeia A, domínio de ligação com o FAD (laranja), domínio de ligação com substrato (verde) e domínio de ligação com a membrana (azul).

O alinhamento das sequências de aminoácidos da MAO-A e MAO-B ^{28,29} permite verificar a similiaridade entre as duas enzimas, Figura 5.

```

73.2% identity in 514 residues overlap; Score: 2057.0; Gap frequency: 0.4%

MAO-A,      15  DVVVIGGGISGLSAAKLLTEYGVSVLVLEARDRVGGRTYTIIRNEHVDYVDVGGAYVGPTQ
MAO-B,      6  DVVVVGGGISGMAAAKLLHDSGLNVVLEARDRVGGRTYTLRNQVKYVDLGGSYVGPTQ
      **** *  **** *  *  ***** ** *  **** *  ****

MAO-A,      75  NRILRLSKELGIETYKVNVSERLVQYVKGKTYPFRGAFPPVWNPIAYLDYNNLWRTIDNM
MAO-B,      66  NRILRLAKELGLETYKVNEVERLIHHVKGKSYPPFRGPFPPVWNPIYLDHNNFWRTMDDM
      ***** **** ***** **  ***** ***** ***** ** *  ** *

MAO-A,      135 GKEIPTDAPWEAQHADKWDKMTMKELIDKICWTKTARRFAYLFVNIINVTSEPHEVSALWF
MAO-B,      126 GREIPSDAPWKAPLAEWDNMTMKELLDKLCWTESAKQLATLFLVNLCVTAETHEVSALWF
      *  *  *  **** *  *  ** ***** ** **** *  *  **** ** *  *****

MAO-A,      195  LWYVKQCGGTTRIFSVTNGGQERKFVGGSGQVSERIMDLLGDQVKLNHPVTHVDQSSDNI
MAO-B,      186  LWYVKQCGGTTRIISTTNGGQERKFVGGSGQVSERIMDLLGDRVKLERPVIYIDQTRENV
      ***** ***** *  ***** ***** ***** ***** **  **  **  *

MAO-A,      255  IIETLNHEHYECKYVINAIPPTLTAKIHFRPELPAERNQLIQRLPMGAVIKCMMYYKEAF
MAO-B,      246  LVETLNHEMYEAKYVISAIPPTLGMKIHFNPLPMMRNQMITRVPLGSVIKCIVYYKEPF
      ***** **  **** ***** ***** *  **  **** *  *  *  **** *****

MAO-A,      315  WKKKDYCGCMIIEDEDAPISITLDDTKPDGSLPAIMGFILARKADRLAKLHKEIRKKKIC
MAO-B,      306  WRKKDYCGTMIIDGEEAPVAYTLDDTKPEGNYAAIMGFILAHKARKLARLTKEERLKKLC
      *  ***** **  *  ** ***** *  ***** **  **  *  *  *  *

MAO-A,      375  ELYAKVLGSQEALHPVHYEEKNWCEEQYSGGCYTAFFPPGIMTYGRVIRQPVGRIFFFAG
MAO-B,      366  ELYAKVLGSLEALEPWHYEEKNWCEEQYSGGCYTTYFPPGILTQYGRVLRQPVDRIYFAG
      ***** **  ***** ***** ***** ***** ***** **  **  **

MAO-A,      435  TETATKWSGYMEGAVEAGERAAREVLNGLGKVTEKDIWVQEPESKDVPVEITHTFWERN
MAO-B,      426  TETATHWSGYMEGAVEAGERAAREILHAMGKIPEDIWQSEPVSDVPAQPITTTFLERH
      ***** ***** ***** *  ** *  ** ***** ***** **  **  **

MAO-A,      495  LPSVSGLLKII GFST - - SVTALGFVLYKYKLLPR
MAO-B,      486  LPSVPGLLR LIGLTTIFSATALGFLAHRGLLVR
      **** **  ** *  *  ***** *  ** *

```

Figura 5: Alinhamento das sequências de aminoácidos da MAO-A e MAO-B, resíduos marcados com * são iguais para ambas as enzimas e em branco são diferentes.

Apesar do alto grau de conservação na sequência de aminoácidos entre as enzimas, elas apresentam diferenças em suas estruturas quaternárias. ³⁰ A MAO-A humana cristaliza como um monômero, ²⁷ enquanto a MAO-B humana cristaliza na forma dimérica, com 520 resíduos cada cadeia, ²⁵ como mostrado na Figura 6. ³¹ A relação desta diferença estrutural com os processos biológicos e a especificidade de substratos ainda deve ser investigada. ³⁰



Figura 6: Estrutura cristalográfica da MAO-A e da MAO-B.

Esse conhecimento estrutural, a partir da resolução das estruturas cristalográficas da MAO-A e MAO-B humanas, permitiu uma comparação mais detalhada entre as duas isoformas. Com isso, surgiram novas informações sobre os mecanismos de interação dessas enzimas com substratos e inibidores, importantes para o planejamento de novos fármacos, com ação mais seletiva.¹⁵ Além disso, a disponibilidade dessas estruturas contribuiu para os estudos *in silico* desses sistemas, que podem auxiliar os estudos *in vitro* realizados com fontes não-humanas, visto que MAO humana apresenta algumas diferenças estruturais com relação à MAO de outros organismos.²⁷

De acordo com resultados experimentais, a MAO-A²⁷ e a MAO-B³² apresentam três grandes regiões, cuja sequência de resíduos está listada na Tabela I. Na Figura 7 e Figura 8, a região de ligação com a membrana, hélice C-terminal, é destacada pela elipse azul, o domínio de ligação com o cofator FAD, elipse em laranja e o domínio de ligação com o substrato, elipse em verde. Na estrutura da MAO-B, somente a cadeia A está mostrada para melhor comparação com a MAO-A.

Tabela I: Sequência de resíduos que fazem parte dos domínios do FAD, substrato e C-terminal.

MAO-A		MAO-B	
RESÍDUOS	DOMÍNIO	RESÍDUOS	DOMÍNIO
1-88	FAD	1-79	FAD
89-219	SUBSTRATO	80-210	SUBSTRATO
220-294	FAD	211-285	FAD
295-399	SUBSTRATO	286-390	SUBSTRATO
400-462	FAD	391-453	FAD
463-497	C-terminal	454-488	SUBSTRATO
498-527	C-terminal	489-520	C-terminal

Além das macrorregiões mostradas nas Figura 7 e Figura 8, ambas as enzimas apresentam a alça em verde, resíduos 108-118 para MAO-A²⁶ e 99-112 para MAO-B,³² localizada na entrada da cavidade do sítio ativo. Já a alça em preto, resíduos 210-216 para MAO-A e 201-207 para MAO-B, está localizada mais próximo da cavidade do sítio ativo.²⁷

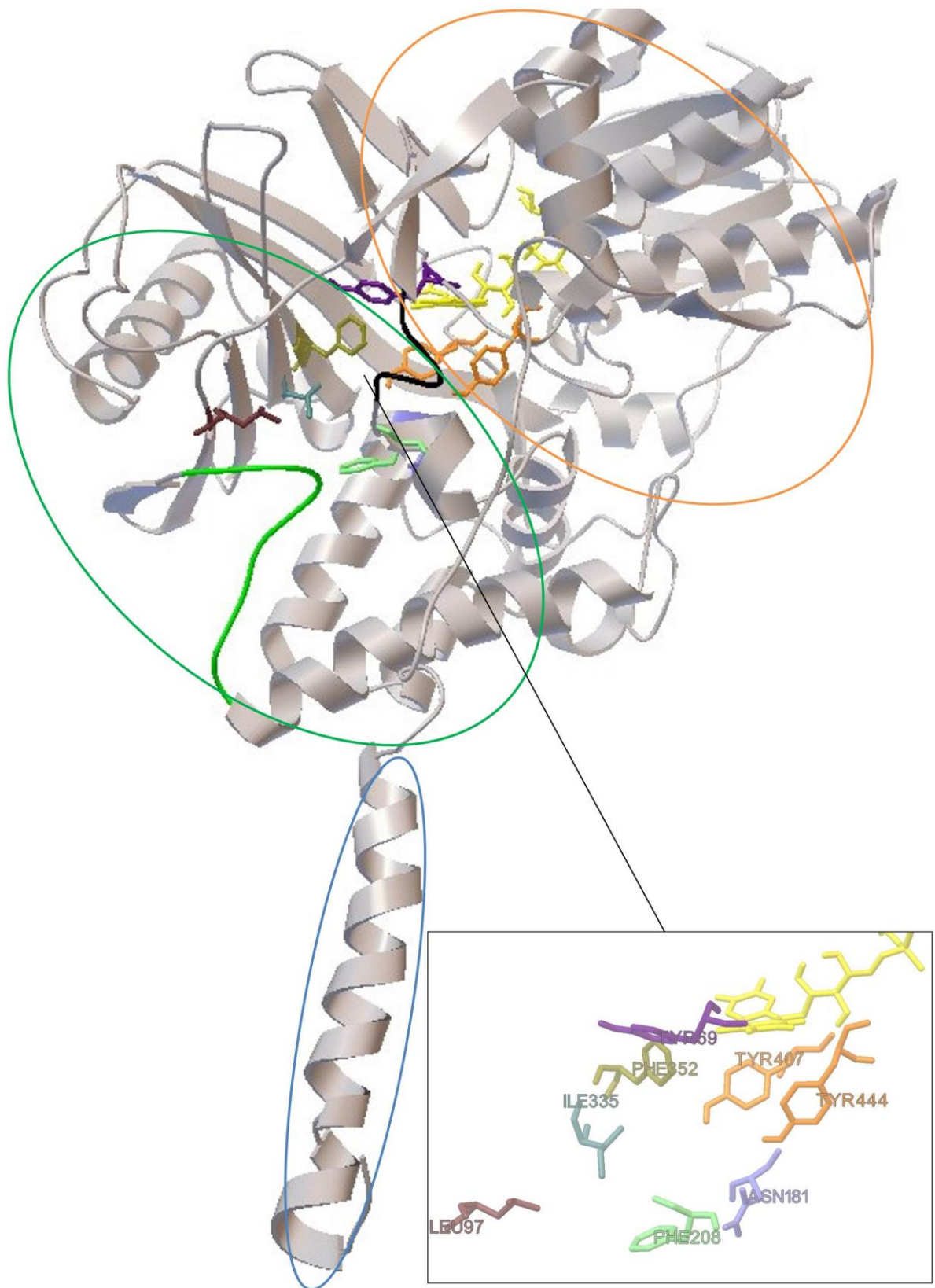


Figura 7: Estrutura da MAO-A, com zoom no sítio ativo, domínio de ligação com o FAD (laranja), domínio de ligação com substrato (verde) e domínio de ligação com a membrana (azul).

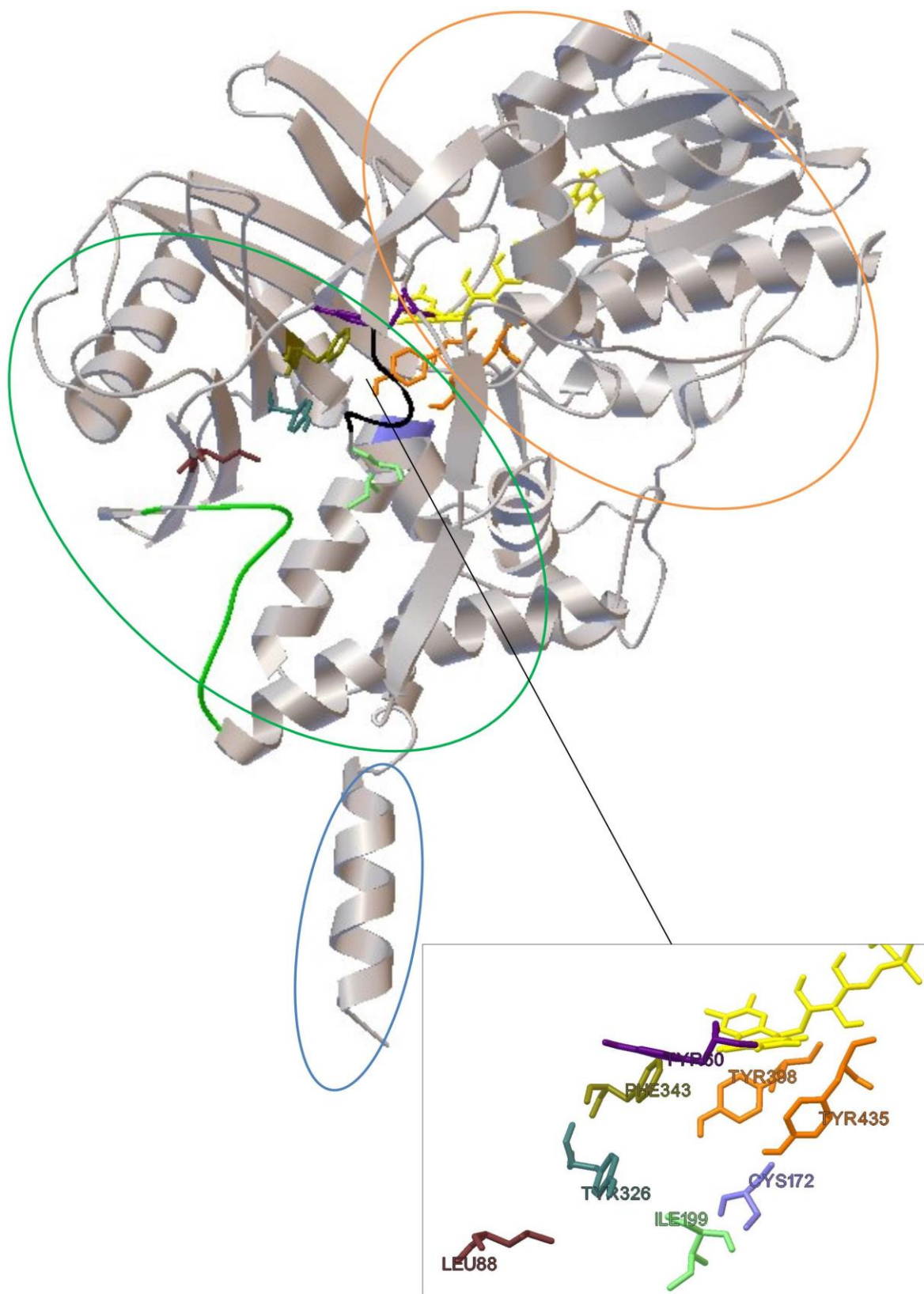


Figura 8: Estrutura da MAO-B, com *zoom* no sítio ativo, domínio de ligação com o FAD (laranja), domínio de ligação com substrato (verde) e domínio de ligação com a membrana (azul).

2.2.1 Cofator FAD

Muitas reações enzimáticas ocorrem com a presença de cofatores, que são moléculas que auxiliam nos processos enzimáticos, normalmente íons metálicos, ou pequenas moléculas orgânicas.¹⁰

A MAO é uma flavoenzima, isto é, realiza sua função enzimática com auxílio do cofator Flavina Adenina Dinucleotídeo ou FAD, cuja estrutura completa é mostrada na Figura 9.^{33,30}

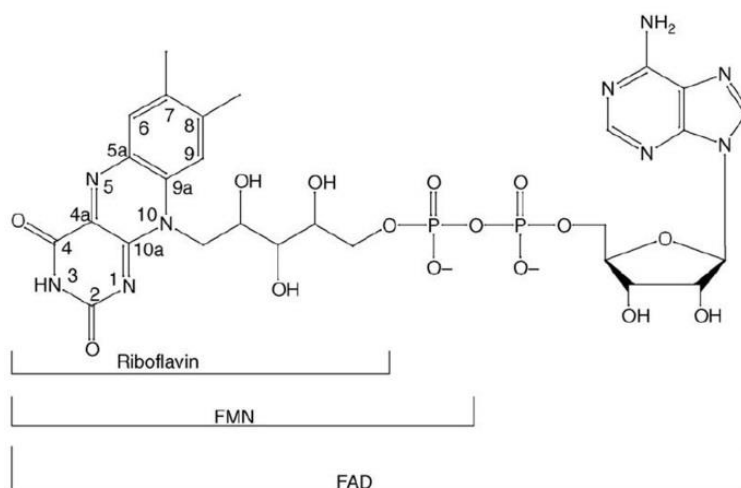


Figura 9: Estrutura completa do cofator FAD, retirada de De Colibus e colaboradores. **30**

Genericamente, o termo flavina pode ser definido como sinônimo do heterociclo isoaloxazina, mostrado na Figura 10.¹⁰ O FAD é um grupo prostético, que pode estar ligado de forma covalente à apoproteína, através de resíduos histidina, cisteína ou tirosina.³⁴ Normalmente, as aminoxidases apresentam o domínio de ligação com o FAD na porção N-terminal, além de estarem ligadas à enzima através de uma ligação histidil ou cisteinil na posição C8a do FAD, Figura 10.³⁵ Na MAO, este cofator está ligado covalentemente através de um resíduo cisteína, Cys406 na MAO-A e Cys397 na MAO-B.^{36,32}

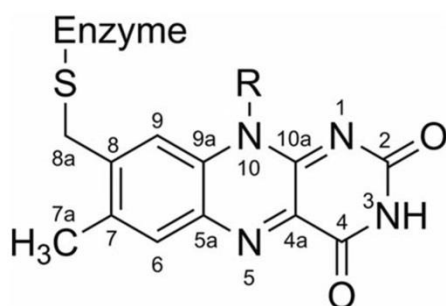


Figura 10: Estrutura do anel isoaloxazina do FAD, retirada de Edmondson e colaboradores.³⁷

O sistema isoaloxazina do cofator FAD é um dos mais versáteis sistemas redox entre os cofatores, envolvendo processos com transferência de um ou dois elétrons, apresentando três estados de oxidação diferentes, a forma oxidada, em que é denominada somente FAD, a forma reduzida por 2 elétrons, ou FADH₂, Figura 11, e também uma forma reduzida por 1 elétron, originando um radical estável, FADH[•]. Essa variedade de estados faz com que essas enzimas sejam responsáveis por uma diversidade de reações associadas com diferentes processos biológicos.^{10,38,30}

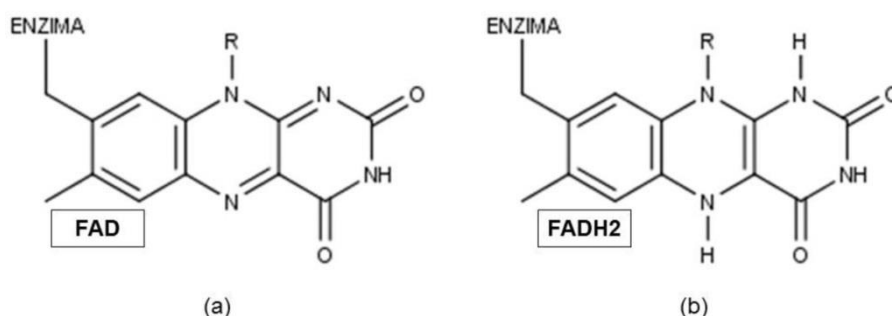


Figura 11: Estrutura do anel flavina do FAD, forma oxidada (a) e forma reduzida (b).

Os processos biológicos redox envolvendo o FAD podem gerar espécies reativas de oxigênio (*ROS*, do inglês *Reactive Oxygen Species*), entre as quais, espécies radicais (superóxidos, O₂⁻, e radical hidroxila, OH[•]) e não-radicais (peróxido de hidrogênio e ozônio).^{39,34} As *ROS* são bastante estudadas devido à sua associação com envelhecimento, natural ou precoce, bem como com condições patológicas, como câncer e neurodegeneração. Na MAO, em geral, a reação do FAD na forma reduzida (FADH₂) com O₂ envolve a formação de H₂O₂.^{39,34} Em condições normais, esses compostos são devidamente degradados, mas em condições patológicas podem causar danos ao DNA e membranas celulares, levando à morte neuronal, num processo denominado de *stress oxidativo*.^{17,26}

Devido às suas características redox, as oxidases, incluindo a MAO, podem também ser importantes para uso industrial como biosensores ou biocatalisadores para a química fina.³⁵

2.2.2 Sítio Ativo

A resolução das estruturas cristalográficas da MAO-A e da MAO-B, permitiu a descrição dos resíduos de aminoácidos que fazem parte do sítio ativo dessas enzimas, sendo que dos 20 resíduos, 7 são aminoácidos diferentes entre a MAO-A e a MAO-B, sendo destacados em negrito na Tabela II.²⁷

Tabela II: Resíduos do sítio ativo da MAO-A e da MAO-B*

MAO-A	MAO-B
Tyr69	Tyr60
Gln74	Gln65
Val91	Val82
Val93	Glu84
Leu97	Leu88
Ile180	Leu171
Asn181	Cys172
Ile207	Ile198
Phe208	Ile199
Ser209	Ser200
Val210	Thr201
Glu216	Glu207
Cys323	Thr314
Ile325	Ile316
Ile335	Tyr326
Leu337	Leu328
Met350	Met341
Phe352	Phe343
Tyr407	Tyr398
Tyr444	Tyr435

* adaptada da referência 27.

Dentre os resíduos do sítio ativo das enzimas, os resíduos Tyr407 e Tyr444, na isoforma MAO-A e Tyr398 e Tyr435 na MAO-B fazem parte do chamado "sanduíche aromático" do sítio ativo, ⁴⁰ uma região importante no reconhecimento dos substratos, conseqüentemente, na interação com possíveis inibidores. Juntamente com o cofator FAD, esses resíduos formam a "gaiola aromática", mostrada na Figura 12. ^{25,41,30}

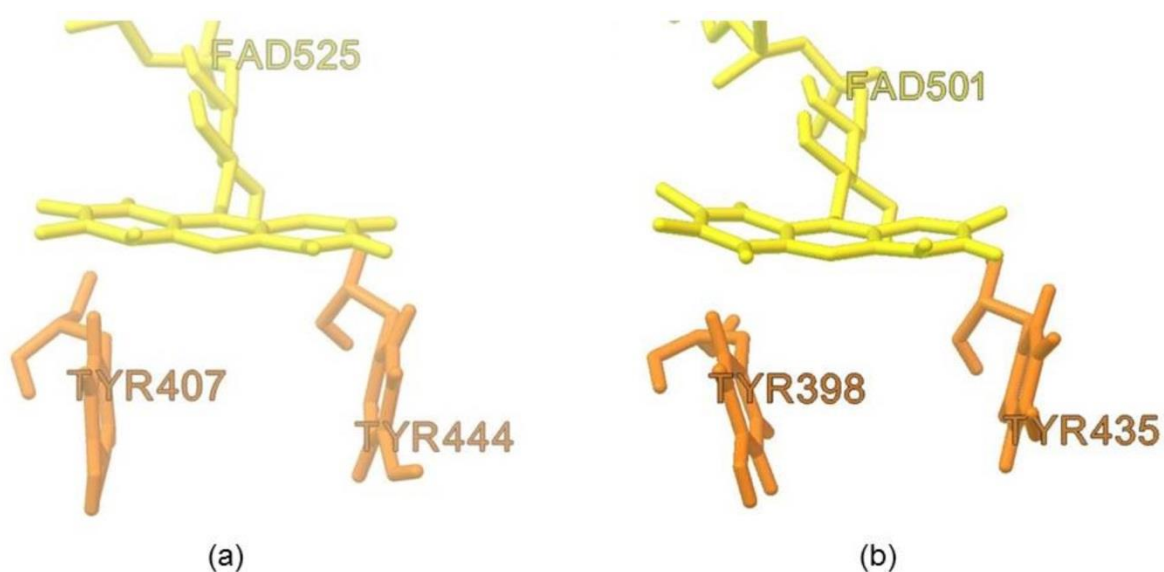


Figura 12: "Gaiola aromática" do sítio ativo, (a) MAO-A e (b) MAO-B.

Tanto a MAO-A quanto a MAO-B, apresentam a região do sítio ativo com natureza essencialmente hidrofóbica. No entanto, o sítio ativo da MAO-A apresenta uma única cavidade, de volume aproximado de 550 Å³. Já o sítio ativo da MAO-B apresenta duas cavidades, a cavidade de entrada, com volume aproximado de 290 Å³, e a cavidade do substrato, com cerca de 390 Å³. ^{25,27}

A cavidade de entrada, na MAO-B, situada entre o sítio ativo e a superfície da enzima, é delineada pelos resíduos Phe103, Pro104, Trp119, Leu164, Phe168, Leu171, Ile199, Ile316 e Tyr326, sendo que os resíduos Ile199 e Tyr326 atuam como um "portão" do sítio ativo, entre essas duas cavidades. ^{37,33}. A alteração da cadeia lateral dos resíduos Ile199 e Tyr326, na MAO-B, pode levar à "fusão" das

cavidades de entrada e de substrato, o que permite a acomodação de substratos mais volumosos.²⁵

Além da característica da cavidade única, o sítio ativo da MAO-A apresenta os resíduos Ile180, Asn181, Phe208 e Ile335, correspondentes à Leu171, Cys172, Ile199 e Tyr326 na MAO-B, respectivamente. Estes podem ser fatores importantes na tentativa de explicar a seletividade de substratos e inibidores.^{27,33}

Sendo assim, avaliações estruturais das enzimas, especialmente na região do sítio ativo, são bastante importantes para a avaliação da sua atividade, bem como dos seus mecanismos de inibição.

2.3 SUBSTRATOS

Dentre os substratos da MAO, estão alguns neurotransmissores, como a dopamina, serotonina, adrenalina e noradrenalina, que são substâncias liberadas pelos neurônios, alterando o comportamento de células vizinhas. A dopamina e a serotonina são derivadas dos aminoácidos tirosina e triptofano, respectivamente. Além disso, tanto MAO-A quanto MAO-B metabolizam a tiramina proveniente da alimentação.^{10,37}

A MAO-A metaboliza especialmente a serotonina e noradrenalina, além da tiramina proveniente da alimentação e pode estar associada com degeneração de células cardíacas. A redução dos níveis de serotonina/noradrenalina no organismo é associada com distúrbios como depressão e outros transtornos de humor. Já a MAO-B age, sobretudo, sobre benzilamina, feniletilamina e histaminas. Ambas metabolizam a adrenalina e a dopamina, no entanto, no cérebro, a MAO-B é a principal responsável pelo metabolismo da dopamina.^{25,30} A dopamina é um importante neurotransmissor associado no controle de movimentos voluntários, assim, a deficiência de dopamina está relacionada com Doença de Parkinson.²³ Em geral, a MAO-A metaboliza substratos mais volumosos, enquanto a MAO-B substratos menores.²⁵

2.4 INIBIDORES

Inibidores são substâncias que reduzem a atividade de uma determinada enzima. Muitos inibidores são estruturalmente semelhantes aos substratos, no entanto, não reagem da mesma forma.

Inibidores competitivos, normalmente apresentam grande semelhança estrutural com substrato, podendo interagir na mesma região, sem apresentar, no entanto, reatividade. Já os inibidores não-competitivos ligam-se diretamente no complexo E+S, e não à enzima livre.¹⁰

O uso clínico dos inibidores da MAO tem início na década de 1950, quando foi observado que pacientes em tratamento clínico contra a tuberculose apresentavam elevação de humor. Foi constatado que o fármaco utilizado, a iproniazida, era capaz de inibir a monoaminoxidase. No final da década este fármaco começou a ser utilizado para tratamento de pacientes deprimidos, sendo considerado o primeiro antidepressivo moderno.^{17,37}

Os inibidores seletivos da MAO-A são geralmente usados no tratamento de distúrbios de humor, como depressão, uma vez que permitem o aumento dos níveis de serotonina e noradrenalina, além de apresentarem possíveis efeitos cardioprotetores. Hoje em dia, no entanto, inibidores da MAO-A cederam lugar no tratamento como antidepressivos, especialmente, para os inibidores da recaptção da serotonina.³⁷

Já os inibidores seletivos da MAO-B são usados, especialmente, no tratamento da Doença de Parkinson, devido à sua associação com a deficiência de dopamina no cérebro.^{19,24} A maioria dos estudos realizados com as monoaminoxidases é na busca de inibidores seletivos da MAO-B, uma vez que inibidores seletivos desta isoforma, geralmente irreversíveis como a selegilina, já são usados clinicamente no tratamento da Doença de Parkinson, normalmente em conjunto a administração de L-dopa (precursor da dopamina).²⁵

Devido ao fato das enzimas estarem associadas com *stress oxidativo*, seus inibidores podem também apresentar efeitos neuroprotetores.^{17,24,16} Inibidores da MAO, que tenham ação sobre a acetilcolinesterase ou butirilcolinesterase podem ser importantes no tratamento da Doença de Alzheimer.^{16,42.}

Um dos efeitos colaterais associado ao uso de inibidores inespecíficos da MAO é a ocorrência de crises hipertensivas e hiperpiréticas (elevação excessiva da

temperatura corporal). Esse efeito é causado, geralmente, pela ingestão de alimentos contendo tiramina (precursora da noradrenalina) que pode não ser metabolizada no sistema periférico, especialmente pela MAO-A no intestino. Os inibidores seletivos reversíveis da MAO-A podem permitir o metabolismo periférico. Já os inibidores seletivos da MAO-B, em geral, não apresentam este efeito, pois o intestino apresenta baixos níveis desta isoforma.

A MAO-A é inibida irreversivelmente pela clorgilina e reversivelmente pela moclobemida e também pela harmina. Já a MAO-B tem como inibidores seletivos irreversíveis pargilina, rasagilina e selegilina, além da isatina, que inibe a MAO-B reversivelmente. A selegilina apresenta alta seletividade com relação à MAO-B, cerca de 250 vezes maior que para MAO-A.⁴⁰

Estudos recentes mostraram que a menadiona (vitamina K3) inibe a MAO-B reversivelmente, com seletividade de cerca de 60 vezes com relação à MAO-A.²¹ Outros derivados da 1,4-naftoquinona, também apresentam efeitos inibitórios na MAO, sendo que o análogo A2, (derivado do lapachol com grupo benzil-espermidina) apresentou seletividade com relação à MAO-A, de cerca de 2 vezes.⁴³ Esses resultados favorecem o estudo da 1,4NQ como "esqueleto" para novos inibidores da MAO.

Sendo assim, o desenvolvimento de possíveis inibidores da MAO deve ser realizado de forma a buscar estruturas que apresentem alta seletividade com relação à MAO-A ou à MAO-B, a fim de minimizar os efeitos colaterais.^{15,17,21} O conhecimento dos ligantes (substratos ou inibidores) e, especialmente, dos receptores, incluindo seu mecanismo catalítico, ou inibitório, aprimora o desenho de drogas com possível ação terapêutica, permitindo o desenvolvimento de fármacos mais eficientes e seletivos.

2.5 CONSIDERAÇÕES MECANÍSTICAS

Os mecanismos de ação propostos para a MAO envolvem reação com o FAD, sendo que, atualmente três mecanismos são mais estudados, mostrados na Figura 13. Mecanismos (1) radicalar, (2) nucleofílico polar e (3) transferência de hidreto, sendo as etapas limitantes a abstração de átomo de H, desprotonação e abstração de H⁻, respectivamente, todos em C α do substrato.²³

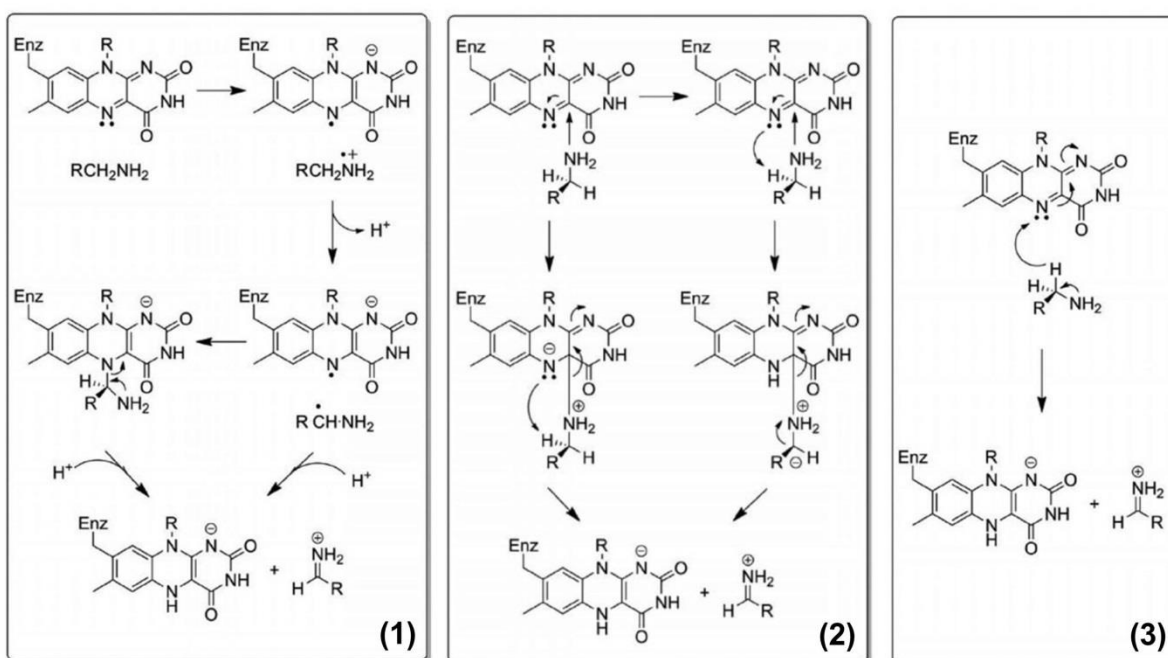


Figura 13: Mecanismos de ação da MAO: (1) radicalar, (2) nucleofílico polar e (3) hidreto.

Estudos teóricos, considerando-se reação entre o cofator FAD (porção flavina) e o substrato dopamina, mostraram que um mecanismo favorável seria o de transferência de hidreto, como mostrado na Figura 14.⁴⁴ No entanto, estudos recentes a respeito do mecanismo de inibição da MAO pelos inibidores acetilênicos rasagilina e selegilina, demonstraram que o mecanismo mais plausível seria o de abstração inicial do próton do carbono acetilênico terminal.³⁶ Apesar das extensas pesquisas, os mecanismos catalíticos e inibitórios ainda não foram completamente esclarecidos.

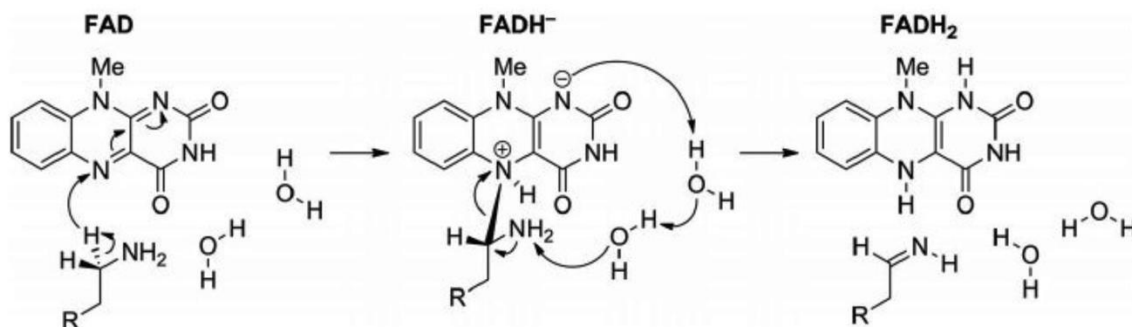


Figura 14: Mecanismo de abstração de hidreto, proposto para a ação da MAO com substratos.

Dentre as várias características estruturais da MAO-B associadas aos mecanismos catalítico ou inibitório, a natureza hidrofóbica do seu sítio ativo e a presença da "gaiola aromática" formada pelos resíduos Tyr398 e Tyr435 com o cofator FAD são fatores bastante importantes.²³

Os estudos teóricos, em conjunto com trabalhos experimentais, levam a um melhor entendimento do mecanismo de ação catalítica ou inibição da MAO-B, o que ajuda no planejamento de novos inibidores seletivos da MAO-B.

3 METODOLOGIAS

3.1 DOCKING

Docking é um método computacional cujo objetivo principal é prever o modo (conformação) e a intensidade (energia) da interação, em geral, entre uma macromolécula, também denominada de receptor, e uma molécula pequena, ou o ligante.⁴⁵ É uma importante ferramenta no desenho de fármacos assistido por computador.⁴⁶

As estruturas dos receptores (alvo macromolecular) e dos ligantes podem ser obtidas a partir de banco de dados de estruturas, como o *PDB*,⁴⁷ ou construídas e otimizadas através de outras metodologias de modelagem molecular, como por exemplo, modelagem por homologia, para o caso dos receptores e métodos *ab initio* ou semi-empíricos, aplicados mais comumente para ligantes.

Os métodos de *Docking*, através dos *algoritmos de busca*, “encaixam” os ligantes no receptor, sendo que as conformações receptor-ligante são avaliadas pela função de escore, a qual ordena em um *ranking* todas as diferentes conformações, da melhor à pior interação.⁴⁶ O programa *AutoDock 4.2*⁴⁸ apresenta função de escore baseada em campo de força. Além disso, o algoritmo de busca é o algoritmo genético lamarckiano (*LGA*), que permite que características adquiridas sejam passadas às gerações futuras. Além disso, o programa *AutoDock* usa o método de *grid*, que reduz o custo computacional associado à avaliação das interações eletrostáticas entre os átomos do ligante e do receptor. Neste método, um *grid* (ou malha) é construído numa região determinada previamente, sendo que em cada ponto deste *grid* são pré-calculadas e armazenadas as interações repulsivas e atrativas, que serão utilizadas no cálculo final da energia de interação ligante-receptor.³

Os algoritmos genéticos são baseados na evolução natural das espécies, onde cada indivíduo representa uma determinada conformação do ligante e a solução adaptativa corresponde à melhor interação ligante-receptor. A população inicial é formada por ligantes posicionados aleatoriamente no espaço. A energia de interação ligante-receptor é avaliada, sendo que as conformações com as melhores energias serão os progenitores para a próxima seleção. Essa etapa é realizada

sucessivamente, até que seja atingido o número máximo de gerações ou de avaliações de energia, que são definidas previamente.⁴⁹

A conformação receptor-ligante com a melhor interação, isto é, a energia de interação com o menor valor de escore, é considerada como o modo de ligação preferencial deste ligante no alvo em questão.¹³

Em geral, os métodos de *Docking* consideram o receptor rígido, não avaliando, portanto, alterações estruturais induzidas pela interação com determinado ligante.³

3.2 DINÂMICA MOLECULAR

O estudo de sistemas de interesse biológico através de DM permite avaliar o comportamento dinâmico dos alvos macromoleculares, ao invés da abordagem essencialmente estática proveniente do *Docking*. Mudanças conformacionais em uma proteína interagindo com um substrato, incluindo a flexibilidade de resíduos na região do seu sítio, flexibilidade de ácidos nucleicos, enovelamento de proteínas, formação de bicamadas fosfolípídicas, são alguns exemplos das informações que podem ser obtidas a partir da DM. À medida que a tecnologia computacional avança, os sistemas estudados via DM aumentam e se tornam cada vez mais complexos, podendo chegar a níveis celulares, segundo Karplus e McCammon.⁵⁰

A simulação por Dinâmica Molecular (DM) é uma ferramenta computacional que permite avaliar a evolução temporal de um dado sistema, considerando-se os fundamentos da Mecânica Clássica. O comportamento do sistema é estudado a partir do comportamento das partículas que o compõem.

Dado um sistema composto por N partículas interagindo mediante potenciais intermoleculares e intramoleculares previamente determinados, a DM resolve as equações do movimento de Newton, ou seja, a partir das velocidades e posições determinadas para um tempo t inicial, pode-se determinar a posição e a velocidade do sistema num tempo $t + \delta t$, e a partir desta, no tempo $t + 2\delta t$, e assim sucessivamente, isto, é calculada a trajetória das partículas que compõem o sistema. O cálculo da energia potencial e das forças a partir das coordenadas das partículas é realizado através de equações que descrevem os potenciais de interação inter e intramoleculares, que são definidas pelo Campo de Força, o qual define também os parâmetros necessários às equações.⁵¹ A partir das médias das

trajetórias, através de princípios da Mecânica Estatística, é possível extrair propriedades macroscópicas do sistema estudado.⁵²

As etapas essenciais para a realização de uma simulação por Dinâmica Molecular são mostradas na Figura 15.

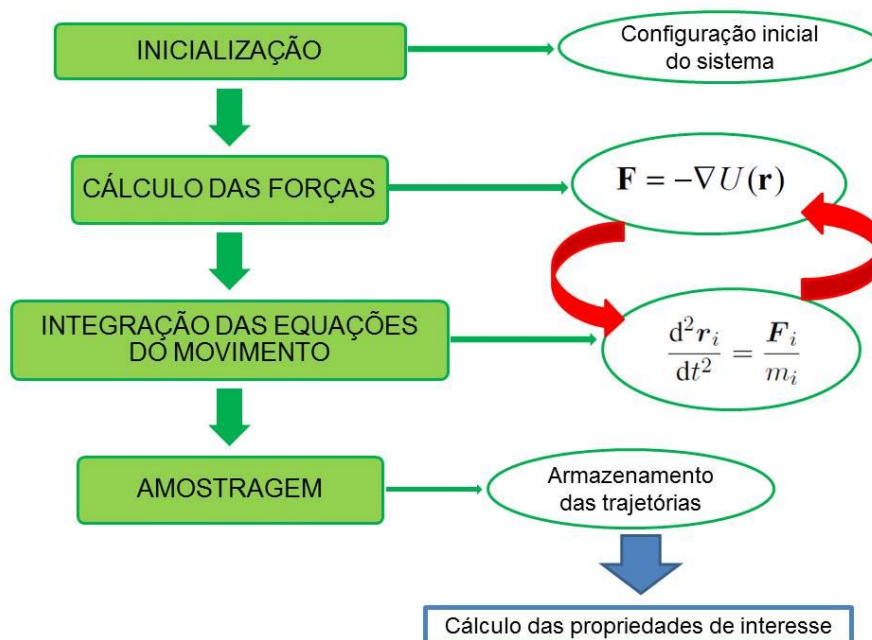


Figura 15: Esquema das etapas essenciais de uma simulação por DM.

O *ensemble* da Dinâmica Molecular é o microcanônico (NVE), onde o número de partículas (N), o volume (V) e a energia total do sistema (E) são conservados ao longo da simulação. Já no *ensemble* canônico (NVT), ao invés da energia total do sistema, a temperatura é mantida constante, assim como N e V. No ensemble NVT, é necessário o acoplamento de um termostato para ajuste da temperatura (T) constante. O *ensemble* isobárico-isotérmico (NPT), onde N, T e a pressão (P) são mantidas constantes ao longo da simulação, é bastante usado para sistemas biológicos, visto que os processos bioquímicos geralmente ocorrem a P e T constantes. Neste ensemble, além do acoplamento de termostato, é necessário também acoplamento de um barostato, para a manutenção da P constante, enquanto o volume do sistema flutua.⁵²

3.3 ENSEMBLE DOCKING

Os métodos de *Docking*, em geral, consideram o ligante flexível, porém o receptor rígido, numa abordagem que tem analogia com o modelo *chave-fechadura*, proposto por Emil Fischer, em 1894.⁵³ Neste modelo, a alta especificidade do sítio ativo de uma enzima (*fechadura*) com seu substrato (*chave*) é relacionada, essencialmente, a fatores geométricos complementares. No entanto, muitas vezes a ligação entre receptor-ligante leva à alterações conformacionais importantes no receptor, que podem influenciar significativamente a intensidade, ou modo, desta interação. Essa flexibilidade dos receptores biológicos, especialmente importante nas enzimas, foi abordada por Koshland e colaboradores num modelo conhecido como *encaixe induzido*.⁵⁴

O reconhecimento molecular entre E+S tem um papel fundamental nos processos bioquímicos essenciais à vida, assim, a consideração da flexibilidade dos receptores nos estudos de modelagem molecular permite uma descrição mais acurada desses importantes processos biológicos, assim como os estudos das interações de sistemas fármaco-receptor, importantes para o desenvolvimento de novos compostos com ação terapêutica.^{7,55}

A metodologia conhecida como *Ensemble Docking* consiste em usar um conjunto suficientemente grande de conformações diferentes do alvo macromolecular, com o intuito de incorporar sua flexibilidade.¹³ Um ligante então é “docado” sequencialmente nas múltiplas estruturas do receptor, sendo que o resultado fornece o modo e intensidade da interação receptor-ligante, como no *docking*, porém com a vantagem de selecionar a melhor estrutura do receptor para uma interação específica, avaliando as alterações estruturais do receptor que permitiram uma interação mais favorável deste com determinado ligante. A construção do *ensemble* pode ser feita, essencialmente de duas formas: a) seleção de uma série de estruturas do receptor determinadas experimentalmente e disponíveis nos bancos de dados; b) seleção de diferentes conformações do receptor gerada a partir de simulação por Dinâmica Molecular.^{56,57,13}

A triagem virtual, onde são testados milhares (até centenas de milhares) de compostos que possam ter ação terapêutica sobre um determinado alvo macromolecular, é realizada através de algoritmos de *Docking*, sendo que a

eficiência deste processo pode ser incrementada através da incorporação da flexibilidade dos receptores.⁵⁸

Conforme mencionado anteriormente, as estruturas de partida para o *Ensemble Docking* podem ser obtidas a partir de simulações por DM, o que foi realizado no presente trabalho. A sequência de etapas desta metodologia está esquematizada na Figura 16.

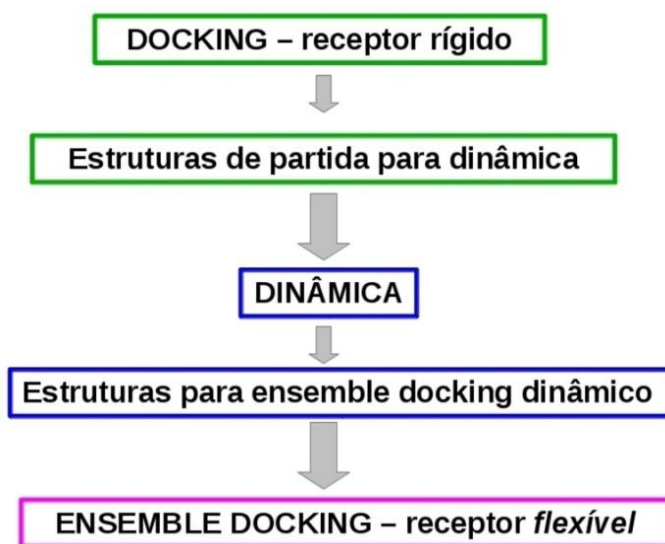


Figura 16: Esquema do *Ensemble Docking*

As estruturas dos receptores são primeiramente obtidas a partir de banco de dados de estrutura, como o *PDB*. Em seguida, é realizado *docking* convencional, afim obter as estruturas dos complexos RECEPTOR+LIGANTE.

Em seguida, são realizadas simulações por Dinâmica Molecular. A partir das trajetórias obtidas na DM, podem ser extraídos *snapshots* a cada intervalo regular de tempo, assim como é possível a obtenção de estruturas a partir da análise de *clusters*, que pode ser realizada a partir de programas de DM, como o *g_cluster* do pacote *GROMACS*.⁵⁹ Nesta análise, as diferentes conformações que o receptor apresenta são avaliadas e agrupadas de acordo com critérios pré-determinados. Neste caso, conformações que possam ter sido negligenciadas na obtenção por *snapshot*, podem ser amostradas após a clusterização.

Para que os resultados sejam analisados de uma forma mais eficiente e comparativa, é aconselhável que as diferentes estruturas dos receptores estejam ordenadas de maneira análoga umas com as outras. Isso pode ser efetuado escolhendo-se um grupo específico pertencente à estrutura do receptor e fazendo a

sobreposição deste grupo para todas as estruturas obtidas. Essas etapas, em geral, são realizadas com auxílio de *scripts* personalizados para cada caso, que contribuem para aumentar a eficiência do processo.

Após a obtenção das estruturas dos receptores é realizado então novo *docking*, cujo ligante pode ser o mesmo testado anteriormente, ou uma variedade de outros ligantes de interesse. Como são testadas inúmeras conformações do receptor, programas de *docking* que sejam rápidos, como o programa *AutoDock Vina*,⁴⁵ são importantes.

Sendo assim, a metodologia do *Ensemble Docking* permite amostrar diferentes conformações de um determinado receptor, incorporando efeitos de sua flexibilidade, o que aprimora o estudo das interações RECEPTOR + LIGANTE.

4 PROCEDIMENTOS COMPUTACIONAIS

4.1 OBTENÇÃO DAS ESTRUTURAS

As estruturas das enzimas MAO-A e MAO-B foram obtidas a partir do banco de dados *PDB*, *PDB-ID 2Z5X*, com resolução de 2,20 Å²⁶ e 2VRL, resolução de 2,40 Å⁶⁰, respectivamente. Os ligantes foram construídos com o programa GaussView 4.1⁶¹ e otimizados com o programa Gaussian 09,⁶² usando método RHF/6-31G(d,p).

Os ligantes escolhidos para o presente trabalho, conforme mostrado na Figura 2, foram: derivados da 1,4-naftoquinona (1,4-NQ) – menadiona, lapachol, norlapachol, A2, B2 e C2, substratos naturais – dopamina e serotonina, e inibidores comerciais – clorgilina (seletivo para MAO-A) e selegilina (seletivo para MAO-B). Como a atividade da MAO requer a presença do cofator FAD,³⁶ todos os sistemas denominados MAO-A ou MAO-B, são constituídos da enzima + FAD. As estruturas cristalográficas usadas no presente trabalho apresentam o cofator FAD, de modo que as suas coordenadas foram mantidas.

4.2 DOCKING

O programa usado para realização do *Docking* foi o AutoDock 4.2.⁴⁸ Os arquivos de entrada (*.PDBqt*) com as estruturas dos receptores MAO-A e MAO-B foram gerados com *AutoDockTools* 1.5.6 (*ADT*),^{63,48} assim como dos diferentes ligantes. As figuras com as estruturas dos complexos E+L foram construídas também com *ADT*.

Os parâmetros escolhidos foram: *GRID* com 60 x 60 x 60 pontos centrado no centro geométrico do receptor, Figura 17, algoritmo de busca genético com busca local *LGA* (do inglês, *lamarckian genetic algorithm*), 100 corridas, população inicial de 50, 5x10⁷ avaliações de energia, passo translacional 0,2 Å e passos rotacional e torsional 5°, demais parâmetros necessários foram mantidos os padrões do programa.

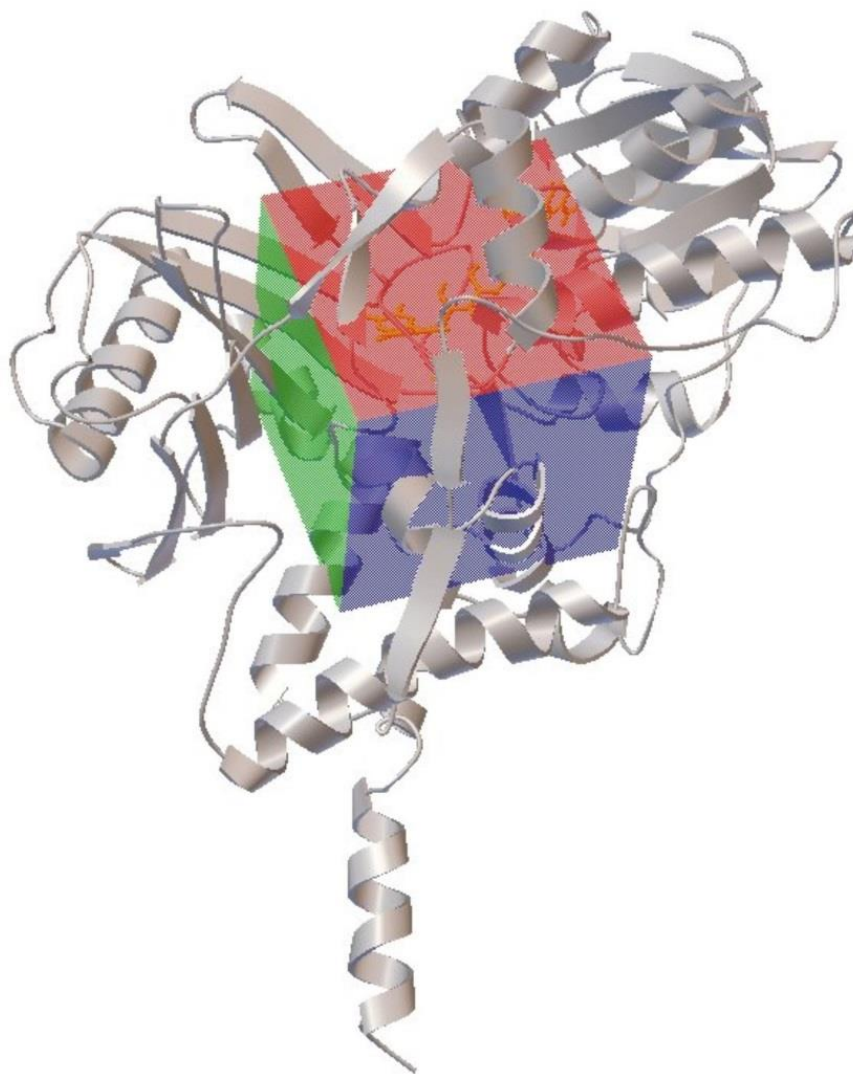
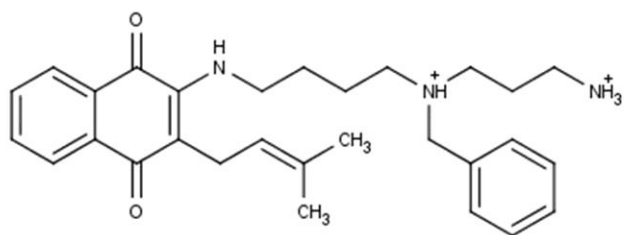


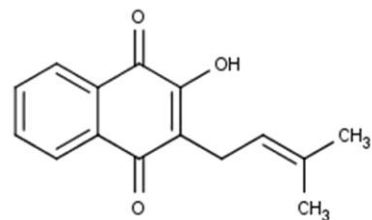
Figura 17: Visualização do *grid*, centrado na enzima.

O *docking* foi realizado com os ligantes A2, B2, C2, clorgilina, dopamina, selegilina e serotonina na sua forma protonada, uma vez que pelas análises com *MarvinSketch*,²² a forma predominante em pH fisiológico (7,4) é a forma protonada, além disso, sabe-se que os substratos dopamina e serotonina encontram-se na forma protonada no organismo.³⁷ O cofator FAD estava na forma oxidada (FAD), que é a forma ativa nas enzimas.

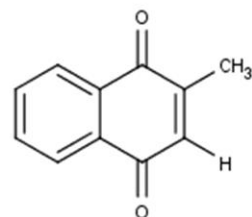
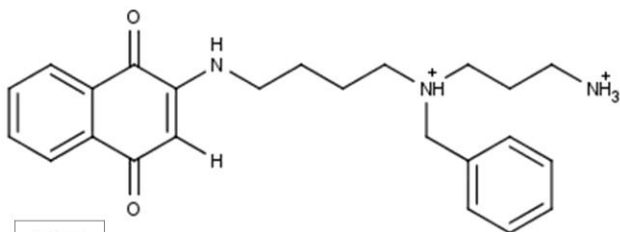
Na Figura 18, estão mostrados os ligantes no estado de protonação em que foram utilizados para o *docking*.



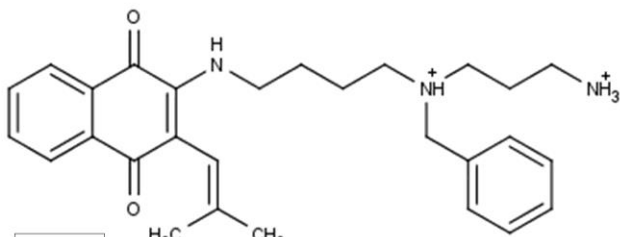
B2



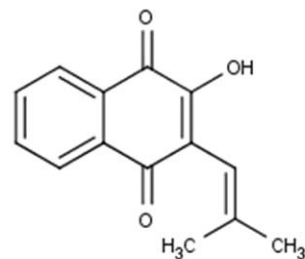
LAPACHOL



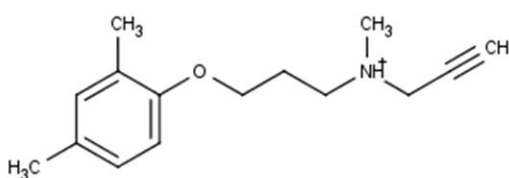
MENADIONA



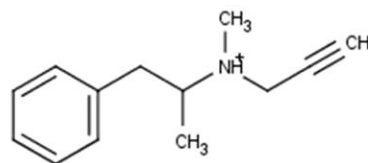
C2



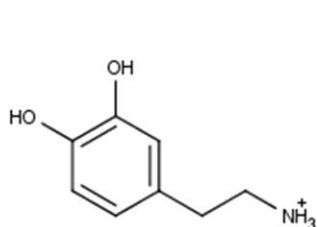
NORLAPACHOL



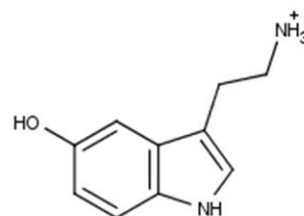
CLORGILINA



SELEGILINA



DOPAMINA



SEROTONINA

Figura 18: Estrutura dos ligantes no estado de protonação usado no *docking*

Os resultados do *docking* foram obtidos a partir de análises de cada um dos grupamentos (ou *clusters*) gerados pelo *AutoDock*, realizadas com auxílio do programa *ADT*, as quais incluíram energia e modo de interação enzima-ligante.

4.3 DINÂMICA MOLECULAR

Todas as simulações por DM foram realizadas usando programas do pacote *GROMACS*,^{64,65,59} com o campo de força *GROMOS 53A6*,⁶⁶ no ensemble *NPT*, temperatura de 310 K, usando o termostato *V-rescale*⁶⁷ e pressão de 1 bar, com barostato *Parrinello-Rahman*.⁶⁸ O algoritmo de integração utilizado foi o *leap-frog*, para *constraints*, algoritmo *LINCS*^{69,70} e as interações eletrostáticas de longo alcance foram corrigidas pelo método *PME*.⁷¹ O passo de integração foi de 2 *fs* e as trajetórias foram salvas a cada 1 *ps*.

Dados experimentais obtidos por Follmer e colaboradores mostraram que a menadiona inibe a MAO-B com uma seletividade de cerca de 60 vezes em relação à MAO-A.²¹ Já o ligante A2 tem maior ação sobre a MAO-A, embora não com o mesmo grau de seletividade observado para a menadiona. O ligante lapachol não apresentou ação sobre a MAO-A e pouca atividade sobre a MAO-B. Além desses fatores, a presença da porção 1,4-NQ nos três ligantes, com diferença de tamanho de seus substituintes na posição 2, permite uma análise comparativa de suas interações com as enzimas MAO-A e MAO-B. Assim, esses ligantes foram selecionados para a DM, além dos substratos naturais dopamina e serotonina, e das enzimas livres (sem ligante). Os sistemas escolhidos para a DM estão listados na Figura 19.

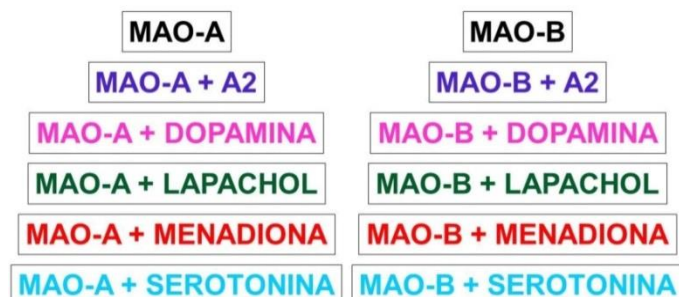


Figura 19: Sistemas selecionados para as simulações de Dinâmica Molecular.

Devido ao fato da MAO apresentar um sítio ativo definido, as simulações foram realizadas com as estruturas de partida contendo o ligante posicionado na região do sítio ativo, cujas coordenadas dos complexos E+L foram obtidas a partir de *docking*. Na Figura 20, são mostradas as estruturas de partida para a DM, dos sistemas MAO-A + LIGANTES, enquanto que na Figura 21, para MAO-B + LIGANTES. Para os sistemas sem ligante foram usadas diretamente as coordenadas das estruturas cristalográficas da MAO-A + FAD e da MAO-B + FAD, apenas cadeia A, *PDB-ID 2Z5X*²⁶ e *2VRL*,⁶⁰ respectivamente. A topologia dos receptores foi obtida com software *pbd2gmx* do pacote *GROMACS*. Já a topologia dos ligantes foi obtida a partir do *PRODRG*,⁷² com alteração das cargas, obtidas pelo método *AM1-BCC*.^{73,74} A topologia do FAD também foi obtida pelo *PRODRG*, porém suas cargas foram obtidas a partir do estudo realizado por Lemkul e colaboradores.⁷⁵

Cada um dos sistemas foi inserido em caixa cúbica, com moléculas de água do tipo *SPC*.⁷⁶ Foi realizado uma minimização de energia, através do algoritmo *steepest descente*,⁵⁹ seguida da inserção de íons, com intuito de aproximar os sistemas das condições fisiológicas. Novamente os sistemas foram submetidos à minimização de energia e então foi efetuada a rampa de aquecimento, com simulações curtas de 50 ps para cada temperatura, de 100 a 300 K, com incrementos de 50 K, mais 50 ps de simulação na temperatura de 310 K. Os sistemas obtidos através dessas etapas foram considerados o *TEMPO ZERO* (0ns) da DM. Então, procedeu-se a etapa de produção, sendo que o tempo total de simulação para cada um dos seis sistemas foi de 100 ns.

As análises das simulações de DM foram realizadas através de módulos do pacote *GROMACS*, incluindo avaliação da evolução da estrutura média (*RMSD*), mobilidade relativa de segmentos (*RMSF*), ligações de hidrogênio intermolecular, distâncias e ângulos entre resíduos da enzima, e outras análises estruturais que serão discutidas no capítulo 5.2. Os gráficos e figuras contidos neste trabalho foram gerados pelos programas *XMGRACE*,⁷⁷ *MarvinSketch*, *Rasmol*^{78,79} e *ADT*.

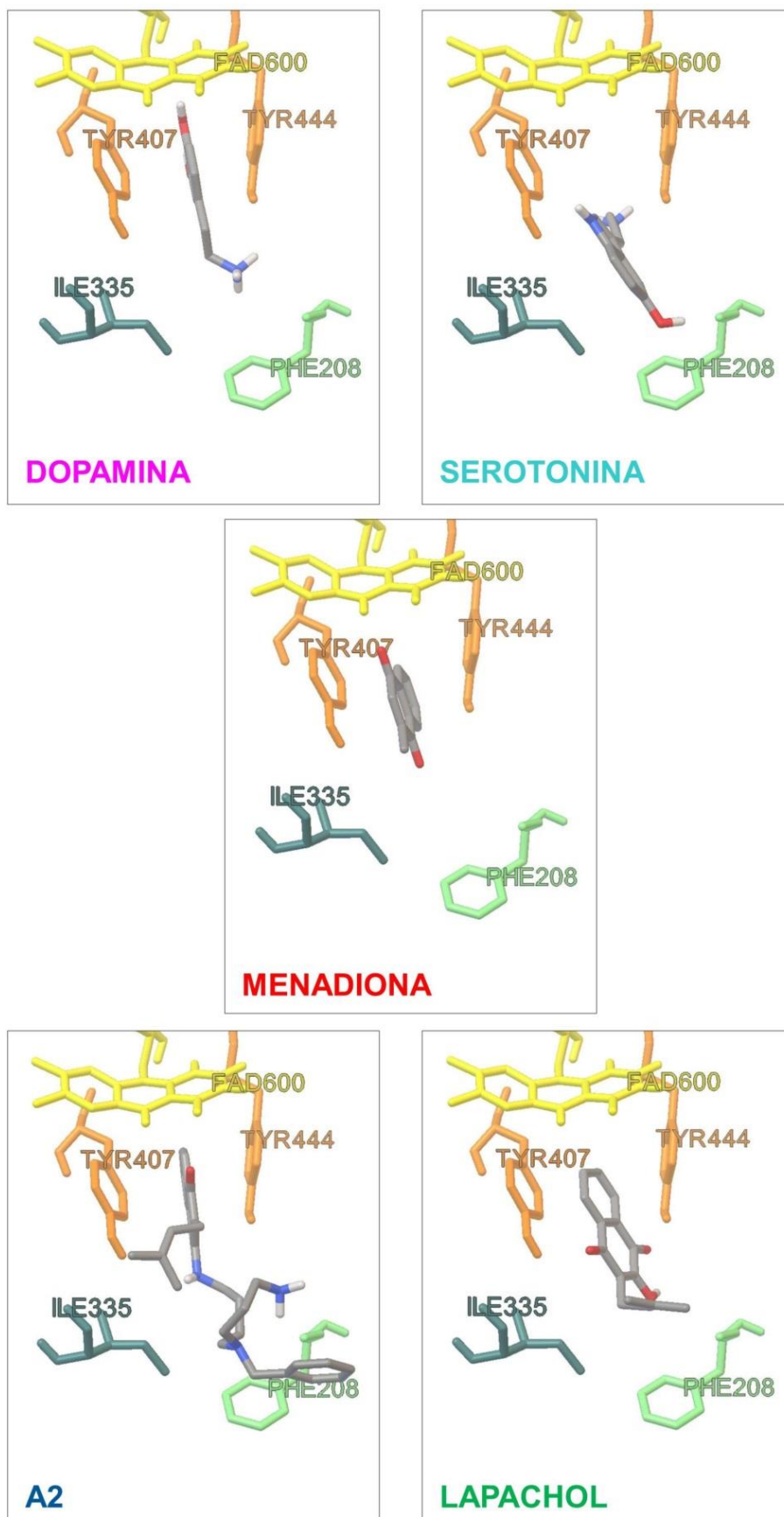


Figura 20: Estruturas de partida para DM, enzima MAO-A, com os diferentes ligantes, destacados com padrão de cor por tipo atômico.

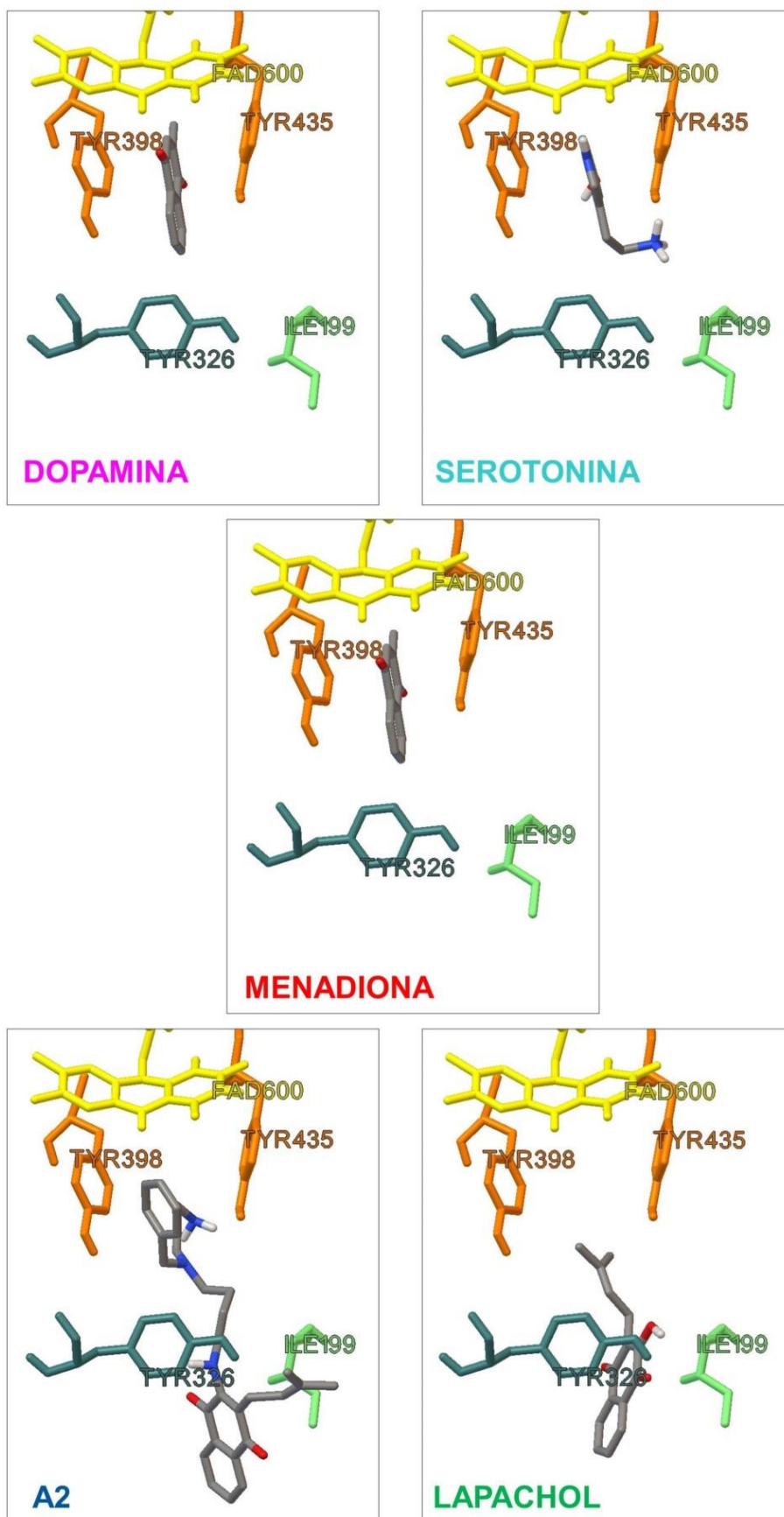


Figura 21: Estruturas de partida para DM, enzima MAO-B, com diferentes ligantes, destacados com padrão de cor por tipo atômico.

4.4 ENSEMBLE DOCKING

A metodologia de *Ensemble Docking* aplicada no presente trabalho, foi realizada com o programa *AutoDock Vina (VINA)*,⁴⁵ com auxílio de programas do pacote *GROMACS* além de *scripts* escritos pelo nosso grupo de pesquisa.

A sequência de etapas do *Ensemble Docking* aplicada no presente trabalho está esquematizada na Figura 16. As estruturas do receptor, tanto MAO-A quanto MAO-B, foram obtidas ao longo dos 100 ns de simulações por Dinâmica Molecular, de todos os sistemas simulados. Foram extraídos *snapshots* de 1 em 1 ns da DM, o ligante original foi retirado, sendo que para cada estrutura do receptor foi realizado sobreposição com a estrutura inicial (tempo ZERO), tendo como referência o FAD. O centro geométrico das enzimas foi calculado e cada uma das estruturas foi convertida em arquivo de entrada para a execução do *docking* (arquivo de extensão *PDBQT*), que foi realizado em triplicata, das enzimas MAO-A e MAO-B com os ligantes A2, dopamina, menadiona e serotonina, listados na Figura 18.

Também foram realizados *docking* considerando-se conformações da MAO-A e MAO-B obtidas através da DM, mas ao invés de *snapshots* a cada 1 ns, foram selecionadas estruturas obtidas após a clusterização, realizada com programa *g_cluster* do pacote *GROMACS*. Esta etapa foi realizada com a finalidade de amostrar o maior número possível de conformações dos receptores. As análises foram realizadas somente com as conformações de menor energia para cada complexo ENZIMA + LIGANTE.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DOCKING

No *docking*, as conformações que apresentam diferença de *RMSD* menor que 2,0 Å, são agrupadas em um mesmo conjunto (ou *cluster*), sendo este *cluster* representado pela estrutura de menor energia. Os resultados obtidos no *docking* para os sistemas MAO-A + LIGANTES e MAO-B + LIGANTES são mostrados na Tabela III, onde estão listadas as energias de interação E+L e também a relação das ligações de hidrogênio (HB) entre a enzima e o ligante.

Comparando-se MAO-A com MAO-B, a avaliação do escore da interação E+L permite identificar a interação da menadiona com a MAO-B mais favorável do que com a MAO-A, concordando com resultados experimentais.²¹ Da mesma forma, para o inibidor seletivo da MAO-B, selegilina,³⁶ que apresentou interação mais favorável com a MAO-B.

Além da avaliação do escore da interação E+L, a análise do modo como um ligante interage com o receptor é bastante importante para o entendimento desses sistemas. Tanto a MAO-A quanto a MAO-B apresentam sítio ativo definido,²⁶ portanto, a avaliação das interações dos ligantes com resíduos da região catalítica é fundamental na tentativa de entender as seletividades observadas experimentalmente. Assim, resultados experimentais mostraram que o ligante A2 tem uma ação seletiva sobre a MAO-A,⁴³ o que também foi observado no *docking*, sendo que, além da energia mais favorável com a MAO-A, o ligante A2 interage através de ligação de hidrogênio (HB) com o FAD, enquanto que com a MAO-B não apresenta nenhuma HB.

As considerações estruturais, como o modo de ligação (pose) e a avaliação das interações com resíduos importantes do sítio ativo são bastante importantes para a análise do *docking*, uma vez que a análise somente através da energia de interação não é aconselhável, tendo em vista que o erro padrão do programa *AutoDock* é de 2-3 kcal/mol na predição da energia livre de ligação.⁴⁸

Tabela III: Resultados *docking* MAO-A e MAO-B, energias e ligações de hidrogênio (HB).

LIGANTE	MAO-A		MAO-B	
	energia (kcal.mol ⁻¹)	HB	energia (kcal.mol ⁻¹)	HB
A2	-9,04	FAD	-6,41	-----
B2	-9,84	-----	-8,30	Gln206, Tyr60
C2	-8,10	Gly214	-4,60	FAD, Gly205
CLORGILINA	-7,70	Phe208	-7,84	Ile198
DOPAMINA	-5,85	Phe208, ILE180, Asn181	-5,93	FAD, Cys172, Tyr188
LAPACHOL	-7,21	Asn181, Tyr444	-6,75	-----
MENADIONA	-5,54	-----	-6,01	Tyr188
NORLAPACHOL	-6,89	Asn181	-6,44	Tyr435
SELEGILINA	-6,80	Gln215	-6,95	Gln206
SEROTONINA	-6,86	Tyr444, Asn181, Phe208	-7,02	Cys172, Gln206, Tyr188

Na Tabela IV são mostradas as interações de cada ligante, derivado da 1,4-NQ, com a MAO-A, sendo que os resíduos destacados em negrito foram determinados experimentalmente como constituintes do seu sítio ativo, assim como os destacados na Tabela V, para a MAO-B.²⁶

No caso da MAO-B com a menadiona, observa-se a formação de ligação de hidrogênio do ligante com o resíduo Tyr188. Este resíduo está localizado abaixo da "gaiola aromática", uma região bastante importante no mecanismo de ação da MAO. Esta é uma região importante na orientação do substrato no sítio ativo, mas também pode estar diretamente envolvida nas transferências de próton dos mecanismos propostos, mostrados no capítulo 2.5.²³

Na Tabela V são mostradas as interações de cada ligante, derivado da 1,4-NQ, com a MAO-B sendo HB as interações do tipo ligação de hidrogênio.

Tabela IV: Relação das interações entre os ligantes derivados da 1,4-NQ, A2, B2, C2, menadiona, lapachol e norlapachol, com a MAO-A.

LIGANTE	A2	B2	C2	LAPACHOL	MENADIONA	NORLAPACHOL
RESÍDUO						
FAD	HB	X	X	X		X
Tyr69	X		X		X	
Val70	X					
Gln74	X		X			
Ile180	X	X	X	X	X	X
Asn181	X	X	X	HB		X
Tyr197	X	X	X			
Ile207	X	X	X	X		
Phe208	X	X	X	X		X
Val210				X		
Gly214	X		HB			
GLN215	X	X	X			X
CYS323	X	X	X			
Ile325		X				
ILE335	X	X	X	X	X	X
Leu337	X	X	X			
Met350	X		X		X	
Phe352	X	X	X	X	X	X
Tyr407	X	X	X	X	X	
Gly443		X	X			
Tyr444	X	X	X	HB	X	X

HB = ligação de hidrogênio e X = interação do tipo VDW

Tabela V: Relação das interações entre os ligantes derivados da 1,4-NQ, A2, B2, C2, menadiona, lapachol e norlapachol, com a MAO-B.

LIGANTE	A2	B2	C2	LAPACHOL	MENADIONA	NORLAPACHOL
RESÍDUO						
FAD	X	X	HB	X	X	X
Tyr60	X	HB	X			X
Gln65	X	X	X			
Phe168	X					X
Leu171	X	X	X	X	X	X
Cys172	X	X	X	X	X	X
Tyr188	X	X	X		HB	
Ile198		X	X			
Ile199	X	X	X	X		X
Gly205	X	X	HB			
Gln206	X	HB	X	X		X
Tyr326	X	X	X	X		
Leu328	X					
Met341	X					
Phe343	X	X	X	X		X
Tyr398	X	X	X	X	X	X
Gly434	X				X	
Tyr435	X	X	X	X	X	HB

HB = ligação de hidrogênio e X = interação do tipo VDW

Nas figuras a seguir, são mostrados os modos de interação de alguns ligantes com a MAO-A e com a MAO-B, incluindo os resíduos com os quais o ligante interage por ligação de hidrogênio, conforme listado na Tabela IV e também na Tabela V.

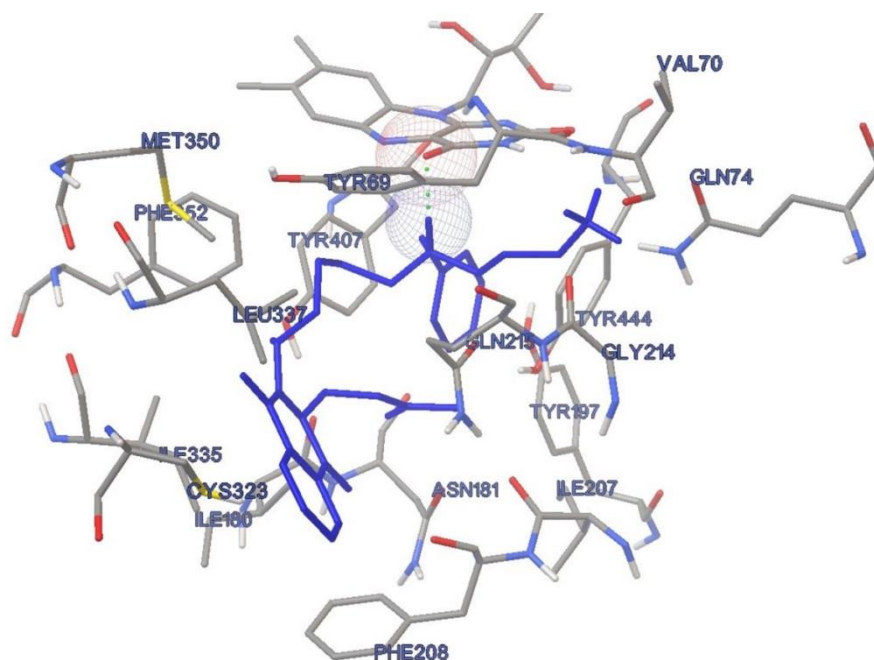


Figura 22: Interações entre o ligante A2 (azul) com resíduos da MAO-A.

Comparando-se o modo de interação do ligante A2 com a MAO-A, Figura 22, e com a MAO-B, Figura 23, vemos que, além da HB com o FAD no primeiro caso, o grupo benzil está localizado quase paralelo aos resíduos Tyr407 e Tyr444, o que pode estabilizar esta interação e explicar a seletividade observada experimentalmente.⁴³

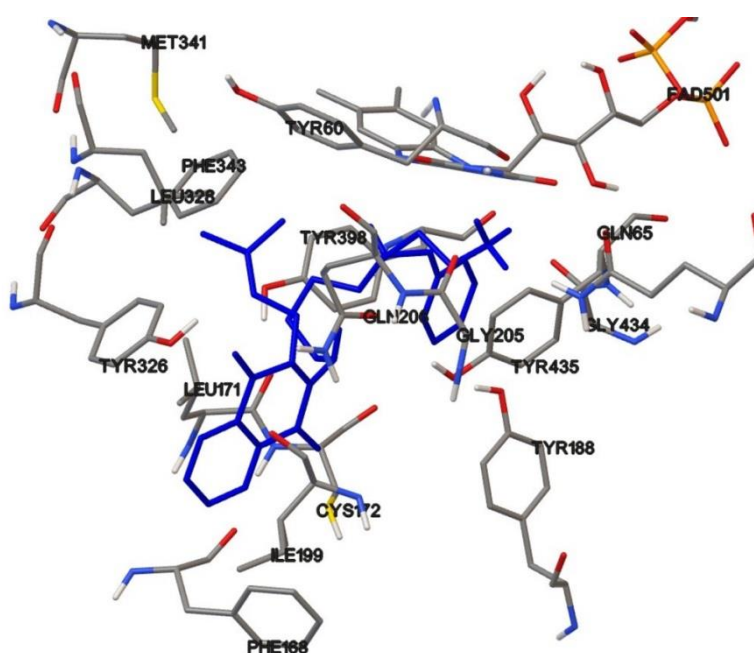


Figura 23: Interações entre o ligante A2 (azul) com resíduos da MAO-B.

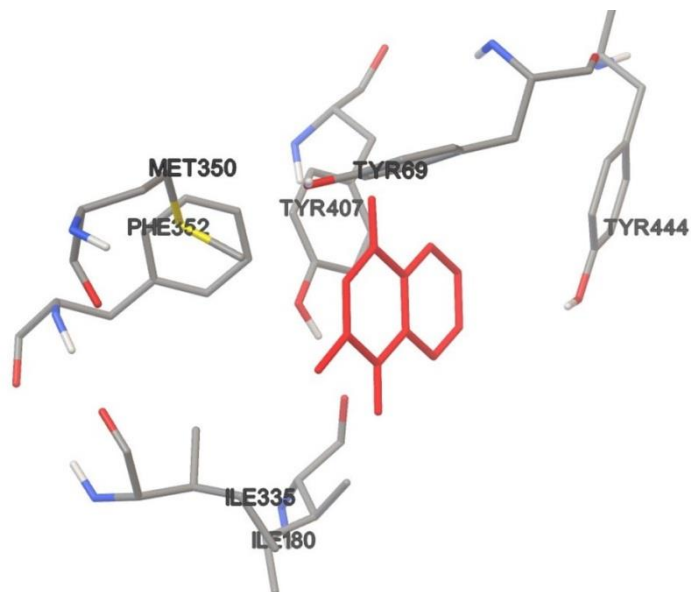


Figura 24: Interações entre o ligante menadiona (vermelho) com resíduos da MAO-A.

No caso da menadiona, sua interação com a MAO-B, Figura 25, mostra a interação da porção 1,4-NQ quase paralela aos resíduos do "sanduíche aromático", Tyr398 e Tyr435, além da HB com a Tyr188. Existe também uma interação com o cofator FAD, que não aparece no sistema MAO-A + menadiona. Esses fatores podem ser importantes na tentativa de explicar a seletividade experimental.²¹

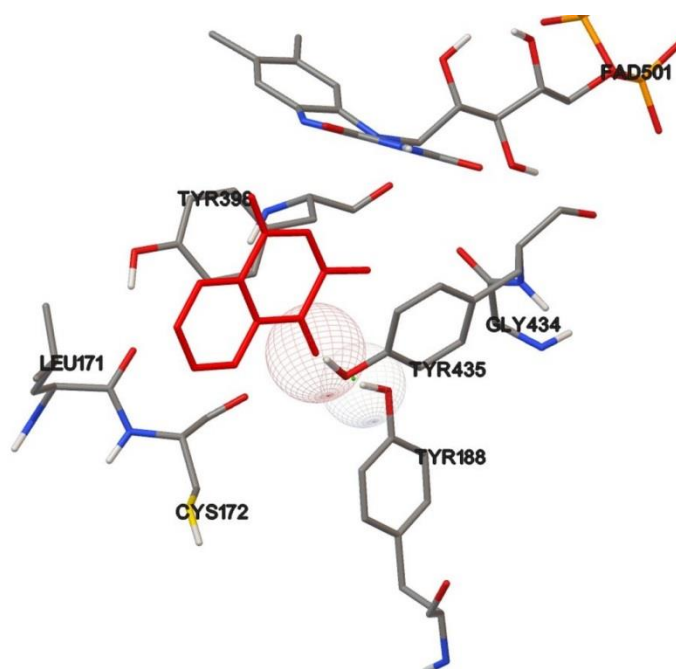


Figura 25: Interações entre o ligante menadiona (vermelho) com resíduos da MAO-B.

Na Tabela VI, estão listadas as interações dos inibidores comerciais, clorgilina e selegilina, e os substratos dopamina e serotonina, com a MAO-A.

Tabela VI: Relação das interações entre os ligantes clorgilina, dopamina, selegilina e serotonina, com a MAO-A.

<i>LIGANTE</i>				
<i>RESÍDUO</i>	CLORGILINA	DOPAMINA	SELEGILINA	SEROTONINA
FAD	X		X	
Ile180	X	HB	X	X
Asn181	X	HB		X
Ile207	X	X		
Phe208	HB	HB		X
Val210	X			
GLN215	X	X	HB	X
ILE335	X		X	X
Thr336	X			
Leu337	X		X	
Met350				X
Phe352			X	
Tyr407	X	X	X	X
Tyr444	X	X	X	X

HB = ligação de hidrogênio e X = interação do tipo VDW

Na Tabela VII, estão listadas as interações dos inibidores comerciais e substratos com a MAO-B.

Tabela VII: relação das interações entre os ligantes clorgilina, dopamina, selegilina e serotonina, com a MAO-B.

LIGANTE	CLORGILINA	DOPAMINA	SELEGILINA	SEROTONINA
FAD	X	HB	X	X
Tyr60		X		
Leu171	X		X	
Cys172	X	HB	X	HB
Tyr188	X	HB	X	HB
Ile198	HB		X	X
Ile199	X		X	
Gln206	X	X	HB	HB
Tyr326	X			
Tyr398	X	X	X	X
Gly434	X			
Tyr435	X	X	X	X

HB = ligação de hidrogênio e X = interação do tipo VDW

Nas Figura 26 e Figura 27, são mostradas as interações do ligante dopamina com a MAO-A e MAO-B, respectivamente. Pode-se observar que, de forma similar à MENADIONA, a posição da DOPAMINA é bastante próxima à "gaiola aromática" na interação com a MAO-B, enquanto que na MAO-A está mais afastada desta região. Além disso, a DOPAMINA com a MAO-B apresenta interação com o FAD.

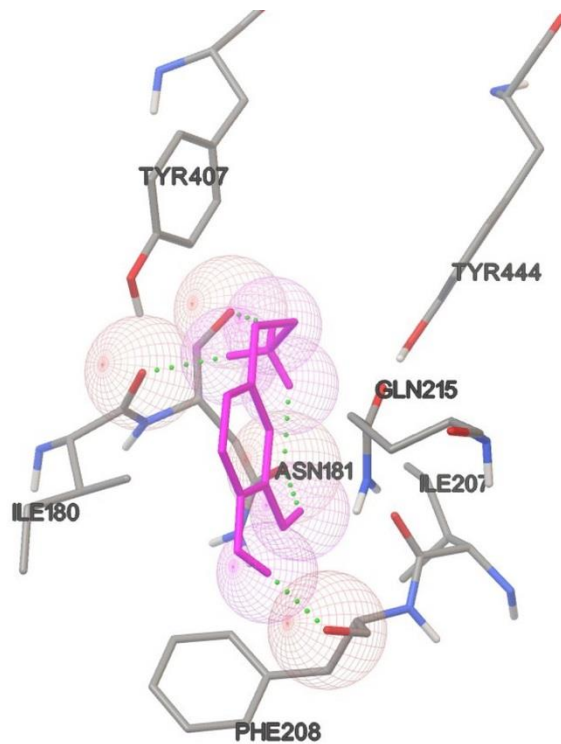


Figura 26: Interações entre o ligante dopamina (magenta) com resíduos da MAO-A.

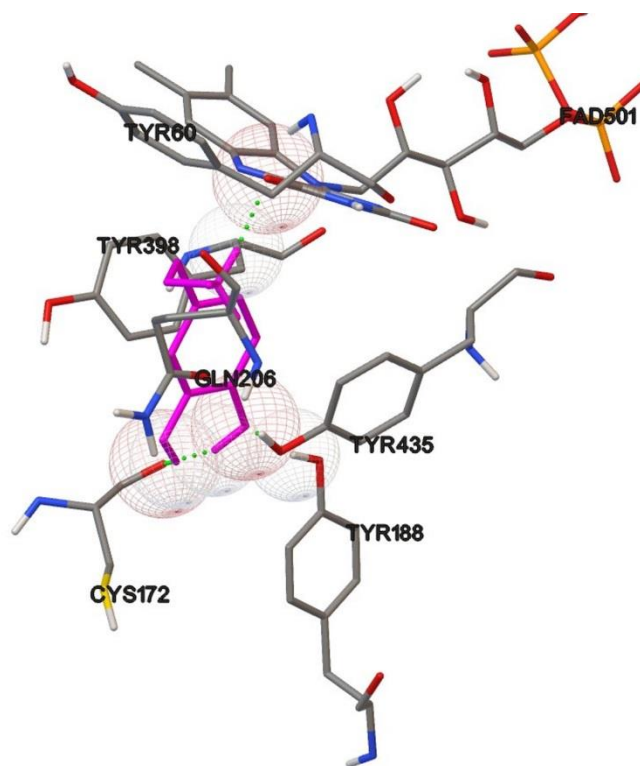


Figura 27: Interações entre o ligante dopamina (magenta) com resíduos da MAO-B.

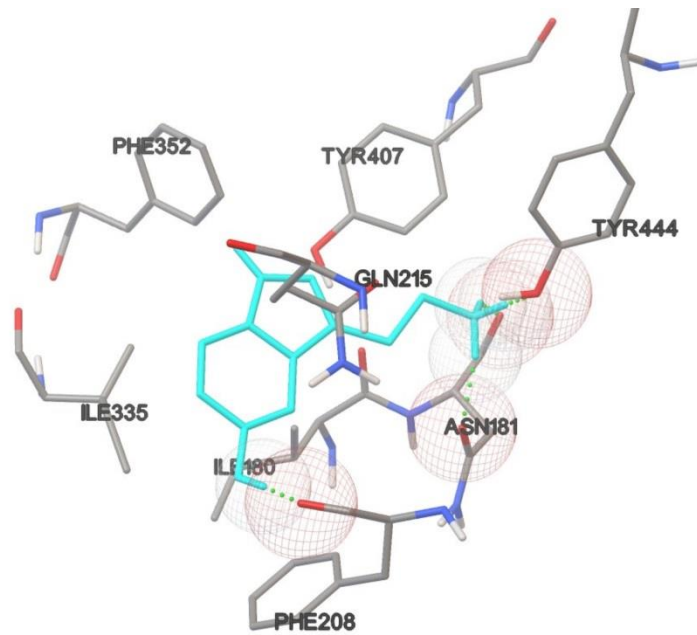


Figura 28: Interações entre o ligante serotonina (ciano) com resíduos da MAO-A.

No caso da interação da MAO-A e MAO-B com a serotonina, Figura 28 e Figura 29 é possível ver que a orientação do ligante é relativamente diferente para cada uma das isoformas.

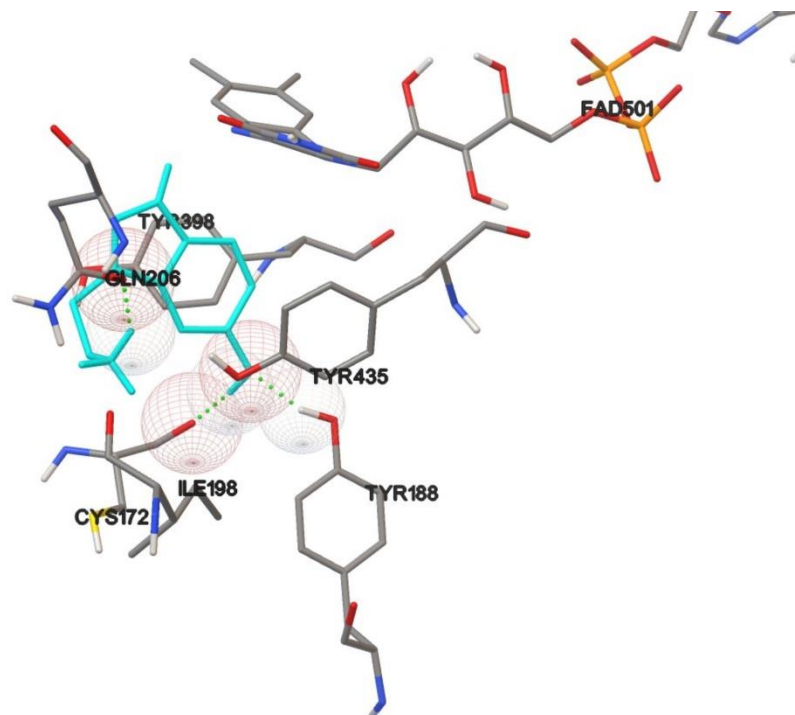


Figura 29: Interações entre o ligante serotonina (ciano) com resíduos da MAO-B.

Os resultados obtidos no *docking* permitem avaliar interações importantes dos ligantes com cada uma das isoformas, na tentativa de entender a seletividade observada experimentalmente.

5.2 DINÂMICA MOLECULAR

As análises realizadas a partir das trajetórias obtidas nas simulações por DM dos diferentes sistemas mostrados na Figura 19, foram realizadas através de programas do pacote *GROMACS*, sendo os gráficos gerados pelo *XMGRACE* e as figuras das enzimas com *ADT*.

Na Figura 30, vemos a estrutura da MAO-A, sem ligante, em *snapshots* retirados ao longo da DM, estrutura inicial ou *tempo zero* (cinza), após 10 ns (roxo), após 50 ns (verde) e após 100 ns (laranja). É possível ver que a enzima sofre alterações conformacionais significativas na região C-terminal, como era esperado, uma vez que esta é a região de ligação com a membrana, sendo que no presente trabalho não foram realizadas simulações em membrana.

Estudos computacionais, por DM, da MAO-A e da MAO-B em membrana mostraram a importância da região transmembrana nos processos mecânicos da MAO.^{80,81,82} No entanto, a ausência da consideração da membrana não prejudica a análise dos resultados no presente trabalho, uma vez que o foco principal é com relação às interações na região do sítio ativo, relativamente afastada da porção transmembrana.

Os demais sistemas simulados, mostrados na Figura 19, com a MAO-A apresentaram comportamento bastante similar ao da Figura 30. Analogamente, todos os sistemas com a MAO-B também apresentaram alteração conformacional significativa nesta região, como mostrado na Figura 31, para a DM da MAO-B sem ligante.

As alterações que possam ocorrer na região do sítio ativo devem ser investigadas, assim como as diferenças conformacionais entre cada um dos sistemas.



Figura 30: Sobreposição da estrutura inicial da MAO-A sem ligante (cinza), após 10 ns (roxo), 50 ns (verde) e 100 ns (laranja).



Figura 31: Sobreposição da estrutura inicial da MAO-B sem ligante (cinza), após 10 ns (roxo), após 50 ns (verde) e após 100 ns (laranja).

A evolução da estrutura média para os diferentes sistemas foi avaliada através da análise do desvio médio quadrático *RMSD* (do inglês, *Root Mean Square Deviation*) das posições atômicas, em relação a uma estrutura de referência. Na Figura 32, vemos o gráfico de *RMSD*, considerando-se o complexo formado por MAO-A + LIGANTE e também o sistema MAO-A + FAD, denominado sem ligante, e de forma análoga para a MAO-B, na Figura 33.

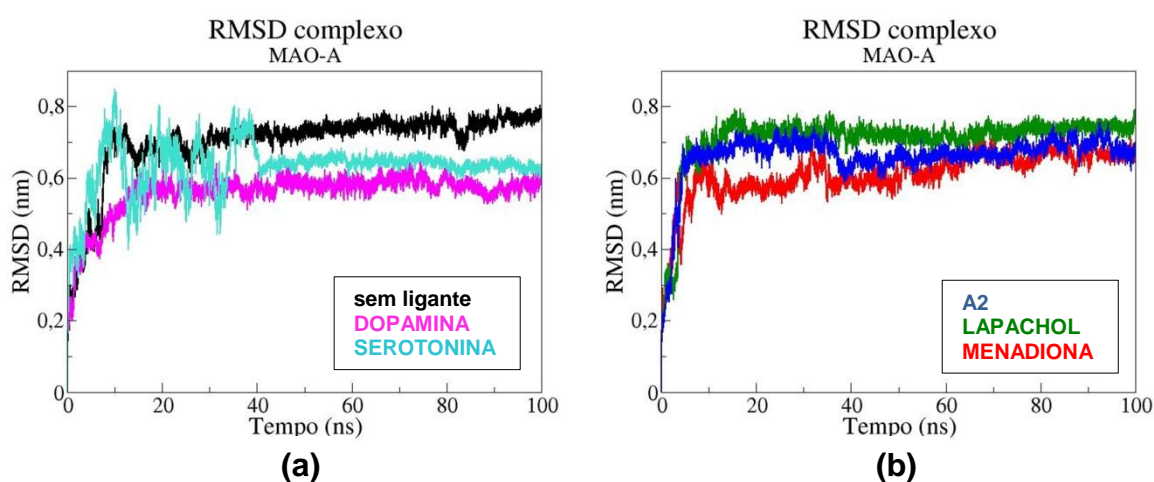


Figura 32: *RMSD* do complexo para os diferentes sistemas com a MAO-A, (a) sem ligante, dopamina e serotonina, (b) A2, lapachol e menadiona.

Comparando a Figura 32 com a Figura 33, vemos que os valores de *RMSD* dos complexos são menores para MAO-B do que para MAO-A.

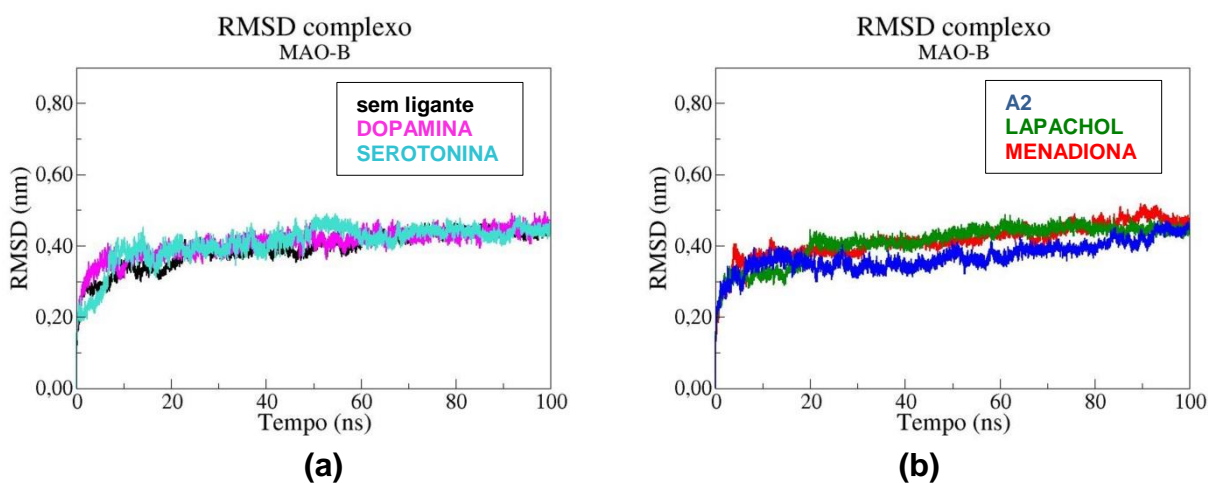


Figura 33: *RMSD* do complexo para os diferentes sistemas com a MAO-B, (a) sem ligante, dopamina e serotonina, (b) A2, lapachol e menadiona.

A hélice C-terminal da MAO-A e da MAO-B é a região de inserção das enzimas na membrana mitocondrial. Como as simulações foram realizadas sem a membrana, esta região tem sua estrutura bastante modificada ao longo da DM, assim, como mostrado na Figura 30 e na Figura 31. Para comparar melhor MAO-A com MAO-B, foram analisados os gráficos de *RMSD* do complexo, porém desconsiderando a região C-terminal de ambas as enzimas. Neste caso, os valores de *RMSD* são mais similares para a MAO-A e MAO-B, ainda assim, os complexos envolvendo a MAO-B apresentam comportamento mais monotônico do que os complexos com a MAO-A.

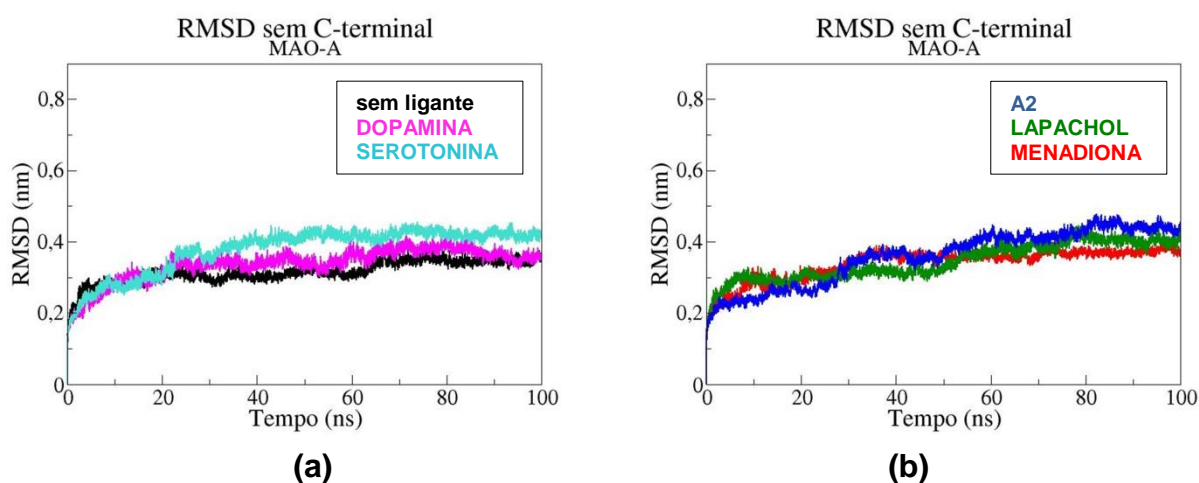


Figura 34: *RMSD* do complexo para os diferentes sistemas com a MAO-A, sem porção C-terminal, (a) sem ligante, dopamina e serotonina, (b) A2, lapachol e menadiona.

Considerando-se a análise de *RMSD*, é importante salientar que as simulações realizadas da MAO-A com os ligantes, MENADIONA, LAPACHOL e A2, Figura 34, apresenta convergência a partir dos 80 ns de simulação, enquanto nos demais sistemas isso ocorre a partir de 70 ns. Além disso, o substrato SEROTONINA, específico para MAO-A, provoca uma alteração maior nessa isoforma, do que na MAO-B.

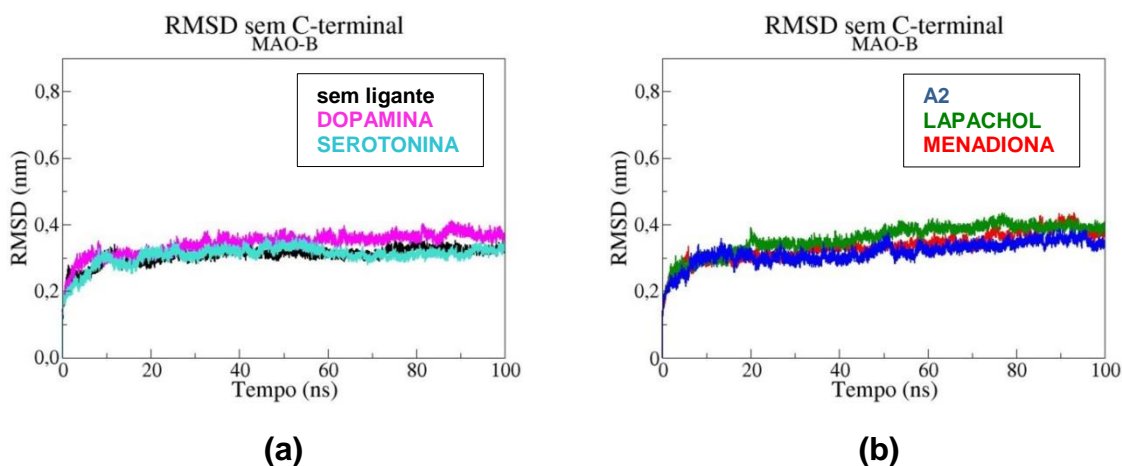


Figura 35: *RMSD* do complexo para os diferentes sistemas com a MAO-B, sem porção C-terminal, (a) sem ligante, dopamina e serotonina, (b) A2, lapachol e menadiona.

Analisando as ligações de hidrogênio, Figura 36, vemos que o ligante A2 apresenta uma ou até duas ligações de hidrogênio com o cofator FAD na MAO-B, o que também ocorre com MAO-B + serotonina. Já o substrato dopamina apresenta no máximo uma HB com a MAO-B. Com relação à MAO-A, não foi observada HB entre o cofator FAD e os ligantes estudados.

No entanto, considerando-se o número de ligações de hidrogênio entre os diferentes ligantes e resíduos da MAO-A e MAO-B, Figura 37 e Figura 38, vemos que o comportamento é bastante similar comparando-se um mesmo ligante com MAO-A ou MAO-B, resultado que pode demonstrar a similaridade do ambiente na região do sítio ativo das duas isoformas.

O ligante que apresenta diferença mais significativa entre as duas isoformas é a menadiona, que apresenta no máximo uma HB com a MAO-B, sendo que na maior parte do tempo não forma nenhuma. Já com a MAO-A, é possível observar a formação de duas ou até três HBs em alguns instantes da simulação.

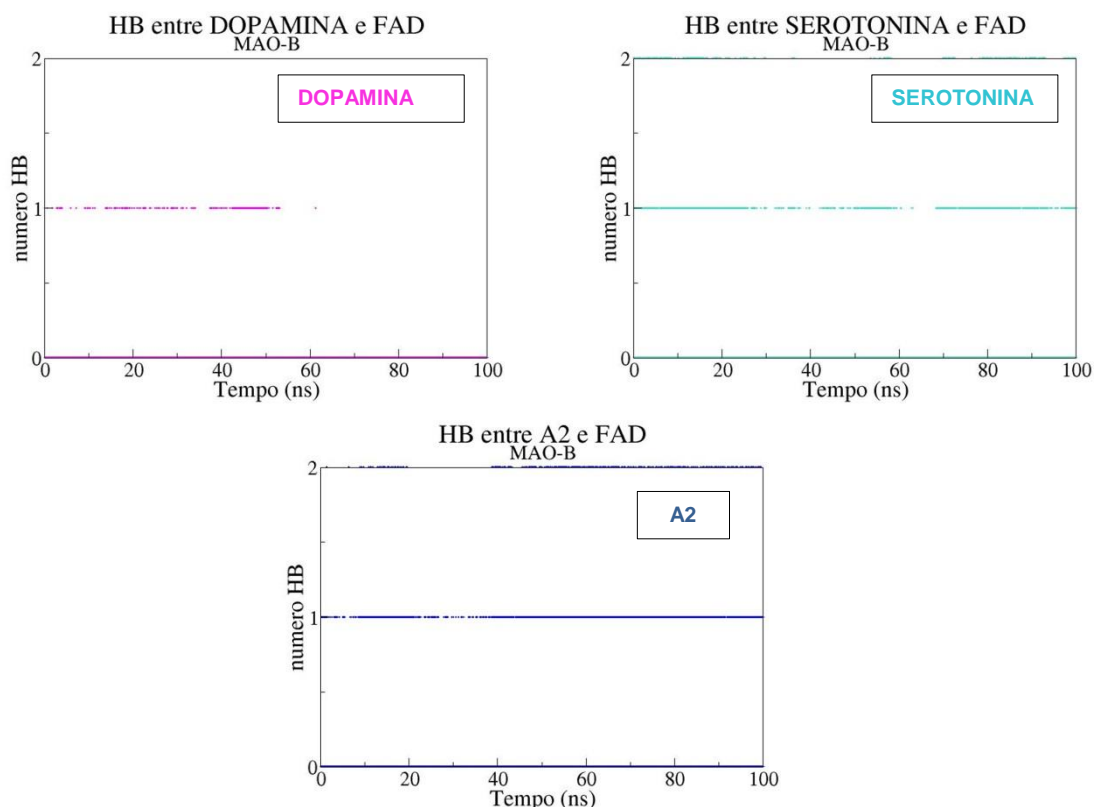


Figura 36: Ligações de hidrogênio entre o FAD da MAO-B e os ligantes dopamina, serotonina e A2.

A partir da Tabela VIII, onde estão listados o número médio de ligações de hidrogênio entre a MAO-A e MAO-B, com os diferentes ligantes, é possível ver que os substratos dopamina e serotonina apresentam cerca de 2 HB tanto com a MAO-A quanto com a MAO-B. Já para os ligantes A2 e lapachol este valor é mais próximo de 1. O ligante menadiona apresenta valores próximos de zero, no entanto, observa-se que a média para MAO-A é maior que o dobro da média para MAO-B.

Tabela VIII: Número médio de ligações de hidrogênio

LIGANTE	MAO-A	MAO-B
A2	0,94	1,42
DOPAMINA	2,21	2,24
LAPACHOL	0,70	0,82
MENADIONA	0,22	0,09
SEROTONINA	2,46	2,02

A pequena diferença no número médio de HB entre a menadiona e as duas isoformas da MAO, pode demonstrar que a alta afinidade da interação da menadiona com a MAO-B, cerca de 60 vezes maior do que com a MAO-A, deva ter a contribuição de interações de outra natureza, como dispersivas, por exemplo.

A avaliação de regiões próximas ao sítio ativo que possam interferir na afinidade com os diferentes ligantes, como as alças descritas no capítulo 2.2, é importante para um entendimento mais detalhado dos receptores MAO-A e MAO-B. Diferenças conformacionais dessas alças podem afetar a especificidade de substratos e inibidores, embora essas duas regiões sejam bastante similares na MAO-A e MAO-B.²⁶ A alça em verde, designada por alça da superfície do sítio ativo, é envolvida no acesso à entrada da cavidade do sítio ativo. Já a alça em preto, designada como alça da cavidade do sítio ativo, está bastante próxima da cavidade do substrato, podendo ser uma região importante na seletividade de substratos e inibidores.

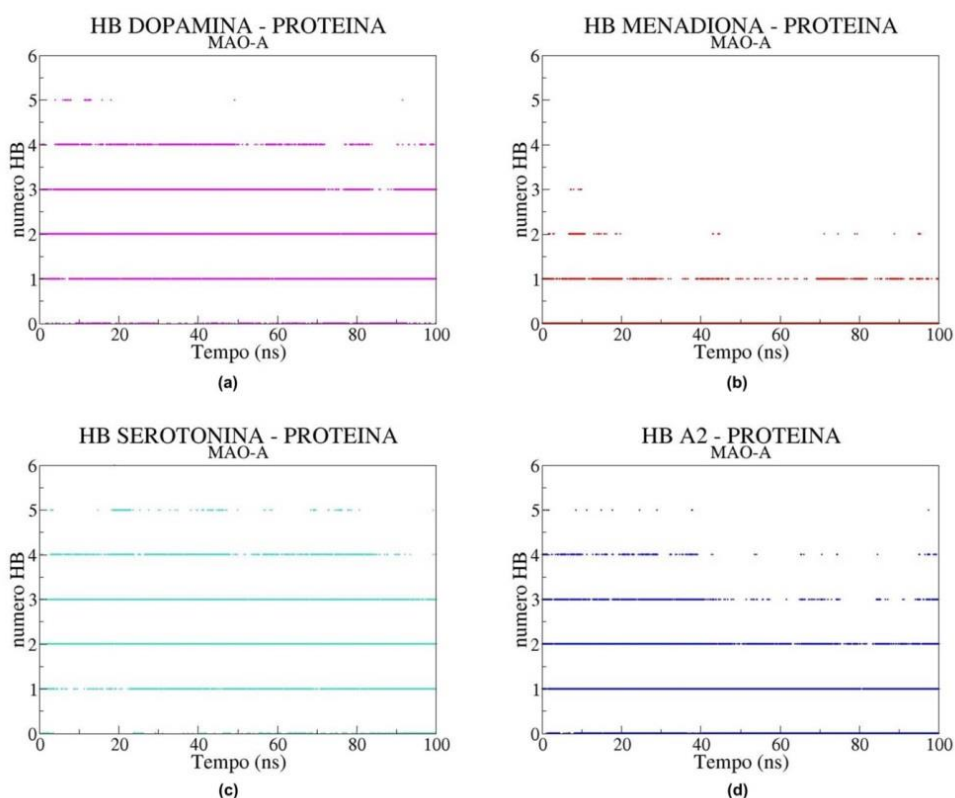


Figura 37: Ligações de hidrogênio entre a MAO-A e os ligantes (a) dopamina, (b) menadiona, (c) serotonina e (d) A2.

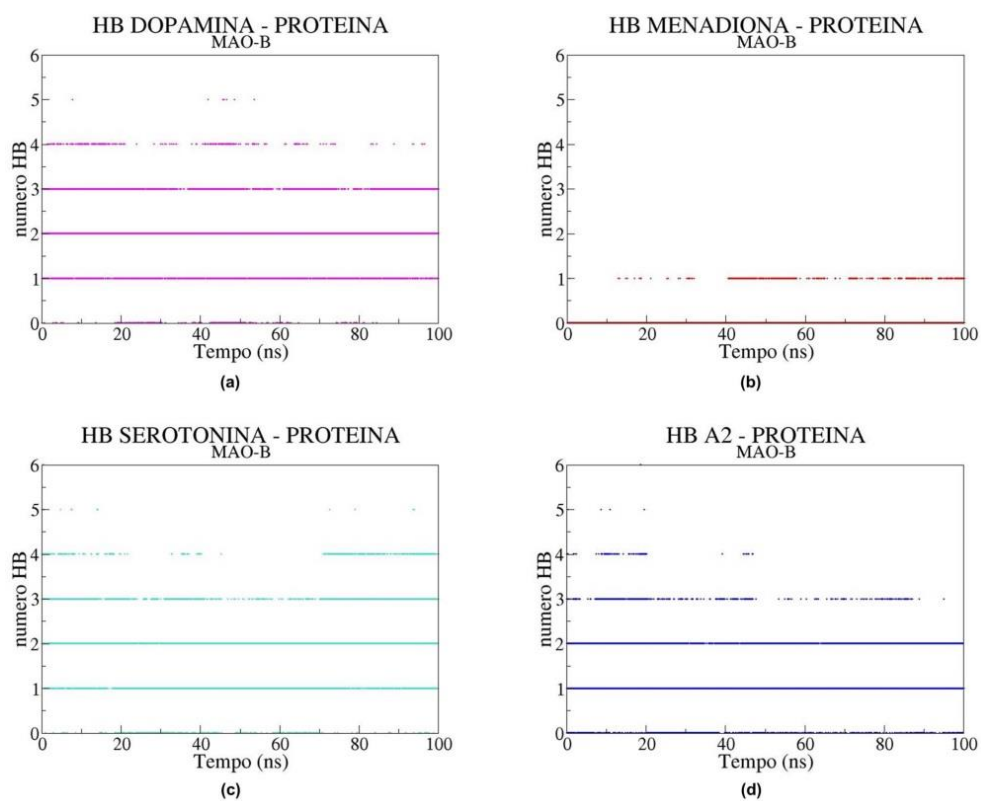


Figura 38: Ligações de hidrogênio entre a MAO-A e os ligantes (a) dopamina, (b) menadiona, (c) serotonina e (d) A2.

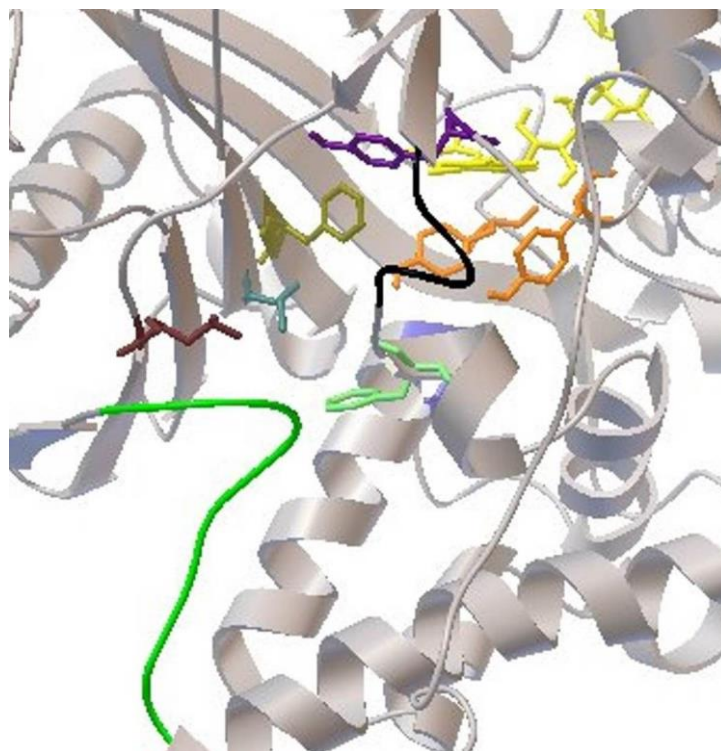


Figura 39: Visualização da alça da superfície do sítio ativo, em verde, e alça da cavidade do sítio ativo, em preto.

Com a finalidade de avaliar aspectos estruturais da *alça* da superfície do sítio ativo e da *alça* da cavidade do sítio ativo, assim como diferenças entre elas, foram selecionados 8 resíduos para cada *alça*, que estão listados na Tabela IX.^{25,27,26}

Tabela IX: Sequência de resíduos representantes da *alça* da superfície e da *alça* da cavidade do sítio ativo, para MAO-A e MAO-B.

alça da superfície		alça da cavidade	
MAO-A	MAO-B	MAO-A	MAO-B
Gly110	Gly101	Ser209	Ser200
Ala111	Pro102	Val210	Thr201
Phe112	Phe103	Thr211	Thr202
Pro113	Pro104	Asn212	Asn203
Pro114	Pro105	Gly213	Gly204
Val115	Val106	Gly214	Gly205
Trp116	Trp107	Gln215	Gln206
Asn117	Asn108	Glu216	Glu207

Segundo Son e colaboradores,²⁶ a flexibilidade da *alça* da superfície do sítio ativo e o ancoramento da enzima na membrana são essenciais no controle do acesso do substrato no sítio ativo. Além disso, deve ocorrer a movimentação de resíduos da cavidade do sítio ativo, para que o substrato seja metabolizado.²⁵

Avaliando a distância entre o primeiro e o último resíduo das *alças* da superfície do sítio ativo e da cavidade do sítio ativo (escolhidos conforme Tabela IX), vemos que a *alça* da superfície apresenta uma amplitude (abertura) maior do que a *alça* da cavidade do sítio ativo, o que está de acordo com a visualização na Figura 39. Além disso, a *alça* da superfície apresenta comportamento menos monotônico do que a *alça* da cavidade, ou seja, essa *alça* apresenta menor restrição ao movimento do que a *alça* da cavidade.

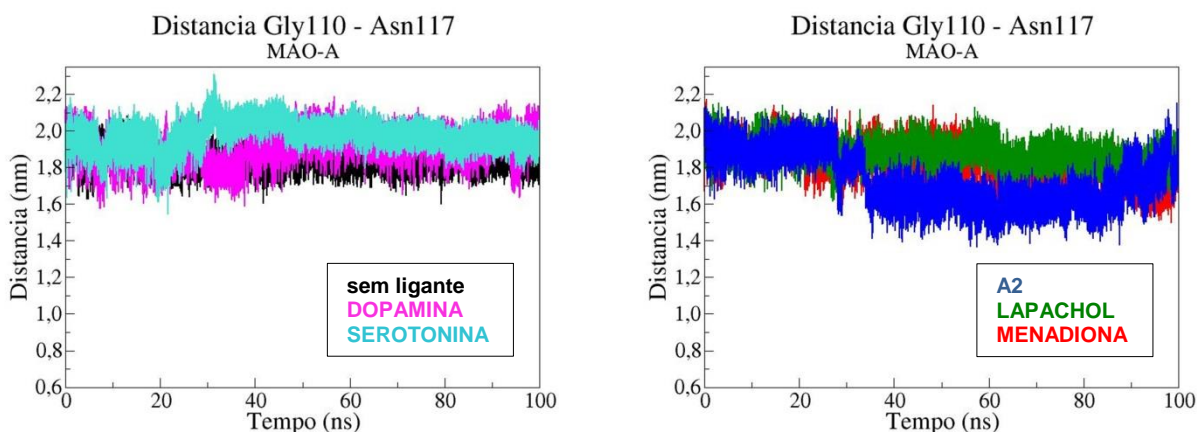


Figura 40: Distância entre os resíduos Gly110 e Asn117, extremidades da alça da superfície do sítio ativo, para MAO-A.

O comportamento para MAO-A e para MAO-B é bastante similar, porém para os ligantes serotonina e A2 a diferença é mais acentuada. Além disso, de maneira geral, os sistemas com a maior apresentam distâncias um pouco maiores do que com a MAO-B.

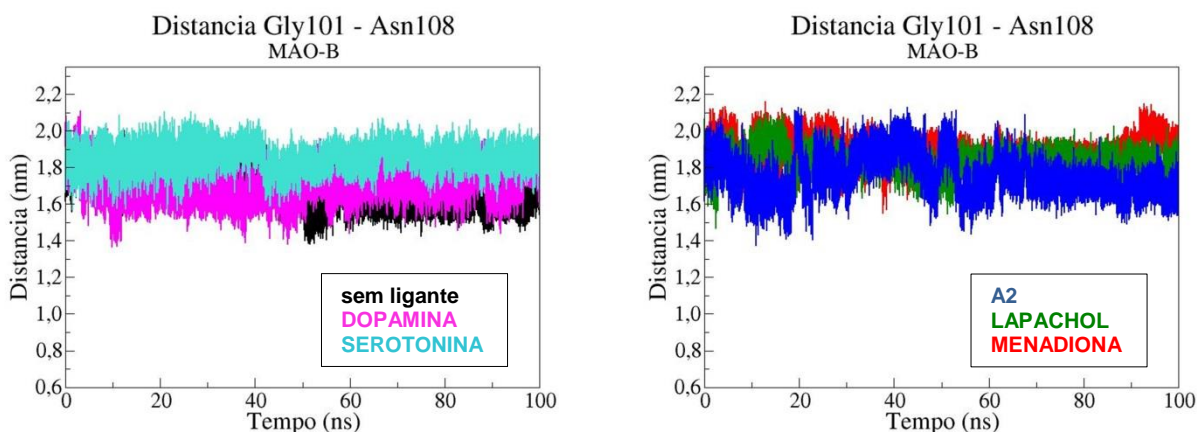


Figura 41: Distância entre os resíduos Gly101 e Asn108, extremidades da alça da superfície do sítio ativo, para MAO-B.

Monitorando a distância entre os resíduos Ser209-Glu216 (MAO-A) e Ser200-Glu207 (MAO-B), Figura 42 e Figura 43, vemos que as diferenças mais significativas entre MAO-A e MAO-B são com relação às enzimas sem ligante, e com os ligantes menadiona e A2. Esses ligantes, com a MAO-A, apresentaram distâncias maiores do que com a MAO-B. Isso está de acordo com resultados experimentais, que mostraram que o *alça* da cavidade do sítio ativo no caso da MAO-A apresenta uma conformação mais estendida, enquanto o da MAO-B é mais compacto.³⁷

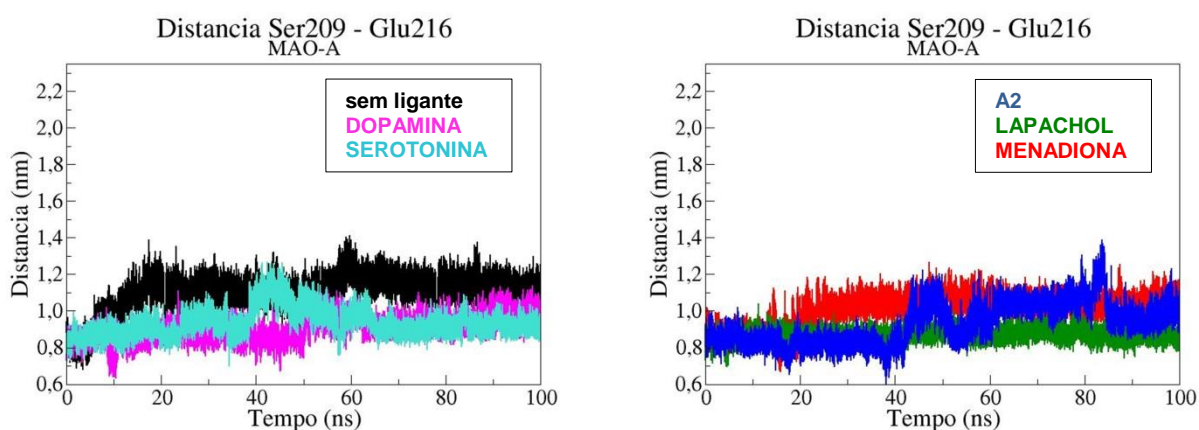


Figura 42: Distância entre os resíduos Ser209 e Glu216, extremidades da alça da cavidade do sítio ativo.

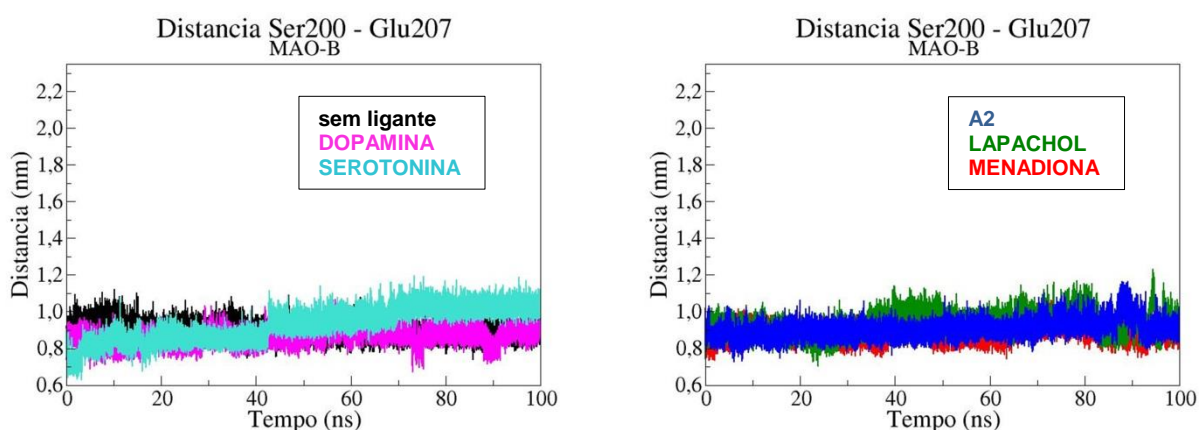


Figura 43: Distância entre os resíduos Ser200 e Glu207, extremidades da alça da cavidade do sítio ativo.

Os resíduos Phe112 e Phe103, respectivamente para MAO-A e MAO-B, são resíduos situados na curva da alça da superfície do sítio ativo. O monitoramento das distâncias entre esses resíduos e o FAD, Figura 44 e Figura 45 para MAO-A e MAO-B, respectivamente, permite avaliar a mobilidade desta alça.

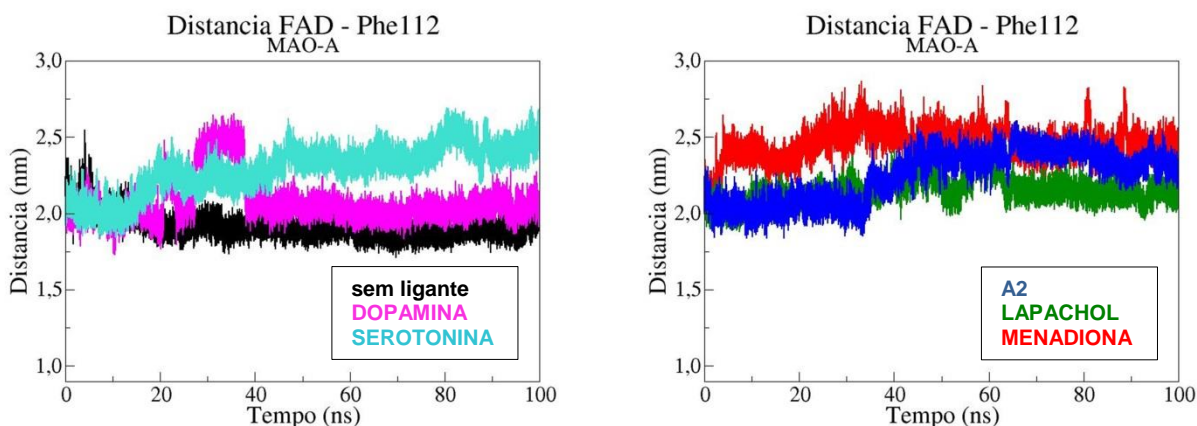


Figura 44: Distância entre o FAD e o resíduo Phe112 da alça da superfície do sítio ativo, para MAO-A

É possível ver que todos os sistemas da MAO + LIGANTES, seja MAO-A ou MAO-B, apresentam flutuações, enquanto que para as enzimas sem ligante, esse *alça* permanece quase inalterado. Além disso, para todos os sistemas os valores são diferentes para MAO-A e MAO-B. No entanto, o perfil das curvas para é bastante semelhante quando comparadas MAO-A e MAO-B, sendo que a maioria dos sistemas MAO+LIGANTE apresenta um aumento nessa distância.

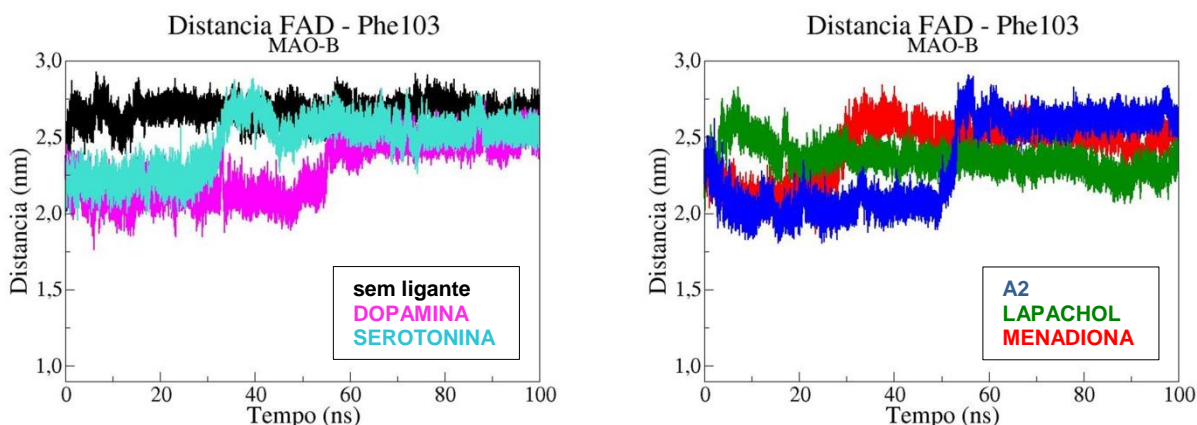


Figura 45: Distância entre o FAD e o resíduo Phe103 do *alça* da superfície do sítio ativo, para MAO-B

Com relação ao *alça* da cavidade do sítio ativo, os resíduos Gly213 e Gly204, MAO-A e MAO-B respectivamente, estão situados na curva da alça. Assim, de maneira análoga ao discutido acima, o monitoramento da distância entre esses resíduos e o FAD pode dar uma ideia da mobilidade desta região.

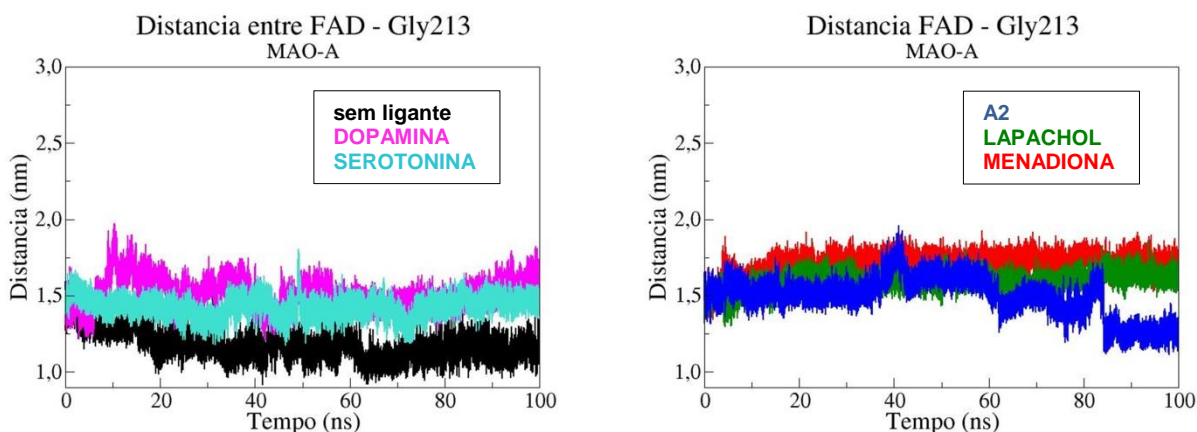


Figura 46: Distância entre o FAD e o resíduo Gly213 da alça da superfície do sítio ativo, para MAO-A

Neste, caso, os sistemas apresentam comportamento mais similar entre si. No caso do ligante menadiona, vemos que a distância Gly-FAD é maior no sistema com a MAO-A do que para MAO-B. Assim, pode-se inferir que o sítio ativo da MAO-B com o ligante menadiona está mais “compacto” do que com a MAO-A.

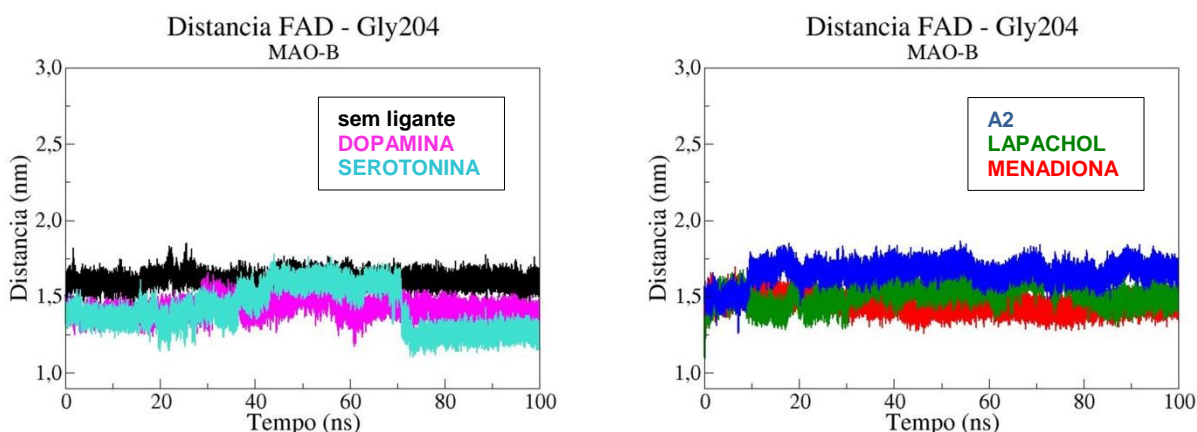


Figura 47: Distância entre o FAD e o resíduo Gly204 da alça da superfície do sítio ativo, para MAO-B

Na Figura 48, são mostrados alguns resíduos que fazem parte do sítio ativo da MAO-A e MAO-B. Vemos que na região central do sítio ativo, três resíduos são diferentes quando comparadas MAO-A e MAO-B, são eles: Asn181, Phe208 e Ile335 para MAO-A, Cys172, Ile199 e Tyr326 para MAO-B. Análises desses resíduos são importantes para o entendimento das interações de cada uma das isoformas com substratos e/ou inibidores.

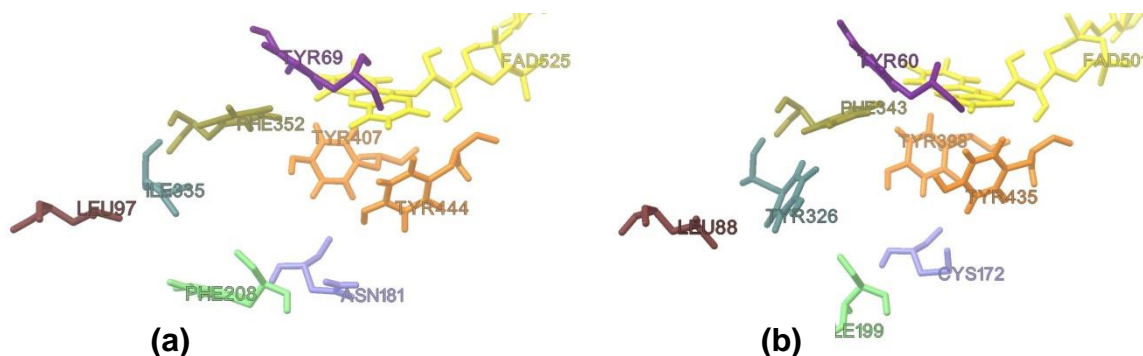


Figura 48: Alguns resíduos do sítio ativo da MAO-A (a) e da MAO-B (b).

Analisando a mobilidade relativa, através do *RMSF* (do inglês, *Root Mean Square Fluctuation*) de alguns resíduos que fazem parte do sítio ativo das enzimas (mostrados na Tabela II, capítulo 2.2.2), vemos que para o caso da MAO-A o resíduo Phe208 apresenta a maior mobilidade para todos os sistemas, com exceção do sistema MAO-A + lapachol.

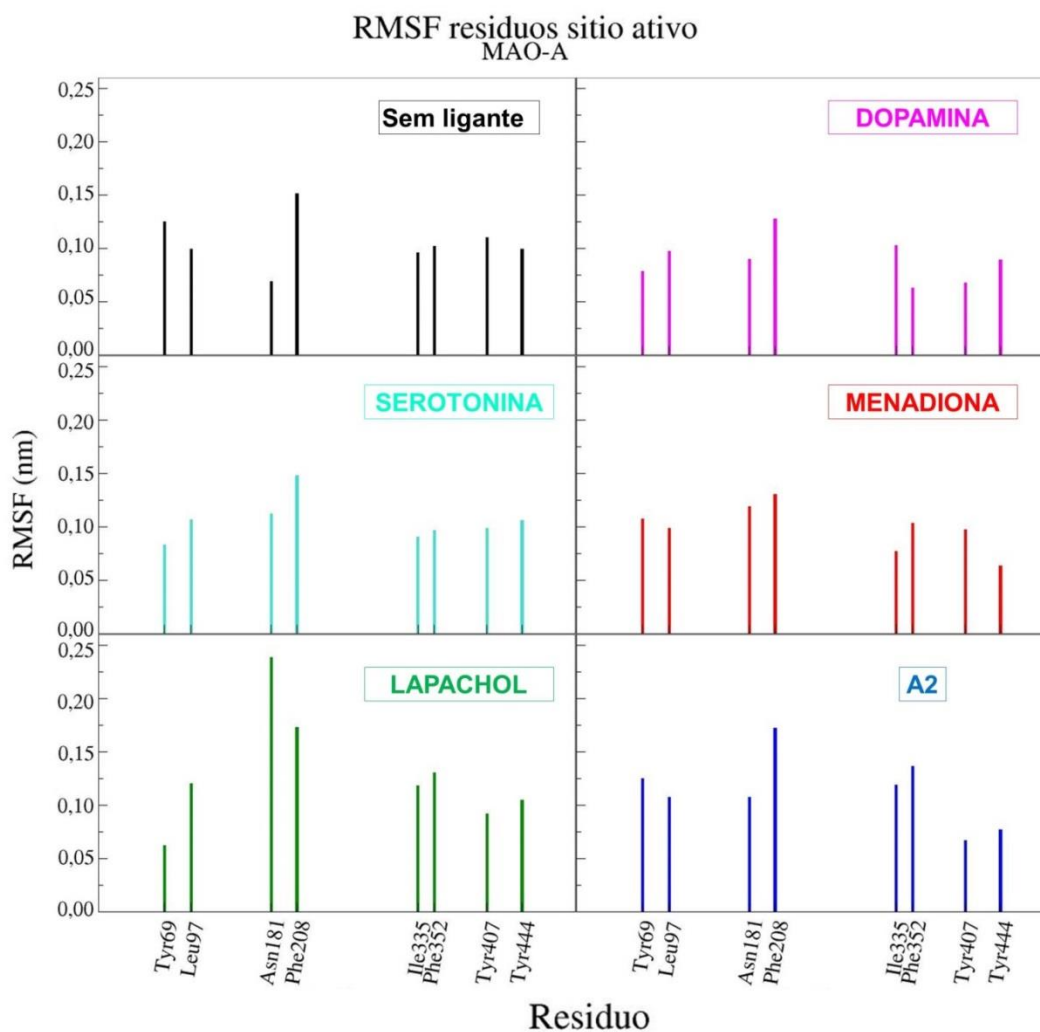


Figura 49: *RMSF* ligantes do sítio ativo da MAO-A.

Comparando-se MAO-A sem ligante com MAO-A + lapachol, vemos que enquanto para o primeiro sistema o resíduo Asn181 apresenta a menor mobilidade, para o segundo caso, este resíduo tem a maior mobilidade. Essas análises permitem que sejam avaliadas alterações estruturais no sítio ativo das enzimas, quando complexada com diferentes ligantes, ou das enzimas livres. Outra constatação é que os resíduos do "sanduíche aromático", tanto da MAO-A quanto da MAO-B, apresentaram mobilidades semelhantes, com exceção dos sistemas MAO-A + menadiona e MAO-B sem ligante.

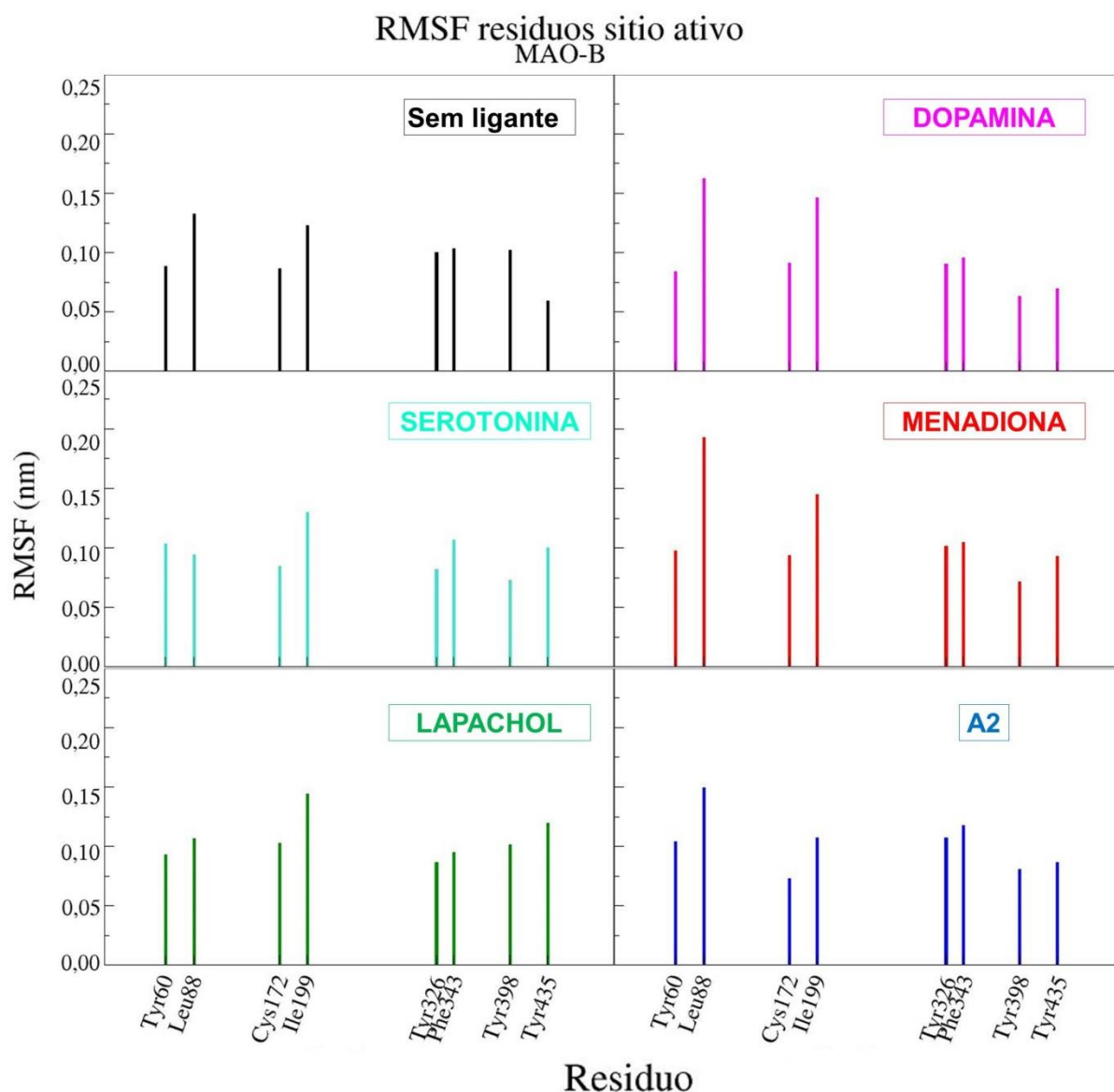


Figura 50: RMSF ligantes sítio ativo da MAO-B.

Já para os sistemas com a MAO-B, o resíduo Leu88 é o que apresentou a maior mobilidade para a maioria dos sistemas. Já o resíduo correspondente na MAO-A, Leu97 apresentou comportamento praticamente igual em todos os sistemas.

Esses resíduos são os mais distantes do FAD, dentro da região do sítio ativo, como visualizado na Figura 48. Monitorando as distâncias entre Leu97-FAD, para MAO-A e Leu88-FAD para MAO-B, Figura 51 e Figura 52, respectivamente, vemos que os valores são bastante próximos para as duas enzimas, no entanto, para o sistema MAOB + menadiona, ocorre uma aproximação da Leu88 com o FAD, o que permite inferir que o sítio ativo pode apresentar um encurtamento da sua cavidade do substrato, devido às alterações conformacionais da Leu88.

Distancia FAD - Leu97 MAO-A

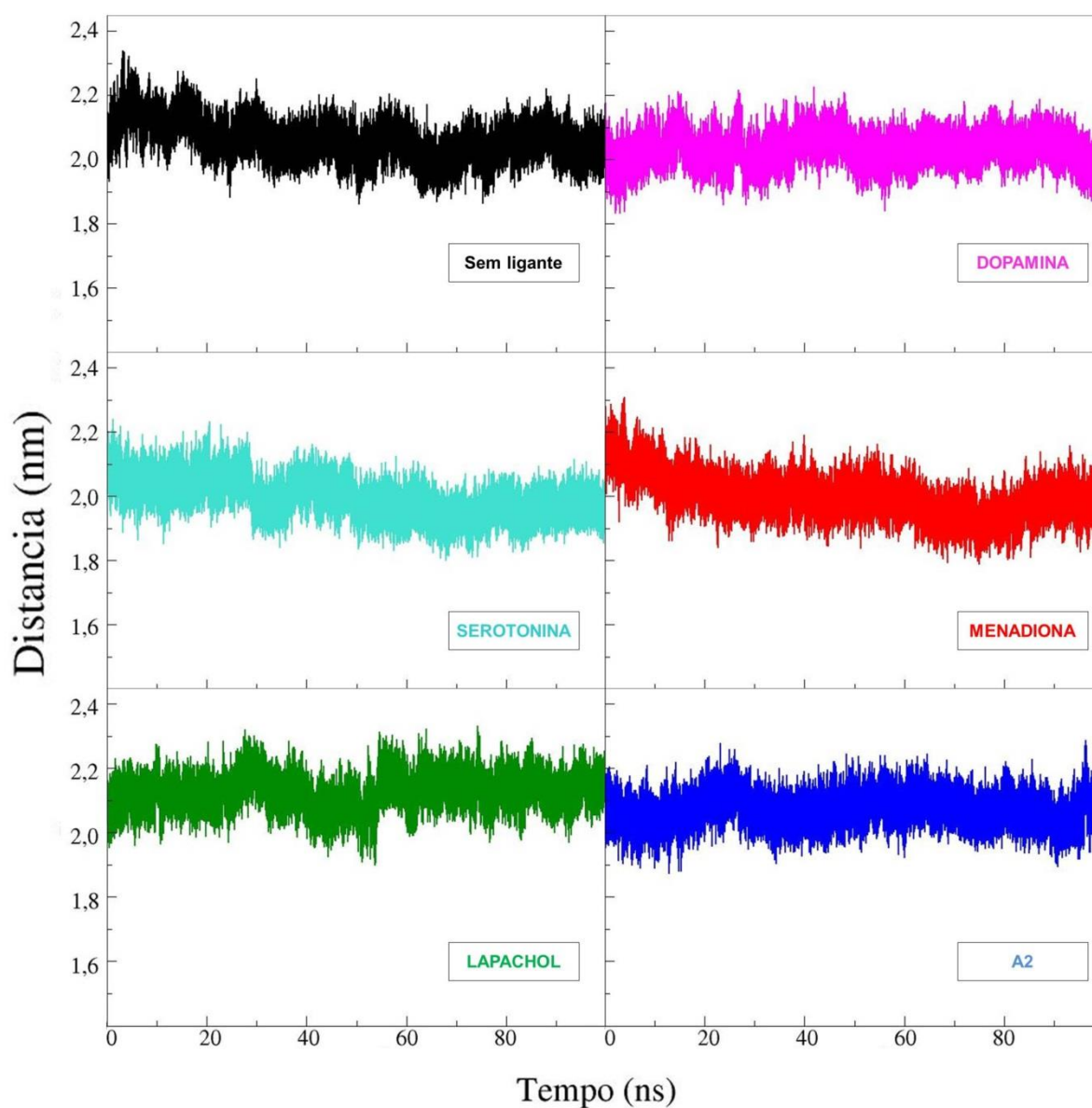


Figura 51: Distância entre FAD e o resíduo Leu97, MAO-A.

Se compararmos a flutuação no valor da distância entre Leu97-FAD e Leu88-FAD para os sistemas com os substratos naturais, vemos que o sistema MAO-A + dopamina apresenta oscilações mais brandas do que a MAO-B + dopamina, assim como MAO-A sem ligante comparada com MAO-B sem ligante. Já o sistema MAO-A + serotonina apresenta maiores oscilações do que MAO-B + serotonina. Além disso, a distância Leu-FAD é maior para MAO-B do que para MAO-A, com esses ligantes.

Distancia FAD - Leu88 MAO-B

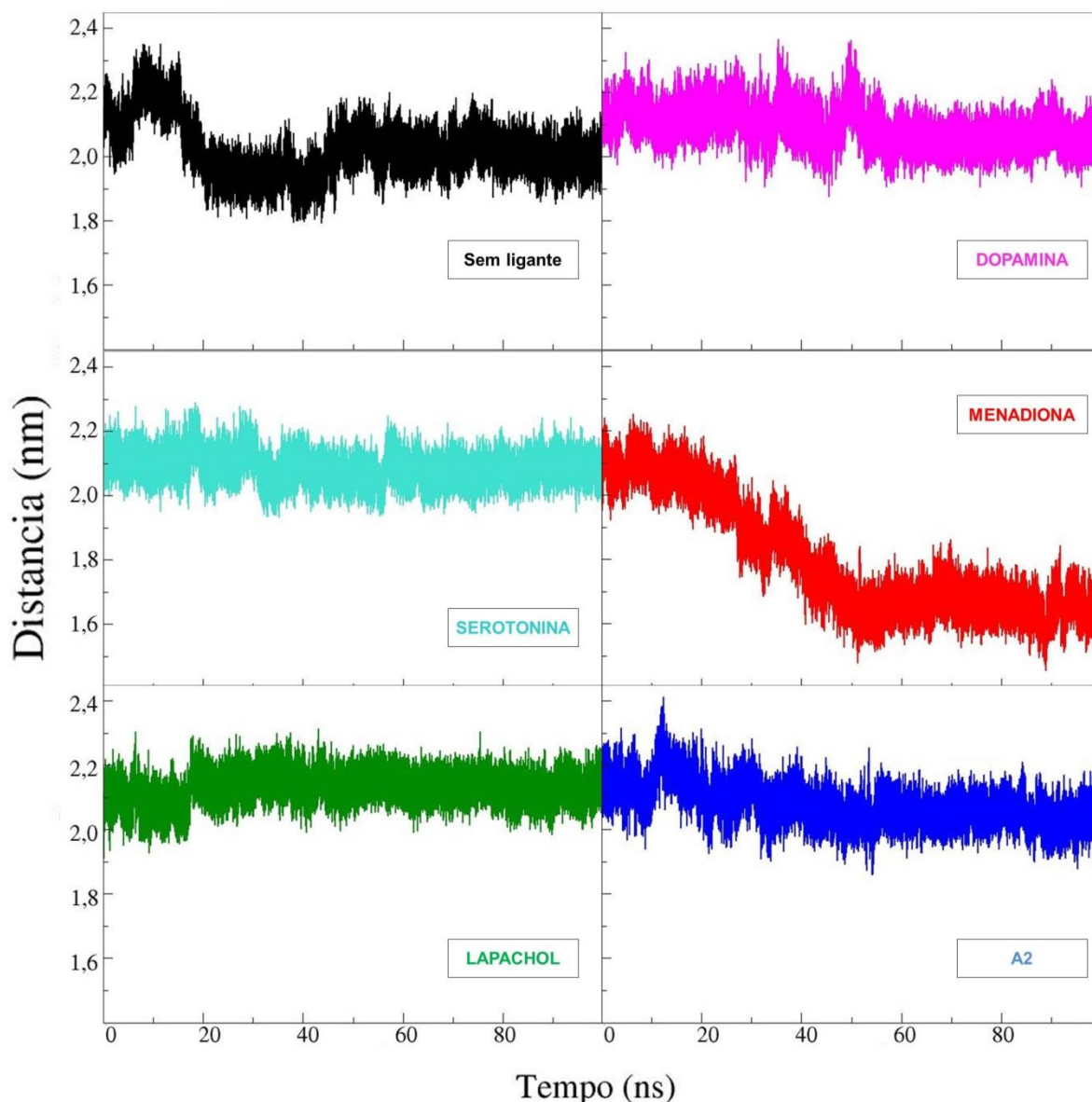


Figura 52: Distância entre o FAD e o resíduo Leu88 MAO-B.

Foi calculada experimentalmente a distância da superfície da cavidade de entrada ao FAD, para MAO-B complexada com a benzilamina, cujo valor é de cerca de 20 Å.²⁵ Este valor está próximo aos valores obtidos para a distância Leu88-FAD, dos sistemas MAO-B + LIGANTES, com exceção da MAO-B+menadiona, conforme mencionado anteriormente.

Analogamente, podemos analisar a distância entre os resíduos Glu216 e Phe352 (MAO-A, Figura 53) e Glu207 e Phe343 (MAO-B, Figura 54), que são dois resíduos localizados na metade do sítio ativo e a distância entre eles pode

corresponder à largura da cavidade do substrato. Neste caso, pode-se observar que os valores com relação à MAO-B são, de um modo geral, menores que para MAO-A, ou seja, a cavidade do substrato é mais estreita para MAO-B e mais larga para MAO-A, o que está de acordo com resultados experimentais.²⁷

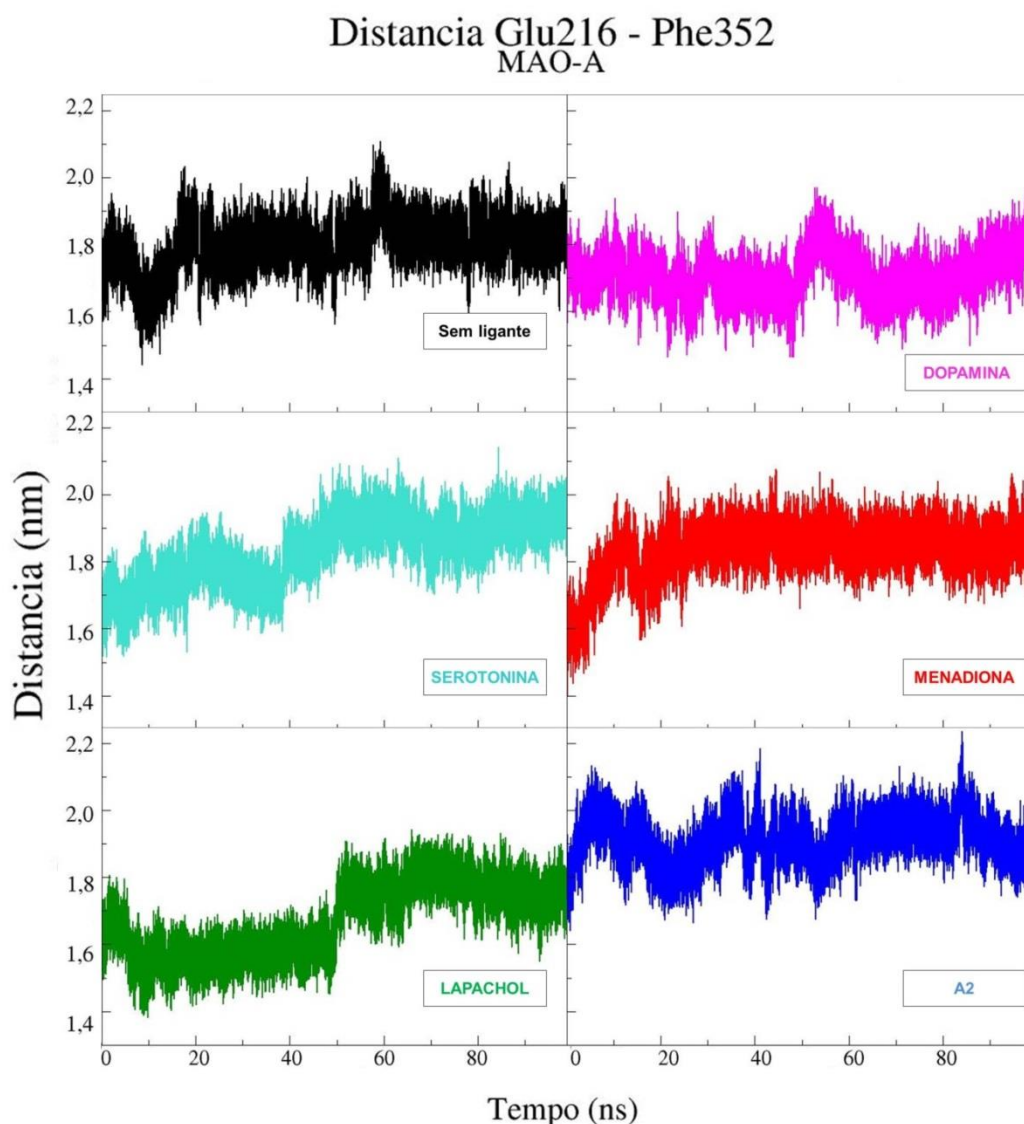


Figura 53: Distância entre os ligantes Glu216 e Phe352, MAO-A.

Foi constatado experimentalmente, que a cavidade do sítio ativo da MAO-A é mais larga e curta do que a da MAO-B, que é mais comprida e estreita. Também não apresenta a natureza dipartida da cavidade da MAO-B. Os resíduos Phe208 e Ile335, para MAO-A e Ile199 e Tyr326, para MAO-B, são importantes na seletividade de substrato e inibidor entre as enzimas.²⁷

Distancia Glu207 - Phe343 MAO-B

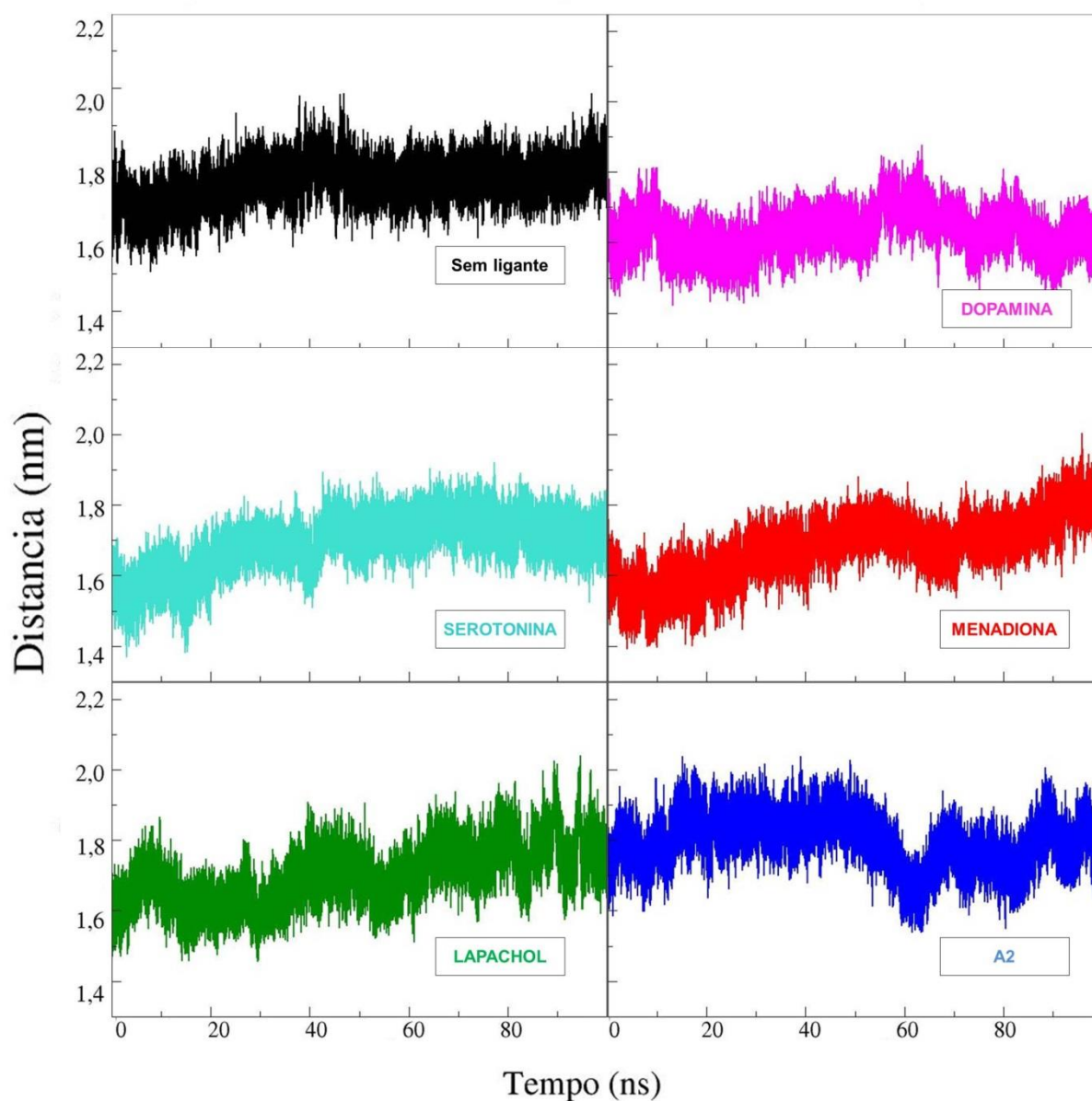


Figura 54: Distância entre os resíduos Glu207 e Phe343, MAO-B.

A comparação estrutural das enzimas MAO-A e MAO-B humanas auxilia no *design* de inibidores mais específicos. A estrutura da gaiola aromática é idêntica para ambas as enzimas, o que é um indício de que o mecanismo de ação possa ser o mesmo.

As Figura 55 e Figura 56 mostram a distância entre os resíduos do "sanduíche aromático", Tyr407/Tyr444 para MAO-A e Tyr398/Tyr435 para MAO-B.

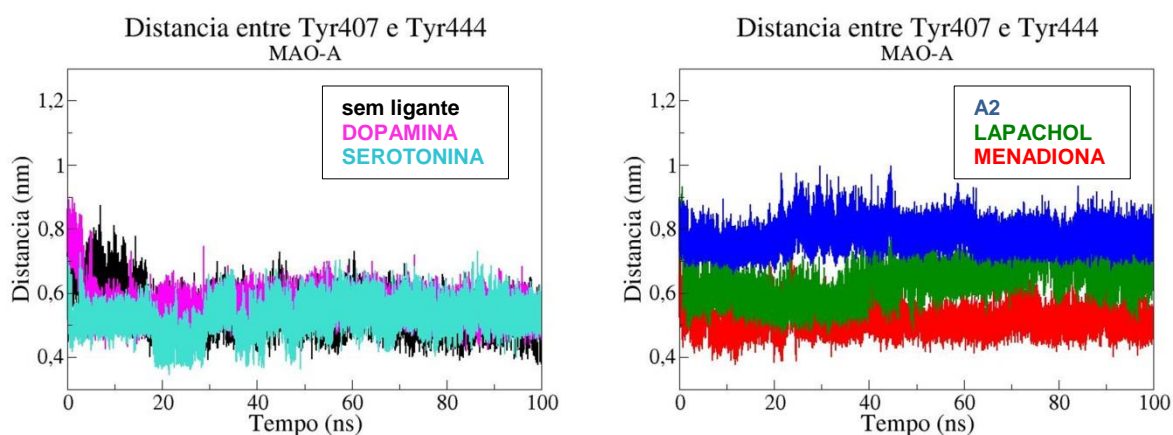


Figura 55: Distância entre os resíduos do "sanduíche aromático" Tyr407 e Tyr444, MAO-A.

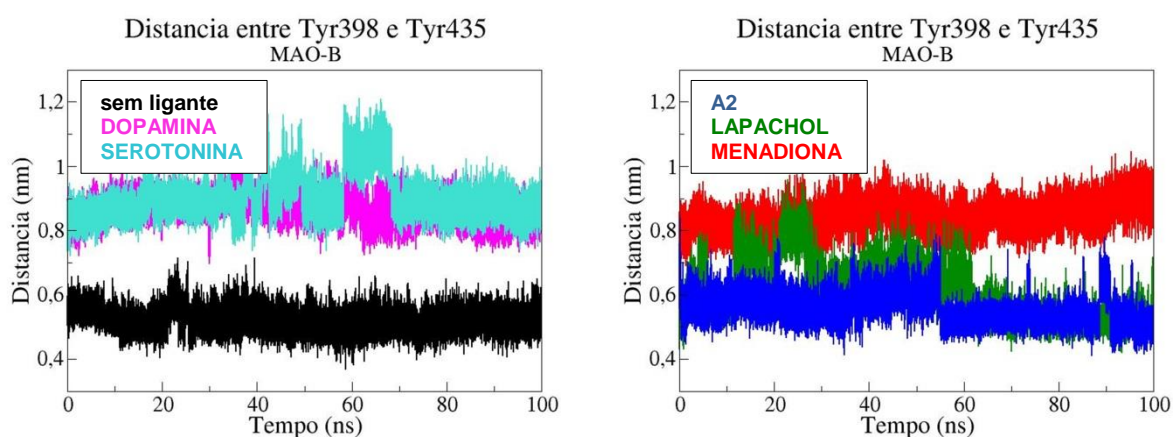


Figura 56: Distância entre os resíduos do "sanduíche aromático" Tyr398 e Tyr435, MAO-A.

Observa-se que para a MAO-A, os sistemas sem ligante, com dopamina, serotonina, menadiona apresentam valores muito próximos para a distância Tyr407-Tyr444. Através das **Erro! Fonte de referência não encontrada.** e Figura 61 é possível observar que os ligantes dopamina e menadiona não estão inseridos na "gaiola aromática", enquanto que o ligante A2, Figura 60, está posicionado entre os dois resíduos tirosina do "sanduíche aromático". Isso, obviamente, faz com que a distância entre eles, nesse caso, seja maior.

Já para o caso da MAO-B com dopamina, **Erro! Fonte de referência não encontrada.**, vemos que o ligante está inserido no "sanduíche aromático", assim como o ligante menadiona.

As Figura 57 e Figura 58 mostram a distância entre o resíduo Ile335 e Phe208 para MAO-A e entre Tyr326 e Ile199 para MAO-B.

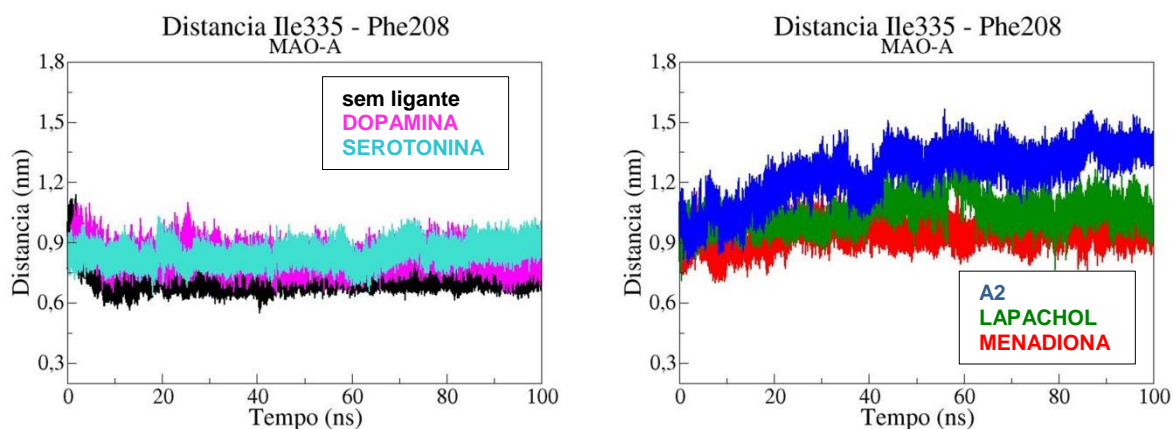


Figura 57: Distância entre os resíduos Ile335 e Phe208, MAO-A.

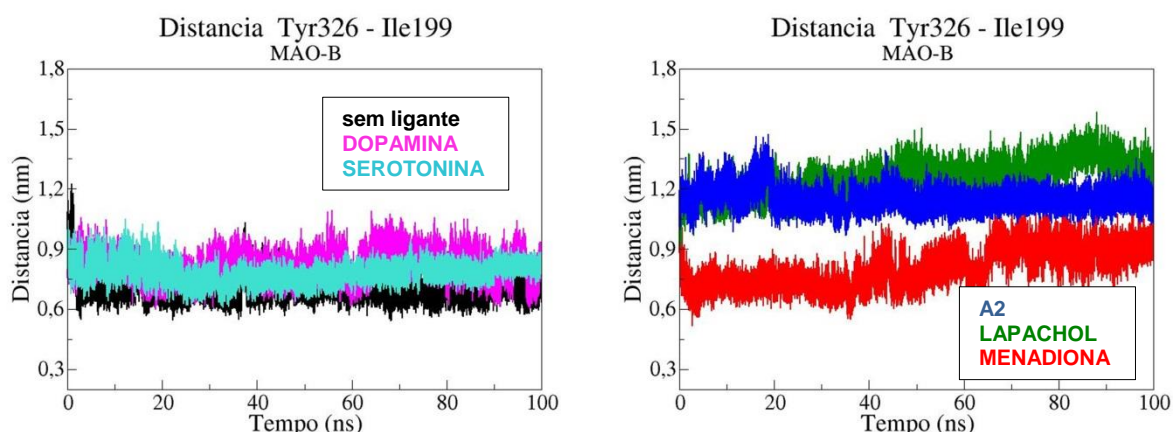


Figura 58: Distância entre os resíduos Tyr326 e Ile199, MAO-B.

É possível observar que para os sistemas sem ligante, com dopamina e com serotonina, a distância é bastante similar para Ile335-Phe208 e Tyr326-Ile199. Já para o sistema MAO-A + A2, a distância Ile335-Phe208 aumenta no decorrer da simulação, enquanto que para MAO-B + A2, a distância entre os resíduos correspondentes Tyr326-Ile199 permanece inalterada. Com relação ao sistema com o ligante menadiona, a distância entre Tyr326-Ile199 é menor do que Ile335-Phe208. No caso da MAO-B + menadiona, o ligante está posicionado entre os resíduos do "sanduíche aromático", um pouco mais afastado dos resíduos Tyr326 e Ile 199, em comparação com os resíduos correspondentes na MAO-A Ile335 e Phe208.

As Figura 59 a Figura 63, mostram a sobreposição das estruturas obtidas ao longo da DM, tempo zero (cinza), após 10 ns (roxo), após 50 ns (verde) e no final dos 100 ns (laranja).

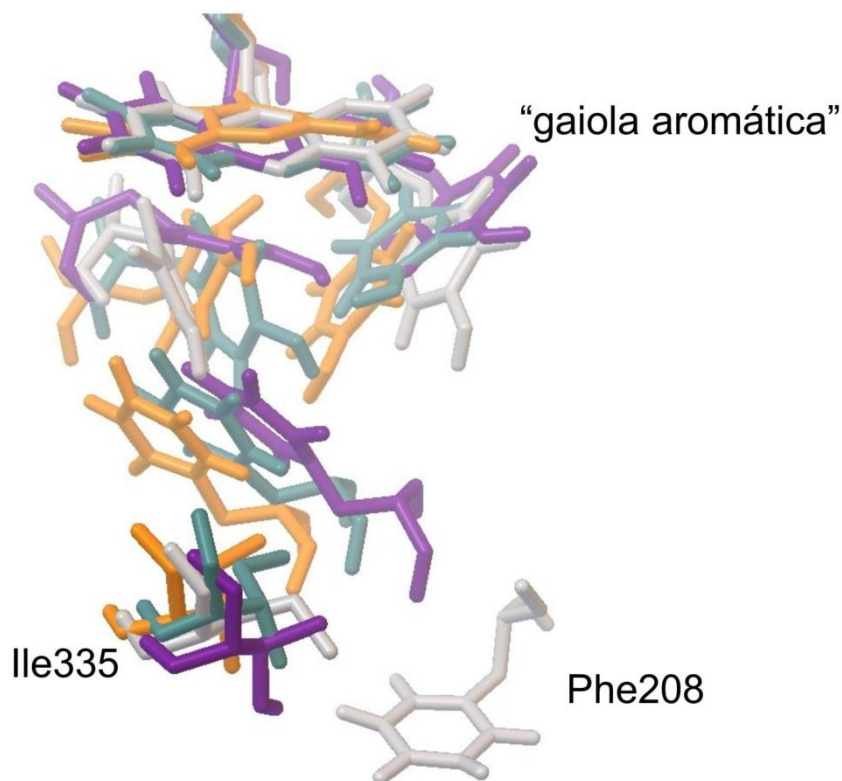


Figura 59: MAO-A sem ligante – sobreposição das estruturas inicial (cinza), após 10 ns (roxo), 50 ns (verde) e 100 ns (laranja).

O ligante A2, complexado com a MAO-A, Figura 60, assim como o ligante menadiona complexado com MAO-B, Figura 64, apresentam a porção 1,4-NQ localizada na região da “gaiola aromática”. Isto faz com que os resíduos Tyr407/Tyr444 (MAO-A) e Tyr398/Tyr435 (MAO-B) fiquem quase paralelos durante toda a simulação. Além disso, vemos que o ligante menadiona fica praticamente na mesma posição ao longo de toda a simulação com a MAO-B. No entanto, com relação à MAO-A, sua posição é alterada com relação à estrutura de partida.

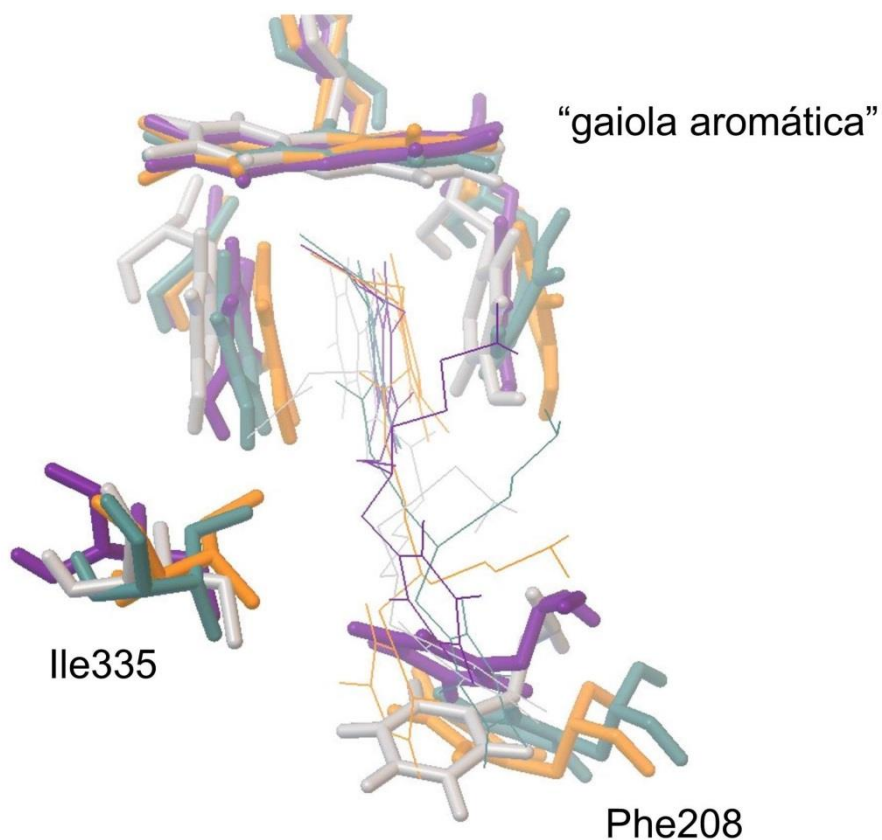


Figura 60: MAO-A + A2 – sobreposição das estruturas inicial (cinza), após 10 ns (roxo), 50 ns (verde) e 100 ns (laranja).

Com relação às enzimas sem ligante, Figura 59 e Figura 62, vemos que os resíduos do "sanduíche aromático" apresentam alteração conformacional, sendo que na MAO-B, o resíduo Tyr398 fica quase paralelo ao FAD.

Além disso, os resíduos Tyr326 e Ile199 no sítio ativo da MAO-B com a menadiona parecem estar se afastando um do outro, como mostrado na Figura 58, cuja curva está levemente ascendente.

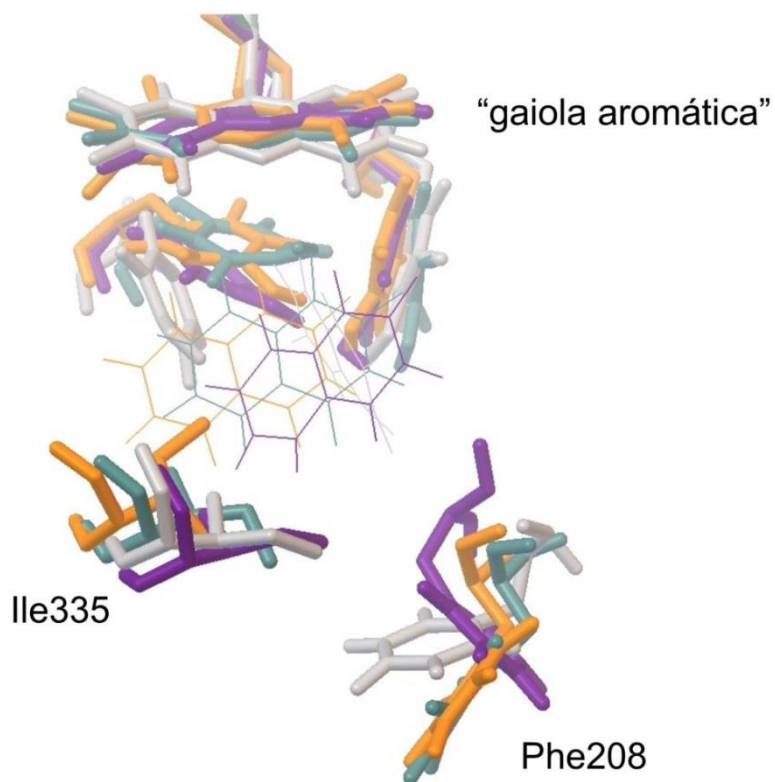


Figura 61: MAO-A + menadiona – sobreposição das estruturas inicial (cinza), após 10 ns (roxo), 50 ns (verde) e 100 ns (laranja).

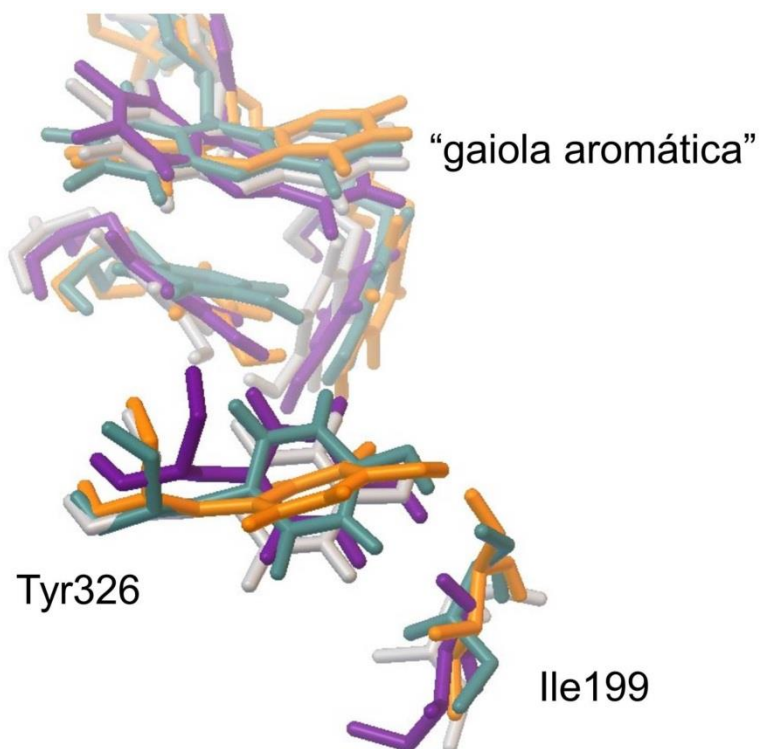


Figura 62: MAO-B sem ligante – sobreposição das estruturas inicial (cinza), após 10 ns (roxo), 50 ns (verde) e 100 ns (laranja).

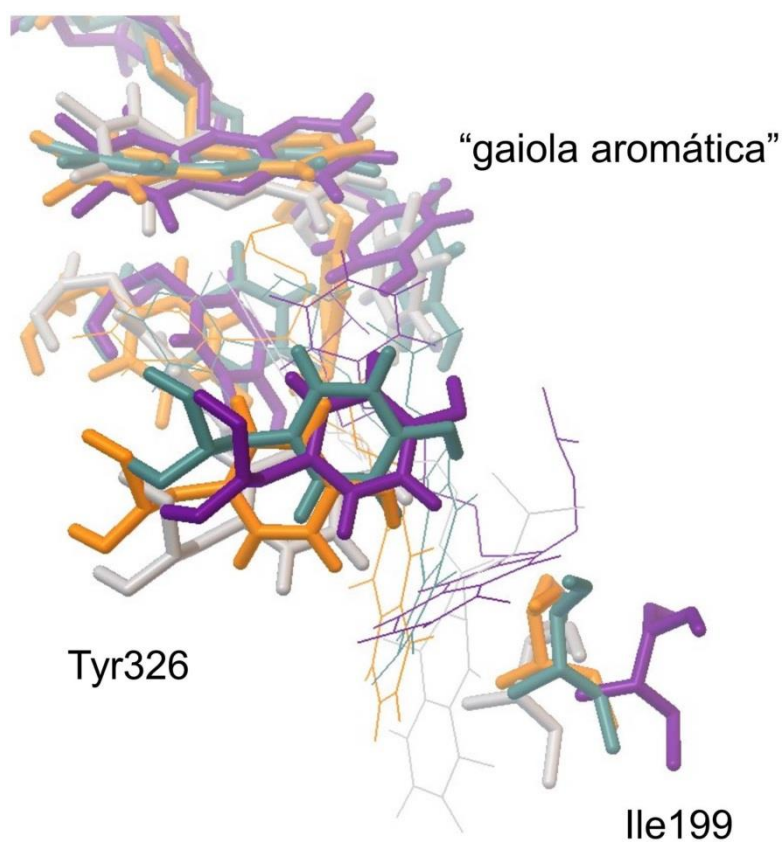


Figura 63: MAO-B + A2 – sobreposição das estruturas inicial (cinza), após 10 ns (roxo), 50 ns (verde) e 100 ns (laranja).

Essas considerações podem ser importantes na tentativa de explicar a seletividade observada experimentalmente para a menadiona com a MAO-B. Além disso, o conhecimento detalhado do sítio ativo das enzimas, bem como alterações que podem ser ocasionadas pela interação com um determinado ligante são importantes para o planejamento de novos inibidores.

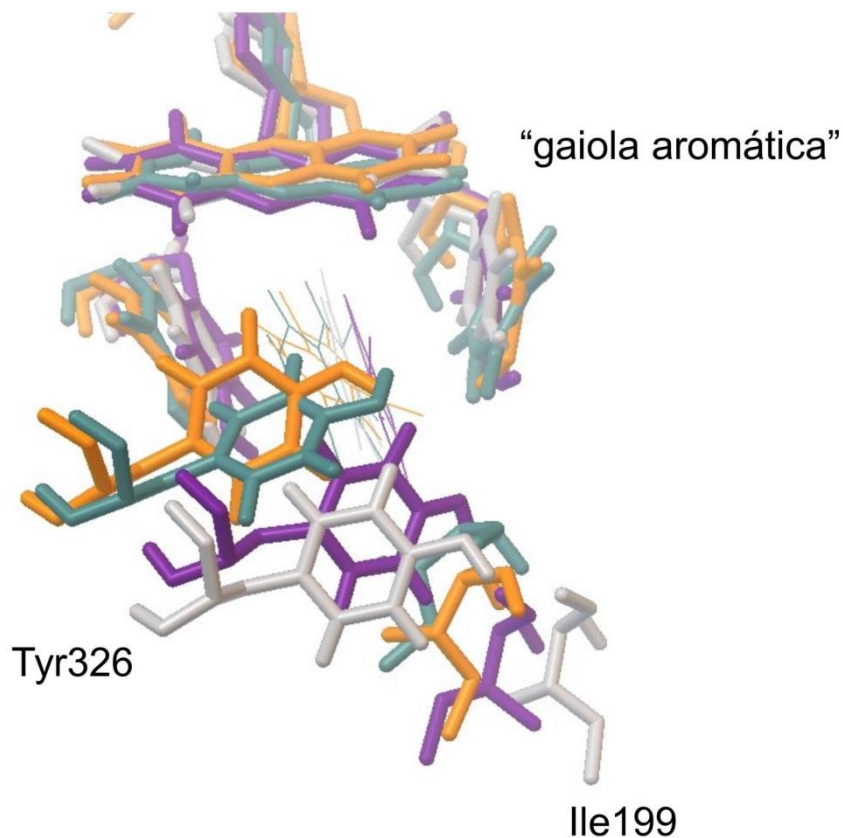


Figura 64: MAO-B + menadiona – sobreposição das estruturas inicial (cinza), após 10 ns (roxo), 50 ns (verde) e 100 ns (laranja).

A presença de moléculas de água no sítio ativo foi detectada nas estruturas cristalográficas, apesar da natureza essencialmente hidrofóbica da cavidade do sítio ativo. A estrutura da MAO-A complexada com a harmina apresentou sete moléculas de água presentes na região do sítio ativo da enzima, além deste ligante apresentar interação do tipo π - π com o resíduo Gln215, com distância interplanar de 3,4 Å.²⁶

Na Figura 65, obtidas a partir das trajetórias das simulações da MAO-A + menadiona e MAO-B + menadiona, é possível ver algumas moléculas de água na região do sítio ativo, no entanto, nem todas as moléculas estão efetivamente dentro da cavidade do sítio ativo. O ligante menadiona aparece em vermelho, o cofator FAD em amarelo e os resíduos do "sanduíche aromático" em laranja. A presença de moléculas de H₂O circundando a região do sítio ativo foi determinada considerando-se um raio de 10 Å centrado no ligante.

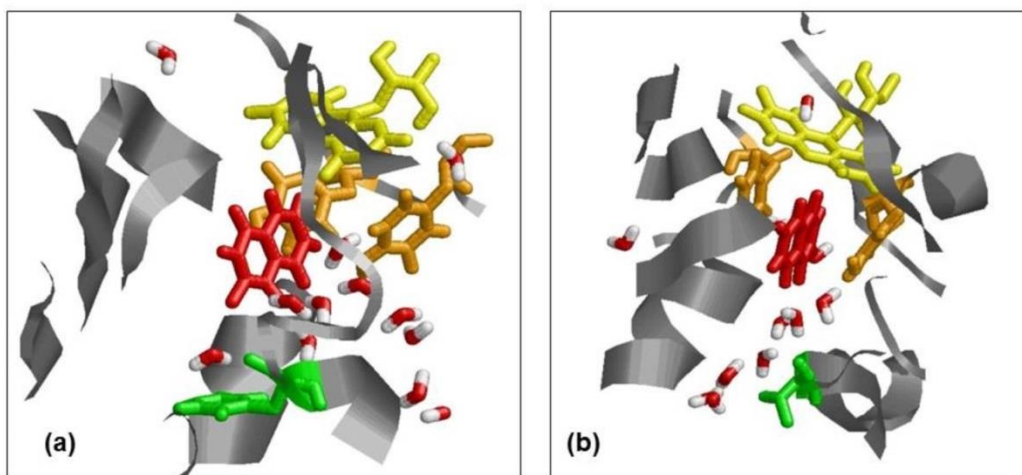


Figura 65: sítio ativo da MAO-A (a) e da MAO-B (b) complexadas com a menadiona (vermelho), com a presença de moléculas de H₂O na região do sítio ativo.

5.3 ENSEMBLE DOCKING

Resultados obtidos por Nichols e colaboradores,⁵⁸ mostraram que a obtenção de estruturas provenientes de *snapshots* da DM podem melhorar o poder de predição dos modos de ligação receptor-ligante nos casos de triagem virtual.

Conforme procedimentos descritos no capítulo 4.4, o *Ensemble Docking* foi realizado com estruturas do receptor oriundas da DM. Cada *docking* foi realizado em triplicata, sendo que os valores apresentam uma boa correlação entre si, tanto para o ligante A2, com maior número de torções, quanto para a menadiona, ligante rígido.

De acordo com a Figura 66c, é possível ver que o escore do *docking* com a MAO-B + A2, melhora ao longo da simulação, sendo que a partir de 60 ns se tornam, em média, mais favoráveis.

Primeiramente, foram realizados *dockings* com os receptores retirados de *snapshots* a cada 1 ns de simulação. Esses receptores foram denominados da seguinte forma, para MAO-A e MAO-B:

- receptor 1 – oriundo da DM da ENZIMA sem ligante
- receptor 2 – oriundo da DM da ENZIMA + MENADIONA
- receptor 3 – oriundo da DM da ENZIMA + LAPACHOL
- receptor 4 – oriundo da DM da ENZIMA + A2

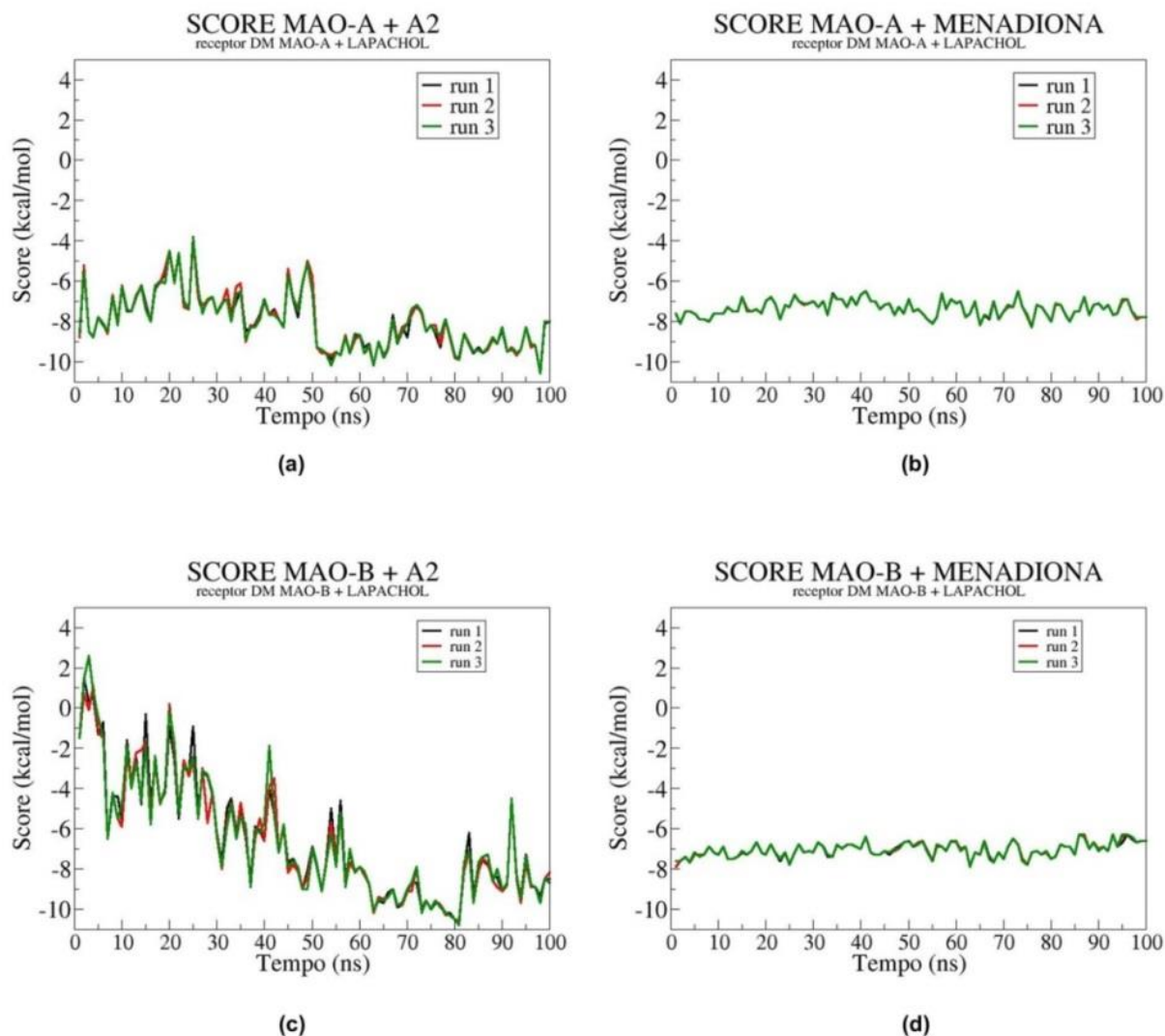


Figura 66: *Ensemble Docking* – triplicatas para os sistemas (a) MAO-A + A2, (b) MAO-A + menadiona, (c) MAO-B + A2 e (d) MAO-B + menadiona.

Considerando-se o ligante A2, é possível ver que a conformação do receptor influencia de maneira significativa o escore da interação com a MAO-A. No caso da menadiona, a alteração não é tão saliente, no entanto, para algumas conformações do receptor, o escore do *docking* é desfavorável. Para os substratos naturais dopamina e serotonina, o escore apresenta alterações mais visíveis para o sistema serotonina com receptor I, obtido da DM da MAO-A sem ligante.

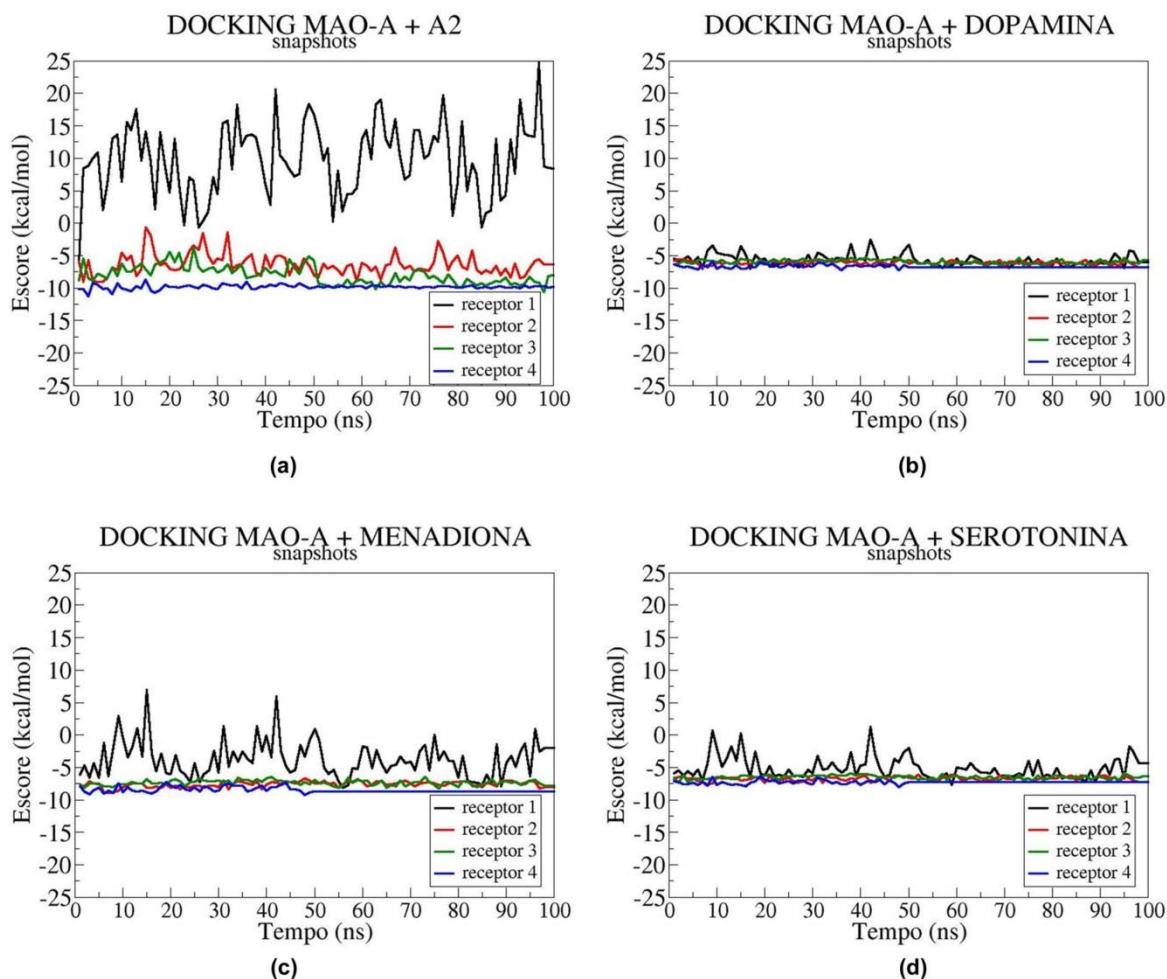


Figura 67: *Docking* da MAO-A com os ligantes (a) A2, (b) dopamina, (c) menadiona e (d) serotonina.

Analisando os *dockings* da MAO-B, vemos que para os substratos naturais, dopamina e serotonina, a conformação do receptor praticamente não altera o escore do *docking*. Para a menadiona, o receptor 1, oriundo da DM da MAO-B sem ligante, altera um pouco mais o escore do *docking*, porém não com a intensidade da alteração sofrida para a MAO-A. Já o sistema MAO-B + A2 apresenta variação significativa no escore dos *dockings*, considerando-se todos os receptores, à exceção do receptor 4, que foi obtido da DM com o próprio ligante A2.

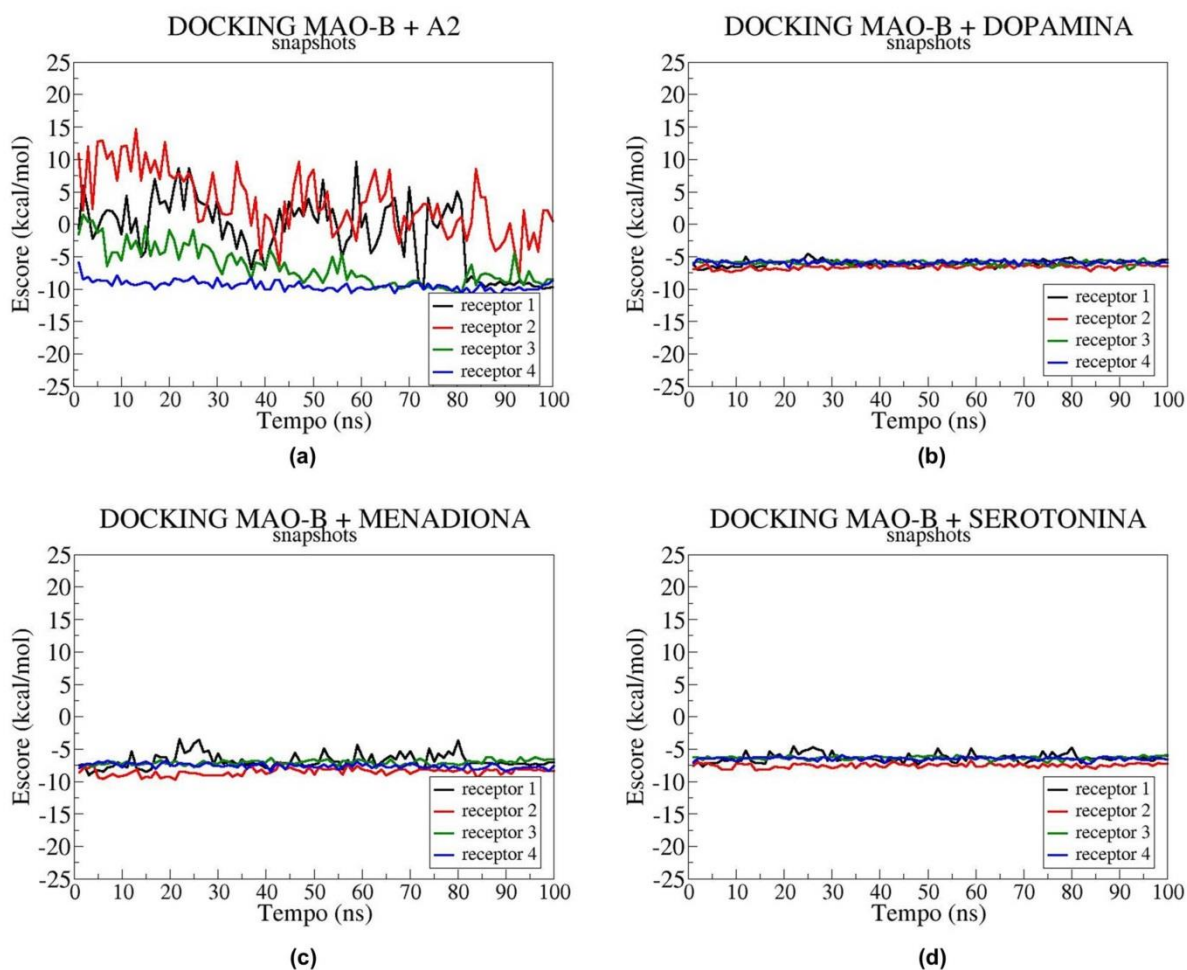


Figura 68: *Docking* da MAO-B com os ligantes (a) A2, (b) dopamina, (c) menadiona e (d) serotonina, receptores obtidos por *snapshots*.

Com a finalidade de amostrar estruturas que possam ter sido negligenciadas na escolha por *snapshots*, foi realizado *docking* das estruturas obtidas pela análise de *clusters* (*g_cluster*, do *GROMACS*). Esses receptores foram denominados de maneira análoga aos primeiros:

- receptor I – oriundo da DM da ENZIMA sem ligante
- receptor II – oriundo da DM ENZIMA + MENADIONA
- receptor III – oriundo da DM ENZIMA + LAPACHOL
- receptor IV – oriundo da DM ENZIMA + A2

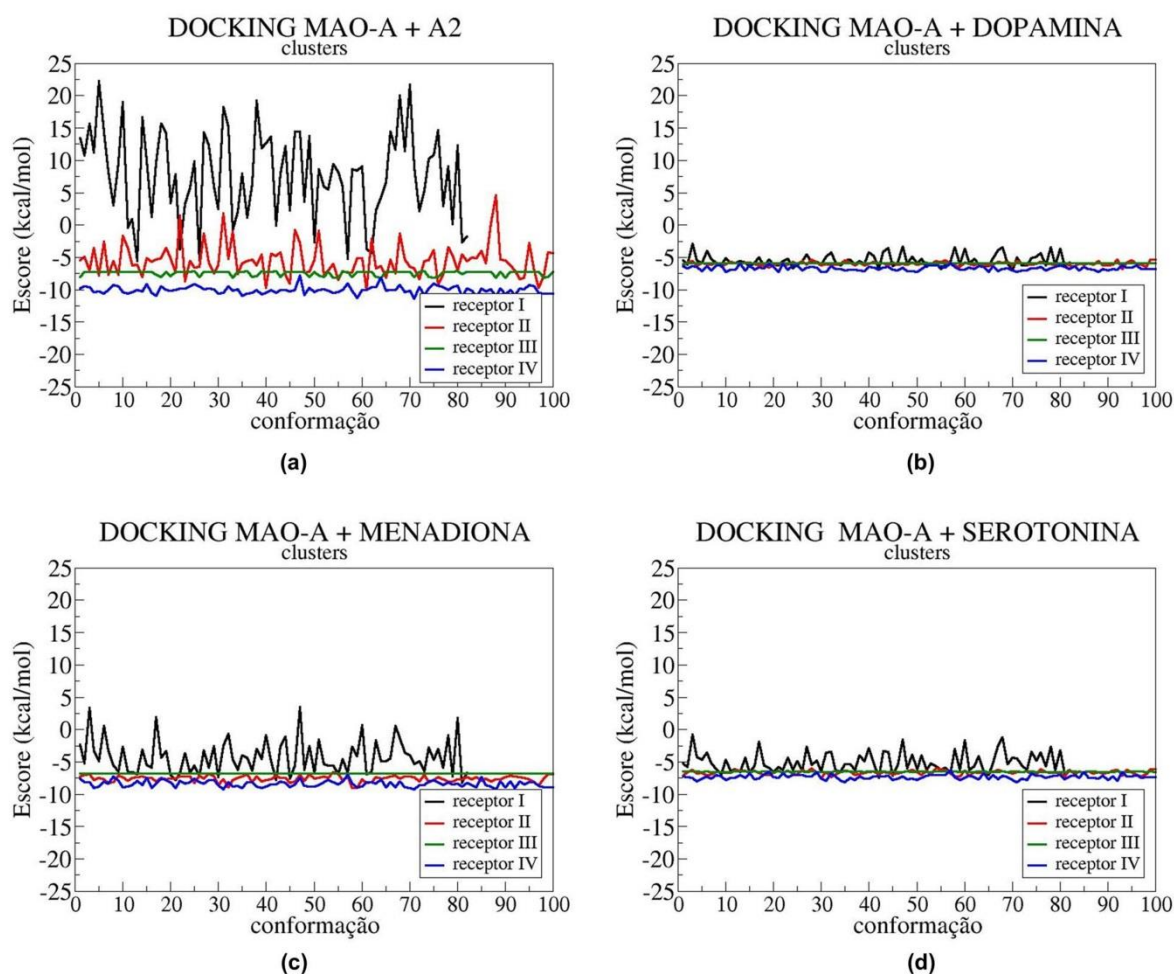


Figura 69: *Docking* da MAO-A com os ligantes (a) A2, (b) dopamina, (c) menadiona e (d) serotonina, receptores obtidos por *cluster*.

Comparando-se a Figura 67 com a Figura 69, vemos que o perfil é bastante similar para MAO-A com os diferentes ligantes. Assim, a obtenção das estruturas do receptor por *snapshot* ou *cluster* não altera de maneira significativa o escore do docking para os sistemas com MAO-A.

De maneira análoga, os dockings com MAO-B com os diferentes ligantes, considerando-se os receptores obtidos por *cluster* não apresentaram diferença significativa nos valores de escore. No entanto, pode-se observar, na Figura 70, que para os substratos naturais dopamina e serotonina, existe uma determinada conformação do receptor I (obtido da DM da MAO-B sem ligante) que apresenta escore bem menos favorável.

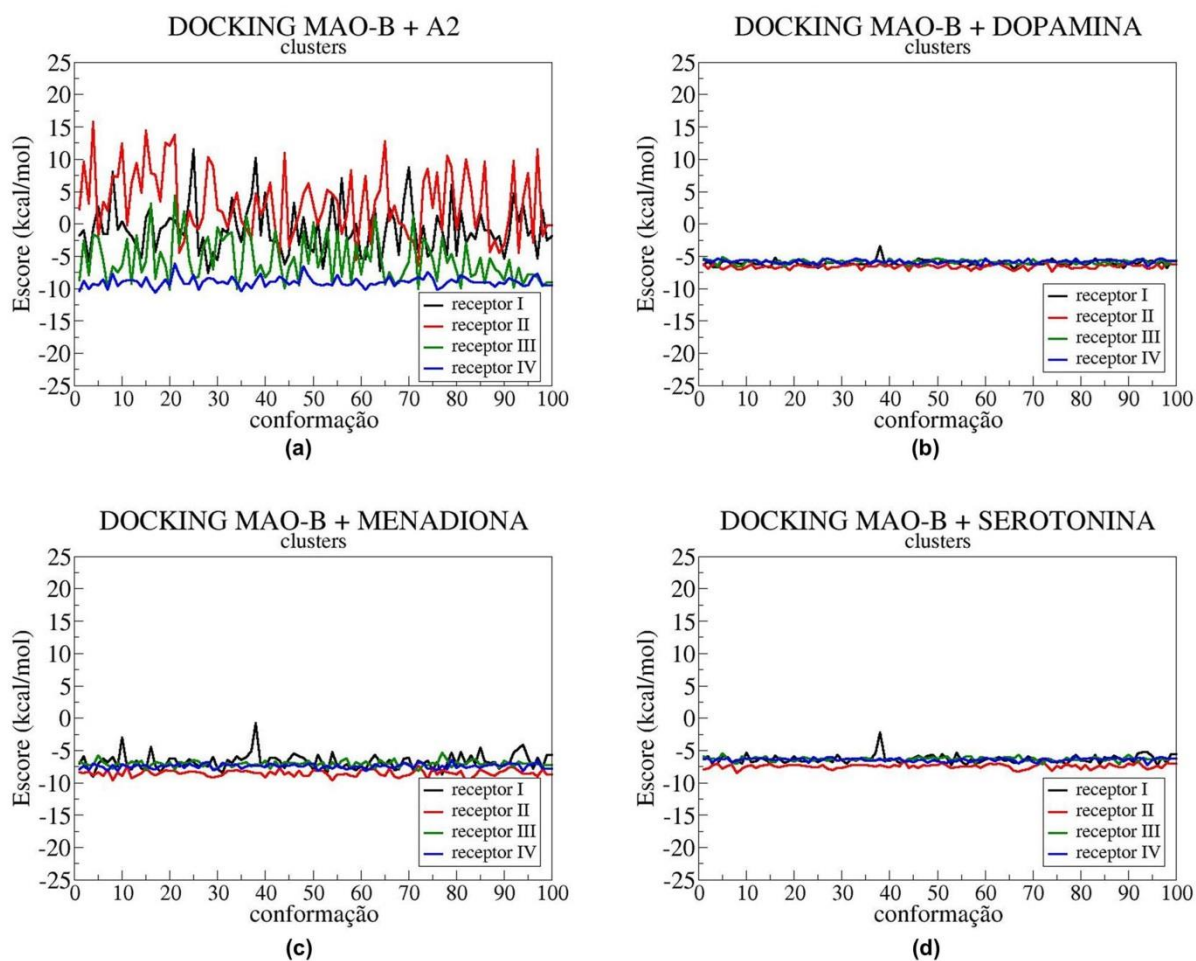


Figura 70: Docking da MAO-B com os ligantes (a) A2, (b) dopamina, (c) menadiona e (d) serotonina, receptores obtidos por *cluster*.

Sendo assim, para o caso da MAO-A e MAO-B, a obtenção das estruturas dos receptores por *snapshot* ou após a análise de *cluster* apresentou resultados equivalente.

6 CONCLUSÕES

A MAO-A e a MAO-B são enzimas importantes, que tem sido bastante estudadas como alvos terapêuticos, especialmente com relação aos inibidores seletivos da MAO-B, que são utilizados no tratamento da Doença de Parkinson.

Para o desenvolvimento de inibidores mais específicos e eficientes da MAO, é importante o conhecimento dos mecanismos catalítico e de inibição, que podem ser investigados pela resolução das estruturas tridimensionais das enzimas, mas também através de metodologias computacionais. Neste contexto, a metodologia de *docking* é uma ferramenta de análise qualitativa, especialmente importante nas avaliações estruturais das interações E+L.

No caso da MAO-A e MAO-B, que apresentam um sítio ativo bem definido, o *docking* pode ser uma ferramenta importante no planejamento de possíveis inibidores, com maior grau de seletividade. A consideração das variações estruturais das enzimas permite uma análise mais detalhada de seus processos biológicos.

A partir dos resultados do *docking*, foi verificada a seletividade dos ligantes A2 e menadiona com a MAO-A e MAO-B, respectivamente, sendo que fatores estruturais podem ser relevantes na tentativa de explicar a seletividade também observada experimentalmente.

A incorporação da flexibilidade das enzimas nos estudos de *docking*, através da metodologia de *Ensemble Docking*, pode ser aplicada à triagem virtual de forma satisfatória, uma vez que as diferentes conformações do alvo macromolecular, neste caso MAO-A e MAO-B, foram obtidas através da DM, no presente trabalho. Essa consideração da flexibilidade do receptor permite um refinamento da metodologia na tentativa de aproximar os sistemas dos processos reais. No entanto, a escolha do receptor para o *Ensemble Docking*, deve ser realizada com cautela, uma vez que foi verificado que a conformação do receptor pode influenciar significativamente o escore das interações ENZIMA+LIGANTE para ligantes volumosos.

A partir de análises das trajetórias obtidas nas simulações por Dinâmica Molecular dos diferentes sistemas: MAO-A e MAO-B sem ligante e com os ligantes A2, dopamina, lapachol, menadiona, serotonina, foi possível observar alterações conformacionais da MAO-A e da MAO-B.

Avaliando as distâncias entre Leu97-FAD e Leu88-FAD, MAO-A e MAO-B, respectivamente, foi possível ver que o sítio ativo da MAO-B é relativamente mais comprido do que o da MAO-A. Analogamente, analisando a distância entre os resíduos Glu216-Phe352 (MAO-A) e Glu207-Phe343 (MAO-B), que corresponderiam à largura da cavidade do substrato, vemos que a cavidade do substrato é mais estreita para MAO-B e mais larga para MAO-A, o que está de acordo com resultados experimentais.²⁷

Através do sobreposição das estruturas obtidas ao longo da DM, foi possível observar alterações na posição dos resíduos do "sanduíche aromático", Tyr407/Tyr444 (MAO-A) e Tyr398/Tyr435 (MAO-B), em relação ao FAD.

Essas alterações conformacionais da MAO complexadas com os diferentes ligantes, ou na forma livre, incrementam as discussões a respeito da seletividade de alguns compostos frente à MAO-A ou MAO-B. Além disso, é possível ver que as estruturas da MAO-A e, especialmente, da MAO-B relaxam ao longo da DM, o que é visível nos resultados do *Ensemble Docking*. Isso favorece o desenho de novas substâncias que possam ter ação seletiva e eficiente, com ênfase especial no planejamento de inibidores seletivos da MAO-B, utilizados no tratamento da Doença de Parkinson.

As análises qualitativas das interações E+L, avaliando resíduos importantes no sítio catalítico, permitem um conhecimento mais detalhado dos sistemas estudados, auxiliando no desenho de novos compostos com possível atividade farmacológica e que tenham alta seletividade.

Sendo assim, a combinação das metodologias de *docking*, Dinâmica Molecular e *Ensemble Docking* utilizadas no presente trabalho foi bastante satisfatória no estudo dos complexos da MAO-A e MAO-B com os diferentes ligantes. A estabilidade da interação da menadiona com a MAO-B, posicionada na "gaiola aromática", paralelamente aos resíduos Tyr398 e Tyr435 e o pequeno número de ligações de hidrogênio entre enzima-ligante permite inferir que interações do tipo dispersivas, como π - π , sejam importantes para explicar a alta afinidade deste ligante com a MAO-B. Isto posto, o esqueleto 1,4-naftoquinona permanece sendo alvo para a proposição de novos inibidores da MAO.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pinto, A. C.; Barreiro, E. J. *Quim. Nova*, 2013, 1557-1560.
2. Pauli, I.; Timmers, L. F. M.; Caceres, R. A.; Soares, M. B. P.; de Azevedo, W. F. *Curr. Drug Targets*, 2008, 1054-1061.
3. de Magalhães, C. S.; Barbosa, H. J. C.; Dardenne, L. E. Métodos de Docking Receptor-Ligante para o Desenho Racional de Compostos Bioativos. In *Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular*; Morgon, N., Coutinho, K., Eds.; Editora Livraria da Física: São Paulo, 2007; pp 489-531.
4. Murrell, J. N. Ligação química e a teoria de átomos e moléculas. In *Neoquímica: a química moderna e suas aplicações*; Hall, N., Ed.; Bookman: Porto Alegre, 2004; pp 39-46.
5. Lyne, P. D. *Drug Discov. Today*, 2002, 1047-1055.
6. Novikov, F. N.; Chilov, G. G. *Mendeleev Commun.*, 2009, 237-242.
7. Verli, H.; Barreiro, E. J. *Quim. Nova*, 2005, 95-102.
8. Salsbury Jr., F. R. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2010, 738-744.
9. Binda, C.; Aldeco, M.; Geldenhuys, W. J.; Tortorici, M.; Mattevi, A.; Edmondson, D. A. *Med. Chem. Lett.*, 2012, 39-42.
10. Voet, D.; Voet, J. G. *Bioquímica*, 3rd ed.; Artmed: Porto Alegre, RS, 2006.
11. Patrick, G. L. *An Introduction to Medicinal Chemistry*, 4th ed.; Oxford University Press: New York, 2009.
12. Namba, A. M.; da Silva, V. B.; da Silva, C. H. T. P. *Ecl. Quim.*, 2008, 13-24.
13. Huang, S.; X., Z. *Proteins*, 2007, 399-421.
14. *Protein Data Bank - PDB*.
<http://www.rcsb.org/pdb/results/results.do?tabtoshow=Current&qrid=D86AF2BA>
(accessed Jan 2014).
15. Youdim, M. B. H.; Edmondson, D.; Tipton, K. F. *Nat. Neurosci.*, 2006, 295-309.
16. Bolea, I.; Juárez-Jiménez, J.; de los Ríos, C.; Chihoa, M.; Pouplana, R.; Luque, F. J.; Unzeta, M.; Marco-Contelles, J.; Samadi, A. *J. Med. Chem.*, 2011, 8251-8270.
17. Hardman, J. G., Limbird, L. E., Eds. *Goodman & Gilman: As Bases*

- Farmacológicas da Terapêutica*, 10th ed.; McGraw Hill: Rio de Janeiro, 2003.
18. Binda, C.; Li, M.; Hubálek, F.; Restelli, N.; Edmondson, D. A.; Mattevi, A. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, 9750-9755.
 19. Booyesen, H. P.; Moraal, C.; Terre'Blanche, G.; Petzer, A.; Bergh, J. J. *Bioorg. Med. Chem.*, 2011, 7507-7518.
 20. Yelekçi, K.; Büyüktürk, B.; Kayrak, N. *J. Neural Transm.*, 2013, 853-858.
 21. Cerqueira, E. C.; Netz, P. A.; Diniz, C.; Canto, V. P.; Follmer, C. *Bioorg. Med. Chem.*, 2011, 7416-7424.
 22. MarvinSketch. Marvin 5.12.3 (Evaluation Mode).
www.chemaxon.com/marvin/sketch/index.php (accessed March 2013).
 23. Borstnar, R.; Repic, M.; Kamerlin, S. C. L.; Vianello, R.; Mavri, J. *J. Chem. Theory Comput.*, 2012, 3864-3870.
 24. Richards, G.; Messer, J.; Waldvogel, H. J.; Gibbons, H. M.; Dragunow, M.; Faull, R. L. M.; Saura, J. *Brain Res.*, 2011, 204-214.
 25. Binda, C.; Newton-Vinson, P.; Hubálek, F.; Edmondson, D.; Mattevi, A. *Nat. Struct. Biol.*, 2002, 22-26.
 26. Son, S. Y.; Ma, J.; Kondou, Y.; Yoshimura, M.; Yamashita, E.; Tsukihara, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, 5739-5744.
 27. De Colibus, L.; Li, M.; Binda, C.; Lustig, A.; Edmondson, D.; Mattevi, A. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, 12684-12689.
 28. EXPASY. <http://web.expasy.org/cgi-bin/sim/sim.pl?prot>.
 29. Huang, X.; Miller, W. *Adv. Appl. Math.*, 1991, 337-357.
 30. De Colibus, L.; Mattevi, A. *Curr. Opin. Struc. Biol.*, 2006, 722-728.
 31. Edmondson, D. E.; Binda, C.; Wang, J.; Upadhyay, A. K.; Mattevi, A. *Biochemistry*, 2009, 4220-4230.
 32. Edmondson, D. E.; Binda, C.; Mattevi, A. *Neurotoxicology*, 2004, 63-72.
 33. Milczek, E. M.; Binda, C.; Rovida, S.; Mattevi, A.; Edmondson, D. E. *FEBS J.*, 2011, 4860-4869.
 34. Joosten, V.; van Berkel, W. J. H. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2007, 195-202.
 35. Dijkman, W. P.; Gonzalo, G.; Mattevi, A.; Fraaije, M. W. *Appl. Microbiol.*

- Biotechnol.*, 2013, 5177-5188.
36. Borstnar, R.; Repic, M.; Krzan, M.; Mavri, J.; Vianello, R. *Eur. J. Org. Chem.*, 2011, 6419-6433.
 37. Edmondson, D. E.; Binda, C.; Mattevi, A. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2007, 269-276.
 38. Fitzpatrick, P. F. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2010, 13-25.
 39. Chaiyen, P.; Fraaije, M. W.; Mattevi, A. *Trends Biochem. Sci.*, 2012, 373-380.
 40. Follmer, C.; Netto, H. J. C. B. *Quim. Nova*, 2013, 306-313.
 41. Li, M.; Binda, C.; Mattevi, A.; Edmondson, D. E. *Biochemistry*, 2006, 4775-4784.
 42. Samadi, A.; de los Ríos, C.; Bolea, I.; Chioua, M.; Iriepa, I.; Moraleda, I.; Bartolini, M.; Andrisano, V.; Gálvez, E.; Valderas, C.; Unzeta, M.; Marco-Contelles, J. *Eur. J. Med. Chem.*, 2012, 251-262.
 43. Cerqueira, E. C.; Netz, P. A.; Canto, V. P.; Pinto, A. C.; Follmer, C. *Chem. Biol. Drug Des.*, 2013, 'Accepted Article', doi:'Acc 10.1111/cbdd.12255.
 44. Vianello, R.; Repic, M.; Mavri, J. *Eur. J. Org. Chem.*, 2012, 7057-7065.
 45. Trott, O.; Olson, A. J. *J. Comput. Chem.*, 2010, 455-461.
 46. Morris, G. M.; Lim-Wilby, M. Molecular Docking. In *Molecular Modeling of Proteins*; Kukul, A., Ed.; Humana Press: New Jersey, 2010; pp 365-382.
 47. Protein Data Bank. <http://www.rcsb.org> (accessed April 2012).
 48. Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. *J. Comput. Chem.*, 2009, 2785-2791.
 49. Kitchen, D. B.; Decornez, H.; Furr, J. R.; Bajorath, J. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2004, 935-949.
 50. Karplus, M.; MacCammon, J. A. *Nat. Struct. Biol.*, 2002, 646-652.
 51. Lindahl, E. R. Molecular Dynamics Simulations. In *Molecular Modeling of Proteins*; Kukul, A., Ed.; Humana Press: New Jersey, 2010; pp 3-24.
 52. Martínez, L.; Borin, I. A.; Skaf, M. S. Fundamentos de Simulação por Dinâmica Molecular. In *Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular*; Morgon, N., Coutinho, K., Eds.; Editora Livraria da Física: São Paulo, 2007; pp 413-452.
 53. Fischer, E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 1894, 2985-2993.

54. Koshland Jr, D. E.; Neméthy, G.; Filmer, D. *Biochemistry*, 1966, 365-385.
55. Lill, M. A. *Biochemistry*, 2011, 6157-6169.
56. Korb, O.; Olsson, T. S. G.; Bowden, S. J.; Hall, R. J.; Verdonk, M. L.; Liebeschuetz, J. W.; Cole, J. C. *J. Chem. Inf. Model.*, 2012, 1262-1274.
57. Sinko, W.; Lindert, S.; McCammon, A. *Chem. Biol. Drug Des.*, 2013, 41-49.
58. Nichols, S. E.; Baron, R.; Ivetac, A.; McCammon, J. A. *J. Chem. Inf. Model.*, 2011, 1439-1446.
59. van der Spoel, D.; Lindahl, E.; Hess, B.; van Buuren, A. R.; Apol, E.; Meulenhoff, O. J.; Tieleman, D. P.; Sijbers, A. L. T. M.; Feenstra, K. A.; van Drunen, R.; Berendsen, H. J. C. *GROMACS*, 2010.
60. Binda, C.; Wang, J.; Li, M.; Hubalek, F.; Mattevi, A.; Edmondson, D. *Biochemistry*, 2008, 5616-5625.
61. Dennington II, R.; Keith, T.; Millan, J. GaussView, Version 4.1. Semichem Inc: Shawnee Mission, 2007.
62. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B. Gaussian 09, Revision B.01. **2010**.
63. Sanner, M. F. *J. Mol. Graph. Model.*, 1999, 57-61.
64. Berendsen, H. J. C.; van der Spoel, D.; van Drunen, R. *Comput. Phys. Commun.*, 1995, 43-56.
65. van der Spoel, D.; Lindahl, E.; Hess, B.; Groenhof, G.; Mark, A. E.; Berendsen, H. J. C. *J. Comput. Chem.*, 2005, 1701-1718.
66. Oostenbrink, C.; Villa, A.; A.E, M.; van Gunsteren, W. F. *J. Comput. Chem.*, 2004, 1656-1676.
67. Bussi, G.; Donadio, D.; Parrinello, M. *J. Chem. Phys.*, 2007, 014101/1-014101/7.
68. Parrinello, M.; Rahman, A. *J. Appl. Phys.*, 1981, 7182-7190.
69. Hess, B.; Bekker, H.; Berendsen, H. J. C.; Fraaije, J. G. E. M. *J. Comp. Chem.*, 1997, 1463-1472.
70. Hess, B. *J. Chem. Theory Comp.*, 2007, 116-122.
71. Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. *J. Chem. Phys.*, 1993, 10089-10092.

72. PRODRG. The GlycoBioChem PRODRG2 Server.
<http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/prodrg/> (accessed April 2012).
73. Jakalian, A.; Bush, B. L.; Jack, D. B.; Bayly, C. I. *J. Comput. Chem.*, 2000, 132-146.
74. Jakalian, A.; Jack, D. B.; Bayly, C. I. *J. Comput. Chem.*, 2002, 1623-1641.
75. Lemkul, J. A.; Allen, W. J.; Bevan, D. R. *J. Chem. Inf. Model.*, 2010, 2221-2235.
76. Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; Hermans, J. Interaction models for waters in relation to protein hydration. In *Intermolecular Force*; Pullman, B., Ed.; Reidel: Dordrecht, 1981; pp 331-342.
77. Turner, P. J.; Stambulchik, E. XMGRACE - Disponível em: <http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace>.
78. Sayle, R. A.; Milner-White, E. J. *Trends in Biochemical Sciences*, 1995, 363-376.
79. RASMOL. <http://www.umass.edu/microbio/rasmol>.
80. Apostolov, R.; Yonezawa, Y.; Standley, D. M.; Kikugawa, G.; Takano, Y.; Nakamura, H. *Biochemistry*, 2009, 5864-5873.
81. Fowler, P. W.; Balali-Mood, K.; Deol, S.; Coveney, P. V.; Sansom, M. S. P. *Biochemistry*, 2007, 3108-3115.
82. Allen, W. J.; Bevan, D. R. *Biochemistry*, 2011, 6441-6454.
83. Ma, J.; Yoshimura, M.; Yamashita, E.; Nagawaka, A.; Ito, A.; Tsukihara, T. *J. Mol. Biol.*, 2004, 103-114.