

Estudo de moléculas naturais em relação ao P2X7, visando a busca de novos fármacos para o tratamento de inflamações crônicas.

Introdução

O trifosfato de adenosina (ATP) se acumula nos locais de lesão e inflamação dos tecidos. Os efeitos do ATP extracelular são mediados por receptores da membrana plasmática denominados receptores P2X e P2Y. O receptor P2X mais envolvido na inflamação e imunidade é o P2X7. Ele é um canal iônico (1) trimérico presente em muitos tecidos, que regula funções fisiológicas e patológicas do organismo. Está presente também em praticamente todas as células de imunidade inata e adaptativa, células-tronco, sangue, glias, neurais, oculares, ósseas, dentais, exócrinas, endoteliais, musculares, renais e cutâneas. (Sluyter R, 2017). Quando envolvido nos processos de inflamação e imunidade, o P2X7 media a ativação do inflamassoma NLRP3, atua na liberação de citocinas e quimiocinas e ajuda na sobrevivência e diferenciação de linfócitos T. (Di Virgilio e colaboradores, 2017). O P2X7 é um potente estimulante da inflamação e imunidade e um promotor do crescimento de células cancerígenas. Isso faz do P2X7 um alvo atraente para terapia anti-inflamatória e anticâncer. Quando ligado ao ATP pode desenvolver a função de abrir um canal seletivo de cátion que leva a despolarização da membrana e o influxo de cálcio de acordo com o gradiente eletroquímico, mas também pode gerar um poro de membrana capaz de permitir a passagem de moléculas de alto peso molecular como corantes fluorescentes, quando ativado por altas concentrações do agonista. Atualmente existem algumas estruturas resolvidas por cristalografia de raios-x que podem ser utilizadas através de ferramentas de modelagem molecular para prever qual a afinidade de moléculas existentes e caracterizadas em bancos de dados como ZincDb. Nesse processo chamado de Virtual Screening, grandes bibliotecas de moléculas são adicionadas à simulações computacionais, a fim de identificar as estruturas que têm maior probabilidade de se ligar a um alvo receptor que geralmente é uma proteína.

Objetivo

Avaliar a ligação de moléculas oriundas de bancos de produtos naturais ao receptor P2X7 por Virtual Screening de forma que futuramente possam contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos para processos inflamatórios crônicos.

Projeto

Com base nos estudos sobre o receptor P2X7, sabemos que ele se liga com a adenosina trifosfato (ATP) e está atrelado à diversas doenças do corpo humano. Algumas dessas doenças estão relacionadas à inflamações crônicas, Parkinson, Alzheimer, entre outras. Por isso a proteína P2X7 foi escolhida como proteína base do projeto, no qual a ideia central era ligá-la a outras moléculas *in silico* (2), de modo que obtivéssemos ligações que ocorressem com muita afinidade.

O projeto começou no computador onde baixamos a estrutura da proteína P2X7 e de moléculas denominadas ligantes, que tinham a função de se ligar à proteína, para então avaliarmos os resultados da afinidade dessas ligações.

As moléculas foram baixadas do ZincDb, um site que acopla diversas empresas que fornecem as estruturas das moléculas para realização de testes. As moléculas baixadas precisavam estar disponíveis para venda e serem naturais. As ligações eram feitas *in silico*, através do servidor Dockthor que realizava o "docking" (ligação) de 100 moléculas ligantes por vez com a proteína, numa área pré-definida por estudos que mostravam que naquela área, se localizava o sítio ortostérico que é o lugar na proteína onde o ATP se liga. Nos fornecendo como resultado a melhor afinidade de cada ligação.

Com o resultado obtido, as moléculas eram listadas de 1 a 100 no programa LibreOffice, sendo a 1ª, a molécula com maior afinidade de ligação com a proteína e a 100ª, com menor afinidade. Esse processo era repetido com inúmeros bancos de 100 moléculas até que obtivemos um número quantitativo para que passássemos para próxima etapa.

Nesta etapa, os primeiros 10% de cada banco com 100 moléculas testadas foi escolhido para ser analisado de acordo com a regra de Lipinski, também conhecida como "rule of five", segundo a qual para uma molécula se tornar um bom fármaco ela deve ter massa molecular menor que 500 daltons; aceptores de ligações de hidrogênicos (ON) deve ser menor ou igual a 10; Log P deve ser menor que 5; doadores de ligações de hidrogênicos deve ser menor ou igual a 5. O servidor utilizado para testar se a molécula passaria na regra de Lipinski foi o Molinspiration, assim obtivemos moléculas que foram aprovadas pelo método e as que não foram. As aprovadas, foram colocadas numa planilha do LibreOffice para serem testadas na última etapa e as não aprovadas, foram testadas de acordo com outras regras, assim como a de Lipinski, como uma "reescapagem". O servidor utilizado foi o SwissAdme que possibilitou que algumas das moléculas rejeitadas pela regra de Lipinski, fossem aceitas como úteis em outras regras. Essas foram consideradas boas o suficiente para serem utilizadas na última etapa. As moléculas não aprovadas foram descartadas do projeto.

Na última etapa, as moléculas que passaram na regra de Lipinski e as que passaram após a testagem no SwissAdme foram analisadas para verificarmos o que poderiam provocar no organismo caso fossem ingeridas. As moléculas com potencial carcinogênico, que podem provocar ou estimular o aparecimento de tumores no organismo; as teratogênicas, que podem produzir dano ao embrião ou ao feto durante a gravidez e as letais, que poderiam levar à morte, foram descartadas. O servidor utilizado para realizar essa análise foi o Pass Way2Drug.

Ao final de todas essas etapas, pudemos selecionar as moléculas que serão compradas e testadas *in vitro* (3) para darmos seguimento ao estudo e que futuramente podem vir a contribuir para o desenvolvimento de um novo fármaco para diversas inflamações crônicas, Parkinson e Alzheimer.

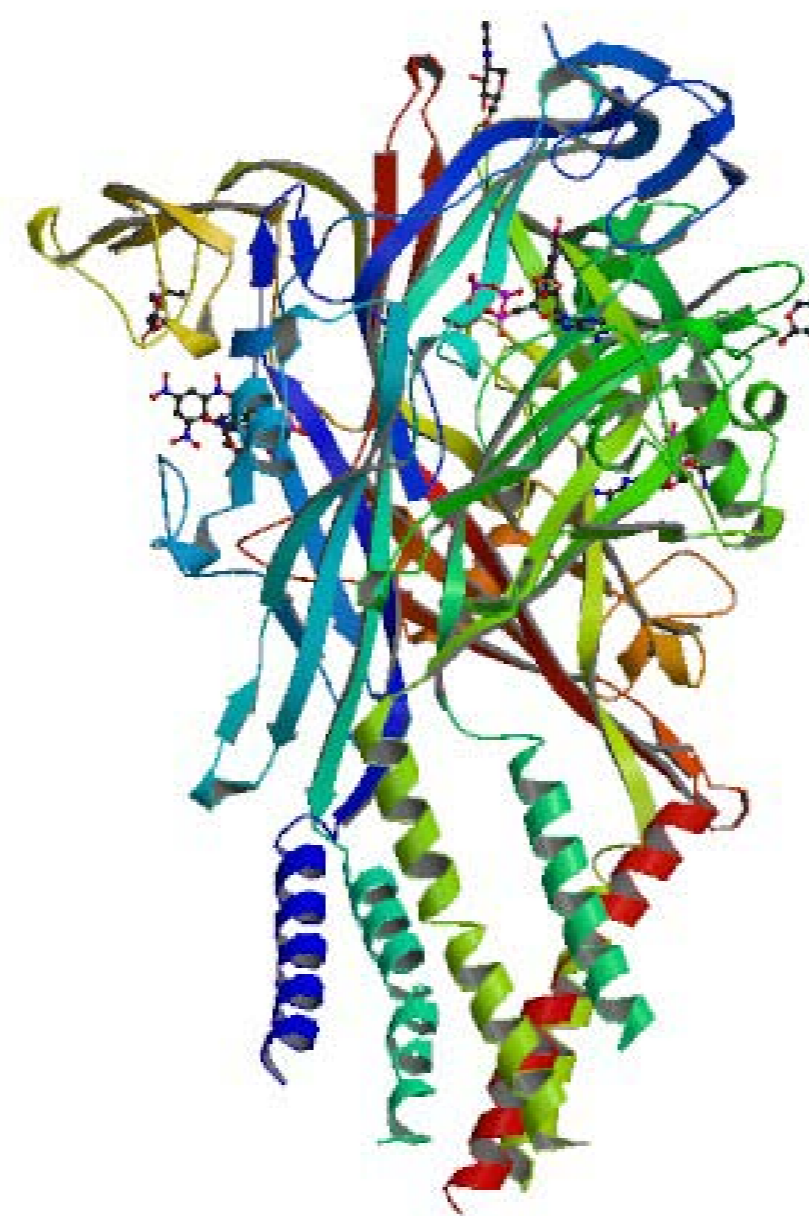
Conclusão

O objetivo do trabalho foi atingido, foram encontradas moléculas que se uniram ao P2X7.

Porém, poucas foram as moléculas aproveitadas para dar seguimento aos testes *in vitro*.

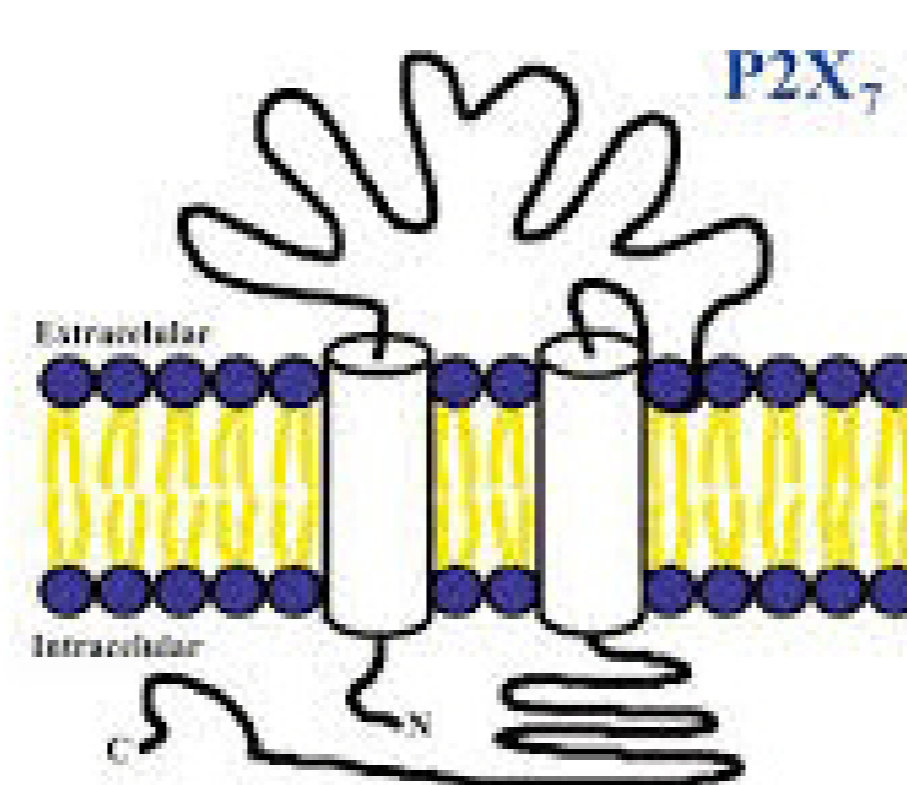
De acordo com os testes *in silico* o estudo pareceu promissor na proposta de gerar possíveis novos fármacos.

Proteína P2X7

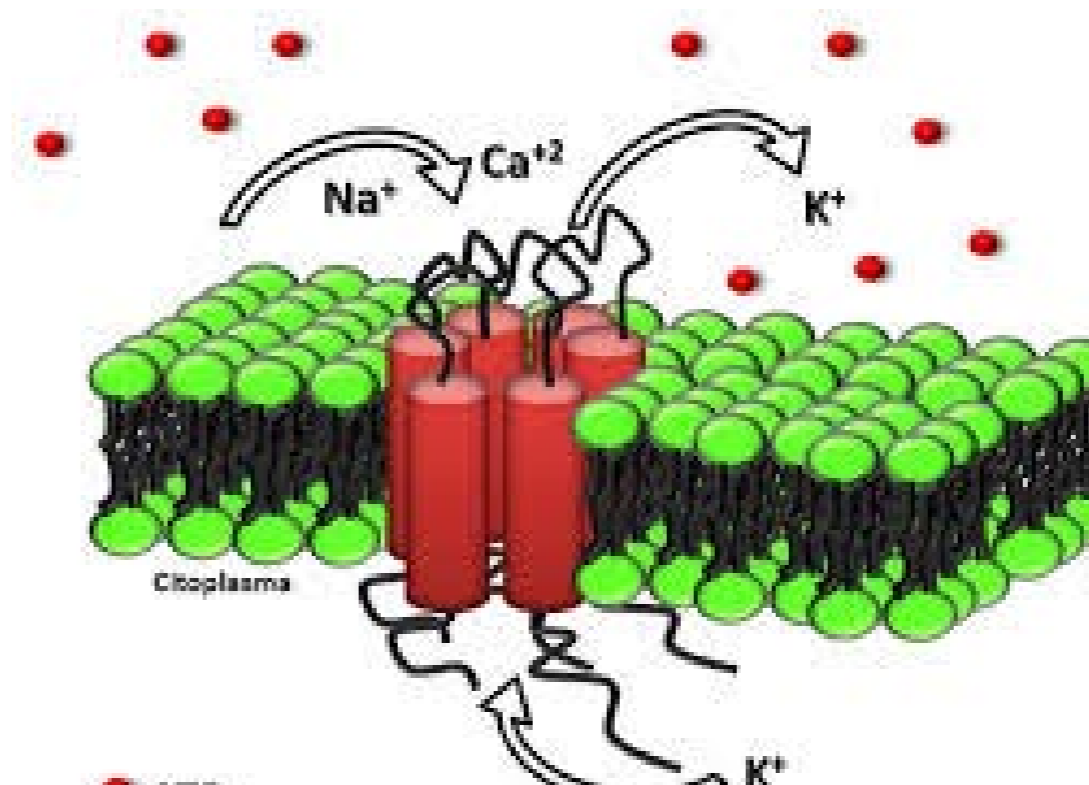


Estrutura cristalina do canal receptor de P2X7 dependente de ATP de frango na presença de antagonista competitivo TNP-ATP à 3,1 Angstroms. Retirado do RCSB Protein Data Bank.

P2X7 na célula

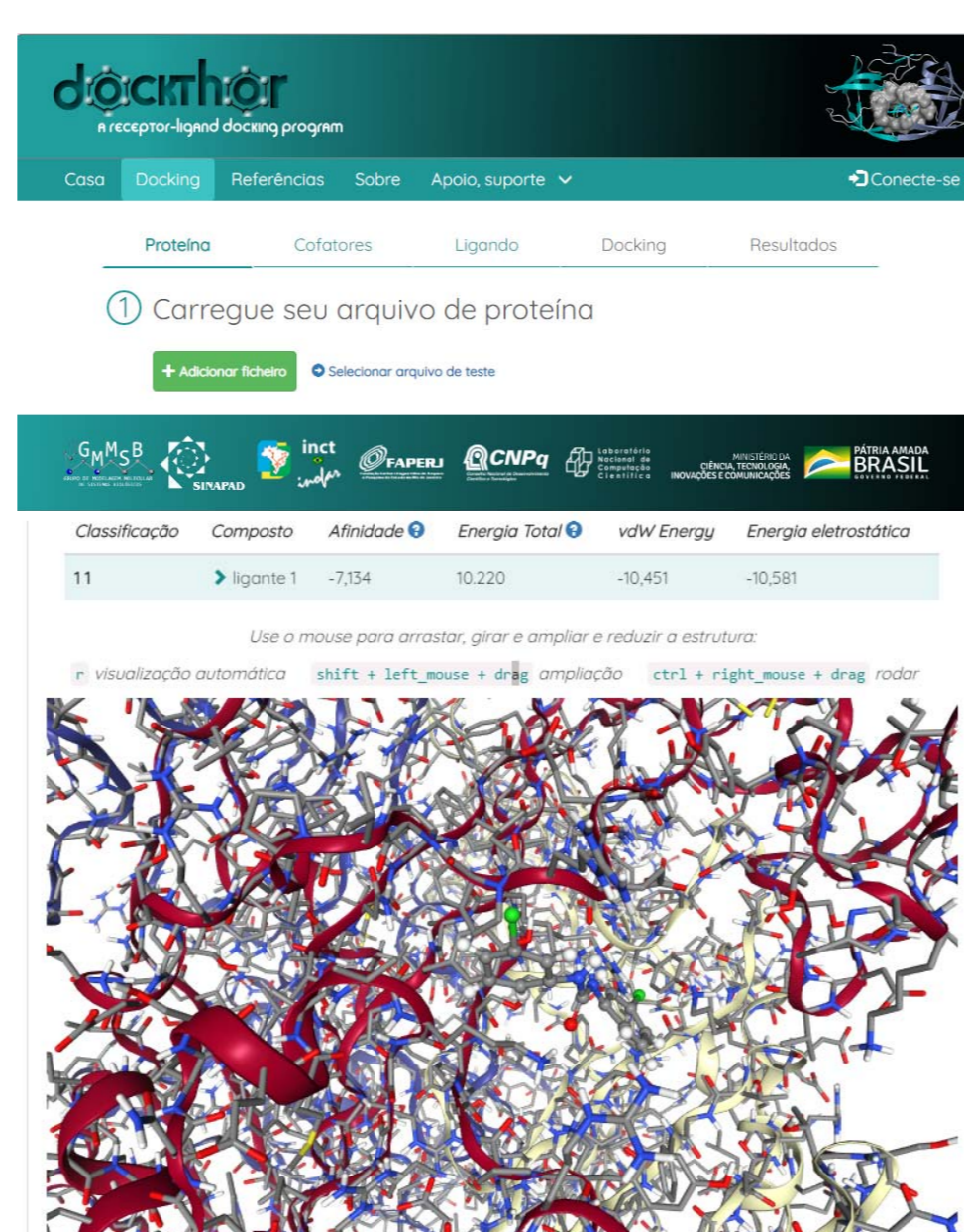


Esquema de arquitetura geral do receptor P2X7 na membrana plasmática de uma célula. Retirado da tese "Estudo do efeito dos antagonistas do receptor P2X7 e Panexina-1 nas células glias entéricas no protocolo de isquemia e reperfusão intestinal" escrita por Cristina Eusébio Mendes.

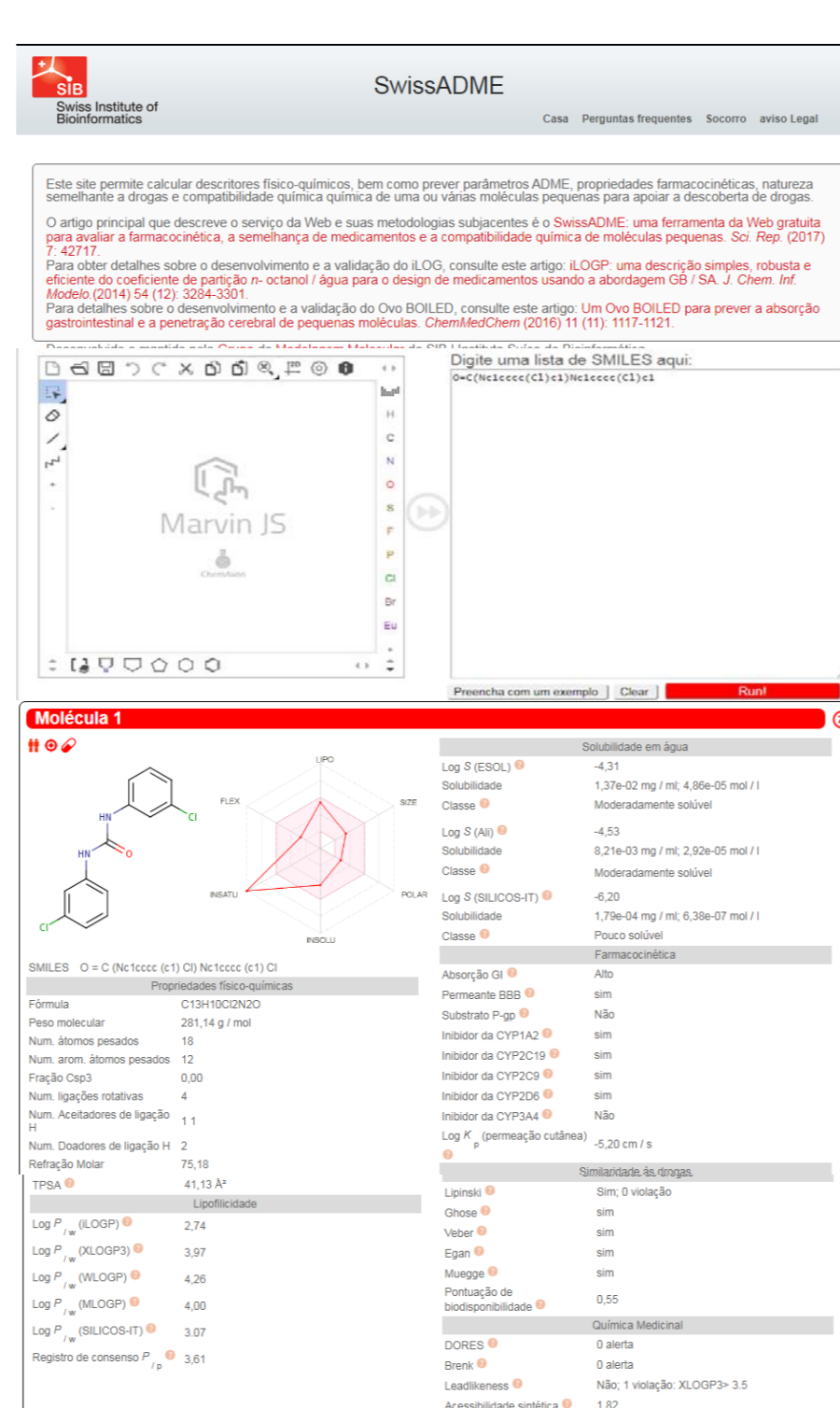


Esquema de arquitetura geral do receptor P2X7 na membrana plasmática de uma célula mediando os efeitos extracelular do ATP. Retirado de uma página do Facebook chamada Purinergic P2X7 Receptor.

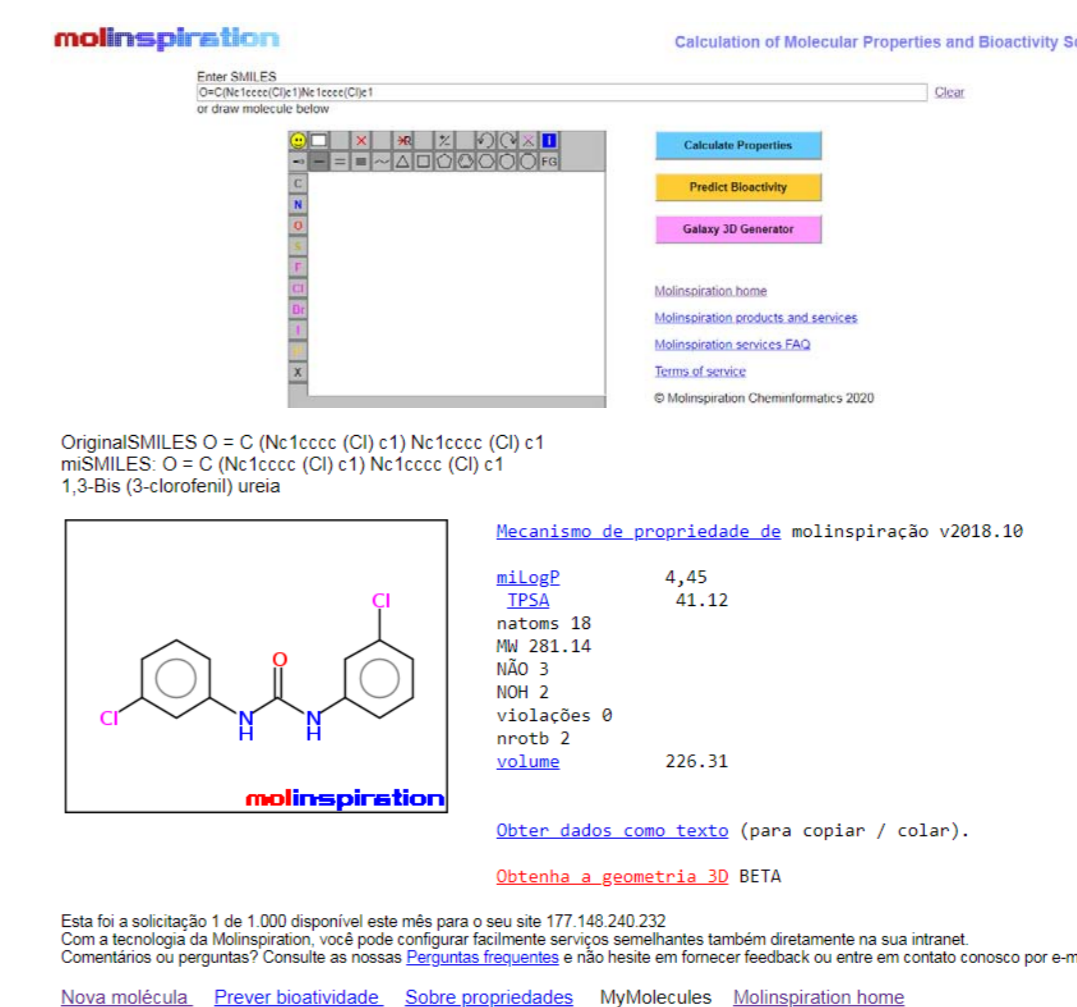
Servidor Dockthor



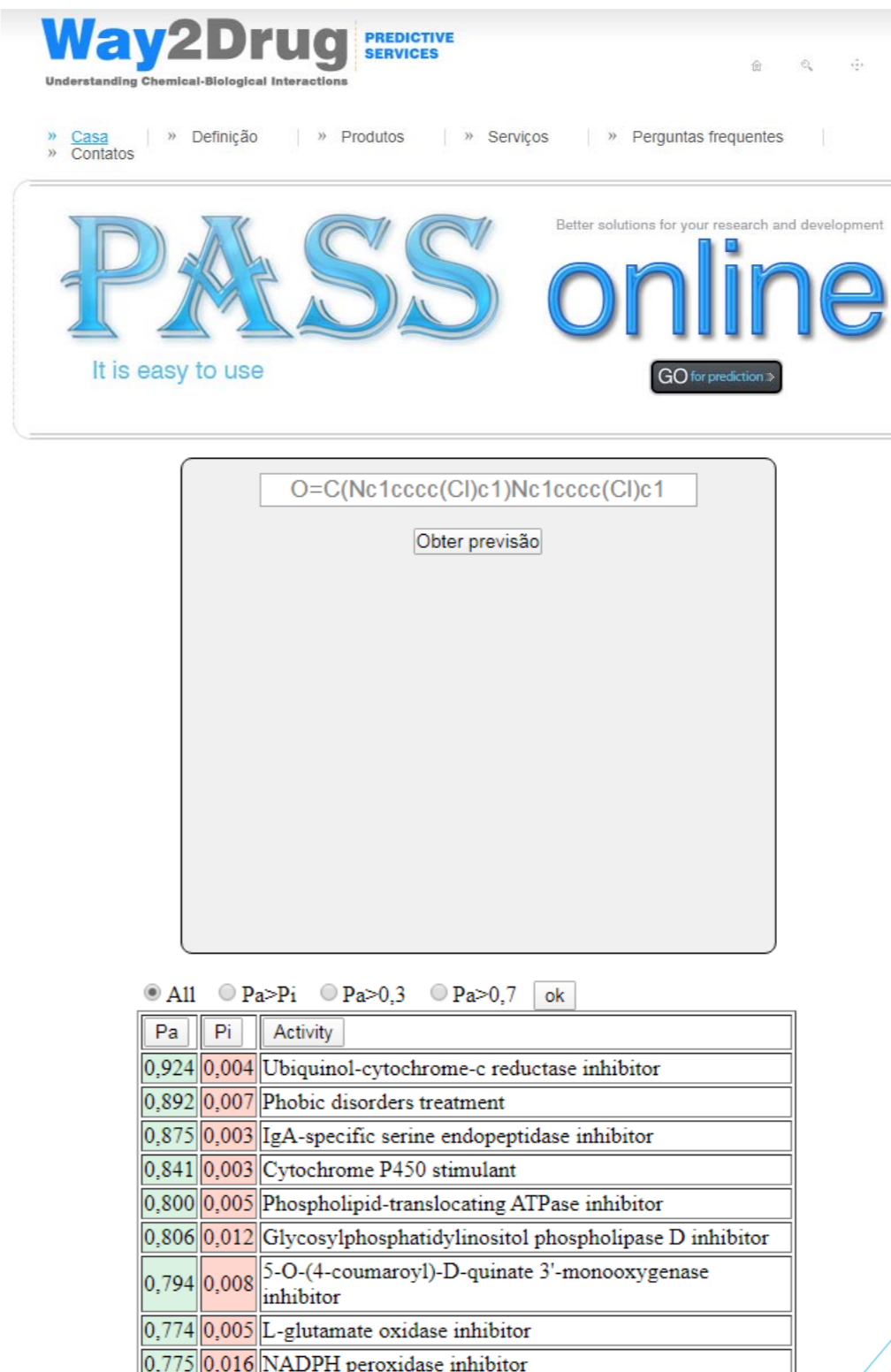
Servidor SwissAdme



Servidor Molinspiration



Servidor Pass Way2Drug



Referências bibliográficas

Site PubMed – NCBI
Livro "Protein Reviews" – The P2X7 Receptor. Escrito por Ronald Sluyter (2017)
Artigo "The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation". Escrito por Francesco Di Virgilio, Diego Dal Ben, Alba Clara Sarti, Anna Lisa Giuliani e Simonetta Falzoni.

Glossário

- (1). Canais iônicos são proteínas de membrana que desempenham papel importante em muitas funções fisiológicas em procariontes e eucariontes.
- (2). *In silico* – expressão usada no âmbito da simulação computacional e áreas correlatas para indicar testes ocorridos em ou através de uma simulação computacional.
- (3). *In vitro* – expressão que designa todos os processos biológicos realizados no ambiente controlado e fechado de um laboratório e que são feitos normalmente em recipientes de vidro.