

EVIDÊNCIA IN-SILICO DE DETOXIFICAÇÃO DO HERBICIDA METSULFURON POR UMA GST DE ARROZ

Vinícius Costa Amador (1); Gérsia Gonçalves de Melo (2); Izabela Cristina Pereira Campos (3); Luana Camilla Cordeiro Braz (4); Rafael Maia Trindade (5)

¹ Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, CDSA, Sumé-PB – vinicius.costa.amador@gmail.com

² Universidade Federal Rural de Pernambuco- UFRPE, PPGAMGP, Recife-PE – gersia.fera@gmail.com

³ Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, CDSA, Sumé-PB – izapcampos@gmail.com

⁴ Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, CDSA, Sumé-PB – luana.camilla.braz@gmail.com

⁵ Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, CDSA, Sumé-PB – rafael.trindade@ufcg.edu.com

INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa*) é uma cultura agrícola de grande interesse e importância mundial, tanto pelo seu peso na agroindústria quanto pelo seu valor nutricional, sendo inclusive considerada fonte primária do quadro nutricional de países asiáticos em desenvolvimento. Não obstante sua notável importância, verifica-se certa escassez de estudos para desenvolver técnicas com potencial de minimizar problemas intrínsecos ao cultivo desta cerealífera, como a competição com plantas daninhas, por exemplo (COBUCCI, 2006).

Sabe-se que a superfamília de enzimas glutatona s-transferases (GSTs) confere em arroz (*Oryza sativa*) ação catalisadora, proteção a estresse biótico e abiótico, além de resistência a herbicidas (FROVA, 2003, 2006), tal que, sua principal reação consiste na conjugação do tripeptídeo glutatona a um composto hidrofóbico, tornando-o mais solúvel e menos tóxico (MARRS, 1996), mantendo assim a homeostase celular. Entretanto, a estrutura tridimensional da proteína deste estudo, que em estudos de natureza proteômica serve para identificar a sua funcionalidade, até o momento não foi elucidada.

Ferramentas da bioinformática apresentam alternativas para predição de estruturas proteicas por meio de homologia entre a sequência alvo de interesse e sequências proteicas com estruturas terciárias conhecidas que servirão de modelos (*templates*) (de SOUZA M. L., 2008). Neste contexto, o *docking* molecular é uma técnica que complementa a modelagem molecular no que diz respeito ao entendimento funcional da molécula em questão, uma vez que se desenvolve analogamente a um esquema de chave fechadura, (PITA et al., 2008) no qual se está interessado em descobrir a orientação correta da chave, que proporcionará o encaixe mais favorável e efetivo. Assim, esta técnica pode ser definida como um método de otimização, que visa descrever a melhor posição de orientação da molécula ao seu ligante. Com esta definição e ponderando-se que ambas as

moléculas podem moldar-se durante a interação, a analogia mão-em-luva é mais adequada que chave-fechadura (JORGENSEN, 1991).

Pela importância mundial da cultura do arroz, conforme mencionado no início, e a necessidade de estudos que contribuam para a solução da problemática apresentada, justifica-se a realização do presente trabalho, que, lançando mão das ferramentas da bioinformática, foi desenvolvido com o objetivo de construir, validar e analisar em plataforma computacional, um modelo teórico de uma proteína glutatona (OsGSTU4) de arroz (*Oriza sativa*) que confere tolerância a herbicidas à plantas.

METODOLOGIA

Refinamento e mineração de dados

O modelo utilizado foi obtido do PMDB- *Protein Model DataBase* (<https://bioinformatics.cineca.it/PMDB/>) e encontra-se disponível para acesso público através do código *PM0079227*.

A estrutura dos ligantes herbicidas foram obtidas na base de dados de pequenas moléculas *ZINC database* (<http://zinc.docking.org/>) em arquivos .mol2. Os arquivos.mol2 foi convertido para .pdbqt no Autodock 1.5.6 (<https://www.chpc.utah.edu/documentation/software/autodock.php>), teve os hidrogênios polares removidos e suas moléculas foram assinaladas com os parâmetros de carga Gasteiger (GASTEIGER; MARSILI, 1980). A estrutura da OsGSTU4 foi obtida a partir do arquivo .pdb do modelo teórico, o qual foi convertido para arquivo .pdbqt no Autodock e foram adicionado hidrogênios e parâmetros de carga Kollman (WEINER et al. 1984). A glutatona foi tratada como co-fator.

Docking

Os cálculos de *docking* rodaram no programa Autodock 1.5.6 (<https://www.chpc.utah.edu/documentation/software/autodock.php>) e as simulações foram realizadas com o campo de força do Gromos53a6 e com o ligante flexível e a proteína rígida (NAMASIVAYAM, GUNTHER, 2007) através do algoritmo genético lamarckiano (LGA).

O Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA) é uma ferramenta computacional apropriada para busca diante de uma vasta variedade de parâmetros, ou seja, combinações que resultem em soluções representativas para um problema pré-determinado, encontradas a partir de princípios de genética, seleção natural e evolução proposto primariamente por Darwin (MORRIS, 1998; GOLDBERG, 1989; CARDOSO, 1998; PEDRO, 2008).

Neste trabalho, o LGA foi usado em conjunto com o método de Goodford, permitindo, ao mesmo tempo, realizar a amostragem do espaço configuracional do ligante e efetuar o cálculo da energia de interação atômica do receptor e do ligante (GOODFORD, 1985).

Neste âmbito, a iniciação é dada por meio de uma população inicial, em que cada indivíduo é constituído por uma conformação específica. Com o objetivo de conduzir a seleção, existem funções de avaliação sobre a população que permitem a escolha de indivíduos mais aptos. Torna-se perceptível que esses indivíduos apresentam uma maior probabilidade de se reproduzirem ao serem submetidos a um processo evolucionário, por meios computacionais, onde são trocados dados (material) genéticos entre si mediante os processos de recombinação e mutação. (DANDEKAR, ARGOS, 1998; MORRIS, 2009). Este processo dá início a uma segunda geração de indivíduos e, dessa forma, pelas gerações seguintes, o ciclo se repete sucessivas vezes, promovendo a simulação de um longo tempo evolucionário, tal que os indivíduos mais aptos resultantes terminam por compor a solução do problema (MORRIS, 2009; GOLDBERG, 1989; CARDOSO, 1998; PEDRO, 2008).

Nesta metodologia há ainda o uso de *grid*, recurso que calcula mapas de afinidade previamente para cada átomo do ligante que interage com o receptor, imersos em uma caixa de pontos reticulados (uma grade de energia). O uso de *grids* neste trabalho teve a finalidade de construir uma caixa de pontos reticulados regularmente espaçados, sendo centrado na região de interesse do receptor. Cada ponto expresso no *grid* corresponde a uma energia potencial representante de grupos funcionais presentes no receptor, como carbonos alifáticos, carbonos aromáticos, oxigênio e nitrogênio sendo doadores-aceptores de ligações de hidrogênio. Portanto, por definição, entende-se que os *grids* são descritores tridimensionais da posição dos diferentes grupos químicos no receptor sendo por fim o tamanho do grid estabelecido em 126 x 126 x 126 angstroms pelo programa Autogrid (<http://autodock.scripps.edu/wiki/AutoGrid>) e centrado no receptor (GST).

Os parâmetros usados para simulações foram os seguintes: 10.000 réplicas, análises de energia a cada 1.500.000 e 27.000 gerações, tamanho populacional de 150 e taxas de mutação e crossing-over de 0,02 e 0,08 respectivamente. Foram geradas 10 conformações que foram ranqueadas com base na menor energia e analisadas no VMD (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O resultado do docking realizado para o herbicida metsulfuron, executado no programa autodock, foi o ranqueamento de dez possíveis complexos, conforme se observa na Tabela 1. Este procedimento tem como base os scores de energias intermoleculares, energia de ligação e ligações de hidrogênio, evidenciando os átomos (e resíduos) da proteína e do ligante que apresentam interações favoráveis para o modelo, conforme descrevem Morris et al. (2009), sendo portanto apropriado para predição de complexos moleculares, simulação computacional de associações moleculares entre substrato e enzima, (TROSSET, SCHERAGA, 1999; BROOIJMANS, KUNTZ, 2003) como o presente trabalho.

Tabela 1. Resultados dos três melhores complexos ranqueados pelo autodock no docking do metsulfuron

Complexo	Energia de ligação Kcal/mol	Energia intermolecular Kcal/mol	Ligações de hidrogênio
1	-3.74	-5.53	B:LYS 111 HZ1 – O2 C: GTX1226 H11-N3 B:LYS 111 HZ2 – O6 C:LYS 56 HZ1 – O2
2	-3.68	-5.47	B:LYS 111 HZ1 – O2 C:HIS 54 HD1 – O5 C:LYS 56 HZ1 – O3, O2
3	-2.78	-4.57	B:LYS 111 HZ1 – O5 C:LYS 56 HZ1 – N5 C:LYS 56 HZ1 – O6

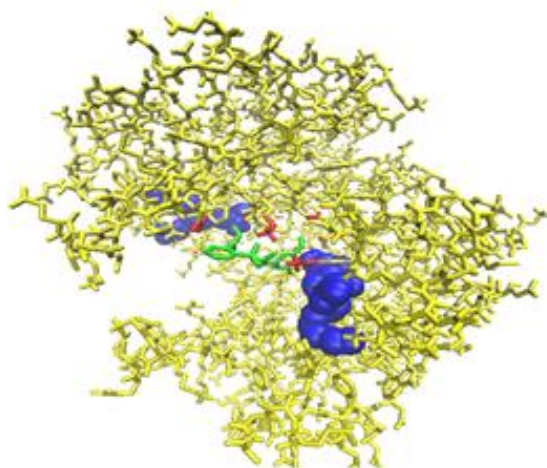
Fonte: Tabela produzida pelo desenvolvedor da pesquisa.

Ligações de hidrogênio com o glutathion indicam conjugação entre as moléculas, como mostra a Tabela 1, indicando ainda, um ranking de possíveis modelos organizados quanto ao seu nível de energia, onde, quanto menor o valor de energia, mais favorável é o modelo, como afirma Kang e colaboradores (2009) sendo este mais energeticamente ajustado (BROOIJMANS, KUNTZ, 2003). Os resultados revelados pelo *docking* do metsulfuron mostram repetições de alguns resíduos (LYS 111, LYS 56, GTX1226) que se apresentaram extremamente favoráveis, sendo estes, possivelmente resíduos âncora para a ligação, combinando com os resultados evidenciado por Rigo

(2011). A identificação da molécula GTX1226 como resíduo âncora é evidência de um possível processo de conjugação (KILILI, 2004) entre o metsulfuron e a glutatona, que evidencia a possibilidade de desintoxicação do metsulfuron pela OsGSTU4.

O primeiro dos resultados ranqueados pelo autodock para o metsulfuron pode ser visualizado na Figura 1.

Figura 1. Imagem do primeiro complexo para o metsulfuron obtido por meio do programa autodock

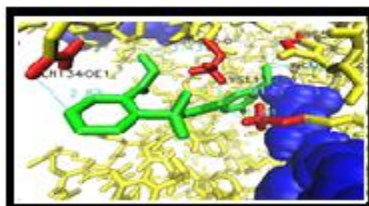
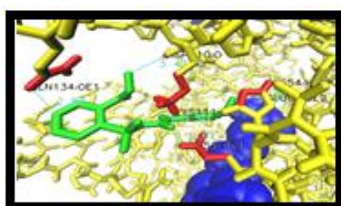


Fonte: Imagem produzida no programa *Visual Molecular Dynamics* pelo autor da pesquisa.

De maneira geral, na Figura 1 pode-se observar a seguinte sequência: em amarelo, sob representação gráfica de bastões, a estrutura da glutatona S-transferase; em azul, sob representação gráfica VDW (Van Der Waals), as moléculas de glutatona; em vermelho encontram-se os mais átomos mais próximos de resíduos de aminoácidos que circundam o ligante a uma distância de 4 ângstroms (4 Å), que por sua vez está representado em verde.

Desta forma, por meio de ferramentas do programa *Visual Molecular Dynamics*, caracterizaram-se átomos dos resíduos sob a referida distância de 4 Å, que podem ser observados em detalhe nas Figuras 2 (“a” e “b”).

Figura 2. Representação do sítio ativo, com identificação dos resíduos e suas respectivas distâncias até o ligante, em duas perspectivas diferentes sobre o mesmo ponto (“a” e “b”), para o primeiro resultado com o metsulfuron.



a) Perspectiva 1

b) Perspectiva 2

Fonte: Imagem produzida no programa *Visual Molecular Dynamics* pelo autor da pesquisa.

A Tabela 2 apresenta os átomos de resíduos de aminoácidos circunvizinhos a distâncias menores de 4 Å e suas respectivas distâncias até átomos do ligante. Onde podemos observar os átomos de hidrogênio das lisinas 56, e 111, se ligando a átomos de oxigênio, à distância de 1,91 Å, reforçando a hipótese de serem resíduos âncora, formando ligações covalentes (ponte de hidrogênio) com o ligante. (BUENO, M.A 2015, OLIVEIRA, B.G. 2012)

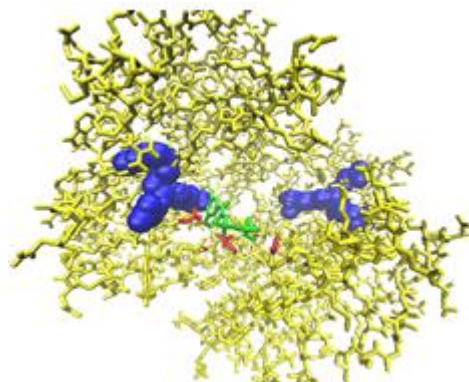
Tabela 2. Representação de átomos de resíduos próximos ao metsulfuron e suas respectivas distâncias em ângstroms no primeiro complexo.

Átomos de resíduos próximos	Átomo usado de referência (ligante)	Distâncias respectiva (Å)
ASP110:O	<0>0:C14	3.43
GLU69:OE2	<0>0:C5	2.95
LYS56:HZ1	<0>0:O2	1.91
LYS111:HZ1	<0>0:O2	1.91
GLN134:OE	<0>0:C10	2.87
HIS54:HE2	<0>0:C5	3.91

Fonte: Tabela produzida pelo desenvolvedor da pesquisa.

O segundo dos resultados ranqueados pelo autodock pode ser visualizado na Figura 3, onde se pode observar igualmente ao que ocorreu com o primeiro resultado ranqueado pelo programa, a seguinte sequência: em amarelo, sob representação gráfica de bastões, a estrutura da glutathione S transferase; em azul, sob representação gráfica VDW (Van Der Waals) as moléculas de glutathione; em vermelho encontram-se os átomos mais próximos de resíduos de aminoácidos que circundam o ligante a uma distância de 4 Å como a sua antecessora, que por sua vez está representado em verde.

Figura 3. Imagem do segundo complexo para o metsulfuron obtido por meio do programa autodock.



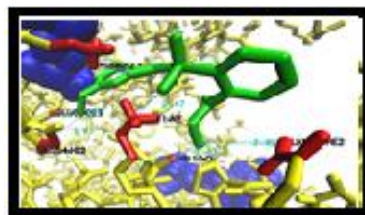
Fonte: Imagem produzida no programa *Visual Molecular Dynamics* pelo autor da pesquisa.

Como no primeiro resultado, por meio de ferramentas do programa *Visual Molecular Dynamics*, caracterizaram-se átomos dos resíduos sob a referida distância de 4Å que podem ser observados em detalhe nas Figuras 4 (“a” e “b”).

Figura 4. Representação do sítio ativo, com identificação dos resíduos e suas respectivas distâncias até o ligante, em duas perspectivas diferentes sobre o mesmo ponto (“a” e “b”) para o segundo resultado com o metsulfuron.



a) Perspectiva 1



b) Perspectiva 2

Fonte: Imagem produzida no programa *Visual Molecular Dynamics* pelo autor da pesquisa.

Complementando as informações da Figura 4, a Tabela 3 apresenta os átomos de resíduos de aminoácidos circunvizinhos a distâncias menores de 4 Å e suas respectivas distâncias até átomos do ligante, tal que podemos observar os átomos de hidrogênio das lisinas 56, e 111, se ligando a átomos de oxigênio, à distância de 2,52 Å, e 2,47 Å reforçando a hipótese de serem resíduos âncora, formando pontes de hidrogênio com o ligante. (BUENO, M.A 2015, OLIVEIRA, B.G. 2012)

Tabela 3. Representação de átomos de resíduos próximos ao metsulfuron, e suas respectivas distâncias em ângstroms no segundo complexo.

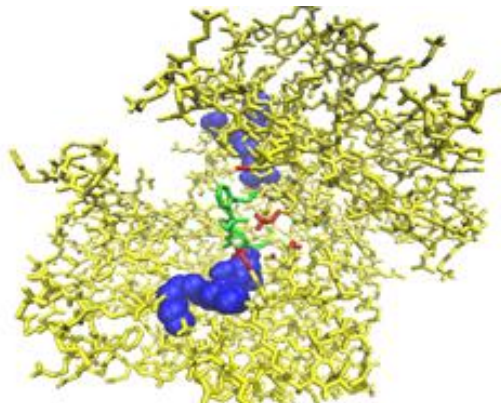
Átomos de resíduos próximos	Átomo usado de referência (ligante)	Distâncias respectiva (Å)
GLU69:OE2	<0>:C5	2.95

ASP110:O	<0>0:C14	3.43
LYS111:NZ	<0>0:O4	2.47
LYS56:HZ3	<0>0:O2	2.52
HIS54:HE2	<0>0:C5	3.91
GLN134:1HE	<0>0:C14	3.82

Fonte: Tabela produzida pelo desenvolvedor da pesquisa.

O terceiro dos resultados ranqueados pelo autodock pode ser visualizado na Figura 5, onde pode ser observada, de maneira semelhante ao que ocorreu com o primeiro e o segundo resultado, a seguinte sequência: em amarelo, sob representação gráfica de bastões, a estrutura da glutathione S transferase; em azul, sob representação gráfica VDW (Van Der Waals) as moléculas de glutathione; em vermelho encontram-se os mais próximos átomos de resíduos de aminoácidos que circundam o ligante a uma distância de 4 Å, que por sua vez está representado em verde.

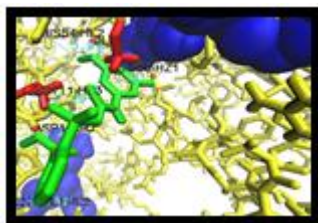
Figura 5. Imagem do terceiro complexo para o metsulfuron obtido por meio do programa autodock.



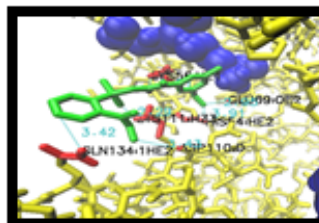
Fonte: Imagem produzida no programa *Visual Molecular Dynamics* pelo autor da pesquisa.

Como nos primeiro e segundo resultados, por meio de ferramentas do programa VMD, caracterizaram-se átomos dos resíduos sob a referida distância de 4Å, que podem ser observados em detalhe nas Figuras 6 (“a” e “b”):

Figura 6. Representação do sítio ativo, com identificação dos resíduos e suas respectivas distâncias até o ligante, em duas perspectivas diferentes sobre o mesmo ponto (“a” e “b”) para o terceiro resultado com o metsulfuron.



a) Perspectiva 1



b) Perspectiva 2

Fonte: Imagem produzida no programa *Visual Molecular Dynamics* pelo autor da pesquisa.

Para complementar as informações da Figura 6, listaram-se na Tabela 4 os átomos de resíduos de aminoácidos circunvizinhos a distâncias menores de 4 Å e suas respectivas distâncias até átomos do ligante, onde podemos observar os átomos de hidrogênio das lisinas 56, e 111, se ligando a átomos de oxigênio, à distância de 1,91 Å, e 2,29 Å reforçando a hipótese de serem resíduos âncora, formando ligações covalentes (ponte de hidrogênio) com o ligante. (BUENO, M.A 2015, OLIVEIRA, B.G. 2012)

Tabela 4. Representação de átomos de resíduos próximos ao metsulfuron, e suas respectivas distâncias em ângstroms no terceiro complexo

Átomos de resíduos próximos	Átomo usado de referência (ligante)	Distâncias respectiva (Å)
LYS56:HZ1	<0>0:O2	1.91
LYS111:HZ3	<0>0:O4	2.29
ASP110:O	<0>0:C14	3.43
GLU69:OE2	<0>0:C5	2.95
HIS54:HE2	<0>0:C5	3.91
GLN134:1HE	<0>0:C10	3.42

Fonte: Tabela produzida pelo desenvolvedor da pesquisa.

CONCLUSÃO

Mediante os dados obtidos neste trabalho, após a sua análise é possível relacionar as seguintes conclusões:

Os resultados obtidos para o modelo desenvolvido e estudado neste trabalho são consistentes e permitem confirmar a sua estabilidade físico-química estrutural. A OsGSTU4 se liga ao herbicida metsulfuron, havendo inclusive formação de complexo. O relevante aparecimento dos átomos de hidrogênio pertencentes as lisinas 56 e 111, ancorando átomos de oxigênio do ligante, à distâncias

de uma ligação covalente são uma evidência *in-silico* de que possivelmente estes resíduos servem para ancoragem de ligantes. O aparecimento do átomo de hidrogênio da glutatona (GTX 1225) associando-se ao ligante, é uma confirmação *in-silico* de conjugação do ligante à glutatona.

O estudo apresenta importância biotecnológica para a agroindústria e indústria de defensivos agrícolas, visto que a compreensão funcional-estrutural da molécula estudada e concebida neste trabalho, pode auxiliar no possível desenvolvimento de defensivos com maior precisão, considerando que é uma cultura com desenvolvimento de poucas tecnologias voltadas para o seu cultivo e manutenção.

REFERÊNCIAS

BROOIJMANS, N.; KUNTZ, I. D. Molecular recognition and docking algorithms. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, v. 32, p. 335-373, 2003.

Bueno M.A, Oliveira B.G. A influência da ligação de hidrogênio em reações químicas: reação de Prileschajew. **Quim. Nova**, Vol. 38, No. 1, 1-7, 2015.

CARDOSO, Fabbryccio A. C. M. Algoritmos Genéticos para Interpolação Não-Linear de Imagem e Decodificação de Códigos Lineares. 1998. 149f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) – Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Universidade Estadual de Campinas, 1998.

COBUCCI, T. Cultivo de arroz de terras altas no estado de mato grosso. **Sistemas de Produção**, n.7, 2006, Embrapa Arroz e Feijão.

DANDEKAR, T.; ARGOS, P. Folding the main chain of small proteins with the genetic algorithm, Journal of Molecular Biology, n. 236, p. 844-861, 1998.

FROVA, C. Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives.

Biomolecular Engineering, Amsterdam, v. 23, n. 4, p. 149-169, 2006.

FROVA, C. The plant glutathione gene family: genomic structure, functions, expression and evolution. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 119, n. 4, p. 469-479, 2003.

GASTEIGER J, MASILI M. TETRAHEDRON. 1980; 36: 3219-3228. Disponível em:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0040402080801682> Acessado em 15/06/2015
Acessado em: 15/05/2015.

GOLDBERG, D. E. Genetic Algorithms in search, optimization, and machine learning, Addison-Wesley, 1989

GOODFORD PJ. A Computational Procedure for Determining Energetically Favorable Binding Sites on Biologically Important Macromolecules. **Journal of Computational Chemistry** 1985;28:849--857.

JORGENSEN, W. L. Rusting of the lock and key model for protein-ligand binding. *Science* .1991: 254 (5034): 954–5.

KANG, L. et al. An improved adaptive genetic algorithm for protein-ligand. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, v. 23, p. 1-12, 2009.

KILILI, K.; et al. Differential Roles of Tau Class Glutathione S-Transferases in Oxidative Stress. **The Journal of Biological Chemistry**, 2004.

MARRS, K. A. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 47, p. 127-158, 1996.

MORRIS G. M., et al. Automated docking using a lamarckian genetic algorithm and empirical binding free energy function. **Journal of Computational Chemistry** 19(14): p. 1639-1662. 1998.

MORRIS GM, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* ;30(16):2785-2791. 2009.

NAMASIVAYAM, V; GUNTHER, R. PSO@Autodock : A fast flexible molecular docking program based on swarm intelligence. *Chemical Biology & Drug Design*, v. 70, p. 475, 2007.

OLIVEIRA B.G., ARAÚJO R.C.M.U. SAPT: Ligação de hidrogênio ou interação de van der Waals?. **Quim. Nova**, Vol. 35, n. 10, 2002-2012, 2012.

PEDRO, Luciana Rocha. Uma nova representação para o problema de predição da estrutura de proteínas em grade. 2008. 163f. Dissertação (Mestrado em Ciência em Modelagem Computacional) Laboratório Nacional de Computação Científica, Rio de Janeiro, 2008.

PITA, S. S. R. et al. Studies of molecular docking between fibroblast growth factor and heparin using generalized simulated annealing. **International Journal of Quantum Chemistry**, v. 108, 2608-2614, 2008.

RIGO, MAURÍCIO MENEGATTI. Estudo in silico da reatividade cruzada entre epitopos de hantavírus. Tese (Mestrado) -Instituto de Biociências da UFRS. Rio Grande do Sul. 2011. 91p.

SOUZA, M. L. de; JORGE D.M., Giuliatti S., Modelagem in silico da proteína Melittin II de Apis melífera In Silico Modeling of Protein Melittin II of Apis melífera. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CINÉTICA, 16., 2008. São Paulo. Anais...

TROSSET, J. Y.; SCHERAGA, H. A. Prodock: software package for protein modeling and docking. Journal of Computational Chemistry, v. 20, p. 412-427, 1999.

WEINER SJ, et al. A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. **J Am Chem Soc.** 1984; 106: 765-784. Disponível em:
<<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja00315a051>> Acessado em 15/05/2015.