

Estudo das interações dos modelos da proteína ATP7A no mecanismo de resistência à cisplatina

Christina Telles Borges (PG), Guilherme Ferreira de Lima (PQ) Juliana Fedoce Lopes (PQ)

Universidade Federal de Itajubá, LaQC- Laboratório de Química Computacional, Av. BPS nº1303, Bairro: Pinheirinho, 37500-903, Itajubá, MG, Brasil; ctellesq@gmail.com

Palavras-chaves: Cisplatina, ATP7A, Química Computacional, ONIOM.

INTRODUÇÃO

Um quimioterápico muito utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer é o *cis*-diaminodichloroplatina (II), conhecido por cisplatina, que é um composto inorgânico neutro e possui geometria quadrático plana (**figura 1**).

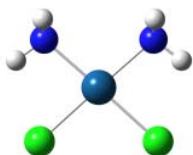


Figura 1: Estrutura da cisplatina

A resistência à cisplatina limita drasticamente seu uso e está associada, entre outros fatores, à redução da acumulação intracelular da droga o que pode estar relacionada à interações com várias biomoléculas tioladas, como por exemplo a proteína ATP7A (**Figura 2**), que é o foco desse estudo. A proteína ATP7A tem 40280 átomos e



alguns domínios de ligação à metais, sendo responsável pelo controle de íons metálicos no organismo, principalmente íons de cobre e magnésio.

Figura 2: Proteína ATP7A¹ (1Y3J)

MÉTODOS

Cálculos computacionais utilizando o programa Gaussian 09 e a metodologia híbrida QM/MM com o método ONIOM², foram feitos para a reação entre o sítio ativo do quinto domínio de ligação à metais da proteína ATP7A e a cisplatina. A opção pela metodologia ONIOM se fez necessária uma vez que a estrutura química/eletrônica é grande, e ao mesmo tempo que é necessário contemplar o ambiente da proteína, precisamos avaliar a termodinâmica e

cinética da formação de novas ligações químicas, o que é competência da química quântica. A escolha do quinto domínio de ligação à metais se deve à presença de dois aminoácidos do tipo cisteína, identificados na estrutura depositada no pdb por cys₁₄ e cys₁₇, que apresentam uma conformação passível de ser realizar uma coordenação de forma bidentada com o metal (Cu²⁺ ou Pt²⁺) e caracterizando assim uma estrutura termodinamicamente mais estável. O quinto domínio possui 1194 átomos e foi dividido em duas camadas de nível de cálculo, tratadas com métodos computacionais diferentes. A camada alta, é evidenciada na **Figura 3**, com modelo "pau-bola" foi tratada com química quântica, por meio do nível de cálculo DFT (funcional pbe1pbe) e funções de base 6-31g(d,p), exceto para a platina, que foi definida com o pseudopotencial LanL2DZ. A camada baixa foi tratada com mecânica molecular, com uso do campo de força UFF e é apresentada com modelo de "varetas".

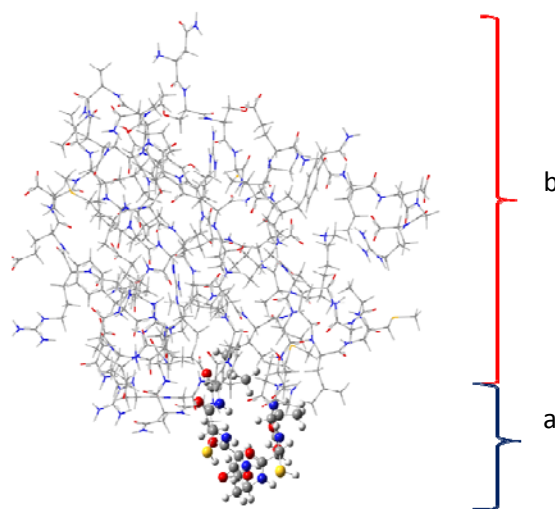
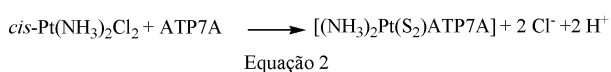
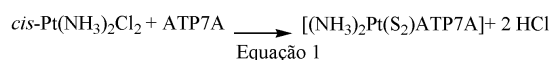


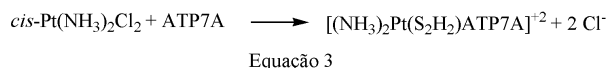
Figura 3: Divisão da estrutura do quinto domínio da ATP7A através da metodologia híbrida QM/MM: camada alta(a) e camada baixa(b).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Inicialmente foram feitos cálculos de otimização de geometria e análise vibracional para as estruturas envolvidas na possível reação entre a cisplatina e o quinto domínio de ligação à metais da proteína ATP7A. Partindo das contribuições energéticas de cada reagente e cada produto, foram calculados os parâmetros termodinâmicos das reações globais, considerando a desprotonação ou não do grupo tiol das cisteínas. No caso da desprotonação, há possibilidade de duas reações diferentes, produzindo HCl ou H⁺ e Cl⁻, e essas reações estão representadas pela **equações 1 e 2**:



Em meio biológico, é de se esperar que as espécies estejam dissociadas, entretanto a presença de íons na equação química, e tratados na aproximação da fase gasosa trará resultados superestimados para as energias dos produtos em relação às do reagente. Se não houver a desprotonação, haverá apenas a formação de dois íons cloreto, como mostrado na **equação 3**. A desprotonação ou não dos grupos tiol dependerá do pH do meio onde ocorre a reação.³



As estruturas otimizadas do quinto domínio da proteína ATP7A e desse domínio coordenado à cisplatina (representando os produto final da substituição) estão representados na **Figura 4**:

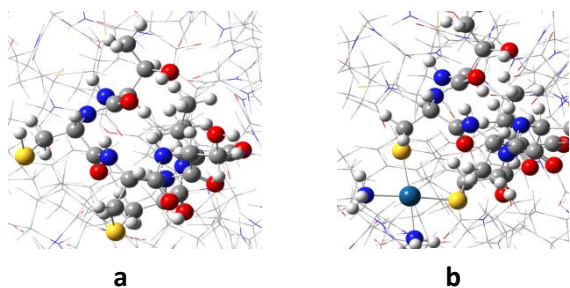


Figura 4: Estruturas otimizadas: a) do quinto domínio da proteína ATP7A b) do quinto domínio da proteína ATP7A coordenada à cisplatina

A estrutura da proteína é simplificada na **Figura 4**, para verificar com mais facilidade a estrutura da camada alta, onde ocorre a reação. O produto, mantém a coordenação quadrático-plana ao redor da Platina e a coordenação não provoca grandes distorções na proteína.

Os dados termodinâmicos obtidos para cada reação estão mostrados abaixo, na **tabela 1**:

Tabela 1. Dados termodinâmicos para as equações químicas 1, 2, e 3.

Equação	$\Delta H(\text{kcal/mol})$	$\Delta G(\text{kcal/mol})$
1	+34,92	+30,35
2	+714,60	+339,30
3	+307,89	+306,90

De acordo com estes resultados, as reações são não espontâneas, indicando de forma incipiente que as reações não ocorreriam nas condições simuladas. Como se pode observar pela **tabela 1**, a **equação 1** apresenta valores bem inferiores aos encontrados para as equações 2 e 3. Isso pode ser explicado pela ausência de espécies iônicas nessa equação, ao contrário das equações 2 e 3. Como os cálculos foram realizados em fase gás, a presença de espécies iônicas faz com que os valores encontrados fiquem superestimados. Quanto maior o número de espécies iônicas, maiores são os resultados obtidos. Os mesmos cálculos anteriores foram feitos com o Cu(II) isolado, no lugar da cisplatina uma vez que esta é a função biológica reconhecida da proteína. Novamente os dados termodinâmicos apontaram reações endotérmicas e não espontâneas, sendo que para a reação onde os grupos tiol estão protonados os valores obtidos foram $\Delta H = 6493,5$ kcal/mol e $\Delta G = 5798,5$ kcal/mol e para a reação onde os grupos desprotonados os valores foram $\Delta H = 6886,9$ kcal/mol e $\Delta G = 6196,3$ kcal/mol. Desta forma, o modelo computacional ainda precisa ser otimizado para definição mais adequada se as reações com a cisplatina e ATP7A ocorrerão em meio biológico colaborando então para a resistência deste fármaco.

Novas estratégias computacionais estão sendo estudadas para contornar esse problema da superestimação dos valores e vão ser colocadas em prática. Esses resultados indicam uma reação endotérmica, onde foi necessário um fornecimento de energia às moléculas reagentes para haver quebra de ligações e formações de novas, o que é explicado pela maior presença de ligações intramoleculares nas moléculas reagentes em relação às moléculas dos produtos nas três reações. Os parâmetros cinéticos da reação dependem da estrutura de estado de transição caracterizada, o que ainda está sendo um desafio. Várias tentativas de se encontrar os estados de transição estão sendo realizados, além de novos cálculos incluindo outros procedimentos como: (i) diminuição do tamanho da camada alta; (ii) inclusão do solvente e (iii) estudos de outros sítios ativos da proteína ATP7A, para que se tenha uma visão geral do possível envolvimento ou não da proteína no mecanismo de resistência ao fármaco cisplatina.



CONCLUSÕES

A espontaneidade de uma reação química depende de diversos parâmetros e a combinação entre eles. A reação entre a proteína ATP7A e a cisplatina é uma reação que ocorre em meio biológico, com a presença de diversos solventes, que interagem com as moléculas participantes da reação. A inserção do solvente nos cálculos computacionais é de grande valia e já está sendo realizada, para que se possa obter uma conclusão mais precisa sobre a ocorrência ou não dessa reação.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio recebido pela FAPEMIG, CAPES, CNPq, PPGMQ-MG, RQ-MG

¹ www.pdb.org

² S. Dapprich, I. Komaromi, K.S. Byun, K. Morokuma, and M.J. Frisch (1999). Journal of Molecular Structure, 461-462: 1

³ Rohr, A. K., M. Hammerstad, *et al.* Tuning of Thioredoxin Redox Properties by Intramolecular Hydrogen Bonds. Plos One, v.8, n.7, Jul, p.12.