



Estudos QSAR e Ancoragem Molecular de Inibidores da Atividade Biológica do Fator de Inibição da Migração dos Macrófagos (MIF)

Alex Gutterres Taranto^{1*}; André Lacerda Braga Teles²; Jocley Queiroz Araújo³; Beatriz Alves Ferreira¹; Moacyr Comar Jr.¹

¹Programas de Pós-Graduação em Biotecnologia, Ciências Farmacêuticas, Ciências da Saúde, Laboratório de Modelagem Molecular, UFSJ, Divinópolis, MG, Brasil.

²PPGBiotec UEFS/CPqGM/FIOCRUZ, UEFS, Feira de Santana, BA, Brasil.

³LabMMol, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

RESUMO

Cumarina e 4-Cromonas são promissores inibidores de fator inibição da migração de macrófagos (MIF), uma proteína envolvida em doenças inflamatórias, como artrite reumatóide e outras patologias. Estudos teóricos de QSAR e ancoragem molecular de um conjunto de compostos mostraram correlação com estudos experimentais. Os descritores doadores de ligação de hidrogênio e momento dipolo total foram capazes de prever atividade inibitória de compostos contra o MIF (MIF_i). Paralelamente, estudos de ancoragem molecular também foram capazes de identificar ligações de hidrogênio e hidrofóbicas entre os ligantes e o MIF. Como resultado, ambas as metodologias mostraram as contribuições de ligação de hidrogênio e interações hidrofóbicas para explicar a atividade de compostos inibidores de MIF, descrevendo os grupos farmacofóricos destes compostos. Adicionalmente, um conjunto de cumarinas naturais e sintéticas foi submetido aos modelos QSAR e de ancoragem molecular a fim de que as suas atividades contra MIF fossem preditas. Ambas as metodologias de modelagem molecular puderam estimar as interações intermoleculares entre inibidores e a enzima, os quais foram muito similares a compostos descritos previamente. Estes resultados podem ser úteis para o desenho de novos compostos contra doenças inflamatórias como artrite reumatóide.

Palavras-chave: MIF. REA. AINES. Artrite Reumatóide. Desenho Fármacos com Auxílio do Computador (CADD).

INTRODUÇÃO

A artrite reumatóide é uma doença inflamatória crônica de etiologia desconhecida que leva ao comprometimento das juntas sinoviais conduzindo um em cada três pacientes à incapacidade em aproximadamente 20 anos. Atualmente, os fármacos utilizados na terapia da artrite reumatóide incluem os agentes anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES), agentes antireumatoide moduladores da doença (DMARDS, *disease-modifying antirheumatoid drugs*), imunossupressores e glicocorticóides, e alternativas recentes como as proteínas terapêuticas Infiximab e Etanercept. Todos eles reduzem os sintomas da artrite reumatóide, mas não retardam a sua evolução. Dentre esses fármacos, os DMARDS são os que apresentam melhores resultados, entretanto sua atuação ainda é bem estabelecida (Rang & Dale, 2001).

As alternativas farmacológicas disponíveis para o tratamento da artrite reumatóide não apresentam eficácia satisfatória, e, além disso, desencadeiam inúmeras reações adversas (Rang & Dale 2001). Estudos comprovaram que pacientes portadores desta doença apresentam níveis séricos do Fator de Inibição da Migração dos Macrófagos (MIF) mais elevados em relação aos não-portadores desse acometimento (Donnelly & Bucala, 1997; Lue et al., 2002).

Neste sentido, trabalhos constataram que a inibição da atividade biológica do MIF reduzia a sintomatologia da artrite (Donnelly & Bucala, 1997; Lue et al., 2002), e que a sua supressão permite que os glicocorticóides exerçam os efeitos anti-inflamatórios, inibindo a produção de citocinas, leucotrienos e prostaglandinas, evitando a exacerbação das condições inflamatórias causadas pela artrite reumatóide (Donnelly & Bucala, 1997; Orita et al. 2001). Estudos mostraram também que o anticorpo anti-MIF é terapêuticamente benéfico em uma ampla variedade de patologias, nas quais as suas principais ações são: conferir proteção contra a endotoxemia letal na sepsis, inibir a produção de células T específicas de antígenos, reduzindo a resposta imunológica primária na inflamação, atenuar a produção *in vitro* de citocinas pró-inflamatórias

nas células alveolares da síndrome da angústia inflamatória do adulto; e interferir na evolução da artrite reumatóide em ratos.

Recentemente, foi descoberto que anticorpos anti-MIF são produzidos por pacientes infectados pelo helminto, *Brugia malayi*, pois este secreta dois homólogos do MIF humano conhecidos como Bm-MIF-1 e Bm-MIF-2, indicando que tais anticorpos são produzidos *in vivo* (Bemhagem et al., 1993; Calandra et al., 1995; Mitchell et al., 1999; Santos, et al., 2001; Bendrat et al., 1997).

Dessa forma, novos fármacos inibidores do MIF podem ser úteis no tratamento de inúmeras patologias de origem inflamatória, principalmente na artrite reumatóide. Vários trabalhos descreveram a busca de compostos protótipos com potencial ação anti-MIF. Dentre estes temos: i) o desenvolvimento de vários análogos da dopacroma capazes de inibir a atividade do MIF fornecendo detalhes do mecanismo de tautomerização (Lue et al., 2002; Swope et al., 1998; Sugimoto et al., 1996; Zhang et al., 1999; Zhang et al., 2002); ii) utilizando a metodologia de busca virtual, foi sintetizado 14 análogos da cumarina e 4-cromonas com valores de atividade que variam entre 0,038-7,4 μM (Orita et al., 2001); iii) iminas conjugadas com aminoácidos foram capazes de inibir a atividade do MIF com uma concentração inibitória variando entre 1,65 μM e 50 μM (Dios et al., 2002); e iv) a síntese de cinco análogos da isoxazolina, onde apenas um deles manifestou atividade inibitória sobre a atividade tautomerase do MIF, com concentração de 7 μM , conhecido como ácido acético metil éster (*S,R*)-3-(4-hidroxifenil)-4,5-dihidro-5-isoxazol (ISO-1) (Lubetsky et al., 2002).

Compostos com o núcleo cumarínico pertencentes à flora brasileira são bem caracterizados em trabalhos anteriores (Silva & Lucchese, 2002). Estes apresentam semelhança estrutural aos descritos por como inibidores de MIF (Orita et al., 2001). Com o objetivo de identificar a possível atividade biológica desses novos compostos, foram realizados estudos de QSAR (Hansch, 1993) e SAR sobre os compostos cumarínicos obtidos por Orita. A equação obtida foi aplicada sobre os compostos isolados da flora brasileira. Adicionalmente, estudos de *docking* no sítio catalítico do MIF com uso do programa *Autodock Vina* (Trott & Olson, 2010) foram realizados. A intervenção na atividade biológica do fator de inibição da migração dos macrófagos por compostos cumarínicos relatados pela literatura, incluindo compostos cumarínicos da flora brasileira, pode representar uma alternativa terapêutica no tratamento da artrite reumatóide.

MATERIAIS E MÉTODOS

As estruturas dos 14 derivados cumarínicos descritos anteriormente (Orita et al., 2001) foram geradas pelo programa BioMedCache (2005). A seguir, para cada cumarina foi realizada uma busca automática pelo conformero de menor energia na superfície de energia potencial empregando o método CONFLEX (Kotev et al., 2005). Este método consiste em um algoritmo desenvolvido

para análise conformacional que promove uma variação em ângulos torcionais previamente selecionados, gerando assim uma segunda estrutura com a respectiva energia através do campo de força MM3 (Allinger, 1977; Allinger, Yuh & Lii, 1989). O processo foi repetido exaustivamente para cada cumarina obtendo diferentes conformeros com as respectivas energias.

O conformero de menor energia, de cada estrutura, foi selecionado para a obtenção dos modelos QSAR. As geometrias destes foram transferidas para o programa MOPAC (Stewart, 2009), sendo refinadas pelo método AM1 (Dewar et al., 1985). Este forneceu também as propriedades físico-químicas utilizadas como descritores para o desenvolvimento dos modelos QSAR.

Os modelos foram obtidos com o pacote E-DRAGON (Tetko et al., 2005), que realiza uma análise de regressão múltipla linear selecionando as melhores equações com um determinado número de descritores pré-selecionados. Somente dois descritores foram utilizados por equação, evitando-se o excesso de parâmetros no modelo. As melhores equações dentre as selecionadas pelo método foram identificadas de acordo com os valores dos coeficientes de correlação (r^2), e de validação cruzada (r^2_{cv}) e com os descritores que possam vir a contribuir para a compreensão do mecanismo de ação destes compostos. Com isso, procurou-se obter um modelo adequado as exigências da metodologia QSAR. As correlações obtidas foram selecionadas de acordo com sua qualidade estatística, e foram validadas pela capacidade de predição de atividades de análogos externos à série (Lipkowitz & Boyd, 1997).

O modelo QSAR foi realizado empregando 14 estruturas descritas por Orita et al., (2001) (figura 1), sendo que 10 desses compostos formaram a série treino (1, 2, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 12 e 13) e os quatro demais formaram a série teste (5, 8, 11 e 14), selecionados aleatoriamente. Assim, o melhor modelo obtido para a série treino foi aplicado sobre a série teste para avaliar a sua capacidade de prever a atividade biológica de compostos não inclusos na série treino. No intuito de identificar compostos protótipos com potencial atividade inibitória do MIF, o modelo QSAR validado pela série teste, foi aplicado em compostos cumarínicos presentes na flora brasileira e em estruturas sintéticas possíveis de serem sintetizados (Figura 1) (Silva, 2002; Matos, 2000; Simões 1999).

Paralelamente ao estudo QSAR, os compostos da figura 1, gerados e refinados de forma similar aos derivados cumarínicos, foram submetidos a cálculos de ancoragem molecular utilizando o programa *AutoDock Vina* (Trott & Olson, 2010). As coordenadas atômicas do MIF foram obtidas a partir da estrutura depositada no *Protein Data Bank* (PDB) com código 1GCZ (Berman, et al. 2007), a qual está complexada com o inibidor cumarínico (1). A seguir, o sítio de interação ligante-proteína foi definido de forma a cobrir todo o ligante complexado em 1GCZ. Após o processo de ancoragem molecular, o programa Pymol (Delano, 2002) foi utilizado para a inspeção visual e descrição dos resultados. Dessa forma, duas metodologias de modelagem molecular diferentes foram empregadas neste estudo.

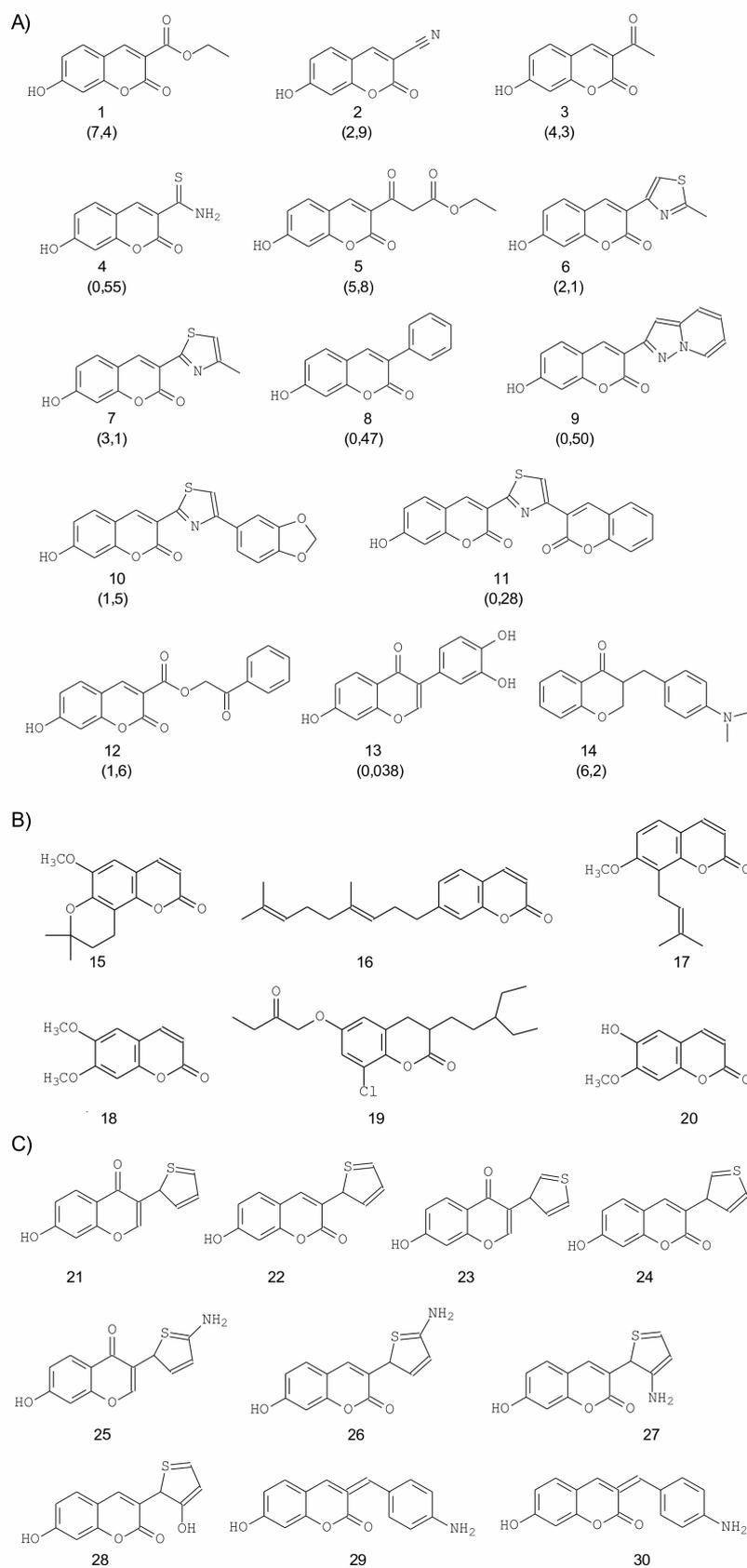


Figura 1: A) Derivados cumarínicos e suas respectivas constantes de inibição (μM); B) Compostos cumarínicos selecionados presentes na flora brasileira; C) Análogos cumarínicos ou de cromonas que podem apresentar atividade anti-MIF (19).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o conjunto treino, formado por 10 derivados cumarínicos, foram obtidos dois modelos QSAR com relevância estatística (Tabela 1), sendo, então, avaliados frente à série teste de compostos.

A proposição das correlações representadas pelas Equações um e dois levou em consideração que os quatro descritores refletiram os parâmetros físico-químicos apropriados para interação proteína-ligante. Adicionalmente, os valores do coeficiente de correlação r^2 e de seus respectivos coeficientes de validação cruzada (r^2_{cv}) (Tabela 1), sugeriram que as tais equações seriam capazes de prever a atividade da série teste. Utilizaram-se os valores de descritores e atividades mostrados na Tabela 2.

Os dois modelos QSAR obtidos, Equações 1 e 2, foram usados para avaliar a capacidade de previsão frente aos compostos do conjunto teste (cumarinas 5, 8 11 e 14), cujos resultados encontram-se na Tabela 2.

A validação dos modelos QSAR deu-se através da comparação dos valores de atividade experimental com os valores de atividade calculada, para a qual se obteve um coeficiente de correlação (r^2) de 0,9 e 0,1, respectivamente para a Equações 1 e 2.

O valor do coeficiente de correlação (0,9) obtido na aplicação da Equação 1, na relação entre os valores de constante de inibição experimental (K_i^E) e os calculados, sugere que este modelo QSAR seja capaz de prever as atividades de compostos da série teste. Todavia, a aplicação da Equação 2, embora tenha tido comportamento semelhante à Equação 1, nos resultados obtidos para a série treino, mostrou-se inadequada para a descrição da série teste, resultando em um coeficiente de correlação de valor de 0,0775

A diferença no comportamento desses dois modelos pode ser explicada pelo papel dos descritores usados em sua construção, pois embora todos eles possam descrever a interação entre ligante e receptor, a importância relativa entre eles não é equivalente, o que pode ser concluído na diferença entre os coeficientes de correlação.

Analisando as estruturas cumarínicas, a presença de uma hidroxila na posição sete é responsável pela formação de uma ligação de hidrogênio com o oxigênio carbonílico da cadeia lateral da Asn-97, além de apresentarem um oxigênio na posição 1 e um oxigênio carbonílico na posição 2, formando uma ligação hidrogênio com o nitrogênio da Ile-64. Cabe ressaltar ainda que outra porção da molécula interage com o sítio hidrofóbico do MIF, que é formado pelos aminoácidos Pro-1, Met-2, Ile-64, Tyr-95, Val-106 e Phe-113.

Tabela 1: Equações 1 e 2, e respectivos resultados estatísticos.

Modelos QSAR	r^2	S^2	r^2_{cv}
Equação 1: $K_i^E = 1,0143 (a) + 0,8787 (b) - 5,2758$ (a)= contagem dos sítios doadores de hidrogênio (b)= dipolo total da molécula	0,9054	0,5885	0,8207
Equação 2: $K_i^E = -2,3861 (c) - 0,0501 (d) + 17,42$ (c)= contagem dos sítios aceptores de hidrogênio (d)= área de superfície negativa parcial	0,9182	0,5086	0,8027

Dentre estes compostos, existe uma variação bastante ampla nos valores de atividade. Os compostos mais ativos 11, 8, 9 e 4, apresentam valores de atividade experimental (AE) de 0,3, 0,5, 0,5 e 0,5 μM respectivamente e, à exceção do composto 4, todos eles apresentam uma estrutura hidrofóbica na posição 3 que é capaz de interagir com a porção hidrofóbica do MIF. Consequentemente, estes apresentam valor reduzido do descritor (a), exceto 4, o que justifica elevados valores de atividade. O composto 4, por sua vez, contém um átomo de enxofre que, lhe confere menor polaridade, quando comparado com átomos como oxigênio e nitrogênio. Deste modo, o modelo QSAR 1 sugere que substituições na posição 3 com grupos que contenham o átomo de S (principalmente em anel heterocíclico) na estrutura como tiol, tiocetônico, tetrahidrotiofeno, tetrahidrotiopirano, tiofeno, tiopirano, tiazol, isotiazol, e ainda que tenham também um grupamento doador de ligação hidrogênio, próximos deste átomo podem ser mais ativos.

A tabela 2 mostra os resultados do modelo QSAR. Como pode ser observado, os compostos menos ativos desta série (1, 3 e 5) apresentam valores de constante de inibição de 7,4, 4,3 e 5,8 μM , respectivamente. Estes baixos valores de atividade podem ser explicados pela presença dos grupos polares cetona e éster na posição 3, que impedem que haja uma interação com a porção hidrofóbica do sítio catalítico do MIF. Segundo o modelo QSAR 1, estes substituintes não favorecem a atividade pela sua pronunciada polaridade e pelo baixo número de sítios doadores hidrogênicos, apresentando valores de 6, 4 e 8 para o descritor (a) e 8, 5 e 6 para o descritor (b) relativamente altos quando comparados com os demais compostos.

Os compostos 2, 6, 7 e 10 apresentam atividade intermediária com valores 2,9; 2,1; 3,1 e 1,5 μM , respectivamente. À exceção do composto 2, os demais possuem um anel tiazol em sua estrutura. Caso este anel seja substituído por anel tiofeno substituído com um grupo amino, o modelo sugere que estes novos compostos apresentem maior atividade devido à interação lipofílica somada a uma possível ligação de hidrogênio com aminoácidos aceptores desta ligação localizados no sítio hidrofóbico do MIF.

Tabela 2. Valores dos descritores, atividades experimentais e atividades inibitórias calculadas para a série treino, e em negrito para a série teste.

Estruturas	(a)	(b)	(c)	(d)	AE(μM)	MIF ₁	MIF ₂
1	6	7,9	1	164	7,4	7,8	6,8
2	1	7,7	2	190	2,9	2,5	3,1
3	4	5,0	2	167	4,3	3,2	4,3
4	3	4,1	2	213	0,5	1,4	2,0
5	8	6,1	2	203	5,8	8,2	2,5
6	4	4,6	2	206	2,1	2,8	2,3
7	4	4,1	2	185	3,1	2,4	3,4
8	1	5,6	1	201	0,4	0,7	5,0
9	1	6,2	3	190	0,5	1,2	0,7
10	3	4,1	2	236	1,5	1,4	0,8
11	1	4,7	2	298	0,3	-0,1	-2,3
12	2	4,8	1	275	1,6	1,0	1,2
13	3	2,9	4	168	0,04	0,3	-0,6
14	6	5,1	2	195	6,2	5,3	2,7

(a)= contagem dos sítios doadores de hidrogênio

(b)= dipolo total da molécula

(c)= contagem dos sítios aceptores de hidrogênio

(d)= área de superfície negativa parcial

AE= Atividade experimental

MIF₁ e MIF₂ = Valores de inibição calculados para equação 1 e 2 respectivamente

O composto 12, que não apresenta o grupamento hidroxila na posição 7, apresenta um valor de atividade considerável (1,6 μ M). Este composto está bem adequado ao modelo QSAR 1, visto que também apresenta valores intermediários dos descritores (a) e (b), com valores 2 e 5, respectivamente. A supressão do grupamento hidroxila na posição 7 reduz o valor de (a) e o anel benzênico no extremo do grupo ceto-éster substituído na posição 3, também reduz o valor de (b).

A cumarina 13, é o mais ativo inibidor do MIF descrito pela literatura e também é o mais apolar de todos os compostos calculados, assumindo um valor de 3 para o descritor (b). Neste composto, Orita e colaboradores observaram que o grupo catecol faz uma interação lipofílica com a Tyr-36, enquanto a hidroxila na posição 7 interage com a Asn-97 através de ligação hidrogênio e, não sendo observado em nenhuma estrutura cristalina, uma ligação hidrogênio entre o oxigênio carbonílico com o grupamento hidroxílico da Tyr-95.

O composto 14 apresenta uma baixa atividade biológica (6,2 μ M), sendo o segundo menos ativo de toda a série. O modelo QSAR obtido mostra que este composto apresenta um valor para o descritor (a) bastante elevado (6). Este valor é facilmente reduzido se houver a substituição dos grupamentos metílicos da amina por hidrogênios, formando uma amina primária aromática ou mesmo uma hidroxila fenólica. Dessa forma, o novo composto apresentaria um valor menor para o descritor (a) e também estes substituintes poderiam interagir como doadores de ligação de hidrogênio para Tyr-36 aumentando a interação com o MIF.

Tabela 3. Energias de ligação dos compostos do semi-árido, e de inibidores cumarínicos propostos no sítio catalítico do MIF calculados pelo AutoDock Viana.

Cumarina	E. de ligação (Kcal/mol)	Cumarina	E. de ligação (Kcal/mol)
15	-6,1	24	-8,8
16	-8,5	25	-7,9
17	-6,3	26	-8,6
18	-6,6	26	-7,2
19	-6,7	28	-8,3
20	-7,0	29	-8,7
21	-7,9	30	-9,7
22	-8,6	13*	-8,7
23	-8,3	1*	-8,2

*compostos de referência: 1 e 13 compostos de menor e maior atividades experimentais respectivamente, descritors por Orita.

A análise dos valores de atividade, obtidos para a série teste, ratifica o perfil de interação fármaco-receptor descrito anteriormente, onde compostos com valores reduzidos de sítios doadores de hidrogênio e dipolo total apresentam melhor atividade sobre o MIF.

O melhor modelo QSAR-1 foi aplicado sobre seis compostos cumarínicos oriundos da flora brasileira e relatado pela literatura (Silva & Lucchese, 2002). Os

resultados revelaram que as cumarinas 15-18, destituídas de sítios doadores de hidrogênio, apresentaram maiores atividades inibitórias que as cumarinas 19 e 20. Entre as estruturas 15-18, aquelas que mostraram menor momento dipolar também revelaram maior atividade inibitória. Em contrapartida, a estrutura 19 em razão de possuir um número elevado de sítios doadores de hidrogênio em relação à estrutura 20 foi muito menos ativa do que esta, apesar de seu momento dipolo ser menor.

Paralelamente aos resultados obtidos pelo modelo analisado, cálculos de ancoragem molecular foram realizados sugerindo as conformações nas quais a interação de compostos naturais (Figura 1B) com o sítio catalítico do MIF. A tabela 3 mostra os valores de energia de ligação preditos. Como pode ser observado, estes compostos poderiam interagir com o MIF, principalmente o composto 16, que possui energia de ligação bastante similar com os compostos descritos por Orita et al., (2001) (-8,7 Kcal/mol).

A Figura 2 mostra as possíveis interações existentes entre os compostos analisados e o sítio catalítico do MIF. Todo processo de ancoragem molecular deve ser inicializado por uma etapa de validação. Como pode ser observado pela Figura 2A, o ligante (azul) foi ancorado no sítio de ação do MIF. Este foi orientado de forma muito similar ao ligante da estrutura cristalina (verde), mostrando que a metodologia escolhida é capaz de reproduzir as interações ao ligante-receptor. Como resultado, o valor de *root-mean-square deviation* (RMSD) foi de 0,95 Å. Dentre os compostos sugeridos, o composto 15 (Figura 2B) é o menos ativo da série, e este assumiu diferentes conformações de acoplamento. Na geometria obtida pelo *Autodock Vina* observa-se uma distância de 3,50 Å entre o hidrogênio ligado ao oxigênio 7 e o oxigênio do anel fenólico da Tyr-36, sugerindo a formação de uma possível ligação hidrogênio. O mesmo anel aromático da Tyr-36, juntamente com o da Phe-113 interage com a estrutura hidrofóbica dos anéis do núcleo cumarínico. O composto 16 (Figura 2C), por outro lado, apresentou o núcleo cumarínico em posições semelhantes nas duas simulações e com distâncias atômicas demasiado longas para realização de ligações hidrogênio com oxigênio da Pro-1 e Tyr-95, porém realizando algum contato hidrofóbico com estes resíduos. Como resultado do *Autodock Vina*, a longa ramificação hidrofóbica inserida na posição 7 foi estabilizada pelos anéis aromáticos da Tyr-36 e Phe-113, e pela porção apolar da Ile-64. De forma similar, o composto 17 (Figura 2D), apresenta uma conformação que sugere interações hidrofóbicas com os anéis aromáticos da Tyr-36 e Phe-113, bem como com a ramificação alifática da Ile-64. O grupo substituinte da posição 8 encontra-se orientado para o interior da cavidade do sítio catalítico, ao passo que o núcleo cumarínico encontra-se orientado para seu exterior. O mesmo padrão de interação ligante-receptor pode ser observado para os compostos 18 a 20 (E-G). Os anéis aromáticos dos resíduos de Pro-1, Tyr-36, Tyr-95 e Phe-113 realizam interações hidrofóbicas com estes compostos. Adicionalmente, o oxigênio-8 destes compostos realiza uma ligação de hidrogênio com a Lys-32 de 2,23 Å (Figura 2E-G). As estruturas refinadas de ambos compostos também mostram que há a possibilidade da formação de uma segunda ligação, entre o oxigênio-1 e o hidrogênio ligado ao nitrogênio aromático da Pro-1, cuja distância é de

2,91 Å. Este dado sugere que a estratégia de modificação de aumentar o tamanho molecular na posição do oxigênio-1, favorecendo a formação desta ligação hidrogênio, pode resultar em derivados mais ativos.

Adicionalmente, os resultados sugerem uma interação hidrofóbica entre o composto 20 (Figura 2G) e a Val-106. Além disso, a hidroxila da posição 8 deste composto encontra-se em posição adequada para formar uma ligação hidrogênio com o átomo de hidrogênio presente no nitrogênio da Asp-97.

A análise dos parâmetros de QSAR, bem como dos estudos de ancoragem molecular para algumas cumarinas da flora brasileira, permitiu obter alguns parâmetros sobre as interações destes compostos com o sítio catalítico do MIF. As geometrias obtidas apontam uma ligação de hidrogênio entre os oxigênios das posições 1 e 2 em comum nos compostos 18, 19 e 20, com o hidrogênio ligado ao nitrogênio da Ile-64. Os resíduos Tyr-95, Tyr-36, Phe-113, Pro-1, Ile-64 e Val-106 realizam interações hidrofóbicas com o núcleo cumarínico e com os substituintes alifáticos. Com exceção das estruturas 15 e 17, as geometrias dos demais compostos reafirmam o posicionamento do núcleo cumarínico compreendido entre a Tyr-95 e a Ile-64.

Dentre as cumarinas presentes na flora brasileira, a estrutura 16 apresentou os melhores valores preditivos pela metodologia de ancoragem molecular. Este resultado, provavelmente, deve-se ao seu perfil hidrofóbico, interagindo de forma pronunciada com os resíduos de caráter apolar do sítio catalítico. As estruturas 16, 18, 20 e, em menor grau, 19, interagem com a Prolina-1. Este resíduo tem importante papel na reação de tautomerase realizando interações hidrofóbicas. Além disso, esse resíduo é invariável em 19 membros da família do MIF, reforçando sua importância na atividade tautomerase da citocina (Sugimoto et al., 1996; Zhang, 1999) e na confiabilidade da metodologia usada.

Segundo Orita e colaboradores, as interações hidrofóbicas podem ser oriundas tanto de substituintes alifáticos quanto por anéis apolares. Estas são importantes para o reconhecimento molecular de inibidores, a exemplo das estruturas 1 e 13, que apresentam considerável perfil apolar, sugerindo as respectivas constantes de inibição.

Estes resultados levam a proposta de análogos estruturais de cumarinas (Figura 1C), com objetivo de prever a atividade de compostos que ainda não foram sintetizados. Na Tabela 2 e Figura 2, é possível observar as interações hidrofóbicas que ocorrem entre o núcleo cumarínico e as estruturas aromáticas dos resíduos de Pro-1, Tyr-36, Ile-64, Tyr-95 e Phe-113. Ligações hidrogênio são sugeridas entre o oxigênio substituinte da posição 4 e o hidrogênio ligado ao nitrogênio da Ile-64. O posicionamento do nitrogênio ligado ao anel aromático substituinte da posição 3, favorece a realização de uma ligação hidrogênio com a hidroxila fenólica da Tyr-36.

Dentre as estruturas propostas, o composto 30 destaca-se também por apresentar o menor valor de energia de ligação (-9,7 Kcal/mol), conforme é mostrado na tabela 3. A figura 2I mostra formação de duas ligações de hidrogênio entre os oxigênios-1 e 2- e os resíduos Lys-32 e Ile-64, respectivamente. Essas ligações hidrogênio, aliadas às interações hidrofóbicas da Pro-1, Tyr-36 e à Phe-113, refletem na interação mais favorável dentre todos os compostos calculados pelo *Autodock Vina*.

Finalmente, pode-se dizer que as geometrias de acoplamento para a maioria dos compostos, inclusive devido a sua semelhança estrutural, acompanham um padrão no qual o núcleo cumarínico fica localizado entre a Tyr-95 e a Ile-64, na maioria dos casos realizando ligações de hidrogênio com estes resíduos. Adicionalmente, nos compostos 24, 26 e 28, a hidroxila substituinte da posição 8 realiza uma ligação de hidrogênio com o resíduo de Asp-97.

Vários projetos genoma foram realizados nos últimos anos com objetivo de contribuir com o desenvolvimento de fármacos fornecendo novos alvos moleculares. Como resultado, as estruturas de proteínas complexados com os compostos protótipos foram depositados em bases de dados como *Protein Data Bank* (PDB). Em paralelo, as abordagens de modelagem molecular se transformaram, e hoje são uma ferramenta indispensável no processo de descoberta de compostos bioativos. A modelagem molecular combina múltiplas fontes de informação e as transforma em conhecimento para uma finalidade específica como rápida tomada de decisão na área de desenho racional de medicamentos. Assim, como novas entidades químicas precisam ser testados num ensaio biológico, estes métodos podem contribuir para prever as propriedades farmacológicas de novos compostos. Neste sentido, a abordagem de ancoragem molecular pode quantificar a energia de ligação entre ligantes e seu receptor. Como resultado, um complexo com coordenadas atômicas de o receptor e o ligante pode ser visualizado e analisado pelo investigador. Resultados de encaixe podem mostrar como as interações intermoleculares que regem o processo de reconhecimento molecular para cada caso específico. Esta informação é útil para comparar a energia de ligação relativa de um conjunto de ligandos contra o mesmo alvo molecular. Portanto, é possível prever o composto mais ativos de um determinado conjunto (Leite et al. 2010).

Análises de QSAR, bem como metodologias de ancoragem molecular, constituem importantes ferramentas para a predição da atividade biológica de moléculas frente a um determinado bioreceptor, tornando mais eficaz o processo de escolha de compostos a serem estudados *in vitro* e, deste modo, auxiliando no desenvolvimento de novos fármacos (Guha & Jurs, 2004; Morón et al 2000; Leite et al. 2010).

Essas análises foram realizadas sobre um conjunto de moléculas encontradas na flora do semiárido brasileiro, de forma a determinar parâmetros que pudessem sugerir modificações moleculares nesses compostos, direcionando para a construção de novos protótipos com atividade mais pronunciada contra o MIF.

Dois modelos QSAR foram construídos, mas somente o modelo 1 mostrou-se confiável para a análise teórica da atividade. Assim, foi possível observar que os inibidores do MIF devem ser moléculas apolares, substituídas na posição 3 com anel benzênico ou heterocíclico, contendo enxofre e substituído por um grupo doador de ligação de hidrogênio como amina primária ou hidroxila. A hidroxila na posição 7 e a carbonila na posição 4 também são importantes por favorecerem ligações de hidrogênio com o receptor. Cadeias contendo grupos polares como cetona, éster e cetoéster, diminuiriam a atividade destes compostos.

Segundo os modelos teóricos estudados, as atividades inibitórias calculadas para os seis compostos cumarínicos foram relativamente significativas, onde a

ordem de atividade inibitória das estruturas é 15 > 16 > 17 > 18 > 20 > 19.

Adicionalmente aos estudos QSAR, estudos de ancoragem molecular sugerem a importância de algumas interações para a avaliação da atividade dos compostos cumarínicos da flora brasileira frente ao MIF. Estes cálculos identificaram importantes resíduos tais como Tyr-36, Tyr-95 e Phe-113 na estabilização do núcleo cumarínico devido a interações hidrofóbicas. De modo similar, os resíduos de Lys-32, Ile-64 e Pro-1 consistem em importantes sítios

doadores de ligações de hidrogênio, fornecendo maior especificidade ao acoplamento do inibidor.

De posse dos resultados obtidos para o grupo de compostos conhecidos, foram propostas algumas moléculas que poderiam apresentar atividade inibitória frente ao MIF. Segundo os resultados obtidos, observou-se que os padrões de interação seguem aqueles mostrados anteriormente, confirmando que os resultados apresentados pela metodologia de ancoragem molecular são confiáveis fornecendo explicações da atividade biológica destes compostos.

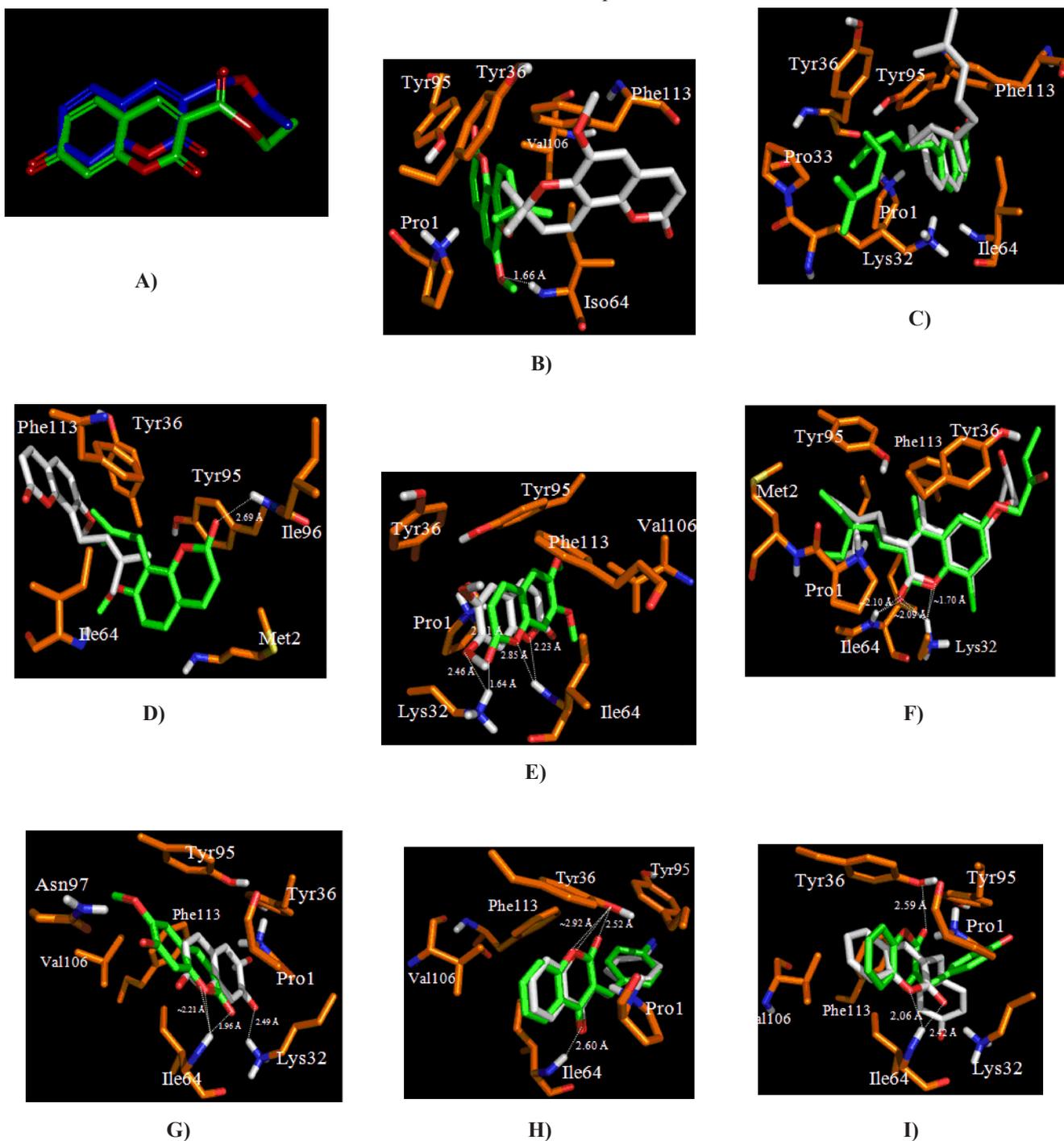


Figura 2. (A) Re-dock do inibidor da estrutura cristalina. Estrutura cristalina (verde) e ancorada (azul). Principais interações intermoleculares entre MIF e os compostos 15 (B), 16 (C), 17 (D), 18 (E), 19 (F) e 20 (G). 28 (H) e 30 (I) resultantes do acoplamento molecular.

Portanto, esses resultados permitem concluir que os seis compostos estudados apresentaram parâmetros favoráveis para a atividade frente ao MIF, bem como os análogos estruturais propostos, os quais apresentaram valores bastante promissores de energia de ligação nos cálculos de ancoragem molecular realizados.

AGRADECIMENTOS

ALB Teles é grato à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pela bolsa concedida (termo de outorga nº BOL0298/2009).

Os autores agradecem também ao CNPq (475512/2010-3) e a FAPEMIG (APQ-01855-10) pelo suporte financeiro.

ABSTRACT

QSAR Modeling and Molecular Docking Study of Inhibitors of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF)

Coumarin and Chromen-4-one are promising inhibitors of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF), a protein involved in rheumatoid arthritis and other inflammatory diseases. Quantum structure-activity relationship (QSAR) and docking theoretical studies were undertaken on a set of compounds of known activity and showed agreement with previous experimental studies. Two descriptors, hydrogen donor sites and the total dipole, were able to predict MIF inhibitory activity (MIF). The docking studies corroborated the QSAR studies. As a result, both methods indicated contributions of hydrogen bonds and hydrophobic interactions that explain the activity of the MIF inhibitors, describing the pharmacophore groups these molecules. Additionally, a set of natural and synthetic coumarins was subjected to the QSAR and docking models in order to predict their possible MIF inhibitory activity. Both molecular modeling methods were able to estimate the intermolecular interactions between inhibitors and enzyme, which were very similar to those of previously described compounds. These results could be useful to design new compounds against inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis.

Keywords: MIF. SAR. NSAIDS. Rheumatoid Arthritis. Computer Aided Drug Design.

REFERÊNCIAS

Allinger NL, Yuh YH, Lii JH. Molecular Mechanics. The MM3 Force Field for Hydrocarbons. *J Am Chem Soc.* 1989;111:8551-65.

Allinger NL. Conformational analysis. 130. MM2. A hydrocarbon force field utilizing V1 and V2 torsional terms. *J Am Chem Soc.* 1977;99(25):8127-37.

Bendrat K, Al-Abed Y, Callaway DJ, Peng T, Calandra T, Metz CN. Biochemical and mutation investigations of

the enzymatic activity of macrophage migration inhibitory factor. *Biochemistry.* 1997;36(49):15356-62.

Berman H, Henrick K, Nakamura H, Markely JL. The worldwide Protein Data Bank (wwPDB): ensuring a single, uniform archive of PDB. *Nucleic Acids Res.* 2007;35:D301-D303.

Bernhagen J, Calandra T, Mitchell RA, Martin SB, Tracey KJ, Voelter W. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature.* 1993;365:756-9.

BioMedCache 6.1.12.34. Cache Group Fujitsu Ltda.; 2005.

Calandra T, Bernhagen J, Metz CN, Spiegel AL, Bacher M, Donnelly T. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature.* 1995;377(6544):68-71.

Delano WL. The PyMOL Molecular Graphics System. DeLano Scientific, USA; 2002.

Dewar MJS, Zoebisch EG, Healy EF, Stewart JJP. The development and use of quantum-mechanical molecular models. 76. AM1: A new general-purpose quantum-mechanical molecular model. *J Am Chem Soc.* 1985;107:3902-9.

Dios A, Mitchell RA, Aljabari B, Lubetsky J, O'connor K, Liao H. Inhibition of MIF bioactivity by rational design of pharmacological inhibitors of MIF tautomerase activity. *J Med Chem.* 2002;45:2410-6.

Donnelly SC, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of glucocorticoid activity with a critical role in inflammatory disease. *Mol Med Today.* 1997;3:502-7.

Guha R, Jurs PC. Development of QSAR Models To Predict and Interpret the Biological Activity of Artemisinin Analogues. *J Chem Inf Comput Sci.* 2004;44(4):1440-9.

Hansch C. Quantitative structure-activity relationships and the unnamed science. *Acc Chem Res.* 1993; 26:147-53.

Kotev MI, Goto H, Ivanov PM. Search/Minimization Study of the Conformations of Ornoside and Escuside. *J Mol Struct.* 2005;748:9-16.

Leite FHA, Taranto AG, Santos Junior MC, Branco A, Araujo MT, Carneiro JW M. Search for new antimalarial compounds obtained from natural sources by molecular modeling. *Int J Quantum Chem.* 2010;110(11):2057-66.

Lipkowitz KB, Boyd DB. Reviews in computational chemistry. New York: Wiley-VCH; 1997.

Lubetsky JB, Angeles D, Han J, Aljabari B, Ruzsicska B, Mitchell R. The tautomerase active site of macrophage migration inhibitory factor is a potential target for discovery of novel anti-inflammatory agents. *J Biol Chem.* 2002;277(28):24976-82.

Lue H, Kleemann R, Calandra T, Roger T, Bernhagen J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. *Microb Infect.* 2002;4:449-60.

- Matos FJA. Plantas Medicinais: Guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil. 2. ed. Fortaleza: Imprensa Universitária/UFC; 2000.
- Mitchell Ra, Metz CN, Peng T, Bucala R. Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). *J Biol Chem.* 1999;274:18100-6.
- Morón JA, Campillo M, Perez V, Unzeta M, Pardo L. Molecular Determinants of MAO Selectivity in a Series of Indolylmethylamine Derivatives: Biological Activities, 3D-QSAR/CoMFA Analysis, and Computational Simulation of Ligand Recognition. *J Med Chem.* 2000;43:1684-91.
- Orita M, Yamamoto S, Katayama N, Motonori A, Takayama K, Yamagiwa Y. Coumarin and chromen-4-one analogues as tautomerase inhibitors of macrophage migration inhibitory factor: discovery and x-ray crystallography. *J Med Chem.* 2001;44:540-7.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM. *Farmacologia.* 4. ed. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan; 2001.
- Santos L, Hall P, Metz C, Bucala R, Morand EF. Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in murine antigen-induced arthritis: interaction with glucocorticoids. *Clin Exp Immunol.* 2001;123:309-14.
- Silva FS, Veloso ES, Lucchese AM. Constituintes químicos da parte externa do rizoma de *Spiranthera odoratissima*. In: 3. Simpósio de Plantas Medicinais da Bahia; 2002; Feira de Santana: UEFS; 2002. p. 55.
- Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, De Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia: da planta ao medicamento.* Porto Alegre: Editora Universidade/UFRGS; 1999.
- Sugimoto H, Suzuki M, Nakagawa A, Tnaka I, Nishihira J. Direct link between citokine activity and a catalytic site for macrophage migration inhibitory factor. *Febs Lett.* 1996;389:145-8.
- Stewart JJP. MOPAC. 2009, Colorado Springs: Stewart Computational Chemistry, CO, USA; 2009.
- Swope M, Sun H, Blake PR, Lolis E. Direct link between citokine activity and a catalytic site for macrophage migration inhibitory factor. *Embo J.* 1998;17:3534-41.
- Tetko IV, Gasteiger J, Todeschini R, Mauri A, Livingstone D, Ertl P, Palyulin VA, Radchenko EV, Zefirov NS, Makarenko AS, Tanchuk VY, Prokopenko VV. Virtual computational chemistry laboratory - design and description. *J Comput Aid Mol Des.* 2005; 19:453-63.
- Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem.* 2010;31(2):455-61.
- Zhang X, Taylor P, Wang JM, Meyer DJ, Scott, AL, Walkinshaw MD. Homologues of human macrophage migration inhibitory factor from a parasitic nematode - Gene cloning, protein activity, and crystal structure. *J Biol Chem.* 2002;277:44261-7.
- Zhang X, Bucala R. Inhibition of macrophage migration inhibitory factor (MIF) tautomerase activity by dopachrome analogs. *Bioorg Med Chem Lett.* 1999;9(22):3193-8.

Recebido em 25 de agosto de 2011

Aceito para publicação em 25 de maio de 2012

