



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

ALEX ALVES DE SOUZA

**ESTUDO TEÓRICO DAS BETAÍNAS HIDROXÂMICAS COMO INIBIDORAS DAS
ENZIMAS HISTONA DEACETILASE E ANIDRASE CARBÔNICA**

ILHÉUS – BAHIA

2017

ALEX ALVES DE SOUZA

**ESTUDO TEÓRICO DAS BETAÍNAS HIDROXÂMICAS COMO INIBIDORAS DAS
ENZIMAS HISTONA DEACETILASE E ANIDRASE CARBÔNICA**

Dissertação apresentada para a obtenção
do título de mestre em Química, à
Universidade Estadual de Santa Cruz –
UESC.

Área de Concentração: Físico-Química

Orientador: Dr. Fernando Cesário
Rangel

**ILHÉUS – BAHIA
2017**

S729

Souza, Alex Alves de.

Estudo teórico das betaínas hidroxâmicas como inibidoras das enzimas histona deacetilase e anidrase carbônica / Alex Alves de Souza – Ilhéus, BA : UESC, 2017.

xii, 77f. : il.

Orientador: Fernando Cesário Rangel
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências.

1. Inibidores enzimáticos. 2. Ácidos hidroxâmicos. 3. Dinâmica molecular. 4. Docagem molecular. 5. Betaínas hidroxâmicas. I. Título.

CDD 572.7

ALEX ALVES DE SOUZA

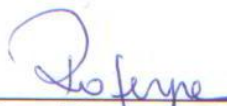
ESTUDO TEÓRICO DAS BETAÍNAS HIDROXÂMICAS COMO
INIBIDORAS DAS ENZIMAS HDAC E AC

Ilhéus-BA, Ilhéus, 03 de março de 2017.

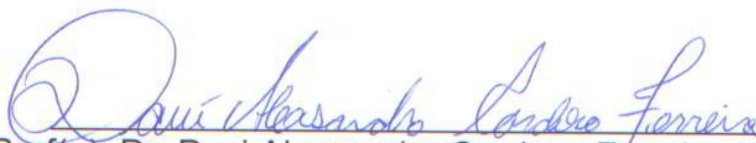
COMISSÃO EXAMINADORA:



Prof(a). Dr. Fernando Cesário Rangel (UESC)
Doutor em Química - UnB
Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC
Orientador(a)



Prof(a). Dra. Rosênira Serpa da Cruz (UESC)
Doutora em Ciências - UNICAMP
Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC



Prof(a). Dr. Davi Alexandre Cardoso Ferreira (UnB) Doutor em
Ciências - UFAL
Universidade de Brasília - UnB

DEDICATÓRIA

Sabia que esse dia chegaria e que eu teria que dedicar esse trabalho a alguém. Recebi ajudas de diversas pessoas, desde os cristãos e ateus mais fanáticos aos jovens e anciãos de diversos lugares. Sinto-me privilegiado em conhecer tantas pessoas boas, independentes de credos, regiões e grau de intelectualidade. Peço desculpas aos demais, mas escolho dedicar esse trabalho ao meu orientador Fernando Cesário Rangel. O porquê é simples, talvez seja a pessoa mais próxima que lerá esse trabalho em sua totalidade. O Escolhi por ser um irmão mais velho que nunca mediu esforços para me auxiliar quando precisei. Isso vai desde as questões de conhecimento acadêmico aos assuntos burocráticos relacionados à vida acadêmica. Então está aí – FEITO ESTÁ!

AGRADEÇO,

Primeiramente a Deus, por ser o mantenedor de minha vida. A Ti seja todo o meu ser, fazer e ter.

Aos meus pais, pela boa sustentação, educação e paciência para comigo. Amo vocês de verdade.

Ao meu amigo e irmão (de sangue) Alan, por seus bons conselhos, mesmo aqueles apresentados de forma áspera, mas de imenso valor. Ajudaram-me muito!

Ao meu amigo Éden, vulgo cara de jaca, por sempre está me fazendo rir e por muitas vezes, me auxiliar com conselhos ou de forma material. Aqui também cabe o agradecimento por me livrar de gafes ou das enrascadas que você me colocou que hoje viraram piada. Valeu pelo o incentivo.

Ao meu amigo Rafael Novaes, vulgo Jabá, pelas loucuras e pela confiança. Só não agradeço por fazer parte do meu time nos casados contra solteiros (hahahaha). Espero que você case logo, para que o time dos solteiros fique mais forte.

Ao meu amigo Vinícius, vulgo babuíno, por muitas vezes ter dado conselhos em relação à vida e caronas para o futebol de sábado. Já fiz minha parte aqui, só não precisa mais cobrar a gasolina.

Ao meu amigo Paulinho, vulgo mijão, por simplesmente estar presente em vários momentos de minha vida. Você dá show!

À comunidade da igreja, em especial ao seu Albérico e dona Hilda por terem cuidado de mim de forma inteligente. Vocês tem parte nessa nova etapa de minha vida.

Ao Cláudio Paranhos e seus mil nomes por sempre ter me auxiliado e ser um amigo dentro da academia.

Aos amigos de curso, pela amizade.

À Prof. Rosenira Serpa da Cruz, pelos os conselhos colocados de forma intensa. No fundo é um doce de jiló. Obrigado!

Ao professor Salay, pela amizade e paciência ao ler e corrigir meu trabalho, auxiliando o desenvolvimento desse trabalho.

À Elaine, por ser muitas vezes o meu muro das lamentações.

À minha família, por todo apoio e cuidado.

Ao professor David, por ter aceitado fazer parte da minha banca de mestrado.

Ao meu amigo professor Fernando. Nem é preciso falar mais nada.

À CAPES, pela bolsa de mestrado!

RESUMO

Ácidos hidroxâmicos são potentes inibidores das enzimas histonas deacetilase e anidrase carbônica. A inibição dessas enzimas tem mostrado atividades contra diversos tipos de patologias e doenças. Nesse trabalho, temos investigado por ancoragem molecular e dinâmica molecular a atividade inibitória de betaínas hidroxâmicas, um grupo de moléculas de estrutura similar aos ácidos hidroxâmicos, sobre as enzima histona deacetilase (HDAC) e anidrase carbônica (AC). Os estudos apontaram resultados promissores, pois além da interação do grupo hidroxamato com o cofator metálico da HDAC e da AC (Zn^{2+}), o grupo das betaínas interagiu com grupos eletronegativos no sítio ativo de ambas as enzimas, mostrando fortes atrações coulombianas, resultando numa maior interação com essas metaloenzimas. Os estudos de ancoragem molecular e dinâmica molecular também revelaram que as betaínas hidroxâmicas podem estar em equilíbrio, interagindo com grupos eletronegativos do sítio ativo da HDAC ou da cavidade adjacente a esse sítio ativo.

Ácidos Hidroxâmicos, Betaínas Hidroxâmicas, inibição da HDAC, inibição da AC, Ancoragem Molecular, Dinâmica Molecular

ABSTRACT

Hydroxamic acids are potent inhibitors of histone deacetylases (HDAC) and carbonic anhydrases (CA). The inhibition these enzymes have showed activities against several pathologies and diseases. Therefore, We have studied the inhibitor activities of hydroxamic betaines on HDAC and CA by *in silico* essay of molecular docking and molecular dynamics. The studies reveal promising results, because betaines hydroxamics complex the Zn^{2+} , the cofactor of enzymes HDAC and AC, and interact with electronegatives groups in active site these enzymes, showing strongers coulombic attraction, resulting in larger interaction with these enzymes. The molecular docking and molecular dynamics studies indicate that, on HDAC, betaines hydroxamics can be in equilibrium, interacting with electronegative groups of site active or adjacent cavity.

Hydroxamic acids, hydroxamic betaines, HDAC inhibition, AC inhibition, molecular docking, molecular dynamics

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação dos ângulos diedrais.....	13
Figura 2 – Sítio ativo da metaloenzima AC.....	24
Figura 3 - Interação de um ácido hidroxâmico -HDAC.....	27
Figura 4 – Inibição de ácido hidroxâmico sobre a enzima AC.....	28
Figura 5 – Orbital molecular HOMO dos ácidos hidroxâmicos e das betaínas hidroxâmicas.....	32
Figura 6 – Interação TSA-HDAC.....	37
Figura 7 – Ácidos hidroxâmicos (AH1 e AH2) e betaínas hidroxâmicas (BH1 e BH2) utilizadas nos cálculos de interação Ligante-HDAC.....	38
Figura 8 – Interação ligante-HDAC.....	39
Figura 9 – Interações dos ligantes na cavidade adjacente ao sítio ativo da metaloenzima HDAC.....	41
Figura 10 - Interação dos ligantes AH2 e BH2 no sítio ativo da HDAC	43
Figura 11 - Interações dos grupos catiônicos da BH1 no sítio ativo da HDAC.....	46
Figura 12 - TSA e as posições que foram combinadas com o grupo catiônico das betaínas....	47
Figura 13 - Interação TSA-HDAC*	49
Figura 14 - RMSD dos ligantes na interação inibidor-HDAC.....	51
Figura 15 - Interação do grupo catiônico BH1 com os resíduos Y307 e H143.....	53
Figura 16 - RMSD das interações TSA-HDAC e análogo-HDAC, com o grupo betaína na posição 5.....	54
Figura 17 - . Ligação de hidrogênio não clássica entre grupo catiônico da betaína na posição 5.....	55
Figura 18 - Repulsões da interação BH2-AC.....	56

Figura 19 - Repulsão eletrônica do cofator metálico Zn^{2+} e o grupo catiônico da BH1.....	57
Figura 20 - Ligação de hidrogênio não clássica do tipo $N^+C-H\cdots O^-$ com o aminoácido THR 200.....	58
Figura 21 - N-(hidroxi)-benzamida. As betaínas hidroxâmicas foram inseridas nas posições orto (<i>o</i>), para (<i>p</i>) e meta (<i>m</i>) do ligante.....	59
Figura 22 - Ligações de hidrogênio não clássica do tipo $N^+C-H\cdots O^-$ da interação <i>m</i> -betaína-N- (hidroxi)-benzamida-AC.....	60
Figura 23 - RMSD dos ligantes na interação inibidor-AC.....	62
Figura 24 - RMSD da N-hidroxi-benzamida e das betaínas derivadas no processo de inibição da AC.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Energias dos orbitais HOMO dos ligantes.....	32
Tabela 2 - Carga dos átomos dos ligantes AH1, BH1, AH2 e BH2.....	33
Tabela 3 - Energia livre de Gibbs ($kcal.mol^{-1}$) teórica e experimental da interação TSA- HDAC.....	36
Tabela 4 - Valores de menor energia das conformações geradas nos cálculos de ancoragem molecular da interação ligante-HDAC.....	38
Tabela 5 - Valores da energia de interação entre o TSA combinado com betaína e HDAC.....	47
Tabela 6 - Energia potencial média das interações AH2-HDAC e BH2-HDAC no sítio ativo e na cavidade adjacente da HDAC.....	52
Tabela 7 - Valores de menor energia das conformações geradas nos cálculos de ancoragem molecular da interação ligante-AC.....	55

Tabela 8 - Valores da interação das N-(hidroxi)-benzamida-AC combinadas com o grupo catiônico das betaínas.....59

LISTAS DE SIGLAS E ABREVIATURAS

6-31G++(d,p) Seis gaussianas para o orbital 1s, 3 gaussianas para os orbitais mais internos 2s e 2p, uma gaussianas para os orbitais mais externos 2s e 2p, uma função difusa para os átomos pesados, uma função difusa para os hidrogênios, uma função polarização para os átomos pesados e uma função polarização para os átomos de hidrogênio.

AC Anidrase Carbônica

ADN Ácidos Desoxirribonucleicos

AKT Proteína Quinase B

AMBER Assisted Model Building with Energy Refinement

ATB Automated Topology Builder

B3LYP Becke, três parâmetros Lee, Yang, Parr

DFT Teoria do Funcional de Densidade

DM Dinâmica Molecular

FDA Food and Drug Administration

GPI glicosilfosfatidilinositol

HDAC Histona Deacetilase

HOMO High Occupied Molecular Orbital

LUMO Low Unoccupied Molecular Orbital

PME Particle Mesh Ewald

RMSD Root Mean Square Deviation

Rpd3 reduced potassium dependency

SAHA Suberonalyde Hydroxamica Acid

Sir Silent Information Regulation

TSA Trichostatin A

SUMÁRIO

RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUÇÃO	1
2. MÉTODOS	5
2.1. DFT	5
2.1.1. Teoremas de Hohenberg e Kohn	6
2.2. Dinâmica Molecular	8
2.2.1. Mecânica Molecular	11
2.2.2. Algoritmo de Verlet	14
2.3. Ancoragem Molecular	16
3. INIBIÇÃO DAS METALOENZIMAS HDAC e AC	17
3.1. As enzimas e enzimas dependentes do Zn²⁺	17
3.2. Histonas Deacetilase (HDAC)	19
3.2.1. Inibição das HDACs	21
3.3. Anidrase Carbônica (ACs)	22
3.3.1. Inibição das ACs	25
3.4. Ácidos Hidroxâmicos como inibidores das enzimas HDAC e AC	26
4. OBJETIVOS	28
4.1. Objetivo Geral	28
4.2. Objetivos Específicos	28
5. JUSTIFICATIVAS	29
6. METODOLOGIA	29
6.1. Otimização da Geometria dos Ligantes	29

6.2. Ancoragem molecular com ligante coordenado ao metal.....	29
6.3. Dinâmica Molecular.....	31
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
7.1. Estudos de Ancoragem Molecular da interação de ligantes com a HDAC.....	35
7.1.1. Validação.....	35
7.1.2. Interações na cavidade adjacente ao sítio ativo da HDAC.....	40
7.1.3. As estruturas AH2 e BH2 podem apresentar um equilíbrio, ora no sítio ativo, ora na cavidade adjacente de 14 Å.....	42
7.1.4. Relação do tamanho da estrutura e energia de interação.....	44
7.1.5. Comparação da energia de interação AH-HDAC e BH-HDAC.....	45
7.1.6. Análise de betaínas hidroxâmicas derivadas do TSA.....	46
7.1.7. Estudos de Dinâmica Molecular das HDAC.....	50
7.1.7.1. Comparação de Estabilidade.....	50
7.1.7.2. Interações BH-HDAC.....	52
7.1.7.3. Análise da DM do TSA e a betaína hidroxâmica análoga, com grupo catiônico na posição 5.....	54
7.2. Estudo das interações inibidor-AC.....	55
7.2.1. Análise das betaínas hidroxâmicas derivadas da N-(hidroxi)-benzamida.....	58
7.2.2. Estudos de Dinâmica Molecular da Interação inibidor-AC.....	60
7.2.2.1. Comparação de estabilidade.....	60
7.2.2.2. Interações inibidor-AC.....	62
7.2.2.3. Análise de Dinâmica Molecular para os análogos da N-Hidroxi-Benzamida.....	62

8. CONCLUSÕES.....	65
9. REFERÊNCIAS.....	66

1. INTRODUÇÃO

O interesse pelo estudo de enzimas tem se expandido sem precedente devido suas várias aplicações na pesquisa básica e na indústria. Como as enzimas são fundamentais para a atividade catalítica no metabolismo, a comunidade biomédica tem intensamente focado a pesquisa aos seus estudos, tornando-as como o alvo mais comum para a intervenção terapêutica nas indústrias de seguimento farmacêutico (COPELAND, 2000).

Estruturalmente, as enzimas possuem um sulco ou um entalhe que funciona como um sítio catalítico, denominado de sítio ativo. Nessa região, os aminoácidos estão eletronicamente organizados para interagirem com o substrato, que possui uma equivalência geométrica, além de uma disposição eletrônica compatível ao sítio ativo da enzima (VOET et.al., 2011; NELSON et.al., 2013). No entanto, a grande maioria das enzimas, para que sejam biocataliticamente ativas, necessitam de cofatores. Dentre essas enzimas, cerca de um terço apresentam cofatores inorgânicos, ou seja, são dependentes de íons metálicos para desenvolvimento da atividade catalítica no organismo (ELLIS, 2006).

Em meio a esses cofatores inorgânicos, tem-se observado um número muito elevado de enzimas que são dependentes do íon Zn^{2+} (McCALL, et. al. 2000). O zinco não apresenta uma reatividade química ou potencial químico excepcional, quando comparado aos demais elementos do bloco d do mesmo período (COTTON & WILKINSON, 1988). Porém, diferentemente dos outros íons metálicos do mesmo período, o Zn^{2+} possui o orbital $3d^{10}$ preenchido, conferindo-o um alto grau de estabilidade, tornando-o inerte às reações redox em meio biológico (COTTON & WILKINSON, 1988; McCALL et.al. 2000; VALLE et. al. 1990). Esse orbital preenchido confere ao Zn^{2+} propriedades Físico-químicas que são importantes para o meio biológico (VALLE et. al. 1990).

Uma dessas propriedades é que o íon Zn^{2+} é estável em reações redox em meio biológico. Essa propriedade torna o Zn^{2+} um cofator ideal para as biocatálises do tipo ácido-

base em meios que a espécie química necessita ser estável às reações redox. Além disso, devido o íon Zn^{2+} possuir o orbital $3d^{10}$, confere a este cofator metálico uma energia de estabilização de campo ligante igual a zero (HUHEEY, 1993). Logo, para todas as geometrias possíveis ao Zn^{2+} , não há uma geometria inerentemente mais estável que a outra (McCALL, 2000).

Essas propriedades conferem ao Zn^{2+} uma natureza entática (VALLE et. al. 1973; McCALL et. al. 2000). Tal natureza entática pode ser utilizada como uma habilidade do íon Zn^{2+} na catálise ácido-base de Lewis (McCALL et.al. 2000). Um exemplo dessa possibilidade é o mecanismo de catálise da carboxipeptidase A (BARBER et. al. 1970). Nesse mecanismo, o ligante se liga ao íon Zn^{2+} tetracoordenado, conferindo um intermediário pentacoordenado para os processos catalíticos. Por outro lado, as metaloenzimas dependentes do Zn^{2+} podem sugerir um mecanismo diferente, como na anidrase carbônica dependente do Zn^{2+} (McCALL, 2000). Neste, a função do cofator Zn^{2+} é aumentar a acidez da água que coordena esse cofator e, conseqüentemente, aumentar a taxa de reação.

O íon Zn^{2+} pode ser encontrado na natureza coordenado a quatro, cinco ou seis ligantes. Todavia, o número de enzimas com o íon Zn^{2+} tetracoordenado é excepcionalmente maior. E ainda, o íon Zn^{2+} apresenta um alto produto de dissociação nas reações de catálise ácido-base, indicando altas velocidades de mudanças em substratos (COTTON et. al. 1988). Tal propriedade torna o íon Zn^{2+} um cofator bem adaptado a essas biocatálises (McCALL, 2000).

Atualmente, são conhecidas mais de 300 enzimas dependentes do íon Zn^{2+} . Nesse sentido, a indústria farmacêutica tem largamente estudado mecanismos de inibição ou ativação de metaloenzimas dependentes do íon Zn^{2+} para fins farmacológicos. A anidrase carbônica (AC), por exemplo, esta associada a diversos processos fisiológicos e patológicos. Atualmente, sabe-se que a inibição da AC tem atividade diurética e antiglaucoma.

Recentemente, tem-se descoberto que a inibição dessa metaloenzima pode conduzir a atividades contra a obesidade (SCOZZAFAVA, et. al. 2013), o câncer (SCOTT, et. al. 2016) e possuir ação anti-infeccivas (CAPASSO, et. al. 2013). Por outro lado, a ativação da AC tem pode prover atividade contra o mal de Alzheimer (SUPURAN, 2008).

A ACs são uma família de metaloenzimas presentes em procariontes e eucariontes que catalizam uma simples, mas fundamental reação química no organismo – a interconversão de CO_2 e bicarbonato. As ACs podem ser classificadas como: α -ACs (presentes em vertebrados, bactérias, algas e citoplasmas de plantas verdes); β -ACs (predominantemente em bactérias, algas e citoplasmas de monocotiledôneos e dicotiledônios); γ -ACs (presentes em algumas bactérias e principalmente em arqueas); δ -ACs e ε -ACs (presente em alguns diatomáceas marinhas); e η -ACs (presente em alguns protozoários) (SUPURAN, 2016). Em todas essas classes de metaloenzimas é essencial o uso de íons metálicos como cofatores (Fe^{2+} , Cd^{2+} ou Zn^{2+}) sendo que o íon Zn^{2+} esta presente na maioria das classes (LIONETTO et. al. 2012).

Outra metaloenzima dependente do íon Zn^{2+} largamente explorada em pesquisas é a histona deacetilase (HDAC). As HDACs estão envolvidas diretamente nos processos de expressão gênica. Conseqüentemente, tem-se investido tempo nos estudos da inibição dessa enzima no desenvolvimento de fármacos com atividade antitumorais (PAN et. al., 2007). Além disso, ensaios *in vitro* e *in vivo* tem mostrado que a inibição das HDACs tem ação neuroprotetiva, mostrando atividade contra o mal de Alzheimer e mal de Parkinson, entre outras doenças neurodegenerativas (MENG et. al., 2014). Alguns estudos também revelaram que a inibição da HDAC tem atividades antiparasídicas (ANDREWS et. al., 2012).

As HDACs catalisam a deacetilação nas lisinas de proteínas histonas. Esse processo de deacetilação das histonas na cromatina é fundamental nos processos de transcrição e outras funções da célula (LOMBARDI et. al., 2011). O mecanismo de deacetilação das proteínas histonas induz ao silenciamento dos genes, atuando como um complexo de repressão

transcricional (ROPERO et. al., 2007). A família das HDACs pode ser dividida em quatro classes, que são baseadas em suas homologias, sendo que a classe I (HDACs 1, 2, 3 e 8), a classe II (HDACs 4, 5, 6, 7, 9 e 10) e a classe IV (HDAC 11) são enzimas dependentes de íons M^{2+} , sendo o íon Zn^{2+} em sua grande maioria (LOMBARDI et. al., 2011).

As metaloenzimas ACs e HDACs, que possuem o cofator Zn^{2+} catalítico, apresentam um sítio ativo característico: o cofator metálico Zn^{2+} é coordenado por três cadeias laterais de aminoácidos da apoenzima e uma molécula de água (McCALL et.al, 2000; LAITAOJA, et. al., 2013). Nesse sentido, como as ACs e HDACs possuem um sítio ativo com características parecidas, existem moléculas podem inibir tanto as ACs quanto as HDACs, como os ácidos hidroxâmicos.

Os ácidos hidroxâmicos são potentes inibidores das ACs e HDACs e constituem uma das mais importantes famílias de bioligantes. Essas estruturas podem ser representadas pela fórmula geral $RCONR'OH$, onde R e R' pode ser um grupo alquila, arila entre outros e são ácidos muito mais fracos quando comparado aos ácidos carboxílicos. O mecanismo geral de inibição desse grupo de bioligantes geralmente acontece da seguinte forma: o grupo hidroxamato dos ácidos hidroxâmicos atua como um ligante bidentado, ligando-se ao íon Zn^{2+} catalítico formando uma geometria trigonal bipiramidal distorcida (GUPTA et. al. 2013).

O desenvolvimento de fármacos pode surgir por meio de experimentos com produtos naturais ou sintéticos que tenham similaridade com compostos com reconhecida atividade para outras doenças ou através de alvos metabólicos específicos. A reconhecida atividade dos derivados de ácidos hidroxâmicos na inibição de HDAC e AC podem servir como base para o desenvolvimento de inibidores mais potentes dessas enzimas. Não obstante, betaínas hidroxâmicas podem apresentar um maior efeito farmacológico, quando comparado aos ácidos hidroxâmicos.

As betaínas hidroxâmicas possuem uma fórmula geral $(R^1)(R^2)(R^3)N^+(R^4)CONHO$, onde (R^1) , (R^2) e (R^3) podem ser um grupo hidroxialquila, composto de 1 à 4 átomos de carbono ou um grupo de hidrocarbonetos monovalente, possuindo de 1 à 25 átomos de carbono, ou formam juntos um grupo de hidrocarbonetos bivalente, possuindo 4 ou 5 átomos de carbono. Já R^4 é um grupo bivalente que possui não mais do que 25 átomos de carbono e pode ser substituído, metileno, etileno propileno ou butileno (EVANS, 1977).

Analisando a estrutura das betaínas hidroxâmicas, elas reúnem características similares aos ácidos hidroxâmicos, o que é favorável para a formação de análogos com o mesmo mecanismo de inibição. Todavia, pode ser favorecida a atração coulombiana devido o grupo das betaínas poderem interagir com grupos eletronegativos no sítio ativo dessas metaloenzimas. Para o estudo desses processos, a Química Computacional tem um papel fundamental na avaliação dessas propriedades.

2. MÉTODOS

2.1 DFT

A teoria do funcional de densidade, do inglês density function theory (DFT), tornou-se um importante método para o estudo de estrutura eletrônica de sólidos e moléculas. O atrativo para o uso do DFT no estudo desses sistemas consiste na precisão química aceitável, muitas vezes apresentando resultados mais próximos ao experimental do que os métodos *ab initio* Hartree-Fock e pós Hartree-Fock, com um custo computacional menor quando comparado a esses métodos tradicionais (DUARTE et. al. 2007).

O método DFT faz uso da densidade eletrônica $-\rho(r)$ – como uma variável básica para a descrição do sistema eletrônico. A legitimação rigorosa do uso dessa variável básica foi dada à partir dos dois teoremas de Hohenberg e Kohn, que posteriormente forneceu os fundamentos básicos da teoria do funcional de densidade moderno. O formalismo de

Hohenberg e Kohn possibilitou a descrição de conceitos químicos importantes tais como o potencial químico, maciez e dureza, além dos princípios de ácidos e bases moles e duros de Pearson, e o da equalização da eletronegatividade de Sanderson, definidos de uma maneira exata à partir da teoria do funcional da densidade (DUARTE et. al. 2007)

2.1.1. Teoremas de Hohenberg e Kohn

O Hamiltoniano de um sistema eletrônico molecular – com M núcleos e N elétrons – na aproximação de Bohr-Oppenheimer, desprezando-se os efeitos relativísticos, é dado, em unidades atômicas por:

$$\mathbf{H}_{BO} = -\sum_i^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{0A}^M \sum_i^N \frac{Z_A}{|R_A - r_i|} + \sum_{i < j}^N \sum_j^N \frac{1}{|r_i - r_j|} + \sum_{B < A}^M \sum_A^M \frac{Z_A Z_B}{|R_A - R_B|} \quad (eq. 1)$$

onde i e j representam os elétrons; A e B representam os núcleos atômicos; r_i e R_A representam as coordenadas do elétron i e do núcleo A respectivamente; e Z_A o número atômico de A . Nessa equação, o primeiro termo corresponde ao operador de energia cinética (\mathbf{T}); o segundo termo corresponde ao potencial externo relacionado aos elétrons (\mathbf{U}), tal que: $\sum_A^M \sum_i^N -\frac{Z_A}{|R_A - r_i|} = \sum_i^N v(r_i)$; o terceiro termo corresponde ao operador repulsão elétron-elétron (\mathbf{V}_e), o qual inclui a repulsão coulombiana e todos os termos não-clássicos (correlação e troca) e o último termo é referente a repulsão dos núcleos.

Partindo do princípio que a densidade eletrônica é definida por essa equação:

$$\rho(r) = \int \dots \int \Psi(r_1, r_2, \dots, r_n)^* \Psi(r_1, r_2, \dots, r_n) dr_1 dr_2 \dots dr_N \quad (eq. 2)$$

sendo que $\Psi(r_1, r_2, \dots, r_n)$ é a solução fundamental do Hamiltoniano.

A energia total do sistema é dada por:

$$E_0 = \int \Psi(r_1, r_2, \dots, r_n)^* \mathbf{H}_{BO} \Psi(r_1, r_2, \dots, r_n) dr_1 dr_2 \dots dr_N = \langle \Psi | \mathbf{H}_{BO} | \Psi \rangle \quad (eq. 3)$$

O potencial externo pode ser separado em um funcional trivial da densidade eletrônica, portanto a energia total pode ser descrita da seguinte forma:

$$E_0 = \langle \Psi | \mathbf{T} + \mathbf{V}_e | \Psi \rangle + \int \rho(r) v(r) dr \quad (eq. 4)$$

Logo, é perceptível que o número de elétrons, N , e o potencial externo em que estes se movem definem completamente o sistema de muitos elétrons, ou seja, o Hamiltoniano do sistema. Tais definições conduzem aos teoremas de Hohenberg-Kohn, onde o primeiro teorema diz que o potencial externo é um funcional único de $\rho(r)$ além de uma constante aditiva. Isso implica que a densidade eletrônica de um sistema define o potencial externo e o número de elétrons, N , e conseqüentemente o Hamiltoniano do sistema. Sabendo que a energia do sistema é calculada a partir da equação de Schrödinger ($\mathbf{H}_{BO} \Psi = E \Psi$), a energia do sistema eletrônico é determinada pela densidade eletrônica $\rho(r)$, ou seja,

$$E = E_v[\rho] \quad (eq. 5)$$

Onde E_v é dependente do potencial externo.

.

O segundo teorema de Hohenberg-Kohn estabelece que havendo qualquer aproximação da densidade eletrônica ($\sim \rho$), de modo que $\sim \rho \geq 0$ e $\int \sim \rho(r) dr = N$, a energia

total será sempre maior ou igual a energia exata do sistema, ou seja, $E[\sim\rho] \geq E[\rho] = E_0$. Disso pode ser definido um funcional universal $F[\rho] = \langle \Psi | \mathbf{T} + \mathbf{V}_e | \Psi \rangle$, devido \mathbf{T} e \mathbf{V}_e serem aplicados à todos os sistemas universais.

Os dois teoremas conduzem ao princípio fundamental da teoria do funcional de densidade

$$\delta\{E_v[\rho] - \mu[\int \rho(r)v(r)dr - N]\} = 0 \quad (eq.6)$$

Onde μ (multiplicador de lagrange) é o potencial químico dos elétrons.

2.2 Dinâmica Molecular

A dinâmica molecular (DM) é uma das mais importantes ferramentas para o estudo de sistemas moleculares, onde os efeitos de temperatura não podem ser desconsiderados. Embora a DM convencional clássica sejam representações ou aproximações de potenciais quânticos, ou seja, os efeitos quânticos são desconsiderados, vários resultados experimentais podem ser obtidos a partir dessa metodologia (MARTINEZ et. al. 2007).

A dinâmica de uma partícula de massa m pode ser obtida através da equação de Schrödinger dependente do tempo (eq 7), que descreverá a probabilidade de encontrar uma partícula no espaço x, y, z , em um instante t .

$$-\frac{\hbar^2}{2m}\nabla^2\Psi(x, y, z, t) + V(x, y, z, t)\Psi(x, y, z, t) = i\hbar\frac{\partial}{\partial t}\Psi(x, y, z, t) \quad (eq.7)$$

Atualmente, existe uma limitação em relação ao tempo que não permite a resolução dessa equação para sistemas com milhares de átomos. Contudo, se os potenciais forem explicitamente dependentes do tempo, a função de onda pode ser separada em sua parte

dependente do tempo e sua parte espacial, podendo ser escrita da seguinte forma:

$\Psi(x, y, z, t) = \varphi(x, y, z)f(t)$, onde a parte independente do tempo toma a seguinte forma:

$$-\frac{\hbar^2}{2m}\nabla^2\varphi(x, y, z) + V(x, y, z)\varphi(x, y, z, t) = E\varphi(x, y, z) \quad (\text{eq. 8})$$

Onde E é a energia associada a cada solução $\varphi(x, y, z)$ da equação.

A equação de Schrödinger para um sistema formado por elétrons e núcleos e independente do tempo pode ser escrito compactamente da seguinte por

$$H\phi = E\phi \quad (\text{eq. 9})$$

Tal que ϕ é uma função de onda independente do tempo para o sistema molecular inteiro e o operador Hamiltoniano (H), em unidades atômicas, é definido como:

$$H = -\sum_i^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{A=1}^M \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{A=1}^M \sum_{B>A}^M \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad (\text{eq. 10})$$

Nessa equação, N representa o número de elétrons, M o número de núcleos, Z_A é a carga do núcleo A, r_{ia} é a distância entre núcleos e elétrons, r_{ij} é a distância elétron-elétron, R_{AB} é a distância entre os núcleos e M_A é a massa atômica dos núcleos. O alto custo computacional de um cálculo de dinâmica das partículas é proveniente dos graus de liberdade eletrônicos. Todavia, devido a cinética dos elétrons ser muito maior do que a dos núcleos, a função de onda dos elétrons pode ser desacoplada da função de onda dos núcleos, o que está de acordo com a aproximação Bohr-Oppenheimer (MARTINEZ et. al. 2007). Nessa aproximação, a função de onda é separada em sua parte nuclear e sua parte eletrônica, sendo que a função de onda dos elétrons é calculada assumindo os núcleos pontuais. A partir disso, o

Hamiltoniano pode ser simplificado pela eliminação da energia cinética dos núcleos (segundo termo) e o termo associado a repulsão nuclear (último termo) que é constante para uma geometria fixa. Assim, o Hamiltoniano pode ser definido de forma puramente eletrônica,

$$H_{ele} = -\sum_i^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} \quad (eq. 11)$$

Associado à equação de Schrödinger para os elétrons.

$$H_{ele} \phi_{ele} = E_{ele} \phi_{ele} \quad (eq. 12)$$

Em conjunto ao princípio de anti-simetria de Pauli, através dessa equação é possível calcular uma superfície de energia potencial gerada pela presença dos elétrons para cada posição dos núcleos. Essa energia potencial somada à repulsão eletrostática entre os núcleos compõe a energia potencial total do sistema.

Para os núcleos, a aproximação Bohr-Oppenheimer define um novo Hamiltoniano. O termo referente à energia cinética dos núcleos é tratado explicitamente. Já a interação elétron-elétron e núcleo-elétron podem ser extraídos da superfície de energia potencial dos elétrons, calculada pela equação de Schrödinger eletrônica. E por fim, a repulsão entre os núcleos é tratada explicitamente, levando ao Hamiltoniano efetivo:

$$H_{nuc} = -\sum_{A=1}^M \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2 + \left\langle -\sum_i^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} \right\rangle + \sum_{A=1}^M \sum_{B>A}^M \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad (eq. 13)$$

O segundo termo da eq. 13 $\langle H_{ele} \rangle$ está correlacionado à superfície de energia potencial gerada pelos elétrons, assumindo núcleos estáticos e pontuais. Como o potencial gerado pelos elétrons e a repulsão nuclear são constantes nessa equação, o Hamiltoniano nuclear pode ser simplificado, sendo escrito da seguinte forma:

$$H_{nuc} = - \sum_{A=1}^M \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2 + \varepsilon_{tot} \quad (eq. 14)$$

Em que $-\sum_{A=1}^M \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2$ é a energia total associada à conformação dos núcleos, podendo ser usada como um potencial para o movimento nuclear, enquanto ε_{tot} pode ser obtido de um cálculo quântico *ab-initio* ou semi-empírico tradicional. Dadas as superfícies de energia potencial gerada pelos elétrons e as repulsões nucleares, as forças que agem sobre cada núcleo podem ser calculadas, podendo ser utilizadas para propagar as trajetórias dos núcleos em um intervalo de tempo pequeno, nos quais as posições dos núcleos variem pouco.

A dinâmica molecular de um sistema, mesmo com a utilização da aproximação Bohr-Oppenheimer, é custoso do ponto de vista computacional. Nesse sentido, o termo ε_{tot} na DM convencional é aproximado por potenciais analíticos, que são viáveis computacionalmente. O termo de repulsão nuclear consiste apenas no potencial coulômbiano. No entanto, diferentes funções são utilizadas para a representação das superfícies de energia potencial gerada pelos elétrons, e dependem do tipo de interação envolvida.

2.2.1. Mecânica Molecular

A mecânica molecular faz uso do modelo matemático que considera os núcleos como bolas que se mantêm unidos por molas. A soma da energia do sistema molecular geralmente é descrito como a soma das energias potenciais intramoleculares (ligação, angular e torção) e intermoleculares (não ligados). Esse método tem sido muito utilizado em estudos de biomoléculas e tem sido aplicado na DM convencional para gerar as forças que atuam sobre as moléculas e, conseqüentemente, calcular seus movimentos (LEWIS, 2011).

A energia potencial de uma molécula, do ponto de vista da mecânica molecular, pode ser escrito da seguinte forma:

$$E = \sum V_{\text{ligação}} + \sum V_{\text{angular}} + \sum V_{\text{torção}} + \sum V_{\text{não-ligado}} \quad (\text{eq. 15})$$

Onde os três primeiros termos da equação são referentes à contribuição da energia potencial do estiramento de ligação, dobramento angular e aos movimentos torcionais (rotação), respectivamente. O quarto termo da equação está correlacionado com a interação entre átomos ou grupos que não estão diretamente ligados. Essa soma da energia potencial é dada sobre todas as ligações, todos os ângulos definidos por três átomos A-B-C, todas as torções definidas por quatro átomos A-B-C-D, e todos os pares das interações dos grupos não ligados diretamente. O delineamento matemático associado com a parametrização consiste num campo de força representativo para os cálculos de mecânica molecular.

Em termos mais específicos, os quatro termos podem ser interpretados da seguinte forma:

O termo de ligação obedece à equação 15. O aumento da energia, quando a ligação sofre um estiramento, é proporcional ao quadrado da extensão, onde:

$$\Delta E_{\text{stretch}} = k_{\text{stretch}}(l - l_{eq})^2 \quad (\text{eq. 16})$$

k é a constante de proporcionalidade e quanto maior o valor dessa constante, maior é a resistência da ligação; l é a distância da ligação quando esticada; l_{eq} é a distância de equilíbrio.

O termo referente à energia angular considera os átomos sequencialmente ligados A-B-C, associado a uma unidade triatômica. O sistema é representado com o modelo bola-mola-bola-mola-bola-mola e o aumento da energia é proporcional ao quadrado do aumento do ângulo e são análogos à equação 16:

$$E_{\text{bend}} = k_{\text{bend}}(a - a_{eq})^2 \quad (\text{eq. 17})$$

Onde k é a constante de proporcionalidade da energia potencial angular; a é o termo que está associado ao valor do ângulo distorcido; e a_{eq} é o termo referente ao ângulo na distância de equilíbrio.

O termo de energia potencial torcional é originado de uma unidade de quatro átomos A-B-C-D, em que o ângulo de torção do sistema é o ângulo entre a ligação A-B e a C-D, visualizada mediante a ligação B-C (figura 1). A equação referente ao termo da energia potencial torcional é calculada mediante a combinação de funções seno e cosseno, o que reproduzirá a curva:

$$E_{torsion} = k_0 + \sum_{r=1}^n k_r [1 + \cos(r\theta)] \quad (eq.17)$$

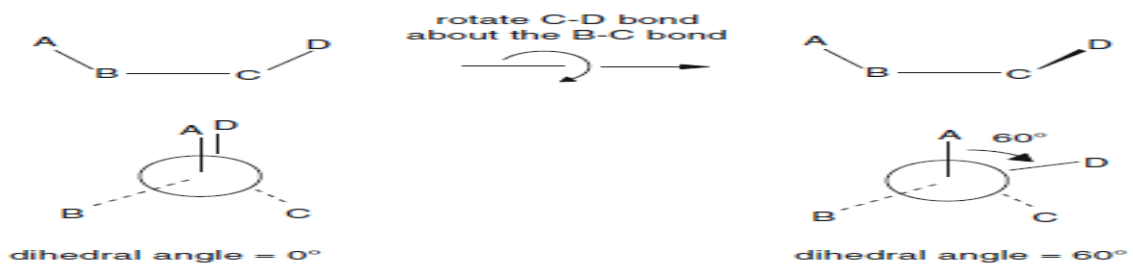


Figura 1. Representação dos ângulos diedrais (LEWIS, 2011)

O último termo da equação descreve a energia potencial de átomos não ligados diretamente. A energia potencial do termo não ligado pode ser aproximado pelo potencial de Lennard-Jones 12-6, que é descrito da seguinte forma:

$$E_{nonbond} = k_{nb} \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] \quad (eq.18)$$

Onde r é a distância entre os centros não ligados de átomos ou grupo de átomos. A equação de Lennard-Jones 12-6 descreve os potenciais associados à dispersão e repulsão. Geralmente, os

termos associados à atração eletrostática também são considerados e a equação é descrita como:

$$E = \sum \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}} \quad (\text{eq. 19})$$

Onde q_i e q_j são os termos correspondentes às cargas dos átomos; ϵ descreve a permissividade no vácuo e r é a distância dos átomos.

2.2.2. Algoritmo de Verlet

Na MD é calculada a força \mathbf{F}_i que atua sobre cada partícula i a partir da derivada da função energia potencial $\mathbf{E}(\{\mathbf{r}_i\})$ que descreve a interação entre as partículas, em relação a sua posição r_i : $\mathbf{F}_i = - \partial \mathbf{E}(\{\mathbf{r}_i\}) / \partial \mathbf{r}_i$ sendo $i = 1, 2, 3, \dots$ até N , o número total de partículas do sistema.

Se a força que atua sobre uma partícula i é dividida pela massa, tem-se que:

$$a_i = \frac{F_i}{m_i} \quad (\text{eq. 20})$$

Considerando, da física clássica que:

$$a = \frac{d^2 r}{dt^2} \quad (\text{eq. 21})$$

É possível descrever o movimento das partículas em determinado tempo t . Logo:

$$\frac{d^2 r}{dt^2} = \frac{F_i(t)}{m_i} \quad (\text{eq. 22})$$

Partindo do princípio do algoritmo de Verlet, se a posição do centro de massa de uma molécula i no tempo t é $r_i(t)$, as posições nos tempos $t \pm \delta t$ são dadas por uma expansão de Taylor ao redor de $r_i(t)$:

$$r_i(t + \delta t) = r_i(t) + \delta t \frac{dr}{dt} + \frac{\delta t^2}{2!} \left(\frac{d^2 r}{dt^2} \right) + \frac{\delta t^2}{3!} r_i(t) + v \delta t^4 \quad (eq.23)$$

$$r_i(t - \delta t) = r_i(t) - \delta t \frac{dr}{dt} + \frac{\delta t^2}{2!} \left(\frac{d^2 r}{dt^2} \right) - \frac{\delta t^2}{3!} r_i(t) + v \delta t^4 \quad (eq.24)$$

Se somadas as duas equações (23 e 25), tomando em conta a eq. 22 obter-se-à uma equação aproximada:

$$r_i(t + \delta t) \cong -r_i(t - \delta t) + r_i(t) + \frac{\delta t^2}{m} F_i(t) \quad (eq.25)$$

As velocidades não aparecem explicitamente nas equações que determinam as trajetórias e estas precisam ser conhecidas no cálculo de energia cinética. Ao subtrair a eq.24 da eq.23, obtem-se a velocidade, tal que:

$$\frac{dr}{dt} \cong \frac{1}{2\delta t} [r_i(t + \delta t) - r_i(t - \delta t)] \quad (eq.26)$$

Na simulação por MD resolve-se portanto as equações de movimento de Newton para cada partícula e em cada incremento no tempo δt . A avaliação das forças para obtenção das acelerações, é em geral o processo mais dispendioso computacionalmente e o tempo gasto no cálculo dessas forças depende da complexidade da função de energia potencial de interação entre as partículas. Em sistemas moleculares as funções potenciais mais realistas são compostas de diversos termos. Na MD são tomadas as derivadas espaciais de cada termo e somadas para se obter a força resultante e a aceleração, sobre cada átomo e a cada novo conjunto de coordenadas. As acelerações são inseridas no algoritmo de Verlet, ou em um similar, para a predição das novas posições e em seguida o processo se repete (MARTINZ et.al., 2007).

A cada passo da dinâmica as forças são reavaliadas. Este processo iterativo sobre um elevado número de átomos impõe que a função para a energia potencial seja baseada em um compromisso entre precisão e simplicidade. Ela deve ser complexa o suficiente para uma análise acurada e realista da estrutura e da dinâmica do sistema e, ao mesmo tempo, simples o suficiente para que os cálculos sejam efetuados com rapidez e baixo custo computacional, possibilitando que a evolução temporal do sistema seja longa o bastante para uma significativa amostragem do espaço de configurações (MENDEZ, 2012).

2. 3. Ancoragem Molecular

A ancoragem molecular é um método que antecipa uma favorecida orientação de um ligante sobre uma molécula receptora (macromolécula), com o objetivo de criar um complexo estável (CHAUDHARY et. al. 2016). Por buscar uma predição da interação das interações ligante-macromolécula, esse método tem sido largamente utilizado no desenvolvimento de fármacos (MENG, et. al. 2011). O processo de ancoragem molecular envolve dois passos básicos: predição da conformação do ligante, bem como a orientação e posição dentro do sítio da macromolécula, e a atribuição da afinidade do ligante com a macromolécula (MENG, et. al. 2011).

As primeiras propostas para o ancoramento molecular eram baseados na teoria chave-fechadura de fischer, onde os ligantes eram considerados as chaves e a macromolécula receptora era considerada a fechadura (KUNTZ et. al. 1982). Contudo, com base na teoria de Koshland, na qual afirma que as proteínas sofrem ajuste induzido, o ideal seria que os processos de ancoramento molecular considerassem a flexibilidade da molécula e do ligante (MENG, et. al. 2011). Todavia, devido à limitação dos recursos computacionais, os cálculos de ancoragem molecular têm considerado a macromolécula rígida e os ligantes flexíveis (MOITESSIER et. al. 2008).

As forças de interação nos processos de ancoragem molecular geralmente são divididas em quatro classes (CHAUDHARY et. al., 2016) que são: as forças eletrostáticas, que consideram as interações dipolo-dipolo, carga-dipolo e dipolo-carga; forças eletrodinâmicas, onde consideram as interações de Van-der-Waals; as forças estéricas, causadas pela entropia; e as forças associadas ao solvente, que são as ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas.

3. INIBIÇÃO DAS METALOENZIMAS HDAC e AC

3.1. As enzimas e enzimas dependentes do Zn²⁺

O interesse pelo estudo de enzimas tem se expandido sem precedente devido suas várias aplicações na pesquisa básica e na indústria. Como as enzimas são fundamentais para a atividade catalítica no metabolismo, a comunidade biomédica tem intensamente focado a pesquisa aos seus estudos, tornando-as como o alvo mais comum para a intervenção terapêutica nas indústrias de seguimento farmacêutico (COPELAND, 2000).

A IUPAC descreve o conceito de enzima como uma macromolécula, com natureza majoritária de proteínas, que funciona como um biocatalisador (GOLDBOOK IUPAC, 2012). No entanto, existem alguns Ácidos Ribonucleicos (RNA)s que podem atuar como enzimas (VOET et. al. 2012; LEHNINGER, et. al. 2013). Em geral, as enzimas catalisam um tipo específico de reação, raramente gerando subprodutos, e possuem um alto grau de especificidade em relação às identidades de seus substratos, tanto geometricamente quanto estereoquimicamente (IUPAC, 2012; VOET et. al. 2011).

Estruturalmente, as enzimas possuem uma cavidade que funciona como um sítio catalítico, denominado de sítio ativo. Nessa região, os aminoácidos estão eletronicamente organizados para interagirem com o substrato, que possui uma equivalência geométrica, além de uma disposição eletrônica compatível ao sítio ativo da enzima (VOET et.al., 2011). No

entanto, a grande maioria das enzimas, para que sejam biocataliticamente ativas, necessitam de cofatores. Dentre essas enzimas, cerca de um terço apresentam cofatores inorgânicos, ou seja, são dependentes de íons metálicos para desenvolvimento da atividade catalítica no organismo (ELLIS, 2006).

Em meio a esses cofatores inorgânicos, tem-se observado um número muito elevado de enzimas que são dependentes do íon Zn^{2+} (McCALL, et. al. 2000). O zinco não apresenta uma reatividade química ou potencial químico excepcional, quando comparado aos demais elementos do bloco d do mesmo período (COTTON & WILKINSON, 1988). Porém, diferentemente dos outros íons metálicos do mesmo período, o Zn^{2+} possui o orbital $3d^{10}$ preenchido, conferindo-o um alto grau de estabilidade, tornando-o inerte às reações redox em meio biológico (COTTON & WILKINSON, 1988; McCALL et.al. 2000; VALLE et. al. 1990). Esse orbital preenchido confere ao Zn^{2+} propriedades Físico-químicas que são importantes para o meio biológico (VALLE et. al. 1990).

Uma dessas propriedades é que o íon Zn^{2+} é estável em reações redox em meio biológico. Essa propriedade torna o Zn^{2+} um cofator ideal para as biocatálises do tipo ácido-base em meios que a espécie química necessita ser estável às reações redox. Além disso, devido o íon Zn^{2+} possuir o orbital $3d^{10}$ preenchido confere ao íon metálico Zn^{2+} uma energia de estabilização de campo ligante igual a zero (HUHEEY, 1993). Logo, para todas as geometrias possíveis ao Zn^{2+} , não há uma geometria inerentemente mais estável que a outra (McCALL, 2000).

Essas propriedades conferem ao Zn^{2+} uma natureza entática (VALLE et. al. 1973; McCALL et. al. 2000). Tal natureza entática pode ser utilizada como uma habilidade do íon Zn^{2+} na catálise ácido-base de Lewis (McCALL et.al. 2000) Um exemplo dessa possibilidade é o mecanismo de catálise da carboxipeptidase A (BARBER et. al. 1970). Nesse mecanismo, o ligante se liga ao íon Zn^{2+} tetracoordenado, conferindo um intermediário pentacoordenado

para os processos catalíticos. Por outro lado, as metaloenzimas dependentes do Zn^{2+} podem sugerir um mecanismo diferente, como na anidrase carbônica dependente do Zn^{2+} (McCALL et. al. 2000). Aqui, a função do cofator Zn^{2+} é aumentar a acidez da água que coordena esse cofator e, conseqüentemente, aumentar a taxa de reação (McCALL et. al. 2000).

O íon Zn^{2+} pode ser encontrado na natureza coordenado a quatro, cinco ou seis ligantes. Todavia, o número de enzimas com o íon Zn^{2+} tetracoordenado é excepcionalmente maior. E ainda, o íon Zn^{2+} apresenta um alto produto de dissociação nas reações de catálise ácido-base, indicando altas velocidades de mudanças em substratos (COTTON et. al. 1988). Tal propriedade torna o íon Zn^{2+} um cofator bem adaptado a essas biocatalises (McCALL, 2000).

3.2. *Histonas Deacetilase*

Os Ácidos desoxirribonucleicos (ADN) nos cromossomos eucarióticos está fortemente ligado a um grupo de pequenas proteínas chamadas *histonas*. As histonas constituem cerca de metade da massa dos cromossomos eucarióticos, sendo a outra metade o ADN. Esse material cromossômico nucleoproteico é chamado *cromatina*. As histonas possuem um elevado conteúdo de cadeias laterais de carga positiva: cerca de 1 em cada 4 aminoácidos é ou lisina ou arginina. Cada tipo de histona pode existir em uma variedade de formas devido a modificações pós-translacionais de algumas cadeias laterais. Estas modificações podem ser acetilação, metilação, ADP-ribosilação e fosforilação. A cadeia nestas proteínas, portanto, é modulada e a sua estrutura é afetada por estas modificações (STRYER, 2011).

A acetilação reversível da histona cumpre uma função importante na regulação da expressão genética. A acetilação e deacetilação da histona são realizadas por enzimas que modificam covalentemente esta enzima introduzindo ou removendo grupos acetil. Duas famílias de enzimas deacetilase têm sido identificadas: as histonas deacetilases e a Sir (*Silent information regulator*). As duas famílias são evolutivamente conservadas (dos procariotos aos

humanos) e ambas possuem várias funções celulares não-redundantes, muitas das quais envolvidas na regulação transcricional (GROZINGER et. al., 2002).

A histona acetil-transferase e histona deacetilase são enzimas que fazem o controle antagônico da acetilação das cadeias laterais dos aminoácidos lisina das proteínas histona do ADN. Essas enzimas são subdividas em dois grupos de acordo com suas características filogenéticas e estruturais bem como pela especificidade de seu mecanismo catalítico (MARTIN et.at., 2002) A deacetilação da histona causa a suspensão da expressão de proteínas devido à condensação da cromatina. Isso se deve ao fato de que a carga positiva da lisina, quando eliminada pelo processo de acetilação da cadeia lateral da lisina, relaxa a estrutura da cromatina levando a uma acessibilidade de fatores ao ADN (MONNERET, 2005).

As histonas deacetilases são divididas em quatro classes. As classes I, II e IV utilizam o mecanismo catalítico dependente de zinco. As enzimas histona deacetilase da classe III seguem um mecanismo distinto que independe da catálise por zinco (SMITH et. al. 2009). A HDAC1 (Histona Deacetilase classe I) foi a primeira a ser identificada e caracterizada. A análise sequencial da HDAC1 revelou que se tratava de uma proteína humana homóloga da proteína de levedura Rpd3 (*reduced potassium dependency*) um conhecido regulador transcricional (GROZINGER et. al., 2002).

O mecanismo de acetilação promovida pela histona acetil-transferase envolve a transferência de um grupo acetil a partir da *acetil coenzima-A* para a cadeia lateral da lisina (SMITH et. al. 2009). O mecanismo de desacetilação envolve a hidrólise da lisina acetilada com a catálise promovida pela coordenação com o zinco da carbonila acetilada. As histonas deacetilase são enzimas que removem os grupos acetil introduzidos covalentemente pelas enzimas histonas acetil-transferases. A histona deacetilase é uma metalo-enzima capaz de promover a hidrólise dos grupos acetil-lisina. As enzimas histona acetil-transferase e histona deacetilase controlam assim o nível de acetilação das histonas.

3.2.1. Inibição das HDACs

Os inibidores de histona deacetilase são moléculas pequenas capazes de promover uma hiperacetilação da histona impedindo o silenciamento de genes ativos (MONNERET et. al., 2005). Quimicamente, os inibidores de histona deacetilase podem ser divididos em quatro grupos: ácidos graxos de cadeia curta; ácidos hidroxâmicos, peptídeos cíclicos e benzamidas (MAI et. al. 2009). O mecanismo de inibição destes compostos, com exceção dos ácidos carboxílicos, envolve a formação de complexo com o zinco no sítio ativo da enzima histona deacetilase (MAI et. al. 2009). O mecanismo de atividade do ácido butírico, entretanto, parece ser distinto uma vez que há evidências de que a inibição da enzima histona deacetilase, promovida por este ácido carboxílico seja mais complexo (COUSENS et. al. 1979).

Os inibidores de histona deacetilase têm demonstrado várias atividades tais como: indução de apoptose celular pela indução da expressão de genes apoptóticos como o gene p53, indução de morte celular pelo aumento de espécies reativas de oxigênio (“radicais livres”), indução de diferenciação celular, inibição e danos à progressão da mitose celular, etc (LI et. al. 2016; FALKENBERG et. al. 2014; EOT-HOULLIER et. al. 2008). A atividade anti-neoplásica destes compostos são muito estudadas devido à sua capacidade de induzir seletivamente a apoptose de células tumorais, tendo um efeito relativamente pequeno sobre células saudáveis.

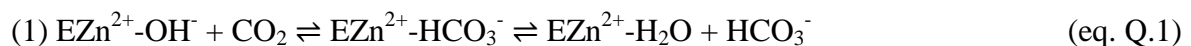
Uma série de outros processos também toma parte na atividade desta classe de compostos (desde a modulação da expressão de genes oncosuppressores, como o p53, até a inibição da angiogênese em tecidos neoplásicos). O mecanismo de indução de apoptose é bastante complexo envolvendo a atividade das enzimas caspase (HENDERSON et. al., 2003) e Akt (proteína quinase B). Alguns estudos sugerem também que o envolvimento da atividade de proteínas fosfatases no controle da apoptose (BELLAKAVADI et. al. 2007; CHEN et. al.; LIU et. al., 2006; RAMOS et. al. 2002).

A investigação de atividade farmacológica dos inibidores de histona deacetilase sobre as neoplasias motivou uma ampla investigação de sua atividade em várias patologias (LEY et. al. 1988). Estes inibidores revelaram atividade antimicrobiana, antiviral e antiparasítica (contra protozoários). De fato, foi identificada atividade contra *Leishmania*, *P. falciparum*, *Toxoplasma gondii* entre outros (ANDREWS et. al. 2012; OUASSI et. al. 2006). Já há alguns derivados do composto *apicidin*, um inibidor de histona deacetilase bastante investigado para o tratamento de malária e leishmaniose, patenteado pelo laboratório MERCK (MEINKE et. al. 2002).

3.3 Anidrase Carbônica

As anidrases carbonicas (AC, E.C. 4.2.1.1) são um grupo de metaloenzimas ubíquas, presente na maioria dos seres vivos e codificadas por seis famílias de genes não relacionadas: as α -, β -, γ -, δ -, ϵ -, ζ - e η - CAs. 1-4 As α -CAs estão presentes em vertebrados, protozoários, algas, citoplasmas de plantas verdes e em bactérias Gram negativas, as β -CAs são encontradas tanto em bactérias Gram positivas quanto negativas, algas e cloroplastos de monocotiledônios e dicotiledônios, além de alguns fungos e arqueas, as δ -CAs são encontradas em arqueas, cianobactérias e na maioria dos tipos de bactérias, as classes ϵ - e ζ -CAs estão presentes em alguns diatomáceos marinhos e a η -CAs em protozoários (SUPURAN, C. T., 2017; SUPURAN, C. T., 2016; SUPURAN, C. T.; SUPURAN, C. T. et. al., 2015; DEL PRETE et. al., 2014; ALTERIO, V. et. al. 2012; SUPURAN, C. T., 2008). As α - β - e γ -CAs possuem o cofator metálico Zn^{2+} em seu sítio ativo, as δ -ACs são ativas com o cofator Fe^{2+} (embora sejam ativas com Zn^{2+} e Co^{2+}) enquanto as ζ -CAs possuem como cofator o íon Cd^{2+} . Com relação às η -CAs, é provável que elas sejam ativadas pelo íon Zn^{2+} (SUPURAN, C. T., 2016; LIONETTO et. al., 2012; ALTERIO, V. et. al. 2012).

Todas as seis classes de metaloenzimas da ACs catalisam uma simples reação fisiológica: a reversível hidratação de dióxido ao íon bicarbonato e prótons ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$), podendo ser entendida por meio de duas etapas, conforme as equações 1 e 2 (ALTERIO, V. et. al. 2012; SUPURAN, C. T., 2008). No primeiro passo, o cofator metálico direciona o íon OH^- para um ataque nucleofílico ao CO_2 , formando o íon HCO_3^- , que posteriormente é deslocado do sítio ativo da AC por uma molécula de água (eq. Q. 1). A segunda etapa, compreendida como etapa limitante, há uma regeneração do sítio ativo cataliticamente ativo $\text{EZn}^{2+}\text{-OH}^-$ por meio da reação de transferência de próton da molécula de água ligada ao cofator metálico para um aceitador (ALTERIO, V. et. al. 2012; SUPURAN, C. T., 2008).



Em mamíferos, dentro do grupo das α -classes, vários membros dessa família têm sido identificados e descritos com diferentes atividades catalíticas, localização subcelular e distribuição tecidual (FROST, 2014; ALTERIO, V. et. al. 2012; SUPURAN, C. T., 2008). Entre essas α -ACs indentificadas, existem oito proteínas citosólicas (AC I, AC II, AC III, AC VII, AC VIII, AC X, AC XI, AC XIII), duas proteínas de matriz mitocondrial (AC AV, CA BV), uma proteína secretada (AC VI), duas proteínas ancora GPI (AC IV and AC XV) e três proteínas de membrana (AC IX, AC XII, AC XIV) (FROST, 2014; ALTERIO, V. et. al. 2011; SUPURAN, C. T., 2008). Dessas proteínas, três das formas citosólicas (VIII, X, and XI) não apresentam atividade catalítica por não apresentarem um ou mais resíduos histidina, na coordenação do cofator metálico Zn^{2+} (FROST, 2014; ALTERIO, V. et. al. 2012).

As α -ACs apresentam algumas similaridades estruturais. Os estudos revelaram que o sítio catalítico dessa enzima é localizado em uma cavidade cônica de aproximadamente 12 Å de largura e 15 Å de profundidade que se expande da superfície da proteína até o centro da macromolécula. O íon Zn^{2+} catalítico está localizado no fundo do sítio ativo, onde apresenta uma coordenação tetraédrica distorcida por três histidinas e uma molécula de água / íon hidroxila. Essa molécula de água / íon hidroxila estão envolvidas em uma rede de ligações de hidrogênios que realçam o caráter nucleofílico desses ligantes (figura 2) (SUPURAN, C. T., 2016; BOONE, C. D., et. al., 2014; ALTERIO, V. et. al. 2012). Mais precisamente, a água/ íon hidroxila interage com o resíduo (Thr 199) e duas moléculas de água localizadas em faces opostas: uma molécula de água na face hidrofílica do sítio ativo e a molécula de água (deep water), localizada na face hidrofóbica do sítio ativo.

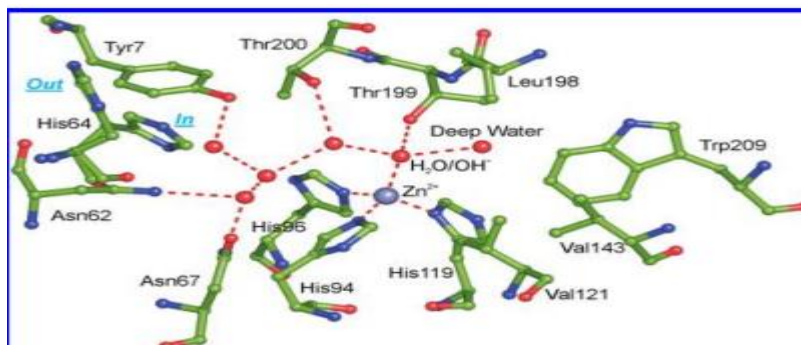


Figura 2. Sítio ativo da metaloenzima AC. O cofator metálico Zn^{2+} é coordenado tetraédricamente por três resíduos histidina e uma molécula de H_2O/OH^- onde estão bem estabilizadas por uma rede de ligações de hidrogênio (ALTERIO, V. et.al. 2012).

O sítio catalítico dessas metaloenzimas pode ser dividido em faces hidrofóbicas e hidrofílicas. A face hidrofóbica é importante para a captura do CO_2 e facilitar a interação com o íon hidróxido ligado ao cofator Zn^{2+} , orientando o átomo de carbono para um ataque nucleofílico. Por outro lado, a face hidrofílica estabiliza por meio de ligações de hidrogênio as

reações de transferências de próton, necessárias nos processos catalíticos dessa metaloenzima (SUPURAN, C. T., 2016; BOONE, C. D., et. al., 2014; ALTERIO, V. et. al. 2011).

3.3.1. Inibição da AC

As ACs tem sido associadas à vários processos fisiológicos como troca de gases na interface ar-agua, transporte de CO_2 e HCO_3^- nas membranas, reações biossintéticas em tecidos metabolicamente ativos, balanço ácido-base, secreção, calcificação, oncogênese entre outros (FROST, 2014; SUPURAN, C. T., 2008). Nesse sentido, a inibição dessas enzimas tem sido foco de várias pesquisas. Dentre esses inibidores, os ligantes que complexam ânions e as sulfonamidas não substituídas, que podem coordenar o cofator metálico ou por substituição da parte não proteica da enzima, ou por adição de mais uma esfera de coordenação, formando uma estrutura bipiramidal distorcida, são as principais classes de inibidores da AC (SUPURAN, C. T., 2017; SUPURAN, C. T., 2016; RODRIGUES, G. C. et. al., 2014; PAN, P. et. al.; SUPURAN, C. T., 2013).

Os inibidores das ACs têm sido largamente utilizados no campo da oftalmologia, principalmente no tratamento de glaucoma, edema macular, degeneração macular e algumas outras patologias oculares; no tratamento de doenças cerebrais, atuando principalmente como agentes antipléticos e também como vasodilatadores; apresentam atividade antitumoral; são agentes diuréticos; e também podem ser utilizados no tratamento de osteoporose (SUPURAN, C. T., 2008). Mais ainda, estudos de homologia tem mostrado muitas semelhanças entre a ACs de parasitas com a hAC. E de fato, estudos in vivo mostraram que os inibidores da ACs também tem potencial antiparasitário (RODRIGUES, G. C. et. al., 2014; PAN, P. et. al., 2013).

3.4. Ácidos Hidroxâmicos como inibidores das enzimas HDAC e AC

Existem várias pesquisas no desenvolvimento de inibidores das enzimas AC e HDAC. Dentre esses inibidores, os ácidos hidroxâmicos têm sido largamente utilizados no mercado. Os ácidos hidroxâmicos podem ser representados por uma fórmula geral $RCONR'OH$ onde R' pode ser um grupo alquila, arila ou simplesmente um hidrogênio (H) (GUPTA et. al., 2013). Essa classe de compostos engloba uma importante família de bioligantes que coordenam íons metálicos situados no bloco d.

Esse grupo de bioligantes podem exibir tautomeria na forma ceto ou iminol e ambos tautômeros podem apresentar a forma Z (zusammen) ou E (entgegen) diastereoisômeros. Esses compostos são ácidos fracos com valores de $pK_a \sim 8,5$ para a deprotonação N-OH em solventes aquosos (HIGGINS, 2006). Os ácidos hidroxâmicos cetólicos, na forma Z, parecem ser favorecidos em fase gasosa e em solventes aquosos. Todavia, em solventes não próticos como o Dimetilsulfóxido (DMSO) apresenta uma maior deprotonação no grupo N-H do que N-OH (KAKKAR, 2013).

A mais importante aplicação dos ácidos hidroxâmicos é como queladores de íons metálicos. As pesquisas recentes tem demonstrado que esse grupo de moléculas coordenam os íons metálicos de forma monodentada e bidentada. Para quelação dos íons metálicos, os ácidos hidroxâmicos adotam uma configuração *cis*. Esse tipo de coordenação parece ser mais favorável devido haver uma ressonância entre o metal e o grupo hidroxamato. Sabendo dessas propriedades dos ácidos hidroxâmicos, a indústria farmacêutica tem largamente pesquisado sobre esse grupo de bioligantes e utilizados como inibidores de metaloenzimas como as ACs e HDACs (GUPTA et. al., 2013).

Os ácidos hidroxâmicos faz parte dos quatro principais inibidores das HDACs dependentes do cofator metálico Zn^{2+} . Dentre esses ácidos hidroxâmicos, os compostos Suberonalyde Hydroxamica Acid (SAHA) e Trichostatin A (TSA) são os mais conhecidos,

inclusive aprovados pela food and drug administration (FDA) como inibidores dessas metaloenzimas, servindo de modelo para o desenvolvimento de novos protótipos. O mecanismo de inibição dos ácidos hidroxâmicos sobre a HDACs é majoritariamente por meio da quelação do cofator metálico Zn^{2+} , conforme a figura 3, formando diversas ligações de hidrogênio com resíduos próximos.

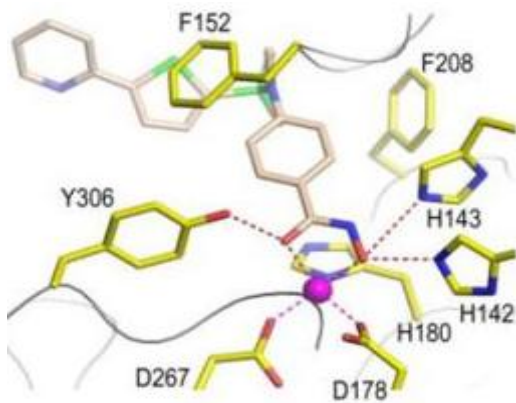


Figura 3. Interação de um ácido hidroxâmico com o cofator metálico Zn^{2+} (em roxo) da HDAC. Na inibição da HDAC os ácidos hidroxâmicos quelam o cofator metálico bidentadamente e as interações com os resíduos HIS 143, HIS 142 e TYR 306 auxiliam na estabilidade do complexo.

Em relação os inibidores das ACs dependentes do cofator Zn^{2+} , a principal classe de inibidores dessas metaloenzimas são as sulfonamidas. Entretanto, devido esse grupo de moléculas apresentarem baixa seletividade, implicando em vários efeitos colaterais, pesquisadores tem investido estudos nos ácidos hidroxâmicos como inibidores dessas enzimas. Como inibidores dessas metaloenzimas, os ácidos hidroxâmicos atuam como um poderoso ligante bidentado, além de formar fortes ligações de hidrogênio com resíduos próximos (figura 4) (FIORE et. al., 2012).

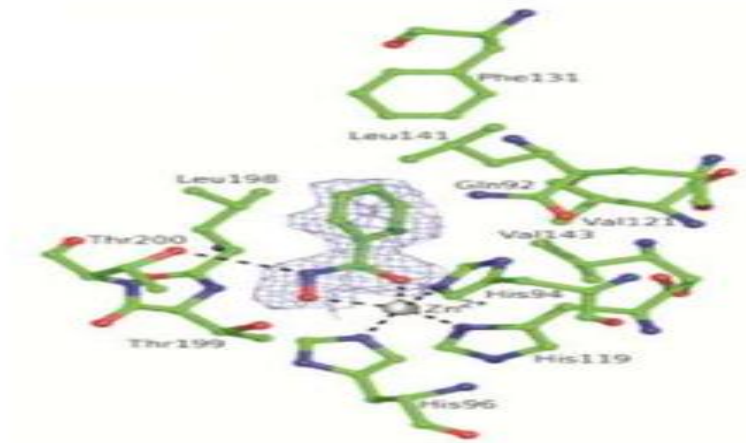


Figura 4. Inibição de um ácido hidroxâmico sobre a enzima AC. Os átomos de oxigênio quelam o cofactor metálico (em prata) da enzima AC. Uma ligação de hidrogênio com o resíduo THR 200 auxilia na estabilização do complex.

4. OBJETIVOS

4.1. *Objetivo Geral*

Avaliar a atividade inibitória das betaínas hidroxâmicas sobre as enzimas HDAC e AC por meio de ensaios in silico.

4.2. *Objetivos Específicos*

Estudar as interações das betaínas hidroxâmicas com a HDAC e AC pelos métodos de Ancoragem Molecular e Dinâmica Molecular.

Comparar as interações das betaínas hidroxâmicas em relação aos Ácidos Hidroxâmicos.

Avaliar as possíveis estruturas moleculares das betaínas hidroxâmicas a serem apresentadas, respeitando as possibilidades de síntese

5. JUSTIFICATIVAS

Os ensaios *in silico*, embora menos exatos que os *in vitro*, possibilitam uma rápida visualização, de baixo custo, de milhares de moléculas. Essa primeira etapa reduz o tempo e o custo na seleção de estruturas mais promissoras para uma próxima etapa, a avaliação *in vitro*.

As Betaínas Hidroxâmicas reúnem características bastante favoráveis para a formação de análogos dos ácidos hidroxâmicos de forma a aumentar a afinidade pela HDAC e AC. Devido à sua forma zwitteriônica, as betaínas hidroxâmicas podem, *in silico*, potencializar a ligação com o zinco, pois o grupo hidroxamato estaria mais disponível para se coordenar ao íon zinco ou a aminoácidos carregados positivamente no sítio ativo das enzimas, enquanto que, os grupos N-metilados, positivamente carregados, podem interagir com aminoácidos carregados negativamente. Outra vantagem da utilização das betaínas hidroxâmicas está relacionada com simplicidade da síntese destas moléculas.

6. METODOLOGIA

6.1. Otimização da Geometria dos Ligantes

A otimização de geometria dos ligantes foi realizada no nível de cálculo B3LYP/6-31G++(d,p) para a obtenção de propriedades, como cargas atômicas ChelpG e potencial eletrostático com o software Firefly 8.2.0 (GRANOVISK, 2015; FRISCH et. al. 2009)

6.2. Ancoragem molecular com ligante coordenado ao metal

Para a representação da proteína, os arquivos adotados para as simulações foram as estruturas cristalográficas de código PDB 1c3r e PDB 4fl7, o qual corresponde à estrutura de uma histona deacetilase (HDAC) dimerizada complexada com o inibidor Trichostatin A (TSA) e uma anidrase carbônica complexada com o inibidor N-hidroxi-benzamida. As estruturas cristalográficas foram pré-tratadas com o software UCSF chimera 1.11.1

(PETTERSEN et. al. 2004). Com o auxílio desse software, foram removidos a cadeia A, as moléculas de água da estrutura e o ligante TSA da HDAC, enquanto que da estrutura da AC foram removidos as moléculas de água, os íons HCO_3^{2-} e o ligante N-hidroxi-benzamida.

A próxima etapa foi referente à ancoragem molecular. Para o procedimento de ancoragem molecular, um processo de protocolo padrão foi utilizado. No preparo do ligante foram adicionados os hidrogênios polares, as cargas de Gasteiger e todas as torsões possíveis para os ligantes. Para o preparo dos receptores HDAC e AC, foram adicionadas as cargas de Gasteiger e, por conseguinte, um pseudo átomo de Zn para a utilização do campo de força AutodockZn, que é um processo padrão utilizado pelo autodock para ancoragens molecular que envolve quelação do cofator inorgânico Zn^{2+} (MARTINS-SANTOS et. al. 2014).

A região de ancoragem molecular foi determinada por um gridbox, de espaço de 0.375\AA , nas dimensões de $80 \times 80 \times 80$, com o centro nas coordenadas correspondente à posição do íon Zn^{2+} da metaloenzima HDAC. Os mesmos valores para o espaço e dimensões foram assumidos para a AC, contudo o centro das coordenadas foi ajustado para o seu cofator metálico Zn^{2+} . O grid foi gerado com uma ferramenta disponível no site: <http://autodock.scripps.edu/resources/autodockzn-forcefield>, produzido especialmente para reproduzir o campo de força utilizado na quelação do íon metálico de Zn^{2+} no grid.

Os cálculos de ancoragem molecular foram efetuados com o programa autodock4.2 (MORRIS et. al. 2009). Foram gerados 300 conformeros, onde o rmsd de tolerância foi de 2.5\AA , com um número máximo de 2.5×10^5 para a avaliação de energia e um numero máximo de 2.7×10^4 de gerações. O restante das outras opções foram mantidas como padrão. O algoritmo de busca para os cálculos de ancoragem molecular foi o Genético Lamarckiano.

6.3. Dinâmica Molecular

Por fim, foi realizada a etapa de Dinâmica Molecular com o software GROMACS 5.1.4. As coordenadas dos átomos na conformação de menor energia dos ligantes foram salvas em formato PDB e, por conseguinte, submetidas ao programa Automated Topology Builder (ATB) para gerar a topologia para os cálculos de Dinâmica Molecular. As cargas utilizadas na topologia foram aquelas obtidas na etapa de otimização da geometria dos ligantes.

Todas as simulações foram realizadas usando o campo de força AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement) 03 (DUAN et. al. 2003). Os sistemas foram solvatados utilizando o modelo de água TIP4P em formato de caixa cúbica, onde o complexo inibidor-proteína se localizava ao centro e distância de 1,0 nm, seguida pela minimização de energia através do algoritmo steepest decente para 500 passos, via tolerância de 1000KJ/mol, com o intuito de remover os efeitos estéricos. Por fim, a dinâmica molecular foi rodada em escala de tempo de 1000ps sob temperatura constante de 309,15K e pressão de 1atm. O algoritmo PME (particle Mesh Ewald) foi utilizado para os estudos das interações eletrostáticas. Por fim, foram feitas as análises de RMSD.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo aos cálculos teóricos, o grupo carbamato das betaínas hidroxâmicas possuem propriedades similares aos dos ácidos hidroxâmicos. Os cálculos a nível DFT B3LYP, com a base 6-311 G++(d,p), revelaram que o orbital HOMO dessas estruturas estão localizadas na mesma região, no grupo carbamato. A energia dos orbitais HOMO dessas estruturas é apresentada na tabela 1 e o formato desses orbitais na figura 5.

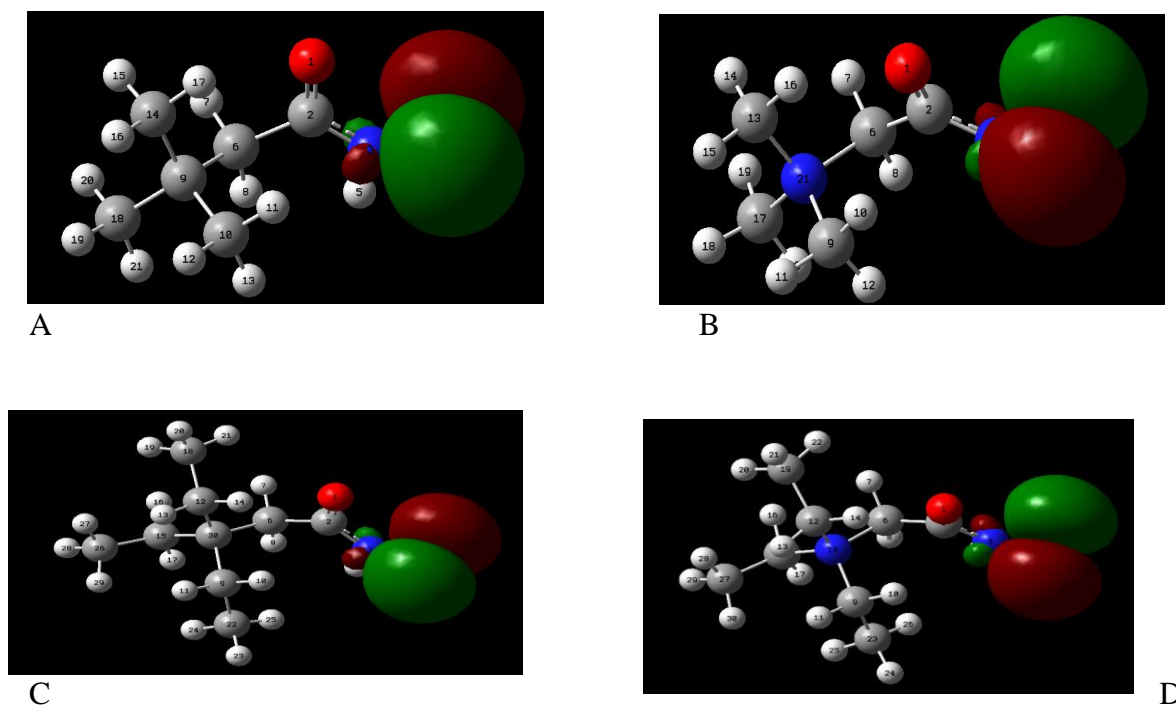


Figura 5. Orbital molecular HOMO dos ácidos hidroxâmicos e das betaínas hidroxâmicas. A) AH1; B) BH1; C) AH2 ; D) BH2

Tabela 1. Energias dos orbitais HOMO dos ligantes.

Moléculas	HOMO
AH1	0,009 a.u.
BH1	-0,142 a.u.
AH2	0,007 a.u.
BH2	-0,135 a.u.
TSA	-0.018 a.u.
NHB	0.013 a.u.

Como as metaloenzimas AC e HDAC utilizam o íon Zn^{2+} como cofator, a inibição pode ser compreendida pelo mecanismo de reação ácido-base de Lewis. Nesse mecanismo, o ácido será um aceitador de prótons enquanto que a base será um doador de prótons (SHRIVER et. al., 1999). Neste caso, o cofator metálico Zn^{2+} será o aceitador de prótons e o ligante o doador de próton. Relacionando essa interação em nível atômico, os orbitais envolvidos nesse tipo de mecanismo de reação são o orbital HOMO e o orbital LUMO

(PEARSON, 1986), geralmente. Analisando os orbitais HOMO dos ligantes, na figura 5, observa-se que as betaínas hidroxâmicas apresentam um orbital HOMO similar aos de seus respectivos análogos. Isso induz ao pensamento que a interação das betaínas hidroxâmicas será similar aos dos ácidos hidroxâmicos, ou seja, um orbital 4p do oxigênio (orbital HOMO) interagirá lateralmente com o orbital 4s (orbital LUMO) do Zn^{2+} , provavelmente.

Além disso, segundo os cálculos teóricos (DFT, na base 6-311G ++ (d,p), com cargas ChelPG), o orbital HOMO dos ligantes apresentados na tabela 1 possui energias próximas. Dessarte, além do mecanismo similar dessas estruturas, é provável que a contribuição de energia da interação dos orbitais HOMO, dos ligantes, com o orbital LUMO do cofator metálico Zn^{2+} serão próximas. Logo, grupo carbamato das betaínas hidroxâmicas podem apresentar interações de orbital de fronteira com essas metaloenzimas, similares aos ácidos hidroxâmicos.

Tabela 2. Carga dos átomos dos ligantes AH1, BH1, AH2 e BH2.

AH1		BH1	
O1	-0,735753	O1	-0,672504
C2	0,711158	C2	0,638502
N3	-0,127969	N3	-0,084724
O4	-0,71615	O4	-0,569601
H5	0,197019	H5	0,209852
C6	-0,719146	C6	-0,626517
H7	0,093663	H7	0,195593
H8	0,05795	H8	0,159349
C9	1,03138	C9	-0,257787
C10	-0,390966	H10	0,157587
H11	0,074972	H11	0,110598
H12	0,017705	H12	0,106222
H13	0,023008	C13	-0,220604
C14	-0,334786	H14	0,102816
H15	0,016879	H15	0,088248
H16	-0,016937	H16	0,163702
H17	0,085322	C17	-0,287001
C18	-0,280244	H18	0,112203
H19	-0,010491	H19	0,132166
H20	0,008812	H20	0,136131

H21	0,014573	N12	0,405773
AH2		BH2	
O1	-0,723247	O1	-0,665642
C2	0,768005	C2	0,659334
N3	-0,171765	N3	-0,102437
O4	-0,715903	O4	-0,588912
H5	0,232275	H5	0,230499
C6	-0,788886	C6	-0,677671
H7	0,117268	H7	0,187172
H8	0,054298	H8	0,121842
C9	0,046793	C9	0,047943
H10	-0,027250	H10	0,054854
H11	-0,087653	H11	0,003013
C12	0,103776	C12	0,099599
H13	-0,122049	H13	-0,022970
H14	-0,028008	H14	0,054044
C15	0,192821	C15	0,182397
H16	-0,076943	H16	-0,001662
H17	-0,068629	H17	0,007444
C18	-0,023065	N18	0,421339
H19	-0,051524	C19	-0,139607
H20	-0,017703	H20	0,016610
H21	-0,001606	H21	0,073894
C22	-0,065607	H22	0,054376
H23	-0,002739	C23	-0,133182
H24	-0,029293	H24	0,075934
H25	0,003655	H25	0,023053
C26	-0,232814	H26	0,045010
H27	0,036954	C27	-0,239871
H28	0,010523	H28	0,071842
H29	0,030296	H29	0,074531
C30	0,638017	H30	0,067225

Em relação às cargas dos átomos, a magnitude dos átomos de oxigênio das betaínas hidroxâmicas é próxima às dos ácidos hidroxâmicos (tabela 2), reforçando que essas estruturas podem apresentar um mecanismo similar aos ácidos hidroxâmicos na inibição das enzimas HDAC e AC. Porém, a interação eletrostática dos ácidos hidroxâmicos junto ao cofator Zn^{2+} deve ser mais forte, devido seus átomos de oxigênio apresentar cargas mais negativas, quando comparado às betaínas hidroxâmicas.

Todavia, ao comparar a magnitude das cargas dos átomos de hidrogênio dos grupos metilas ligadas ao átomo N21 com a dos átomos de hidrogênio dos grupos metilas ligadas ao átomo C9 e dos átomos de hidrogênio dos grupos metilas ligadas ao átomo 18N com os hidrogênios da etila ligada ao átomo C30, aquelas são mais positivas. Isso pode conferir uma vantagem às betaínas hidroxâmicas na interação com sítios eletronegativos das metaloenzimas HDAC e AC, visto que as ligações de hidrogênio não clássicas podem ser realizadas. Mais ainda, os cálculos sugeriram que o átomo de nitrogênio (N21 na BH1 e N18 na BH2) das betaínas hidroxâmicas apresenta valores positivos, o que pode favorecer uma interação de compostos instáveis com resíduos eletronegativos dessas enzimas.

7.1 Estudos de Ancoragem Molecular da interação de ligantes com a HDAC

7.1.1 Validação

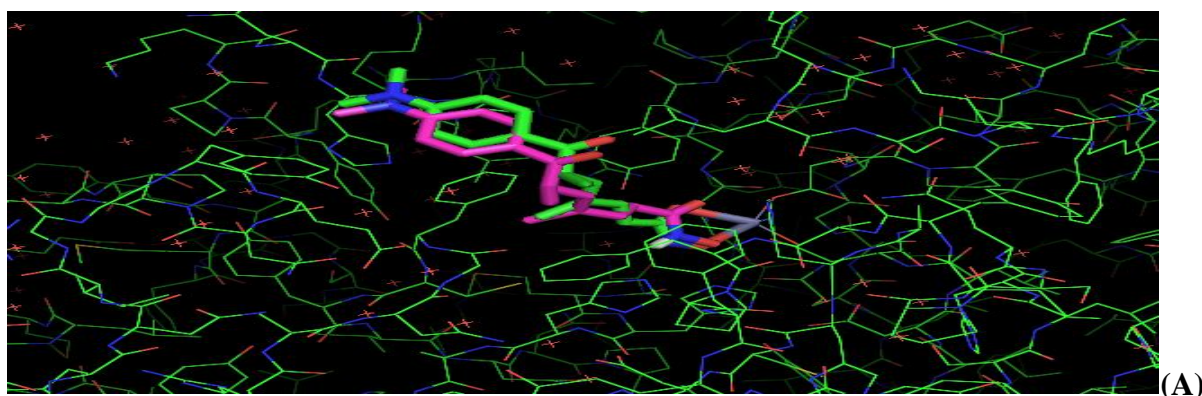
Uma rápida avaliação nas interações *in silico* entre ligantes e enzimas, com a finalidade de se descobrir as energias de ligação da interação enzima-ligante, é altamente desejável. Uma boa ferramenta para essa rápida avaliação é a ancoragem molecular. Embora existam vários programas disponíveis (open source ou comercial), poucos apresentam funções de energia para metaloproteínas (WANG, 2004). Martins e colaboradores (2014), com a finalidade de otimizar as interações de pequenos ligantes e metaloenzimas dependentes do íon Zn^{2+} , desenvolveram um campo de força para o software Autodock 4.2.

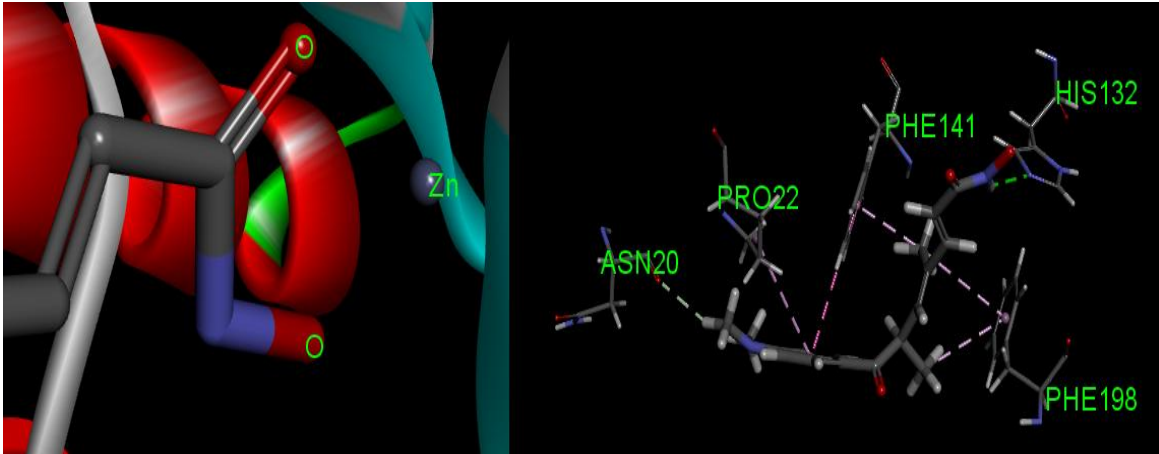
Nesse sentido, como a HDAC é uma metaloenzima dependente do íon Zn^{2+} como cofator, esse campo de força foi empregado para melhor representar a função de energia. Como a interação TSA-HDAC é bem conhecida, para a validação teórica foram utilizadas essas estruturas. Os resultados obtidos teoricamente da energia livre de Gibbs para a interação TSA-HDAC (tabela 3) foram muito próximos ao apresentado experimentalmente.

Tabela 3. Energia livre de Gibbs (kcal.mol^{-1}) teórica e experimental da interação TSA-HDAC

enzima-inibidor	$\Delta G_{\text{Teórico}}$	$\Delta G_{\text{Experimental}}$
TSA-HDAC	-9,95	-10,3

Além da energia livre de Gibbs, teórica e experimental, da interação TSA-HDAC serem próximas, as inspeções visuais obtidas pelo método de ancoragem molecular apontaram geometrias próximas ao experimental (figura 6A). Várias interações significativas entre o ligante e os aminoácidos ASN 20, PHE 198, PRO 22, PHE 141, HIS 170 (figura 6B), entre outros foram observadas no estudo teórico. As mais significativas foram uma ligação de hidrogênio entre (TSA) N-H \cdots N-HIS 132 e uma interação do tipo pi-stacking na forma T entre os anéis do TSA e do aminoácido PHE 141. Além disso, as distâncias entre Zn \cdots O(C) e Zn \cdots O $^-$ foram de 2,074 Å e 1,847 Å respectivamente, mostrando proximidade ao resultado apresentado pela estrutura cristalográfica (2,45 Å e 2,24 Å respectivamente).





(B)

Figura 6. Interação TSA-HDAC. **A:** Comparação das conformações teórica e experimental na interação TSA-HDAC. Em verde está representado o TSA do PDB 1c3r e em rosa a estrutura mais próxima obtida na Ancoragem Molecular. **B:** Interação da TSA-HDAC por ancoragem molecular. A figura representada à esquerda mostra os átomos de oxigênio coordenando o cofator Zn^{2+} . A figura representada à direita mostra as interações do TSA com o grupo de aminoácidos próximos.

Análise das interações betaína hidroxâmica-HDAC e ácidos hidroxâmicos-HDAC

Ácidos hidroxâmicos são potentes inibidores das enzimas HDAC devido possuírem um grupo hidroxamato que coordena o cofator metálico Zn^{2+} (GUPTA, 2013). Nesse sentido, as betaínas hidroxâmicas (EVANS, 1977) podem ser potenciais inibidores da enzima HDAC porque, além da existência do grupo hidroxamato em sua estrutura, apresentam também um grupo catiônico que pode favorecer uma interação coulombiana com a HDAC. A escolha das betaínas hidroxâmicas da figura 7 para essa análise comparativa se deve à sua síntese conhecida (EVANS, 1977). A tabela 4 exhibe os resultados da interação dos ligantes da figura 7 com a HDAC.

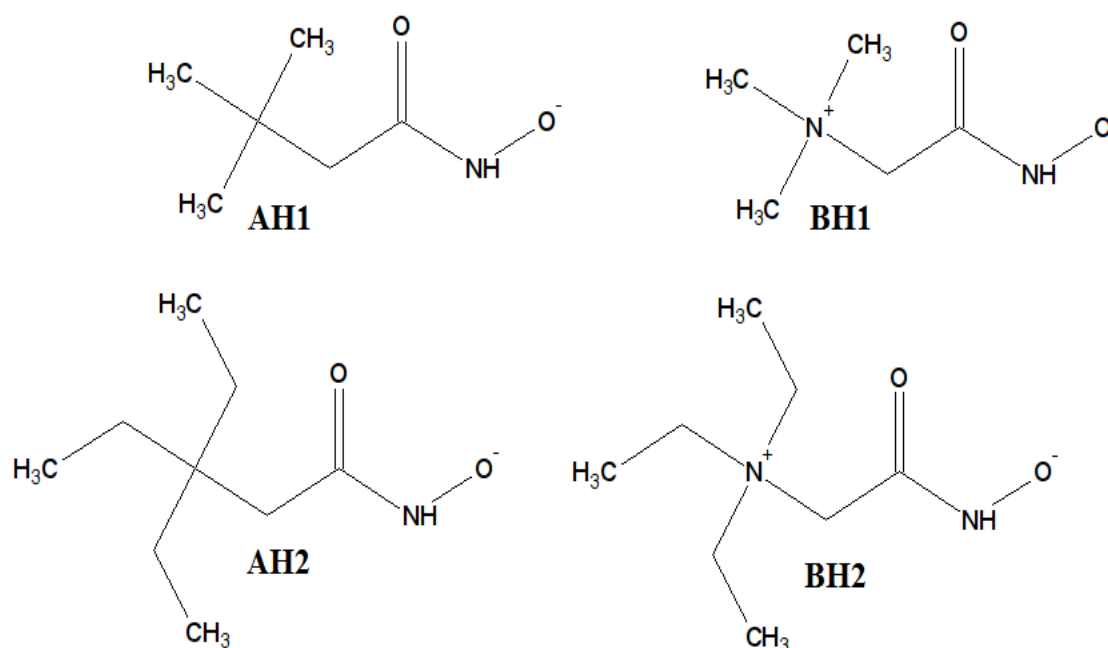
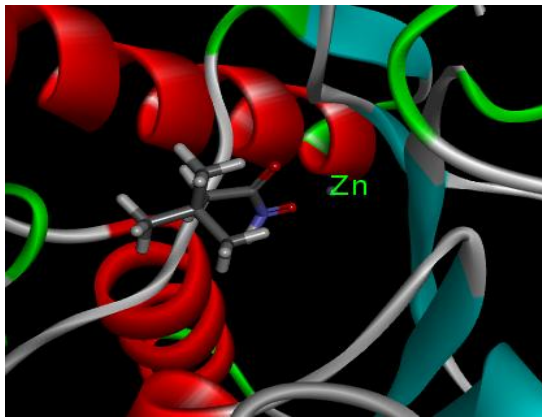


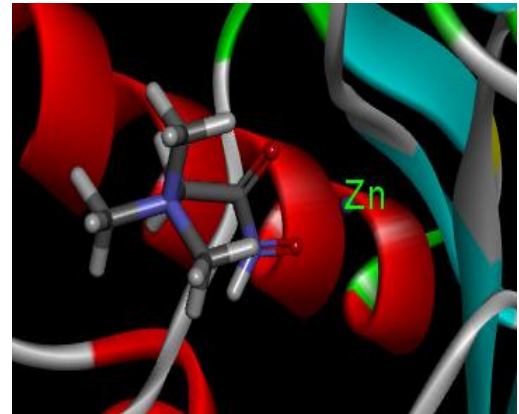
Figura 7. Ácidos hidroxâmicos (AH1 e AH2) e betaínas hidroxâmicas (BH1 e BH2) utilizadas nos cálculos de interação Ligante-HDAC.

Tabela 4. Valores de menor energia das conformações geradas nos cálculos de ancoragem molecular da interação ligante-HDAC.

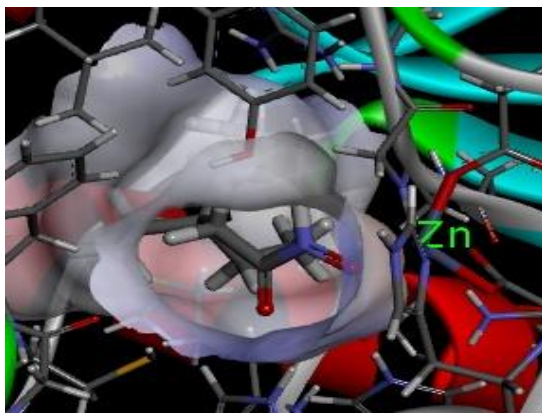
Moléculas	Energia (Kcal.mol ⁻¹)
AH1	-6,46
BH1	-5,24
AH2	-6,98
BH 2	-5,53



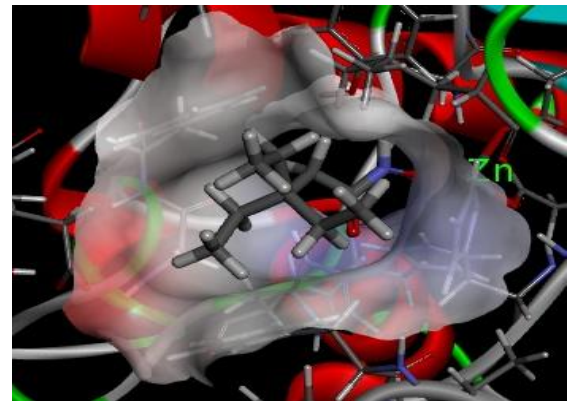
(A)



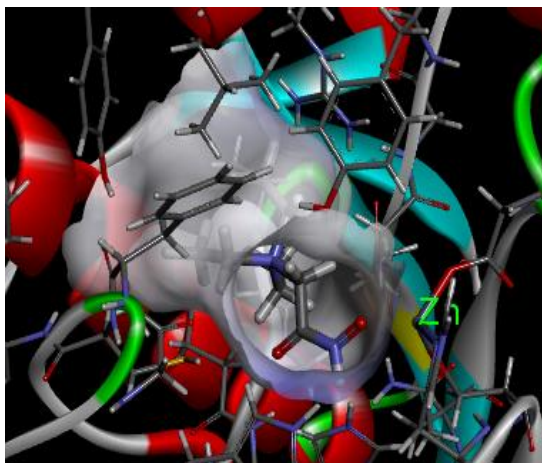
(B)



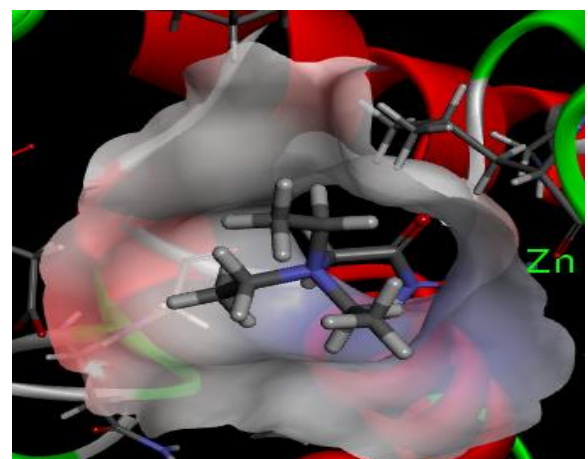
(C)



(D)



(E)



(F)

Figura 8. Interação ligante-HDAC. **A:** Interação AH1-HDAC. **B:** Interação BH1-HDAC. **C:** Interação AH2-HDAC na cavidade adjacente ao sítio ativo da HDAC. **D:** Interação AH2-HDAC no sítio ativo da HDAC. **E:** Interação BH2-HDAC na cavidade adjacente ao sítio ativo da HDAC. **F:** Interação BH2-HDAC no sítio ativo da HDAC.

A diminuição da energia de interação ligante-HDAC era esperada para estruturas de cadeias maiores, haja vista a superfície de contato contribui para a minimização da energia (SOLOMONS, 2012). Contudo, nota-se que, embora essas estruturas maiores tenham uma energia de interação menor, elas preferencialmente se ligaram a uma cavidade adjacente ao sítio ativo da HDAC, que tem um tamanho de aproximadamente 14 Å (WANG, 2004). Por outro lado, as estruturas maiores, quando localizadas no sítio ativo da HDAC, apresentaram energias de interação maiores do que as estruturas menores. A figura 8 mostra a conformação desses ligantes na interação com a HDAC.

Tem sido sugerido por alguns autores que a função da cavidade de 14 Å adjacente ao cofator Zn^{2+} seja de facilitar o escape do subproduto da reação de deacetilação das histonas, devido favorecer as interações iônicas (WAMBUA et. al. 2014; WANG, 2004), por possuir grupos polares naquela região. Logo, o estudo dessa cavidade tem sido largamente estudado para o desenvolvimento de novos fármacos (MEHOT, et. al.; WITTER, et. al., 2008; MORADEI, et. al. 2007). E ainda, pesquisas sugerem que os ligantes podem ocupar ambos os modos, ora no sítio ativo, ora na cavidade adjacente ao sítio ativo da HDAC (WANG, 2004). Nesse sentido, é provável que as estruturas utilizadas na ancoragem molecular possam interagir nas duas cavidades.

7.1.2. Interações na cavidade adjacente ao sítio ativo da HDAC.

Através do método empregado na ancoragem molecular, foi visto que as estruturas maiores (AH2 e BH2) obtiveram menor energia quando as suas ramificações interagiram com os grupos localizados na cavidade adjacente ao sítio ativo da HDAC, com o seu átomo de oxigênio ($R-N=O^-$) interagindo com o cofator Zn^{2+} (figura 9). Pelos cálculos de ancoragem molecular, a conformação da AH2 (figura 9A) apresentou, além da ligação $Zn \cdots O^-$, ligações

de hidrogênio (CYS142-H \cdots O=C-AH2, HIS131-H \cdots O=C-AH2, e AH2-N-H \cdots O-TYR297), forças intermoleculares com a HIS 131, interações carga-carga e várias interações- π .

Os cálculos de ancoragem molecular, para as conformações BH2, apresentaram uma menor quantidade de interações hidrofóbicas e aumentou a quantidade de interações do tipo carga-carga, comparado a AH2. Para a BH2, os cálculos além da interação Zn \cdots O $^-$, apresentaram uma ligação de hidrogênio (CYS142-H \cdots O=C-BH2) e várias interações carga-carga (figura 9B). Contudo, os cálculos de ancoragem molecular gerados apresentaram algumas repulsões que afetaram a energia da estrutura. Essa repulsão pode ter acontecido porque os cálculos de ancoragem molecular efetuados, no presente trabalho, consideraram a proteína toda rígida. Por consequência, alguns grupos de cargas semelhantes ficaram próximos, aumentando a energia de ligação.

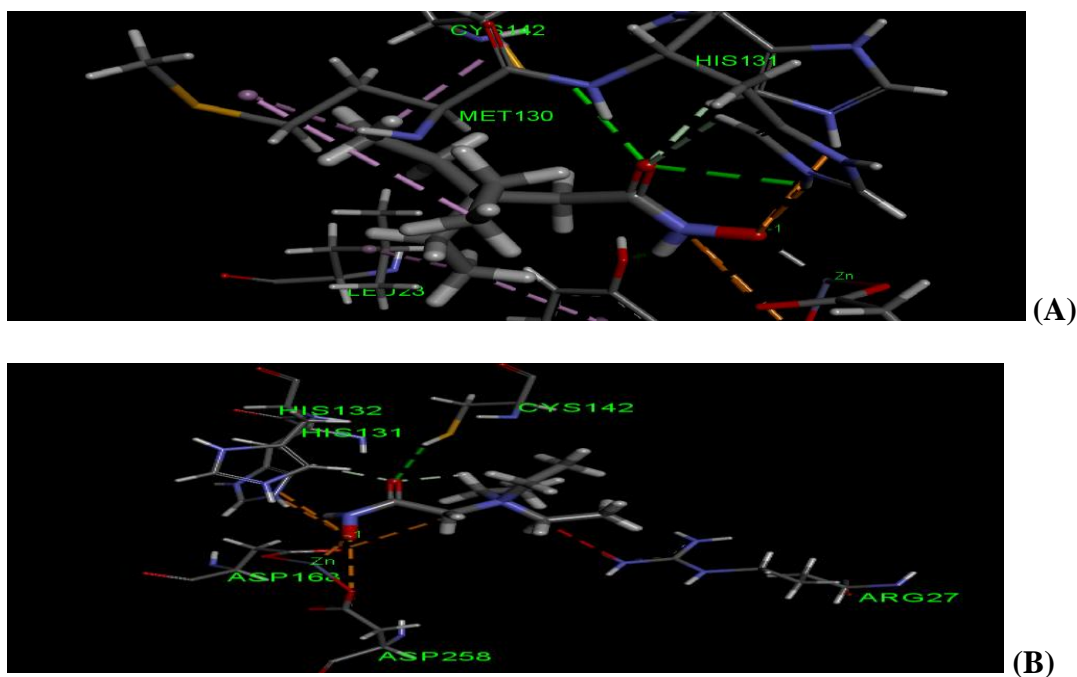


Figura 9. Interações dos ligantes na cavidade adjacente ao sítio ativo da metaloenzima HDAC. **A:** Interação AH2-HDAC. **B:** Interação BH2-HDAC. Tracejado em verde (ligação de hidrogênio), tracejado em laranja (interação carga-carga), tracejado em roxo (interações- π), tracejado em branco (interação intermolecular), tracejado em laranja (interação carga-carga), tracejado em vermelho (repulsão eletrônica).

Embora o programa utilizado para a visualização das interações ligante-HDAC não tenha mostrado as interações dos ligantes com os átomos mais eletronegativos desses aminoácidos, é possível que o programa autodock4.2 tenha computado essas interações nos cálculos. Assim, os efeitos de indução explicaria a preferência de alguns ligantes interagirem melhor na cavidade de 14 Å.

Como existem muitos grupos que favorecem uma interação iônica nessa cavidade, uma possibilidade é que as etilas tenham sentido o efeito de retirada de elétrons do grupo hidroxamato, quando ligado ao cofator metálico Zn^{2+} . Conseqüentemente, essa indução pode ter facilitado a interação com grupos polares nessa cavidade. No entanto, embora o efeito de indução das cargas seja parecido nas moléculas menores (AH1 e BH1), é possível que a distância do grupo metila desses grupos eletronegativos seja maior, desfavorecendo as interações na cavidade de 14 Å. Ainda que a ideia da indução das cargas possa ser válida na explicação da preferência do AH2 e BH2 interagirem melhor na cavidade adjacente ao sítio ativo, não é possível afirmá-las devido ao método utilizado para os cálculos de interação dessas estruturas considerarem a proteína rígida, aproximando-se do modelo de chave e fechadura.

7.1.3. As estruturas AH2 e BH2 podem apresentar um equilíbrio, ora no sítio ativo, ora na cavidade adjacente de 14 Å

Os ligantes AH2 e BH2 apresentaram energias de interação satisfatórias tanto no sítio ativo quanto na camada adjacente de 14 Å. A conformação do AH2 que apresentou menor energia de interação no sítio ativo da HDAC, além de se ligar ao cofator Zn^{2+} , apresentou ligações de hidrogênio (HIS132-H...O=C-AH2 e AH2-N-H...O-TYR297) e vários tipos de interações- π e carga-carga com a metaloenzima HDAC (figura 10A). Já a BH2 apresentou interações $Zn\cdots O^-$ e $Zn\cdots O=C-BH2$, uma ligação de hidrogênio (BH2-N-H...O-TYR297) e diversas interações carga-carga no sítio ativo da HDAC (figura 10B).

As energias do cálculo de ancoragem molecular para as conformações foram de $-6,98 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para a interação AH2-HDAC na camada adjacente de 14 \AA e $-5,97 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para a interação AH2-HDAC no sítio ativo da HDAC. Essa pequena diferença na energia de interação das conformações sugerem que as estruturas apresentem interações similares, mesmo em cavidades diferentes, e, por conseguinte, essas conformações podem aparecer em equilíbrio, ora na cavidade de 14 \AA , ora no sítio ativo da HDAC. No entanto, a conformação da AH2, quando a cadeia carbônica esta localizada na cavidade 14 \AA , parece facilitar as ligações de hidrogênio AH2-HDAC e algumas interações iônicas com os grupos polares na cavidade adjacente de 14 \AA e, portanto, apresentar uma menor energia de interação.

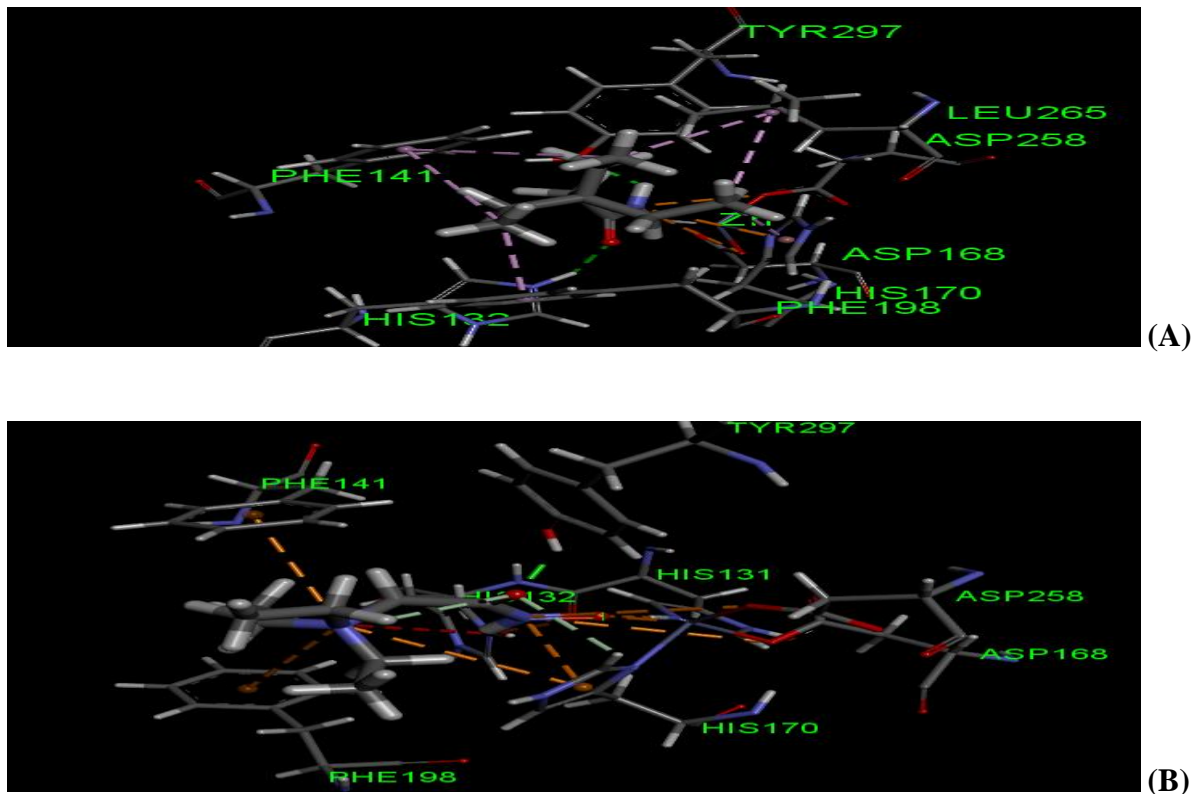


Figura 10. Interação dos ligantes AH2 e BH2 no sítio ativo da HDAC. **A:** Interação AH2-HDAC. **B:** Interação BH2-HDAC. Tracejado em verde (ligação de hidrogênio), tracejado em laranja (interação carga-carga), tracejado em roxo (interações- π), tracejado em branco (interação intermolecular), tracejado em laranja (interação carga-carga), tracejado em vermelho (repulsão eletrônica).

No estudo da BH2, os valores resultantes para os cálculos de energia para a interação BH2-HDAC na cavidade adjacente ao sítio ativo foram de $-5.53 \text{ kcal.mol}^{-1}$, enquanto que para a interação BH2-HDAC no sítio ativo da HDAC foi de $-4.98 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Essa pequena diferença de energia induz ao pensamento de que essas estruturas estão presentes em equilíbrio na HDAC, ora na cavidade de 14 \AA , ora no sítio ativo da metaloenzima HDAC. E ainda, a baixa diferença de energia entre as conformações ancoradas aludem a várias formas de interação similares. Todavia, a estrutura localizada na cavidade de 14 \AA apresenta-se como mais favorável por exibir uma quantidade menor de repulsões eletrônica, e, por conseguinte, mostrar uma melhor energia de interação, segundo os cálculos de ancoragem molecular do presente trabalho.

7.1.4 Relação do tamanho da estrutura e energia de interação

As energias de interação no sítio ativo da metaloenzima foram menores para as estruturas AH1 e BH1, sendo que eram esperadas que as estruturas AH2 e BH2 apresentassem-nas, devido à superfície de contato ser maior (SOLOMONS, 2012). Esses problemas podem estar relacionados com os métodos empregados para o estudo da interação ligante-proteína.

Para os ácidos hidroxâmicos, esse possível fato, talvez, possa estar relacionado com a disposição eletrônica das estruturas e compatibilidade geométrica (LEHNINGER, 2013; VOET et. al., 2011). Pelos cálculos, o ligante AH1 parece apresentar melhores interações entre o seu resíduo orgânico com os aminoácidos laterais da HDAC, comparado ao AH2. Já para as betaínas hidroxâmicas, além da variável compatibilidade geométrica, o número de repulsões de cargas positivas foram maiores para o ligante BH2, gerando maior instabilidade ao ser comparada com a BH1.

Tanto as estruturas AH1 e BH1 apresentaram várias interações hidrofóbicas em comum às estruturas maiores. Contudo, somente para essas estruturas (AH1 e BH1) foram notadas a presença de interações hidrofóbicas do tipo $\text{CH}\cdots\pi$ com o aminoácido PHE141. Estes tipos de interação, embora considerada fraca, auxilia na estabilização das estruturas com energia entre $-0,5$ e $-1,0 \text{ kcal.mol}^{-1}$ (BRANDL et. al., 2001). Talvez, essa tenha sido a razão dos ligantes menores apresentarem uma maior complementaridade geométrica nos cálculos de ancoragem molecular.

Não obstante, embora os cálculos apresentassem esse resultado, o método empregado não considerou o ajuste induzido da metaloenzima. Essa rigidez pode ter influenciado nos resultados dos cálculos. Logo, cálculos mais acurados, os quais considerem o ajuste induzido, são necessários para investigar a estabilidade dessas estruturas.

7.1.5 Comparação da energia de interação AH-HDAC e BH-HDAC

O grupo catiônico das betaínas hidroxâmicas interagiu com os resíduos de aminoácidos ricos em elétrons da HDAC, independente da cavidade que o resíduo orgânico do grupo hidroxamato esteja localizado (figura 11). Entretanto, ao ser comparado com os ácidos hidroxâmicos, essas estruturas mostraram uma energia de interação mais alta. Essa diferença pode estar associada à repulsão provocada pela a carga positiva do íon Zn^{2+} .

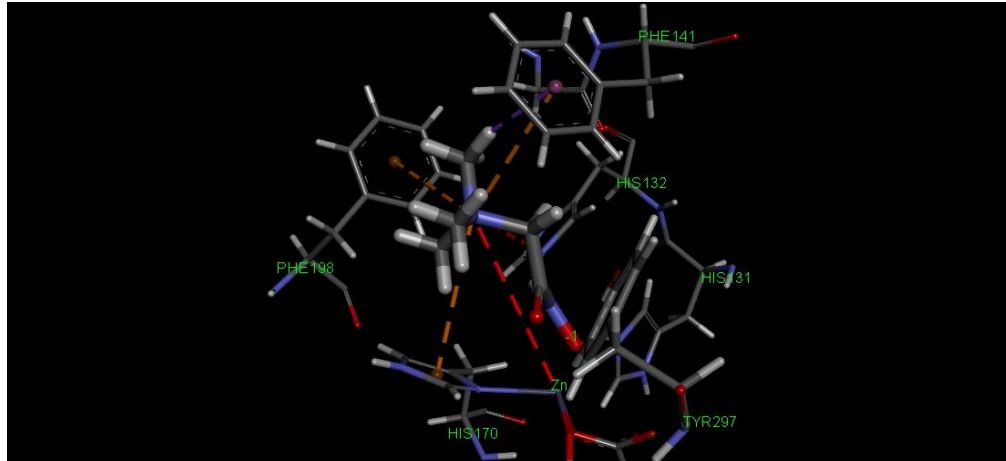


Figura 11. Interações dos grupos catiônicos da BH1 no sítio ativo da HDAC. O tracejado laranja representa as interações entre o grupo catiônico e aminoácidos ricos em elétrons da HDAC. O tracejado vermelho representa as repulsões entre cargas positivas.

Mesmo que os cálculos por ancoragem molecular tenham apontado que a interação BH-HDAC, quando comparadas às interações AH-HDAC de seus análogos, mostrem energia mais elevada, tal resultado não é definitivo, visto que as proteínas sofrem deformações (LEHNINGER, 2013; VOET et. al., 2011) e estas não foram consideradas nos cálculos de ancoragem molecular deste trabalho, que foi baseado no modelo chave-fechadura.

Mais além, como o grupo catiônico das betaínas hidroxâmicas analisadas no trabalho interagiram bem com aminoácidos ricos em elétrons, em ambas as cavidades da HDAC, esse grupo pode ser promissor no desenvolvimento de novos inibidores dessa enzima. Nesse sentido, com a finalidade de evitar uma repulsão entre as cargas dentro o cofator metálico da HDAC e alguns outros aminoácidos carregados positivamente, testes podem ser realizados com betaínas hidroxâmicas maiores, mantendo o grupo catiônico mais distante do íon Zn^{2+} e dos aminoácidos carregados positivamente.

7.1.6 Análise de betaínas hidroxâmicas derivadas do TSA

O Trichostatin A (TSA) é um conhecido inibidor da enzima HDAC. Por ser um fármaco aprovado pela food and drugs administration (FDA) e ter resultados expressivos no combate a diversas doenças dependentes da inibição da HDAC (SOMANNA et. al., 2016; VANHAECKE et. al. 2011; VUGUSHIN et. al. 2001), testes foram realizados combinando o grupo das betaínas hidroxâmicas a esse inibidor. A figura 12 mostra as posições que o grupo das betaínas foi substituído no TSA e a tabela 5 mostra a energia referente à interação do TSA combinado com a betaína e a HDAC.

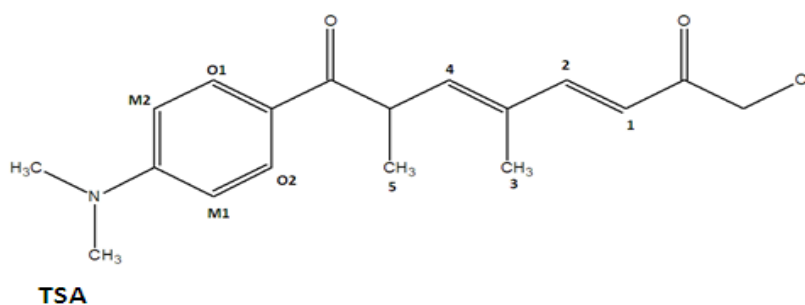


Figura 12. TSA e as posições que foram combinadas com o grupo catiônico das betaínas.

Tabela 5. Valores da energia de interação entre o TSA combinado com betaína e HDAC.

Posição	Energia (Kcal.mol ⁻¹)
TSA	-9,95
1	-12,27
2	-9,38
3	-9,83
4	-9,32
5	-10,29
M1	-10,39
M2	-9,86
O1	-9,13
O2	-10,23

A inserção do grupo catiônico das betaínas em algumas posições no TSA favoreceu a interação com a HDAC, mediante os cálculos realizados de ancoragem molecular. Os resultados mais expressivos foram a combinação TSA-betaína na posição 1, posição 5, posição meta (M1) e posição orto (O2). E ainda, os resultados gerados no cálculo de ancoragem molecular revelou que o grupo catiônico da betaína pode interagir tanto no sítio ativo, quanto na cavidade de 14 Å da HDAC.

Como fator no processo de estabilização, além da grande superfície de contato aliada ao processo de interação do complexo enzima-ligante, o grupo catiônico dos ligantes TSA-betaína interage com resíduos eletronegativos da HDAC, favorecendo ao abaixamento de energia e, por conseguinte, aumentando a estabilização do sistema. Nesse sentido, as betaínas hidroxâmicas são potenciais a ser explorado no desenvolvimento de inibidores da metaloenzima HDAC.

Nos cálculos de ancoragem molecular, o grupo catiônico das betaínas induziu a formação de ligações de hidrogênio não clássicas no sítio ativo dessas metaloenzimas. A figura 13 mostra uma comparação entre as ligações de hidrogênio não clássicas do TSA, combinado com o grupo catiônico das betaínas hidroxâmicas na posição 5, as ligações de hidrogênio do TSA, da conformação de menor energia localizada no sítio ativo e a conformação que apresentou a geometria mais próxima do ligante inserido no PDB 1c3r.

A estrutura do TSA apresentada no PDB apresenta uma ligação de hidrogênio não clássica do tipo NC-H...O com o aminoácido ASN 20 da proteína, enquanto que a estrutura gerada no cálculo de energia menor para o TSA, localizada no sítio ativo da enzima (segunda estrutura da figura 13), gerou duas ligações de hidrogênio não clássica do tipo NC-H...O com a enzima LEU 265. No entanto, quando combinado com o grupo catiônico das betaínas, além das ligações de hidrogênio não clássica do tipo NC-H...O com a enzima LEU 265 (estrutura

2), são observadas outras ligações de hidrogênio do tipo $N^+C-H \cdots O^-$ com o aminoácido GLU 92, de alta densidade eletrônica.

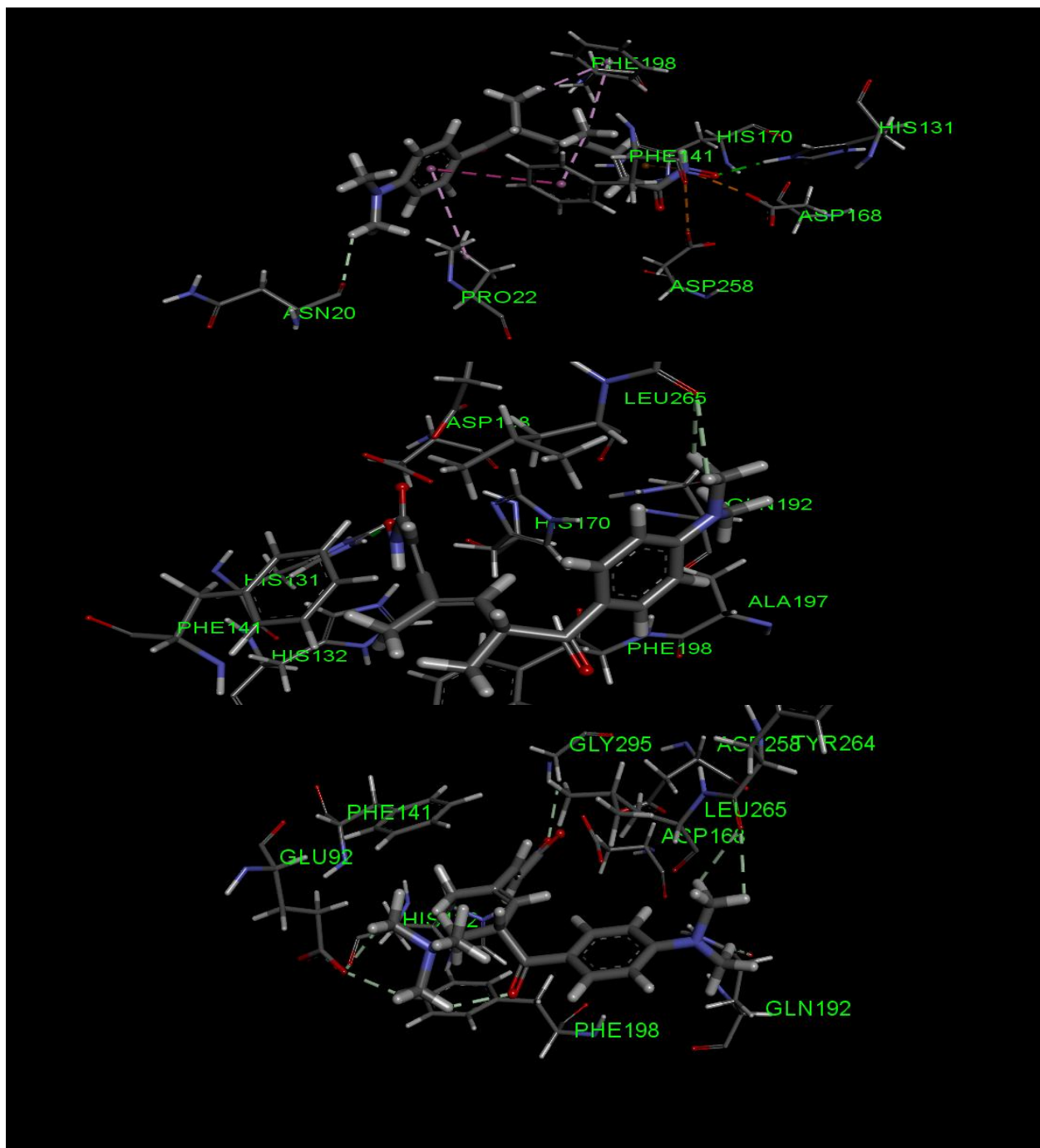


Figura 13. Interação TSA-HDAC*. A estrutura 1 mostra a estrutura gerada no cálculo com conformação mais próxima do TSA apresentado no PDB 1c3r. A estrutura 2 mostra a conformação do TSA de menor energia, localizada no sítio ativo da HDAC. A estrutura 3

apresenta o TSA combinado com o grupo catiônico das betaínas. O tracejado branco representa as ligações de hidrogênio não clássicas.

7.1.7 Estudos de Dinâmica Molecular das HDAC

Os complexos inibidor-HDAC foram caracterizados com ensaios de dinâmica molecular (DM) para se investigar a estabilidade, as alterações conformacionais e o comportamento dos inibidores no sítio ativo da HDAC e camadas adjacentes. Essas características foram analisadas por meio das mudanças, plotadas no gráfico de RMSD (Root mean Square Deviation). A figura 14 mostra o comportamento da interação inibidor-HDAC dos ligantes AH1, AH2, BH1 e BH2.

7.1.7.1. Comparação de Estabilidade

Em relação à estabilidade dos ligantes na interação inibidor-HDAC, os estudos de DM apontam que as estruturas são estáveis. Os estudos das interações desses ligantes, dentro do tempo de 1000ps, à temperatura de 309,15K mostraram os valores para o RMSD $\sim 1\text{Å}$, sugerindo que todas as estruturas são estáveis. Os resultados de DM, em relação à estabilidade dos ligantes, estão de acordo aos cálculos de ancoragem molecular, visto que esses cálculos previram a estabilidade dos ligantes no sítio ativo da metaloenzima.

Em relação aos ácidos hidroxâmicos, as betaínas hidroxâmicas apresentou maior estabilidade nos cálculos de DM (figura 14). Essa maior estabilidade provavelmente acontece devido o grupo catiônico de esses ligantes interagirem com grupos eletronegativos próximos, formando fortes interações, como ligações de hidrogênio não clássicas e interações do tipo π -cátion. Essa maior estabilidade das betaínas hidroxâmicas na interação inibidor-HDAC, em relação aos ácidos hidroxâmicos, contradiz os resultados obtidos na ancoragem molecular, referente às repulsões entre o cofator da metaloenzima e o grupo catiônico das betaínas. Mais

ainda, durante os 1000ps os átomos de oxigênio das betaínas hidroxâmicas quelaram o cofator Zn^{2+} , evidenciando o que era esperado - um mecanismo similar aos ácidos hidroxâmicos de inibição das HDACs.

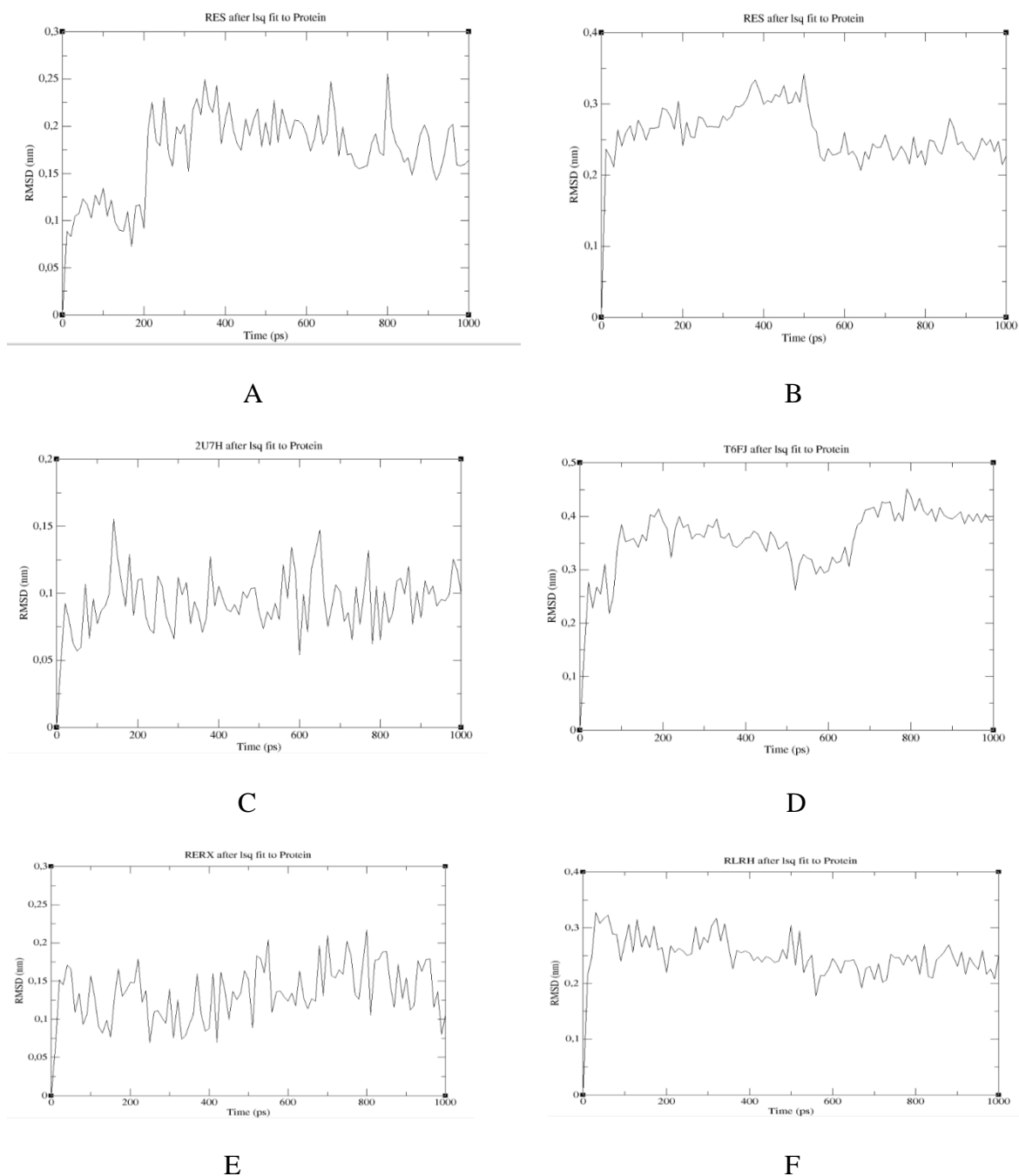


Figura 14. RMSD dos ligantes na interação inibidor-HDAC. O RMSD dos ligantes plotados nos gráficos de A-D são referentes à sua estabilidade no sítio ativo. Os gráficos E e F, são referentes aos ligantes na camada adjacente. **A)** interação AH1-HDAC; **B)** interação BH1-

HDAC; C) interação AH2-HDAC; D) interação BH2-HDAC; E) interação AH2-HDAC; F) interação BH2-HDAC.

As análises de energia potencial média da interação AH2-HDAC e BH2-HDAC no sítio ativo e na cavidade adjacente, obtidos nos cálculos de DM, apresentaram valores de energia muito próximos. Os resultados obtidos nos cálculos estão apresentados na tabela 6. Com a proximidade desses valores, é possível que esses ligantes possam interagir ora no sítio ativo, ora na cavidade adjacente do sítio ativo das HDACs, o que está em conformidade com os resultados obtidos na ancoragem molecular. Esse resultado reforça que o grupo catiônico das betaínas atuar em ambas as cavidades, mostrando ser um potencial inibidor dessa enzima. Todavia, a energia potencial de interação no sítio ativo é levemente menor, o que implica na preferência desses ligantes em interagirem nessa cavidade, ao invés da cavidade adjacente.

Tabela 6. Energia potencial média das interações AH2-HDAC e BH2-HDAC no sítio ativo e na cavidade adjacente da HDAC. O ligante representado com o símbolo (*) é referente às interações na cavidade adjacente.

AH2	-7,35335
AH2*	-7,35211
BH2	-7,34973
BH2*	-7,34591

7.1.7.2 Interações BH-HDAC

No mecanismo de catálise da deacetilação das histonas, alguns resíduos são importantes no processo de deacetilação das lisinas terminais das histonas. Entre esses resíduos, a tirosina TYR 306 e a histidina HIS 143 desempenham um papel fundamental nesse processo de catálise (LOMBARDI et. al. 2011). De acordo ao mecanismo proposto, o resíduo TYR 306, inicialmente para o lado de fora, parece direcionar a Acetil-L-lisina para o cofator

Zn^{2+} e durante as etapas dos mecanismos de deacetilação das histonas, estabilizar o sistema. Já a HIS 143 é importante porque ela ataca uma das moléculas de água que coordenam o cofator da HDAC, gerando um íon hidroxila, importante em uma das etapas de deacetilação das histonas (LOMBARDI et. al. 2011).

Dessarte, é provável que a interação com esses resíduos auxiliasse no processo de inibição das enzimas HDAC. Os cálculos de DM molecular mostraram que os ligantes AH1 e BH1, além de coordenarem o cofator da HDAC interagem com esses aminoácidos. O ligante BH1, por sua vez, apresentou uma menor distância (~3,6) quando comparado ao ligante AH1 (~4,0). Isso permite inferir que o grupo catiônico do ligante BH1 pode interagir mais fortemente com esses resíduos, formando ligações de hidrogênio não clássicas com aqueles. A figura 15, mostra as interações da BH1 com esses grupos no sítio ativo da molécula.

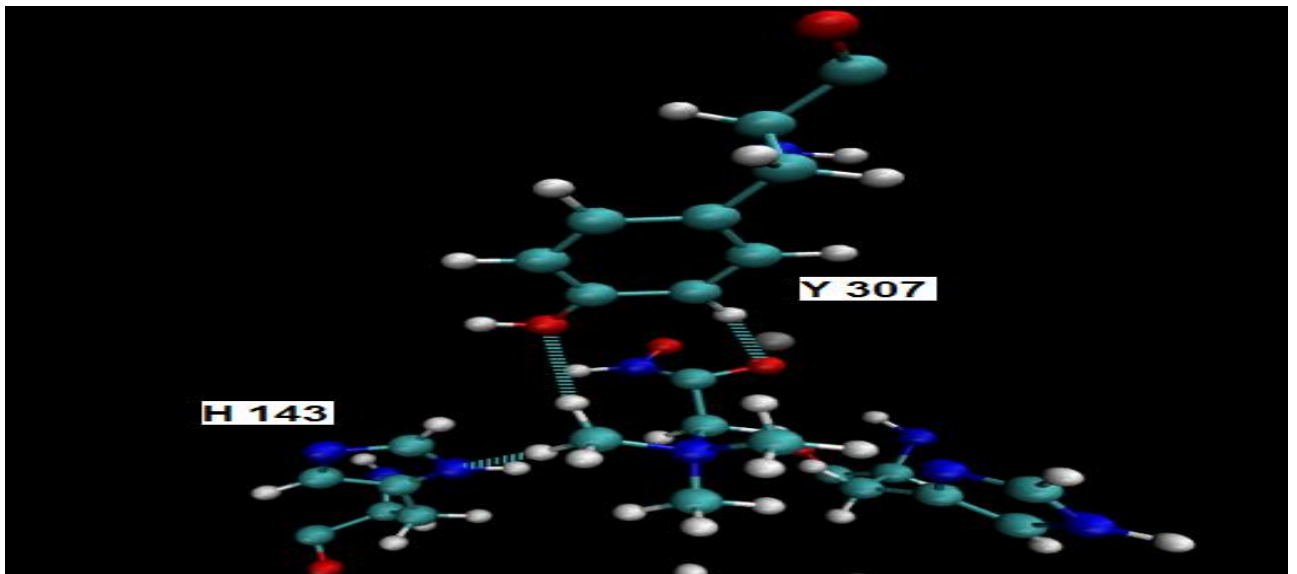


Figura 15. Interação do grupo catiônico BH1 com os resíduos Y307 e H143. Os resíduos TYR 297 e HIS 132 do PDB 1c3r são equivalentes.

7.1.7.3 Análise da DM do TSA e a betaína hidroxâmica análoga, com grupo catiônico na posição 5

As interações TSA-HDAC e análogoTSA-HDAC com o grupo catiônico na posição 5 também foram caracterizadas por DM. A plotagem do RMSD para esses ligantes, no tempo de 1000ps, estão apresentados na figura 16. As análises mostram que o análogo do TSA, com o grupo catiônico na posição 5, é mais estável quando comparado ao TSA. As ligações de hidrogênio não clássicas desse análogo com o resíduo GLU 92 também foi evidenciado nos estudos de DM, o que pode justificar a alta estabilidade desse ligante no sítio ativo da HDAC (figura 17). Os altos valores para o RMSD do TSA, pode ser a tendência do grupo amina interagir com o resíduo AGN 20, localizado em um lado do sítio ativo e os resíduos LEU 295 e GLN 192, localizados no outro lado do sítio ativo.

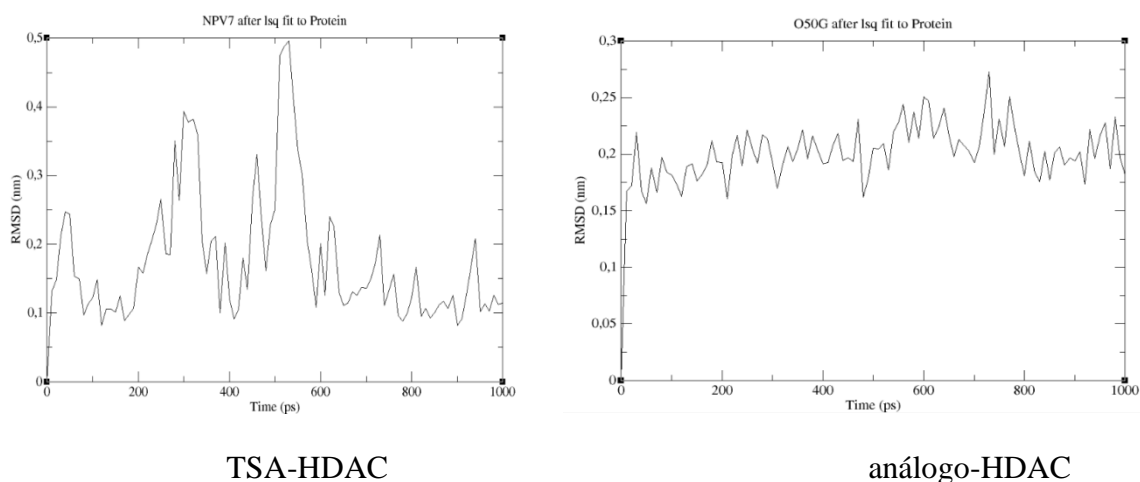


Figura 16. RMSD das interações TSA-HDAC e análogo-HDAC com o grupo betaína na posição 5.

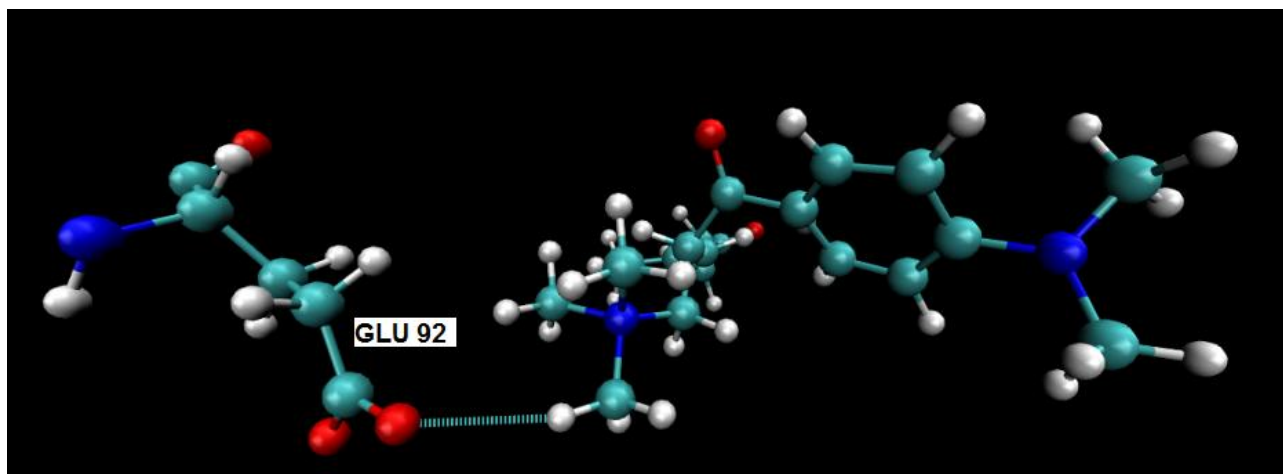


Figura 17. Ligação de hidrogênio não clássica entre grupo catiônico da betaína na posição 5 (figura 12) do análogo do TSA e o resíduo GLU 92.

7.2. Estudo das interações inibidor-AC

Impulsionados pelos resultados das interações do grupo catiônico das betaínas hidroxâmicas com a HDAC, as estruturas da figura 7 também foram testadas na metaloenzima AC. Das 300 conformações geradas nos cálculos, foi observado que todas as estruturas apresentaram energia de ligação negativa no complexo enzima-ligante. Os valores da energia de interação Ligante-AC estão apresentados na tabela 7. Os valores considerados são aqueles de menor energia, interagindo no sítio ativo.

Tabela 7. Valores de menor energia das conformações geradas nos cálculos de ancoragem molecular da interação ligante-AC.

Moléculas	Energia (Kcal.mol ⁻¹)
AH1	-6,08
BH1	-3,86
AH2	-4,52
BH2	-3,08*

Dentre todas as estruturas, a única que mostrou interações de mais baixa energia em outras regiões da AC II foi a BH2. A energia de interação dessa estrutura na outra região da

metaloenzima foi de -4,26 kcal/mol. Todavia, como o ligante BH2 é pequeno, é possível que essa estrutura tenha facilidade para interagir em outras regiões da metaloenzima. Além disso, o valor da energia de interação BH2-AC II no sítio ativo é mais alto, sugerindo que devem existir algumas repulsões dessa estrutura no sítio ativo da AC II (figura 18).

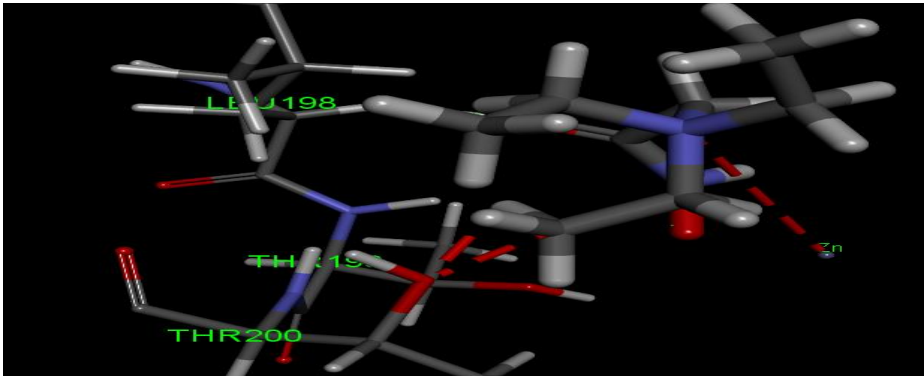


Figura 18. Repulsões da interação BH2-AC. A linha tracejada vermelha representa a repulsão entre as estruturas.

Embora a interação da BH2-AC seja favorável, do ponto de vista energético, as análises sugeriram algumas repulsões. O grupo catiônico de algumas betaínas hidroxâmicas sentiu a carga positiva do cofator Zn^{2+} da AC II, apresentando uma repulsão do tipo carga-carga. Já o ligante BH2 mostrou também repulsões na interação com a THR 200, correlacionada com a proximidade das estruturas (contato de van der Waals). Provavelmente, esse fenômeno aconteceu devido os cálculos de ancoragem molecular não considerarem o ajuste induzido (LEHNINGER, 2013; VOET et. al., 2011).

Os cálculos para a interação BH1-AC II, semelhantemente à interação BH2-AC II, apontaram para uma repulsão entre as cargas positivas do cofator metálico Zn^{2+} e o seu grupo catiônico (Figura 19). Essas repulsões apresentadas nas interações BH1-AC e BH2-AC estão correlacionadas com a distância do cofator metálico ao grupo catiônico das betaínas. Provavelmente, as repulsões de cargas positivas sejam a principal razão para que os cálculos

de ancoragem molecular tenham gerado resultados de maior estabilidade para as interações AH1-AC e AH2-AC, em relação às interações BH1-AC e BH2-AC.

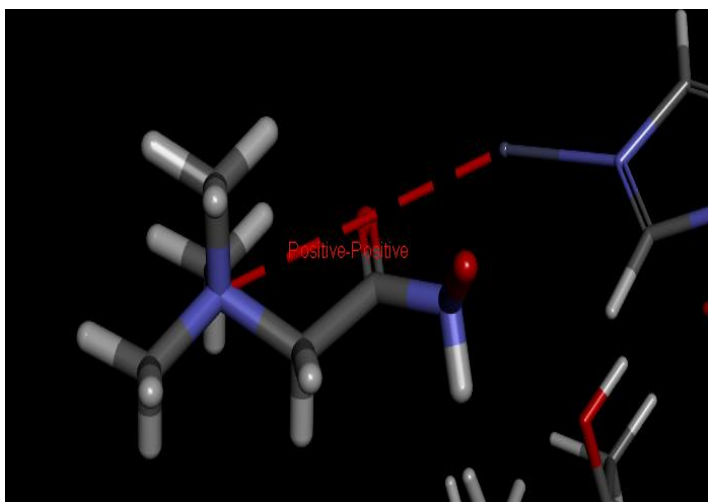


Figura 19. Repulsão eletrônica do cofator metálico Zn^{2+} e o grupo catiônico da BH1.

Contudo, por ter uma estrutura menor, a interação BH1-AC não apresentou contatos de van der Waals. Este resultado por ser um indicativo do porque que os grupos menores apresentaram energias de interação mais baixa quando comparado às suas respectivas classes de ligantes, nos cálculos de ancoragem molecular, embora as análises não tenham apontado esse tipo de repulsão para a interação AH2-AC II. Mais ainda, a inspeção visual dos cálculos mostrou que as interações entre os ácidos hidroxâmicos com os resíduos da AC II foram praticamente similares. Não obstante, é provável que a relação entre a disponibilidade geométrica e eletrônica entre as estruturas tenham favorecido a interação com a ramificação menor. Embora, isso possa ser verdadeiro, não é possível ratificar essas informações somente com os cálculos de ancoragem molecular, devido os cálculos considerarem a proteína rígida..

Ainda que, para essas estruturas, as betaínas hidroxâmicas tenham apresentado uma interação de maior energia, quando comparado aos ácidos hidroxâmicos, é possível verificar que o grupo catiônico do ligante BH1 formou uma ligação de hidrogênio não clássica do tipo $N^+C-H\cdots O^-$ com o aminoácido THR 200 (Figura 20). Além disso, a proximidade entre uma

das etilas da ramificação da BH2 com o aminoácido THR 200, ainda que muito próximo, pode sugerir uma forte interação, considerando um ajuste induzido naquela região. Considerando um distanciamento entre as cargas do cofator metálico da AC II e do grupo catiônico das betaínas hidroxâmicas, essas estruturas podem ter um bom efeito no processo de inibição dessas metaloenzimas.

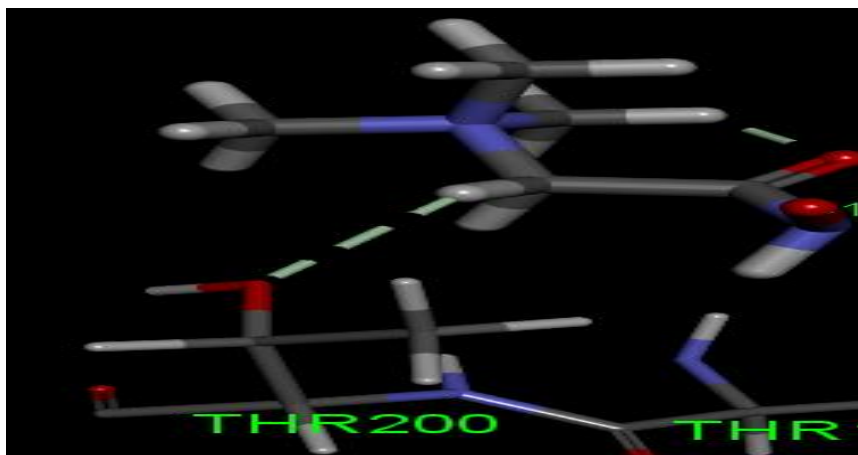


Figura 20. Ligação de hidrogênio não clássica do tipo $N^+C-H \cdots O^-$ com o aminoácido THR 200.

7.2.1 Análise das betaínas hidroxâmicas derivadas da N-(hidroxi)-benzamida.

O conhecimento da N-(Hidroxi)benzamida como um inibidor da AC II 25 e a descoberta da forte tendência do grupo catiônico das betaínas, para formar interações com o resíduo THR 200, direcionou a pesquisa para a realização de testes da N-(hidroxi)-benzamida, combinada com o grupo catiônico das betaínas hidroxâmicas. As energias de interação das combinações possíveis mostradas na Figura 21 estão apresentadas na Tabela 8.

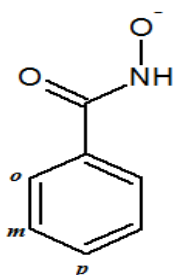


Figura 21. N-(hidroxi)-benzamida. As betaínas hidroxâmicas foram inseridas nas posições orto (*o*), para (*p*) e meta (*m*) do ligante.

Tabela 8. Valores da interação das N-(hidroxi)-benzamida-AC combinadas com o grupo catiônico das betaínas.

Moléculas	Energia (Kcal/mol)
N-(hidroxi)-benzamida	-5,91
<i>o</i> -betaína-N-(hidroxi)-benzamida	-4,92
<i>m</i> -betaína-N-(hidroxi)-benzamida	-6,14
<i>p</i> -betaína-N-(hidroxi)-benzamida	-9,03

De acordo com os cálculos de ancoragem molecular, a substituição na posição meta e na posição para geraram os melhores resultados na interação com a metaloenzima AC. É provável que esse melhor resultado esteja correlacionado com as ligações de hidrogênio não clássicas do tipo do tipo N+C-H...O e minimização das interações intramoleculares. Os ligantes *m*-betaína-N-(hidroxi)-benzamida e *p*-betaína-N-(hidroxi)-benzamida apresentam esse tipo de ligação com os aminoácidos PRO 201 e THR 200 (figura 22).

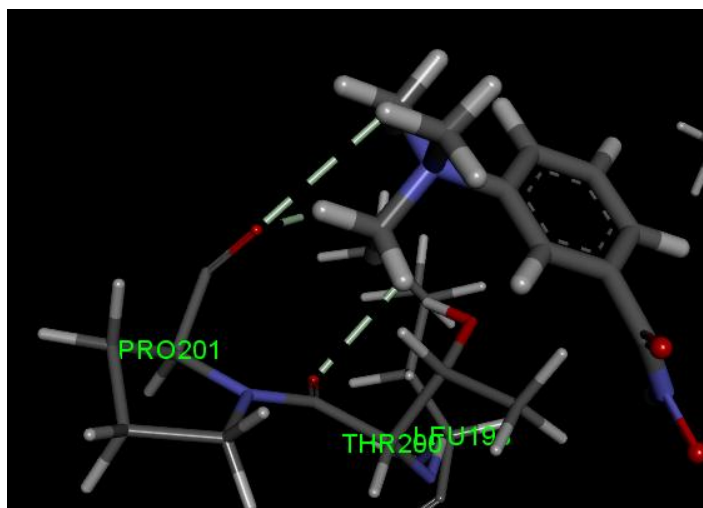


Figura 22. Ligações de hidrogênio não clássica do tipo $N^+C-H\cdots O$ da interação *m*-betaína-N-(hidroxi)-benzamida-AC.

Comparando as estruturas *m*-betaína-N-(hidroxi)-benzamida e *p*-betaína-N-(hidroxi)-benzamida, foi observado o grupo catiônico das betaínas na posição meta favoreceu uma melhor interação com os resíduos para a formação de ligações de hidrogênio. Contudo, a estrutura *p*-betaína-N-(hidroxi)-benzamida teve uma menor energia de ligação, de acordo com os cálculos de ancoragem molecular. É possível que a inserção do grupo catiônico na posição para tenha uma menor energia de interação por minimizar ao máximo as interações intramoleculares entre o grupo carbamato e o grupo catiônico.

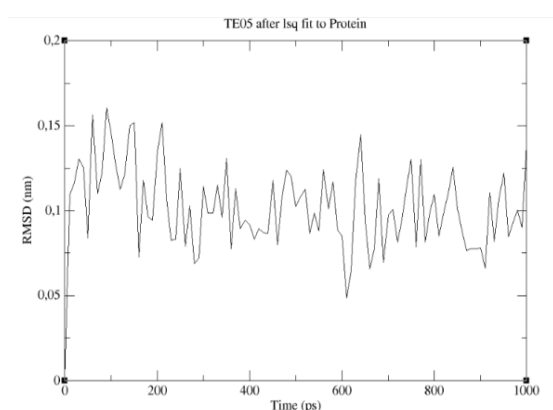
7.2.2. Estudos de Dinâmica Molecular da Interação inibidor-AC

Os complexos inibidor-AC também foram caracterizados com ensaios de DM para investigar a estabilidade, as alterações conformacionais e o comportamento dos inibidores no sítio ativo da AC. Essas características foram analisadas por meio das mudanças, plotadas no gráfico de RMSD (Root mean Square Deviation). A figura 23 mostra o comportamento da interação inibidor-HDAC dos ligantes AH1, AH2, BH1 e BH2.

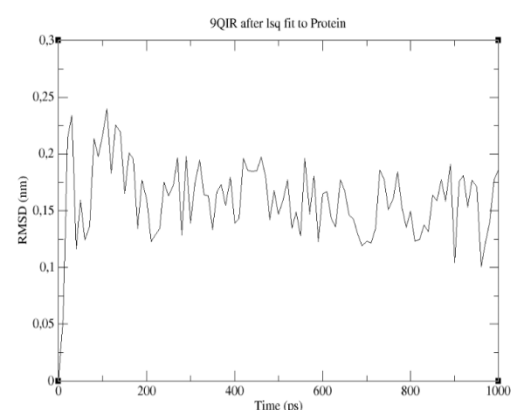
7.2.2.1. Comparação de estabilidade

Em relação à estabilidade dos ligantes, na interação inibidor-AC, os estudos de DM apontaram para uma estabilidade do sistema. Os estudos das interações desses ligantes, dentro do tempo de 1000ps, à temperatura de 309,15K mostraram os valores para o RMSD $\sim 1\text{\AA}$, comprovando tal estabilidade. Esses resultados de DM estão de acordo aos cálculos de ancoragem molecular, visto que esses cálculos previram a estabilidade dos ligantes no sítio ativo da metaloenzima.

No sítio ativo da AC, as betaínas hidroxâmicas também mostraram ser mais estáveis do que os ácidos hidroxâmicos de volume similar, nos cálculos de DM. Essa maior estabilidade acontece porque o grupo catiônico desses ligantes interage com grupos eletronegativos de resíduos próximos, formando fortes interações, como ligações de hidrogênio não clássicas e interações do tipo π -cátion. Essa maior estabilidade das betaínas hidroxâmicas na interação inibidor-AC, em relação aos ácidos hidroxâmicos, contradiz os resultados obtidos na ancoragem molecular, referente às repulsões entre o cofator da metaloenzima e o grupo catiônico das betaínas.



A



B

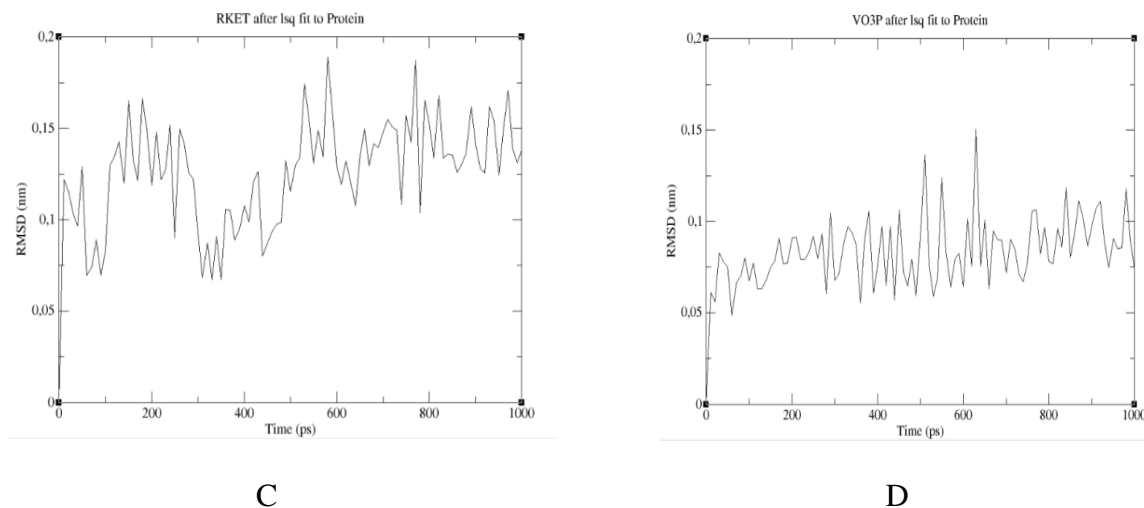


Figura 23. RMSD dos ligantes na interação inibidor-AC. O RMSD dos ligantes plotados nos gráficos de A-D são referentes à sua estabilidade no sítio ativo. **A)** interação AH1-AC; **B)** interação BH1-AC; **C)** interação AH2-AC; **D)** interação BH2-AC.

7.2.2.2. Interações inibidor-AC

No mecanismo de catálise da AC, vários resíduos contidos na parte hidrofílica são importantes na estabilização das cargas no sítio ativo. Os resultados dos cálculos de DM mostraram que, para todos os ligantes, os oxigênios do grupo hidroxamato interagem com o cofator Zn^{2+} dessa metaloenzima e o resíduo orgânico interage na região hidrofílica do sítio ativo da AC. Para as betaínas hidroxâmicas eram esperadas tais interações, devido serem favorecidas pela atração eletrostática do seu grupo catiônico com os resíduos eletronegativos localizados no sítio ativo. Já os ácidos hidroxâmicos, provavelmente, interagiram nessa região por causa dos efeitos de indução das cargas atômicas.

Dentre os resíduos localizados no sítio ativo da AC, os ligantes apresentaram uma melhor interação com a TYR 199, HIS 94, LEU 198, GLN 92 ASN 67 e ASN 62. As interações TYR199-O...H-N-hidroxamato são típicas e foram visualizadas para todos os ligantes. Os ligantes maiores (BH2 e AH2) tiveram uma maior interação com esses resíduos. Isso aconteceu, provavelmente, porque os grupos etilas, ligados ao carbono tetraédrico (AH2),

e os grupos etilas, localizados no grupo catiônico (BH₂), proporcionaram uma maior proximidade com esses resíduos.

7.2.2.3. Análise de Dinâmica Molecular para os análogos da N-Hidroxi-Benzamida

As interações N-(hidroxi)benzamida-AC e análogo-AC com o grupo catiônico nas posições *orto*, *meta* e *para* também foram caracterizadas por DM. A plotagem do RMSD para esses ligantes, no tempo de 1000ps, está apresentada na figura 24. De acordo aos cálculos de DM, N,N,N-metil-*p*-N-hidroxi-benzamida-AC e a N,N,N-metil-*m*-N-hidroxi-benzamida-AC apresentaram estabilidades similares à N-(hidroxi)benzamida. A alta estabilidade dos análogos betaína se deve ao grupo catiônico estar localizado próximo de átomos eletronegativos, os quais permitem essa estabilidade.

Do ponto de vista das interações, tanto o grupo catiônico na posição *meta*, quanto na posição *para*, da N-hidroxi-benzamida, interage com os mesmos resíduos (LEU 198, GLN 92, ASN 67, ASN 62). Além disso, ao comparar a energia potencial da interação desses dois inibidores com a AC, são extremamente próximos. Porém, de acordo aos resultados de ancoragem molecular, a energia de ligação N,N,N-metil-*p*-N-hidroxi-benzamida-AC é menor quando comparada energia de ligação N,N,N-metil-*m*-N-hidroxi-benzamida-AC. Essa diferença da energia de ligação pode esta associada com as interações intramolecular desses ligantes. Ou seja, como há uma maior interação intramolecular do grupo catiônico com o grupo hidroxamato na N,N,N-metil-*m*-N-hidroxi-benzamida, em relação ao ligante N,N,N-metil-*p*-N-hidroxi-benzamida, a reatividade desse composto diminui, o que pode justificar o resultados da ancoragem molecular. Dessarte, é provável que a N,N,N-metil-*p*-N-hidroxi-benzamida seja mais reativa com a AC, em relação aos outros ligantes.

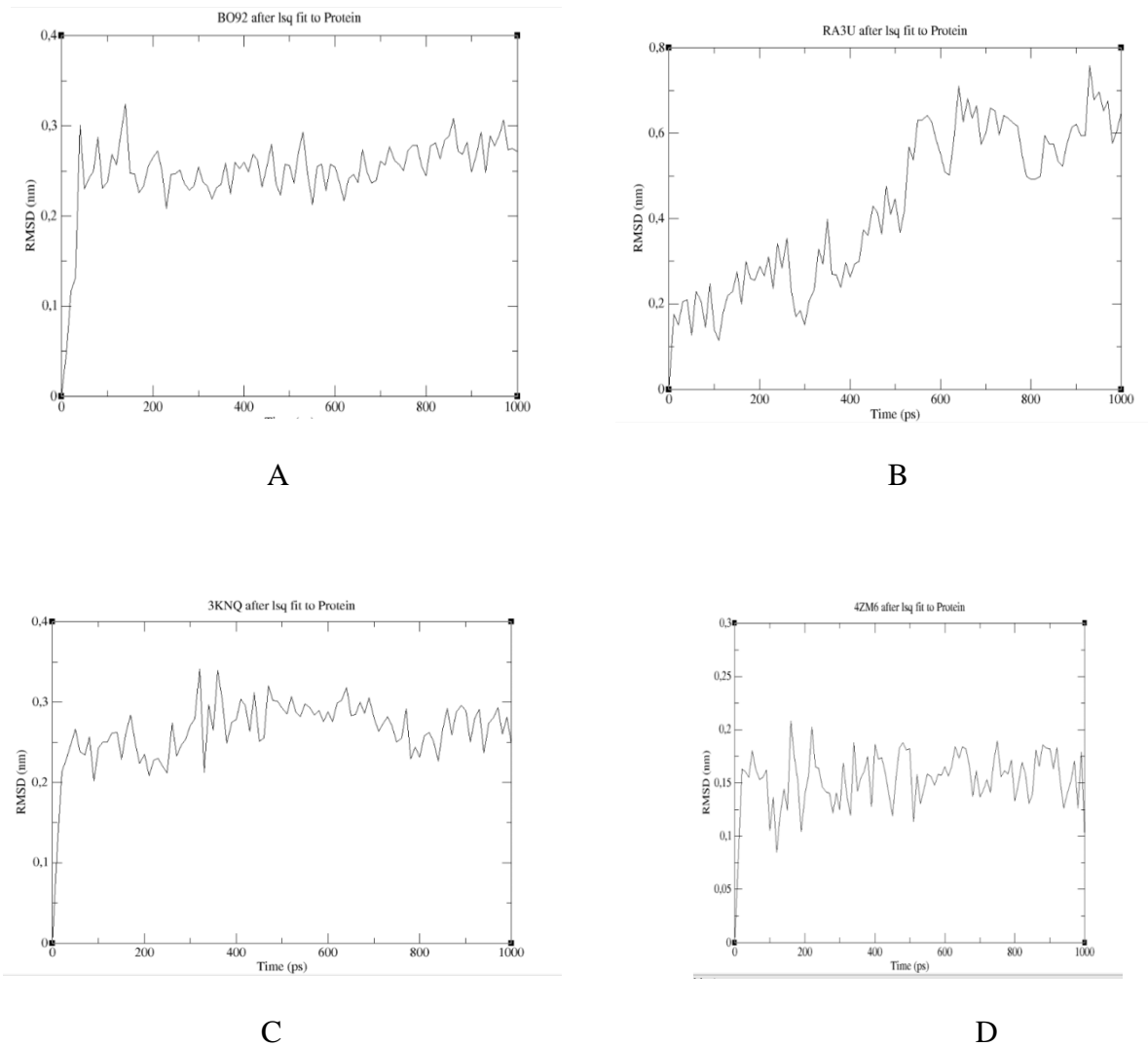


Figura 24. RMSD da N-hidroxi-benzamida e das betaínas derivadas no processo de inibição da AC. O RMSD dos ligantes plotados nos gráficos de A-D são referentes à sua estabilidade no sítio ativo. **A)** interação N-hidroxi-benzamida-AC; **B)** interação N,N,N-metil-*o*-N-hidroxi-benzamida-AC; **C)** interação N,N,N-metil-*m*-N-hidroxi-benzamida-AC; **D)** interação N,N,N-metil-*p*-N-hidroxi-benzamida-AC.

8. CONCLUSÕES

De acordo com os métodos de ancoragem molecular adotados no presente trabalho, as betaínas hidroxâmicas de síntese conhecida (figura 7) apresentaram menor interação com as metaloenzimas AC e HDAC, devido sentirem o efeito das cargas do cofator inorgânico, o íon Zn^{2+} . Todavia, em cálculos de DM as repulsões entre as cargas positivas do cofator metálico Zn^{2+} e o grupo catiônico das betaínas não existiu, evidenciado pela forte quelação dos átomos de oxigênio do grupo carbamato das betaínas hidroxâmicas. E ainda, o grupo catiônico das betaínas hidroxâmicas apresentaram boas interações com os resíduos laterais próximos de ambas as metaloenzimas, que apresentavam alta densidade eletrônica.

A combinação do TSA com o grupo catiônico das betaínas hidroxâmicas potencializou, por meio de cálculos de ancoragem molecular, a interação com a metaloenzima HDAC, para diversas substituições efetuadas na cadeia da estrutura (figura 12). Com essa combinação foram visualizadas várias ligações de hidrogênio não clássicas com o aminoácido GLU 92 no sítio ativo da metaloenzima. Mais ainda, o grupo catiônico também favoreceu a interações do tipo pi-cátion na cavidade adjacente ao cofator metálico. Nesse sentido, o grupo catiônico das betaínas pode começar a ser pensado como um potencial inibidor da enzima HDAC. A interação do grupo catiônico da estrutura substituída na posição 5 do TSA foi também evidenciada nos cálculos de DM.

A combinação da N-(hidroxi)-benzamida com o grupo catiônico das betaínas hidroxâmicas, nas posições meta e para também potencializaram a interação com a enzima AC. Essa combinação proporcionou ligações de hidrogênio com o aminoácidos laterais PRO 201 e THR 200, potencializando a interação. Nesse sentido, os cálculos de ancoragem

molecular também demonstraram que o uso do grupo das betaínas hidroxâmicas pode ser interessantes no desenvolvimento de novos inibidores da metaloenzima AC.

Os cálculos de DM mostraram que as betaínas hidroxâmicas possuem maior estabilidade, demonstrado pelos valores de RMSD por apresentarem menor desvio. Isso provavelmente se dá pela alta interação do grupo catiônico das betaínas hidroxâmicas que por interagirem fortemente com grupos eletronegativos, permanecem por mais tempo em determinada região. Nesse sentido, o uso das betaínas hidroxâmicas pode ser um caminho viável para o desenvolvimento de novos fármacos.

9. REFERÊNCIAS

ALTERIO, V.; DI FIORE, A.; D'AMBROSIO, K.; et. al. Multiple Binding Modes of Inhibitors to Carbonic Anhydrases: How to Design Specific Drugs Targeting 15 Different Isoforms? *Chemicals Reviews*. p. A-AV. 2012

SUPURAN, C. T. Structure and function of carbonic anhydrases. *Biochemistry Journal*. v. 473, p. 2023-2032. 2016.

ANDREWS, K. T.; HAQUE, A.; JONES, M. K. HDAC inhibitors in parasitic diseases. *Immunol. Cell Biology*. v. 90, p. 66-77, 2012.

BARBER, A. K.; FISHER, J. R. A Mechanism of Action for Carboxypeptidase A. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v. 69, n. 10, p. 2970-2974. 1972

BELAKAVADI, M.; PRABHAKAR, B.T.; SALIMATH, B. P. Purification and characterization of butyrate-induced protein phosphatase involved in apoptosis of Ehrlich ascites tumor cells. *B.B.A.-General subjects*. v. 1770, p. 39-47, 2007.

BOONE, C. D.; PINARD, M.; McKENNA, R.; et. al. In Catalytic Mechanism of α -Class Carbonic Anhydrases: CO₂ Hydration and Proton Transfer. ed.: FROST. S. C.; McKENNA, R. Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications, 2014, Springer Berlin Heidelberg, New York, ch. 3, pp. 31-52.

BRANDL, M.; WEISS, M. S.; JABS, A.; SÜHNEL, J.; et.al. C-h \cdots π -interactions in proteins. *J. Mol. Biol.*, v. 307, p.357-377, 2001

CAPASSO, C.; SUPURAN, C. Anti-infective carbonic anhydrase inhibitors: a patent and literature review. *Expert Opin Ther Pat.* v. 23, n. 6, p. 693-704, 2013.

CHAUDHARY, K. K.; MISHRA, M. A Review on Molecular Docking: Novel Tool for Drug Discovery. *JSM chemistry.* v. 4, n. 3, 1029-1031p., 2016.

CHEN, J.; GHAZAWI, F. M.; BAKKAR, W. Valproic acid and butyrate induce apoptosis in human cancer cells through inhibition of gene expression of Akt/protein kinase B. *Molecular Cancer.* v. 5, 2006.

COPELAND, R. A. **ENZYMES: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis.** 2. ed. Nova Iorque: John Wiley & Sons, 2000.

COTTON, F. A.; WILKINSON, G. **ADVANCED INORGANIC CHEMISTRY: A Comprehensive Text.** v.1. 5ed. Nova Iorque: John Wiley & Sons, 1988.

COUSENS, L.S.; GALLWITZ, D.; ALBERTS, B. M. Different accessibilities in chromatin to histone acetylase. *Journal of Biological Chemistry.* v. 254, p. 1716-1723, 1979.

Del Prete, S., Vullo, D., Fisher, G.M., Andrews, K.T., Poulsen, S.A., Capasso, C. And Supuran, C.T. Discovery of a new family of carbonic anhydrases in the malaria pathogen *Plasmodium falciparum* – the η -carbonic anhydrases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* v. 15, p. 4389–4396. 2014.

DUAN, Y.; WU, C.; CHOUDHURY, S.; et. al. A Point-Charge Force Field for Molecular Mechanics Simulations of Proteins Based on Condensed-Phase Quantum Mechanical Calculations. *Journal of Computational Chemistry.* v. 24, p. 1999-2012, 2003.

DUARTE, H. A.; ROCHA, W. R. *Teoria do Funcional da Densidade*. Cap. 3, p. 73-111. In: In: MORGON, N. H.; COUTINHO, K. **Métodos de Química Teórica e Computacional**. ed. 1. São Paulo: Livraria da Física, 2007. 539p.

ELLIS, W. R. Metalloenzymes. In: **Reviews in Cell Biology and Molecular Medicine**. Wiley, 2006.

EOT-HOULLIER, G.; FULCRAND, G.; MAGHINANI-JAULI, L.; et. al. Histone deacetylase inhibitors and genomic instability. *Cancer Letters*. v. 274, p. 169-176, 2008.

FALKENBERG, K. J.; JOHNSTONE, R. W. Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. *Nature Review in Drug Discovery*. v. 13, p. 673-691, 2014.

EVANS W. P.; NAIK, A. R. Hydroxamic Betaines - US Patent 4,020,100, 1977.

FIORE, D. A.; MARESCA, A.; SUPURAN, C. T.; et. al. Hydroxamate represents a versatile zinc binding group for the development of new carbonic anhydrase inhibitors. *Chemical Communication*. v. 40, p. 8838-8840.

FROST, S. C. In *Physiological Functions of the Alpha Class of Carbonic Anhydrases*. ed.: FROST, S. C.; McKENNA, R. *Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications*, 2014, Springer Berlin Heidelberg, New York, ch. 2, pp. 9-30.

GRANOVSKY A. A., Firefly version 8.2.G Acessado em: 15 dez 2016 disponível em: <<http://classic.chem.msu.su/gran/firefly/index.html>>

GROZINGER, C.M.; SCHREIBER, S.L. Deacetylase enzymes: biological functions and the use of small-molecule inhibitors. *Chemical Biology*. v. 9, p. 3-16, 2002.

GUPTA, S. P.; SHARMA, A. in *The Chemistry of Hydroxamic Acids*. ed.: Hydroxamates Acids: A Unique Family of Chemicals with Multiple Biological Activities, 2013, Springer Berlin Heidelberg, New York, ch 1, pp. 1-17.

HENDERSON, C.; BRANCOLINI, C. Apoptotic pathways activated by histone deacetylase inhibitors: implications for the drug-resistant phenotype. *Drug Resistance Updates*. v. 6, p. 247-256, 2003.

HIGGINS, F. S.; MAGLIOCO, L. G.; COLTHUP, N. B. Infrared and Raman spectroscopy study of alkyl hydroxamic acid and alkyl hydroxamate isomers. *Applied Spectroscopy*. v. 60, n. 3, p. 279-287, 2006.

HUHEEY, J. E.; KEITER, E. A. **Inorganic Chemistry: Principles of Structure and Reactivity**. 4ed. Nova Iorque: Harper Collins College Publishers. 1993.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC)

Compendium of **Chemical Terminology – Gold Book**. Disponível em:

<www.goldbook.iupac.org> Acesso em: 4 jul 2016.

KAKKAR, R. *Theoretical Studies on Hydroxamic Acids: Hydroxamates Acids: A Unique Family of Chemicals with Multiple Biological Activities*, 2013, Springer Berlin Heidelberg, New York, ch 1, pp. 19-53.

KUNTZ, I. D.; BLANEY, J. M.; OATLEY, S. J.; et. al. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *Journal of Molecular Biology*. v. 161, n. 2, 269-288 p., 1982.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of Biochemistry**. 6. ed. Nova Iorque: W. H. FREEMAN AND COMPANY, 2013.

LEY, V.; ANDREWS, N.M.; ROBBINS, E.S.; et. al.. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *Journal of Experimental Medicine*. v. 168, p. 649-659.

LEWIS, E. G.; **COMPUTATIONAL CHEMISTRY: Introduction to the Theory and Applications of Molecular and Quantum Mechanics**. 2. Ed. New York: Springer, 2011. 664.

LIONETTO, M. G.; CARICATO, R.; GIORDANO, M. E.; et. al. Carbonic Anhydrase and Heavy Metals. In: DENIZ, E. **Biochemistry**. 2012. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/biochemistry>>.

LIU, T.; KULJACA, S.; TEE, A.; et.al. Histone deacetylase inhibitors: Multifunctional anticancer agents. *Cancer treatment Reviews*. v. 32, p. 157-165, 2006.

LI, Y.; SETO, E. HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy. *Cold Spring Harbor Perspective in Medicine*. v. 6, 2016.

LOMBARDI, P. M.; COLE, K. M.; DOWNLING, D. P.; et. al. Structure, mechanism, and inhibition of histone deacetylases and related metalloenzymes. *Current Opinion of Structural Biology*. v. 21, p. 735-743, 2011.

Lubert Stryer; Bioquímica; 3ª ed, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1992.

McCALL, K. A.; HUANG, C.; FIERKE, C. A. Function and Mechanism of Zinc Metalloenzymes. *The Journal of Nutrition*. v. 130, n. 5, p. 14375 – 1446. 2000.

MAI, A.; ALTUCCI, L. Epi-drugs to fight cancer: From chemistry to cancer treatment, the road ahead. *International Journal of Biochemistry of the Cell B*. v. 41, p. 199-213, 2009.

MARTINEZ, L.; BORIN, I.; SKAF, M. S. *Fundamentos de Simulação por Dinâmica Molecular*. Cap. 12, p. 413-452. In: MORGON, N. H.; COUTINHO, K. **Métodos de Química Teórica e Computacional**. ed. 1. São Paulo: Livraria da Física, 2007. 539p.

MARTIN, M.; KETTMANN, R.; DEQUIED, F. Class IIa histone deacetylases: regulating the regulators. *Oncogene*. v. 26, p. 5450-5467, 2007.

MARTINS-SANTOS, D.; FORLI, S.; RAMOS, M. J.; et. al. AUTODOCK4ZN: An Improved AutoDock Force Field for Small-Molecule Docking to Zinc Metalloproteins. *Journal of Chemical Information and Modeling*. v. 54, n. 8, p. 2371-2379. 2014.

Meinke P T, Schmatz D, Fisher M H, WO200107042-A, Novel apicidin-derived cyclic tetrapeptides useful for treating protozoal infections, MERCK & CO INC, 2002.

MONNERET, C. Histone deacetylase inhibitors. *European Journal of Medicine Chemistry*. v. 40, p. 1-13, 2005.

MENDES, Y. S.; ALVES, N. S.; SOUZA, T. L.; et. al. The Structural Dynamics of the Flavivirus Fusion Peptide–Membrane Interaction. *Plos One*. , v.7, p.e47596, 2012.

MENG, X.; ZHANG, H.; MEZEI, M.; et. al. Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. *Current computational Aided Drug Design*. v. 7, n. 2, 146-157p., 2011.

METHOT, J. L.; CHAKRAVART, P. K.; CHENARD, M.; et. al. Exploration of the internal cavity of histone deacetylase (HDAC) with selective HDAC1/HDAC2 inhibitors (SHI-1:2). *Bioorg. Med. Chem. Lett*. v. 8, p. 973-978, 2008.

MOITESSIER, N.; ENGLEBIENNE, P.; LEE, D.; et. al. Towards the development of universal, fast and highly accurate docking/scoring methods: a long way to go. *British Journal of Pharmacology*. v. 153, S7-S26, 2008. 2008.

MORADEI, O. M.; MALLAIS, T. C.; FRECHETTE, S.; et. al. Novel Aminophenyl Benzamide-Type Histone Deacetylase Inhibitors with Enhanced Potency and Selectivity. *J. Med. Chem*. v. 50, p. 5543-5549, 2007

Morris G. M., Huey R., Lindstrom W., Sanner M. F., Belew R. K., Goodsell D. S., Olson A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*. v. 30, p. 2785-2791, 2009.

OUAISSI, M.; OUAISSI, A.; Histone Deacetylase Enzymes as Potential Drug Targets in Cancer and Parasitic Diseases. *Journal of Biomedical Biotechnology*. p. 1-10, 2006.

PAN, P.; VERMELHO, A. B.; RODRIGUES, G. C.; et. al. Cloning, Characterization, and Sulfonamide and Thiol Inhibition Studies of an α -Carbonic Anhydrase from *Trypanosoma cruzi*, the Causative Agent of Chagas Disease. v. 56, p. 1761-1771, 2013.

PARKS, S. K.; CORMERAIS, Y.; DURIVALT, J.; et. al. Genetic disruption of the pH-regulating proteins Na^+/H^+ exchanger 1 (SLC9A1) and carbonic anhydrase 9 severely reduces growth of colon cancer cells. *Oncotarget*. v. 8, n. 6, p. 10225–10237, 2016.

PEARSON, R. G. Absolute electronegativity and hardness correlated with molecular orbital theory. *Proc. Nati. Acad. Sci.* v. 80, p. 8440-8441, 1986.

Pettersen E. F. , Goddard T. D., Huang C. C., Couch G. S., Greenblatt D. M., Meng E. C., Ferrin T. E. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.*, 2004 25, 1605-1612.

RAMOS, M.G.; RABELO F.L.A.; DUARTE, T.; et. al. Butyrate induces apoptosis in murine macrophages via caspase-3, but independent of autocrine synthesis of tumor necrosis factor and nitric oxide. *Brazilian Journal of Medicine Biology Research*. v. 35, p. 161-173, 2002.

RODRIGUES, G. C.; FEIJÓ, D. F.; BOZZA, M. T.; et.al. Design, synthesis, and evaluation of hydroxamic acid derivatives as promising agents for the management of Chagas disease. *Journal of medicinal chemistry*. v. 57, n. 2, p. 298-308, 2014.

SCOZZAFAVA, A.; SUPURAN, C. T.; CARTA, F. Antiobesity carbonic anhydrase inhibitors: a literature and patent review. *Expert Opin Ther Pat.* v. 23, n. 6, p. 725-735, 2013.

SMITH, B.C.; BEMU J.M. *Biochimica et Biophysica Acta.* v. 1789, 2009.

SOMANNA, N. K.; VALENTE, A. J.; KRENZ, M.; et. al Histone deacetyltransferase inhibitors Trichostatin A and Mocetinostat differentially regulate MMP9, IL-18 and RECK expression, and attenuate Angiotensin II-induced cardiac fibroblast migration and proliferation. *Hypertens. Res.* v. 39 p. 710-716, **2016**.

Solomons, T. W. Graham, and Craig B. Fryhle. 2012. **Organic chemistry**. Hoboken, NJ: John Wiley.

SUPURAN, C. T. Advances in structure-based drug discovery of carbonic anhydrase inhibitors. *Journal of Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology.* v. 12, p. 61-88, 2017.

Supuran, C.T. and Capasso, C. The eta-class carbonic anhydrases as drug targets for antimalarial agents. *Expert Opin. Ther. Targets* v. 19, p. 551–563. 2015.

SUPURAN, C.T. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat. Rev. Drug Discov.* v. 7, p. 168–181. 2008.

SUPURAN, C. T. Drug interaction considerations in the therapeutic use of carbonic anhydrase inhibitors. *Journal of Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*. v. 12, p. 423-431, 2016.

SUPURAN, C. T. How many carbonic anhydrase inhibition mechanisms exist? *J Enzyme Inhib Med Chem*, p. 1-16, 2015

SUPURAN, C. T. In Hydroxamates as Carbonic Anhydrase Inhibitors. ed.: Hydroxamates Acids: A Unique Family of Chemicals with Multiple Biological Activities, 2013, Springer Berlin Heidelberg, New York, ch 3, pp. 55-69.

SUPURAN, C. T. Structure and function of carbonic anhydrases. *Biochemistry Journal*. v. 473, p. 2023-2032. 2016.

VALLE, B. L.; AULD, D. S. Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry*. v. 29, p. 5647–5659. 1990.

Vanhaecke T., Papeleu P., Elaut G., Rogiers V. Trichostatin A - like Hydroxamate Histone Deacetylase Inhibitors as Therapeutic Agents: Toxicological Point of View. *Curr. Med. Chem.*, **2004** 11, 1629-1643.

Vigushin D. M., Ali S., Pace P. E., Mirsaidi N., Ito K., Adcock I., Coombes R. C. Trichostatin A Is a Histone Deacetylase Inhibitor with Potent Antitumor Activity against Breast Cancer in Vivo. *Clin. Cancer Res.* **2001** 7, 971-976.

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. 4. ed. Nova Iorque: John Wiley & Sons, 2011.

WAMBUA, M. K.; NALAWANSHA, D. A.; NEGMELDIN, A. T.; et. al. Mutagenesis Studies of the 14 Å Internal Cavity of Histone Deacetylase 1: Insights toward the Acetate-Escape Hypothesis and Selective Inhibitor Design. *Journal of Medicinal Chemistry*. v. 57, p. 642-650. 2014.

WANG, D.; WIEST, O.; HELQUIST, P. et. al. ON THE FUNCTION OF THE Å LONG INTERNAL CAVITY OF HISTONE DEACETYLASE-LIKE PROTEIN: Implications for the Design of Histone Deacetylase Inhibitors. *Journal of Medical Chemistry*. v. 47, p. 3409-3417.

WITTER, D. J., HARRINGTON, P.; WILSON, K. J.; et. al. Optimization of biaryl Selective HDAC1&2 Inhibitors (SHI-1:2). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* v. 18, p. 726-731, 2008.