

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA (FISIOPATOLOGIA E TOXICOLOGIA)
ÁREA DE TOXICOLOGIA

André Berndt Penteado

**Estudo estrutural e comparativo entre Sirtuínas 2 de diferentes
espécies de *Leishmania* por meio de Modelagem Comparativa e
Dinâmica Molecular**

São Paulo

2024

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA (FISIOPATOLOGIA E TOXICOLOGIA)
ÁREA DE TOXICOLOGIA

André Berndt Penteado

**Estudo estrutural e comparativo entre Sirtuínas 2 de diferentes
espécies de *Leishmania* por meio de Modelagem Comparativa e
Dinâmica Molecular**

Versão Corrigida

Dissertação para obtenção do título de Mestre
Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini

São Paulo

2024

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

P419e Penteado, André Berndt Estudo estrutural e comparativo entre Sirtuínas 2 de diferentes espécies de Leishmania por meio de Modelagem Comparativa e Dinâmica Molecular / André Berndt Penteado. - São Paulo, 2024.
186 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.

Orientador: Trossini, Gustavo Henrique Goulart

1. Modelagem Comparativa. 2. Dinâmica Molecular. 3. Sirtuína 2. 4. Leishmania. 5. Structure-Based Drug Design. I. T. II. Trossini, Gustavo Henrique Goulart, orientador.

André Berndt Penteado

**Estudo estrutural e comparativo entre Sirtuínas 2 de diferentes
espécies de *Leishmania* por meio de Modelagem Comparativa e
Dinâmica Molecular**

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do título de Mestre

Prof. Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini

Orientador/Presidente

Prof. Dr. Pedro Geraldo Pascutti

1o. Examinador

Prof. Dr. Alessandro Silva Nascimento

2o. Examinador

Prof. Dr. Hugo Verli

3o. Examinador

São Paulo, 03 de Maio de 2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP) pela oportunidade de desenvolver este projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida.

Ao Prof. Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini, pela parceria, pela confiança, pela sabedoria e por ter sido meu Professor Orientador neste curso de Mestrado.

Ao Doutor Renan Augusto Gomes, por ter me iniciado no conhecimento de biologia estrutural e das enzimas da família das Sirtuínas, entre outros ensinamentos.

Ao Doutor Gláucio Monteiro Ferreira, por ter me orientado no aprendizado de Modelagem e Dinâmica Molecular, entre outros ensinamentos.

Ao meu amigo, Doutor Daniel Ferreira de Lima Neto, por ter me iniciado no conhecimento de virologia e da metodologia de cálculos de energia de interação ligante - receptor, e por todas as discussões, ideias, ensinamentos e pela parceria.

Aos alunos e amigos do Laboratório para a Integração de Técnicas Experimentais e Computacionais (LITEC) por todas as discussões construtivas, por todos os ensinamentos e por toda a convivência e trabalho em grupo.

Por último, mas não menos importante, aos meus pais, por todo o suporte e apoio, todos os ensinamentos e toda a paciência.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

RESUMO

Penteado, A. B. **Estudo estrutural e comparativo entre Sirtuínas 2 de diferentes espécies de *Leishmania* por meio de Modelagem Comparativa e Dinâmica Molecular**. 2024. no. f. Dissertação para obtenção do título de Mestre do programa de Mestrado em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2024.

As leishmanioses são doenças negligenciadas que afetam mais de um bilhão e meio de pessoas ao redor do mundo, principalmente nos países em desenvolvimento, provocando grandes impactos socioeconômicos. Os fármacos disponíveis para o tratamento dessas doenças são ineficazes e apresentam graves efeitos adversos. O processo de pesquisa de novos fármacos envolve, entre outras coisas, a seleção de alvos bioquímicos essenciais para a sobrevivência e desenvolvimento do agente causador. Neste sentido, a Sirtuína 2, uma enzima epigenética com atividade hidrolase essencial para a sobrevivência dos parasitas do gênero *Leishmania* se apresenta como um alvo validado na busca de novos fármacos contra essas parasitoses. O planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor requer o conhecimento da estrutura tridimensional da proteína alvo. Desta forma, a elucidação estrutural e um estudo minucioso das Sirtuínas das várias espécies do gênero *Leishmania* apresenta-se como uma importante abordagem na aplicação desta estratégia na busca por agentes quimioterápicos. Até o momento, na família *Trypanosomatidae*, a única estrutura tridimensional resolvida experimentalmente de uma enzima Sirtuína 2 é a da espécie *L. infantum*. Assim, este trabalho aplicou a abordagem de Modelagem Comparativa utilizando o *software* Modeller na construção de modelos da Sir2rp1 das espécies *L. infantum*, *L. major* e *L. braziliensis*, cujas sequências de aminoácidos foram extraídas do banco de dados UNIProt. Os modelos construídos foram validados por meio da função de escore DOPE do Modeller e dos servidores PROCHECK, MolProbity e QMEAN, avaliando sua qualidade estereoquímica e seu enovelamento. Os ligantes naturais da enzima foram sobrepostos nos modelos construídos por alinhamento estrutural utilizando o *software* PyMol e os complexos validados foram submetidos a simulações de Dinâmica Molecular através do pacote GROMACS. Os complexos refinados foram então analisados por meio dos *softwares* PyMol e LigPlotPlus e dos pacotes GROMACS e gmx_MMPBSA, e foram estudados os sítios de ligação dos substratos e os resíduos de aminoácidos relevantes envolvidos em sua ligação e reconhecimento. A Modelagem Comparativa da Sirtuína 2 humana e seus homólogos das espécies *L. infantum*, *L. major* e *L. braziliensis*, as simulações de Dinâmica Molecular realizadas com os modelos enzimáticos construídos e validados complexados com seus ligantes naturais, os cálculos de energia de interação entre os modelos e seus substratos e o estudo estrutural comparativo realizado entre eles nos fornecem uma base teórica para a busca de novos inibidores da Sirtuína 2 que sejam mais seletivos e potentes contra as enzimas parasitárias, abrindo caminho para o desenvolvimento de candidatos a fármacos leishmanicidas mais seguros e eficazes.

Palavras-chave: Modelagem Comparativa, Dinâmica Molecular, Sirtuína 2, Sir2rp1, *Leishmania*, Tripanosomatídeos, Structure-Based Drug Design, SBDD, Epigenética, MMPBSA.

ABSTRACT

Penteado, A. B. **Structural and comparative study between Sirtuins 2 of different species of *Leishmania* by means of Comparative Modeling and Molecular Dynamics.** 2024. no. f. Dissertation for obtaining the title of Master of the Master's Degree program in Pharmacy (Physiopathology and Toxicology) - School of Pharmaceutical Sciences - University of São Paulo, São Paulo, 2024.

Leishmaniasis are neglected diseases that affect more than one and a half billion people around the world, mainly in developing countries, causing major socioeconomic impacts. The drugs available for the treatment of these diseases are ineffective and have serious adverse effects. The process of researching new drugs involves, among other things, the selection of biochemical targets essential for the survival and development of the causative agent. In this sense, Sirtuin 2, an epigenetic enzyme with hydrolase activity essential for the survival of parasites of the *Leishmania* genus, presents itself as a validated target in the search for new drugs against these parasites. Structure-Based Drug Design requires knowledge of the three-dimensional structure of the target protein. In this way, structural elucidation and a detailed study of Sirtuins from various species of the genus *Leishmania* presents itself as an important approach in the application of this strategy in the search for chemotherapeutic agents. To date, in the *Trypanosomatidae* family, the only experimentally resolved three-dimensional structure of a Sirtuin 2 enzyme is that of the species *L. infantum*. Thus, this work applied the Comparative Modeling approach using the Modeller software in the construction of Sir2rp1 models of the species *L. infantum*, *L. major* and *L. braziliensis*, whose amino acid sequences were retrieved from the UNIProt database. The constructed models were validated using Modeller's DOPE score function and the PROCHECK, MolProbity and QMEAN servers, evaluating their stereochemical quality and folding. The enzyme's natural ligands were superimposed on the built models by structural alignment using the PyMol software and the validated complexes were subjected to Molecular Dynamics simulations using the GROMACS package. The refined complexes were then analyzed using the PyMol and LigPlotPlus softwares and the GROMACS and gmx_MMPBSA packages, and the substrate binding sites and relevant amino acid residues involved in their binding and recognition were studied. The Comparative Modeling of human Sirtuin 2 and its homologues from the species *L. infantum*, *L. major* and *L. braziliensis*, the Molecular Dynamics simulations carried out with the constructed and validated enzymatic models complexed with their natural ligands, the interaction energy calculations between the models and their substrates and the comparative structural study carried out between them provide us with a theoretical basis for the search for new Sirtuin 2 inhibitors that are more selective and potent against the parasitic enzymes, paving the way for the development of safer and more effective leishmanicidal drug candidates.

Key words: Comparative Modeling, Molecular Dynamics, Sirtuin 2, Sir2rp1, *Leishmania*, Trypanosomatids, Structure-Based Drug Design, SBDD, Epigenetics, MMPBSA.

ATIVIDADES ACADÊMICAS DESENVOLVIDAS NO PERÍODO

Produção científica no período
<p>Publicação de artigo científico de revisão bibliográfica como primeiro autor, juntamente ao seu grupo de pesquisa, sobre os modos de ligação e mecanismos de inibição de inibidores conhecidos da Sirtuína 2 humana, intitulado “<i>Human Sirtuin 2 inhibitors, their mechanisms and binding modes</i>”, na revista indexada de circulação internacional <i>Future Medicinal Chemistry</i>. O trabalho fora realizado como parte do levantamento bibliográfico necessário para o desenvolvimento do projeto de mestrado envolvendo as enzimas ortólogas de espécies de Tripanosomatídeos, Sir2rp1 (<i>Sirtuin 2 related protein 1</i>).</p> <p>Penteado, A.B.; Hassanie, H.; Gomes, R.A.; Emery, F.S.; Trossini, G.H.G. Human sirtuin 2 inhibitors, their mechanisms and binding modes. <i>Future Medicinal Chemistry</i>, 2023. https://doi.org/10.4155/fmc-2022-0253</p>
<p>Publicação de um artigo de pesquisa científica como primeiro autor, junto à outro grupo de pesquisa, usando metodologias de Modelagem Molecular, Atracamento Molecular e Dinâmica Molecular em estudos envolvendo a evolução da glicoproteína do envelope do vírus da dengue e sua interação com o receptor humano DC-SIGN, intitulado “<i>Binding Evolution of the Dengue Virus Envelope Against DC-SIGN: A Combined Approach of Phylogenetics and Molecular Dynamics Analyses Over 30 Years of Dengue Virus in Brazil</i>”, na revista indexada de circulação internacional <i>Journal of Molecular Biology</i>.</p> <p>Penteado, A. B.; De Oliveira Ribeiro, G.; Lima Araújo, E. L.; Kato, R. B.; De Melo Freire, C. C.; De Araújo, J. M. G.; Da Luz Wallau, G.; Salvato, R. S.; De Jesus, R.; Bosco, G. G.; Franz, H. F.; Da Silva, P. E. A.; De Souza Leal, E.; Goulart Trossini, G. H.; De Lima Neto, D. F. Binding Evolution of the Dengue Virus Envelope Against DC-SIGN: A Combined Approach of Phylogenetics and Molecular Dynamics Analyses Over 30 Years of Dengue Virus in Brazil. <i>Journal of Molecular Biology</i>, 2024. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2024.168577</p> <p>O trabalho foi apresentado no 58º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (MEDTROP 2023), realizado no período de 10 a 13 de setembro de 2023, no Centro de Convenções de Salvador na cidade de Salvador, Bahia.</p>
<p>Publicação de artigo científico de revisão bibliográfica, juntamente a colegas de seu grupo de pesquisa, quanto a relevância da enzima epigenética histona metil transferase SETDB1</p>

(*SET Domain Bifurcated 1*) na fisiopatologia de uma gama de enfermidades, principalmente vários tipos de cânceres, e os esforços da comunidade científica no estudo da mesma como um alvo terapêutico e na busca por inibidores enzimáticos efetivos e seletivos como potenciais novos agentes quimioterapêuticos, intitulado “*SETDB1 as a cancer target: Challenges and perspectives in drug design*”, na revista indexada de circulação internacional *Royal Society of Chemistry – Medicinal Chemistry*. Hassanie, H.; Penteadó, A.B.; de Almeida, L.C.; Calil, R.; Emery F.S.; Costa-Lotufo, L.V.; Trossini, G.H.G. SETDB1 as a cancer target: Challenges and perspectives in drug design. *RSC Med Chem*. 2024.

<https://doi.org/10.1039/D3MD00366C>

Publicação de um artigo científico de *expert opinion*, juntamente a colegas de seu grupo de pesquisa e parceiros de outros grupos, quanto aos alvos biomoleculares contra Doença de Chagas no planejamento de novas farmacoterapias frente as infecções provocadas por parasitas da espécie *Trypanosoma cruzi*, intitulado “*Molecular targets for Chagas disease: validation, challenges and lead compounds for widely exploited targets*”, na revista indexada de circulação internacional *Expert Opinion On Therapeutic Targets*.

Souza, M.N.; Lapierre, T.J.W.J.D.; Marques, G.V.L.; Ferraz, W.R.; Penteadó, A.B.; Trossini, G.H.G.; Murta, S.M.F.; Oliveira, R.B.; Rezende Jr, C.O.; Ferreira, R.S. Molecular targets for Chagas disease: validation, challenges and lead compounds for widely exploited targets. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2023.

<https://doi.org/10.1080/14728222.2023.2264512>

Publicação de um artigo científico de *expert opinion*, juntamente a colegas de seu grupo de pesquisa e parceiros de outros grupos, quanto a estratégias de planejamento de fármacos visando superar a resistência a benznidazol desenvolvida por parasitas da espécie *Trypanosoma cruzi*, intitulado “*New drug discovery strategies for the treatment of benznidazole-resistance in Trypanosoma cruzi, the causative agent of Chagas disease*”, na revista indexada de circulação internacional *Expert Opinion On Drug Design*.

Murta, S. M. F.; Lemos Santana, P. A.; Jacques Dit Lapierre, T. J. W.; Penteadó, A. B.; El Hajje, M.; Navarro Vinha, T. C.; Liarte, D. B.; De Souza, M. L.; Goulart Trossini, G. H.; De Oliveira Rezende Júnior, C.; De Oliveira, R. B.; Ferreira, R. S. New Drug Discovery Strategies for the Treatment of Benznidazole-Resistance in Trypanosoma Cruzi, the

Causative Agent of Chagas Disease. *Expert Opinion on Drug Discovery* 2024, 19 (6), 741–753.

<https://doi.org/10.1080/17460441.2024.2349155>

Publicação de artigo científico de revisão bibliográfica, juntamente a seu grupo de pesquisa, quanto a abordagem de *Structure-Based Virtual Screening* (SBVS), explorando as metodologias e ferramentas utilizadas, bem como sua validação, fontes de erros em sua aplicação e casos de sucesso de seu uso na literatura, intitulado “*Structure-Based Virtual Screening: Successes and Pitfalls*”, no periódico *Journal of the Brazilian Chemical Society*.

Código do manuscrito: JBCHS-2024-0124.

Envolvimento, juntamente a seu grupo de pesquisa, em um trabalho de *Perspectives*, quanto aos fármacos atualmente aprovados para uso clínico cujos mecanismos de ação envolvem enzimas de caráter epigenético, intitulado “*FDA-Approved Epigenetic Drugs: History, Development, Medical Indication, Pharmacology and Synthesis*”, cujo manuscrito está em fase final de revisão e será submetido para publicação no periódico *Journal of Medicinal Chemistry* da *American Chemical Society* em breve.

Envolvimento com outro grupo de pesquisa, na aplicação das metodologias de Modelagem Molecular e de Dinâmica Molecular em estudos envolvendo as proteínas Spike do SARS-CoV-2, visando entender as interações das várias cepas do vírus com a enzima conversora da angiotensina 2 (ECA2) humana.

Desenvolvimento, junto a outro grupo de pesquisa, de um projeto envolvendo metodologias de Modelagem Molecular e de Dinâmica Molecular visando estudar a interação da fração Fab de um anticorpo monoclonal com a enzima trans-sialidase do parasita *Trypanosoma cruzi* por meio do *software* Modeller e dos pacotes GROMACS e gmx_MMPBSA.

Participação, junto a outro grupo de pesquisa, na aplicação das metodologias de Modelagem Molecular e de Dinâmica Molecular em estudos envolvendo o complexo proteico NSP10/NSP14 do SARS-CoV-2, e de fármacos que potencialmente influenciam na capacidade de corrigir erros genéticos provindos da replicação do vírus.

Contribuição à comunidade *open source* de desenvolvimento do pacote de simulações de Dinâmica Molecular GROMACS, ao notar um erro em uma das páginas do manual do *software*, e indicá-lo à comunidade, sugerindo a alteração que deveria ser feita. Esta foi

<p>aceita e já implementada.</p> <p>(https://gitlab.com/gromacs/gromacs/-/issues/4528#note_1072049380)</p>
<p>O resumo do trabalho de Mestrado foi aceito para apresentação de Pôster no Simpósio da <i>American Chemical Society</i> (ACS) que será realizado em março de 2024 em Nova Orleans, nos EUA.</p>
<p>Participação no simpósio internacional de química medicinal <i>BrazMedChem 2022</i>, realizado em Poços de Caldas, MG, no mês de setembro de 2022, onde apresentou um Pôster sobre seu trabalho, participou das palestras do evento e do <i>Workshop</i> de Jovens Pesquisadores que lá ocorreu.</p>
<p>Participação no II <i>Workshop</i> de Modelagem Molecular em <i>Drug Discovery</i> e <i>Drug Design</i> (WMMD3), que ocorreu no mês de novembro de 2022 na Universidade Federal do ABC em Santo André, SP, onde apresentou Pôster e realizou uma Apresentação Oral sobre o trabalho paralelo que conduziu envolvendo a proteína Spike do SARS-CoV-2, visando entender as interações das várias cepas do vírus com a enzima conversora da angiotensina 2 (ECA2) humana por meio de simulações de Dinâmica Molecular.</p>
<p>Participou do Simpósio em comemoração dos 50 anos do Programa de Pós-Graduação em Farmácia – Fisiopatologia e Toxicologia da FCF-USP realizado em novembro de 2022 na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, tendo apresentado Pôster sobre seu projeto de mestrado, que foi avaliado como sendo o segundo melhor Pôster apresentado no evento, e recebido Menção Honrosa pelo mesmo.</p>
<p>Participação no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE), realizando Estágio em Docência como Monitor na disciplina optativa do curso de Graduação em Farmácia e Bioquímica da FCF-USP, “Planejamento Avançado de Fármacos”, código FBF-0348 (4 créditos), juntamente a seu Orientador, tendo sido contemplado pela bolsa de auxílio do estágio.</p>
<p>Participação no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE), realizando Estágio em Docência como Monitor na disciplina obrigatória do curso de Graduação em Farmácia e Bioquímica da FCF-USP, “Química farmacêutica, Farmacodinâmica e Fisiopatologia das Doenças Endócrinas, Metabólicas e Cardiovasculares”, código 1001014-2 (7 créditos), juntamente a seu Orientador, tendo sido contemplado pela bolsa de auxílio do estágio.</p>

Disciplinas cursadas no período			
Código	Disciplina	Nº de créditos	Conceito
FBC5793-17/1	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia I, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP	1	A
ICB5756-2/1	Bioquímica Estrutural de Proteínas e Cristalografia Biomolecular, do Instituto de Ciências Biomédicas da USP	8	A
VCM5748-2/3	Preparação Pedagógica em Medicina Veterinária, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP	2	A
FBC5757-9/3	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia II, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP	1	A
QBQ5888-3/2	Tópicos em Metabolismo, do Instituto de Química da USP	8	A

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Regulação do nível de condensação da cromatina através da acetilação de histonas.
- Figura 2** - Relevância do controle epigenético para a sobrevivência de Tripanosomatídeos.
- Figura 3** - Distribuição das DTNs no mundo.
- Figura 4** - Ciclo de vida dos parasitas do gênero *Leishmania*.
- Figura 5** - Formas morfológicas dos parasitas do gênero *Leishmania*.
- Figura 6** - Mapa da população da América do Sul em risco de contrair Leishmaniose.
- Figura 7** - Estruturas químicas dos fármacos empregados na quimioterapia das Leishmanioses.
- Figura 8** - Dendrograma representando a distância de identidade entre as Sir2rp1 das espécies de Tripanosomatídeos estudadas neste trabalho e a Sirtuína 2 humana.
- Figura 9** - Estruturas químicas de compostos com atividade inibitória de Sirtuínas 2 de Tripanosomatídeos.
- Figura 10** - Representação do tipo *cartoon* da estrutura da cadeia principal da hSIRT2. Com os elementos da estrutura secundária rotulados.
- Figura 11** - Representação do tipo *cartoon* da estrutura da cadeia principal da hSIRT2 nas formas apo e holo.
- Figura 12** - Representação da superfície eletrônica da hSIRT2 nas formas apo e holo.
- Figura 13** - Representação do tipo *cartoon* da estrutura da cadeia principal da hSIRT2 ligada a seus substratos.
- Figura 14** - Representação da estrutura da hSIRT2 ligada a seus substratos.
- Figura 15** - Mecanismo catalítico proposto para a Sirtuína 2.
- Figura 16** - Representação da estrutura da hSIRT2 complexada à ligantes.
- Figura 17** - Representação em linhas das estruturas dos inibidores de Sirtuína exibidos posteriormente em complexo com a enzima.
- Figura 18** - Representação da estrutura da hSIRT2 ligada ao NAD⁺ e ao inibidor EX243.
- Figura 19** - Representação da estrutura da Sirtuína complexada à ligantes.
- Figura 20** - Representação da estrutura da hSIRT2 complexada à ligantes.
- Figura 21** - Representação da estrutura da hSIRT2 complexada à ligantes.
- Figura 22** - Representação da estrutura da hSIRT3 ligada a um inibidor competitivo do substrato e da nicotinamida.

Figura 23 - Representação das ligações que compõem a cadeia principal de um polipeptídeo.

Figura 24 - Diagrama de Ramachandran do modelo de Sir2rp1 de *L. major* gerado pelo *software* Modeller.

Figura 25 - Demais análises da qualidade do modelo de Sir2rp1 de *L. major* gerado por meio do *software* Modeller.

Figura 26 - Análise da qualidade local e global dos dez modelos de Sir2rp1 de *L. major* gerados pelo *software* Modeller realizada pela função DOPE score.

Figura 27 - Gráficos de variação de RMSD da cadeia principal do modelo de Sir2rp1 de *L. major* e do co-substrato NAD⁺ complexado ao mesmo ao longo das replicatas das simulações de DM conduzidas com e sem restrições de posicionamento.

Figura 28 - Gráficos de variação do número de ligações de hidrogênio formadas entre o modelo de Sir2rp1 de *L. major* e o co-substrato NAD⁺ complexado ao mesmo ao longo das replicatas das simulações de DM conduzidas com e sem restrições de posicionamento.

Figura 29 - Gráficos de RMSF dos resíduos de aminoácidos do modelo de Sir2rp1 de *L. major* ao longo das replicatas da simulação de DM conduzida sem restrições de posicionamento e predição de regiões intrinsecamente desordenadas.

Figura 30 - Gráficos de variação de raio de giro (R_g) do modelo de Sir2rp1 de *L. major* ao longo das replicatas da simulação de DM conduzida sem restrições de posicionamento.

Figura 31 - Gráficos de tamanho de cluster das replicatas das trajetórias da simulação de DM conduzida sem restrições de posicionamento com o modelo de Sir2rp1 de *L. major*.

Figura 32 - Estruturas centrais dos clusters mais populosos das três replicatas das trajetórias da simulação de DM conduzida sem restrições de posicionamento com o modelo de Sir2rp1 de *L. major* alinhadas estruturalmente.

Figura 33 - Gráficos de variação de RMSD da cadeia principal dos modelos de hSIRT2 e de Sir2rp1 de *L. infantum*, *L. major* e *L. braziliensis* ao longo do terceiro conjunto de simulações de DM conduzidas com uma frequência de amostragem mais densa.

Figura 34 - Gráficos de energia de ligação entre os modelos refinados de hSIRT2 e Sir2rp1 de *L. infantum*, *L. major* e *L. braziliensis* e seu co-substrato NAD⁺.

Figura 35 - Gráficos de análise de decomposição de energia de interação entre os modelos refinados de hSIRT2 e Sir2rp1 de *L. infantum*, *L. major* e *L. braziliensis* e seu co-substrato NAD⁺ e o resíduo de lisina acetilada de seu substrato peptídico.

Figura 36 - Ilustração da análise de decomposição de energia de interação entre os substratos naturais das Sirtuínas e os modelos refinados de hSIRT2 e Sir2rp1 de *L. infantum*, *L. major* e *L. braziliensis* realizada por meio do pacote gmx_MMPBSA.

Figura S1 - Diagramas de interação ligante-enzima do LigPlotPlus para os substratos da hSIRT2.

Figura S2 - Diagramas de interação ligante-enzima do LigPlotPlus para os produtos de reação da hSIRT2.

Figura S3 - Diagrama de interação ligante-enzima do LigPlotPlus para o inibidor enzimático da hSIRT2, EX243.

Figura S4 - Diagramas de interação ligante-enzima do LigPlotPlus para inibidores enzimáticos da Sirtuína humana.

Figura S5 - Representação da estrutura da hSIRT2 complexada a ligantes.

Figura S6 - Representação da estrutura da hSIRT2 complexada a ligantes.

Figura S7 - Diagrama de interação ligante-enzima do LigPlotPlus para um inibidor competitivo da nicotinamida e do substrato peptídico da hSIRT3.

Figura S8 - Representação da estrutura da hSIRT2 complexada a ligantes.

Figura S9 - Comparação entre os diagramas de Ramachandran dos modelos de Sir2rp1 de *L. major* gerados por diferentes plataformas de modelagem.

Figura S10 - Comparação entre os diagramas de ângulos Chi1-Chi2 dos modelos de Sir2rp1 de *L. major* gerados por diferentes plataformas de modelagem.

Figura S11 - Comparação entre os desvios de ângulos Ômega (ω) dos modelos de Sir2rp1 de *L. major* gerados por diferentes plataformas de modelagem.

Figura S12 - Comparação estrutural do modelo de Sir2rp1 de *L. major* após simulação de Dinâmica Molecular com os campos de força CHARMM36 e AMBER99SB-ILDN.

Figura S13 - Gráficos de variação do número de ligações de hidrogênio formadas entre o modelo de Sir2rp1 de *L. major* e o substrato peptídico fragmento do peptídeo p53 acetilado complexado ao mesmo ao longo das replicatas das simulações de DM conduzidas com e sem restrições de posicionamento.

Figura S14 - Diagramas de interação entre os modelos refinados de hSIRT2 e Sir2rp1 de *L. infantum*, *L. major* e *L. braziliensis* e seu co-substrato NAD.

Figura S15 - Diagramas de interação entre os modelos refinados de hSIRT2 e Sir2rp1 de *L. infantum*, *L. major* e *L. braziliensis* e o resíduo de lisina acetilada de seu substrato peptídico.

Figura S16 - Ilustração da análise dos sítios de ligação aos substratos dos modelos refinados de hSIRT2 e Sir2rp1 de *L. infantum*, *L. major* e *L. braziliensis* realizada por meio do servidor CavityPlus.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação entre a localização subcelular e as atividades catalíticas dos diferentes parálogos da Sirtuína humana e a identidade entre suas sequências primárias.

Tabela 2 - Substratos da Sirtuína 2 e o papel fisiológico de sua ação enzimática.

Tabela 3 - Comparação entre a localização subcelular e as atividades catalíticas dos diferentes parálogos da Sirtuína de *Leishmania major* e a identidade entre suas sequências primárias e àquelas dos ortólogos humanos hSIRT2, hSIRT4 e hSIRT.

Tabela 4 - Identidade entre as sequências primárias dos ortólogos da *Sirtuin 2 related protein 1* dos diferentes Tripanosomatídeos estudados neste trabalho e seu homólogo humano.

Tabela 5 - Comparação entre os resíduos de aminoácidos que formam os sítios de ligação aos substratos naturais dos modelos de Sirtuína estudados.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ADP	Adenosina difosfato
ADPr	Adenosina difosfato ribose
CADD	<i>Computer Aided Drug Design</i>
DFT	<i>Density-Functional Theory</i>
DM	Dinâmica Molecular
DTN	Doenças Tropicais Negligenciadas
GAFF	<i>General Amber Force Field</i>
HF	<i>Hartree-Fock method</i>
HDAC	<i>Histone Deacetylase</i>
hSIRT	<i>Human Sirtuin</i>
KDAC	<i>Lysine Deacetylase</i>
LiSir2rp1	<i>Leishmania infantum Sirtuin 2 related protein 1</i>
MMPBSA	<i>Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area</i>
MQ	Mecânica Quântica
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NES	<i>Nuclear Export Sequence</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBC	<i>Periodic Boundary Conditions</i>
PDAC	<i>Protein Deacetylase</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PME	<i>Particle Mesh Ewald</i>
R_g	<i>Radius of Gyration</i>
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
RMSF	<i>Root Mean Square Fluctuation</i>
SBDD	<i>Structure Based Drug Design</i>
SBVS	<i>Structure Based Virtual Screening</i>
Sirtuin	<i>Silent Information Regulator (Sirtuína)</i>
Sir2	Sirtuína 2
Sir2rp1	<i>Sirtuin 2 related protein 1</i>
Sir2rp2	<i>Sirtuin 2 related protein 2</i>
Sir2rp3	<i>Sirtuin 2 related protein 3</i>
UniProt	<i>The Universal Protein Knowledgebase</i>
-TΔS	Variação de Entropia
ΔG	Variação da energia livre de Gibbs
ΔH	Variação de Entalpia
σ_{EI}	Desvio padrão do valor da energia de interação

SUMÁRIO

	Pág.
AGRADECIMENTOS.....	1
RESUMO.....	2
ABSTRACT.....	3
ATIVIDADES ACADÊMICAS DESENVOLVIDAS NO PERÍODO.....	4
DISCIPLINAS CURSADAS NO PERÍODO.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	13
SUMÁRIO.....	14
1.INTRODUÇÃO.....	15
2.OBJETIVOS.....	39
3.MATERIAIS.....	40
4.MÉTODOS.....	41
5.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
6.CONCLUSÕES.....	122
7.BIBLIOGRAFIA.....	123
8.ANEXOS.....	135

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Epigenética*

A epigenética é um fenômeno no qual uma mudança fenotípica é observada em um indivíduo, sem alteração da sequência de nucleotídeos que compõem seu material genético, ou genótipo. Isso ocorre por meio de modificações estruturais que alteram a atividade dos processos de transcrição, replicação e reparo gênico em locais específicos da sequência genética. Ao alterar a atividade transcricional em determinadas regiões do genoma, a expressão dos genes é alterada, e o controle sobre este processo permite que um mesmo genoma contenha vários repertórios gênicos que, ao terem sua atividade intercalada, permitem a expressão de diferentes fenótipos celulares pelo mesmo organismo ou espécie (DEANS; MAGGERT, 2015; GUJRAL et al., 2020; SKVORTSOVA; IOVINO; BOGDANOVIĆ, 2018).

As sequências de DNA que compõem os cromossomos são altamente empacotadas em complexos com proteínas chamadas histonas, formando a cromatina do núcleo celular em organismos eucarióticos (Figura 1). Para que os genes presentes nos cromossomos sejam expressos, a região do material genético que os contém deve ser desempacotada, permitindo assim o acesso das proteínas envolvidas no processo de transcrição, como fatores de transcrição e transcriptases (GUJRAL et al., 2020; HOGG et al., 2020; ZHANG; LU; CHANG, 2020).

As principais alterações estruturais epigenéticas que influenciam o controle da expressão gênica são a metilação das bases nitrogenadas do DNA e a acetilação, metilação, ubiquitinação e fosforilação das histonas. A acetilação das histonas reduz sua afinidade pelo DNA e, assim, leva a uma diminuição no nível de empacotamento do material genético, aumentando a expressão dos genes ali presentes (Figura 1). Portanto, enzimas envolvidas na acetilação e desacetilação de histonas, como as lisina deacetilases (KDACs), desempenham um papel fundamental no controle da expressão gênica, desde bactérias e arqueias, até plantas, fungos e animais, incluindo os parasitas protistas da família *Trypanosomatidae* (GOMES et al., 2021; GUJRAL et al., 2020; HOGG et al., 2020; ZHANG; LU; CHANG, 2020).

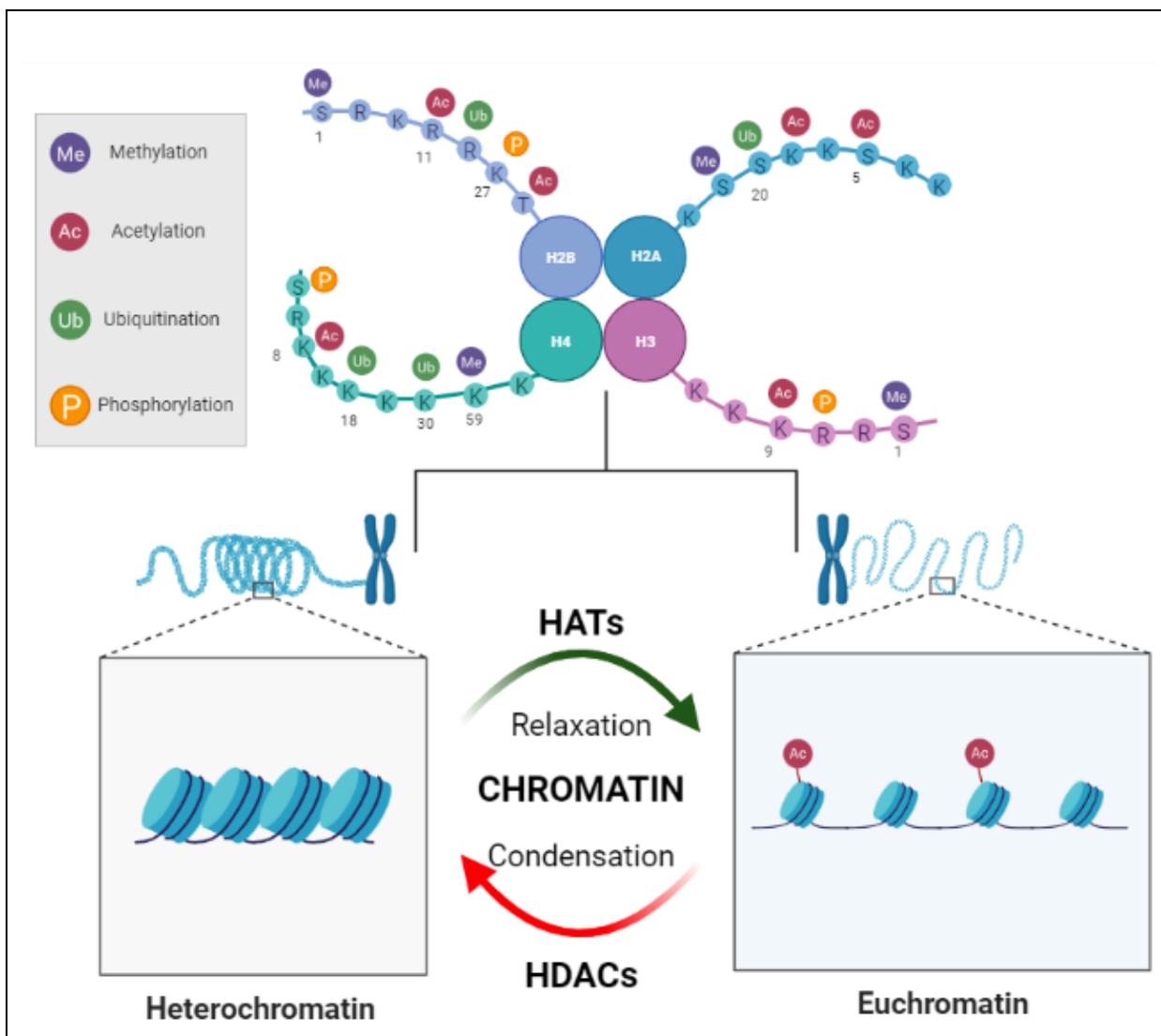


Figura 1. Regulação do nível de condensação da cromatina através da acetilação de histonas.

H2B, H2A, H4 e H3 são diferentes isoformas de histonas que juntas formam um heterotetrâmero que se complexa com a sequência de DNA para formar um nucleossomo. Vários nucleossomos se associam na formação do cromossomo. As "caudas" das histonas estão representadas e os resíduos de aminoácidos que sofrem modificações pós-traducionais estão indicados.

A atividade das enzimas histonas acetil transferases (HATs) contribui para o desempacotamento da cromatina. Enquanto a atividade das histonas deacetilases (HDACs) contribui para o seu empacotamento.

Figura elaborada pelo autor por meio da plataforma BioRender.

Fonte: (GUJRAL et al., 2020)

Neste contexto, é de extrema relevância o fato de que a regulação epigenética é conhecida como um importante aspecto da biologia de Tripanosomatídeos, como parasitas das espécies *Trypanosoma* e *Leishmania*. Como são organismos com ciclo celular complexo (Figuras 2b, 4 e 5) e que precisam responder de maneira rápida a diversos fatores ambientais, tais como evasão do sistema imune dos diferentes hospedeiros e reparo celular da ação de fármacos e

outras substâncias químicas, além das mudanças fenotípicas e morfológicas associadas à infecção de hospedeiros de diferentes espécies, faz-se necessário o controle preciso e eficiente dos processos epigenéticos para a sobrevivência dos mesmos (Figura 2) (DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010; GOMES, 2021; GOMES et al., 2021; HUTCHINSON et al., 2007; ROMERO-MEZA; MUGNIER, 2020).

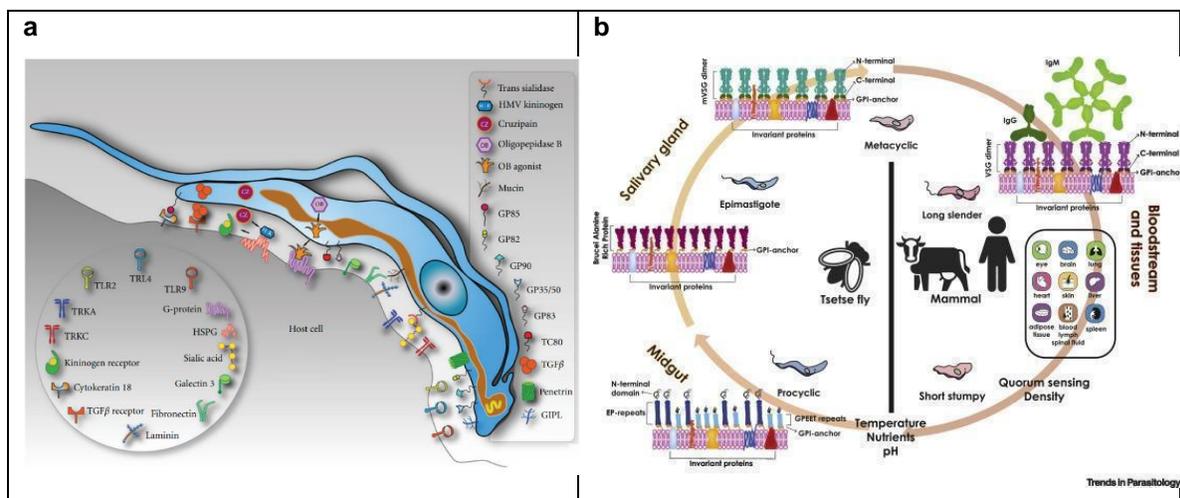


Figura 2. Relevância do controle epigenético para a sobrevivência de Tripanosomatídeos.

(a) Exemplo de *Trypanosoma cruzi* da complexidade da interação entre o parasita na forma tripomastigota e a célula do hospedeiro.

(b) Exemplo de *Trypanosoma brucei* da importância da variação antigênica para a sobrevivência dos parasitas ao longo de seu ciclo de vida.

Adaptado de: (DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010; ROMERO-MEZA; MUGNIER, 2020)

A superfamília das KDACs, se destaca como enzimas envolvidas na modificação epigenética. Estas vêm sendo exploradas como alvos biomoleculares no planejamento de fármacos em várias doenças humanas e diferentes aplicações terapêuticas, que vão desde distúrbios psiquiátricos e doenças neurodegenerativas até câncer e infecções parasitárias (TORO; WATT, 2020; VAN DYKE, 2014; WANG et al., 2015).

A reguladora silenciosa de informação (Sirtuína), do inglês *silent information regulator* (Sirtuin), é uma família de enzimas pertencente à superfamília das KDACs, compondo a Classe III da mesma. As Sirtuínas estão presentes em todos os reinos biológicos e nas células de mamíferos são classificadas em sete subtipos de acordo com sua similaridade estrutural e funcional. Nessas proteínas os sítios catalíticos

são altamente conservados e seu mecanismo de ação é caracterizado como dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺). Tanto em células de mamíferos, como em parasitas da família *Trypanosomatidae*, as Sirtuínas estão envolvidas em vários processos fisiológicos e celulares, incluindo a replicação celular, expressão gênica e controle de vias metabólicas e de sinalização, e assim ganharam destaque como alvos de novos candidatos a fármacos, principalmente em modelos de cânceres, no caso das Sirtuínas humanas (Tabela 2) (CHEN; LU; WU, 2021; HAIGIS; SINCLAIR, 2010; JING et al., 2016; PENTEADO et al., 2023).

1.2 KDACs

A modificação epigenética tem sido um dos principais focos na busca de novas terapias para várias doenças, desde distúrbios metabólicos, câncer, autismo, doenças associadas à inflamação e associadas à idade até parasitoses (SAMANTA et al., 2017; ZHANG; LU; CHANG, 2020).

As KDACs, também conhecidas como proteínas desacetilases (PDACs) ou histonas desacetilases (HDACs), formam um grupo diversificado de enzimas com atividade *N*-(ϵ)-acil lisina hidrolase que estão envolvidas em diversos processos fisiológicos, fisiopatológicos e celulares, tais como expressão e transcrição gênica, proliferação, diferenciação e desenvolvimento celular, regulação do metabolismo e da longevidade, resistência ao estresse celular e estabilidade genômica, entre outros, e assim são considerados alvos terapêuticos cada vez mais atraentes. As KDACs são comumente classificadas nos grupos I, IIA, IIB, III e IV. As KDACs de classe III, também conhecidas como Sirtuínas, são únicas na superfamília por serem enzimas dependentes de NAD⁺, enquanto as enzimas pertencentes às demais quatro classes apresentam mecanismos catalíticos dependentes de zinco, e não possuem homologia com as Sirtuínas. As Sirtuínas, portanto, funcionam tanto como efetores transcricionais quanto como sensores metabólicos e energéticos através da razão de concentração celular de NAD⁺:NADH (BLASL et al., 2022; GROZINGER; SCHREIBER, 2002; LI; TIAN; ZHU, 2020; VAN DYKE, 2014).

1.3 Sirtuínas

As Sirtuínas compõem um grupo de enzimas evolutivamente conservadas e expressas em todos os reinos da vida, desde bactérias e arqueias até parasitas eucariotos, fungos, plantas e animais. Em mamíferos, sete parálogos de Sirtuína foram identificados (SIRT1 a SIRT7), e podem ser classificados em quatro grupos principais, de acordo com sua homologia de sequência. SIRT1–SIRT3 pertencem à classe I, SIRT4 à classe II, SIRT5 à classe III e SIRT6 e SIRT7 à classe IV. Esses homólogos diferem em suas especificidades de substratos e localização subcelular. SIRT1, 6 e 7 são predominantemente localizadas no núcleo celular, SIRT3, 4 e 5 são principalmente enzimas mitocondriais e a SIRT2 é única no grupo por ser uma proteína majoritariamente citoplasmática. Além disso, enquanto todas as diferentes Sirtuínas exibem atividade desacetilase até certo ponto, elas também são capazes de catalisar uma variedade de outras reações. Observou-se que as SIRT2, 4 e 6 são capazes de promover ADP-ribosilação de proteínas, SIRT5 tem atividades demalonilase, desuccinilase e deglutarilase conhecidas, SIRT6 também mostra atividades demiristoilase e depalmitoilase, SIRT3 mostrou atividade decrotonilase e SIRT2 promove reações demiristoilase e 4-oxononanoilase (Tabela 1) (AVALOS et al., 2002; BHEDA et al., 2016; BLANDER; GUARENTE, 2004; CHEN et al., 2015; FANG; TANG; LI, 2019; GARG et al., 2021; HAIGIS; SINCLAIR, 2010; HOUTKOOPE; PIRINEN; AUWERX, 2012; MITTAL; MUTHUSWAMI; MADHUBALA, 2017; PENTEADO et al., 2023; TENG et al., 2015).

Tabela 1. Comparação entre a localização subcelular e as atividades catalíticas dos diferentes parálogos da Sirtuína humana e a identidade entre suas sequências primárias.

O alinhamento de sequências foi realizado pelo autor, por meio da ferramenta Clustal W, através do pacote PyMod, empregando as sequências humanas canônicas depositadas no banco de dados UniProt (códigos de acesso: Q96EB6 ; Q8IXJ6 ; Q9NTG7 ; Q9Y6E7 ; Q9NXA8 ; Q8N6T7 ; Q9NRC8 , respectivamente).

Fonte: (AVALOS et al., 2002; BHEDA et al., 2016; BLANDER; GUARENTE, 2004; CHEN et al., 2015; FANG; TANG; LI, 2019; GARG et al., 2021; HAIGIS; SINCLAIR, 2010; HOUTKOOPE; PIRINEN; AUWERX, 2012; MITTAL; MUTHUSWAMI; MADHUBALA, 2017; PENTEADO et al., 2023; TENG et al., 2015)

	Localização subcelular primária	Atividades enzimáticas conhecidas	Porcentagem de identidade em relação à hSIRT2
Sirtuína 1	Núcleo	Desacetilase	37.78%
Sirtuína 2	Citoplasma	Desacetilase, ADP-ribosil-transferase, demiristoilase e 4-oxononanoilase	N.A.
Sirtuína 3	Mitocôndria	Desacetilase, decrotonilase	47.90%
Sirtuína 4	Mitocôndria	Desacetilase e ADP-ribosil-transferase	24.82%
Sirtuína 5	Mitocôndria	Desacetilase, demalonilase, desuccinilase e deglutarilase	26.24%
Sirtuína 6	Núcleo	Desacetilase, ADP-ribosil-transferase, demiristoilase e depalmitoilase	25.57%
Sirtuína 7	Núcleo	Desacetilase	22.02%

Devido à sua expressão em quase todos os tecidos e ao papel central que desempenham em vários processos fisiológicos e fisiopatológicos, somado à sua capacidade característica de atuar como sensores da razão celular entre $[NAD^+]/[NADH]$ e da concentração de nicotinamida (NAM), promovendo assim a tradução do estado nutricional em expressão gênica e função proteica, as Sirtuínas têm sido exploradas por vários estudos como potenciais novos alvos terapêuticos (Tabela 2) (CHEN; LU; WU, 2021; PENTEADO et al., 2023; WANG et al., 2019; ZHENG et al., 2021).

1.4 Sirtuína 2

O gene *SIRT2* humano está localizado no cromossomo 19, braço longo (q), região 1, banda 3, sub-banda 2 (19q13.2) com 17 éxons, que sofrem *splicing* alternativo formando duas isoformas com produtos proteicos de relevância fisiológica confirmada. A forma de 389 resíduos, na qual todos os introns são

excisados, e uma variante de 352 resíduos que não possui uma extensão terminal N do domínio central, resultante da excisão do segundo exon, que coloca um códon de parada dentro do exon 3, em fase com o primeiro códon de início ATG. A isoforma de 352 resíduos é a forma predominantemente expressa no sistema nervoso central, enquanto a isoforma de 389 resíduos tem sua expressão predominante na maioria dos demais tecidos e é considerada a sequência canônica da Sirtuína 2 humana (HIRATSUKA et al., 2003; NORTH; VERDIN, 2007; RACK et al., 2014; ZHENG et al., 2021).

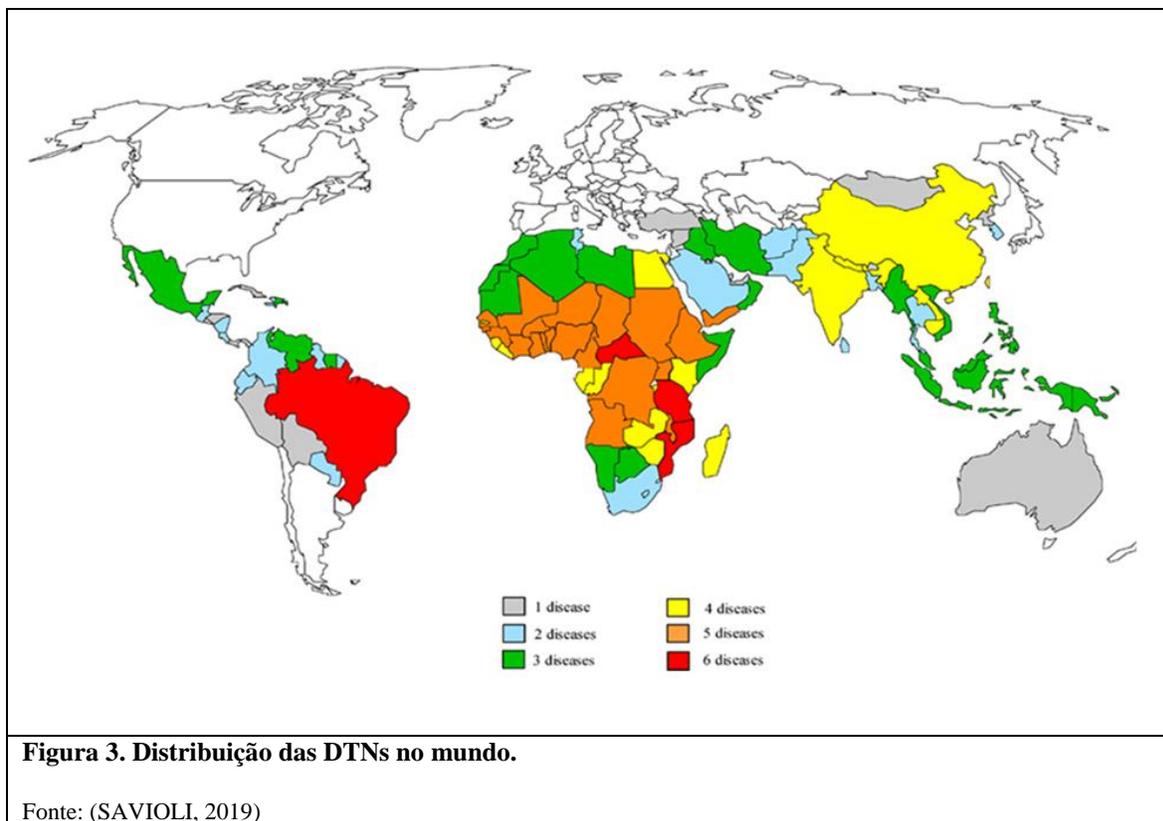
Como afirmado anteriormente, foi demonstrado que, embora os diferentes parálogos da Sirtuína apresentem uma preferência por compartimentos subcelulares específicos, essa localização pode variar de acordo com o tecido no qual é expressa e ao longo do ciclo celular. Além disso, embora descritas pela primeira vez como sendo desacetilases de histonas, as Sirtuínas demonstram afinidade por uma variedade de outros substratos peptídicos e, desta forma, estão envolvidas em vários processos fisiológicos, celulares e patológicos além do controle epigenético, o que faz delas alvos terapêuticos importantíssimos no desenvolvimento de novos fármacos visando tratar uma ampla gama de patologias (Tabela 2). Em algumas espécies de Tripanossomatídeos, as Sirtuínas se mostram essenciais para a sobrevivência dos parasitas, já em outras espécies a sua ausência acarreta em redução da virulência e de sua reprodução e maior susceptibilidade aos agentes quimioterapêuticos empregues no tratamento destas parasitoses (CHEN; LU; WU, 2021; GARG et al., 2021; GOMES et al., 2021; JING et al., 2016; LEITE et al., 2022; PENTEADO et al., 2023; WANG et al., 2019; ZHENG et al., 2021).

Tabela 2. Substratos da Sirtuína 2 e o papel fisiológico de sua ação enzimática.			
Substrato(s) da Sirtuína 2	Papel fisiológico da ação da Sirtuína 2	Comentários	Referências bibliográficas
α -tubulina	Influencia a estabilidade dos microtúbulos e, conseqüentemente, a motilidade celular, os processos de migração e divisão e a degradação de proteínas pela via do agressomo	-	(INOUE et al., 2007a; NORTH et al., 2003; SCHEMIES et al., 2010; YANG et al., 2013)
Centrossomo, fuso mitótico e corpo médio	Progressão do ciclo celular	Há evidências de que a SIRT2 pode funcionar como um checkpoint mitótico na metáfase inicial	(DRYDEN et al., 2003; INOUE et al., 2007b)
Quinase de checkpoint mitótico BubR1	A superexpressão da SIRT2 pode reverter o efeito do envelhecimento em camundongos BubR1 hipomórficos, aumentando sua vida útil média	Com o envelhecimento, os níveis de BubR1 desacetilado caem, juntamente com uma diminuição na atividade da SIRT2	(NORTH et al., 2014)
Histonas H4 e H3	Manutenção da integridade genômica e remodelação da cromatina	-	(VAQUERO et al., 2006; WANG et al., 2019)
Repressor de transcrição BCL6	Desenvolvimento de linfoma de células B	Justifica por que a inibição farmacológica da SIRT2 pode ser benéfica em alguns tipos de câncer	(SCHEMIES et al., 2010)
Antígeno tumoral celular p53	Supressão de seu efeito apoptótico		(WANG et al., 2019)
Fator de transcrição Forkhead box O 3a (FOXO3a)	Indução da expressão do inibidor de quinase dependente de ciclina p27kip1, da superóxido dismutase (SOD), da proteína BCL-2-like 11 (BCL2L1 ou BIM), entre outros	Regulação dos mecanismos de gerenciamento de espécies reativas de oxigênio, promovendo a redução de seus níveis nas células. Após o estresse induzido por ROS, a expressão da SIRT2 é aumentada	(WANG et al., 2007, 2019)
Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD)	Aumento da produção de NADPH e, conseqüentemente, do potencial redox celular e da atividade sequestradora de ROS da glutatona (GSH)	-	(WANG et al., 2014)
?	A SIRT2 demonstra regular a mielinização no SNC e contribuir para a progressão de patologias neurodegenerativas, como as doenças de Huntington e Parkinson	-	(CHEN; LU; WU, 2021; LEITE et al., 2022; QUINTI et al., 2016; WANG et al., 2019; ZHENG et al., 2021)
?	Abundante em adipócitos indiferenciados, notou-se que a expressão de SIRT2 inibe a adipogênese e, após a diferenciação pré-adipocitária, a expressão de SIRT2 é regulada negativamente, resultando em progressão da adipogênese. Contrariamente, a superexpressão de SIRT2 inibe a diferenciação celular	A SIRT2 é um mediador chave na regulação metabólica e um potencial alvo terapêutico para a regulação da adipogênese e obesidade	(JING; GESTA; KAHN, 2007; YANG et al., 2013; YU; AUWERX, 2009)
Fator de transcrição Forkhead box O 1 (FOXO1)	Repressão da transcrição do gene PPAR γ		(ARMONI et al., 2006; JING; GESTA; KAHN, 2007; WANG; TONG, 2009; WANG et al., 2009)
Fosfoenolpiruvato carboxiquinase 1 (PEPCK1)	Ativação da atividade enzimática da PEPCK1	Controle da taxa gliconeogênica em função de alterações nas condições metabólicas	(JUNG et al., 2011; WANG et al., 2019)
?	A inibição ou regulação negativa da SIRT2 provoca uma notória diminuição da atividade da proteína quinase B (PKB)	A SIRT2 pode ser considerada como um importante alvo terapêutico em múltiplas doenças metabólicas ou mesmo em células cancerígenas com atividade da via de sinalização fosfoinositol-tris-fosfato (PI3K-PKB) regulada positivamente	(RAMAKRISHNAN et al., 2014)

1.5 Doenças Tropicais Negligenciadas

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) caracterizam-se por ser um grupo de diversas patologias que, apesar de provocarem enfermidades de grande relevância médica, social e econômica, não recebem a devida atenção e investimento de governos, indústrias farmacêuticas e grupos de pesquisa públicos e privados. Acometem, majoritariamente, as populações mais carentes de países em desenvolvimento como da África, Ásia e Américas Central e do Sul (Figura 3), não proporcionando projeções de grandes ganhos financeiros associados ao desenvolvimento de novas terapias (ENGELS; ZHOU, 2020; OMS, 2023a).

Atualmente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece 21 doenças como sendo DTNs, as quais acometem mais de 1,5 bilhão de pessoas, sendo reportados aproximadamente 300 mil novos casos anualmente. Estas doenças resultam de quatro classes de patógenos causadores, protozoários (doença de Chagas, tripanossomíase humana africana e leishmaniose), bactérias (úlceras de Buruli, hanseníase, tracoma e boubas), helmintos ou vermes metazoários (cisticercose/teníase, dracunculíase, equinococose, trematodíases de origem alimentar, filariose linfática, oncocercose, esquistossomose e helmintíases transmitidas pelo solo) e vírus (dengue, chikungunya e raiva). Algumas delas são tidas como extremamente negligenciadas, pois acometem milhões de pessoas no mundo e recebem quase nenhum investimento em inovação, como, por exemplo, a Leishmaniose Visceral, que possui alta prevalência no Brasil (OMS, 2023a, 2023b).



1.6 Leishmaniose

As Leishmanioses são endemias infecciosas, consideradas doenças tropicais negligenciadas, causadas por mais de 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. Os parasitas, agentes causadores destas doenças, são transmitidos majoritariamente por insetos hematófagos vetores da família *Phlebotominae*, pertencentes ao gênero *Phlebotomus* e conhecidos como *sand flies*, no velho mundo, e ao gênero *Lutzomyia*, nas Américas, sendo popularmente conhecidos como mosquito-palha, birigui, cangalha ou tatuquira (OMS, 2023c; ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2018).

Estes protozoários são inoculados nos hospedeiros mamíferos, como por exemplo, seres humanos, quando os mosquitos infectados os picam para se alimentarem de sangue (Figuras 4 e 5a). Os parasitas presentes no trato digestivo do inseto, na forma promastigota, passam para a corrente sanguínea do mamífero, e logo são fagocitados por macrófagos e outras células fagocíticas, onde sofrem uma transformação fenotípica e morfológica, tornando-se amastigotas (Figuras 4 e 5b). Estes então se multiplicam e infectam vários tecidos do corpo, até que, no

evento de uma nova picada por flebotomíneos, são ingeridos junto ao sangue pelo inseto e passam a infectar o trato digestivo do mesmo. No mosquito, os parasitas se diferenciam novamente em promastigotas, se multiplicam, migram para as glândulas salivares do artrópode e, quando o animal volta a picar para se alimentar de sangue, passam a infectar novos hospedeiros mamíferos (BATES, 2018; CDC, 2023; OGDEN; MELBY, 2009).

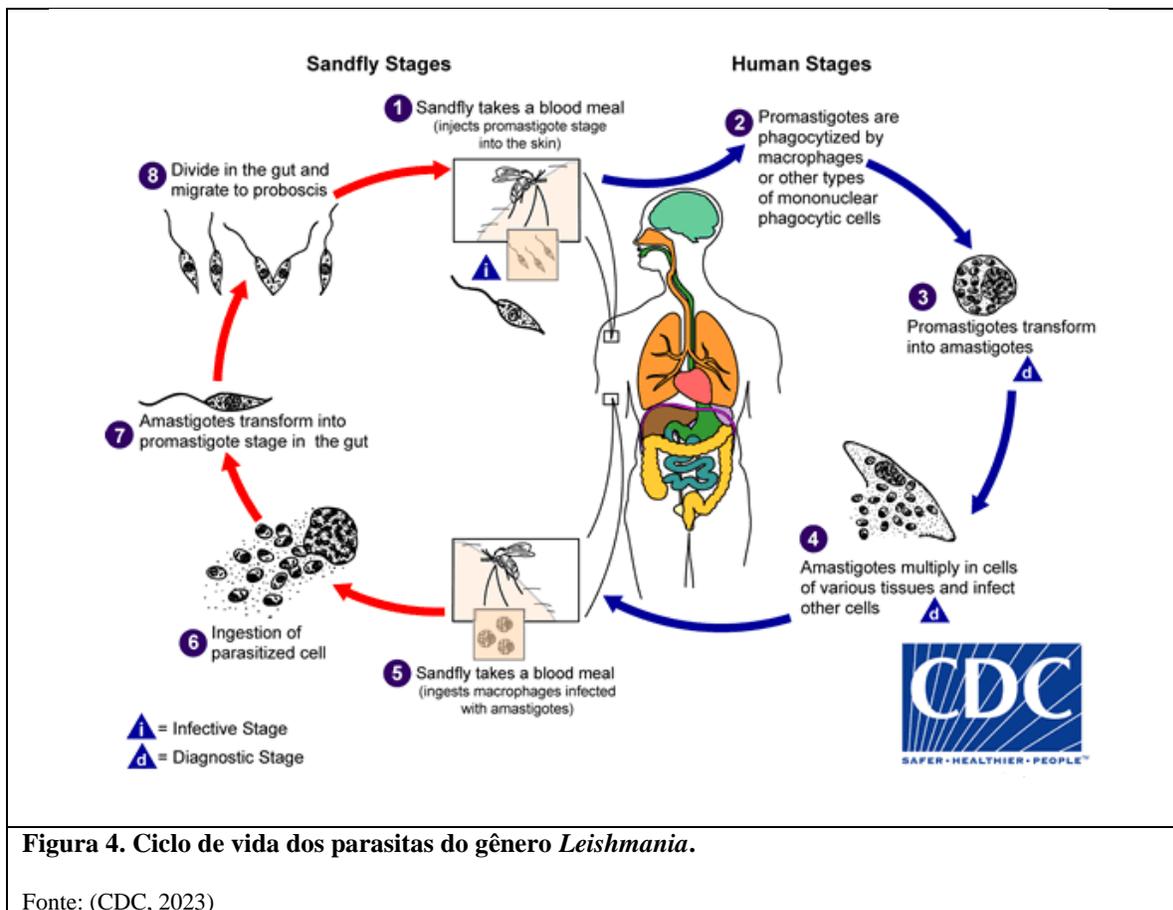
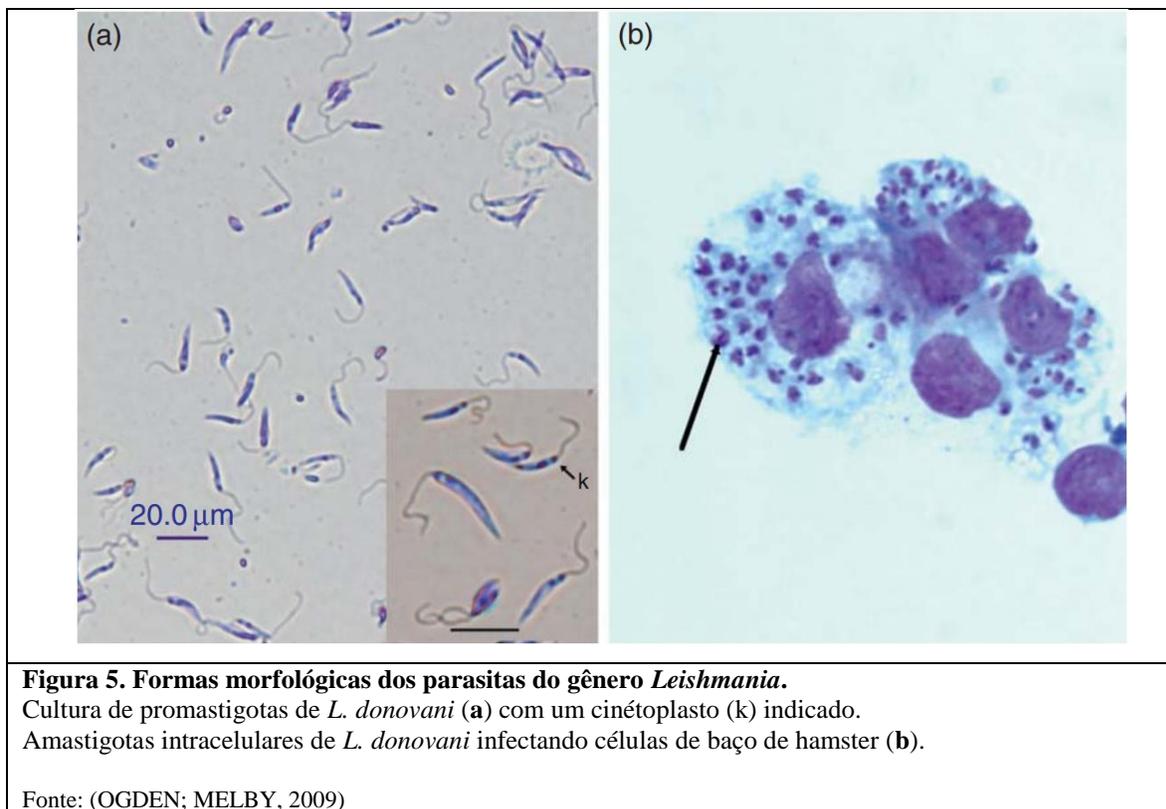


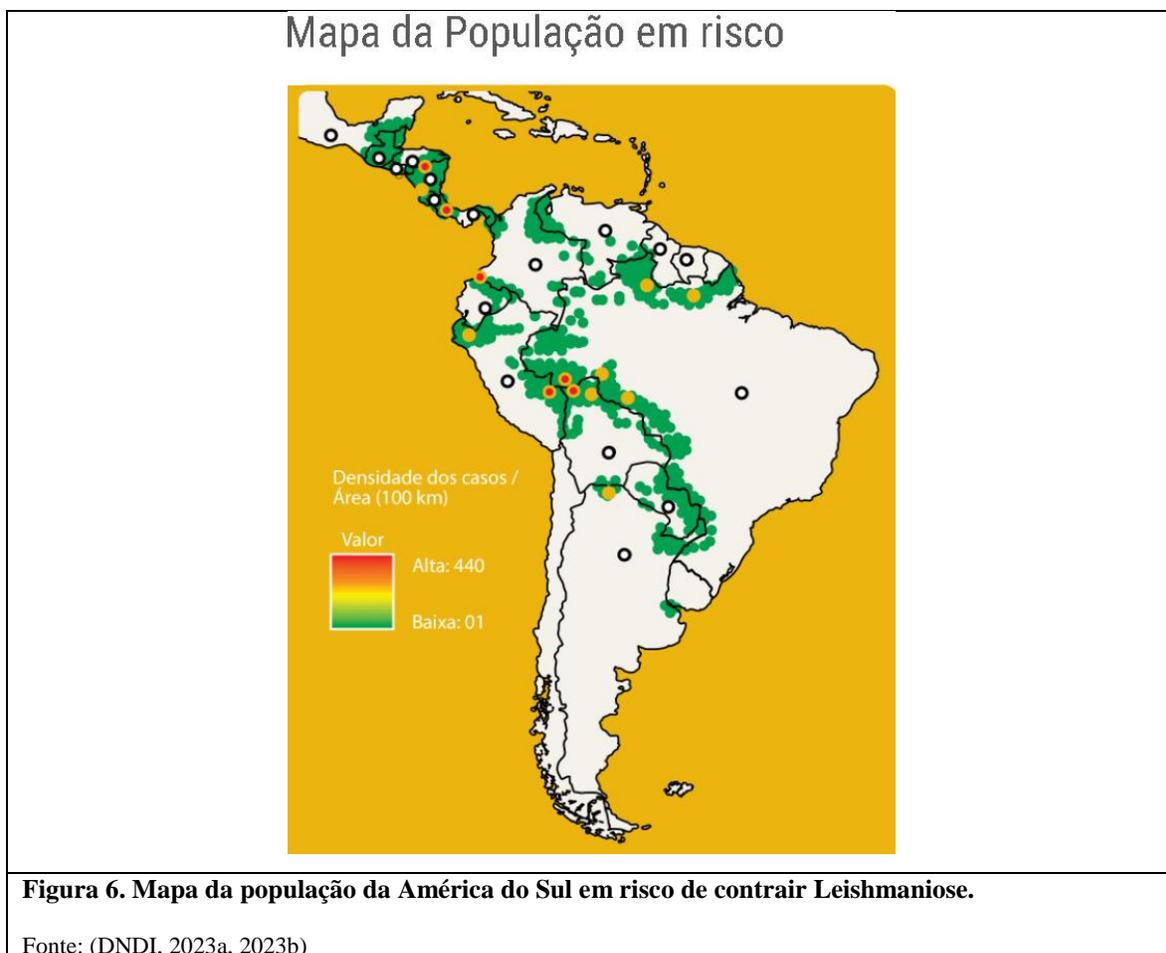
Figura 4. Ciclo de vida dos parasitas do gênero *Leishmania*.

Fonte: (CDC, 2023)



As infecções por *Leishmania* se manifestam em três formas principais, sendo elas cutânea, visceral, chamada kala-azar, e mucocutânea. Todas as três formas da doença provocam sequelas irreparáveis e podem levar a morbidades desabilitantes, com impactos socioeconômicos gravíssimos. A forma visceral é considerada a mais grave, podendo levar à caquexia profunda, anemia, hipergamaglobulinemia, processos hemorrágicos e infecções secundárias, devido à indução de trombocitopenia e leucopenia pelo parasita. Caso não tratada, sua taxa de mortalidade pode chegar a 100% em 2 anos. (OMS, 2023c; ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2018).

Afetando 98 países, a Leishmaniose apresenta por volta de 100 mil novos casos e provoca 30 mil mortes anualmente. Segundo dados epidemiológicos, estima-se que mais de 1 bilhão de pessoas encontram-se sob risco de infecção. No Brasil, 18.010 novos casos foram relatados em 2020, sendo 94% da forma cutânea (Figura 6) (OMS, 2023c, 2023d, 2023e).



1.6.1 Quimioterapia das Leishmanioses

Até o momento, não existem vacinas eficazes para Leishmaniose, sendo o tratamento composto por, apenas, poucos agentes quimioterapêuticos (Figura 7). Os mais empregados são os compostos antimoniais pentavalentes, como o antimoniato de meglumina e o estibogluconato de sódio (Figura 7a-b), os quais foram desenvolvidos na década de 1920, sendo estes os fármacos de primeira escolha (DNDI, 2023a, 2023b; ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2018).

A segunda classe de agentes mais empregada no tratamento das Leishmanioses é a da anfotericina B (Figura 7c), cuja eficácia frente a parasitas deste gênero foi reportada nos anos 1950, e apresenta toxicidade bastante elevada. Tentando mitigar seus efeitos colaterais, formulações modernas foram desenvolvidas, tais como preparações lipossomais e PEGuiladas, porém estas apresentam custo proibitivo para a população afetada (DE ALMEIDA et al., 2017; DNDI, 2023a, 2023b; ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2018).

Ambas as classes são de uso parenteral e induzem efeitos adversos graves, o que contribui para a não adesão ao tratamento por parte dos pacientes. Além disso, as taxas de falha do tratamento são altas, sendo relatados casos de resistência aos fármacos e, conseqüentemente, levando ao aumento das dosagens necessárias ao longo dos anos (DNDI, 2023a, 2023b; ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2018).

Há algumas alternativas ao tratamento clássico, porém também apresentam efeitos adversos graves e eficácia limitada, como é o caso da miltefosina (Figura 7e), de administração oral, e da paromomicina (Figura 7d), que demonstra eficácia inferior aos compostos de antimônio pentavalente, porém tem se mostrado útil quando empregada em associação aos mesmos, possibilitando redução do tempo de tratamento. A pentamidina (Figura 7f), também tem sido usada, porém os efeitos adversos e baixa eficácia a levam a não ser empregada frequentemente, salvo em casos de resistência à primeira linha de tratamento (DE ALMEIDA et al., 2017; ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2018).

A combinação de dois agentes de mecanismos de ação distintos é normalmente empregada, visando aumentar a eficácia, reduzir o tempo de tratamento e a incidência de resistência aos quimioterápicos (DE ALMEIDA et al., 2017; ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2018).

Além dos problemas relativos aos fármacos em si, o tratamento para as Leishmanioses também é caro e inacessível para a maior parte da população afetada, devido ao custo proibitivo ou por se encontrarem em áreas de difícil acesso e distantes de centros de tratamento (DNDI, 2023a, 2023b; ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2018).

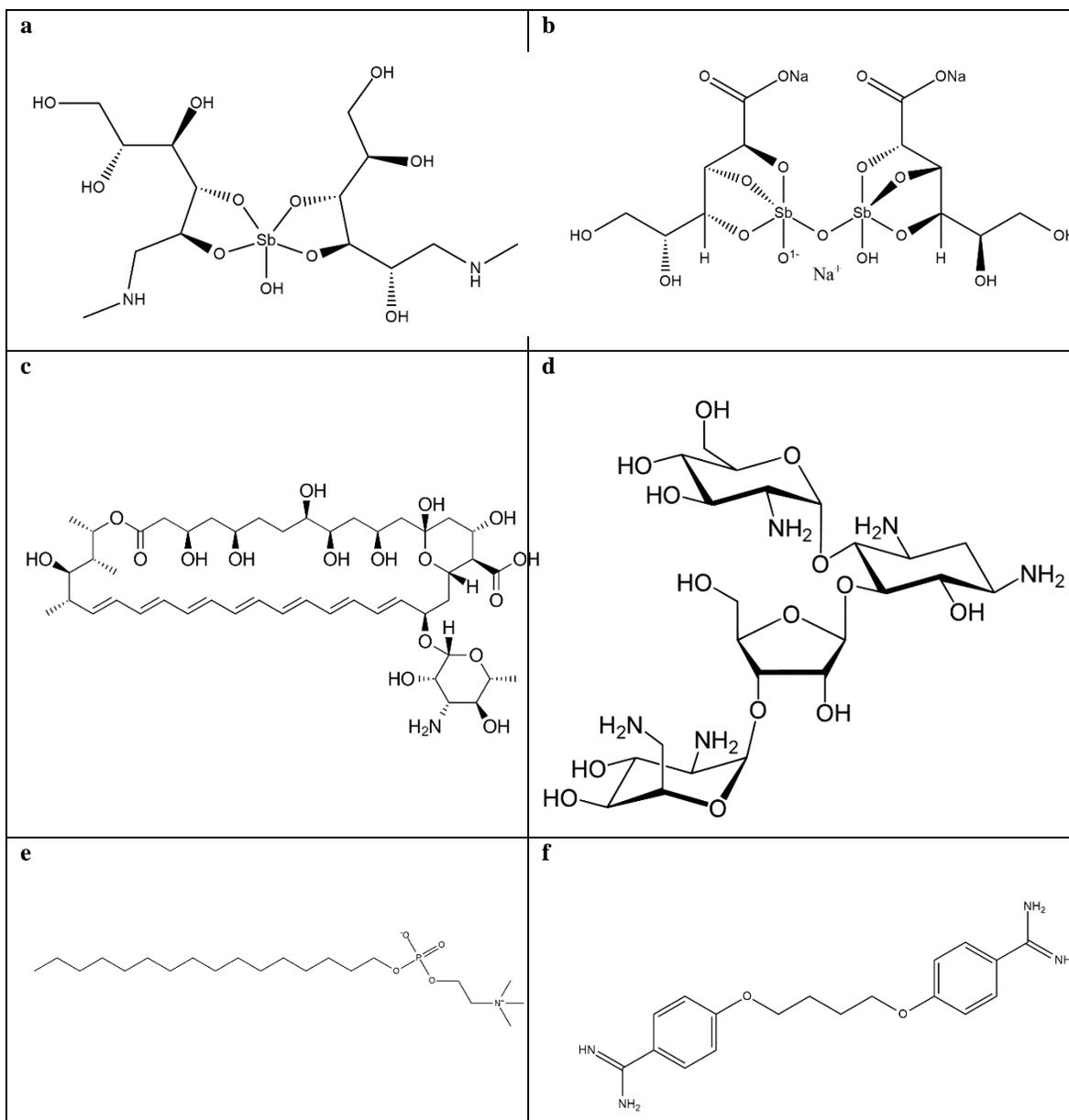


Figura 7. Estruturas químicas dos fármacos empregados na quimioterapia das Leishmanioses.

Antimoniato de meglumina (a), estibogluconato de sódio (b), anfotericina B (c), paromomicina (d), miltefosina (e) e pentamidina (f).

Figura preparada pelo autor por meio do *software* ChemDraw.

Fonte: (DE ALMEIDA et al., 2017)

Neste contexto, a busca por novos agentes seguros e eficazes para combater protozoários do gênero *Leishmania*, com um perfil de tratamento mais simples e com um custo mais acessível, possibilitando um maior acesso e adesão da população ao mesmo é premente (DE ALMEIDA et al., 2017; DNDI, 2023a, 2023b; ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2018).

1.7 Sirtuína 2 parasitária como alvo bioquímico

Em parasitas da família *Trypanosomatidae*, foram descritos três grupos de enzimas homólogas das Sirtuínas humanas, sendo eles a *Sirtuin 2 related protein 1* (Sir2rp1), *Sirtuin 2 related protein 2* (Sir2rp2) e *Sirtuin 2 related protein 3* (Sir2rp3) (Tabela 3). Enzimas desta família estão envolvidas em diversos processos fisiológicos celulares nos parasitas, incluindo a regulação da expressão de vários genes, controle metabólico e a resposta a danos no DNA (FERREIRA, 2019; FERREIRA et al., 2023; GOMES, 2021; GOMES et al., 2021; MORETTI et al., 2015; RONIN et al., 2018).

Tabela 3. Comparação entre a localização subcelular e as atividades catalíticas dos diferentes parálogos da Sirtuína de *Leishmania major* e a identidade entre suas sequências primárias e àquelas dos ortólogos humanos hSIRT2, hSIRT4 e hSIRT5.

O alinhamento de sequências fora realizado por meio da ferramenta Clustal Omega, através do pacote PyMod, empregando as sequências canônicas depositadas no banco de dados UniProt (códigos de acesso: Q25337 ; Q4QB33 ; Q4Q2Y6 ; Q8IXJ6 ; Q9Y6E7 ; Q9NXA8, respectivamente).

Fonte: (GOMES et al., 2021; MITTAL; MUTHUSWAMI; MADHUBALA, 2017; RONIN et al., 2018; SACCONNAY et al., 2013)

Enzima	Localização subcelular primária	Atividades enzimáticas conhecidas	Porcentagem de identidade em relação à Sir2rp1 de <i>L. major</i>	Porcentagem de identidade em relação à hSIRT2	Porcentagem de identidade em relação à hSIRT4	Porcentagem de identidade em relação à hSIRT5
<i>L. major</i> Sir2rp1	Citoplasma	Desacetilase e ADP-ribosil-transferase	N.A.	37.17%	20.08%	20.59%
<i>L. major</i> Sir2rp2	Mitocôndria	Desacetilase e ADP-ribosil-transferase	20.66%	24.46%	37.99%	26.01%
<i>L. major</i> Sir2rp3	Mitocôndria	Desacetilase, desuccinilase e demalonilase	22.59%	19.62%	26.52%	38.75%
hSIRT2	Citoplasma	Desacetilase, ADP-ribosil-transferase, demiristoilase e 4-oxononanoilase	37.17%	N.A.	24.82%	26.24%

Em espécies do gênero *Leishmania*, as *Sirtuin 2 related proteins* (Sir2rp) se mostram essenciais para a fisiologia do parasita, ocasionando alterações significativas na mesma quando inibidas por algum agente farmacológico ou quando seus genes são deletados em estudos de *knockout* (GOMES et al., 2021; MITTAL; MUTHUSWAMI; MADHUBALA, 2017; VERGNES et al., 2005).

Enquanto a ausência completa da Sir2rp2 mitocondrial em estudos de *knockout* com *L. donovani* gera indivíduos viáveis, estes apresentam atividade mitocondrial, crescimento e virulência reduzidos em comparação com a cepa selvagem, além de serem mais suscetíveis a inibidores de Sirtuína 2 humana (GOMES et al., 2021; MITTAL; MUTHUSWAMI; MADHUBALA, 2017).

Já em estudos de *knockout* de Sir2rp3 em *L. infantum*, não se observou diferenças notáveis entre a cepa selvagem e aquela apresentando a deleção de ambos os alelos da enzima. Porém, em outras espécies de Tripanosomatídeos, como *Trypanosoma cruzi*, foi observado que a superexpressão de Sir2rp3 em amastigotas tem uma correlação positiva com a proliferação celular e a infectividade dos parasitas, além de atenuar a ação dos fármacos benznidazol e nifurtimox contra os mesmos. Foi demonstrado também, que a inibição farmacológica da Sir2rp3 por salermida é letal para os parasitas da espécie *T. cruzi* (FERREIRA et al., 2023; GOMES et al., 2021; MORETTI et al., 2015).

Estudos de *knockout* de Sir2rp1 em *L. infantum* demonstram que esta enzima citosólica é necessária para a sobrevivência dos parasitas, ocasionando a inviabilidade dos mesmos quando de sua ausência completa. Em cepas onde apenas um dos dois alelos fora deletado, apesar de viáveis, os parasitas apresentaram virulência significativamente reduzida em comparação à cepa selvagem. Outros trabalhos demonstraram, também, que a superexpressão de Sir2rp1 em *L. infantum* levou a um aumento da proliferação do protozoário e de seu consumo de NAD⁺. Diante destas observações, esta se apresenta como alvo bioquímico na busca e desenvolvimento de novos fármacos contra as parasitoses causadas por estes protozoários (GOMES et al., 2021; RONIN et al., 2018).

Além do mais, diferenças estruturais entre os homólogos humanos e de espécies de *Leishmania* podem ser exploradas, na busca de inibidores seletivos, o que pode resultar em fármacos mais seguros, eficazes e com menor toxicidade para o tratamento das Leishmanioses (Tabela 4, Figura 8). Alguns compostos com atividade inibitória de Sirtuínas 2 de Tripanosomatídeos já foram reportados (Figura 9), como o sirtinol, o cambinol, a salermida, a nicotinamida, a esplitomicina e o bisnaftalimidopropil (BNIP) (GOMES et al., 2021; MITTAL; MUTHUSWAMI;

MADHUBALA, 2017; MORETTI et al., 2015; RONIN et al., 2018; RUMPF et al., 2015a).

Tabela 4. Identidade entre as sequências primárias dos ortólogos da *Sirtuin 2 related protein 1* dos diferentes Tripanosomatídeos estudados neste trabalho e seu homólogo humano.

O alinhamento de sequências fora realizado pelo autor, por meio da ferramenta Clustal Omega, através do pacote PyMod, empregando as sequências canônicas depositadas no banco de dados UniProt

(códigos de acesso: A0A6L0XH39 ; E9AY03 ; Q25337 ; Q8IT90 ; A0A3P3Z957 ; Q4DP02 ; Q8IXJ6 , respectivamente).

Sir2rp1	Porcentagem de identidade em relação à <i>L. infantum</i> Sir2rp1
<i>L. mexicana</i>	93,03%
<i>L. major</i>	92,23%
<i>L. amazonensis</i>	92,08%
<i>L. braziliensis</i>	81,77%
<i>T. cruzi</i>	56,23%
hSIRT2	42,99%

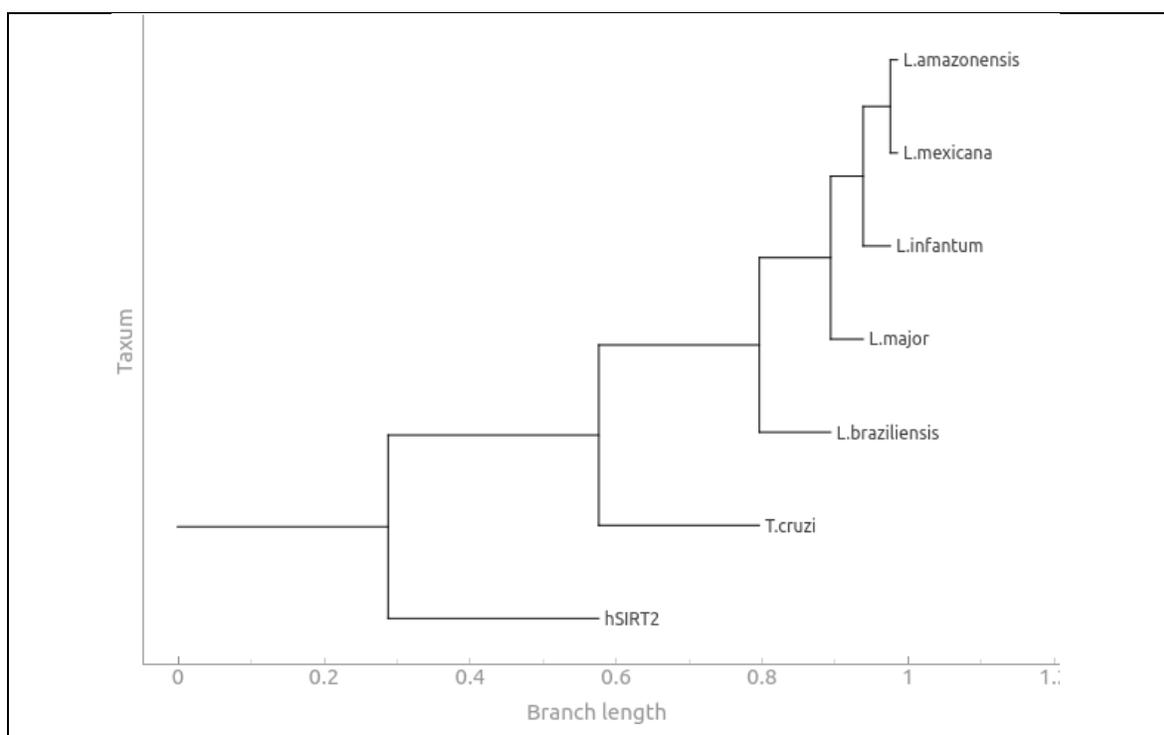


Figura 8. Dendrograma representando a distância de identidade entre as Sir2rp1 das espécies de Tripanosomatídeos estudadas neste trabalho e a Siruína 2 humana.

O dendrograma foi gerado pelo autor, usando o método de clusterização hierárquica UPGMA (método de grupo de pares não ponderado com média aritmética) através do pacote PyMod, à partir do alinhamento de sequências realizado por meio da ferramenta Clustal Omega, empregando as sequências canônicas depositadas no banco de dados UniProt

(códigos de acesso: A0A6L0XH39 ; E9AY03 ; Q25337 ; Q8IT90 ; A0A3P3Z957 ; Q4DP02 ; Q8IXJ6 , respectivamente).

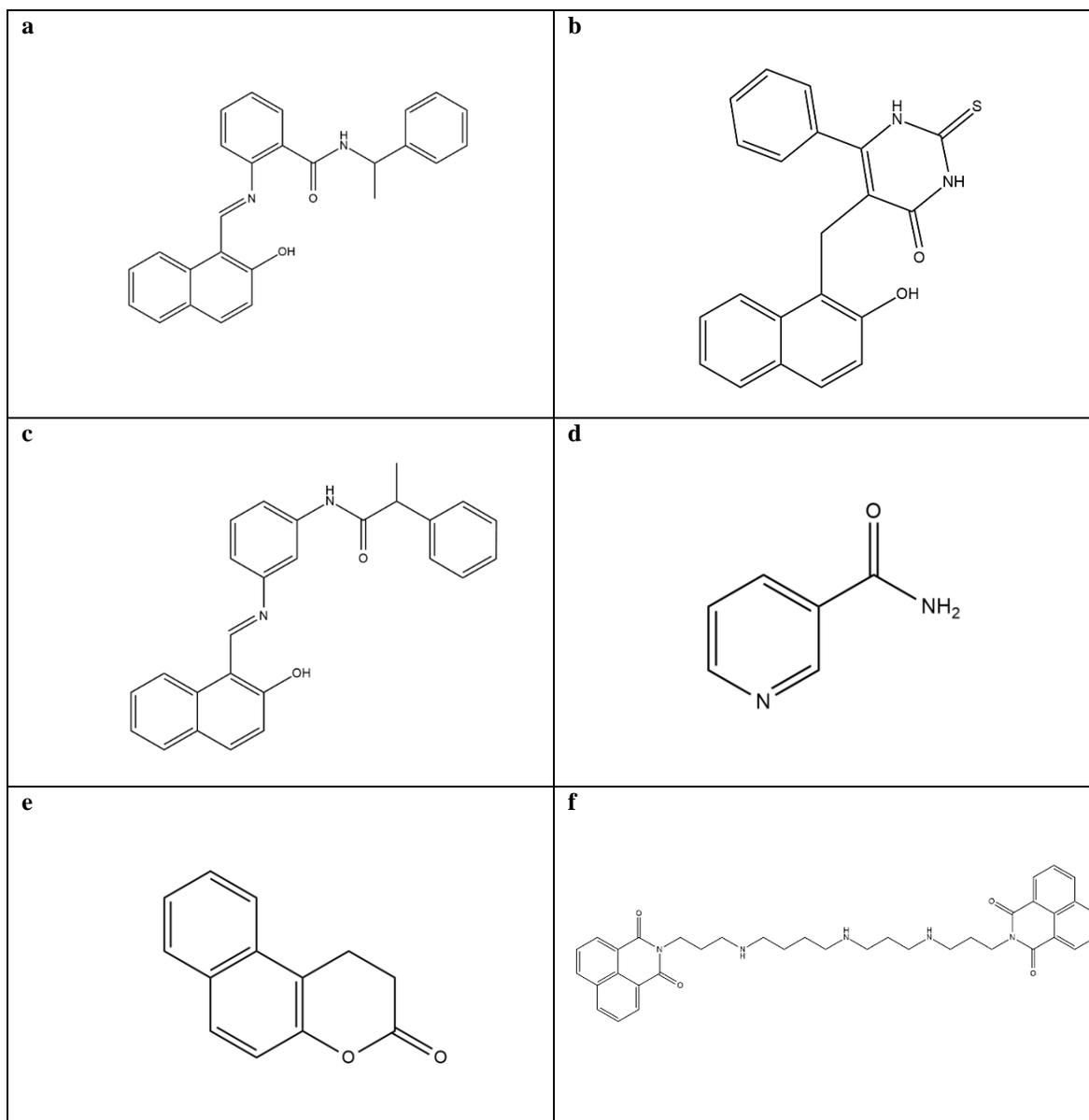


Figura 9. Estruturas químicas de compostos com atividade inibitória de Sirtuínas 2 de Tripanosomatídeos.

Sirtinol (a), Cambinol (b), salermida (c), nicotinamida (d), esplitomicina (e) e bisnaftalimidopropil (f).

Figura preparada pelo autor por meio do *software* ChemDraw.

Fonte: (FERREIRA, 2019; GOMES, 2021; GOMES et al., 2021; MITTAL; MUTHUSWAMI; MADHUBALA, 2017)

Considerando-se, que apenas uma Sir2rp da família *Trypanosomatidae* teve sua estrutura elucidada experimentalmente, por meio de cristalografia e difração de raios X (*L. infantum* Sir2rp1, código PDB 5OL0), o presente trabalho visa a aplicação da metodologia de Modelagem Comparativa na construção de modelos tridimensionais de enzimas da família das Sirtuínas de outras espécies do gênero. Essa é uma importante abordagem para a contribuição ao entendimento de suas estruturas tridimensionais, seu funcionamento bioquímico, seus sítios catalíticos e

de ligação a substratos, co-substratos e inibidores, ao estudo das diferenças entre elas e possíveis pontos de interação para o desenvolvimento de candidatos a novos fármacos por metodologias de planejamento baseado na estrutura do alvo biomolecular (SBDD) (FERREIRA, 2019; FERREIRA et al., 2023; GOMES, 2021; GOMES et al., 2021; RONIN et al., 2018; RUMPF et al., 2015a).

1.8 Planejamento de Fármacos Assistido por Computadores

O Planejamento de Fármacos Assistido por Computadores (do inglês *Computer Aided Drug Design*, CADD) contempla múltiplas estratégias químico-moleculares, físicas e quânticas com o objetivo de descobrir, projetar e desenvolver agentes químicos terapêuticos, lançando mão de ferramentas, técnicas e metodologias matemáticas e computacionais englobadas dentro das áreas de químico- e bioinformática. Os principais objetivos do CADD fazem parte de um trabalho multidisciplinar que visa aumentar a eficiência dos processos de descoberta e aprimoramento de moléculas bioativas, de desenvolvimento de novas farmacoterapias, e da compreensão de eventos biológicos no nível molecular (FERREIRA et al., 2023; GOMES, 2021; LIMA et al., 2021; PRIETO-MARTÍNEZ et al., 2019).

1.8.1 Planejamento de Fármacos Baseado na Estrutura do Receptor

A busca de novos fármacos pela abordagem de planejamento baseado na estrutura do alvo biomolecular (do inglês *Structure Based Drug Design*, SBDD) se fundamenta no conhecimento estrutural detalhado do alvo biológico. Analisando a composição de sítios ativos e alostéricos destas enzimas ou receptores em termos de quais resíduos de aminoácidos os compõem e o posicionamento espacial dos mesmos, torna-se possível desenhar de maneira racional compostos que apresentem características complementares a estes sítios, ou estudar a complementaridade de compostos já existentes, isto é, presença e posicionamento de grupamentos químicos funcionais cujas propriedades eletrônicas e estéricas possibilitem interações termodinamicamente favoráveis com tais sítios de ligação. O conhecimento do papel fisiológico do alvo é outro requisito para este tipo de abordagem. Conhecendo a sua função biológica e a sua relação com um processo

fisiopatológico, por exemplo, podemos aplicar o conhecimento estrutural deste alvo no desenvolvimento de compostos que possam influenciar de maneira desejável o processo patológico estudado (FERREIRA, 2019; FERREIRA et al., 2023; GOMES, 2021; LIMA et al., 2021; VERLI, 2015).

1.8.2 Atracamento Molecular, Modelagem Farmacofórica e Triagem Virtual Baseada na Estrutura do Alvo

O atracamento molecular (do inglês *Molecular Docking*), a modelagem farmacofórica baseada na estrutura do alvo e a triagem virtual baseada no alvo (do inglês *Structure Based Virtual Screening*, SBVS) são metodologias que se enquadram na estratégia de SBDD e, portanto, requerem conhecimento estrutural detalhado do alvo (FERREIRA, 2019; FERREIRA et al., 2023; LIMA et al., 2021; TYAGI et al., 2022; VERLI, 2015).

No atracamento molecular e na triagem virtual baseada em *docking*, empregando algoritmos computacionais e modelos tridimensionais de compostos ou fragmentos de compostos provenientes de bancos de dados, simula-se a interação destes ligantes em potencial com alguma região específica da estrutura alvo em questão, como, por exemplo, o sítio ativo de uma enzima. Os compostos estudados têm sua estrutura simulada em várias conformações distintas, e essas são inseridas computacionalmente dentro do sítio de interesse do alvo biomolecular, processo que pode ser realizado por meio de algoritmos fundamentalmente distintos, como os genéticos Darwinianos e Lamarckianos, além dos estocásticos, entre outros. Então, as poses dos ligantes dentro do sítio do alvo são avaliadas por funções de ranqueamento de acordo com a sua complementaridade com o mesmo. Estas funções empregam uma análise das interações estéricas e eletrostáticas entre o ligante e o alvo para estimar um modelo da termodinâmica desta interação, e assim predizer quais poses dos ligantes mais provavelmente apresentariam maior afinidade pelo receptor. Deste modo, a otimização de um protótipo pode ser continuada a partir dos compostos que apresentem interações mais favoráveis (FERREIRA et al., 2023; GLAAB, 2016; GOMES, 2021; VERLI, 2015).

Na modelagem farmacofórica baseada na estrutura do alvo e na triagem virtual baseada em modelo farmacofórico, o sítio de ligação de um alvo biomolecular

tem sua estrutura mapeada, e as propriedades espaciais e físico-químicas dos resíduos de aminoácidos que compõem o sítio são analisadas por algoritmos computacionais, de modo que o tamanho e características químicas dos bolsos que formam o sítio possam ser usados na construção de um modelo quantitativo que representa as possíveis interações químicas e propriedades estruturais que um ligante deva ter para poder realizar uma interação ótima com o sítio. Assim, de maneira similar a triagem virtual baseada em atracamento molecular, é possível triar dentre uma biblioteca de compostos ou fragmentos moleculares quais os mais promissores para a interação com o sítio estudado (FERREIRA et al., 2023; TYAGI et al., 2022).

Estas metodologias permitem que a busca por novos ligantes se torne muito mais eficiente, pois a partir de uma biblioteca contendo centenas, milhares, ou até milhões de compostos, é possível eleger algumas poucas dezenas de compostos promissores para a realização de ensaios biológicos, além da possibilidade de desenhar alguns compostos que provavelmente, segundo a estrutura do alvo, irão apresentar afinidade por este, o que propicia uma grande redução de custos e de tempo nesta primeira etapa do desenvolvimento (FERREIRA et al., 2023; GLAAB, 2016; LIMA et al., 2021; PRIETO-MARTÍNEZ et al., 2019; TYAGI et al., 2022).

Porém, para que seja possível prever e avaliar a interação de compostos com o alvo escolhido, se faz necessário conhecimento estrutural e dinâmico extensivo do mesmo, a estrutura do sítio ativo, quais resíduos de aminoácidos estão envolvidos no reconhecimento do ligante e na catálise da reação, no caso de uma enzima, e o posicionamento destes no espaço. Desta forma, esta metodologia requer um modelo estrutural da proteína alvo, que pode ser obtido pela técnica de cristalografia e difração de raios X, criomicroscopia eletrônica, ressonância magnética nuclear, modelagem comparativa, entre outras (FERREIRA, 2019; FERREIRA et al., 2023; GOMES, 2021; JUMPER et al., 2021; VARADI et al., 2022; VERLI, 2015; WEBB; SALI, 2016).

1.9 Modelagem Molecular de Proteínas

A técnica computacional de Modelagem Molecular compreende um conjunto de metodologias que se apresentam como uma alternativa a elucidação estrutural

experimental de proteínas, visto que metodologias como cristalografia e difração de raios X, difração de nêutrons, criomicroscopia eletrônica e ressonância magnética nuclear (RMN) são de complexidade elevada e mesmo com os recursos adequados, estas não são aplicáveis a toda e qualquer estrutura protéica por diversos motivos (JUMPER et al., 2021; VARADI et al., 2022; VERLI, 2015; WEBB; SALI, 2016).

A modelagem computacional pode ser abordada por metodologias distintas, tais como a Modelagem Comparativa, o *Threading* ou predição do enovelamento e a Modelagem *Ab initio* ou predição por primeiros princípios, dependendo do grau de identidade da sequência alvo com estruturas conhecidas. Quando não há nenhuma estrutura de referência adequada pode-se tentar prever a ocorrência de estruturas secundárias na sequência alvo com base nas interações químicas e estéricas entre seus resíduos de aminoácidos, essencialmente buscando a conformação de menor energia em ambiente aquoso e levando em consideração propriedades conhecidas de proteínas, como ângulos diedrais termodinamicamente favoráveis que sabidamente ocorrem em estruturas proteicas (predição *Ab initio*). Outra abordagem é o chamado *Threading*, onde a sequência alvo é comparada com bancos de dados compostos por pequenos fragmentos de sequências de aminoácidos que estatisticamente apresentam um determinado tipo de enovelamento, provindas de um grande número de estruturas de proteínas resolvidas experimentalmente. Considerando que o enovelamento é mais conservado do que as sequências de aminoácidos, e que o número de tipos de enovelamento possíveis para proteínas é limitado, pode-se encontrar quais estruturas secundárias a sequência alvo apresenta maior probabilidade de assumir (JUMPER et al., 2021; VARADI et al., 2022; VERLI, 2015; WEBB; SALI, 2016).

Já a metodologia de Modelagem Comparativa se baseia no emprego de propriedades tridimensionais elucidadas experimentalmente, provenientes de uma ou mais proteínas usadas como moldes, na construção de modelos tridimensionais de outras proteínas a partir de suas sequências de aminoácidos, desde que as estruturas molde e modelada apresentem alto grau de identidade entre suas estruturas primárias, de modo que estas possam ser alinhadas satisfatoriamente (VERLI, 2015; WEBB; SALI, 2016).

Atualmente, ferramentas que empregam várias metodologias de modelagem combinadas são muito utilizadas, incluindo algumas que abordam o problema com auxílio de Inteligência Artificial e Aprendizado de Máquinas, de modo a aplicar as várias metodologias conhecidas e os bancos de dados disponíveis de maneira extremamente eficiente. Um exemplo desta abordagem é a ferramenta AlphaFold, que ganhou muita visibilidade nos últimos anos por ser capaz de resolver com qualidade boa ou, ao menos, razoável as estruturas de quase todas as sequências de aminoácidos conhecidas pela comunidade científica, revolucionando a Modelagem Molecular de proteínas (JUMPER et al., 2021; VARADI et al., 2022; WEBB; SALI, 2016).

1.10 Dinâmica Molecular

A metodologia de Dinâmica Molecular (DM) envolve a parametrização matemática das propriedades dos átomos de um modelo, por meio de um conjunto de parâmetros validados experimentalmente chamado de campo de força, para então simular a movimentação do modelo ao longo do tempo por meio de cálculos de Mecânica Molecular e equações de movimento de Newton. Os principais parâmetros utilizados são a carga e a massa dos átomos, que são tratados como esferas, e a força e comprimento de suas ligações covalentes, que são tratadas como molas. As interações não ligadas, tanto eletrostáticas como apolares, também são simuladas (ABRAHAM et al., 2023, 2015; LEMKUL, 2019; VERLI, 2015).

Considerando que modelos de proteínas existem estáticos e isolados em um vácuo, enquanto as proteínas reais existem em um meio aquoso, interagem com várias outras moléculas e estão em constante movimento, as simulações de Dinâmica Molecular apresentam uma ampla gama de aplicações. Exemplos do uso de simulações de DM são a avaliação dinâmica da interação ligante-receptor em meio fisiológico ao longo do tempo, o estudo de mudanças conformacionais e de encaixe induzido em estruturas de macromoléculas, o refinamento de estruturas tanto modeladas computacionalmente como aquelas resolvidas experimentalmente, levando em consideração, por exemplo, que o meio para a obtenção de cristais de proteínas é bastante distinto do meio fisiológico no qual elas ocorrem, entre outros (FERREIRA, 2019; FERREIRA et al., 2023; VERLI, 2015).

1.11 Cálculos de energia de interação via MMPBSA

O MM/PBSA, do inglês *Molecular Mechanics/Poisson-Boltzmann Surface Area*, ou Mecânica Molecular/Área Superficial de Poisson-Boltzmann, é um método de estado final de pós-processamento para calcular a energia livre de solvatação de moléculas em solução, podendo usar conjuntos de dados derivados de simulações de Dinâmica Molecular. O método emprega o modelo de solvatação implícita de Poisson-Boltzmann e a área superficial acessível ao solvente (SASA, do inglês *solvent accessible surface area*) para estimar a energia de solvatação das espécies estudadas, e as frequências vibracionais podem ser calculadas usando o método de modos normais ou análise quase-harmônica para aproximar a variação de entropia do soluto, entre outros métodos como *interaction entropy* e *C2 entropy*. Interações específicas também podem ser dissecadas usando a metodologia de decomposição de energia livre ou de varredura de alanina. Esta metodologia pode ser usada para estudar a interação e estimar a afinidade de ligantes por proteínas (DUAN; LIU; ZHANG, 2016; EKBERG; RYDE, 2021; MILLER et al., 2012; VALDÉS-TRESANCO et al., 2021; WANG et al., 2016).

2. OBJETIVOS

Os objetivos centrais desta dissertação foram dois:

- 1) Construção, validação e refinamento de modelos tridimensionais de *Sirtuin 2 related protein 1* (Sir2rp1) de espécies do gênero *Leishmania*, empregando-se para tal metodologias e ferramentas de Modelagem Comparativa e Dinâmica Molecular.
- 2) Estudo estrutural dos modelos construídos e de sua interação com seus substratos naturais e comparação entre eles e com a estrutura da Sirtuína 2 Humana

3. MATERIAIS

- Servidor de processamento Dell PowerEdge T630, processadores 2x Intel Xeon E5-2650v3 (20 núcleos, 40 *threads*, 2.3 GHz, frequência turbo de 3 GHz), 64GB de memória RAM, 12TB de armazenamento em RAID 5 (8TB disponíveis para o usuário), placas de vídeo 2x NVIDIA GeForce RTX 2060 6GB. Sistema operacional VMWare ESXi 6.0, máquinas virtuais com Linux Ubuntu 20 instalado.
- Bancos de dados utilizados:
 - Protein Data Bank (PDB)
 - UniProt
- Sequências de aminoácidos utilizadas (Códigos de acesso UniProt):

Q25337	E9AY03	Q8IT90
A0A3P3Z957	Q4DP02	A0A6L0XH39
Q4QB33	Q4Q2Y6	Q8IXJ6
Q96EB6	Q9NTG7	Q9Y6E7
Q9NXA8	Q8N6T7	Q9NRC8
A4IAM7	-	-

- Estruturas tridimensionais de proteínas utilizadas (Códigos de acesso PDB):

5OL0	3ZGO	5D7O	2H4F
5DY4	4RMJ	4BUZ	1YC2
4BV2	5D7P	5D7Q	4Y6L
4BV3	4L3O	5FYQ	4BN5
4RMI	4RMH	4RMG	5DY4
5YQM	5YQL	5DY5	5Y0Z
5Y5N	5MAR	5MAT	5YQN
5YQO	4R8M	7BOT	7BOS
4JSR	5G4C	4TWI	6RXJ
5OJ7	-	-	-

- *Softwares e plataformas utilizados:*

Modeller 10.3	PyMod 3.0.2	PyMol 2.5
UCSF Chimera 1.16	BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2021	SAVES 6.0
MolProbity 4.5.1	QMEAN	GROMACS 2023.3
LigPlotPlus 2.2	AmberTools 22	ACPYPE 2022.1.3
Visual Molecular Dynamics (VMD) 1.9.3	BioRender	ChemDraw Ultra 12
gmx_MMPBSA 1.6.1	DisEMBL 1.5	XMGrace
CavityPlus	PyMol 2.5	Open Babel 3.1.1
Gaussian 09	Spartan v14	-

4. MÉTODOS

4.1 Construção dos modelos de *Sirtuína*

Empregando o *software* Modeller através do pacote PyMod, foram construídos modelos tridimensionais de *Sirtuin 2 related-protein 1* das espécies *L. infantum*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. amazonenses*, *L. braziliensis* e *T. cruzi*, tendo como base sequências de aminoácidos consideradas canônicas destas enzimas depositadas no banco de dados UniProt (códigos de acesso A0A6L0XH39, Q25337, E9AY03, Q8IT90, A0A3P3Z957 e Q4DP02, respectivamente), por meio da técnica de Modelagem Comparativa e do uso da estrutura tridimensional de Sir2rp1 de *L. infantum* extraída da plataforma PDB (código de acesso 5OL0, cadeia A) como molde. Realizou-se o alinhamento entre as sequências modeladas e o molde realizado por meio da ferramenta Clustal Omega. Para cada sequência foram gerados 10 modelos, sendo que o melhor destes foi usado nos experimentos subsequentes. Quando necessário, como por exemplo devido à presença de nós, a porção da grande alça desordenada foi refinada por meio da função de modelagem de alças do Modeller.

Os modelos foram visualizados e manipulados por meio dos *softwares* PyMol, da Schrödinger, LLC, Chimera, da *University of California, San Francisco* e Discovery Studio Visualizer, da *Dassault Systèmes* (BIOVIA, 2023; PETERSEN et al., 2004; SCHRÖDINGER, 2022).

4.2 Validação dos modelos

Os modelos gerados foram avaliados quanto à qualidade estereoquímica de sua cadeia principal por meio de gráficos de Ramachandran (diagramas de ângulos Phi e Psi) e desvio de ângulos ômega, e quanto a qualidade de sua cadeia lateral por meio de desvios de ângulos Chi1-Chi2 e de planaridade, além da análise de qualidade local dos resíduos de aminoácidos dos modelos e qualidade global dos mesmos, entre outros parâmetros como a quiralidade dos resíduos de aminoácidos, geometria tetraédrica dos átomos de carbono alfa, número de prolinas cis, número de *bad contacts*, distâncias de ligação entre os átomos dos modelos e a geometria ideal das ligações de hidrogênio formadas nos mesmos, empregando para tal as ferramentas PROCHECK e WHATCHECK do servidor SAVES, do *Molecular Biology Institute da University of California*, o servidor MolProbity, do *Richardson Lab da Duke University School of Medicine*, a ferramenta QMEAN, do *Center for Molecular Life Sciences da University of Basel* e a função DOPE score do *software Modeller* (FERREIRA, 2019; FERREIRA et al., 2023; GOMES, 2021; HOOFT et al., 1996; LASKOWSKI et al., 1993; SHEN; SALI, 2006; STUDER et al., 2020; WILLIAMS et al., 2018).

4.3 Simulações de Dinâmica Molecular das estruturas dos modelos

Posteriormente, os modelos validados de Sir2rp1 de *L. infantum*, *L. major*, *L. braziliensis* e da hSIRT2 foram submetidos a simulações de Dinâmica Molecular e seu movimento e estabilidade avaliados, na presença de um substrato peptídico e co-substrato NAD⁺, por meio do pacote GROMACS versão 2023.3 e do campo de força AMBER99SB-ILDN. Os ligantes não peptídicos foram parametrizados usando o *software Antechamber*, parte do pacote AmberTools, por meio do script ACPYPE, empregando-se para tal o campo de força GAFF (do inglês, *General Amber Force Field*). (ABRAHAM et al., 2015; FERREIRA, 2019; FERREIRA et al., 2023; LEMKUL, 2019; LINDORFF- LARSEN et al., 2010; SOUSA DA SILVA; VRANKEN, 2012; WANG et al., 2004, 2006).

4.3.1 Montagem dos sistemas de simulação

Os modelos foram manipulados com auxílio do software PyMol, e os complexos (Sirtuína, substrato segmento do peptídeo p53 acetilado, co-substrato NAD⁺ e íon estrutural Zn²⁺) foram então preparados para simulação no pacote GROMACS 2021.3, em triplicata, de acordo com a seguinte metodologia. As topologias para os sistemas foram geradas com o módulo pdb2gmx usando o campo de força AMBER99SB-ILDN e o modelo de água TIP3P. Os estados de protonação dos resíduos de aminoácidos ionizáveis foram aplicados considerando um pH de 7. O co-substrato NAD⁺ foi parametrizado utilizando a ferramenta Antechamber do pacote AmberTools22 e o campo de força GAFF por meio do script ACPYPE, e as cargas parciais assignadas aos seus átomos por esta ferramenta foram checadas empregando os métodos de mecânica quântica (MQ) da Teoria do Funcional da Densidade (do inglês, *Density Functional Theory*, DFT) com o método B3LYP e Hartree-Fock (HF) com a base de cálculos 6-311++G** por meio dos *softwares* Spartan e Gaussian, apresentando valores próximos aos calculados por essas metodologias. Os complexos foram colocados dentro de uma caixa de simulação de forma dodecaédrica rômica com uma distância mínima de um nanômetro (nm) das bordas dos mesmos. Os sistemas foram solvatados, sua carga elétrica líquida foi neutralizada com íons de sódio e sal cloreto de sódio foi adicionado a uma concentração de 145 mmol. Um intervalo de corte duplo de um nm foi usado para os cálculos das interações Coulombicas (eletrostática de curto alcance) e interações não covalentes de Lennard-Jones (van der Waals). As interações eletrostáticas de longo alcance foram calculadas usando o método de malha suave de partículas de Ewald (do inglês, *smooth particle-mesh Ewald*, PME), com um esquema de interpolação cúbica (ABRAHAM et al., 2023, 2015; FERREIRA, 2019; FERREIRA et al., 2023; FRISCH et al., 2009; LEMKUL, 2019; LEMKUL; BEVAN, 2010; LINDORFF- LARSEN et al., 2010; SCHRÖDINGER, 2022; SHAO et al., 2006; SOUSA DA SILVA; VRANKEN, 2012; WANG et al., 2004, 2006).

4.3.2 Minimização de energia e equilíbrio

Os sistemas passaram por uma primeira etapa de minimização de energia usando o algoritmo do método do gradiente (do inglês, *steepest descent algorithm*)

com um intervalo de distância de um picômetro (pm) até que a força máxima convergisse abaixo de mil kilojoules por mol por nanômetro (kJ/mol·nm). Seguindo a minimização por método do gradiente, cada sistema foi equilibrado em duas etapas, com restrições de posicionamento de 10^3 kJ/mol·nm² em todos os eixos aplicadas a todos os átomos pesados dos complexos. Os comprimentos de todas as ligações envolvendo átomos de hidrogênio foram harmonicamente restringidos aos seus valores de equilíbrio usando o algoritmo LINCS. A lista de vizinhos para o cálculo de interações não covalentes foi atualizada a cada cem etapas de tempo sob condições de fronteira periódicas (do inglês, *Periodic Boundary Conditions*, PBC) e a correção de dispersão foi aplicada aos termos de energia e pressão para compensar o truncamento dos termos de van der Waals. Em todas as simulações, os complexos e os íons cloreto de sódio e as moléculas de solvente foram separadamente fracamente acoplados a dois banhos de temperatura a 310 K, usando o algoritmo de Berendsen modificado, V-Rescale, com um tempo de acoplamento de 0,1 picosegundo (ps), e as equações de movimento foram integradas usando o algoritmo *Leapfrog* com um intervalo de tempo de dois femtosegundos (fs). As velocidades iniciais foram obtidas a partir de distribuição Maxwelliana na temperatura de 310 K, e uma trajetória de equilíbrio de temperatura sob volume constante (conjunto NVT) foi calculada por 200 ps. Os sistemas foram então equilibrados sob pressão constante de um bar (conjunto NPT) empregando o barostato de Berendsen modificado, C-Rescale, com tempo de acoplamento de dois ps em trajetória computada por 200 ps, escalando o centro de massa das coordenadas de referência com a matriz de escala do acoplamento de pressão (ABRAHAM et al., 2023, 2015; FERREIRA, 2019; FERREIRA et al., 2023; LEMKUL, 2019; LEMKUL; BEVAN, 2010).

4.3.3 Simulações de *Dinâmica Molecular de produção*

Duas simulações de dinâmica molecular de produção foram então conduzidas por mil nanosegundos (ns) para cada modelo, com tempo de amostragem de dez ps. A primeira trajetória de simulação de DM de produção foi computada aplicando-se restrições de posicionamento de 1000 kJ/mol·nm² em todos os eixos aos átomos pesados do substrato segmento do peptídeo p53 e do

co-substrato NAD^+ , para que a enzima pudesse se acomodar em torno de seus ligantes. A segunda simulação de DM de produção foi então computada sem quaisquer restrições de posicionamento, partindo da estrutura central de um *cluster* populoso e representativo da conformação holo da enzima proveniente da primeira simulação de um microsegundo (μs) de cada modelo de Sirtuína, e empregando o barostato Parrinello-Rahman com um tempo de acoplamento de dois ps para regular a pressão isotropicamente (ABRAHAM et al., 2023, 2015; FERREIRA et al., 2023; LEMKUL, 2019; LEMKUL; BEVAN, 2010).

Adicionalmente, para as análises realizadas pela metodologia de Mecânica Molecular/Área Superficial de Poisson-Boltzmann (MM/PBSA) foi conduzido um terceiro conjunto de simulações de dinâmica molecular de produção de dez ns cada, partindo da estrutura central de um *cluster* populoso e representativo da conformação holo da enzima proveniente da segunda simulação de um μs de cada modelo de Sirtuína, utilizando-se para tal os mesmos parâmetros da simulação anterior, porém com uma frequência de amostragem de cem fs, devido à necessidade de uma amostragem mais densa das trajetórias para este tipo de cálculo (DUAN; LIU; ZHANG, 2016; EKBERG; RYDE, 2021).

4.3.4 Tratamento das trajetórias de Dinâmica Molecular

As trajetórias das três simulações de produção para cada modelo foram tratadas para posterior análise empregando-se os módulos grompp e trjconv do pacote GROMACS, de acordo com a seguinte metodologia. O primeiro *frame* da trajetória não tratada fora extraído aplicando-se o filtro “cluster” e agrupando todos os elementos dos complexos (Sirtuína, substrato segmento do peptídeo p53 acetilado, co-substrato NAD^+ e íon estrutural Zn^{2+}). A partir deste *frame*, fora gerado um novo arquivo de entrada de simulação (.tpr), e utilizando este novo arquivo tpr foi gerado um novo arquivo de trajetória (.xtc) aplicando-se neste o filtro “nojump”, de modo que todos os elementos dos complexos permaneçam unidos e não atravessem as condições de fronteira periódicas individualmente. Então, o primeiro *frame* desta nova trajetória fora extraído aplicando-se os filtros “pbc”, “center” e “ur”, com este foi gerado um novo arquivo de entrada de simulação (.tpr), e utilizando este novo arquivo tpr foi gerado um novo arquivo de trajetória (.xtc) a partir do

anterior, aplicando-se neste os filtros “pbc”, “center” e “ur”, com a finalidade de centralizar os complexos no centro das caixas de simulação, para evitar que estes atravessassem as condições de fronteira periódicas. Por fim, o último arquivo de entrada de simulação gerado foi usado para gerar um novo arquivo de trajetória a partir do anterior, aplicando-se neste o filtro “fit”, para compensar pelos movimentos de rotação e translação dos complexos ao longo das trajetórias de simulação de dinâmica molecular (ABRAHAM et al., 2023, 2015; LEMKUL, 2019; LEMKUL; BEVAN, 2010).

4.3.5 Clusterização das trajetórias

Então, usando os arquivos de entrada de simulação e de trajetória tratados, as estruturas dos complexos nas trajetórias foram clusterizadas usando o módulo cluster do pacote GROMACS, realizando o alinhamento estrutural (*Least Squares Fitting*) entre todos os átomos pesados das enzimas a não ser aqueles pertencentes às extremidades flexíveis terminais N e C e à grande alça desordenada da mesma, com um corte de RMSD de 0,1 nm e empregando o método de agrupamento de Jarvis-Patrick. As estruturas centrais dos *clusters* que representaram o maior número de conformações dos complexos nas trajetórias foram usadas nos experimentos subsequentes (ABRAHAM et al., 2023, 2015; LEMKUL, 2019; LEMKUL; BEVAN, 2010).

4.3.6 Modificação do campo de força

O campo de força AMBER99SB-ILDN não contém parâmetros para o resíduo de lisina acetilado e, portanto, teve de ser modificado para poder parametrizar a topologia deste resíduo do substrato peptídico das Sirtuínas. Para tal, o procedimento descrito no manual do pacote GROMACS foi seguido. Primeiramente, a entrada para o resíduo de lisina do arquivo de topologia de resíduos (aminoacids.rtp) do campo de força foi duplicada e renomeada de “LYS” para “ALY” (de *Acetyl Lysine*). Esta entrada foi então modificada de modo a acrescentar os átomos de carbono e de oxigênio carbonílicos e o grupo metila do radical acetil ao resíduo, além de modificar o nitrogênio ϵ de amina para amida, de acordo com os tipos de átomos usados neste campo de força. As cargas parciais dos átomos foram

calculadas para o resíduo de acetil lisina por meio da ferramenta Antechamber do AmberTools22 através do script ACPYPE, de acordo com o procedimento descrito no tutorial oficial do pacote AmberMD, e as cargas parciais assignadas aos seus átomos por esta ferramenta foram checadas empregando os métodos de MQ de DFT com o método B3LYP e de HF com a base de cálculos 6-311++G** por meio dos *softwares* Spartan e Gaussian, apresentando valores próximos aos calculados por essas metodologias. O banco de dados de átomos de hidrogênio (aminoacids.hdb) também foi modificado para incluir uma entrada para o novo resíduo que, de maneira similar, foi duplicada a entrada para o resíduo de lisina, renomeada, e modificada para incluir o número, tipo e conectividade dos átomos de hidrogênio pertinentes para o resíduo de lisina acetilada. Por fim, foi incluído no arquivo do pacote GROMACS “residuetypes.dat” o novo resíduo “ALY”. Desta maneira, o módulo pdb2gmx é capaz de reconhecer, adicionar átomos de hidrogênio e parametrizar automaticamente o resíduo de lisina acetilada dos substratos peptídicos das Sirtuínas. (ABRAHAM et al., 2023; FRISCH et al., 2009; LINDORFF-LARSEN et al., 2010; SHAO et al., 2006; SOUSA DA SILVA; VRANKEN, 2012; SWAILS; CASE; LEE, 2015; WANG et al., 2004, 2006).

4.4 Cálculos de energia de interação enzima-ligante via MMPBSA

Análises de energia de ligação entre os modelos de Sirtuína estudados e seus substratos naturais foram executadas usando a metodologia de *Molecular Mechanics/Poisson-Boltzmann Surface Area* por meio do pacote gmx_MMPBSA. Empregando-se o protocolo de trajetória única, dez mil *frames* (equivalente à 1 ns de simulação) do terceiro conjunto de trajetórias de DM computadas por dez ns cada com um tempo de amostragem de cem fs foram utilizados para os cálculos de energia de ligação entre os modelos de Sirtuína, o resíduo de lisina acetilada do substrato peptídico e o co-substrato NAD⁺, empregando o modelo de solvatação implícita de Poisson-Boltzmann para os cálculos de energia de interação e a aproximação de entropia C2 para os cálculos da variação de entropia dos complexos, além da análise de decomposição de energia livre para a avaliação da contribuição energética individual de cada resíduo de aminoácido para a interação

com os ligantes. (DUAN; LIU; ZHANG, 2016; EKBERG; RYDE, 2021; MILLER et al., 2012; VALDÉS-TRESANCO et al., 2021; WANG et al., 2016).

4.5 Análise comparativa entre as estruturas de Sirtuína 2

Estruturas dos modelos construídos e refinados do homólogo Humano da Sirtuína 2 (hSIRT2) e de Sir2rp1 de Tripanosomatídeos, complexadas com o co-substrato NAD⁺ e um substrato peptídico acetilado, foram avaliadas com auxílio dos *softwares* Discovery Studio Visualizer, UCSF Chimera, PyMol, LigPlot+, Visual Molecular Dynamics (VMD), gmx_MMPBSA, CavityPlus e GROMACS, para reconhecimento dos resíduos envolvidos na interação com seus ligantes naturais, entre outras propriedades dos sítios ativos das enzimas estudadas (ABRAHAM et al., 2023, 2015; BIOVIA, 2023; FERREIRA, 2019; FERREIRA et al., 2023; GOMES, 2021; HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996; LASKOWSKI; SWINDELLS, 2011; LEMKUL, 2019; LEMKUL; BEVAN, 2010; PETERSEN et al., 2004; SCHRÖDINGER, 2022; VALDÉS-TRESANCO et al., 2021; WANG et al., 2023; XU et al., 2018).

A partir das análises conduzidas com os modelos construídos e usando alinhamentos estruturais realizados no *software* PyMol e alinhamentos de suas sequências de aminoácidos executadas com a ferramenta Clustal W foram comparados os resíduos homólogos essenciais para a interação com seus substratos enzimáticos naturais e as diferenças entre os seus sítios de ligação foram estudadas (ABRAHAM et al., 2015; GOMES, 2021; LARKIN et al., 2007; MADEIRA et al., 2022; SCHRÖDINGER, 2022; VALDÉS-TRESANCO et al., 2021).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudo estrutural das Sirtuínas

Levando-se em consideração a maior homologia entre as Sir2rp1 de Tripanosomatídeos com a Sirtuína 2 humana (Tabela 3), e a grande abundância de estruturas cristalográficas desta última em complexo com uma gama de ligantes inibidores enzimáticos, o presente trabalho iniciou-se com a realização de um levantamento e subsequente revisão bibliográfica sobre a estrutura da hSIRT2 e os

possíveis modos de ligação de inibidores conhecidos desta enzima. (PENTEADO et al., 2023).

Em termos estruturais, as Sirtuínas compartilham um núcleo conservado em formato oval de aproximadamente 275 resíduos de aminoácidos. Estes, se apresentam flanqueados pelas porções terminais N e C, que são estruturalmente mais flexíveis que o domínio central e evolutivamente menos conservadas em toda a família das Sirtuínas. O núcleo catalítico é composto por dois domínios globulares, o domínio Dobra de Rossmann ou domínio grande e um domínio menor que contém um módulo de ligação ao zinco. A interseção entre esses dois domínios forma os sítios de ligação do substrato e co-substrato, peptídeo contendo um resíduo de lisina *N*-acilada e o NAD⁺, formando uma grande fenda que contém os resíduos catalíticos da enzima (Figura 10). No homólogo mamífero da Sirtuína 2, sabe-se que a região terminal N contém uma sequência de exportação nuclear (NES), responsável por sua localização predominantemente citoplasmática, enquanto a porção terminal C tem uma composição rica em serina e demonstrou modular a atividade da enzima através da fosforilação de resíduos de tirosina e serina e acetilação de resíduos de lisina (FINNIN; DONIGIAN; PAVLETICH, 2001; MONIOT; SCHUTKOWSKI; STEEGBORN, 2013; RUMPF et al., 2015a).

O domínio denominado Dobra de Rossmann (do inglês *Rossmann-fold*) está presente em muitas proteínas que tem NAD(H)/NADP(H) como cofator e é essencial para a interação com esses cofatores nucleotídicos. A Dobra de Rossmann variante da SIRT2 é composta por seis fitas β paralelas (β 1-3 e β 7-9) formando uma folha β que é flanqueada por seis hélices α (α 1, 7, 8 e 10-12) que estão dispostas em uma clássica configuração β - α - β . Existem três outras hélices α que compõem o domínio, α 13 e α 14, que levam à porção terminal C e α 2, que exhibe um motivo típico dos domínios Dobra de Rossmann, a sequência de ligação à NAD(P)(H), GLY-X-GLY, e o conecta a uma das duas inserções que formam o domínio menor (Figura 10). Além disso, exhibe outro motivo típico aos domínios Dobra de Rossmann, o pequeno bolso com resíduos polares que se ligam aos dois grupos ribose fosfato. Essa estrutura é composta por três segmentos, que na Sirtuína 2 humana correspondem aos resíduos 53-89, 146-186 e 241-356 (Figura 10), e estão intercalados com as duas inserções que formam o domínio menor. Os resíduos das quatro alças que

conectam os dois domínios (L1, L2, L4 e L5), juntamente com três alças do domínio grande (L3, L6 e L7), formam a grande fenda contendo os sítios de ligação da enzima (Figuras 10 e 11). De fato, L1, L3 e L4 estão entre as partes mais conservadas desta família de enzimas (FINNIN; DONIGIAN; PAVLETICH, 2001; MONIOT; SCHUTKOWSKI; STEEGBORN, 2013; RUMPF et al., 2015a).

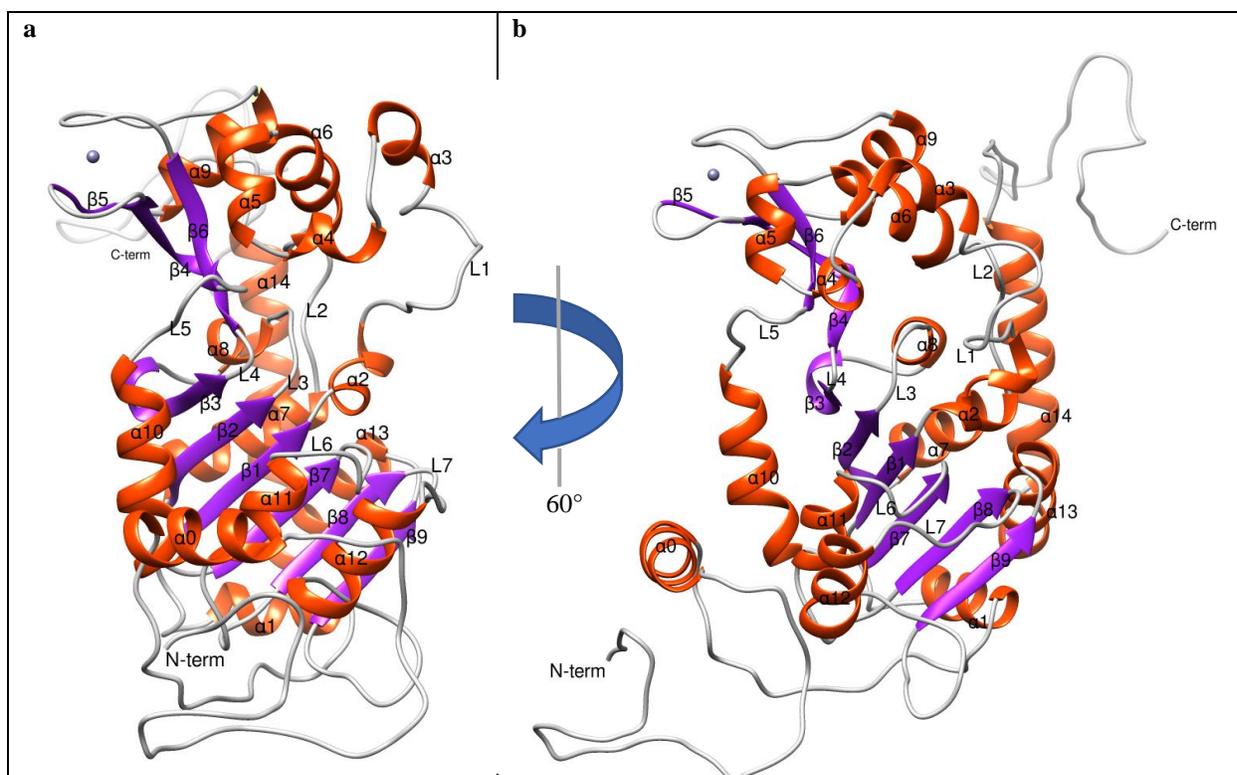


Figura 10. Representação do tipo *cartoon* da estrutura da cadeia principal da hSIRT2. Os elementos da estrutura secundária estão rotulados.

As fitas β estão representadas em magenta, as hélices α em laranja e as alças e voltas em cinza claro. A numeração vai do terminal N ao terminal C.

A representação da enzima mostrada em (b) está rotacionada aproximadamente 60 graus no sentido horário em seu eixo longitudinal em relação à representação mostrada em (a).

A esfera cinza é o íon estrutural de Zn^{2+} complexado com a enzima.

A grande fenda contendo os sítios de ligação do substrato e do co-substrato da enzima são formados pelas alças L1, L2, L3, L4, L5, L6 e L7, resíduos 93-101, 140-145, 167-170, 186-187, 233-239, 261-267 e 287-293, respectivamente.

Figura elaborada pelo autor por meio do *software* UCSF-Chimera, utilizando a estrutura da hSIRT2 modelada pelo *software* Modeller empregando a sequência canônica de 389 resíduos depositada no banco de dados UniProt com código de acesso Q8IXJ6, e usando como molde a estrutura da hSIRT2 depositada no banco de dados PDB com o código de acesso 3ZGO. A estrutura mostrada aqui foi modelada pois o molde usado não contém a região terminal C, a extremidade da região terminal N e uma porção de conexão entre as hélices $\alpha 0$ e $\alpha 1$, devido à impossibilidade de resolver essas estruturas flexíveis através da técnica cristalografia de raios-X.

O subdomínio de ligação ao zinco resulta de uma inserção no domínio Dobra de Rossmann, que começa na alça L4 e termina na alça L5, ficando assim entre o segundo e o terceiro segmentos da Dobra de Rossmann. Consiste em uma hélice α (α_9) e uma folha β antiparalela composta por três fitas (β_4 , 5 e 6), correspondendo aos resíduos 187-240 no homólogo humano. Um cátion divalente de zinco coordena com geometria tetraédrica com dois pares de resíduos de cisteína aniônica (cisteínatos 195, 200, 221 e 224) (Figuras 10 e 11). Essa estrutura tem uma topologia semelhante ao motivo dedo de zinco do tipo RING (do inglês, *Really Interesting New Gene*), que está implicado na interação proteína-proteína em uma ampla variedade de enzimas, incluindo a modulação da atividade de ubiquitina ligases E3, envolvidas em vários processos celulares como a progressão de cânceres. O motivo RING clássico é caracterizado pela composição de resíduos C-x-C-x-C-x-H-x-C-x-C-x-C-x-C, enquanto o subdomínio de ligação ao zinco das Sirtuínas não apresenta o segundo cátion de zinco e a sua hélice α esteja mais frouxamente empacotada à folha β , em comparação com o motivo RING tradicional. Apesar do cátion zinco não estar diretamente envolvido no mecanismo catalítico das enzimas da família das Sirtuínas, sua presença é essencial para o enovelamento e integridade estrutural dessas proteínas, e sua ausência resulta em perda completa da atividade catalítica (CASSANDRI et al., 2017; FINNIN; DONIGIAN; PAVLETICH, 2001; MONIOT; SCHUTKOWSKI; STEEGBORN, 2013; RUMPF et al., 2015a).

Juntamente com a região de ligação ao zinco, o domínio pequeno é composto por outra inserção ao domínio Dobra de Rossmann, que forma o módulo helicoidal e contém a alça flexível de ligação ao co-substrato, rotulada L1 na figura 10. Este subdomínio é composto por quatro hélices α (α_3 -6, resíduos 90-145 da hSIRT2), ocorrendo entre o primeiro e o segundo segmentos da Dobra de Rossmann, ou seja, começa na alça L1 e termina na alça L2 (Figura 10). Sua interação com o subdomínio de ligação ao zinco e a integridade estrutural do domínio pequeno como um todo são amplamente mediadas por resíduos hidrofóbicos presentes em sua interface, formando um pequeno sulco contendo os bolsos chamados C-estendido e o bolso de seletividade da enzima (Figura 13), que estão envolvidos na seletividade da ligação a substratos e a inibidores (FINNIN; DONIGIAN;

PAVLETICH, 2001; MONIOT; SCHUTKOWSKI; STEEGBORN, 2013; RUMPF et al., 2015a).

Na isoforma da Sirtuína 2 humana de 389 resíduos, a porção terminal N é composta por 52 resíduos, com uma estrutura bastante desordenada e flexível, dos quais os resíduos 41-51 compreendem o NES. Esta porção também contém uma hélice α anfipática (α_0 , resíduos 35-45), terminando na hélice α_1 da Dobra de Rossmann. A ausência desta porção terminal N contendo o NES na isoforma de 352 resíduos da hSIRT2 provoca a localização subcelular nuclear nesta enzima. O domínio central da hSIRT2 é composto por 304 resíduos (53-356), e a porção terminal C corresponde aos últimos 33 resíduos, começando no final da hélice α_{14} do domínio grande, e também se mostra uma região altamente desordenada e flexível da proteína, que está sujeita a modificações pós-traducionais, como fosforilação e acetilação, que influenciam a atividade da enzima (Figura 10) (FINNIN; DONIGIAN; PAVLETICH, 2001; MONIOT; SCHUTKOWSKI; STEEGBORN, 2013; RUMPF et al., 2015a).

A interseção entre os domínios grande e pequeno forma uma grande fenda que contém os sítios de ligação ao substrato e co-substrato. Após a ligação do NAD^+ e do substrato peptídico, observa-se uma mudança conformacional na enzima, em que o pequeno domínio torce na direção do grande domínio, fechando a fenda ao redor dos ligantes. Observa-se também um deslocamento de aproximadamente 45 graus na orientação da hélice α_3 do módulo helicoidal e o desenovelamento completo da hélice α_{12} da Dobra de Rossmann na forma produtiva da enzima (Figuras 10-12). Assim, a enzima em sua forma apo apresenta a conformação aberta ou não produtiva (código de acesso PDB 3GZO), enquanto a holoenzima, ligada tanto ao substrato peptídico quanto ao NAD^+ , assume a conformação fechada ou produtiva (código de acesso PDB 5D7O). Nas Sir2rp1 de espécies de Tripanosomatídeos, a porção da sequência de aminoácidos que é análoga à porção da hélice α_{12} na hSIRT2 é mais longa e flexível, formando a chamada “grande alça desordenada” presente nestas enzimas (Figuras 11 e 29). Além do mais, as Sir2rp de Tripanosomatídeos não apresentam a hélice α_0 , em sua porção terminal N (AVALOS et al., 2002; FINNIN; DONIGIAN; PAVLETICH, 2001; MONIOT; SCHUTKOWSKI; STEEGBORN, 2013; RONIN et al., 2018; RUMPF et al., 2015a).

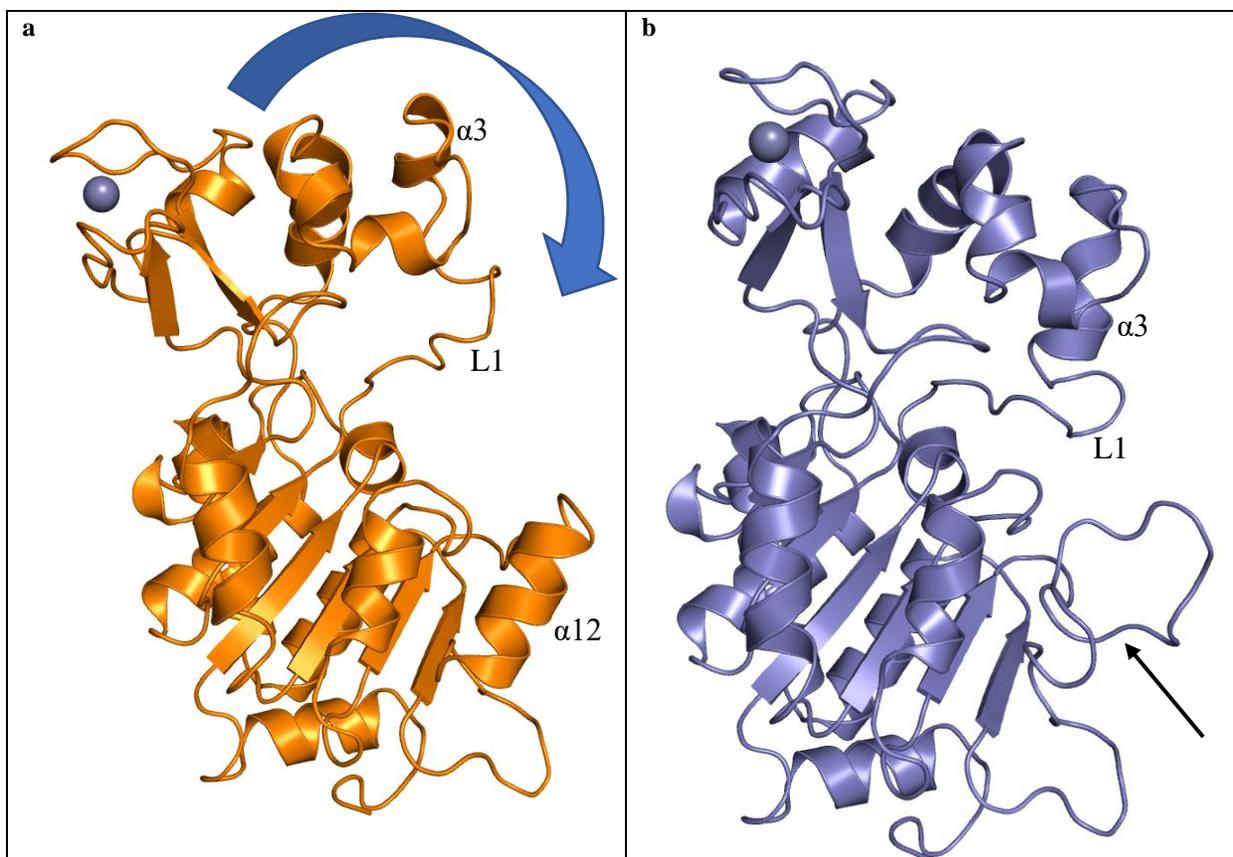


Figura 11. Representação do tipo *cartoon* da estrutura da cadeia principal da hSIRT2 nas formas apo e holo.

A apoenzima ou estrutura não produtiva está representada em laranja (a), enquanto a holoenzima em sua conformação produtiva está na cor índigo (b). Os domínios Dobra de Rossmann foram alinhados estruturalmente para mostrar a orientação relativa do domínio pequeno e a mudança conformacional induzida pela ligação aos substratos.

Na estrutura da holoenzima (b) o pequeno domínio “fecha” na direção do grande domínio, movimento que é indicado pela grande seta curva azul em (a).

A hélice $\alpha 3$ do módulo helicoidal sofre uma torção de aproximadamente 45 graus à medida que os substratos se ligam à enzima, aproximando a alça de ligação ao co-substrato (L1) do mesmo.

Na holoenzima, a hélice $\alpha 12$ da Dobra de Rossmann é completamente desenovelada, indicada pela seta preta em (b).

Nas *Sirtuin 2 related proteins 1* (Sir2rp1) de espécies de Tripanosomatídeos, a porção da sequência de aminoácidos que é análoga à porção da hélice $\alpha 12$ na hSIRT2 é mais longa e flexível, formando a chamada ‘grande alça desordenada’ presente nestas enzimas (Figura 29).

Figura elaborada pelo autor por meio do *software* PyMol, utilizando a estrutura de conformação não produtiva da hSIRT2 como depositada no banco de dados PDB com código de acesso 3ZGO (laranja, a) e a estrutura de conformação produtiva depositada no banco de dados PDB com código de acesso 5D7O (índigo, b).

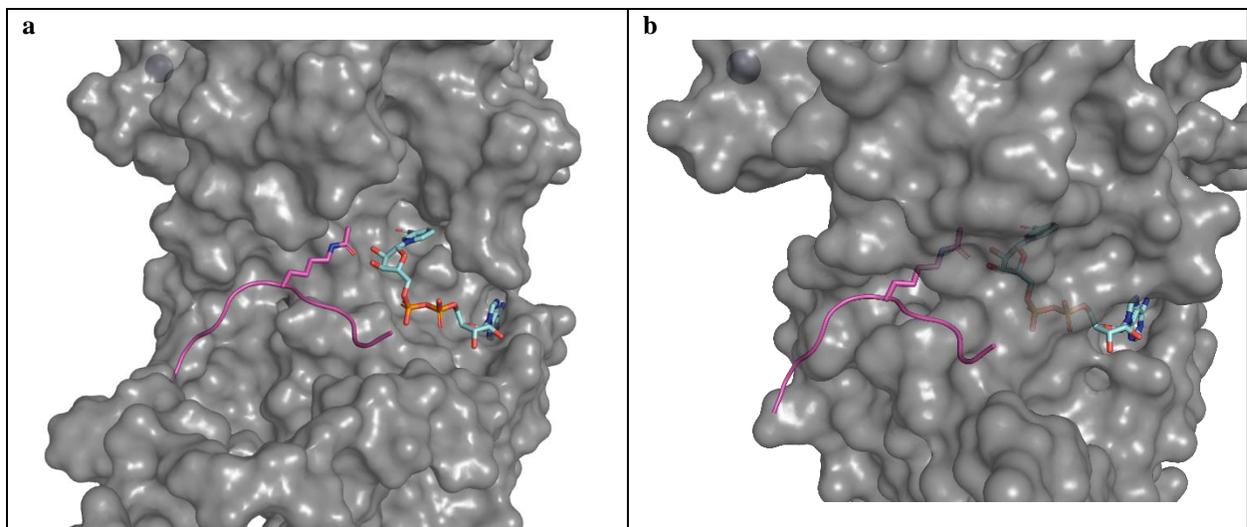


Figura 12. Representação da área superficial acessível ao solvente (SASA) da hSIRT2 nas formas apo e holo.

A área superficial acessível ao solvente (SASA) de todos os átomos da enzima, incluindo os das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos, está representada em cinza transparente.

Um substrato peptídico contendo uma lisina *N*-acetilada (segmento do antígeno tumoral celular p53) está representado com seus átomos da cadeia principal e os carbonos da cadeia lateral do resíduo de lisina em magenta, nas representações do tipo *cartoon* e bastões, respectivamente.

O co-substrato NAD⁺ aparece em ciano, na representação do tipo bastões.

Os átomos de nitrogênio estão representados na cor azul, oxigênio em vermelho e fósforo em laranja.

(a) A enzima na conformação aberta, não produtiva, mostrando claramente a grande fenda entre os domínios pequeno e grande.

(b) A enzima na conformação fechada e produtiva, envolvendo os substratos dentro da grande fenda.

Figura elaborada pelo autor por meio do *software* PyMol, utilizando a estrutura de conformação não produtiva da hSIRT2 depositada no banco de dados PDB com código de acesso 3ZGO (a) e a estrutura de conformação produtiva depositada no banco de dados PDB com código de acesso 5D7O (b). O substrato, segmento do peptídeo p53, foi sobreposto em ambas as estruturas a partir de um alinhamento estrutural com o modelo de Sir2Tm depositado no banco de dados PDB com código de acesso 2H4F, e o co-substrato NAD⁺ foi sobreposto em ambas as estruturas a partir de um alinhamento estrutural com o modelo de hSIRT2 depositado no banco de dados PDB com código de acesso 5DY4.

O sítio de ligação ao resíduo de lisina *N*-acilado do substrato, denominado bolso Ac-K, é um túnel altamente hidrofóbico que ocorre na conformação produtiva da enzima, formado principalmente por resíduos das alças L5 e L6 (Figura 10). Ele conduz da face de ligação do substrato peptídico da enzima ao sítio catalítico e aos resíduos no centro da grande fenda, na qual a cadeia lateral da lisina substituída se insere (Figuras 12 e 13). A interação do resto do substrato peptídico com a face da Sirtuína é amplamente mediada pela estrutura flexível da hélice α 12 desenovelada na holoenzima (Figura 11) e pelos resíduos das alças L5 e L6, que formam uma curta folha β antiparalela com a porção da cadeia principal do substrato que contém o resíduo de lisina substituída (AVALOS et al., 2002; FINNIN; DONIGIAN; PAVLETICH, 2001; MONIOT; SCHUTKOWSKI; STEEGBORN, 2013; RUMPF et al., 2015a).

O sítio de ligação à molécula de NAD⁺ ocorre entre a hélice $\alpha 2$ e os resíduos das alças L1, L3 e L7 da enzima (Figura 10), e é subdividido em três bolsões. O bolsão A se liga firmemente ao anel de adenina do co-substrato, mantendo-o rigidamente no lugar. O bolsão B se liga ao pirofosfato e as duas riboses, e o bolsão C se liga ao grupo nicotinamida (Figura 13). A ribose da nicotinamida (ribose N), o pirofosfato e a nicotinamida em si se ligam de maneira mais fraca à enzima e, na ausência do substrato e fechamento do pequeno domínio em direção ao grande domínio, estes grupos apresentam uma certa liberdade para adotar uma variedade de diferentes conformações. Na vacância de uma cadeia lateral de um resíduo de lisina acilada no túnel Ac-K, o grupamento pirofosfato e a ribose N do co-substrato NAD⁺ podem torcer de maneira a posicionar seu grupo nicotinamida para fora do bolso C (ver Figuras 13, 16b e 18). A ocupação do bolso Ac-K posiciona o grupo nicotinamida no bolso C. Também digno de nota, é um túnel que se forma na face oposta da entrada do túnel Ac-K, atrás do bolsão C, através do qual um dos produtos da reação enzimática, a nicotinamida livre, sai do sítio catalítico da enzima após a reação ocorrer (Figura 13b) (FINNIN; DONIGIAN; PAVLETICH, 2001; MONIOT; SCHUTKOWSKI; STEEBORN, 2013; RUMPF et al., 2015a).

Existem também dois bolsões altamente hidrofóbicos, denominados bolso C-estendido e bolso da seletividade, que se formam entre as hélices α do módulo helicoidal e na interseção entre o módulo de ligação ao zinco e o módulo helicoidal, respectivamente (Figura 13). Embora estes não participem da ligação à molécula NAD⁺, estão envolvidos na seletividade da enzima a substratos e inibidores. Por exemplo, nos substratos de Sirtuína que contêm um resíduo de lisina substituído com um ácido graxo, como uma *N*-miristoil-lisina (código de acesso PDB 4Y6L), a cadeia do ácido graxo se estende além do bolso Ac-K, se inserindo no bolso C-estendido (ver Figuras S6g-h e S8) (FELDMAN et al., 2015; FINNIN; DONIGIAN; PAVLETICH, 2001; JING et al., 2016; MONIOT; SCHUTKOWSKI; STEEBORN, 2013; RUMPF et al., 2015a).

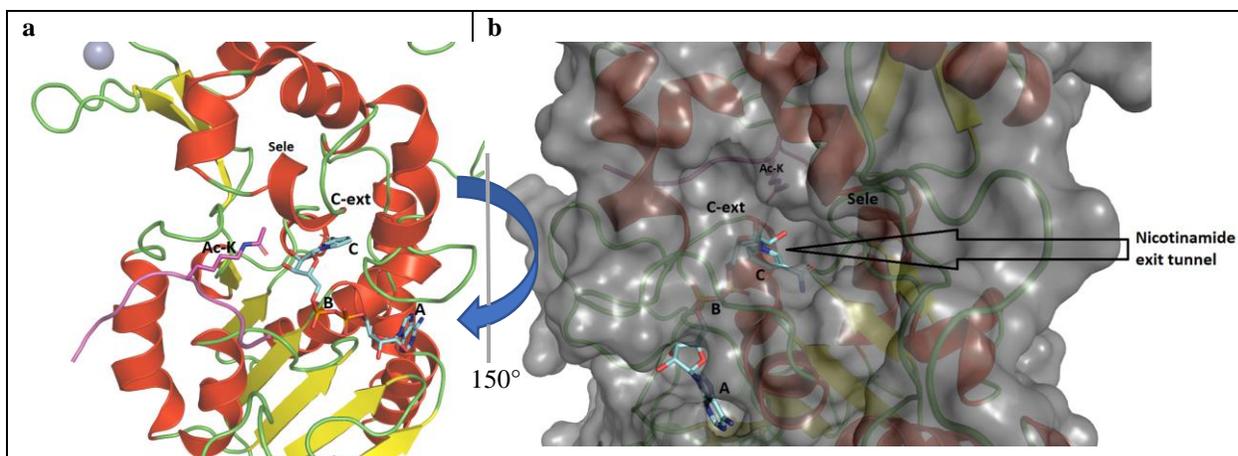


Figura 13. Representação do tipo *cartoon* da estrutura da cadeia principal da hSIRT2 ligada a seus substratos.

As hélices α estão representadas na cor vermelha, as fitas β em amarelo, as alças e voltas na cor verde.

A área superficial acessível ao solvente (SASA) de todos os átomos da enzima, incluindo os das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos, está representada em cinza transparente (**b**).

Um substrato peptídico contendo um resíduo de lisina *N*-acetilada (segmento do antígeno tumoral celular p53) está representado com seus átomos da cadeia principal e os carbonos da cadeia lateral de lisina em magenta, nas representações do tipo *cartoon* e bastões, respectivamente.

O co-substrato NAD^+ está representado em ciano, na forma de bastões.

Os átomos de nitrogênio estão representados em azul, oxigênio em vermelho e fósforo em laranja.

A esfera cinza é o íon estrutural de Zn^{2+} complexado com a enzima (**a**).

(**a**) Os bolsões dos sítios de ligação estão indicados, sendo eles:

O bolso A, que se liga à adenina do co-substrato;

O bolso B, que se liga às riboses e o grupamento pirofosfato da molécula de NAD^+ ;

O bolso C, que se liga ao grupo nicotinamida do co-substrato;

O túnel Ac-K, que se liga ao resíduo de lisina acilada do substrato peptídico;

E os bolsões hidrofóbicos C-estendido e de Seletividade, que ocorrem acima do sítio ativo da enzima.

(**b**) Além dos bolsões dos sítios de ligação, o túnel de saída da nicotinamida também está indicado. Essa representação da enzima está rotacionada no sentido horário aproximadamente 150 graus em seu eixo longitudinal em relação à representação mostrada em (**a**).

Figura elaborada pelo autor por meio do *software* PyMol, utilizando a estrutura da hSIRT2 na conformação produtiva, conforme depositada no banco de dados PDB com código de acesso 5D7O. O substrato, segmento do peptídeo p53, foi sobreposto no modelo a partir de um alinhamento estrutural com o modelo de Sir2Tm depositado no banco de dados PDB com código de acesso 2H4F, e o co-substrato NAD^+ foi sobreposto no modelo a partir de um alinhamento estrutural com a estrutura da hSIRT2 depositada no banco de dados PDB com código de acesso 5DY4.

5.1.1 Mecanismo catalítico da Sirtuína 2

A atividade *N*-acilase das Sirtuínas depende de um resíduo de histidina catalítico altamente conservado contido na alça L4 da enzima, que na hSIRT2 é a HIS187 (Figuras 10, 14 e S1). Além disso, muito importante para o seu mecanismo catalítico é um resíduo de fenilalanina igualmente conservado presente na alça de ligação ao co-substrato (L1, Figuras 10 e 11), a PHE96 no homólogo de Sirtuína 2 humana (Figura 14 e S1) (HOFF et al., 2006; RUMPF et al., 2015a; SCHEMIES et al., 2010).

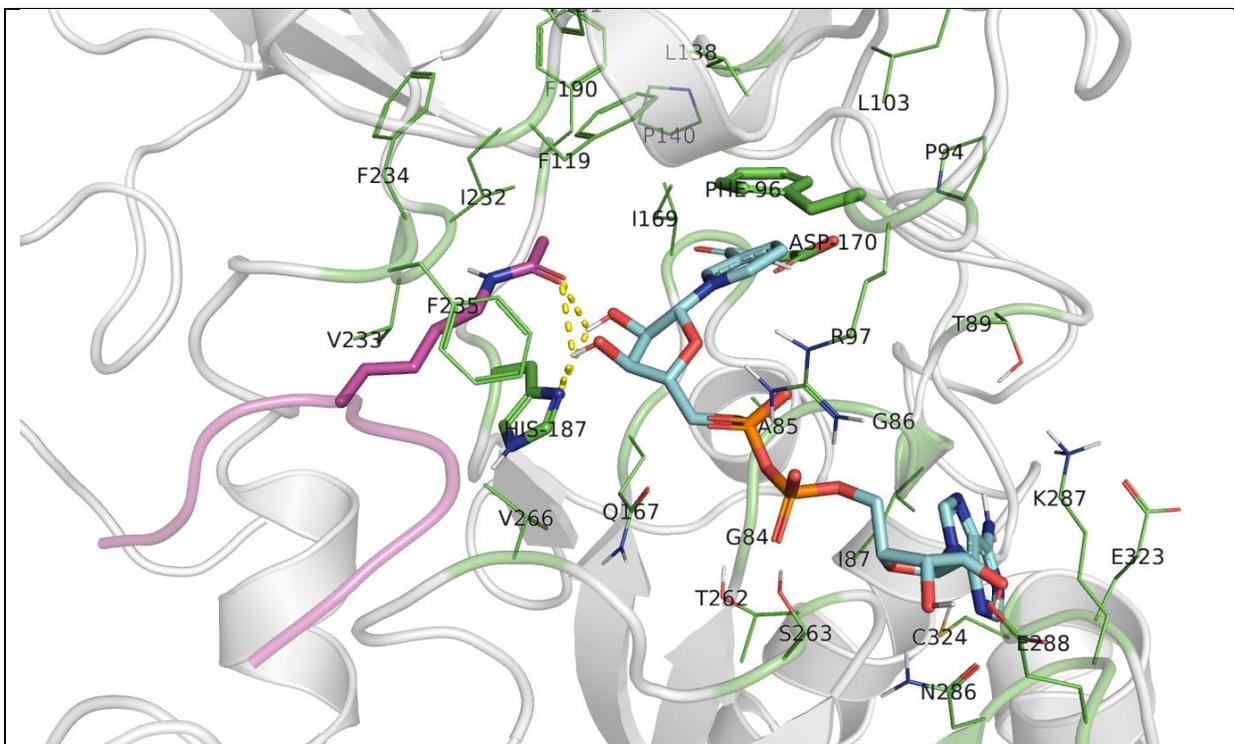


Figura 14. Representação da estrutura da hSIRT2 ligada a seus substratos.

A estrutura da cadeia principal da enzima está representada em cinza claro transparente e a cadeia principal do substrato peptídico (segmento do antígeno tumoral celular p53) em magenta transparente, ambos na representação do tipo *cartoon*.

A cadeia lateral do resíduo de lisina *N*-acetilado do substrato está representada com seus átomos de carbono em magenta, o co-substrato NAD⁺ em ciano e as cadeias laterais dos resíduos que compõem os sítios de ligação em verde, nas representações dos tipos bastões e linhas. Os átomos de nitrogênio estão representados em azul, oxigênio em vermelho, fósforo em laranja, enxofre em amarelo e átomos de hidrogênio polares em branco.

Rotulados com o código de três letras estão a HIS187 catalítica, a PHE96 de ligação ao co-substrato e o ASP170, que participa da ligação de hidrogênio com a função amida do grupo nicotinamida da molécula do NAD⁺.

Outros resíduos estão rotulados com o código de uma letra.

VAL233, VAL266 e PHE235 formam o túnel Ac-K.

GLY86, ILE87, THR89, LYS287, GLU323 e CYS324 participam da ligação à adenina.

ASN286 e GLU288 formam ligações de hidrogênio com a ribose da adenina (ribose A).

GLY84, ALA85, THR262 e SER263 estabelecem ligações de hidrogênio com o grupamento pirofosfato, enquanto a ARG97 forma uma ponte salina com este.

As ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila da ribose N, a HIS187 e o oxigênio carbonílico do grupo acetil-lisina do substrato estão representadas por linhas amarelas tracejadas.

Os resíduos hidrofóbicos que ocorrem acima e além dos bolsões Ac-K e C da enzima formam os bolsos C-estendido e de seletividade.

Átomos de hidrogênio não polares foram omitidos para maior clareza na visualização.

Os diagramas de ligação do LigPlotPlus para o co-substrato NAD⁺ e o substrato peptídico estão exibidos nas figuras do anexo S1a e S1b, respectivamente.

Figura elaborada pelo autor por meio do software PyMol, utilizando a estrutura da hSIRT2 na conformação produtiva, conforme modelado pelo *software* Modeller empregando a sequência canônica de 389 resíduos depositada no banco de dados UniProt com código de acesso Q8IXJ6, e utilizando como molde a estrutura da hSIRT2 depositada no banco de dados PDB com o código de acesso 5D7O. O substrato, segmento do peptídeo p53, foi sobreposto no modelo a partir de um alinhamento estrutural com o modelo de Sir2Tm depositado no banco de dados PDB com código de acesso 2H4F, e o co-substrato NAD⁺ foi sobreposto no modelo a partir de um alinhamento estrutural com a estrutura da hSIRT2 depositada no banco de dados PDB com código de acesso 5DY4. Átomos de hidrogênio foram adicionados e a estrutura foi refinada através de uma simulação de Dinâmica Molecular com o campo de força AMBER99SB-ILDN por meio do *software* GROMACS.

Os diagramas de interação ligante-enzima (Figura S1) foram elaborados pelo autor por meio do *software* LigPlot+, empregando o mesmo modelo citado acima.

A conformação do sítio catalítico após a ligação dos substratos e o fechamento da enzima em torno destes posiciona o grupo nicotinamida carregado positivamente do co-substrato no bolsão hidrofóbico C. O grupamento amida da nicotinamida também sofre uma torção de sua conformação coplanar de baixa energia, que prejudica a ressonância eletrônica, a distribuição de carga catiônica e a estabilização dos orbitais do anel aromático. Essa conformação produtiva expõe a face α do anel ribose N ao átomo de oxigênio carbonílico do grupo *N*-acil-lisina do substrato peptídico. Ligações de hidrogênio se formam entre os grupos hidroxila da ribose N, o átomo de nitrogênio delta da HIS187 e o átomo de oxigênio carbonílico do grupo *N*-acil-lisina do substrato (Figuras 14 e 15, etapa I) (HOFF et al., 2006; RUMPF et al., 2015a; SCHEMIES et al., 2010).

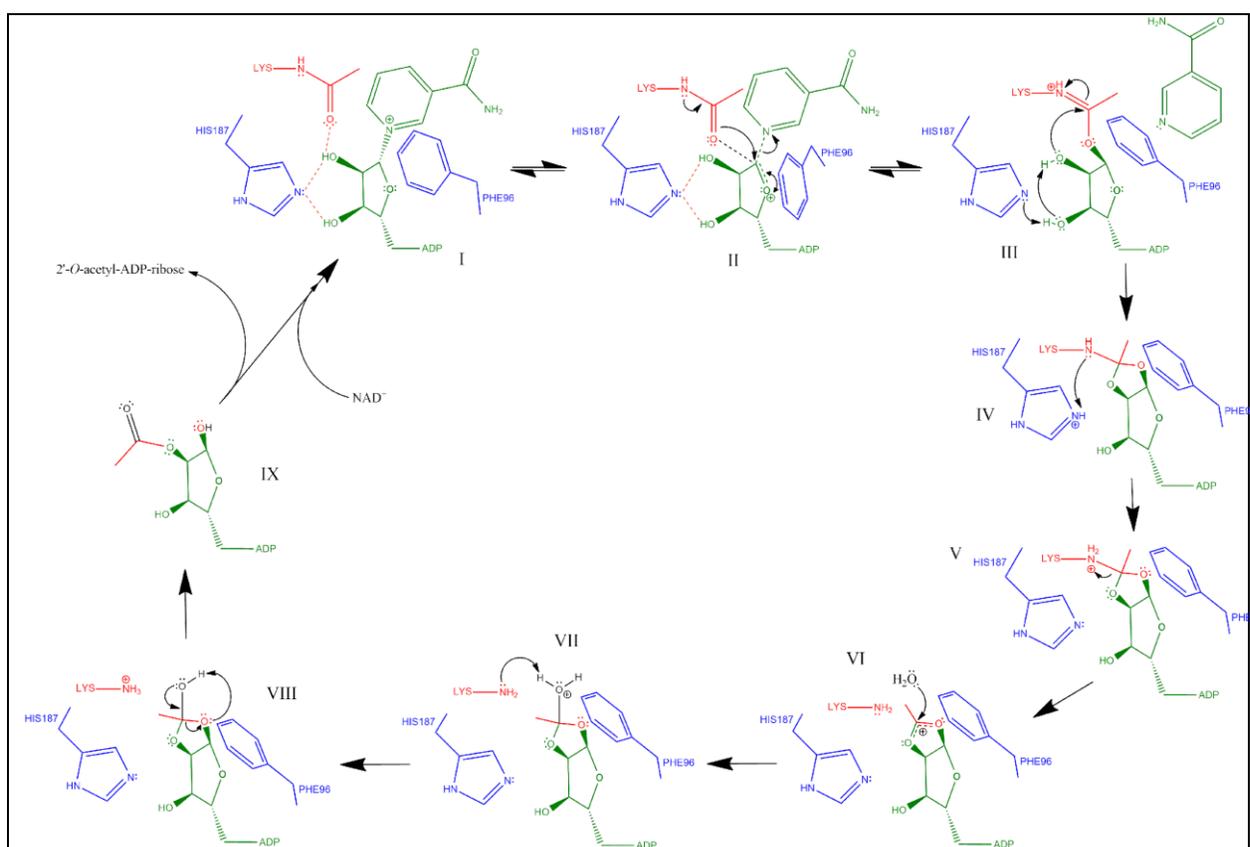


Figura 15. Mecanismo catalítico proposto para a Sirtuína 2.

Os resíduos da hSIRT2 estão representados em azul, o co-substrato NAD⁺ em verde e o resíduo *N*-acetil-lisina do substrato peptídico em vermelho, todos na representação do tipo linhas. As ligações de hidrogênio relevantes para o mecanismo estão representadas por linhas tracejadas na cor laranja, nas etapas I e II. Os movimentos de pares de elétrons estão representados por pequenas setas pretas curvas. Os pares de elétrons livres dos átomos envolvidos nas reações químicas são exibidos como pontos duplos.

Figura preparada pelo autor por meio do *software* ChemDraw.

Fonte: (HOFF et al., 2006; RUMPF et al., 2015a; SCHEMIES et al., 2010)

Devido à hidrofobicidade do bolso C, o anel catiônico da nicotinamida tende a se dissociar para fora deste, polarizando sua ligação com a ribose N no processo. Esta polarização torna o átomo de carbono anomérico C1 do anel da ribose N altamente deficiente em elétrons, o que é estabilizado pelos elétrons não ligantes do átomo de oxigênio acetal cíclico da ribose N, formando um estado de transição com caráter oxacarbênico. Durante este processo, o grupo ribose N tende a se afastar da nicotinamida, na direção do átomo de oxigênio da carbonila do grupo *N*-acil do substrato. Este processo é auxiliado pela nuvem de elétrons π da PHE96, que estabiliza a carga positiva migratória por meio de interações π -cátion e, também, fornece um escudo hidrofóbico que impede a hidrólise dos intermediários por moléculas de água do solvente (Figuras 14 e 15, etapa II) (HOFF et al., 2006; HONG et al., 2019; RUMPF et al., 2015a; SCHEMIES et al., 2010).

O orbital antiligante da ligação sigma entre o átomo eletrodeficiente C1 da ribose N e o átomo de nitrogênio do anel aromático da nicotinamida pode então sofrer um ataque nucleofílico pelos elétrons não ligantes do átomo de oxigênio carbonílico do grupo *N*-acil do substrato, formando por reação de substituição nucleofílica (SN2), ou, mais precisamente, deslocamento nucleofílico por migração do eletrófilo, o intermediário *O*-alquimidato e o produto nicotinamida livre, que pode então se dissociar para o meio aquoso através do túnel de saída da nicotinamida (Figuras 13b e 15, etapas II e III). A PHE96 é crucial para esta etapa, pois sua cadeia lateral sofre uma mudança conformacional, protegendo o intermediário *O*-alquimidato da reação reversa com a molécula de nicotinamida livre e da hidrólise por moléculas de água (Figuras 14, 15 etapa III e 16a). À medida que a reação de transferência do grupamento acila ocorre, os grupos ribose N e pirofosfato do co-substrato NAD⁺ sofrem uma mudança conformacional, na qual a ribose N se afasta do bolsão C, na direção do bolsão Ac-K, enquanto a cadeia lateral da PHE96 torce de modo a bloquear o túnel de saída da nicotinamida. Essas mudanças conformacionais são importantes para o mecanismo de inibição da Sirtuína pela nicotinamida livre e análogos (Figuras 16b e 18) (HOFF et al., 2006; HONG et al., 2019; RUMPF et al., 2015a; SCHEMIES et al., 2010).

À medida que a ligação glicosídica entre a nicotinamida e a ribose N se polariza, a carga positiva do anel da nicotinamida tende a migrar para fora do ambiente hidrofóbico do bolsão C, transitoriamente para o bolsão B mais hidrofílico. No entanto, quando a ligação se rompe e o intermediário *O*-alquimidato é formado, a carga positiva migra para o bolso Ac-K, também de caráter hidrofóbico (Figura 15, etapas I a III) (HOFF et al., 2006).

A reação prossegue com a HIS187 atuando como uma base para ativar o grupamento hidroxila 2' da ribose N, diretamente ou através do OH 3' por cadeia de transferência de prótons. O oxigênio 2' ativado pode então atacar o grupamento *O*-alquimidato, formando um intermediário amino-acetal cíclico (Figura 15, etapas III e IV) (HOFF et al., 2006; HONG et al., 2019; RUMPF et al., 2015a; SCHEMIES et al., 2010).

A HIS187 protonada agora pode atuar como um ácido, protonando o intermediário amino-acetal, que então sofre um rearranjo, quebrando a ligação com o nitrogênio para formar a amina primária da cadeia lateral agora hidrolisada do resíduo de lisina do substrato e um intermediário acil-oxônio, deslocando assim a carga catiônica de volta para o bolsão B. O anel aromático da PHE96 também contribui para a estabilização deste intermediário eletrodeficiente através de ligações π -cátion (Figura 15, etapas IV a VI) (HOFF et al., 2006; HONG et al., 2019; RUMPF et al., 2015a; SCHEMIES et al., 2010).

O intermediário acil-oxônio pode então sofrer um ataque nucleofílico por uma molécula de água ativada pelo grupamento pirofosfato do co-substrato NAD^+ e ter um próton captado pelo nitrogênio ϵ do resíduo de lisina do substrato agora livre, que atua como base, formando seu estado fisiológico de amina protonada, e um intermediário hidroxi-acetal (Figura 15, etapas VI a VIII) (HOFF et al., 2006; HONG et al., 2019; RUMPF et al., 2015a; SCHEMIES et al., 2010).

Na etapa final ocorre espontaneamente um rearranjo do intermediário hidroxi-acetal, produzindo o 2'-*O*-acetil ADP ribose (Figuras 15, etapas VIII e IX, 16^a e S2a) (HOFF et al., 2006; HONG et al., 2019; RUMPF et al., 2015a; SCHEMIES et al., 2010).

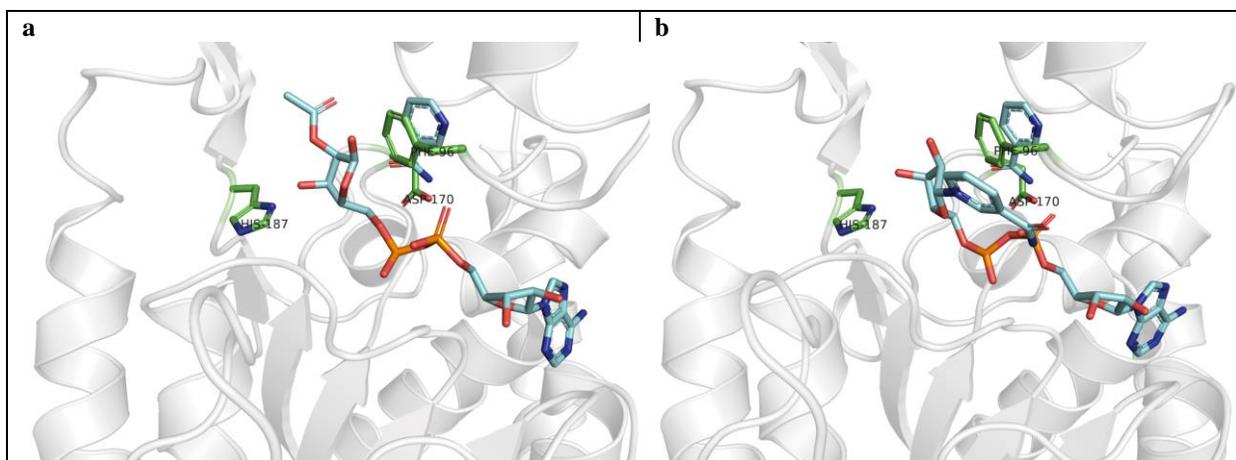


Figura 16. Representação da estrutura da hSIRT2 complexada à ligantes.

A estrutura da cadeia principal está representada em cinza claro transparente, na representação do tipo *cartoon*.

Os produtos da reação enzimática nicotinamida (**a** e **b**) e 2'-*O*-acetil ADP ribose (**a**) e o co-substrato NAD⁺ (**b**) estão representados com seus átomos de carbono coloridos em ciano e as cadeias laterais dos resíduos HIS187, PHE96 e ASP170 em verde, todos na representação do tipo bastões. Os átomos de nitrogênio estão representados na cor azul, oxigênio em vermelho e fósforo em laranja.

Os diagramas de ligação do LigPlotPlus para os produtos de reação nicotinamida e 2'-*O*-acetil ADP ribose estão exibidos nas figuras do anexo S2a e S2b, respectivamente.

Figura elaborada pelo autor por meio do software PyMol, utilizando a estrutura da hSIRT2 complexada com a molécula de nicotinamida, conforme depositada no banco de dados PDB com código de acesso 4RMJ. O 2'-*O*-acetil ADPr (**a**) foi sobreposto no modelo a partir de um alinhamento estrutural com o modelo de Sir2Tm depositado no banco de dados PDB com o código de acesso 4BUZ, e o co-substrato NAD⁺ (**b**) foi sobreposto no modelo a partir de um alinhamento estrutural com a estrutura de Sir2Af2 depositada no banco de dados do PDB com o código de acesso 1YC2.

Os diagramas de interação ligante-enzima (Figura S2) foram elaborados pelo autor por meio do *software* LigPlot+, empregando os mesmos modelos citados acima.

5.1.2 Mecanismos de inibição da Sirtuína 2

Devido à importância dessa família de enzimas como alvos biomoleculares na busca por novos fármacos, a compreensão de seus possíveis mecanismos de inibição é essencial para o planejamento de inibidores eficientes. Existem três principais modos de ligação diferentes conhecidos para os inibidores existentes das Sirtuínas. Um deles compreende os competitivos com a nicotinamida, que se ligam ao bolsão C da enzima. Os inibidores competitivos do substrato peptídico compreendem outro grupo, que se ligam ao bolso Ac-K das Sirtuínas. Um terceiro tipo de inibidor pode ligar-se aos sítios C-estendido e de seletividade altamente hidrofóbicos, e, também, são chamados de inibidores SirReal, do inglês *Sirtuin-Rearranging Ligands*. Existem também alguns inibidores de Sirtuína conhecidos que se ligam a mais de um desses bolsos ao mesmo tempo, sendo estes os mais potentes inibidores de Sirtuína descobertos até o momento. Aqui, trazemos exemplos de inibidores que foram co-cristalizados com a enzima Sirtuína 2 humana

(exceto quando indicado) e tiveram a estrutura de seu complexo e seus pontos de interação com a enzima elucidados experimentalmente (DISCH et al., 2013; KNYPHAUSEN et al., 2016; PENTEADO et al., 2023; RUMPF et al., 2015a, 2015b; YANG et al., 2018).

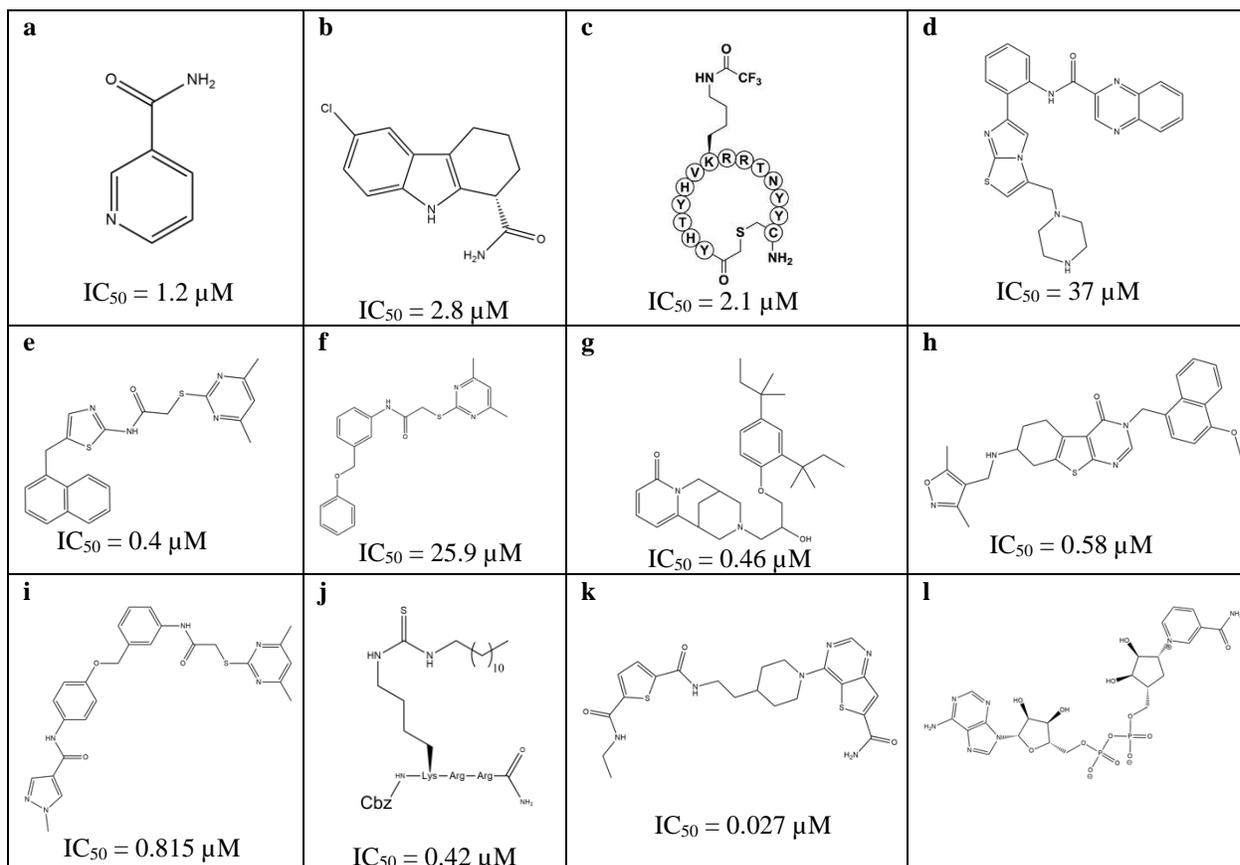


Figura 17. Representação em linhas das estruturas dos inibidores de Sirtuína exibidos a seguir em complexo com a enzima.

Os valores de concentração inibitória média (IC_{50}) frente a enzima hSIRT2 para cada composto são dados.

- (a) Nicotinamida, ver Figura 16.
- (b) EX243, veja a Figura 18.
- (c) Peptídeo trifluoroacetil macrocíclico S2iL5, ver Figura 19a.
- (d) SRT1720, veja a Figura 19b.
- (e) SirReal2, consulte a Figura 20.
- (f) Análogo do SirReal1, veja a Figura S5b-c.
- (g) NPD11033, figura S6a-b.
- (h) O inibidor tienopirimidinona, ver Figura S6c-d.
- (i) O inibidor fenoximetil-fenil-acetamida, ver Figura 21a.
- (j) O inibidor peptídico miristoil-tioureia, ver Figura 21b.
- (k) O inibidor tienopirimidina, ver Figura 22.
- (l) Carbamida-NAD, ver Figuras 19b e S8.

Figura preparada pelo autor por meio do *software* ChemDraw.

5.1.2.1 *Inibidores competitivos da nicotinamida*

A nicotinamida (Figura 17a), sendo um produto da reação catalisada pelas Sirtuínas, atua como inibidor, deslocando por efeito de massas a reação para o sentido dos reagentes. Depois que a reação de hidrólise ocorre, a PHE96 da hSIRT2 bloqueia o túnel de saída da nicotinamida (Figura 13b), protegendo o recém-formado 2'-O-acil-ADPr da reação reversa com a nicotinamida, que pode sair para o meio através do túnel. (Figura 16a) (AVALOS et al., 2002; GERTZ et al., 2013; RUMPF et al., 2015a, 2015b).

Quando em excesso, a nicotinamida pode ligar-se ao bolsão C da enzima, competindo com o grupo nicotinamida do co-substrato NAD⁺. Quando isso ocorre, os grupos pirofosfato e ribose N da molécula de NAD⁺ ligada à enzima sofrem uma mudança conformacional, assumindo uma pose semelhante ao produto da reação 2'-O-acil-ADPr, no qual o grupo nicotinamida do NAD⁺ é deslocado para fora do bolso C (Figuras 16 e S2) (AVALOS et al., 2002; GERTZ et al., 2013; RUMPF et al., 2015a, 2015b).

Alguns inibidores, como o EX527 (ou seu enantiômero S, EX243, Figura 17b) e seu análogo CHIC35 ligam-se ao bolsão C da enzima (códigos PDB 4BV2, 5D7P e 5D7Q, respectivamente), deslocando o co-substrato NAD⁺ para uma conformação não produtiva, o grupamento amida dos inibidores se sobrepõe à posição que o grupamento amida da nicotinamida do NAD⁺ assumiria na conformação produtiva, formando uma ligação de hidrogênio com o ASP170 da hSIRT2 (Figuras 18 e S3). É importante notar que esses inibidores apresentam um comportamento cinético acompetitivo em relação à molécula de NAD⁺ como um todo, ou seja, eles só podem se ligar à enzima enquanto o co-substrato também estiver ligado (AVALOS et al., 2002; GERTZ et al., 2013; RUMPF et al., 2015a, 2015b).

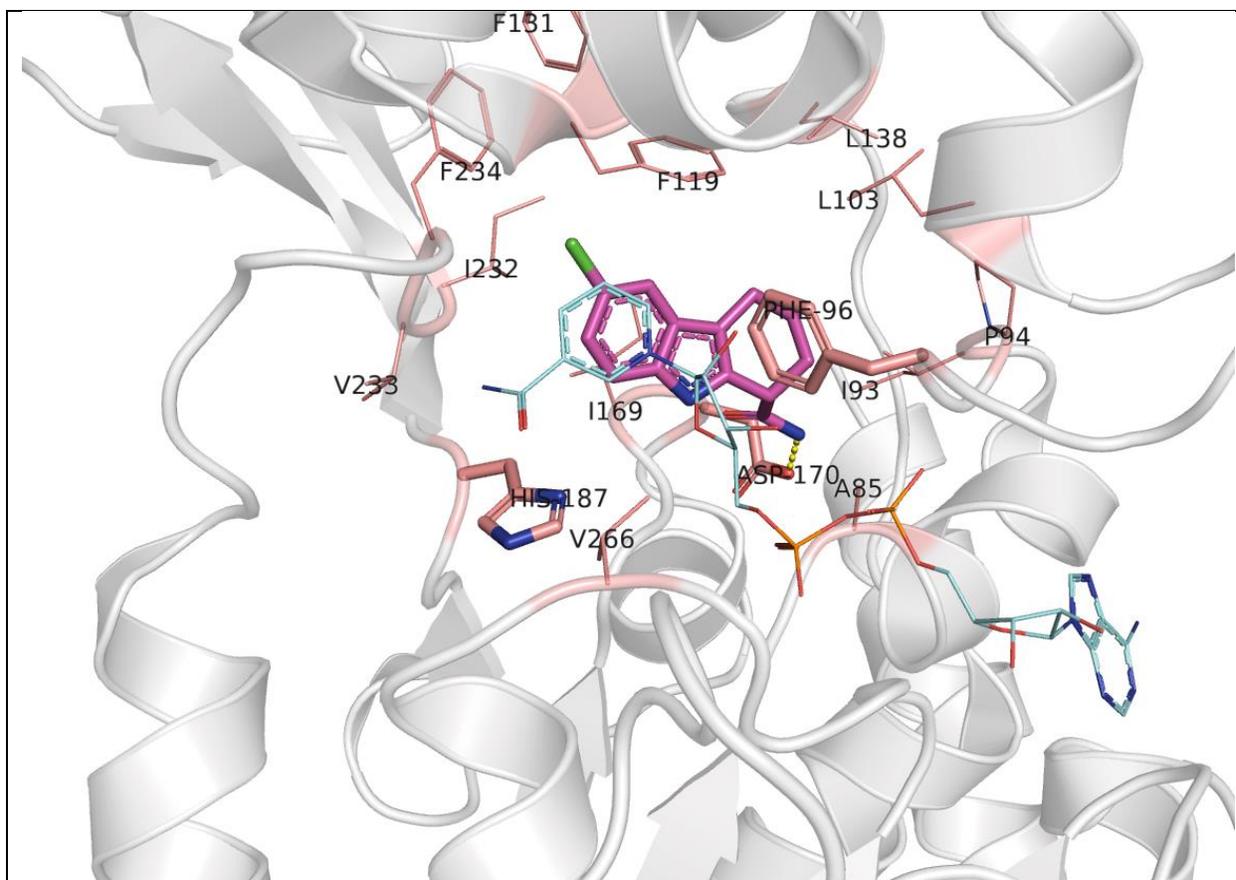


Figura 18. Representação da estrutura da hSIRT2 ligada ao NAD⁺ e ao inibidor EX243.

A estrutura da cadeia principal está representada em cinza claro transparente, na representação do tipo *cartoon*.

O co-substrato NAD⁺ está representado com seus átomos de carbono coloridos em ciano, na representação do tipo linhas. O inibidor enzimático EX243 tem seus átomos de carbono coloridos em magenta, e é representado na representação do tipo bastões.

As cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos relevantes são mostradas com seus átomos de carbono coloridos em salmão, nas representações dos tipos bastões e linhas.

Os átomos de nitrogênio estão representados na cor azul, oxigênio em vermelho, fósforo em laranja e cloro em verde.

A ligação de hidrogênio entre o grupamento amida do inibidor e a cadeia lateral do ASP170, análogas às formadas entre este resíduo e o grupo nicotinamida do NAD⁺ (ver Figura 14), está representada por uma linha amarela tracejada.

O diagrama de ligação do LigPlotPlus para o inibidor EX243 está exibido na figura S3 do anexo.

Figura elaborada pelo autor por meio do software PyMol, utilizando a estrutura da hSIRT2 complexada com o inibidor EX243, conforme depositada no banco de dados PDB com código de acesso 5D7P. O co-substrato NAD⁺ foi sobreposto ao modelo a partir de um alinhamento estrutural com a estrutura da hSIRT3 depositada no banco de dados PDB com código de acesso 4BV3. O diagrama de interação ligante-enzima (Figura S3) foi elaborado pelo autor por meio do *software* LigPlot+, empregando o mesmo modelo citado acima.

5.1.2.2 *Inibidores competitivos do substrato peptídico*

Alguns inibidores conhecidos das Sirtuínas se ligam ao bolso Ac-K da enzima, competindo por este com seus substratos. Os que foram co-cristalizados com a hSIRT2 são de natureza peptídica, apresentando um grupo *N*-acil-lisina modificado que não pode reagir com o co-substrato NAD⁺ da mesma forma que os substratos normais, efetivamente inibindo a enzima (KNYPHAUSEN et al., 2016; YAMAGATA et al., 2014).

Os exemplos cujas estruturas complexadas com a hSIRT2 foram caracterizadas ambos apresentam um grupo trifluoroacetil em vez do grupo acetil convencional, que devido à propriedade de retirada de elétrons do grupamento trifluorometil, não pode exercer o ataque nucleofílico sobre o átomo C1 da ribose N e subsequentemente levar à formação do intermediário de reação *O*-alquimidato (ver Figura 15, etapas I a III). Eles são o peptídeo macrocíclico S2iL5 (Figuras 17c, 19a e S4a) e o fragmento do peptídeo RAN, ambos exibindo um resíduo modificado de *N*-trifluoroacetil-lisina (códigos de acesso PDB 4L3O e 5FYQ, respectivamente) (KNYPHAUSEN et al., 2016; YAMAGATA et al., 2014).

Também, digno de nota, é um composto que foi identificado pela primeira vez como sendo um ativador da Sirtuína 1 humana, ligando-se à extensão terminal N conhecida por modular a atividade da hSIRT1 (CAO et al., 2015; MILNE et al., 2007).

Posteriormente, foi descoberto que o SRT1720 apresenta atividade inibitória da Sirtuína 3 humana, ligando-se ao bolso Ac-K da enzima, embora não seja de natureza peptídica (Figura 17d). Curiosamente, uma porção deste inibidor se estende ao bolsão C, mas sem competir por ele com o grupo nicotinamida do co-substrato NAD⁺, em vez disso, ele se empacota firmemente entre o anel aromático da nicotinamida e o do resíduo de fenilalanina que fecha o túnel de saída da nicotinamida (PHE96 na hSIRT2, e PHE157 na hSIRT3), formando uma interação π do tipo sanduíche com estes (código de acesso PDB 4BN5). De fato, este inibidor comporta-se de maneira competitiva em relação aos substratos peptídicos, e de forma incompetitiva em relação ao co-substrato NAD⁺, sendo a presença deste último determinante para a ligação deste inibidor à enzima Sirtuína 3 humana (Figuras 19b e S4b) (NGUYEN et al., 2013).

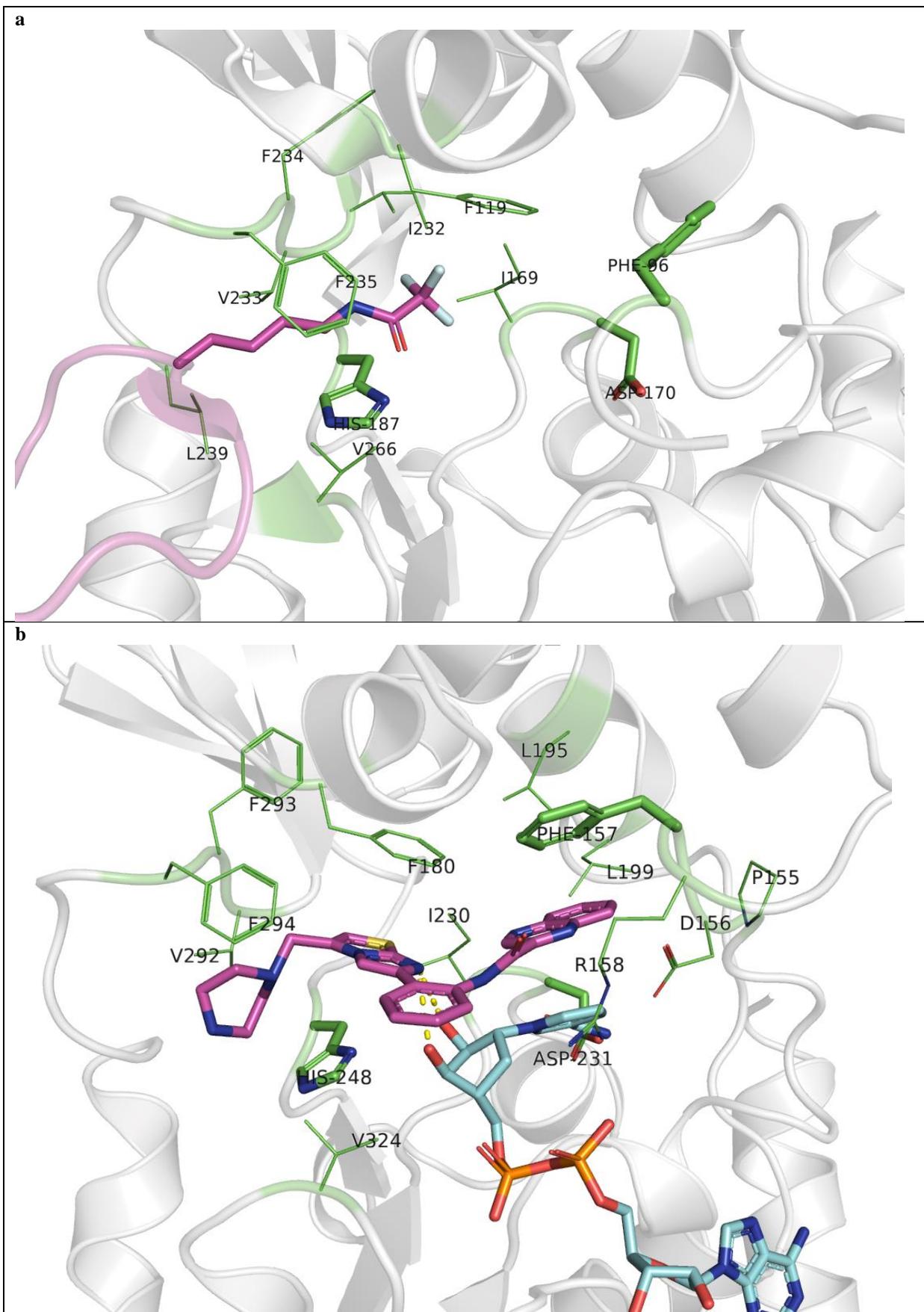


Figura 19. Representação da estrutura da Sirtuína complexada à ligantes.

A estrutura da cadeia primária da enzima está representada em cinza claro transparente, e a cadeia primária do inibidor peptídico (a) em magenta transparente, ambas na representação do tipo *cartoon*.

O inibidor enzimático peptídeo trifluoroacetilado macrocíclico S2iL5 (a) tem sua cadeia lateral de lisina representada com seus átomos de carbono coloridos em magenta, na representação do tipo bastões.

O inibidor SRT1720 (b) está representado com seus átomos de carbono coloridos em magenta e o análogo do co-substrato Carba-NAD (b) em ciano, ambos na representação do tipo bastões.

As cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos relevantes estão representadas em verde, nas representações dos tipos bastões e linhas.

Os átomos de nitrogênio estão representados na cor azul, oxigênio em vermelho, fósforo em laranja, enxofre em amarelo e flúor em ciano claro.

Os resíduos PHE157, ASP231 e HIS248 da hSIRT3 (b) são homólogos dos resíduos PHE96, ASP170 e HIS187 da hSIRT2, respectivamente.

Ligações de hidrogênio entre um átomo de nitrogênio do inibidor SRT1720 e os grupos hidroxila da ribose N do análogo do co-substrato Carba-NAD (b), análogas às formadas entre o co-substrato NAD⁺ e o oxigênio carbonílico do grupo *N*-acil-lisina dos substratos peptídicos (ver Figura 14) estão representadas por linhas amarelas tracejadas.

Os diagramas de ligação do LigPlotPlus para os inibidores peptídeo trifluoroacetilado macrocíclico S2iL5 (a) e SRT1720 (b) estão exibidos nas figuras do anexo S4a e S4b, respectivamente.

Figura elaborada pelo autor por meio do software PyMol, utilizando a estrutura da hSIRT2 complexada com o inibidor S2iL5, conforme depositada no banco de dados PDB com código de acesso 4L3O (a) e a estrutura da hSIRT3 complexada com o inibidor SRT1720 e o análogo do co-substrato Carba-NAD depositada no banco de dados PDB com código de acesso 4BN5 (b).

Os diagramas de interação ligante-enzima (Figura S4) foram elaborados pelo autor por meio do *software* LigPlot+, empregando os mesmos modelos citados acima.

5.1.2.3 Inibidores dos bolsos C-estendido e de seletividade (SirReal)

Um terceiro tipo de inibidores da Sirtuína 2 são aqueles conhecidos como SirReal, que inibem a enzima por induzirem um rearranjo do sítio ativo. Eles são assim chamados por agirem como um “calço molecular”, ligando-se ao bolso C-estendido e ao bolso de seletividade da enzima e, assim, bloqueando-a na conformação aberta ou não produtiva. Os exemplos clássicos são o SirReal1 e SirReal2 (códigos de acesso PDB 4RMI, 4RMH e 4RMG, Figuras 17e, 20 e S5a), que foram criados por Rumpf e colaboradores, mas alguns novos exemplos desta classe foram desenvolvidos, como o análogo brominado do SirReal2 (código PDB 5DY4) por Schiedel *et al.* e os análogos do SirReal1 (códigos de acesso 5YQM e 5YQL, Figuras 17f e S5b-c) caracterizados pelo grupo de Yang. Os compostos desta classe foram desenvolvidos como inibidores potentes e seletivos do parálogo SIRT2 (RUMPF *et al.*, 2015a, 2015b; SCHIEDEL *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2018).

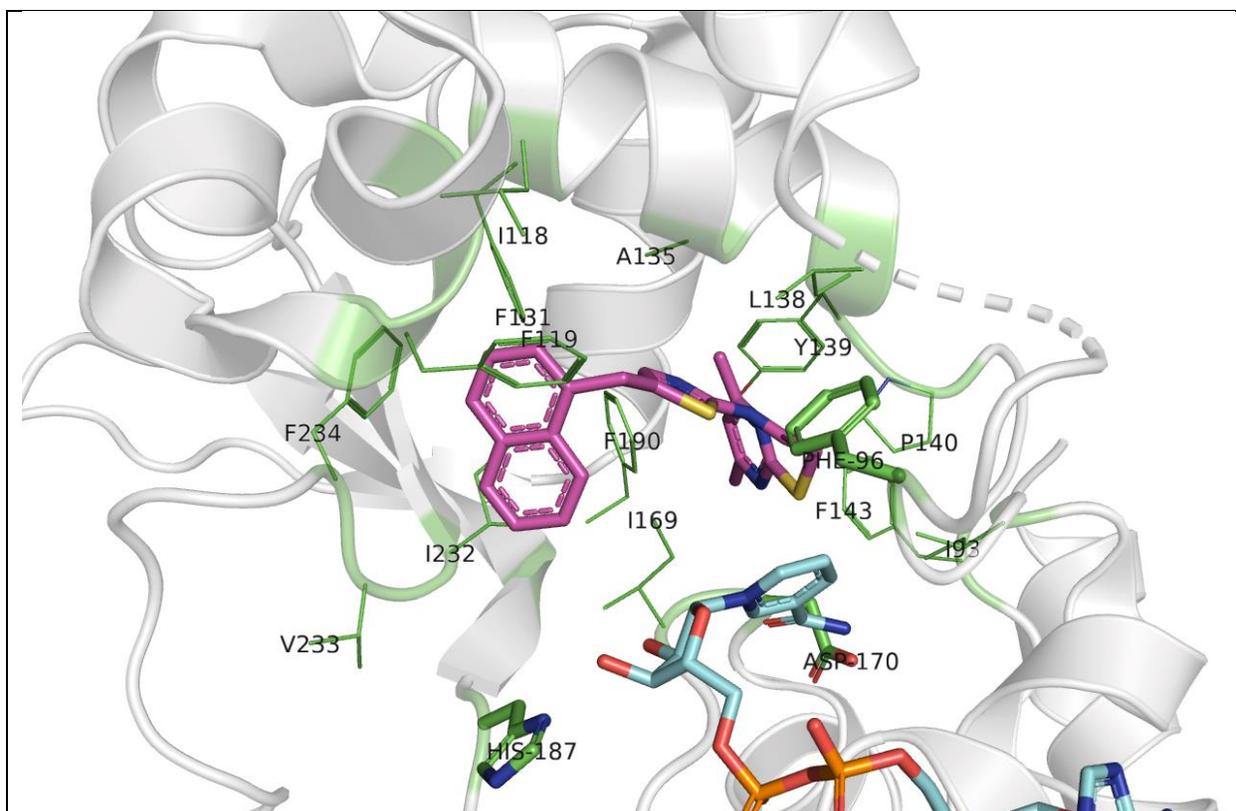


Figura 20. Representação da estrutura da hSIRT2 complexada à ligantes.

A estrutura da cadeia primária da enzima está representada em cinza claro transparente na representação do tipo *cartoon*.

O inibidor enzimático SirReal2 está representado com seus átomos de carbono coloridos em magenta e o co-substrato NAD⁺ em ciano, ambos na representação do tipo bastões.

As cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos relevantes estão representadas em verde, nas representações dos tipos bastões e linhas.

Os átomos de nitrogênio estão representados na cor azul, oxigênio em vermelho, fósforo em laranja e enxofre em amarelo.

O diagrama de ligação do LigPlotPlus para o inibidore SirReal2 está exibido na figura do anexo S5a.

Figura elaborada pelo autor por meio do software PyMol, utilizando a estrutura da hSIRT2 complexada com o inibidor SirReal2, conforme depositada no banco de dados PDB com código de acesso 4RMG.

O diagrama de interação ligante-enzima foi elaborado pelo autor por meio do *software* LigPlot+, empregando o mesmo modelo citado acima.

5.1.2.4 Inibidores do bolso C-estendido e competitivos do substrato peptídico

Alguns compostos inibem as Sirtuínas ligando-se tanto aos bolsões hidrofóbicos C-estendido e de seletividade quanto ao túnel de ligação da acil-lisina (Ac-K), exibindo assim um comportamento competitivo em relação aos substratos peptídicos, além de afinidade e seletividade pela enzima aprimoradas, devido ao maior número de pontos de interação com esta. Os exemplos de pequenas moléculas desta classe de inibidores, que foram co-cristalizadas com a enzima Sirtuína 2 humana são o derivado benzotriazol do SirReal1, criado por Schiedel e

grupo, o composto NPD11033 (Figuras 17g e S6a-b) descoberto por Kudo *et al.*, a 2-anilinobenzamida introduzida por Mellini e colaboradores, o 1,2,4-Oxadiazol desenvolvido pelo grupo de Moniot, o derivado de tienopirimidinona (Figuras 17h e S6c-d) desenvolvido por Sundriyal *et al.* e os derivados de fenoximetil-fenil-acetamida (Figuras 17i, 21a e S6e) desenvolvidos por Yang e colaboradores (códigos de acesso PDB 5DY5, 5Y0Z, 5Y5N, 5MAR, 5MAT, 5YQN e 5YQO, respectivamente) (KUDO *et al.*, 2018; MELLINI *et al.*, 2017; MONIOT *et al.*, 2017; SCHIEDEL *et al.*, 2016; SUNDRIYAL *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2018).

Também pertencentes a esta classe, são os inibidores de natureza peptídica que apresentam tanto um resíduo de lisina substituído com uma cadeia alifática, que ocupa os bolsões C-estendido e Ac-K da enzima, como um bioisótero do grupamento acil em vez da convencional amida, que não pode sofrer a reação catalisada pelas Sirtuínas, como a tioamida desenvolvida por Teng *et al.* (código PDB 4R8M) e a tiouréia desenvolvida por Nielsen e colaboradores (códigos de acesso PDB 7BOT e 7BOS, Figuras 17j, 21b e S6f). Esses inibidores são análogos dos substratos da Sirtuína que contêm um resíduo de lisina conjugados com um ácido graxo, como por exemplo uma miristoil-lisina (Figura S6g-h), mas similarmente aos que contêm o grupamento trifluoroacetil mencionados anteriormente, eles não podem exercer o ataque nucleofílico sobre o átomo C1 da ribose N e subsequentemente levar à formação do intermediário de reação O-alquimidato (ver Figura 15, etapas I a III), devido à densidade eletrônica e caráter nucleofílico atenuados do átomo de enxofre nos grupos tioamida e tioureia, quando comparado ao átomo de oxigênio no grupamento amida (FELDMAN *et al.*, 2015; JING *et al.*, 2016; NIELSEN *et al.*, 2021; TENG *et al.*, 2015).

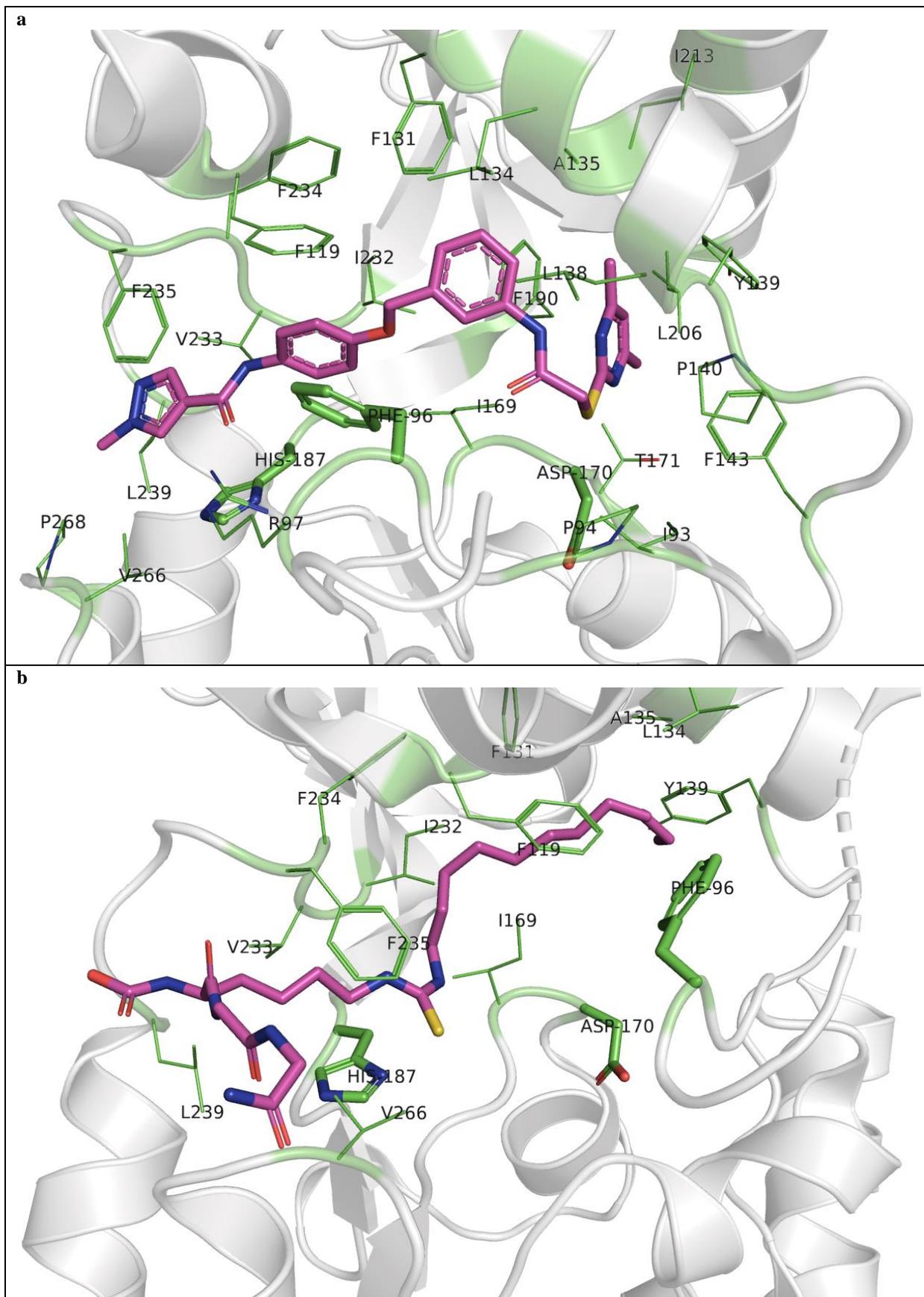


Figura 21. Representação da estrutura da hSIRT2 complexada à ligantes.

A estrutura da cadeia primária da enzima está representada em cinza claro transparente na representação do tipo *cartoon*.

O inibidor não peptídico dos bolsões C-estendido e Ac-K (**a**) e o inibidor peptídico miristoil tiourea (**b**) estão representados com seus átomos de carbono em magenta, na representação do tipo bastões.

As cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos relevantes estão representadas em verde, nas representações dos tipos bastões e linhas.

Os átomos de nitrogênio estão representados na cor azul, oxigênio em vermelho e enxofre em amarelo.

Os diagramas de ligação do LigPlotPlus para os inibidores dos bolsos C-estendido e Ac-K (**a**) e (**b**) estão exibidos nas figuras do anexo S6e e S6f, respectivamente.

Figura elaborada pelo autor por meio do software PyMol, utilizando a estrutura da hSIRT2 complexada com o inibidor fenoximetil-fenil-acetamida (**a**), conforme depositada no banco de dados PDB com código de acesso 5YQO e a estrutura da hSIRT2 complexada com o inibidor peptídico miristoil tiourea (**b**), como depositada no banco de dados PDB com código de acesso 7BOS.

Os diagramas de interação ligante-enzima foram elaborados pelo autor por meio do *software* LigPlot+, empregando os mesmos modelos citados acima.

5.1.2.5 Inibidores competitivos da nicotinamida e do substrato peptídico

Um tipo único de inibidor das Sirtuínas foi desenvolvido pelo grupo de Disch, que se liga aos bolsões C e Ac-K da enzima, apresentando assim um comportamento competitivo tanto frente aos substratos peptídicos quanto ao grupo nicotinamida do co-substrato NAD⁺ (código de acesso PDB 4JSR, Figuras 17k, 22 e S7). O grupo obteve e caracterizou estruturalmente seus co-cristais com a hSIRT1 e a hSIRT3, mas não com a hSIRT2, que este inibe com a maior potência (IC₅₀ frente a hSIRT2 = 2,7 nMol, versus 3,6 nMol frente a hSIRT1 e 4,0 nMol frente a hSIRT3) (DISCH et al., 2013).

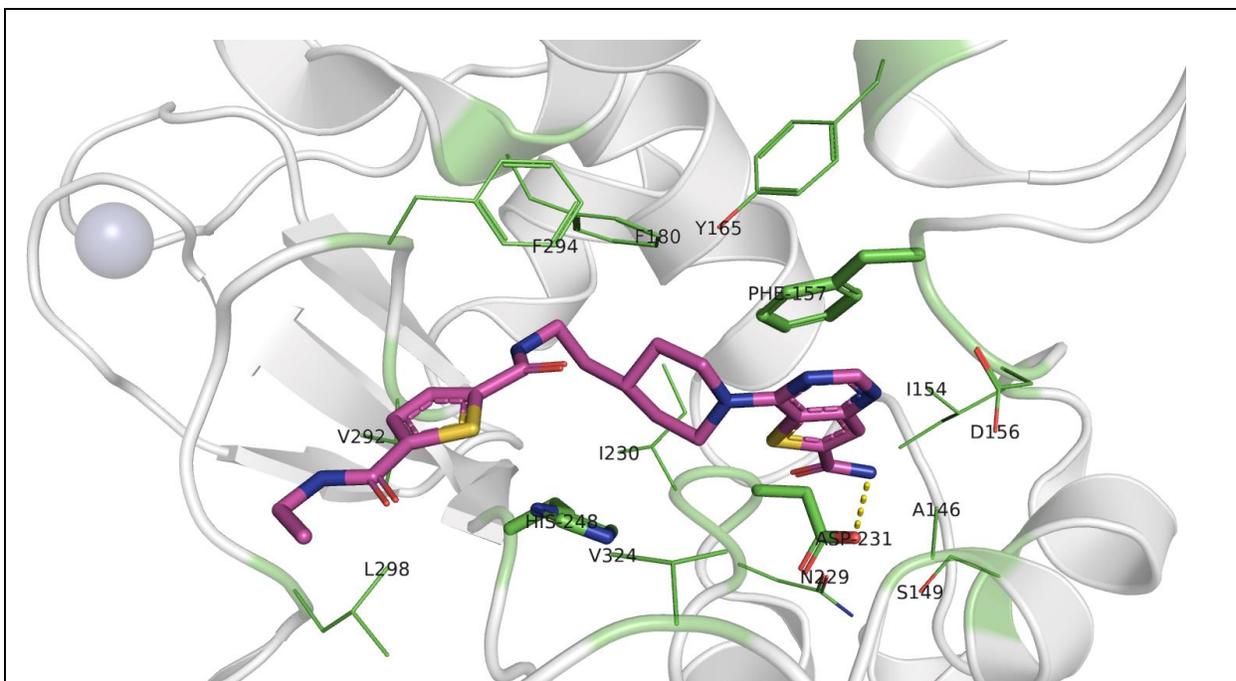


Figura 22. Representação da estrutura da hSIRT3 ligada a um inibidor competitivo do substrato e da nicotinamida.

A estrutura da cadeia primária da enzima está representada em cinza claro transparente na representação do tipo *cartoon*.

O inibidor tieno[3,2-d]pirimidina-6-carboxamida está representado com seus átomos de carbono em magenta, na representação do tipo bastões.

As cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos relevantes estão representadas em verde, nas representações dos tipos bastões e linhas.

Os átomos de nitrogênio estão representados na cor azul, oxigênio em vermelho e enxofre em amarelo.

Os resíduos PHE157, ASP231 e HIS248 da hSIRT3 são homólogos dos resíduos PHE96, ASP170 e HIS187 da hSIRT2, respectivamente.

A ligação de hidrogênio entre o grupamento amida do inibidor e a cadeia lateral do ASP170, análogas às formadas entre este resíduo e o grupo nicotinamida do NAD⁺ (ver Figura 14), está representada por uma linha amarela tracejada.

O diagrama de ligação do LigPlotPlus para o inibidor tienopirimidina está exibido na figura do anexo S7.

Figura elaborada pelo autor por meio do software PyMol, utilizando a estrutura da hSIRT3 complexada com o inibidor tieno[3,2-d]pirimidina-6-carboxamida, conforme depositada no banco de dados PDB com código de acesso 4JSR.

O diagrama de interação ligante-enzima (Figura S7) foi elaborado pelo autor por meio do *software* LigPlot+, empregando o mesmo modelo citado acima.

5.1.2.6 Inibidor análogo da nicotinamida adenina dinucleotídeo

O Carbamida-NAD (Carba-NAD ou CNA, abreviando-se) é um análogo de NAD⁺ no qual o átomo de oxigênio do anel ribose N, adjacente à ligação anomérica ao grupo nicotinamida, é substituído por um grupamento metileno. Essa substituição torna o átomo C1 da ribose N muito menos deficiente em elétrons e, portanto, menos eletrofílico, de modo que não pode sofrer o ataque nucleofílico pelo átomo de oxigênio carbonílico do grupo *N*-acil dos substratos das Sirtuínas, ou permitir a migração e ajudar a estabilizar a carga catiônica do anel da nicotinamida através do

intermediário com caráter oxacarbênico (ver Figura 15, etapa II), efetivamente inibindo a enzima. Este análogo é amplamente empregado como meio para estudar enzimas que têm o NAD⁺ como ligante, auxiliando, por exemplo, na obtenção de estruturas cristalinas de complexos enzima-substrato-Carba-NAD (Figuras 17I, 19b e S8, códigos de acesso PDB 4BN5 e 5G4C). Embora seja um inibidor competitivo do NAD⁺, não pode ser usado terapêuticamente, devido à natureza não seletiva de sua inibição de todas as enzimas que se ligam a NAD⁺, à potência de inibição relativamente fraca em relação às concentrações celulares fisiológicas de NAD⁺ e, mais importante, devido à sua falta de permeabilidade da membrana celular (JIN et al., 2016; NGUYEN et al., 2013; SZCZEPANKIEWICZ et al., 2012).

5.2 Modelagem Comparativa de Sir2rp1

Após modelados como descrito no item 4.1 deste trabalho, considerando-se que o molde empregue (PDB 5OL0) apresenta apenas o íon de zinco estrutural e um substrato peptídico acetilado (fragmento de oito resíduos do peptídeo p53 humano) complexados com a enzima, os modelos construídos foram alinhados estruturalmente com o modelo de Sir2Tm (código de acesso PDB 2H4F) e o co-substrato NAD⁺ foi sobreposto em suas estruturas usando o *software* PyMol. A escolha desta estrutura como fonte do co-substrato para os modelos construídos se deu pelo fato desta ser uma das únicas estruturas cristalográficas disponíveis de Sir2 que apresenta co-cristalizados tanto um substrato peptídico acetilado, como o co-substrato NAD⁺ e, desta forma, se encontra na conformação produtiva em complexo com ambos os ligantes naturais, além de possuir uma identidade razoável com as Sir2rp1 de Tripanosomatídeos (BERMAN, 2000; FERREIRA, 2019; FERREIRA et al., 2023; GOMES, 2021; HOFF et al., 2006; JANSON; PAIARDINI, 2021; LARKIN et al., 2007; RONIN et al., 2018; SCHRÖDINGER, 2022; THE UNIPROT CONSORTIUM et al., 2021; WEBB; SALI, 2016).

A própria enzima de *L. infantum* também foi modelada devido ao fato de que a sua estrutura cristalográfica disponível não apresenta as regiões terminais N e C e tampouco a grande alça desordenada presente nas Sirtuínas de Tripanosomatídeos (Figuras 11, 25f e 29), devido à alta flexibilidade destas regiões

(FERREIRA, 2019; FERREIRA et al., 2023; GOMES, 2021; RONIN et al., 2018; WEBB; SALI, 2016).

Além disso, foi construído um modelo da Sirtuína 2 humana com seus ligantes naturais, em sua forma holo “fechada”, com base na sequência canônica de código UniProt Q8IXJ6, tendo como molde a estrutura cristalográfica de código PDB 5D7O, para fins de comparação com as estruturas parasitárias e para estudos de Dinâmica Molecular. A necessidade da construção deste modelo pela mesma metodologia que os homólogos parasitários se dá por conta da ausência das extremidades terminais N e C, e de outras lacunas presentes nas estruturas cristalográficas disponíveis, devido à alta flexibilidade destas regiões (BERMAN, 2000; FERREIRA, 2019; FINNIN; DONIGIAN; PAVLETICH, 2001; GOMES, 2021; MONIOT; SCHUTKOWSKI; STEEGBORN, 2013; RUMPF et al., 2015a; THE UNIPROT CONSORTIUM et al., 2021).

Adicionalmente, foram construídos modelos de Sir2rp2 de *L. major* e Sir2rp3 de *L. infantum* por meio da mesma metodologia empregue para as demais enzimas, usando suas sequências canônicas depositadas no banco de dados UniProt com códigos de acesso Q4QB33 e A4IAM7, respectivamente, e tendo como molde as estruturas cristalográficas da Sirtuína de *Xenopus tropicalis* e da Sirtuína de *E. coli* “CobB”, com códigos de acesso PDB 5OJ7 e 6RXJ, respectivamente, pois estas estruturas cristalográficas apresentaram a maior identidade com as sequências modeladas, além de boa qualidade. Devido ao fato de que os moldes empregues apresentam apenas o íon de zinco estrutural e um substrato peptídico acetilado, os modelos foram alinhados estruturalmente com os modelos de Sir2Tm e Sir2Af1 (códigos de acesso PDB 2H4F e 4TWI) e o co-substrato NAD⁺ e o substrato peptídico succinilado foram sobrepostos em suas estruturas usando o *software* PyMol. (BERMAN, 2000; FERREIRA, 2019; GOMES, 2021; HOFF et al., 2006; PANNEK et al., 2017; RINGEL; ROMAN; WOLBERGER, 2014; SCHRÖDINGER, 2022; SPINCK et al., 2020; THE UNIPROT CONSORTIUM et al., 2021).

5.3 Validação e comparação entre os modelos construídos

No início do trabalho, outras plataformas de modelagem molecular foram testadas em experimentos preliminares para comparação entre os modelos gerados, sendo elas o I-Tasser, o RaptorX, o Swiss-Model e o AlphaFold, porém os resultados obtidos foram inferiores àqueles obtidos através do *software* Modeller, quando avaliados sob o ponto de vista da qualidade estereoquímica de seus resíduos de aminoácidos, como descrito a seguir. Estes resultados são corroborados por estudos comparativos como o conduzido pelo grupo de Lee *et al.*, que indicam que quando as sequências molde e modelada apresentam altíssima identidade e o molde possui alto grau de qualidade, a ferramenta Modeller é capaz de gerar modelos de qualidade superior àqueles gerados por outras plataformas, como o AlphaFold. Para fins de comparação entre as plataformas de modelagem testadas, utilizamos os modelos de Sir2rp1 da espécie *Leishmania major*, modelados por meio das ferramentas mencionadas anteriormente, tendo como base a sequência canônica desta proteína com código de acesso UniProt Q25337. A discussão desta análise comparativa entre as plataformas de modelagem molecular encontra-se no Tópico S2 do anexo deste trabalho (JUMPER et al., 2021; LEE; SU; TSENG, 2022; THE UNIPROT CONSORTIUM et al., 2021; WATERHOUSE et al., 2018; WEBB; SALI, 2016; XU; MCPARTLON; LI, 2021; YANG et al., 2015).

5.3.1 *Qualidade estereoquímica dos modelos*

Uma das metodologias para a validação de modelos construídos foi a verificação da qualidade estereoquímica dos mesmos. Um dos parâmetros extremamente relevantes no que tange a qualidade dos modelos gerados é a relação entre os ângulos Phi (ϕ) e Psi (ψ) da cadeia principal da proteína. Estes ângulos representam a torção das ligações entre o átomo de carbono alfa de um resíduo de aminoácido e a sua amina e a sua carbonila, respectivamente (Figura 23a). Devido, principalmente, aos impedimentos estéricos, nem todas as combinações de valores destes ângulos são termodinamicamente favoráveis em uma cadeia polipeptídica. O físico indiano G.N. Ramachandran, que propôs a estrutura de hélice tripla da fibra de colágeno a partir de estudos de cristalografia e difração de raios X, foi o primeiro a examinar a distribuição da combinação de valores de ângulos Phi (ϕ) e Psi (ψ) em cadeias polipeptídicas, culminando no famoso diagrama de Ramachandran. Este diagrama nos mostra que existe uma distribuição bastante específica para os valores destes ângulos de ligação em polipeptídios, e que algumas combinações, por serem estericamente desfavoráveis, dificilmente ocorrem na natureza. Estas combinações de ângulos, ou ângulos diedrais, resultam no surgimento das estruturas secundárias das proteínas. Resumidamente, combinações que resultem num diedro aproximadamente linear levam a formação de fitas β , enquanto combinações que resultam em uma torção da cadeia levam ao surgimento de hélices α (Figura 23) (RAMACHANDRAN; RAMAKRISHNAN; SASISEKHARAN, 1963; VERLI, 2015).

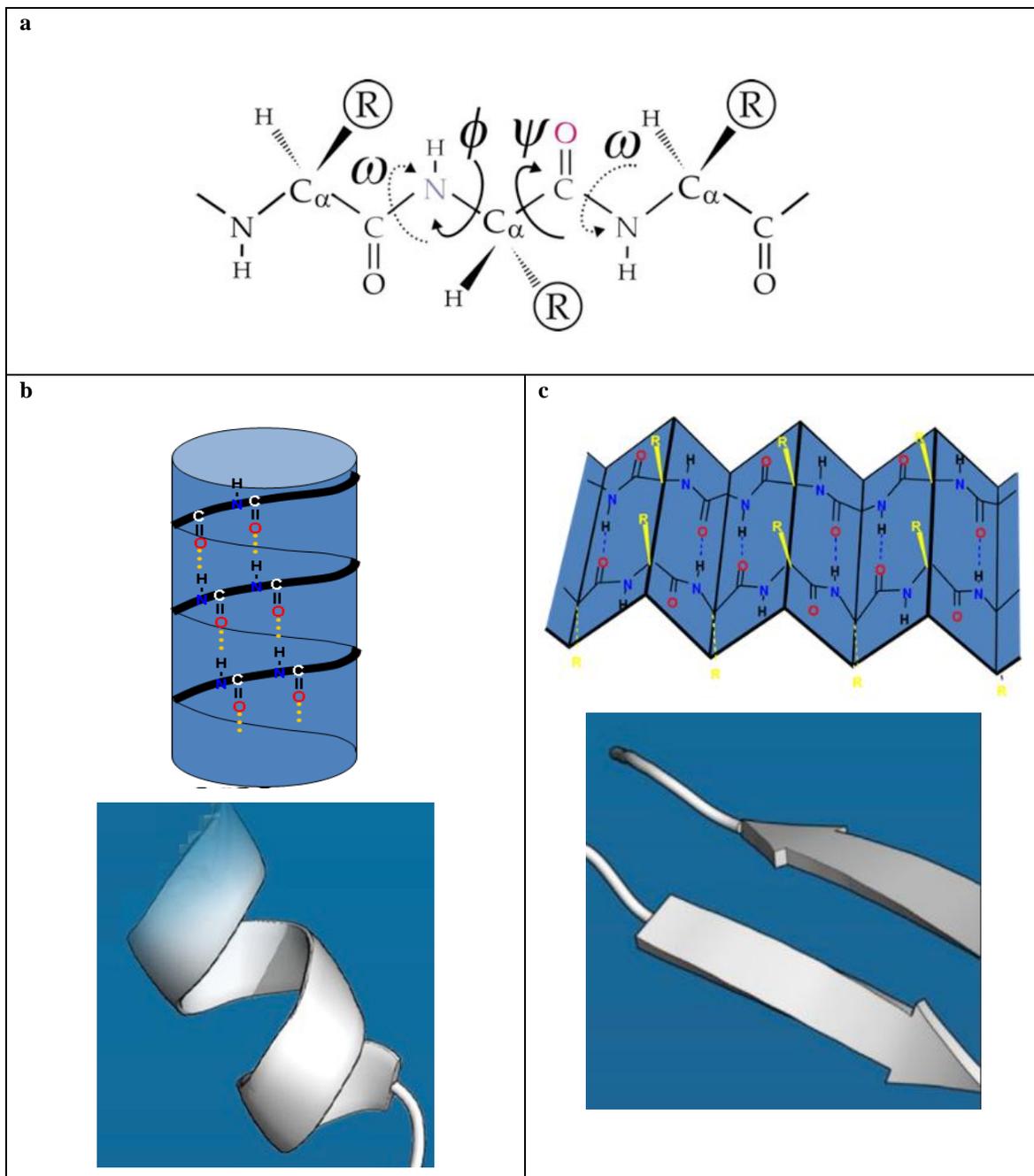


Figura 23. Representação das ligações que compõem a cadeia principal de um polipeptídeo.

(a) Os ângulos torcionais das ligações entre os átomos estão rotulados.

(b e c) Representação das estruturas secundárias mais comuns, um reflexo da combinação das torções dos ângulos Phi (ϕ) e Psi (ψ).

Hélices α (b) apresentam diedros de 90° e, portanto, se dobram sobre si mesmas.

Fitas β (c) apresentam diedros de 180° e, conseqüentemente, apresentam uma estrutura linear.

Fonte: (VERLI, 2015)

Em uma análise estereoquímica da combinação de ângulos Phi (ϕ) e Psi (ψ) de uma estrutura tridimensional de proteína por meio do diagrama de Ramachandran, um bom modelo deveria apresentar a maioria de seus resíduos de aminoácidos dentro das regiões mais favoráveis termodinamicamente do diagrama (regiões “A”, “B” e “L”, em vermelho, Figura 24). Considerando cada caso de enovelamento como sendo único, o microambiente local de cada resíduo da cadeia individualmente, as interações químicas e estéricas entre as cadeias laterais dos mesmos, e outras possíveis perturbações da estereoquímica e casos especiais, como a presença de ligantes, é comum observar resíduos fora das regiões mais favoráveis do diagrama, mesmo em estruturas resolvidas por técnicas empíricas e modelos de altíssima qualidade. Dentro deste contexto, é comumente esperado que 98% ou mais de todos os resíduos de aminoácidos de uma estrutura se encontrem dentro das regiões permitidas termodinamicamente (regiões “a”, “b”, “l” e “p”, em amarelo, Figura 24), e que 99,8% ou mais se encontrem dentro das regiões mais favoráveis. Ainda assim, é considerado aceitável observar até 10% dos resíduos de uma cadeia fora destas regiões, chamados *outliers* de Ramachandran, especialmente se estes se encontrarem nas regiões pouco favoráveis (regiões “~a”, “~b”, “~l” e “~p”, em creme, Figura 24) (HOOFT et al., 1996; LASKOWSKI et al., 1993; WILLIAMS et al., 2018).

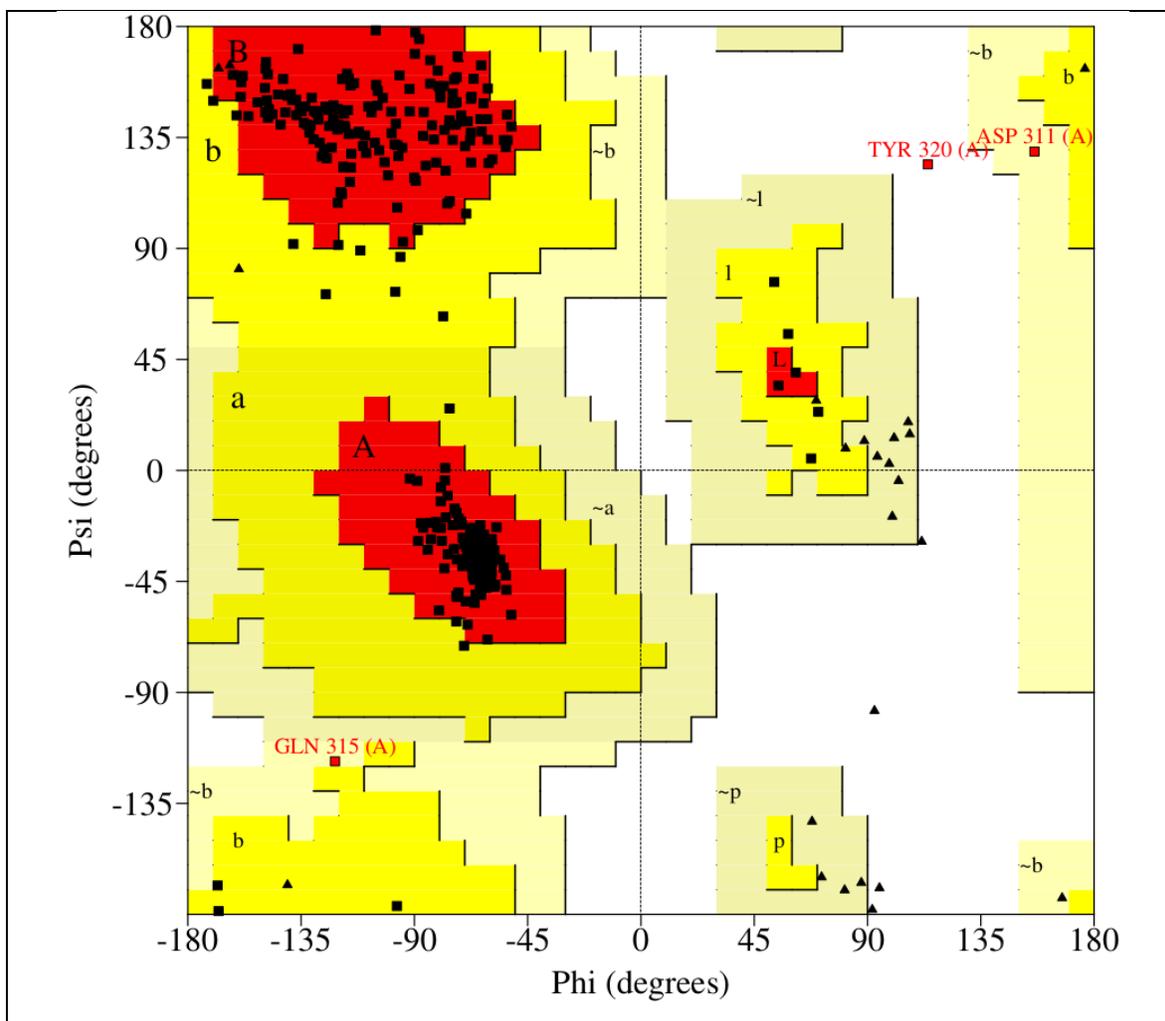


Figura 24. Diagrama de Ramachandran do modelo de Sir2rp1 de *L. major* gerado pelo software Modeller.

As regiões em vermelho representam as combinações de ângulos mais favoráveis estericamente, sendo a superior esquerda, demarcada com a letra “B”, referente às fitas β e a central/inferior esquerda, demarcada com a letra “A”, correspondente às hélices α . As regiões em amarelo representam combinações de ângulos favoráveis, porém não ideais. As regiões na cor creme representam combinações aceitáveis, porém pouco favoráveis. Em branco, seriam as combinações desfavoráveis.

A região central demarcada com a letra “L” corresponde às hélices α levorotatórias e a região central inferior, demarcada com a letra “p” corresponde a uma combinação favorável para resíduos de prolina.

Cada quadrado preto no diagrama representa um resíduo de aminoácido da cadeia polipeptídica e os resíduos de glicina, que apresentam regiões termodinamicamente favoráveis distintas dos demais aminoácidos (ver figura 25a), são representadas por triângulos pretos.

Os resíduos que aparecem em vermelho com seu nome e número na sequência demarcados são aqueles que apresentam uma configuração estereoquímica desfavorável.

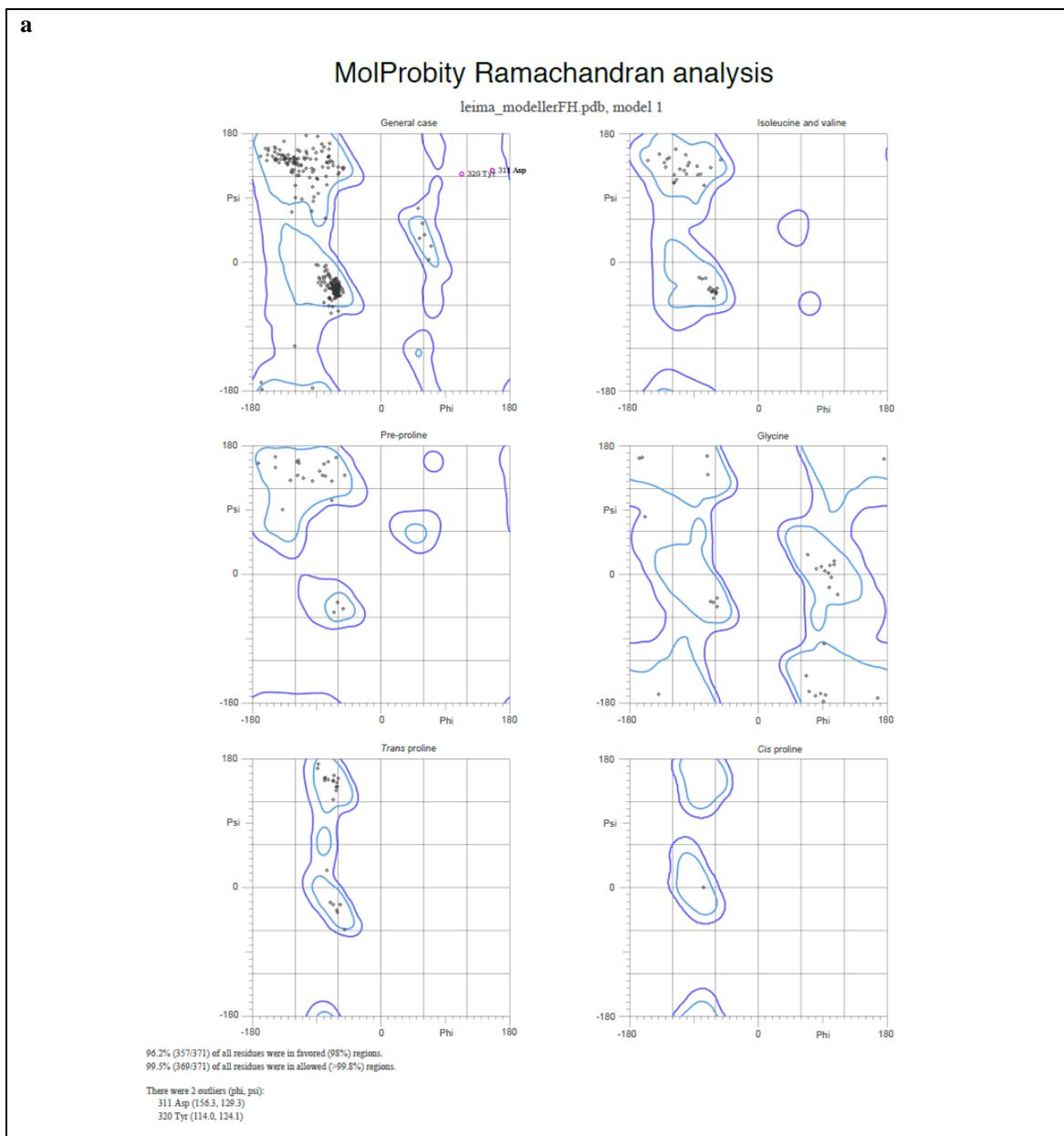
Diagrama elaborado pelo autor por meio da plataforma PROCHECK do servidor SAVES.

Outro parâmetro importante na avaliação da qualidade estereoquímica dos modelos são os diedros formados entre os ângulos Chi1 (χ_1) e Chi2 (χ_2), sendo estes os ângulos das ligações entre o carbono alfa de um resíduo e o seu carbono beta, e entre o carbono beta e o carbono gama da cadeia lateral do mesmo, respectivamente (Figura 23a, ângulo χ_1 é aquele entre o C α e o grupo R). Assim como é o caso dos ângulos Phi (ϕ) e Psi (ψ), existem combinações para estes ângulos que são mais favoráveis termodinamicamente e outras que são desfavoráveis, e a distribuição desta relação é conhecida para cada tipo de resíduo de aminoácido. Assim como o diagrama de Ramachandran é um bom parâmetro para avaliar a qualidade da cadeia principal de um modelo de proteína, os diagramas de ângulos Chi1-Chi2 são uma boa ferramenta para se avaliar a qualidade das cadeias laterais de uma estrutura polipeptídica (Figuras 25c e S10) (HOOFT et al., 1996; LASKOWSKI et al., 1993; WILLIAMS et al., 2018).

Temos ainda, outra avaliação estereoquímica interessante da qualidade dos modelos é o desvio de ângulos Ômega. O ângulo Ômega (ω) representa a torção da ligação peptídica, isto é, o ângulo entre o átomo de carbono carbonílico de um resíduo de aminoácido e o átomo de nitrogênio do próximo resíduo da cadeia (Figura 23a). Sendo uma ligação do tipo amida, esta deveria apresentar uma geometria planar. Sabe-se, porém, que a geometria mais favorável termodinamicamente para as ligações peptídicas em uma proteína é, na verdade, ligeiramente desviada de um plano perfeito. A avaliação da torção da ligação peptídica é uma ferramenta importante na validação de modelos de proteína, levando em consideração a distribuição de amplitude deste desvio de planaridade nas estruturas conhecidas elucidadas experimentalmente (Figuras 25d e S11) (HOOFT et al., 1996; LASKOWSKI et al., 1993; WILLIAMS et al., 2018).

Os resultados destas análises, juntamente com outras avaliações realizadas com os modelos gerados, como desvio de planaridade dos resíduos de aminoácidos com grupos planares em suas cadeias laterais, distâncias de ligações entre os átomos dos resíduos das cadeias polipeptídicas, distorção da geometria tetraédrica dos átomos de carbono alfa dos resíduos, a qualidade termodinâmica das ligações de hidrogênio formadas por estes e a incidência de “*bad contacts*” ou interações não covalentes com uma distância entre os átomos muito próxima e, portanto,

desfavorável (Figura 25), nos levaram a escolher o *software* Modeller para a realização da Modelagem Comparativa das Sirtuínas das demais espécies estudadas neste trabalho, com os modelos gerados por este passando pelas mesmas validações de maneira similar (GOMES, 2021; HOOFT et al., 1996; LASKOWSKI et al., 1993; LEE; SU; TSENG, 2022; WILLIAMS et al., 2018).

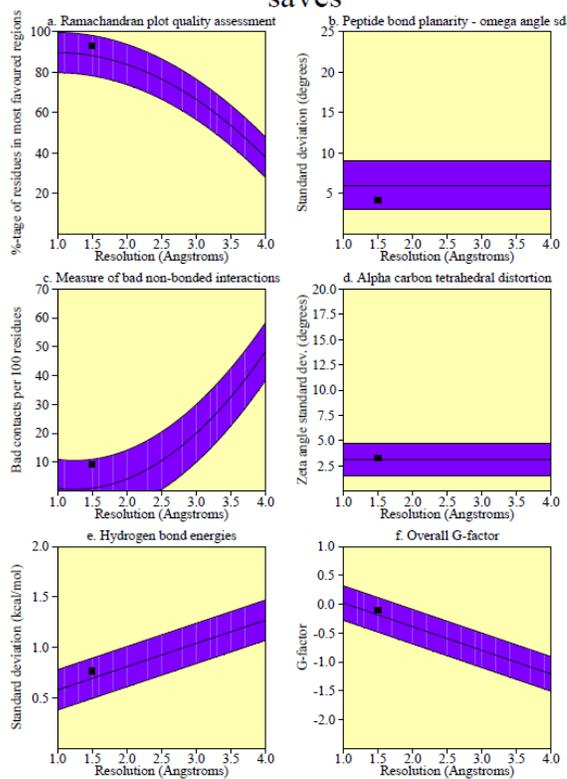


b

PROCHECK

Main-chain parameters

saves



Plot statistics

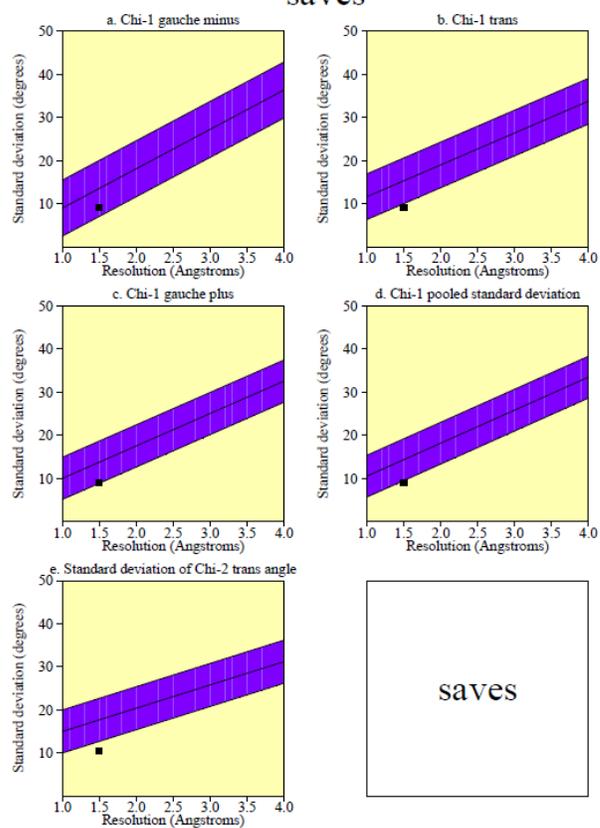
Stereochemical parameter	No. of data pts	Parameter value	Comparison values		No. of band widths from mean
			Typical value	Band width	
a. %age residues in A, B, L	318	92.8	88.2	10.0	0.5
b. Omega angle st dev	371	4.2	6.0	3.0	-0.6
c. Bad contacts / 100 residues	34	9.1	1.0	10.0	0.8
d. Zeta angle st dev	343	3.3	3.1	1.6	0.1
e. H-bond energy st dev	177	0.8	0.7	0.2	0.4
f. Overall G-factor	374	-0.1	-0.2	0.3	0.5

c

PROCHECK

Side-chain parameters

saves



Plot statistics

Stereochemical parameter	No. of data pts	Parameter value	Comparison values		No. of band widths from mean
			Typical value	Band width	
a. Chi-1 gauche minus st dev	59	9.2	13.6	6.5	-0.7 Inside
b. Chi-1 trans st dev	101	9.2	15.3	5.3	-1.2 BETTER
c. Chi-1 gauche plus st dev	123	9.0	13.8	4.9	-1.0 Inside
d. Chi-1 pooled st dev	283	9.1	14.3	4.8	-1.1 BETTER
e. Chi-2 trans st dev	61	10.5	17.7	5.0	-1.4 BETTER

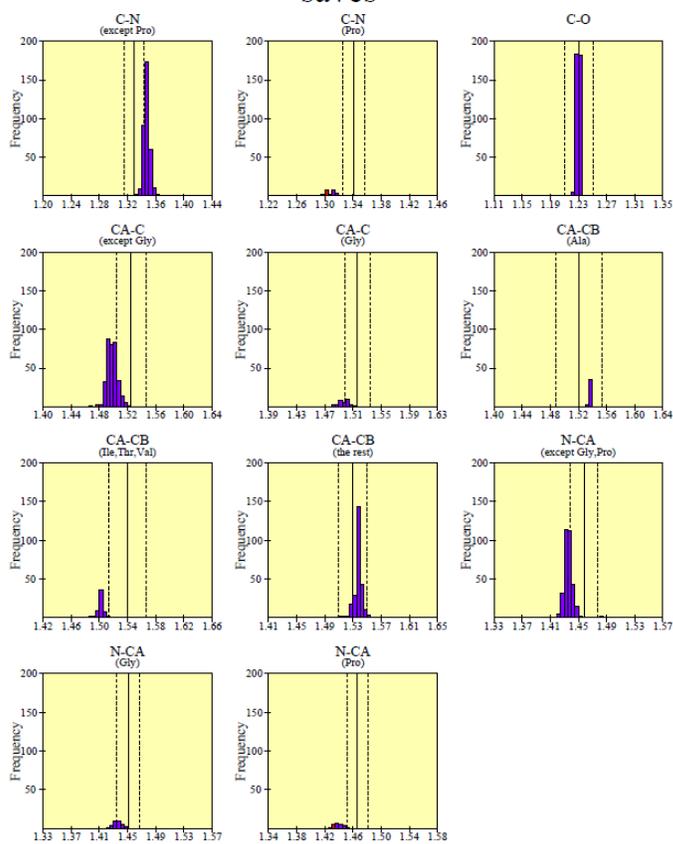
d

PROCHECK

Page 1

Main-chain bond lengths

saves



Black bars > 2.0 st. devs. from mean.

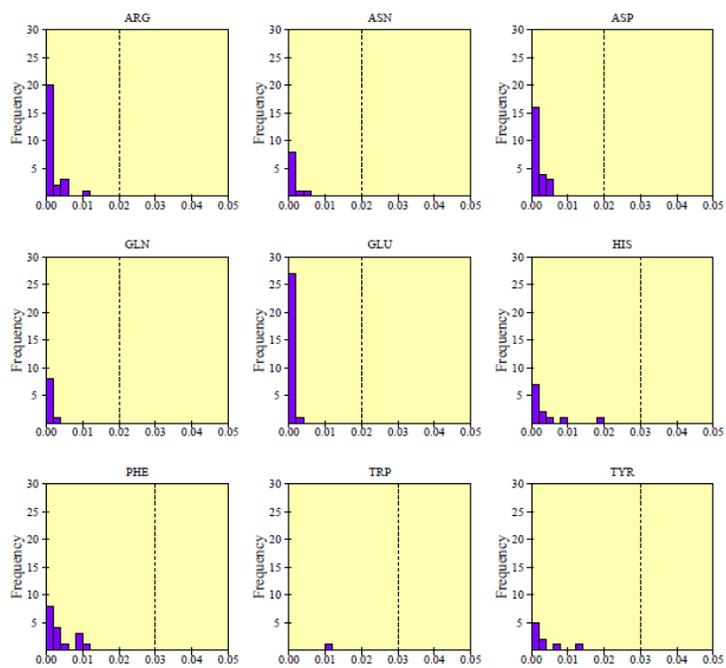
Solid and dashed lines represent the mean and standard deviation values as per Engh & Huber small-molecule data.

e

PROCHECK

Page 1

RMS distances from planarity saves



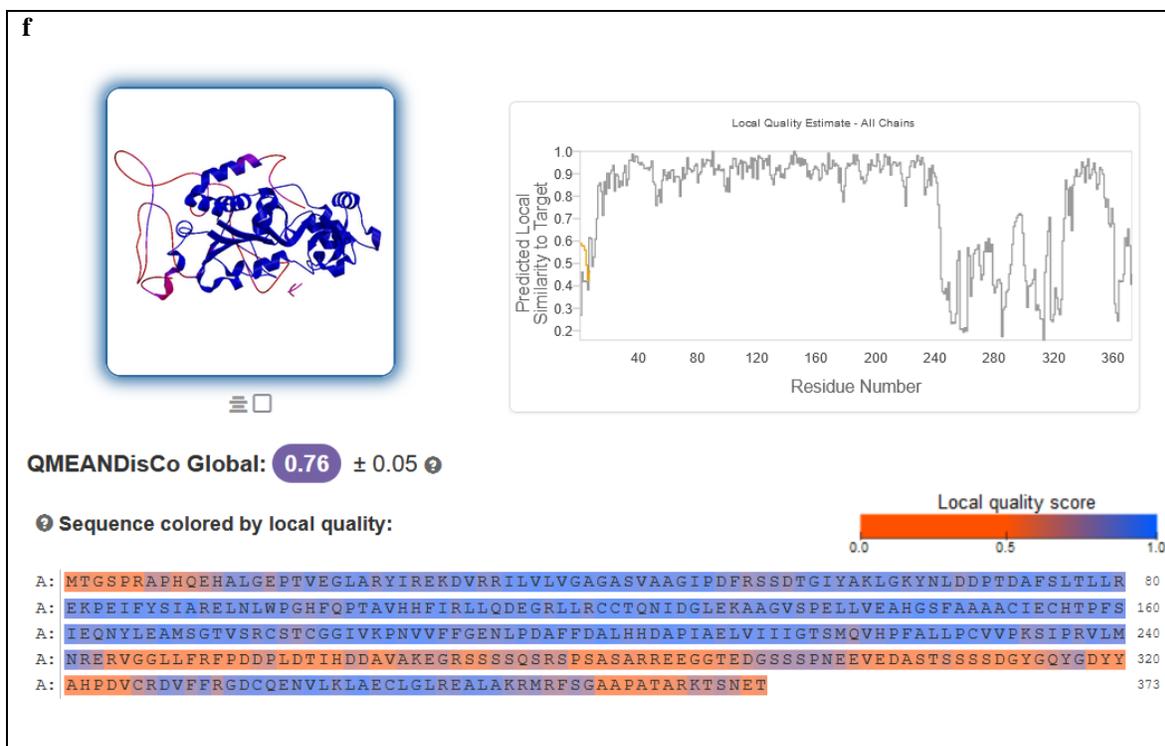


Figura 25. Demais análises da qualidade do modelo de Sir2rp1 de *L. major* gerado por meio do *software* Modeller.

- (a) Diagramas de Ramachandran gerados através da plataforma MolProbity.
 (b) Média dos parâmetros da cadeia principal do modelo, dentre eles desvio da geometria tetraédrica ótima dos carbonos alfa dos resíduos de aminoácido, número de "bad contacts" e análise termodinâmica das ligações de hidrogênio formadas.
 (c) Média dos parâmetros dos ângulos Chi das cadeias laterais do modelo.
 (d) Análise das distâncias de ligação entre os átomos da cadeia principal do modelo.
 (e) Desvio quadrático médio do plano perfeito para os grupos planares das cadeias laterais dos resíduos de aminoácido do modelo.
 (f) Análise de qualidade global e local do modelo pelo servidor QMEAN, parte do pacote SwissModel.

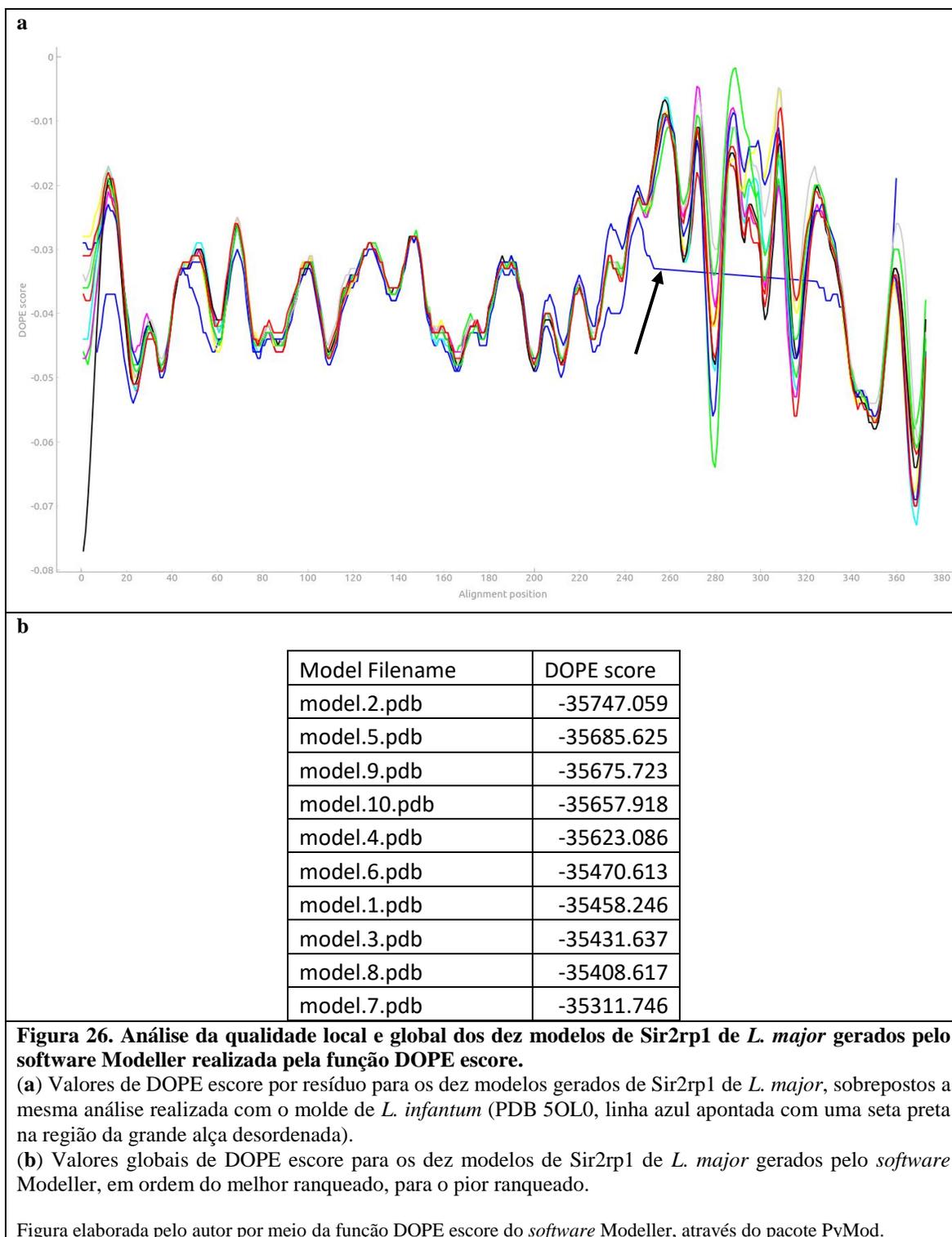
Imagens geradas pelo autor por meio das plataformas PROCHECK do servidor SAVES (b, c, d e e), MolProbity (a) e QMEAN (f).

Como podemos observar na Figura 25, o modelo de Sir2rp1 de *L. major* construído por meio do *software* Modeller apresenta boa qualidade em todas as análises realizadas. O servidor MolProbity nos dá diagramas de Ramachandran específicos para os resíduos cujas regiões mais favoráveis termodinamicamente são expressivamente distintas dos demais (Figura 25a). Segundo a análise de ângulos Phi (ϕ) e Psi (ψ) realizada por este servidor, o modelo gerado apresenta dois resíduos *outliers* de Ramachandran, ambos pertencentes a grande alça desordenada presente nas Sir2rp1 de Tripanosomatídeos (Figuras 11 e 29), o que justifica as torções incomuns na cadeia principal destes resíduos, dada a dificuldade de modelar esta região da proteína devido à sua alta flexibilidade e também ao fato

de que o molde utilizado (Sir2rp1 de *L. infantum*, código de acesso PDB 5OL0) não abrange esta porção da enzima, justamente devido à impossibilidade de se obter um cristal da mesma quando da presença desta região flexível. Na Figura 25b, podemos observar que as médias dos parâmetros da cadeia principal do modelo caem dentro das regiões esperadas. As análises de desvio da geometria tetraédrica ótima dos átomos de carbonos alfa dos resíduos de aminoácido, o número de "bad contacts" nas interações não covalentes presentes no modelo e a análise termodinâmica das ligações de hidrogênio formadas todas apresentam resultados que indicam boa qualidade deste modelo da enzima. Os parâmetros dos ângulos Chi das cadeias laterais do modelo (Figuras 25c e S10e), as distâncias de ligação entre os átomos da cadeia principal do modelo (Figura 25d), e os desvios quadráticos médios do plano perfeito para os grupos planares das cadeias laterais dos resíduos de aminoácido do modelo (Figura 25e), todos apresentam bons resultados. Além do mais, a análise de qualidade local e global realizada por meio da plataforma QMEAN (Figura 25f) nos corrobora a ideia de que temos um modelo de boa qualidade em mãos, e ainda nos indica que as regiões de pior qualidade do modelo são justamente as regiões mais flexíveis da enzima e que encontram-se ausentes no molde empregue, isto é, as porções terminais N e C e a grande alça desordenada discutida anteriormente (Figuras 11 e 29). Dentre as análises discutidas e apresentadas na Figura 25, o modelo gerado pelo *software* Modeller apresentou resultados mais favoráveis em todas elas em comparação aos demais modelos de Sir2rp1 de *L. major* gerados pelas plataformas iTasser, AlphaFold, SwissModel e RaptorX (salvo no caso do diagrama de Ramachandran, análise na qual o modelo gerado pela plataforma RaptorX obteve o melhor resultado, com apenas um *outlier*), corroborando assim a escolha da ferramenta de Modelagem Comparativa a ser usada neste trabalho. (GOMES, 2021; HOOFT et al., 1996; LASKOWSKI et al., 1993; RONIN et al., 2018; STUDER et al., 2020; WILLIAMS et al., 2018).

O *software* Modeller emprega uma função de ranqueamento chamada DOPE score, do inglês, *Discrete Optimized Protein Energy*, que se trata de uma avaliação de potencial estatístico da energia global e local dos modelos gerados. Em outras palavras, esta função de ranqueamento compara o estado energético dos modelos

gerados com os modelos empíricos presentes no banco de dados PDB, de maneira similar a um Z score e a análise realizada pelo servidor QMEAN, com o objetivo de avaliar quão próximas as estruturas tridimensionais modeladas são das estruturas proteicas conhecidas. Parâmetros como distâncias interatômicas, ângulos de torção, exposição de resíduos ao solvente e a geometria das ligações de hidrogênio são levados em consideração para o cálculo de energia, e quanto mais próximos são os valores obtidos entre os modelos gerados e valores médios presentes no banco de dados, menor o valor de DOPE score resultante. Na Figura 26a encontram-se os valores de DOPE score por resíduo obtidos para os dez modelos de Sir2rp1 de *L. major* gerados, em comparação com o molde de *L. infantum* empregue (PDB 5OL0). A figura denota que todos os modelos apresentam qualidade bastante similar entre si, e ainda que a qualidade dos mesmos está bastante próxima a do molde usado. Também podemos observar que as regiões com maior variabilidade estrutural são justamente as regiões flexíveis e ausentes no molde usado, as extremidades terminais N e C e a região da grande alça desordenada (aproximadamente entre os resíduos 250 e 340), em concordância com as análises realizadas pelos servidores QMEAN e DisEMBL, além da análise de flexibilidade dos modelos ao longo das simulações de DM (ver Figuras 11, 25f e 29). Na Figura 26b são dados os valores de DOPE score globais para os dez modelos gerados de Sir2rp1 de *L. major*. Com base no DOPE score e nas demais análises expostas nas Figuras 25, S10 e S11 anteriormente discutidas, foram escolhidos os melhores modelos de cada espécie estudada neste trabalho para uso nos estudos posteriores (LINDING et al., 2003; SHEN; SALI, 2006; STUDER et al., 2020; WEBB; SALI, 2016).



5.4 Simulações de Dinâmica Molecular dos modelos construídos

Experimentos de Dinâmica Molecular foram conduzidos com os melhores modelos gerados de Sirtuína 2 humana e de Sir2rp1 de *L. infantum*, *L. major* e *L. braziliensis* por meio do pacote GROMACS. Além do refino dos modelos, as

simulações foram conduzidas para permitir a análise das interações entre seus ligantes e resíduos de aminoácidos dos mesmos, bem como a observação de mudanças conformacionais em suas estruturas, com auxílio dos *softwares* Visual Molecular Dynamics (VMD), UCSF Chimera, Discovery Studio Visualizer, LigPlot+ e PyMol (ABRAHAM et al., 2023, 2015; BIOVIA, 2023; FERREIRA et al., 2023; HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996; LASKOWSKI; SWINDELLS, 2011; LEMKUL, 2019; LEMKUL; BEVAN, 2010; PETERSEN et al., 2004; SCHRÖDINGER, 2022).

5.4.1 Estudo dos parâmetros de simulação de DM e de diferentes campos de força

Diversos parâmetros de simulações de dinâmica molecular e campos de força foram estudados em experimentos preliminares para fins de comparação entre os resultados gerados. Os campos GROMOS54a7, CHARMM36 e OPLS-AA/M foram testados, cujos resultados direcionaram à escolha dos campos AMBER99SB-ILDN e GAFF, além do entendimento da influência das múltiplas variáveis envolvidas nestas simulações. A discussão desta análise comparativa entre os campos de força e parâmetros usados em simulações de dinâmica molecular encontra-se no Tópico S3 do anexo deste trabalho (ABRAHAM et al., 2023; HUANG; MACKERELL, 2013; HUANG; LIN; VAN GUNSTEREN, 2011; LEMKUL, 2019; LINDORFF- LARSEN et al., 2010; ROBERTSON; TIRADO-RIVES; JORGENSEN, 2015; WANG et al., 2004).

5.4.2 Refinamento dos modelos de Sirtuína construídos

Devido ao fato de que o molde empregue na construção dos modelos apresenta apenas o substrato peptídico complexado à enzima, e que pela ausência do co-substrato NAD⁺ esta se apresenta numa conformação não produtiva, ao inserir o co-substrato nos modelos construídos, faz-se necessário o refinamento dos mesmos, para que as enzimas possam se acomodar em torno de seus ligantes e assim assumir a conformação produtiva apresentada pela forma holo das Sirtuínas (Figuras 11 e 12). Seguindo a teoria do encaixe-induzido, os sítios de ligação dos substratos enzimáticos estudados neste trabalho não existem na enzima em sua

forma apo, ou, encontram-se em uma configuração radicalmente diferente daquela apresentada pela forma holo. Assim como a enzima induz os substratos a assumirem a conformação na qual estes se ligam a mesma, os substratos induzem a enzima a assumir a sua conformação ativa ao se ligarem a ela. Além do mais, o molde empregado, por ter sua estrutura resolvida por cristalografia e difração de raios X, não apresenta átomos de hidrogênio na mesma, estes tendo sido adicionados aos modelos pelo módulo pdb2gmx do pacote GROMACS, logo, a geometria das ligações com estes átomos também precisa ser refinada para posterior estudo das ligações de hidrogênio formadas entre a enzima e seus ligantes (ABRAHAM et al., 2023; FERREIRA, 2019; FERREIRA et al., 2023; FINNIN; DONIGIAN; PAVLETICH, 2001; GOMES, 2021; HOFF et al., 2006; LEMKUL, 2019; MONIOT; SCHUTKOWSKI; STEEGBORN, 2013; RUMPF et al., 2015a; SCHEMIES et al., 2010).

Para tal, um primeiro conjunto de simulações de DM de mil ns foi conduzido aplicando-se restrições de posicionamento aos ligantes das enzimas, de modo a mantê-los em suas conformações produtivas provenientes das estruturas cristalográficas usadas, enquanto a estrutura da enzima pode se equilibrar ou “fechar” em torno dos mesmos, assumindo também a sua conformação produtiva, que não é apresentada pelo molde de *L. infantum* empregue. Então, um segundo conjunto de simulações de DM foi conduzido, sem quaisquer restrições de posicionamento aplicadas aos complexos, partindo da estrutura central de um *cluster* populoso e representativo da conformação holo da enzima proveniente da primeira simulação de um μ s de cada modelo de Sirtuína (estruturas extraídas com tempos de simulação de 764 ns, 913 ns, 782 ns e 847 ns, para hSIRT2, *L. infantum*, *L. major* e *L. braziliensis*, respectivamente), para verificar a estabilidade das conformações assumidas pela enzima e por seus ligantes.

A estrutura da hSIRT2 construída em sua forma holo e subsequentemente refinada, visando principalmente a otimização das geometrias das ligações de hidrogênio para possibilitar o estudo das interações chave entre a enzima e seus ligantes naturais, e para servir como base na modelagem de seus sítios de ligação, pode ser observada na Figura 14 e seus diagramas de interação com os ligantes na

Figura S1 (ABRAHAM et al., 2023, 2015; FERREIRA et al., 2023; LEMKUL, 2019; LEMKUL; BEVAN, 2010).

5.4.3 *Análise das simulações de DM conduzidas*

O RMSD, do inglês *root mean square deviation*, ou desvio quadrático médio, é usado em Modelagem Molecular como uma medida da distância de posicionamento no espaço entre os átomos de dois ou mais modelos. A partir de um alinhamento estrutural realizado pelo método dos mínimos quadrados (MMQ), do inglês *least squares fit* (LSQ), que busca encontrar o melhor ajuste para um determinado conjunto de dados, no caso, o posicionamento no espaço dos átomos dos modelos, é possível medir o desvio quadrático médio entre estes. Esta medida é usada para aferir quão próximos dois ou mais modelos são estruturalmente. Um valor de RMSD de zero nm entre duas estruturas indica que elas são idênticas, enquanto um valor mais alto (em geral, maior que dois nm) indica duas estruturas que diferem consideravelmente em sua disposição espacial. Em Dinâmica Molecular, costuma-se empregar esta medida em função do tempo de simulação, de modo a investigar o quanto variou o posicionamento dos átomos do sistema ao longo da simulação, em relação à estrutura de partida (ABRAHAM et al., 2023; FERREIRA et al., 2023; LEMKUL, 2019).

Na Figura 27 (a, b e c) observamos que no conjunto inicial de simulações, a estrutura da cadeia principal do modelo de Sir2rp1 de *L. major* apresentou uma movimentação considerável até atingir um estado mais estável por volta da metade da simulação, enquanto que o co-substrato NAD⁺ se manteve quase estático durante toda a simulação, devido às restrições de posicionamento impostas, nas três replicatas conduzidas. Já no segundo conjunto de simulações, conduzidas sem quaisquer restrições de posicionamento (Figura 27d-f), podemos observar que a movimentação dos átomos da cadeia principal da enzima atingiu um estado estável mais rapidamente, por volta de cem ns de trajetória. Podemos notar também, que a conformação da cadeia principal do modelo após atingir a estabilidade não divergiu muito da conformação inicial do mesmo, considerando um valor médio de RMSD de apenas 0,2 nm ao longo da simulação, nas triplicatas conduzidas, o que denota a estabilidade conformacional do complexo atingida durante a primeira trajetória

calculada com restrições de posicionamento impostas aos ligantes. Adicionalmente, observa-se que neste segundo conjunto de simulações o co-substrato NAD⁺ apresentou uma movimentação na mesma ordem de grandeza que a enzima, mas apesar da liberação das restrições de posicionamento impostas sobre o mesmo na etapa anterior, este se mostrou ainda consideravelmente estável, devido a interação com a enzima em sua conformação holo estabilizar a conformação ativa do ligante e vice-versa.

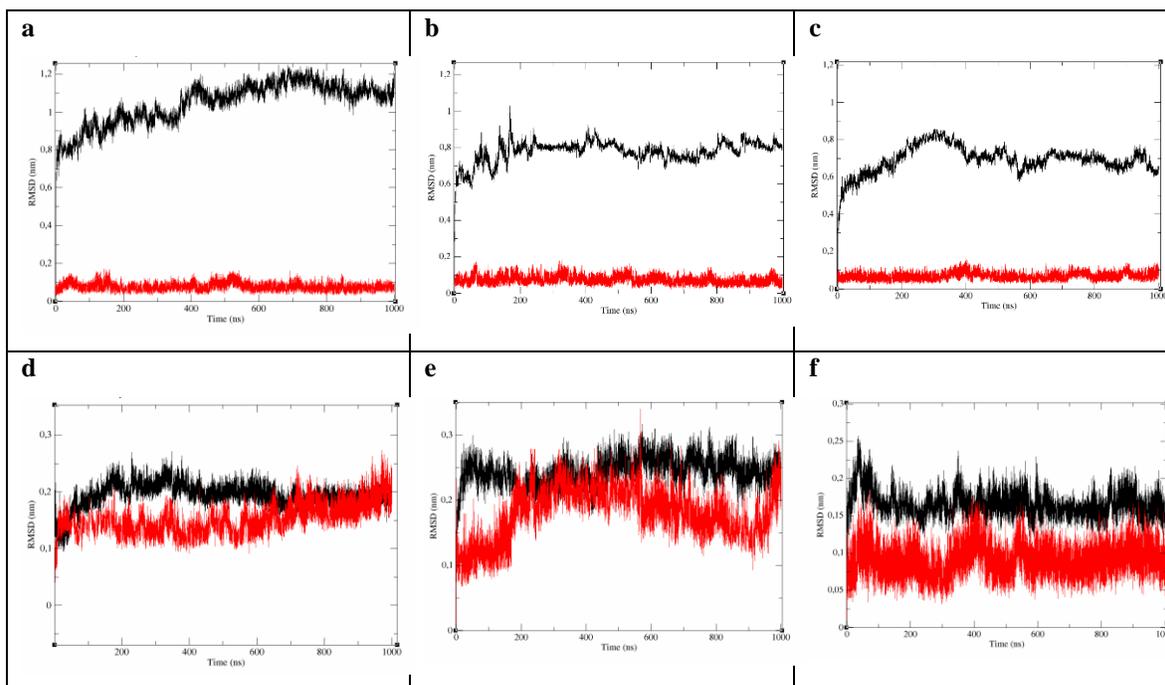


Figura 27. Gráficos de variação de RMSD da cadeia principal do modelo de Sir2rp1 de *L. major* e do co-substrato NAD⁺ complexado ao mesmo ao longo das replicatas das simulações de DM conduzidas com e sem restrições de posicionamento.

(a, b e c) Gráficos de variação de RMSD (desvio quadrático médio) da posição dos átomos da cadeia principal do modelo de Sir2rp1 de *L. major* (em preto) e do seu co-substrato NAD⁺ (em vermelho) ao longo das replicatas do primeiro conjunto de simulações de mil nanosegundos conduzidas com restrições de posicionamento impostas aos ligantes da enzima. É possível observar que a movimentação do modelo atinge um estado estável por volta da metade da simulação e que o co-substrato NAD⁺ permanece estável durante toda a simulação.

(d, e e f) Gráficos de variação de RMSD (desvio quadrático médio) da posição dos átomos da cadeia principal do modelo de Sir2rp1 de *L. major* (em preto) e do seu co-substrato NAD⁺ (em vermelho) ao longo das replicatas de mil nanosegundos de simulação conduzidas sem restrições de posicionamento partindo da estrutura central de um cluster representativo da conformação holo da enzima proveniente da primeira simulação de um microsegundo. É possível observar que a movimentação do modelo atinge um estado estável por volta de cem nanosegundos de simulação.

Figura elaborada pelo autor por meio do módulo rms do pacote GROMACS e do software XMGrace.

Uma análise da variação do número de ligações de hidrogênio formadas entre os modelos construídos de Sirtuínas e seus substratos ao longo das simulações de Dinâmica Molecular conduzidas foi realizada por meio do módulo hbond do pacote GROMACS. Na Figura 28 é possível observar que o número de ligações de hidrogênio formadas entre o modelo construído de Sir2rp1 de *L. major* e seu co-substrato NAD⁺ se mantém bastante estável, por volta de quinze ligações, não apenas entre as replicatas das trajetórias calculadas, mas também se compararmos o primeiro conjunto de simulações (Figura 28a-c) com o segundo (Figura 28d-f), isto é, conduzidas com e sem restrições de posicionamento impostas aos seus ligantes. Esta tendência de estabilidade do número de ligações formadas entre a enzima e seu co-substrato também ocorreu em todos os demais modelos de Sirtuínas construídos, se mantendo em uma média de quinze ligações de hidrogênio ao longo das simulações. Esta observação corrobora a estabilidade das simulações de DM conduzidas e a reprodutibilidade não apenas da metodologia de DM empregue, mas também da Modelagem Molecular realizada neste trabalho.

Já a variação do número de ligações de hidrogênio formadas entre o modelo de Sir2rp1 de *L. major* e seu substrato peptídico fragmento do peptídeo p53 é exibido na Figura S13 do anexo. Nesta figura podemos observar que o número de ligações de hidrogênio formadas neste caso também se mantém bastante estável entre as replicatas das trajetórias de DM calculadas. Entre 6 e 7 ligações de hidrogênio no primeiro conjunto de simulações (Figura S13a-c) conduzidas com restrições de posicionamento impostas aos seus ligantes, e entre 7 e 12 ligações no segundo (Figura S13d-f), isto é, conduzidas sem restrições de posicionamento impostas aos seus ligantes. É interessante notar que neste caso o conjunto de simulações conduzidas sem restrições de posicionamento apresenta uma variação maior do número de ligações de hidrogênio, além de haver ocorrido um aumento do número médio das mesmas em relação ao conjunto anterior, condizente com a ausência das restrições. Este perfil também foi observado nos demais modelos de Sirtuínas estudados neste trabalho. Uma possível explicação para a maior variação das interações de hidrogênio estabelecidas com o substrato peptídico em comparação àquelas estabelecidas pelo co-substrato NAD⁺, é o fato de que esta análise foi realizada com o fragmento do peptídeo p53 inteiro e, diferentemente do

resíduo de lisina acetilada que se insere no bolso Ac-K da enzima, os demais resíduos deste interagem com alças na face da enzima, o que permite uma movimentação muito maior dos mesmos.

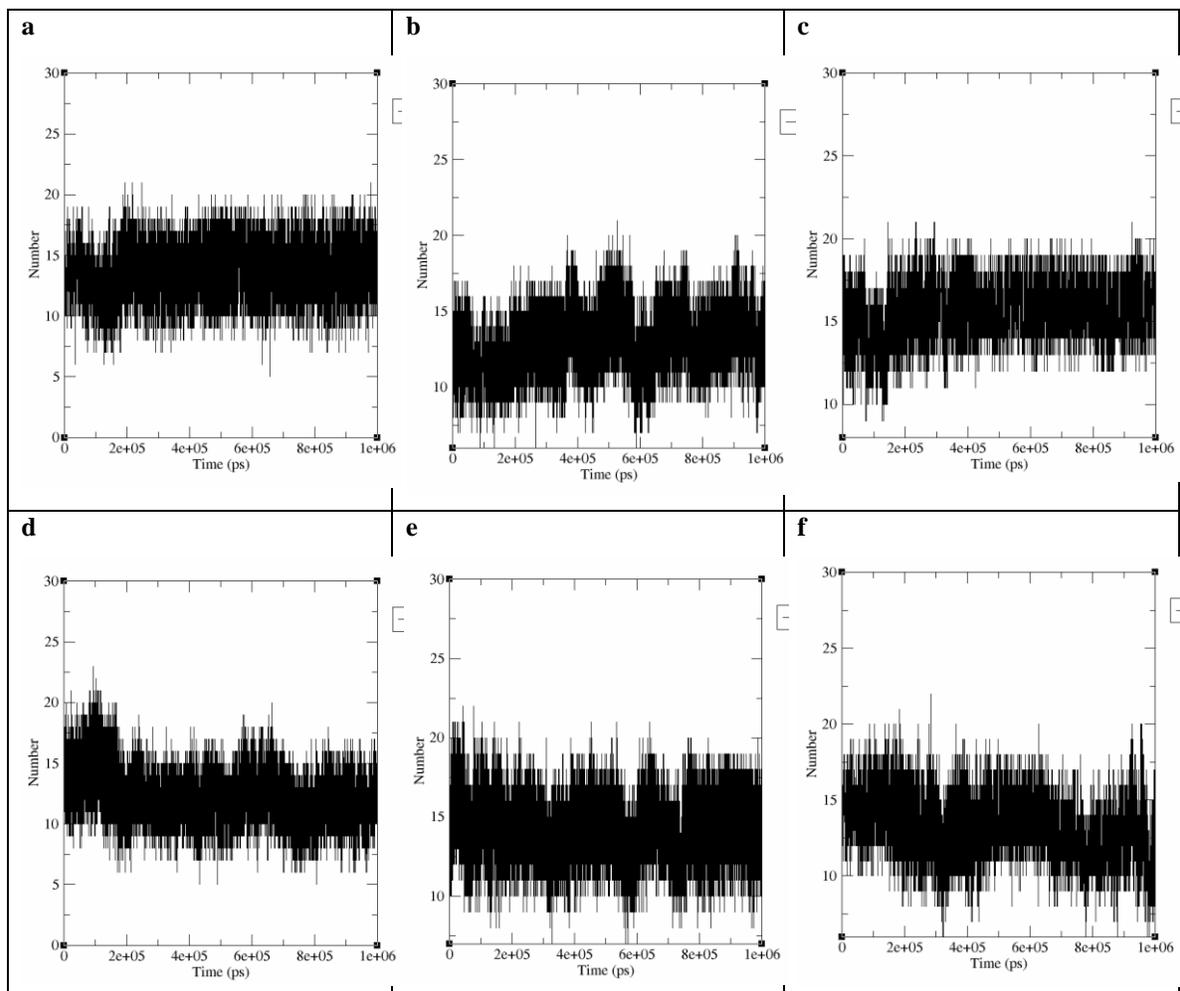


Figura 28. Gráficos de variação do número de ligações de hidrogênio formadas entre o modelo de Sir2rp1 de *L. major* e o co-substrato NAD⁺ complexado ao mesmo ao longo das replicatas das simulações de DM conduzidas com e sem restrições de posicionamento.

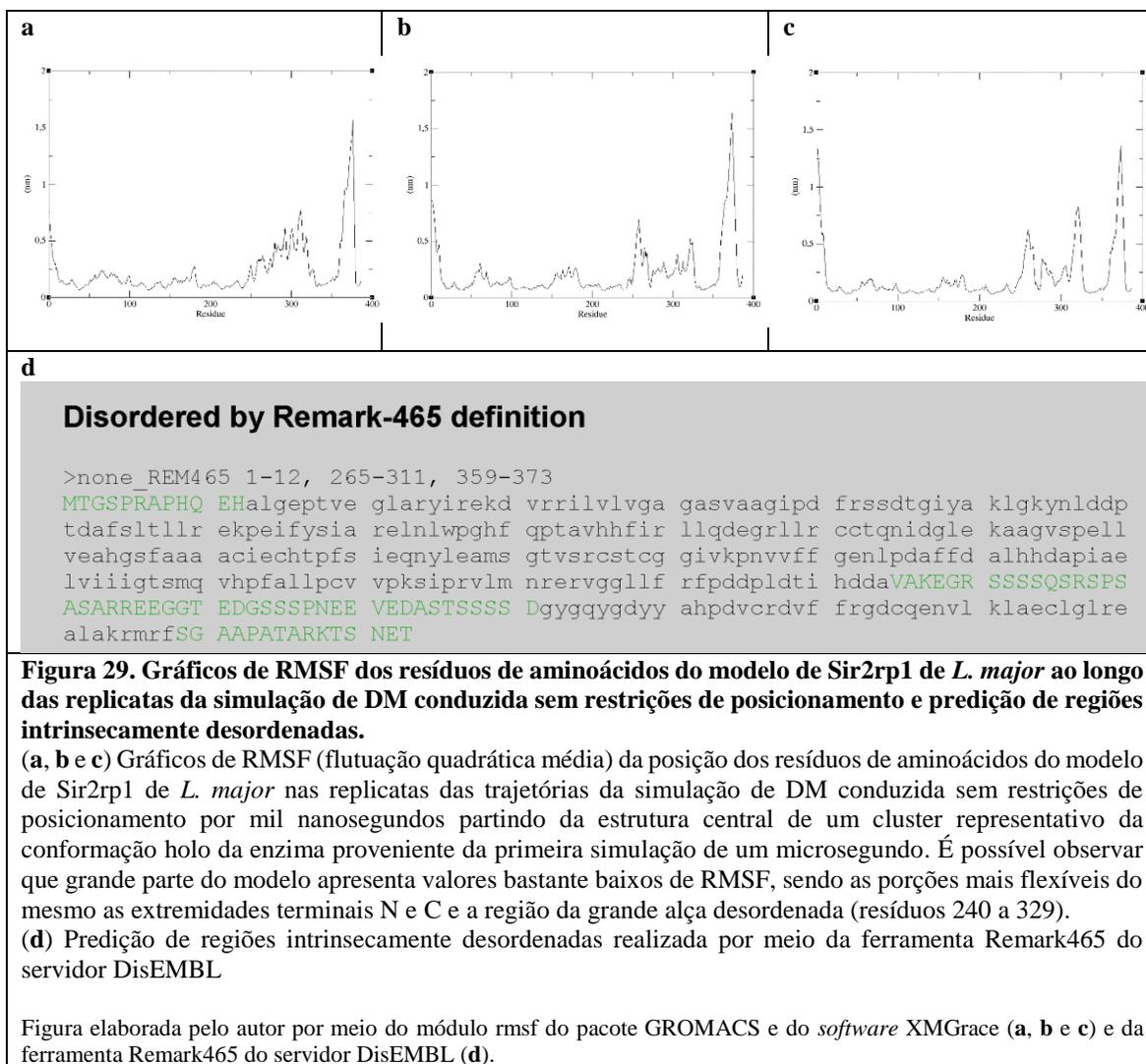
É possível observar que o número de ligações de hidrogênio formadas entre o modelo e seu co-substrato NAD⁺ se mantém bastante estável, por volta de 15 ligações, não apenas entre as replicatas, mas também se compararmos o primeiro conjunto de simulações (a, b e c) com o segundo (d, e e f), isto é, conduzidas com e sem restrições de posicionamento impostas aos seus ligantes.

Os gráficos de variação do número de ligações de hidrogênio formadas entre o modelo de Sir2rp1 de *L. major* e o substrato peptídico fragmento do peptídeo p53 acetilado complexado ao mesmo ao longo das replicatas das simulações de DM conduzidas com e sem restrições de posicionamento são expostos na Figura S13.

Figura elaborada pelo autor por meio do módulo hbond do pacote GROMACS e do software XMGrace.

O RMSF, do inglês *root mean square fluctuation*, ou flutuação quadrática média, é usado em Dinâmica Molecular como uma medida da flutuação do posicionamento no espaço dos átomos dos resíduos de aminoácidos de um modelo ao longo de uma simulação. De maneira similar ao RMSD, a partir de um alinhamento estrutural realizado pelo método dos mínimos quadrados (LSQ), é possível medir de maneira individual a flutuação do desvio quadrático médio do posicionamento no espaço dos átomos de um modelo ao longo de uma trajetória de DM. Esta medida é usada para quantificar a movimentação individual dos resíduos de aminoácidos de um modelo ao longo de uma simulação em relação ao seu posicionamento médio, ou seja, aferir quão flexíveis são as várias regiões do modelo em questão. Quanto maior o valor de RMSF para um determinado resíduo ao longo de uma simulação, maior a flexibilidade da região do modelo onde este se encontra. (ABRAHAM et al., 2023; LEMKUL, 2019).

Na Figura 29 (a, b e c) podemos observar que, em geral, os resíduos de aminoácidos do modelo de Sir2rp1 de *L. major* apresentaram uma movimentação relativamente baixa ao longo das simulações conduzidas sem restrições de posicionamento, salvo no caso daqueles que compreendem as regiões flexíveis e desenoveladas do modelo, isto é, as porções terminais N e C e a grande alça desordenada. Este resultado corrobora o fato de que os modelos construídos se mantêm consideravelmente estáveis ao longo das simulações conduzidas neste trabalho, além de estar de acordo com a predição de regiões intrinsecamente desordenadas realizada pela ferramenta Remark465 do servidor DisEMBL a partir da sequência primária do modelo (Figura 29d) (LINDING et al., 2003).



O raio de giro, do inglês, *radius of gyration* (R_g), é outra medida que é empregue em Dinâmica Molecular para aferir a estabilidade de um sistema ao longo de uma simulação. Esta medida indica o quanto variou a distribuição dos átomos de uma macromolécula em torno de seu eixo ao longo da simulação, que no caso de uma proteína está diretamente relacionada à variação no seu enovelamento, isto é, valores elevados de R_g sugerem uma alteração drástica do enovelamento da mesma, enquanto que valores baixos indicam uma estabilidade das estruturas secundárias e terciárias da proteína (ABRAHAM et al., 2023; LEMKUL, 2019).

Na Figura 30 observamos que a estrutura do modelo de Sir2rp1 de *L. major* se manteve estável ao longo das três replicatas da simulação de DM conduzida sem restrições de posicionamento. Podemos notar também, que a conformação da cadeia principal do modelo não divergiu muito da conformação inicial do mesmo, se mantendo com um valor médio de R_g de apenas 1,9 nm ao longo das simulações.

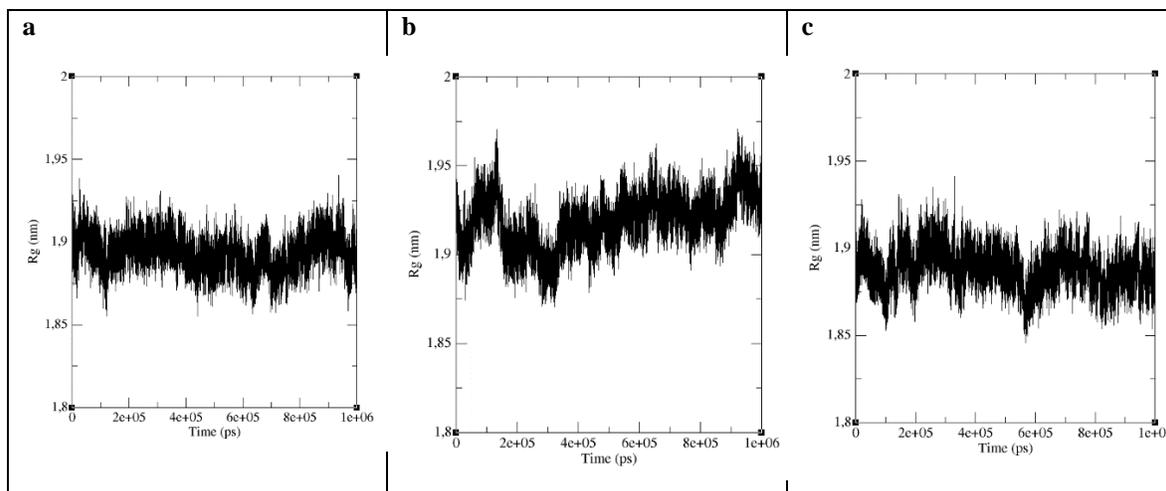


Figura 30. Gráficos de variação de raio de giro (R_g) do modelo de Sir2rp1 de *L. major* ao longo das replicatas da simulação de DM conduzida sem restrições de posicionamento.

Gráficos de variação de raio de giro (R_g) do modelo de Sir2rp1 de *L. major* nas replicatas das trajetórias da simulação de DM conduzida sem restrições de posicionamento por mil nanossegundos partindo da estrutura central de um cluster representativo da conformação holo da enzima proveniente da primeira simulação de um microsegundo. É possível observar que a conformação da cadeia principal do modelo não divergiu muito da conformação inicial do mesmo, se mantendo com um valor médio de R_g de apenas 1,9 nanômetro ao longo das simulações.

Figura elaborada pelo autor por meio do módulo gyrate do pacote GROMACS e do software XMGrace.

Por meio destas avaliações, podemos constatar que as estruturas dos modelos se mantêm estáveis ao longo das simulações conduzidas, indicando tanto a confiabilidade das trajetórias calculadas, como também corroborando a boa qualidade dos modelos de partida. Além do mais, foram observados valores e perfis de RMSD, RMSF e R_g dos sistemas muito similares entre as replicatas das simulações, o que denota a robustez e reprodutibilidade do método (ABRAHAM et al., 2023; FERREIRA, 2019; FERREIRA et al., 2023; LEMKUL, 2019; VERLI, 2015).

5.4.4 Clusterização das estruturas das trajetórias de DM

Uma trajetória de Dinâmica Molecular consiste de uma sequência de *frames* ou quadros, de maneira análoga a um filme, que é composto de uma sequência de

fotos ou imagens estáticas. Cada *frame* da trajetória contém uma estrutura estática do sistema estudado, e a diferença de posicionamento dos átomos do sistema entre dois *frames* representa o seu movimento no intervalo do tempo de amostragem da simulação conduzida. Desta maneira, um *frame* arbitrário qualquer de uma trajetória de uma simulação de DM não necessariamente é representativo das estruturas contidas na mesma, podendo apresentar uma estrutura ou conformação que ocorreu apenas uma ou pouquíssimas vezes ao longo da trajetória em questão. Assim, a clusterização ou agrupamento das estruturas de uma trajetória de DM segundo algum critério é uma ferramenta poderosa para a obtenção de estruturas representativas de uma simulação (ABRAHAM et al., 2023, 2015; LEMKUL, 2019; LEMKUL; BEVAN, 2010).

As estruturas contidas nas trajetórias calculadas foram então clusterizadas pelo método de Jarvis-Patrick com um corte de 0,1 nm de RMSD, isto é, estruturas que após alinhadas diferem em até 0,1 nm de RMSD umas das outras são agrupadas, por meio do módulo cluster do pacote GROMACS para a obtenção de estruturas representativas das simulações. O alinhamento feito pelo método dos mínimos quadrados (LSQ) empregou todos os átomos pesados das enzimas (cadeias principais e laterais), visando agrupar não apenas estruturas com enovelamento, ou configuração da cadeia principal similar, mas também conformações similares das cadeias laterais, considerando a relevância de ambas na interação com ligantes, porém excluindo os átomos pertencentes às extremidades flexíveis terminais N e C e à grande alça desordenada, pois sua movimentação exacerbada impede a clusterização pelo método de Jarvis-Patrick. As estruturas centrais dos *clusters* de maior população foram analisadas, e aquelas representando a conformação produtiva do complexo Sirtuína-substratos foram subsequentemente utilizadas no estudo comparativo entre os modelos construídos (Figura 31). Além do mais, estruturas muito similares às estruturas centrais dos *clusters* mais populosos de cada trajetória também ocorrem em *clusters* populosos nas replicatas conduzidas com pequeno desvio de RMSD umas das outras, o que corrobora a robustez e reprodutibilidade da metodologia empregue neste trabalho. Como mostrado na Figura 32, após alinhamento estrutural entre as estruturas centrais de *clusters* populosos de cada trajetória (*clusters* 64, 51 e 80, Figura 30), o

valor de RMSD entre elas foi de 0.697, 0.824 e 0.766 nm (alinhamento entre estruturas provenientes das replicatas 1 x 2, 1 x 3 e 2 x 3, respectivamente).

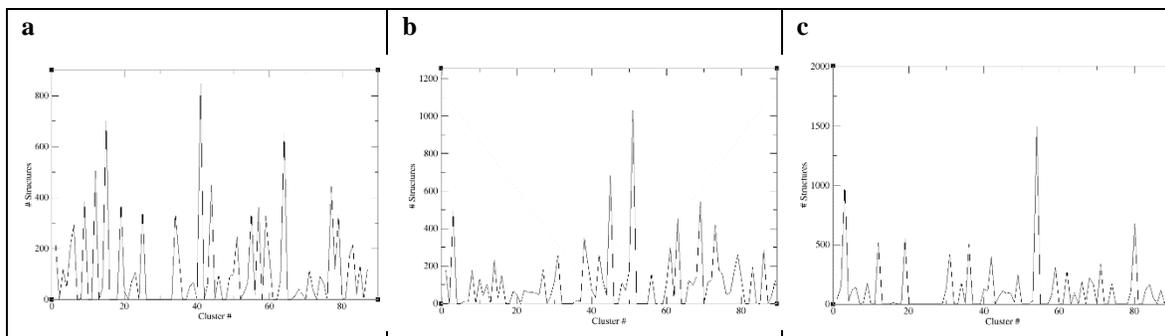


Figura 31. Gráficos de tamanho de *cluster* das replicatas das trajetórias da simulação de DM conduzida sem restrições de posicionamento com o modelo de Sir2rp1 de *L. major*.

Gráficos de tamanho de *cluster* das replicatas das trajetórias da simulação de DM conduzida sem restrições de posicionamento com o modelo de Sir2rp1 de *L. major* por mil nanosegundos partindo da estrutura central de um cluster representativo da conformação holo da enzima proveniente da primeira simulação de um microsegundo. É possível observar a presença de alguns *clusters* com uma população significativamente maior que os demais.

Figura elaborada pelo autor por meio do módulo cluster do pacote GROMACS e do *software* XMGrace.

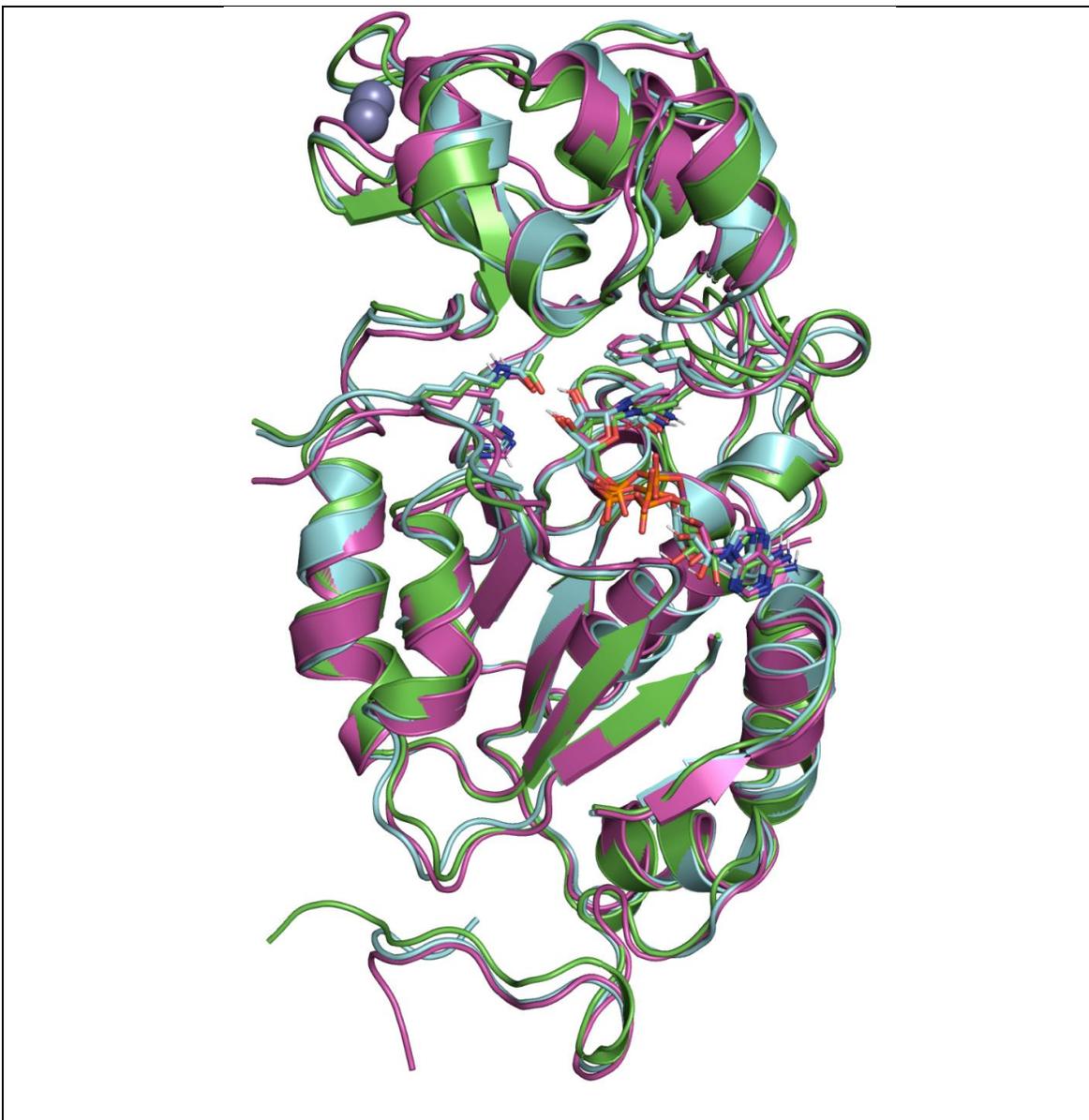


Figura 32. Estruturas centrais dos *clusters* mais populosos das três replicatas das trajetórias da simulação de DM conduzida sem restrições de posicionamento com o modelo de Sir2rp1 de *L. major* alinhadas estruturalmente.

Estruturas centrais de *clusters* populosos das replicatas das trajetórias da simulação de DM conduzida sem restrições de posicionamento com o modelo de Sir2rp1 de *L. major* por mil nanosegundos partindo da estrutura central de um cluster representativo da conformação holo da enzima proveniente da primeira simulação de um microsegundo, alinhadas estruturalmente. É possível observar a alta similaridade entre as estruturas, sendo os valores de RMSD entre os carbonos alfa das mesmas de 0,697, 0,824 e 0,766 nanômetros.

A estrutura da cadeia primária da enzima e de seu substrato peptídico estão representadas em verde, ciano e magenta para a primeira, segunda e terceira replicata, respectivamente, na representação do tipo *cartoon*.

O co-substrato NAD⁺ e as cadeias laterais de resíduos de aminoácidos relevantes, incluindo a lisina acetilada do substrato peptídico, estão representados com seus átomos de carbono na mesma coloração que a enzima, na representação do tipo bastões.

Os átomos de nitrogênio estão representados na cor azul, oxigênio em vermelho e fósforo em laranja.

A estrutura da grande alça desordenada e os átomos de hidrogênio não polares foram omitidos para maior clareza na visualização.

Figura elaborada pelo autor por meio do *software* PyMol.

5.5 Análise comparativa entre os modelos construídos de Sirtuína 2

As estruturas centrais dos *clusters* de maior população das trajetórias do segundo conjunto de simulações de DM conduzidas sem restrições de posicionamento com os modelos de hSIRT2 e Sir2rp1 de *L. infantum*, *L. major* e *L. braziliensis* foram analisadas, e aquelas representando a conformação produtiva do complexo Sirtuína-substratos foram utilizadas no estudo comparativo entre os modelos construídos, realizados por meio do pacote gmx_MMPBSA, dos softwares LigPlotPlus e PyMol e do servidor CavityPlus (ABRAHAM et al., 2023, 2015; FERREIRA et al., 2023; LASKOWSKI; SWINDELLS, 2011; LEMKUL, 2019; LEMKUL; BEVAN, 2010; SCHRÖDINGER, 2022; VALDÉS-TRESANCO et al., 2021; WANG et al., 2023).

5.5.1 Cálculos de energia de interação enzima-ligante via MMPBSA

Análises de energia de ligação entre os modelos de Sirtuína estudados e seus substratos naturais foram executadas empregando a metodologia de MM/PBSA por meio do pacote gmx_MMPBSA. Foram calculadas as energias de interação, variação de entropia e variação de energia livre de Gibbs entre os modelos de Sirtuína, o resíduo de lisina acetilada do substrato peptídico e o co-substrato NAD⁺, além da análise de decomposição de energia livre para a avaliação da contribuição energética individual de cada resíduo de aminoácido para a interação com os ligantes (DUAN; LIU; ZHANG, 2016; EKBERG; RYDE, 2021; MILLER et al., 2012; VALDÉS-TRESANCO et al., 2021; WANG et al., 2016).

Na Figura 33 encontram-se os gráficos de variação de RMSD das estruturas das cadeias principais dos modelos de Sir2rp1 de *L. infantum*, *L. major*, *L. braziliensis* e da Sirtuína 2 humana nas trajetórias de DM calculadas por dez ns com uma frequência de amostragem mais densa (cem fs) partindo da estrutura central de um *cluster* representativo da conformação holo da enzima proveniente da segunda simulação de um μ s de cada modelo de Sirtuína estudado (estruturas extraídas com tempos de simulação de 815 ns, 764 ns, 634 ns e 772 ns, para hSIRT2, *L. infantum*, *L. major* e *L. braziliensis*, respectivamente), empregues nos cálculos de energia de interação executados no pacote gmx_MMPBSA. As análises de MM/PBSA foram conduzidas utilizando dez mil frames (um ns) extraídos de um

trecho cujo ponto central contém a estrutura central do cluster mais populoso destas trajetórias (por volta do centro das trajetórias, ou seja, aproximadamente de 4,5 a 5,5 ns de simulação).

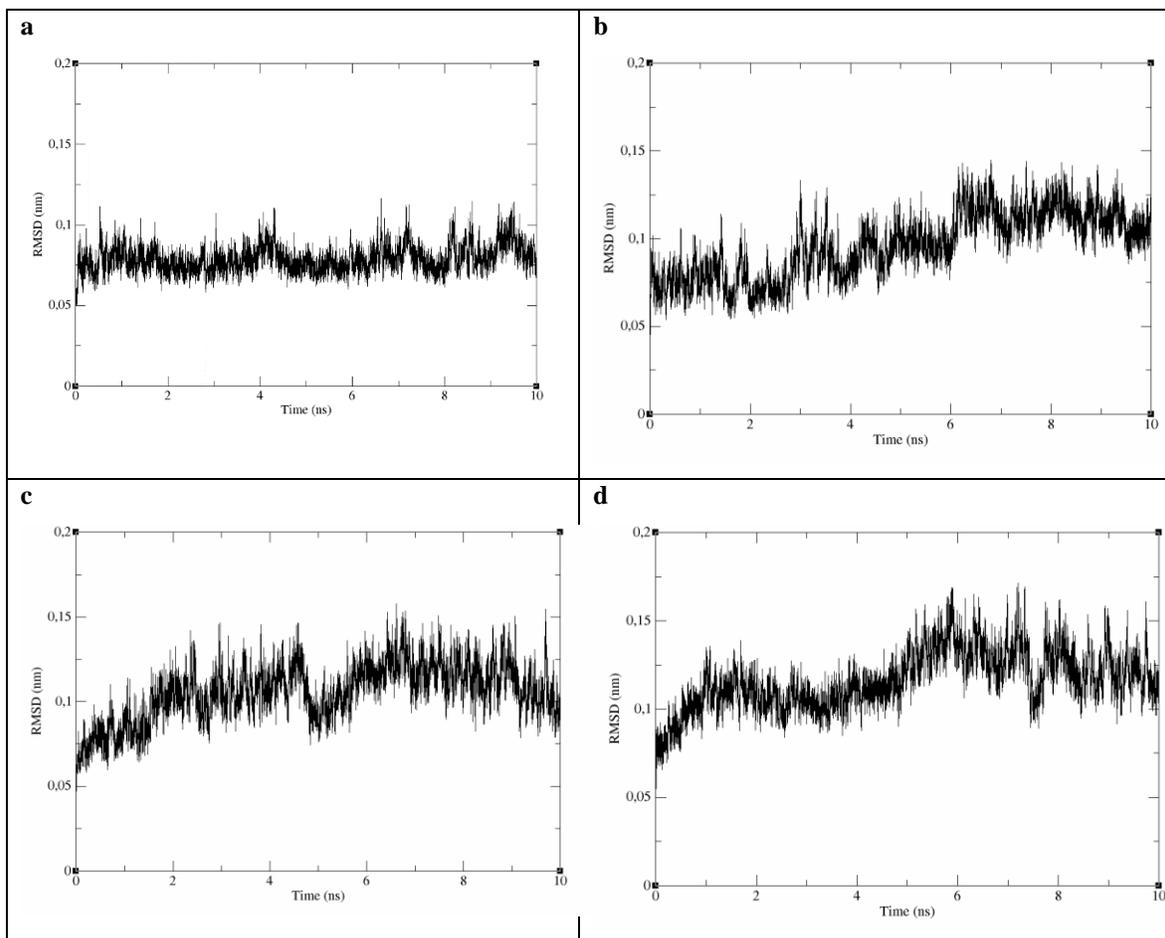


Figura 33. Gráficos de variação de RMSD da cadeia principal dos modelos de hSIRT2 e de Sir2rp1 de *L. infantum*, *L. major* e *L. braziliensis* ao longo do terceiro conjunto de simulações de DM conduzidas com uma frequência de amostragem mais densa.

Gráficos de variação de RMSD (desvio quadrático médio) da posição dos átomos da cadeia principal dos modelos de de hSIRT2 e de Sir2rp1 de *L. infantum*, *L. major* e *L. braziliensis* (a, b, c e d, respectivamente) ao longo do terceiro conjunto de simulações de DM conduzidas com uma frequência de amostragem mais densa (cem femtosegundos), partindo da estrutura central de um cluster representativo da conformação holo da enzima proveniente da segunda simulação de um microsegundo de cada modelo de Sirtuína estudado. É possível observar que a movimentação do modelo se mantém extremamente estável ao longo da simulação, apresentando valores médios de RMSD entre 0,075 e 0,125 nanômetros, apenas.

Figura elaborada pelo autor por meio do *software* XMGrace.

Na Figura 34, observamos a energia de interação calculada (ΔH) usando o modelo de solvatação implícita de Poisson-Boltzmann, a variação de entropia ($-T\Delta S$) aproximada pela metodologia de entropia C2 e a variação de energia livre de Gibbs (ΔG) calculada para a ligação do co-substrato NAD^+ com os modelos construídos e refinados das enzimas. O valor de desvio padrão para o cálculo de energia de interação (σ_{EI}) ficou abaixo de 7 kcal/mol, onde o número de *frames* necessário para convergir o valor do cálculo de variação de entropia pelo método de entropia C2 fica por volta de dez mil *frames*, como demonstrado pelo grupo de Ekberg. Considerando que foram utilizados dez mil *frames* para a realização destes cálculos, podemos dizer que estes resultados são confiáveis (DUAN; LIU; ZHANG, 2016; EKBERG; RYDE, 2021; MILLER et al., 2012; VALDÉS-TRESANCO et al., 2021; WANG et al., 2016).

Apesar disto, os valores de variação de energia livre de Gibbs (ΔG) calculados para a ligação do co-substrato NAD^+ com os modelos construídos e refinados das enzimas ficaram por volta de -10 kcal/mol, que resulta, via a equação da energia livre de Gibbs ($\Delta G = RT \ln K_D$, onde R é a constante dos gases ideais, T é a temperatura em Kelvin e $\ln K_D$ é o logaritmo natural da constante de dissociação), em uma constante de dissociação (K_D) por volta de 88,3 nM. Estes valores representam uma afinidade da enzima pelo seu co-substrato maior do que é reportado na literatura ($K_{D \text{ NAD}} \approx 200 \mu\text{M}$). Estes resultados podem ser explicados por alguns pontos, como o fato de que o objetivo do cálculo de energia de ligação realizado pela metodologia de MM/PBSA não é reproduzir numericamente valores obtidos em experimentos com calorímetros, mas sim possibilitar o uso deste *framework* para fins de comparação entre ligantes e/ou sistemas distintos ao se aplicar a mesma metodologia aos mesmos, como demonstrado em experimentos conduzidos pelo grupo de Zhang, *et al.*. Outro fator que interfere na obtenção de valores de energia de ligação numericamente equivalentes aos experimentos empíricos, é o fato de que a maioria dos valores de K_D encontrados na literatura são calculados a partir de experimentos de competição e deslocamento de um ligante por outro, e não pela aferição do calor liberado quando da interação receptor-ligante em um calorímetro. Essas metodologias são fundamentalmente diferentes do que ocorre na metodologia de MM/PBSA, sendo esta mais próxima ao que ocorre num

experimento com calorímetro, especialmente se levarmos em conta o fato da ausência de outro(s) ligantes que poderiam competir com o co-substrato NAD⁺ nos sistemas simulados neste trabalho. Por fim, levando em consideração a teoria do encaixe-induzido e a metodologia de simulação de DM empregue neste estudo, os cálculos de energia de interação foram realizados utilizando um ns de trajetória de DM, este tempo pode ser considerado insuficiente para que ocorram grandes mudanças conformacionais na estrutura da proteína. Além do mais, considerando que a trajetória empregue nestes cálculos teve seu início a partir de uma estrutura enzimática que passou por mais de um μ s de equilíbrio em torno de seus ligantes, apresentando-se, portanto, em sua conformação holo, na qual a configuração do sítio de ligação é ótima para a interação com estes ligantes em específico, seria possível, de fato, que para o co-substrato interagir com a enzima em sua forma apo e induzir a mudança conformacional para a forma holo seria necessário uma concentração deste muito maior do que a afinidade calculada a partir desta configuração já estabilizada na forma da enzima fechada em torno de seus ligantes (DUAN; LIU; ZHANG, 2016; EKBERG; RYDE, 2021; FISCHER et al., 2012; MILLER et al., 2012; VALDÉS-TRESANCO et al., 2021; WANG et al., 2016; ZHANG et al., 2017; ZHANG; TUGULDUR; VAN DER SPOEL, 2015).

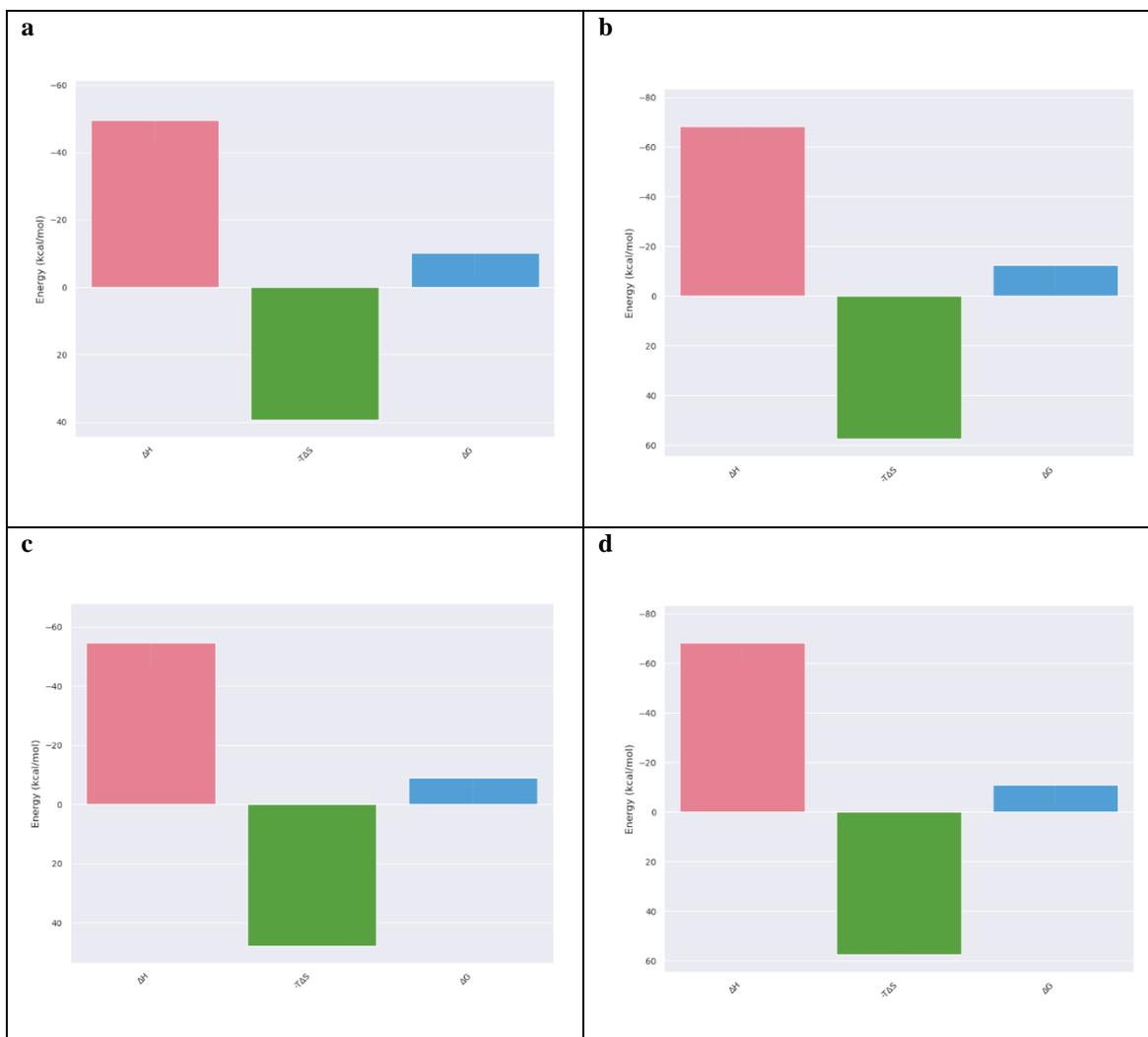


Figura 34. Gráficos de energia de ligação entre os modelos refinados de hSIRT2 e Sir2rp1 de *L. infantum*, *L. major* e *L. braziliensis* e seu co-substrato NAD⁺.

(a) hSIRT2: $\Delta H = -49,56$ kcal/mol; $-T\Delta S = 39,35$ kcal/mol; $\Delta G = -10,21$ kcal/mol ($K_D = 6,28 \times 10^{-8} M = 62,8$ nM); $\sigma EI = \pm 6,76$ kcal/mol.

(b) *L. infantum*: $\Delta H = -68,28$ kcal/mol; $-T\Delta S = 57,36$ kcal/mol; $\Delta G = -10,91$ kcal/mol ($K_D = 2,01 \times 10^{-8} M = 20,1$ nM); $\sigma EI = \pm 6,98$ kcal/mol.

(c) *L. major*: $\Delta H = -55,91$ kcal/mol; $-T\Delta S = 46,12$ kcal/mol; $\Delta G = -9,79$ kcal/mol ($K_D = 1,24 \times 10^{-7} M = 124$ nM); $\sigma EI = \pm 6,87$ kcal/mol.

(d) *L. braziliensis*: $\Delta H = -67,43$ kcal/mol; $-T\Delta S = 56,87$ kcal/mol; $\Delta G = -10,56$ kcal/mol ($K_D = 3,56 \times 10^{-8} M = 35,8$ nM); $\sigma EI = \pm 6,54$ kcal/mol.

Figura elaborada pelo autor por meio do módulo gmX_MMPBSA_ana do pacote gmX_MMPBSA.

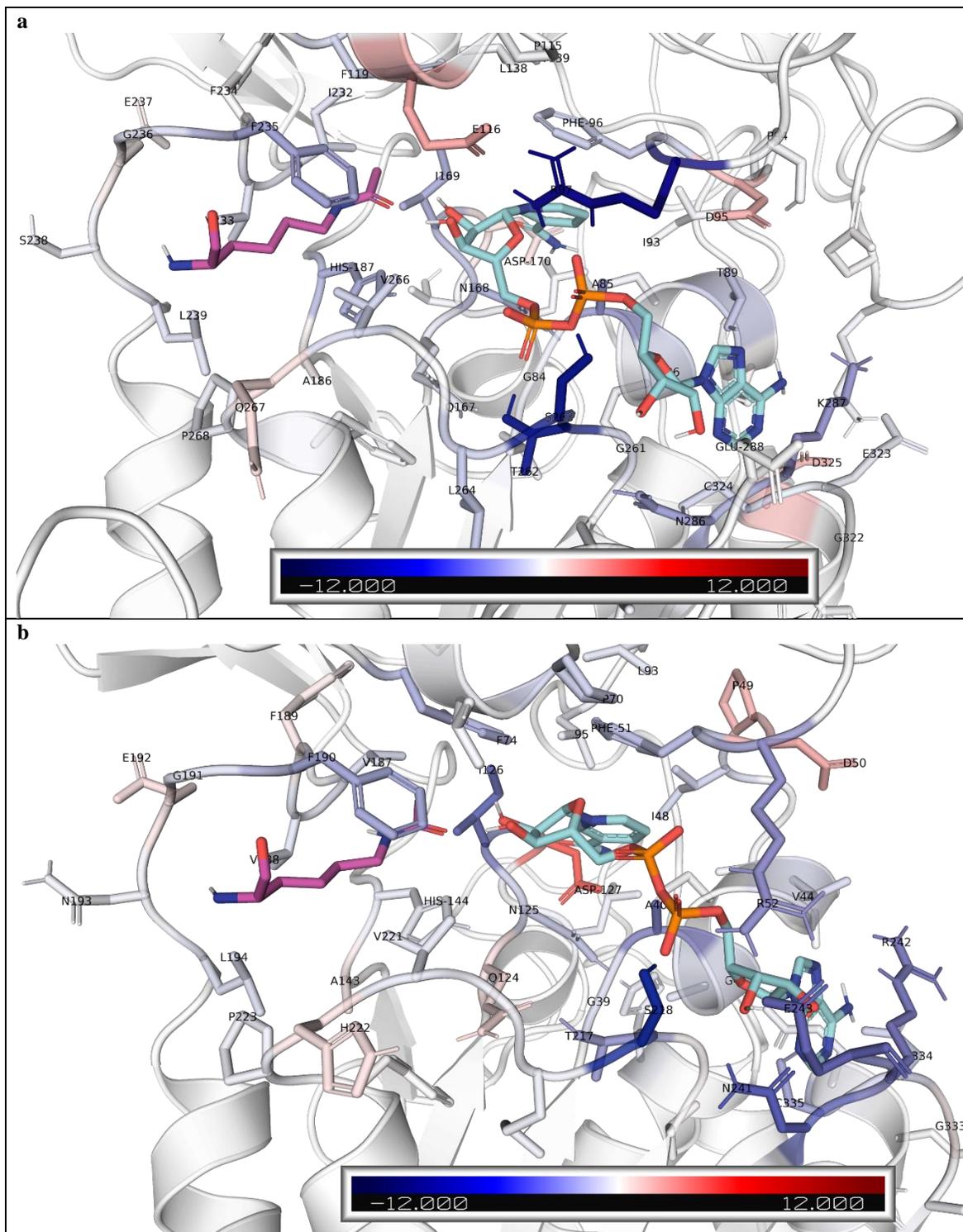
Por meio das análises de energia de interação entre os modelos construídos de Sirtuína e seu co-substrato NAD⁺ (Figura 34), podemos constatar que, levando em conta o valor de desvio padrão da análise, todos os modelos apresentaram afinidade igual pelo co-substrato, para todos os fins práticos. Ainda assim, nesta análise, o modelo de *L. infantum* apresentou a maior afinidade calculada pelo mesmo, com um valor de K_D de 20,1 nM, seguido do modelo de *L. brasiliensis*, com um valor de K_D de 35,8 nM, em terceiro lugar observamos o modelo de hSIRT2, com um K_D de 62,8 nM, e apresentando a menor afinidade pelo co-substrato, o modelo de *L. major*, com valor de K_D de 124 nM. É interessante notar que em todos os quatro modelos, quanto maiores os valores de energia de interação, maiores também os valores de variação de entropia, de modo que apesar de variações relativamente grandes destes valores entre os modelos estudados (variação de 18,72 kcal/mol ou 31,1% em média para a energia de ligação e de 18,01 kcal/mol ou 36,1% em média para a variação de entropia), os valores finais de variação de energia livre de Gibbs variaram relativamente pouco (1,12 kcal/mol ou 10,8% em média) o que, somado a baixíssima variação entre os valores de desvio padrão da análise global de energia de interação (0,44 kcal/mol ou 0,065% em média), indica que esta é uma metodologia adequada para ser aplicada na análise de decomposição por resíduo para o estudo comparativo entre os sítios de ligação dos diferentes modelos (Figura 35). Além do mais, a pequena variação de ΔG entre os modelos somada ao fato de que o modelo que apresentou o menor valor de afinidade calculado (*L. major*) não ser o mesmo que apresentou o menor valor de energia de interação (hSIRT2), denota a importância da estimação da variação de entropia para a comparação computacional da afinidade de ligantes aos seus receptores (DUAN; LIU; ZHANG, 2016; EKBERG; RYDE, 2021; MILLER et al., 2012; VALDÉS-TRESANCO et al., 2021; WANG et al., 2016).

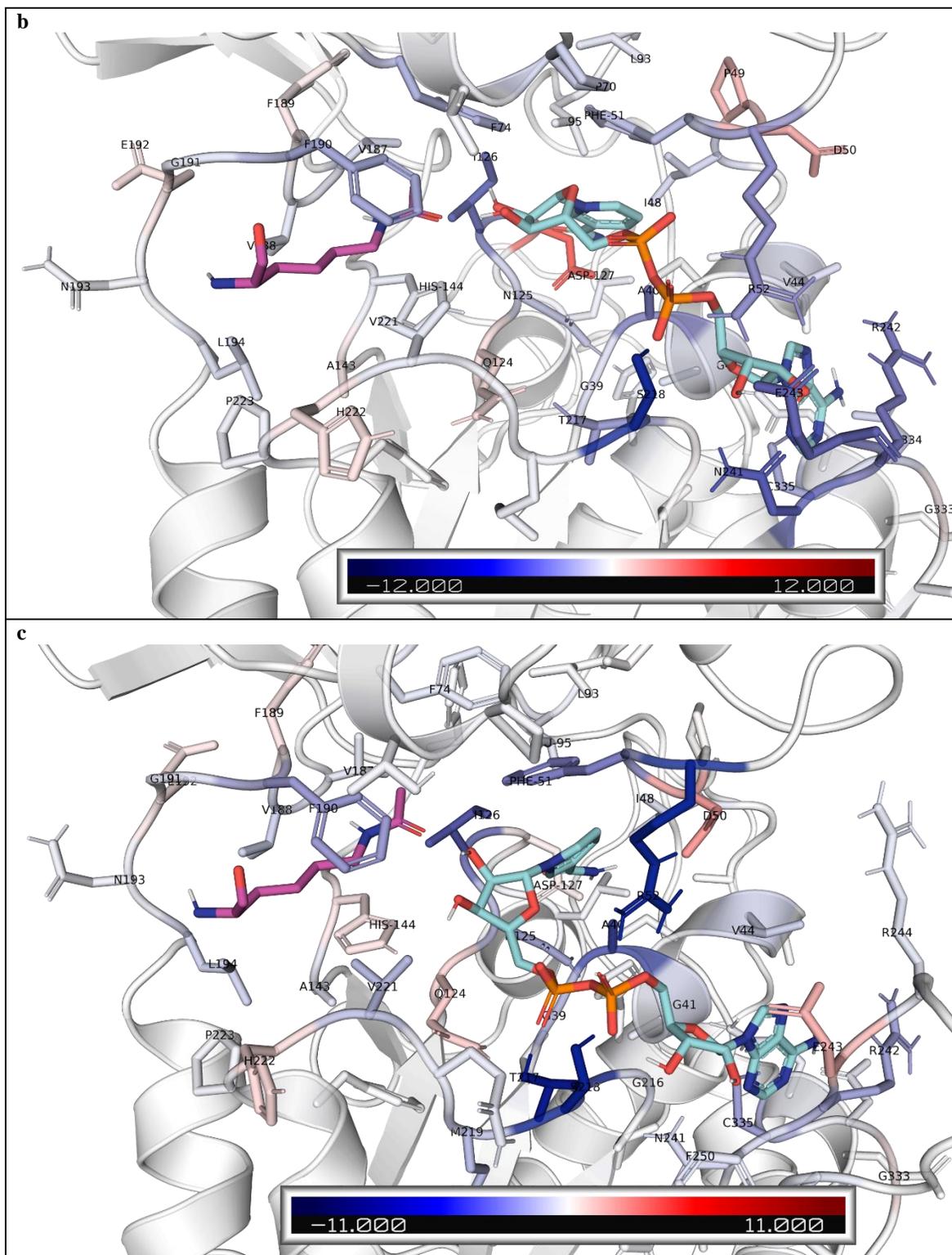
5.5.2 Análise de decomposição de energia de interação enzima-ligante via MMPBSA

Empregando a análise de decomposição de energia de interação do pacote gmx_MMPBSA, podemos aferir a contribuição energética de cada resíduo de aminoácido para a interação da enzima com seus substratos. Na Figura 35

podemos observar os valores de energia de interação calculados para cada resíduo dos modelos estudados contendo ao menos um átomo a uma distância de no máximo seis angstroms (Å) de qualquer átomo do co-substrato NAD⁺, ou do resíduo de lisina acetilada do substrato peptídico, fragmento do peptídeo p53, complexados com as enzimas. A escolha da distância de seis Å para esta análise foi feita baseada na faixa em que ocorrem interações não covalentes, sendo que é de costume considerar que ligações de hidrogênio ocorrem entre 2,5 e 3,5 Å entre os átomos pesados envolvidos (ou 1,5 a 2,5 Å se os átomos de hidrogênio forem levados em consideração) e pontes salinas ocorrem a distâncias menores que esta, por serem ligações mais fortes. Já interações de polarização induzida e de polarização instantânea são mais fracas, e assim ocorrem em faixas de 3 a 4 Å para interações do tipo *pi-stacking* ou π-π, enquanto que a faixa para as interações de van der Waals é geralmente considerada de até 4 ou 5 Å. Porém, interações mais fracas podem ocorrer a distâncias superiores a 5 Å, logo, a escolha de uma faixa de corte de 6 Å foi feita de modo a não deixar nenhum resíduo relevante de fora da análise (MILLER et al., 2012; VALDÉS-TRESANCO et al., 2021; WANG et al., 2016).

formado pela glicina 84 e 39, alanina 85 e 40 e glicina 86 e 41, também forma ligações de hidrogênio com o grupamento pirofosfato do co-substrato, enquanto que a alanina também contribui para a delimitação do bolso C e interação com o anel nicotinamida do NAD⁺, apresentando valores de energia de interação consideravelmente elevados, com a glicina 86 e 41 participando da interação com o anel adenina e delimitando o bolso A. Um resíduo notável para a interação com o anel adenina do co-substrato é a cisteína 324 e 335, sendo sua posição um resíduo maior no modelo de *L. braziliensis* (CYS 336) devido a inserção de outra cisteína na posição 327 da grande alça desordenada nesta espécie, que se mostra importante em todos os casos estudados para o reconhecimento deste anel e para a delimitação do bolso A da enzima. Curiosamente, a lisina 287 que interage com o anel adenina do NAD⁺, delimitando o bolso A na hSIRT2 é substituído por uma arginina (ARG 242) nos modelos de Sir2rp1 estudados, e em todos os casos estes resíduos se mostram interagir avidamente com o co-substrato, o que faz sentido, considerando a similaridade entre os mesmos. Também contribuindo para a delimitação do bolso A, a treonina 89 na hSIRT2 que é substituída por uma valina nas Sir2rp1 estudadas (VAL 44) formam interações com o anel adenina do co-substrato, fato este curioso, devido à alta afinidade do bolso A pela base nitrogenada em todos os casos estudados, e a diferença considerável das propriedades físicoquímicas entre estes resíduos. Outro resíduo relevante para o reconhecimento do NAD⁺ é a asparagina 286 e 241, que forma interações de hidrogênio com as hidroxilas da ribose A do co-substrato (Figuras 35, 36, S14 e S15, Tabela 5).





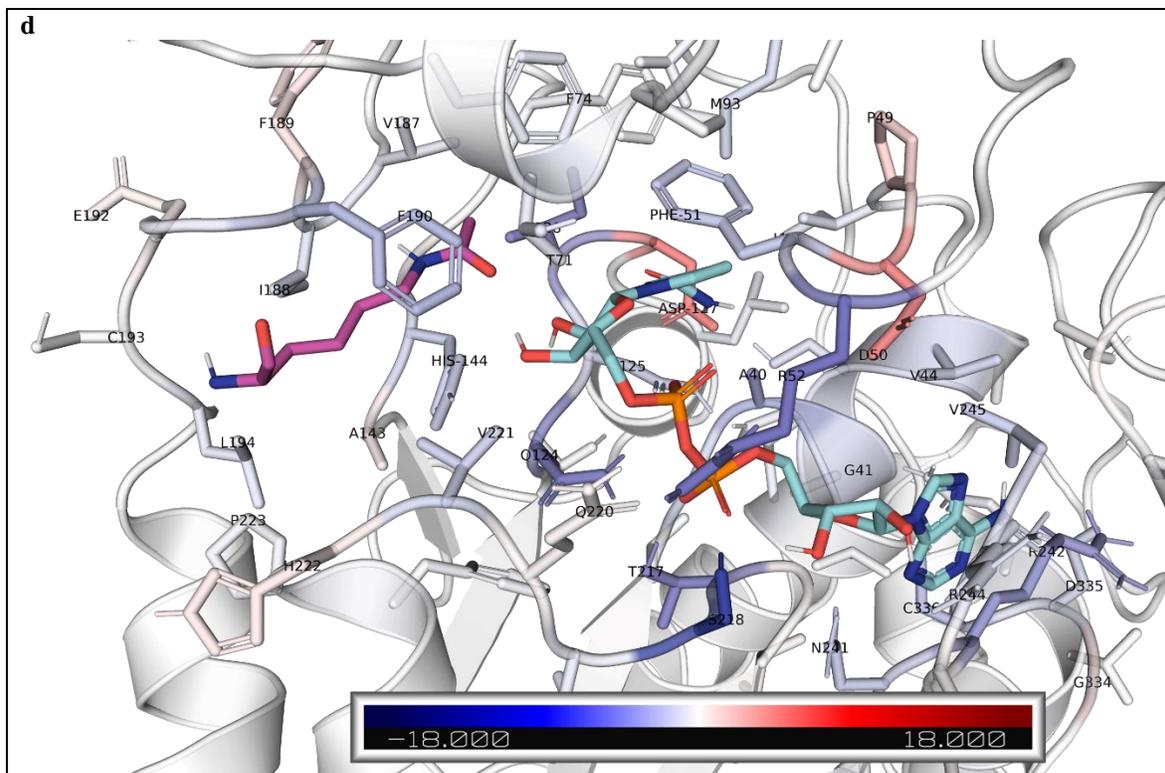


Figura 36. Ilustração da análise de decomposição de energia de interação entre os substratos naturais das Sirtuínas e os modelos refinados de hSIRT2 e Sir2rp1 de *L. infantum*, *L. major* e *L. braziliensis* realizada por meio do pacote gmX_MMPBSA.

- (a) hSIRT2
- (b) *L. infantum*
- (c) *L. major*
- (d) *L. braziliensis*

A estrutura da cadeia primária da enzima está representada em cinza claro transparente na representação do tipo *cartoon*.

Um substrato peptídico contendo um resíduo de lisina *N*-acetilada (segmento do antígeno tumoral celular p53) está representado com seus átomos de carbono da cadeia lateral de lisina em magenta, na representação do tipo bastões.

O co-substrato NAD⁺ está representado em ciano, na forma de bastões.

As cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos com ao menos um átomo a uma distância máxima de 6 Å dos substratos das enzimas são mostradas na representação do tipo bastões com seus átomos coloridos de acordo com a contribuição energética individual do resíduo em questão, numa escala onde azul escuro representa uma forte contribuição favorável à ligação aos substratos e vermelho escuro uma contribuição fortemente desfavorável.

Os átomos de nitrogênio dos substratos estão representados em azul, oxigênio em vermelho e fósforo em laranja.

A estrutura da grande alça desordenada, os demais resíduos do substrato peptídico fora a lisina acetilada e os átomos de hidrogênio não polares foram omitidos para maior clareza na visualização.

Diagramas de interação enzima-ligante do LigPlotPlus destas estruturas estão exibidos nas Figuras do anexo S14 e S15 para a interação com o NAD⁺ e com o resíduo de lisina acetilada, respectivamente.

Figura elaborada pelo autor por meio do pacote gmX_MMPBSA e do *software* PyMol.

A fenilalanina catalítica (PHE 96 e PHE 51) que interage com o grupo nicotinamida do co-substrato também apresenta sempre valores negativos. A histidina catalítica (HIS 187 e HIS 144), apresenta uma energia de interação mais fraca, chegando a se mostrar desfavorável na estimativa de energia de interação feita com o modelo de Sir2rp1 de *L. major*. Outro fato relevante é que o aspartato relevante na catálise enzimática das Sirtuínas (ASP 170 e ASP 127), que interage com o grupamento amida do anel nicotinamida do co-substrato das mesmas, apresentou energia de interação desfavorável em todos os casos. Tanto no caso da histidina catalítica, como do aspartato, o fenômeno observado pode ser explicado pela necessidade da movimentação de suas cadeias laterais para a catálise da reação, de modo que estes resíduos não poderiam interagir muito fortemente com os substratos pois isto acarretaria num comprometimento de sua flexibilidade, assim estes parecem não desempenhar um papel de ligação ou reconhecimento dos substratos, mas apenas de catálise, propriamente dita. Outros resíduos apresentando valores de energia de interação notáveis frente aos substratos naturais da enzima são a isoleucina 169 e 126, que juntamente com a fenilalanina catalítica delinea o bolso C e a divisão deste com os bolsos C-estendido e de seletividade, posicionando o grupo nicotinamida do co-substrato neste bolso e induzindo a conformação produtiva do NAD⁺. A asparagina 168 e 125, se mostrou energeticamente relevante para a interação com o grupo nicotinamida do co-substrato, contribuindo para a delineação do bolso C. A fenilalanina 235 e 190, valina 233 e 188, fenilalanina 234 e 189, glicina 236 e 191, glutamato 237 e 192, serina 238 e asparagina 193, leucina 239 e 194, valina 266 e 221, glutamina 267 e histidina 222 e prolina 268 e 223, juntamente a histidina catalítica, formam o túnel hidrofóbico no qual o resíduo de lisina acetilada se insere (Figuras 35, 36, S14 e S15, Tabela 5). Digno de nota é o fato de que os resíduos discutidos até então se mostram extremamente conservados ao longo da árvore filogenética das Sirtuínas.

Tabela 5. Comparação entre os resíduos de aminoácidos que formam os sítios de ligação aos substratos naturais dos modelos de Sirtuína estudados.

Resíduos relevantes na formação dos principais bolsos de ligação da enzima e/ou que apresentaram energia de interação na análise de decomposição com valores superiores a 0,5 kcal/mol (positivo ou negativo) frente a ao menos um dos modelos estudados estão listados.

Resíduo da hSIRT2 / contribuição energética (kcal/mol)	Resíduo homólogo na Sir2rp1 de <i>L. infantum</i> / contribuição energética (kcal/mol)	Resíduo homólogo na Sir2rp1 de <i>L. major</i> / contribuição energética (kcal/mol)	Resíduo homólogo na Sir2rp1 de <i>L. braziliensis</i> / contribuição energética (kcal/mol)	Bolso do sítio de ligação ao qual pertence o resíduo (e/ou Motivo e/ou Domínio e/ou estrutura secundária)
GLY 84 -0,34	GLY 39 -0,83	GLY 39 -1,75	GLY 39 -1,28	Bolso B (Motivo GLY-X-GLY)
ALA 85 -2,80	ALA 40 -3,41	ALA 40 -3,98	ALA 40 -2,78	Bolsos B e C (Motivo GLY-X-GLY)
GLY 86 -0,91	GLY 41 -0,70	GLY 41 -0,77	GLY 41 1,21	Bolso B (Motivo GLY-X-GLY)
ILE 87 -0,20	ALA 42 -0,63	ALA 42 -0,36	ALA 42 -0,62	Hélice α 2
SER 88 -0,19	SER 43 0,01	SER 43 -0,11	SER 43 -0,87	Bolso C (Hélice α 2)
THR 89 -1,35	VAL 44 -0,82	VAL 44 -0,87	VAL 44 -1,20	Bolso A (Hélice α 2)
ILE 93 -0,11	ILE 48 -1,08	ILE 48 -0,43	ILE 48 -0,54	Bolso C (Alça L1)
PRO 94 -0,05	PRO 49 1,70	PRO 49 0,10	PRO 49 1,40	Bolsos C e C-estendido (Alça L1)
ASP 95 1,70	ASP 50 1,87	ASP 50 2,07	ASP 50 3,80	Bolsos C, A e B (Alça L1)
PHE 96 -1,07	PHE 51 -1,59	PHE 51 -2,73	PHE 51 -1,82	Bolsos C e C-estendido (Resíduo relevante na catálise, Alça L1)
ARG 97 -9,19	ARG 52 -2,47	ARG 52 -5,35	ARG 52 -4,77	Bolso B (Alça L1)

PRO 115 -0,06	PRO 70 -1,00	PRO 70 -0,14	PRO 70 -0,11	Bolso C-estendido (Módulo Helicoidal do Domínio pequeno)
GLU 116 1,93	THR 71 -0,14	THR 71 -0,17	THR 71 -0,55	Hélice α 4 do Módulo Helicoidal do Domínio pequeno
PHE 119 -0,88	PHE 74 -1,77	PHE 74 -0,41	PHE 74 -0,56	Bolso C-estendido (Módulo Helicoidal do Domínio pequeno)
LEU 138 -0,06	LEU 93 -0,48	LEU 93 -0,03	MET 93 -0,92	Bolsos C- estendido/de Seletividade (Módulo Helicoidal do Domínio pequeno)
TYR 139 N.A.	LEU 95 -0,32	LEU 95 -0,38	LEU 95 -0,19	Bolsos C-estendido e de Seletividade (Alça L2)
GLN 167 -0,55	GLN 124 0,80	GLN 124 0,97	GLN 124 -4,22	Bolso B (Alça L3)
ASN 168 -1,86	ASN 125 -1,29	ASN 125 -1,69	ASN 125 -1,23	Bolso C (Alça L3)
ILE 169 -1,97	ILE 126 -3,87	ILE 126 -3,47	ILE 126 -3,69	Bolso C (Alça L3)
ASP 170 0,72	ASP 127 4,42	ASP 127 0,32	ASP 127 3,90	Bolso C (Resíduo relevante na catálise, Alça L3)
ALA 186 0,24	ALA 143 0,43	ALA 143 -0,44	ALA 143 0,63	Bolso Ac-K (Alça L4)
HIS 187 -1,89	HIS 144 -0,33	HIS 144 0,49	HIS 144 -1,51	Bolso Ac-K (Resíduo relevante na catálise, Alça L4)
ILE 232 -1,62	VAL 187 -0,78	VAL 187 -0,34	VAL 187 -0,44	Bolsos Ac-K e de Seletividade (Alça L5)
VAL 233 -0,59	VAL 188 -0,49	VAL 188 -0,90	ILE 188 -0,81	Bolso Ac-K (Alça L5)

PHE 234 0,04	PHE 189 0,43	PHE 189 0,50	PHE 189 0,81	Bolsos Ac-K e de Seletividade (Alça L5)
PHE 235 -2,03	PHE 190 -1,89	PHE 190 -2,11	PHE 190 -2,26	Bolso Ac-K (Alça L5)
GLY 236 -0,76	GLY 191 -0,59	GLY 191 -0,69	GLY 191 -0,66	Bolso Ac-K (Alça L5)
GLU 237 0,34	GLU 192 0,61	GLU 192 0,47	GLU 192 0,41	Bolso Ac-K (Alça L5)
SER 238 -0,19	ASN 193 -0,20	ASN 193 -0,24	CYS 193 -0,16	Bolso Ac-K (Alça L5)
LEU 239 -0,61	LEU 194 -0,68	LEU 194 -0,89	LEU 194 -0,64	Bolso Ac-K (Alça L5)
GLY 261 -0,86	GLY 216 0,20	GLY 216 -0,84	GLY 216 0,17	Bolso A (Alça L6)
THR 262 -7,49	THR 217 -2,18	THR 217 -6,70	THR 217 -3,90	Bolso B (Alça L6)
SER 263 -7,53	SER 218 -5,53	SER 218 -6,07	SER 218 -6,73	Bolso B (Alça L6)
LEU 264 -1,11	MET 219 -0,26	MET 219 -1,44	LEU 219 -0,57	Bolso B (Alça L6)
VAL 266 -0,86	VAL 221 -0,41	VAL 221 -1,40	VAL 221 -1,42	Bolsos Ac-K e B (Alça L6)
GLN 267 0,68	HIS 222 0,57	HIS 222 0,77	HIS 222 0,69	Bolso Ac-K (Alça L6)
PRO 268 -0,32	PRO 223 -0,25	PRO 223 -0,16	PRO 223 -0,29	Bolso Ac-K (Alça L6)
ASN 286 -2,16	ASN 241 -4,00	ASN 241 -0,78	ASN 241 -1,53	Bolso A (Alça L7)
LYS 287 -2,48	ARG 242 -3,24	ARG 242 -1,96	ARG 242 -3,27	Bolso A (Alça L7)
GLU 288 -0,02	GLU 243 -3,24	GLU 243 1,56	GLU 243 0,13	Bolso A (Alça L7)
LYS 289 -0,02	ARG 244 -0,32	ARG 244 -0,41	ARG 244 -0,90	Bolso A (Alça L7)
ALA 290 -0,17	VAL 245 -0,10	VAL 245 N.A.	VAL 245 -1,52	Bolso A (Alça L7)

GLY 322 -0,06	GLY 333 0,48	GLY 333 0,56	GLY 334 0,94	Bolso A (Alça final da Dobra de Rossmann, L8)
GLU 323 -0,34	ASP 334 -1,06	ASP 334 -0,28	ASP 335 -0,93	Bolso A (Alça final da Dobra de Rossmann, L8)
CYS 324 -0,92	CYS 335 -2,12	CYS 335 -2,00	CYS 336 -2,06	Bolso A (Hélice α 13)
ASP 325 1,67	GLN 336 -0,21	GLN 336 -0,26	GLN 337 -0,33	Bolso A (Hélice α 13)

Alguns resíduos em posições homólogas do enovelamento das enzimas diferem entre o modelo de hSIRT2 e os modelos estudados de Sir2rp1, porém nem todos poderiam ser explorados no planejamento de fármacos seletivos. Primeiramente, não consideramos os bolsos A e B da enzima, como já discutido anteriormente, devido à inibição competitiva com o NAD⁺ ser difícil devido a afinidade elevada por este pelas enzimas que usam este cofator somado a sua concentração intracelular relativamente elevada e ainda ao fato de que tal agente inibiria todas, ou quase todas, as enzimas que usam este cofator de maneira não seletiva, o que reduziria a sua aplicabilidade terapêutica. Na hélice α 2 da enzima ocorre uma substituição de uma isoleucina por uma alanina (ILE 87 vs. ALA 42), porém este resíduo encontra-se na face da hélice α oposta ao bolso B da enzima, apontando para a direção oposta aos sítios de ligação aos substratos das Sirtuínas, logo, não se mostra de grande interesse no planejamento de fármacos. Há a substituição de um glutamato por uma treonina (GLU 116 vs. THR 71) no módulo helicoidal do domínio pequeno, na hélice α 4, que é uma substituição de resíduos com propriedades consideravelmente distintas, porém, este resíduo não participa da formação de nenhum dos bolsos da enzima, de modo que dificilmente ele poderia ser explorado no planejamento de fármacos. No bolso Ac-K da enzima, ocorre a substituição de uma serina por uma asparagina (SER 238 vs. ASN 193) e por uma cisteína, na enzima de *L. braziliensis* (CYS 193), e de uma glutamina por uma histidina (GLN 267 vs. HIS 222), porém ambos estes resíduos ocorrem na entrada do túnel hidrofóbico onde o resíduo de lisina acetilada do substrato se insere, e têm

suas cadeias laterais voltadas para fora do bolso, expostas ao solvente. Na prática, estes resíduos participam da interação com os demais resíduos dos substratos peptídicos da enzima, reconhecendo-os e os estabilizando na sua interação com a face da enzima, não sendo muito úteis para o planejamento de pequenas moléculas que inibiriam a enzima interagindo com seu sítio ativo diretamente (Figuras 35, 36, S14 e S15, Tabela 5).

Duas alterações notáveis que ocorrem entre a hSIRT2 e as Sir2rp1 estudadas neste trabalho poderiam servir como base para o planejamento de fármacos seletivos. A primeira é a substituição de uma isoleucina por uma valina (ILE 232 vs. VAL 187), que ocorre bem na interface entre os bolsos Ac-K, C-estendido e de seletividade da enzima que, ainda que apresentem propriedades físicoquímicas bastante similares, possuem volumes consideravelmente diferentes, o que poderia ser explorado no desenho de novos inibidores competitivos da enzima (Figuras 35, 36, S14 e S15, Tabela 5). A segunda é a troca de uma tirosina por uma leucina (TYR 139 vs. LEU 95), que ocorre na interface entre os bolsos C-estendido e de seletividade da enzima que, apesar de serem ambos apolares, apresentam não apenas volumes e formatos bastante distintos, mas também a tirosina possui tanto a capacidade de formar interações de hidrogênio, como elétrons π disponíveis para a formação de interações π - π ou π -cátion, o que poderia ser explorado no planejamento de moléculas que se insiram nestes bolsos. Este resíduo não teve sua contribuição energética calculada no modelo de hSIRT2 pois se encontrava a mais de 6 Å dos substratos da enzima. A estrutura dos sítios de ligação aos substratos naturais das Sirtuínas é extremamente conservada, porém mutações ocorrem com maior frequência nos bolsos C-estendido e de seletividade, daí o nome deste último. Outras substituições não exploradas neste trabalho por estarem distantes dos substratos naturais das enzimas e, portanto, não apresentarem contribuições energéticas significativas para a ligação aos mesmos podem ser exploradas no planejamento de novos agentes seletivos frente a estas enzimas.

No mais, todos os resíduos explorados neste trabalho não apresentam nenhuma substituição entre as espécies *L. infantum* e *L. major*, apenas a Sir2rp1 de *L. braziliensis* apresenta mutações com relação às duas anteriores, sendo elas a substituição da leucina 93 por uma metionina, a troca da valina 188 por uma

isoleucina, a substituição da asparagina 193 por uma cisteína e a troca da metionina 219 por uma leucina, esta última tornando esta posição do modelo de *L. braziliensis* curiosamente igual a hSIRT2. Apenas uma das substituições exploradas neste estudo parece fazer diferença significativa na energia de interação com os ligantes naturais das enzimas, sendo ela a troca do glutamato 116 da hSIRT2 pela treonina 71 nos parasitas, provavelmente por conta da repulsão eletrostática entre as cargas negativas do glutamato e aquelas do grupamento pirofosfato do NAD⁺, não sendo assim de grande interesse para o planejamento de fármacos (Figuras 35, 36, S14 e S15, Tabela 5).

5.5.3 Análise do tamanho dos bolsos de ligação das enzimas realizada via o servidor CavityPlus

Uma análise realizada no servidor CavityPlus (Figura S16), nos mostrou que dentre as enzimas estudadas, a hSIRT2 apresenta o maior volume e área superficial dos bolsos que compõem os sítios de ligação de seus substratos naturais, com um volume de 2284.62 Å³ e uma área superficial de 1782.50 Å². Já o modelo de Sir2rp1 de *L. braziliensis* apresentou os menores valores, com um volume de 1050.12 Å³, e uma área superficial de 1106.00 Å². Os modelos de *L. infantum* e *L. major* apresentaram valores intermediários e próximos entre si (valores de volume de 1828.62 Å³ e 1984.62 Å³ e de área superficial de 1374.75 Å² e 1451.50 Å², respectivamente), o que é condizente com a sua extrema proximidade estrutural. É interessante notar que o servidor CavityPlus apenas reconheceu o bolso C-estendido no caso do modelo de hSIRT2, o que justifica os valores de volume e área superficial maiores que os demais modelos (Figuras S16a vs. S16b-d). Este resultado pode indicar que inibidores do tipo SirReal, que ligam-se aos bolsos C-estendido e de seletividade não são adequados para a inibição de Sirtuínas de Tripanosomatídeos.

6. CONCLUSÕES

Primeiramente, um estudo de revisão bibliográfica sobre a estrutura da Sirtuína 2 humana, seu mecanismo catalítico e os mecanismos de inibição de seus inibidores enzimáticos foi conduzido, contribuindo para o entendimento dos vários modos de ligação possíveis para inibidores desta enzima, seus pontos de interação com a mesma e os resíduos de aminoácidos que participam da interação com os mesmos, auxiliando assim o desenvolvimento racional de novos agentes frente a este alvo biomolecular.

Foi desenvolvida e validada uma metodologia para a Modelagem e Dinâmica Molecular de enzimas da família da Sirtuína 2 e proteínas relacionadas, e para a análise estrutural comparativa entre diferentes enzimas da família e diferentes ligantes das mesmas, culminando assim em um *framework in silico* para a busca de novos ligantes de Sirtuína 2, possibilitando o desenvolvimento mais eficiente de candidatos a fármacos tendo esta enzima como alvo biomolecular.

Além do mais, os estudos realizados neste projeto, envolvendo a Modelagem Comparativa das enzimas *Sirtuin 2 related protein 1* das espécies *L. infantum*, *L. major*, *L. braziliensis* e da Sirtuína 2 humana, as simulações de Dinâmica Molecular conduzidas com os modelos enzimáticos construídos e validados complexados com seus ligantes naturais, as análises de energia de interação feitas entre os modelos enzimáticos e seus ligantes, e a comparação entre suas estruturas, nos fornece uma base teórica para a busca de novos inibidores de Sirtuína 2 mais seletivos e potentes contra os homólogos parasitários, abrindo caminho para o desenvolvimento de candidatos a fármacos leishmanicidas mais seguros e eficazes.

7. BIBLIOGRAFIA

ABRAHAM, M. et al. GROMACS 2023.1 Manual. 21 abr. 2023.

ABRAHAM, M. J. et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v. 1–2, p. 19–25, set. 2015.

ARMONI, M. et al. FOXO1 Represses Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ 1 and - γ 2 Gene Promoters in Primary Adipocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 29, p. 19881–19891, jul. 2006.

AVALOS, J. L. et al. Structure of a Sir2 Enzyme Bound to an Acetylated p53 Peptide. **Molecular Cell**, v. 10, n. 3, p. 523–535, set. 2002.

BATES, P. A. Revising Leishmania's life cycle. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 5, p. 529–530, 24 abr. 2018.

BERMAN, H. M. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 1 jan. 2000.

BHEDA, P. et al. The Substrate Specificity of Sirtuins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 85, n. 1, p. 405–429, 2 jun. 2016.

BIOVIA, D. S. **Discovery Studio**. San Diego: Dassault Systèmes BIOVIA, Dassault Systèmes, , 2023.

BLANDER, G.; GUARENTE, L. The Sir2 Family of Protein Deacetylases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 73, n. 1, p. 417–435, jun. 2004.

BLASL, A.-T. et al. Post-translational lysine ac(et)ylation in health, ageing and disease. **Biological Chemistry**, v. 403, n. 2, p. 151–194, 27 jan. 2022.

CAO, D. et al. Structural basis for allosteric, substrate-dependent stimulation of SIRT1 activity by resveratrol. **Genes & Development**, v. 29, n. 12, p. 1316–1325, 15 jun. 2015.

CASSANDRI, M. et al. Zinc-finger proteins in health and disease. **Cell Death Discovery**, v. 3, n. 1, p. 17071, 13 nov. 2017.

CDC, C. **CDC - DPDx - Leishmaniasis**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>>. Acesso em: 4 out. 2023.

CHEN, B. et al. The chemical biology of sirtuins. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 15, p. 5246–5264, 2015.

CHEN, X.; LU, W.; WU, D. Sirtuin 2 (SIRT2): Confusing Roles in the Pathophysiology of Neurological Disorders. **Frontiers in Neuroscience**, v. 15, p. 614107, 24 maio 2021.

DE ALMEIDA, L. et al. Nanotechnological Strategies for Treatment of Leishmaniasis—A Review. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 13, n. 2, p. 117–133, 1 fev. 2017.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M. U.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, p. 1–18, 2010.

DEANS, C.; MAGGERT, K. A. What Do You Mean, “Epigenetic”? **Genetics**, v. 199, n. 4, p. 887–896, 1 abr. 2015.

DISCH, J. S. et al. Discovery of Thieno[3,2-*d*]pyrimidine-6-carboxamides as Potent Inhibitors of SIRT1, SIRT2, and SIRT3. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 9, p. 3666–3679, 9 maio 2013.

DNDI, DND. **Symptoms, transmission, and current treatments for visceral leishmaniasis | DNDi**. Disponível em: <<https://dndi.org/diseases/visceral-leishmaniasis/facts/>>. Acesso em: 4 out. 2023a.

DNDI, DND. **Symptoms, transmission, and current treatments for cutaneous leishmaniasis | DNDi**. Disponível em: <<https://dndi.org/diseases/cutaneous-leishmaniasis/facts/>>. Acesso em: 4 out. 2023b.

DRYDEN, S. C. et al. Role for Human SIRT2 NAD-Dependent Deacetylase Activity in Control of Mitotic Exit in the Cell Cycle. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, n. 9, p. 3173–3185, 1 maio 2003.

DUAN, L.; LIU, X.; ZHANG, J. Z. H. Interaction Entropy: A New Paradigm for Highly Efficient and Reliable Computation of Protein–Ligand Binding Free Energy. **Journal of the American Chemical Society**, v. 138, n. 17, p. 5722–5728, 4 maio 2016.

EKBERG, V.; RYDE, U. On the Use of Interaction Entropy and Related Methods to Estimate Binding Entropies. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 17, n. 8, p. 5379–5391, 10 ago. 2021.

ENGELS, D.; ZHOU, X.-N. Neglected tropical diseases: an effective global response to local poverty-related disease priorities. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 9, n. 1, p. 10, dez. 2020.

FANG, Y.; TANG, S.; LI, X. Sirtuins in Metabolic and Epigenetic Regulation of Stem Cells. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 30, n. 3, p. 177–188, mar. 2019.

FELDMAN, J. L. et al. Kinetic and Structural Basis for Acyl-Group Selectivity and NAD⁺ Dependence in Sirtuin-Catalyzed Deacetylation. **Biochemistry**, v. 54, n. 19, p. 3037–3050, 19 maio 2015.

FERREIRA, G. M. **Busca por inibidores seletivos de Sirtuína 2 de *T. cruzi* empregando técnicas de planejamento de fármacos baseada na estrutura do receptor**. Doutorado Direto em Toxicologia e Análises Toxicológicas—São Paulo: Universidade de São Paulo, 15 mar. 2019.

- FERREIRA, G. M. et al. Trypanosoma cruzi Sirtuin 2 as a Relevant Druggable Target: New Inhibitors Developed by Computer-Aided Drug Design. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 3, p. 428, 10 mar. 2023.
- FINNIN, M. S.; DONIGIAN, J. R.; PAVLETICH, N. P. Structure of the histone deacetylase SIRT2. **Nature Structural Biology**, v. 8, n. 7, p. 621–625, 1 jul. 2001.
- FISCHER, F. et al. Sirt5 Deacylation Activities Show Differential Sensitivities to Nicotinamide Inhibition. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. e45098, 19 set. 2012.
- FRISCH, M. J. et al. **Gaussian 09**. Gaussian, Inc., Wallingford CT, , 2009.
- GARG, G. et al. Promising drug discovery strategies for sirtuin modulators: what lessons have we learnt? **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 16, n. 8, p. 915–927, 3 ago. 2021.
- GERTZ, M. et al. Ex-527 inhibits Sirtuins by exploiting their unique NAD⁺-dependent deacetylation mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 30, 23 jul. 2013.
- GLAAB, E. Building a virtual ligand screening pipeline using free software: a survey. **Briefings in Bioinformatics**, v. 17, n. 2, p. 352–366, mar. 2016.
- GOMES, R. A. **Planejamento de inibidores seletivos de sirtuína 2 de tripanossomatídeos baseado em fragmentos moleculares (FBDD)**. Doutorado Direto em Insumos Farmacêuticos—São Paulo: Universidade de São Paulo, 4 fev. 2021.
- GOMES, R. A. et al. Parasitic sirtuin 2 as an opportunity in drug discovery. **Future Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 16, p. 1397–1409, ago. 2021.
- GROZINGER, C. M.; SCHREIBER, S. L. Deacetylase Enzymes. **Chemistry & Biology**, v. 9, n. 1, p. 3–16, jan. 2002.
- GUJRAL, P. et al. Histone acetylation and the role of histone deacetylases in normal cyclic endometrium. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 18, n. 1, p. 84, dez. 2020.
- HAIGIS, M. C.; SINCLAIR, D. A. Mammalian Sirtuins: Biological Insights and Disease Relevance. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 5, n. 1, p. 253–295, 1 jan. 2010.
- HIRATSUKA, M. et al. Proteomics-based identification of differentially expressed genes in human gliomas: down-regulation of SIRT2 gene. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 309, n. 3, p. 558–566, set. 2003.
- HOFF, K. G. et al. Insights into the Sirtuin Mechanism from Ternary Complexes Containing NAD⁺ and Acetylated Peptide. **Structure**, v. 14, n. 8, p. 1231–1240, ago. 2006.
- HOGG, S. J. et al. Targeting the epigenetic regulation of antitumour immunity. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 19, n. 11, p. 776–800, nov. 2020.

HONG, J. Y. et al. A Glycoconjugated SIRT2 Inhibitor with Aqueous Solubility Allows Structure-Based Design of SIRT2 Inhibitors. **ACS Chemical Biology**, v. 14, n. 8, p. 1802–1810, 16 ago. 2019.

HOOFT, R. W. W. et al. Errors in protein structures. **Nature**, v. 381, n. 6580, p. 272–272, maio 1996.

HOUTKOOOPER, R. H.; PIRINEN, E.; AUWERX, J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 4, p. 225–238, abr. 2012.

HUANG, J.; MACKERELL, A. D. CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. **Journal of Computational Chemistry**, v. 34, n. 25, p. 2135–2145, 30 set. 2013.

HUANG, W.; LIN, Z.; VAN GUNSTEREN, W. F. Validation of the GROMOS 54A7 Force Field with Respect to β -Peptide Folding. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 7, n. 5, p. 1237–1243, 10 maio 2011.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: Visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, v. 14, n. 1, p. 33–38, fev. 1996.

HUTCHINSON, O. C. et al. Variant Surface Glycoprotein gene repertoires in *Trypanosoma brucei* have diverged to become strain-specific. **BMC Genomics**, v. 8, n. 1, p. 234, dez. 2007.

INOUE, T. et al. SIRT2, a tubulin deacetylase, acts to block the entry to chromosome condensation in response to mitotic stress. **Oncogene**, v. 26, n. 7, p. 945–957, 15 fev. 2007a.

INOUE, T. et al. The Molecular Biology of Mammalian SIRT Proteins: SIRT2 Functions on Cell Cycle Regulation. **Cell Cycle**, v. 6, n. 9, p. 1011–1018, 2 maio 2007b.

JANSON, G.; PAIARDINI, A. PyMod 3: a complete suite for structural bioinformatics in PyMOL. **Bioinformatics**, v. 37, n. 10, p. 1471–1472, 16 jun. 2021.

JIN, J. et al. SIRT2 Reverses 4-Oxononanoyl Lysine Modification on Histones. **Journal of the American Chemical Society**, v. 138, n. 38, p. 12304–12307, 28 set. 2016.

JING, E.; GESTA, S.; KAHN, C. R. SIRT2 Regulates Adipocyte Differentiation through FoxO1 Acetylation/Deacetylation. **Cell Metabolism**, v. 6, n. 2, p. 105–114, ago. 2007.

JING, H. et al. A SIRT2-Selective Inhibitor Promotes c-Myc Oncoprotein Degradation and Exhibits Broad Anticancer Activity. **Cancer Cell**, v. 29, n. 3, p. 297–310, mar. 2016.

JUMPER, J. et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, v. 596, n. 7873, p. 583–589, 26 ago. 2021.

- JUNG, C. J. et al. Epigenetic Modulation of miR-122 Facilitates Human Embryonic Stem Cell Self-Renewal and Hepatocellular Carcinoma Proliferation. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, p. e27740, 28 nov. 2011.
- KNYPHAUSEN, P. et al. Insights into Lysine Deacetylation of Natively Folded Substrate Proteins by Sirtuins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 28, p. 14677–14694, jul. 2016.
- KUDO, N. et al. Identification of a novel small molecule that inhibits deacetylase but not defatty-acylase reaction catalysed by SIRT2. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 373, n. 1748, p. 20170070, 5 jun. 2018.
- LARKIN, M. A. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947–2948, 1 nov. 2007.
- LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283–291, 1 abr. 1993.
- LASKOWSKI, R. A.; SWINDELLS, M. B. LigPlot+: Multiple Ligand–Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 10, p. 2778–2786, 24 out. 2011.
- LEE, C.; SU, B.-H.; TSENG, Y. J. Comparative studies of AlphaFold, RoseTTAFold and Modeller: a case study involving the use of G-protein-coupled receptors. **Briefings in Bioinformatics**, v. 23, n. 5, p. bbac308, 20 set. 2022.
- LEITE, J. A. et al. Sirtuins as pharmacological targets in neurodegenerative and neuropsychiatric disorders. **British Journal of Pharmacology**, v. 179, n. 8, p. 1496–1511, abr. 2022.
- LEMKUL, J. From Proteins to Perturbed Hamiltonians: A Suite of Tutorials for the GROMACS-2018 Molecular Simulation Package [Article v1.0]. **Living Journal of Computational Molecular Science**, v. 1, n. 1, 2019.
- LEMKUL, J. A.; BEVAN, D. R. Assessing the Stability of Alzheimer’s Amyloid Protofibrils Using Molecular Dynamics. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 4, p. 1652–1660, 2010.
- LI, G.; TIAN, Y.; ZHU, W.-G. The Roles of Histone Deacetylases and Their Inhibitors in Cancer Therapy. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 576946, 29 set. 2020.
- LIMA, E. J. C. et al. Insights into Newly Approved Drugs from a Medicinal Chemistry Perspective. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 16, p. 2227–2248, 23 nov. 2021.
- LINDING, R. et al. Protein Disorder Prediction. **Structure**, v. 11, n. 11, p. 1453–1459, nov. 2003.

- LINDORFF-LARSEN, K. et al. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 78, n. 8, p. 1950–1958, jun. 2010.
- MADEIRA, F. et al. Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. W1, p. W276–W279, 5 jul. 2022.
- MELLINI, P. et al. Potent mechanism-based sirtuin-2-selective inhibition by an in situ-generated occupant of the substrate-binding site, “selectivity pocket” and NAD⁺-binding site. **Chemical Science**, v. 8, n. 9, p. 6400–6408, 2017.
- MILLER, B. R. et al. *MMPBSA.py*: An Efficient Program for End-State Free Energy Calculations. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 8, n. 9, p. 3314–3321, 11 set. 2012.
- MILNE, J. C. et al. Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. **Nature**, v. 450, n. 7170, p. 712–716, 29 nov. 2007.
- MITTAL, N.; MUTHUSWAMI, R.; MADHUBALA, R. The mitochondrial SIR2 related protein 2 (SIR2RP2) impacts *Leishmania donovani* growth and infectivity. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 5, p. e0005590, 11 maio 2017.
- MONIOT, S. et al. Development of 1,2,4-Oxadiazoles as Potent and Selective Inhibitors of the Human Deacetylase Sirtuin 2: Structure–Activity Relationship, X-ray Crystal Structure, and Anticancer Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 6, p. 2344–2360, 23 mar. 2017.
- MONIOT, S.; SCHUTKOWSKI, M.; STEEGBORN, C. Crystal structure analysis of human Sirt2 and its ADP-ribose complex. **Journal of Structural Biology**, v. 182, n. 2, p. 136–143, maio 2013.
- MORETTI, N. S. et al. Characterization of *Trypanosoma cruzi* Sirtuins as Possible Drug Targets for Chagas Disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 8, p. 4669–4679, ago. 2015.
- NGUYEN, G. T. T. et al. Structures of human sirtuin 3 complexes with ADP-ribose and with carba-NAD⁺ and SRT1720: binding details and inhibition mechanism. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 69, n. 8, p. 1423–1432, 1 ago. 2013.
- NIELSEN, A. L. et al. Mechanism-based inhibitors of SIRT2: structure–activity relationship, X-ray structures, target engagement, regulation of α -tubulin acetylation and inhibition of breast cancer cell migration. **RSC Chemical Biology**, v. 2, n. 2, p. 612–626, 2021.
- NORTH, B. J. et al. The Human Sir2 Ortholog, SIRT2, Is an NAD⁺-Dependent Tubulin Deacetylase. **Molecular Cell**, v. 11, n. 2, p. 437–444, fev. 2003.
- NORTH, B. J. et al. SIRT 2 induces the checkpoint kinase BubR1 to increase lifespan. **The EMBO Journal**, v. 33, n. 13, p. 1438–1453, jul. 2014.

NORTH, B. J.; VERDIN, E. Mitotic Regulation of SIRT2 by Cyclin-dependent Kinase 1-dependent Phosphorylation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 27, p. 19546–19555, jul. 2007.

OGDEN, G. B.; MELBY, P. C. Leishmania. Em: **Encyclopedia of Microbiology**. [s.l.] Elsevier, 2009. p. 663–673.

OMS, O. **Neglected tropical diseases -- GLOBAL**. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases#tab=tab_1>. Acesso em: 4 out. 2023a.

OMS, O. **Neglected Tropical Diseases progress dashboard 2011-2020**. Disponível em: <<https://www.who.int/teams/control-of-neglected-tropical-diseases/overview/progress-dashboard-2011-2020>>. Acesso em: 4 out. 2023b.

OMS, O. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 4 out. 2023c.

OMS, O. **Number of cases of visceral leishmaniasis reported**. Disponível em: <<https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/number-of-cases-of-visceral-leishmaniasis-reported>>. Acesso em: 4 out. 2023d.

OMS, O. **Number of cases of cutaneous leishmaniasis reported**. Disponível em: <<https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/number-of-cases-of-cutaneous-leishmaniasis-reported>>. Acesso em: 4 out. 2023e.

PANNEK, M. et al. Crystal structures of the mitochondrial deacylase Sirtuin 4 reveal isoform-specific acyl recognition and regulation features. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1513, 15 nov. 2017.

PAVELITES, J. J. et al. A molecular mechanics force field for NAD⁺ NADH, and the pyrophosphate groups of nucleotides. **Journal of Computational Chemistry**, v. 18, n. 2, p. 221–239, 30 jan. 1997.

PENTEADO, A. B. et al. Human sirtuin 2 inhibitors, their mechanisms and binding modes. **Future Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 3, p. 291–311, fev. 2023.

PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, out. 2004.

PRIETO-MARTÍNEZ, F. D. et al. Computational Drug Design Methods—Current and Future Perspectives. Em: **In Silico Drug Design**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 19–44.

QUINTI, L. et al. SIRT2- and NRF2-Targeting Thiazole-Containing Compound with Therapeutic Activity in Huntington's Disease Models. **Cell Chemical Biology**, v. 23, n. 7, p. 849–861, jul. 2016.

RACK, J. G. M. et al. Constitutive Nuclear Localization of an Alternatively Spliced Sirtuin-2 Isoform. **Journal of Molecular Biology**, v. 426, n. 8, p. 1677–1691, abr. 2014.

RAMACHANDRAN, G. N.; RAMAKRISHNAN, C.; SASISEKHARAN, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. **Journal of Molecular Biology**, v. 7, n. 1, p. 95–99, jul. 1963.

RAMAKRISHNAN, G. et al. Sirt2 Deacetylase Is a Novel AKT Binding Partner Critical for AKT Activation by Insulin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 9, p. 6054–6066, fev. 2014.

RINGEL, A. E.; ROMAN, C.; WOLBERGER, C. Alternate deacylating specificities of the archaeal sirtuins Sir2Af1 and Sir2Af2. **Protein Science**, v. 23, n. 12, p. 1686–1697, dez. 2014.

ROBERTSON, M. J.; TIRADO-RIVES, J.; JORGENSEN, W. L. Improved Peptide and Protein Torsional Energetics with the OPLS-AA Force Field. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 11, n. 7, p. 3499–3509, 14 jul. 2015.

ROMERO-MEZA, G.; MUGNIER, M. R. Trypanosoma brucei. **Trends in Parasitology**, v. 36, n. 6, p. 571–572, jun. 2020.

RONIN, C. et al. The crystal structure of the Leishmania infantum Silent Information Regulator 2 related protein 1: Implications to protein function and drug design. **PLOS ONE**, v. 13, n. 3, p. e0193602, 15 mar. 2018.

RUMPF, T. et al. Selective Sirt2 inhibition by ligand-induced rearrangement of the active site. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 6263, 12 fev. 2015a.

RUMPF, T. et al. Seeding for sirtuins: microseed matrix seeding to obtain crystals of human Sirt3 and Sirt2 suitable for soaking. **Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications**, v. 71, n. 12, p. 1498–1510, 1 dez. 2015b.

SACCONNAY, L. et al. Structural insights of SIR2rp3 proteins as promising biotargets to fight against Chagas disease and leishmaniasis. **Molecular BioSystems**, v. 9, n. 9, p. 2223, 2013.

SAKHAROV, D. V.; LIM, C. Zn Protein Simulations Including Charge Transfer and Local Polarization Effects. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 13, p. 4921–4929, 1 abr. 2005.

SAKHAROV, D. V.; LIM, C. Force fields including charge transfer and local polarization effects: Application to proteins containing multi/heavy metal ions. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 2, p. 191–202, 30 jan. 2009.

SAMANTA, S. et al. Epigenetic dysfunctional diseases and therapy for infection and inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1863, n. 2, p. 518–528, fev. 2017.

SAVIOLI, L. **Neglected Tropical Diseases (NTDs): Yesterday's drain, tomorrow's gain for global health.** . Em: PAPER PRESENTED AT THE WHO: PRESENTATION AT THE AMERICAN SOCIETY FOR TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE. , 2019.

SCHEMIES, J. et al. NAD⁺-dependent histone deacetylases (sirtuins) as novel therapeutic targets: NAD⁺-DEPENDENT HISTONE DEACETYLASES. **Medicinal Research Reviews**, v. 30, n. 6, p. 861–889, nov. 2010.

SCHIEDEL, M. et al. Aminothiazoles as Potent and Selective Sirt2 Inhibitors: A Structure–Activity Relationship Study. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 4, p. 1599–1612, 25 fev. 2016.

SCHRÖDINGER, LLC. **Pymol Molecular Graphics System**. Schrödinger, LLC., , 2022.

SHAO, Y. et al. Advances in methods and algorithms in a modern quantum chemistry program package. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 8, n. 27, p. 3172–3191, 2006.

SHEN, M.; SALLI, A. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. **Protein Science**, v. 15, n. 11, p. 2507–2524, nov. 2006.

SKVORTSOVA, K.; IOVINO, N.; BOGDANOVIĆ, O. Functions and mechanisms of epigenetic inheritance in animals. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 19, n. 12, p. 774–790, dez. 2018.

SMITH, P. E.; TANNER, J. J. Conformations of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) in various environments. **Journal of Molecular Recognition**, v. 13, n. 1, p. 27–34, jan. 2000.

SOUSA DA SILVA, A. W.; VRANKEN, W. F. ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interfacE. **BMC Research Notes**, v. 5, n. 1, p. 367, dez. 2012.

SPINCK, M. et al. Evolved, Selective Erasers of Distinct Lysine Acylations. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 59, n. 27, p. 11142–11149, 26 jun. 2020.

STOTE, R. H.; KARPLUS, M. Zinc binding in proteins and solution: A simple but accurate nonbonded representation. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 23, n. 1, p. 12–31, set. 1995.

STUDER, G. et al. QMEANDisCo—distance constraints applied on model quality estimation. **Bioinformatics**, v. 36, n. 8, p. 2647–2647, 15 abr. 2020.

SUNDRIYAL, S. et al. Thienopyrimidinone Based Sirtuin-2 (SIRT2)-Selective Inhibitors Bind in the Ligand Induced Selectivity Pocket. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 5, p. 1928–1945, 9 mar. 2017.

SWAILS, J.; CASE, D.; LEE, T. S. **Simulating the Green Fluorescent Protein and Building a Modified Amino Acid Residue**. AmberMD Tutorials, Amber 2015 Reference Manual., , 2015. Disponível em: <<https://ambermd.org/tutorials/basic/tutorial5/>>. Acesso em: 7 out. 2023

SZCZEPANKIEWICZ, B. G. et al. Synthesis of Carba-NAD and the Structures of Its Ternary Complexes with SIRT3 and SIRT5. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 77, n. 17, p. 7319–7329, 7 set. 2012.

TENG, Y.-B. et al. Efficient Demyristoylase Activity of SIRT2 Revealed by Kinetic and Structural Studies. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 8529, 23 fev. 2015.

THE UNIPROT CONSORTIUM et al. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. D1, p. D480–D489, 8 jan. 2021.

TJÖRNHAMMAR, R.; EDHOLM, O. Molecular dynamics simulations of Zn²⁺ coordination in protein binding sites. **The Journal of Chemical Physics**, v. 132, n. 20, p. 205101, 28 maio 2010.

TORO, T. B.; WATT, T. J. Critical review of non-histone human substrates of metal-dependent lysine deacetylases. **The FASEB Journal**, v. 34, n. 10, p. 13140–13155, out. 2020.

TRZASKOWSKI, B.; ADAMOWICZ, L.; DEYMIER, P. A. A theoretical study of zinc(II) interactions with amino acid models and peptide fragments. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 133–137, 29 nov. 2007.

TYAGI, R. et al. Pharmacophore modeling and its applications. Em: **Bioinformatics**. [s.l.] Elsevier, 2022. p. 269–289.

ULIANA, S. R. B.; TRINCONI, C. T.; COELHO, A. C. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 464–480, abr. 2018.

VALDÉS-TRESANCO, M. S. et al. gmx_MMPBSA: A New Tool to Perform End-State Free Energy Calculations with GROMACS. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 17, n. 10, p. 6281–6291, 12 out. 2021.

VAN DYKE, M. W. Lysine Deacetylase (KDAC) Regulatory Pathways: an Alternative Approach to Selective Modulation. **ChemMedChem**, v. 9, n. 3, p. 511–522, mar. 2014.

VAQUERO, A. et al. SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis. **Genes & Development**, v. 20, n. 10, p. 1256–1261, 15 maio 2006.

VARADI, M. et al. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. D1, p. D439–D444, 7 jan. 2022.

VERGNES, B. et al. Targeted disruption of cytosolic SIR2 deacetylase discloses its essential role in Leishmania survival and proliferation. **Gene**, v. 363, p. 85–96, dez. 2005.

VERLI, ET AL. **Bioinformática: da biologia à flexibilidade molecular**. [s.l.] SBBq, 2015.

WANG, C. et al. Calculating protein–ligand binding affinities with MMPBSA: Method and error analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 37, n. 27, p. 2436–2446, 15 out. 2016.

WANG, F. et al. SIRT2 deacetylates FOXO3a in response to oxidative stress and caloric restriction. **Aging Cell**, v. 6, n. 4, p. 505–514, ago. 2007.

WANG, F.; TONG, Q. SIRT2 Suppresses Adipocyte Differentiation by Deacetylating FOXO1 and Enhancing FOXO1's Repressive Interaction with PPAR γ . **Molecular Biology of the Cell**, v. 20, n. 3, p. 801–808, fev. 2009.

WANG, J. et al. Development and testing of a general amber force field. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 9, p. 1157–1174, 15 jul. 2004.

WANG, J. et al. Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 25, n. 2, p. 247–260, out. 2006.

WANG, Q. et al. Abrogation of hepatic ATP-citrate lyase protects against fatty liver and ameliorates hyperglycemia in leptin receptor-deficient mice. **Hepatology**, v. 49, n. 4, p. 1166–1175, abr. 2009.

WANG, Q. et al. Targeting Lysine Deacetylases (KDACs) in Parasites. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. e0004026, 24 set. 2015.

WANG, S. et al. CavityPlus 2022 Update: An Integrated Platform for Comprehensive Protein Cavity Detection and Property Analyses with User-friendly Tools and Cavity Databases. **Journal of Molecular Biology**, v. 435, n. 14, p. 168141, jul. 2023.

WANG, Y. et al. SIRT2: Controversy and multiple roles in disease and physiology. **Ageing Research Reviews**, v. 55, p. 100961, nov. 2019.

WANG, Y.-P. et al. Regulation of G6PD acetylation by KAT9/SIRT2 modulates NADPH homeostasis and cell survival during oxidative stress. **The EMBO Journal**, p. embj.201387224, 25 abr. 2014.

WATERHOUSE, A. et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W296–W303, 2 jul. 2018.

WEBB, B.; SALI, A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 54, n. 1, jun. 2016.

WILLIAMS, C. J. et al. MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. **Protein Science**, v. 27, n. 1, p. 293–315, jan. 2018.

XU, J.; MCPARTLON, M.; LI, J. Improved protein structure prediction by deep learning irrespective of co-evolution information. **Nature Machine Intelligence**, v. 3, n. 7, p. 601–609, 20 maio 2021.

XU, Y. et al. CavityPlus: a web server for protein cavity detection with pharmacophore modelling, allosteric site identification and covalent ligand binding ability prediction. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W374–W379, 2 jul. 2018.

YAMAGATA, K. et al. Structural Basis for Potent Inhibition of SIRT2 Deacetylase by a Macrocyclic Peptide Inducing Dynamic Structural Change. **Structure**, v. 22, n. 2, p. 345–352, fev. 2014.

- YANG, J. et al. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. **Nature Methods**, v. 12, n. 1, p. 7–8, jan. 2015.
- YANG, L.-L. et al. X-ray crystal structure guided discovery of new selective, substrate-mimicking sirtuin 2 inhibitors that exhibit activities against non-small cell lung cancer cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 155, p. 806–823, jul. 2018.
- YANG, W. et al. Regulation of adipogenesis by cytoskeleton remodelling is facilitated by acetyltransferase MEC-17-dependent acetylation of α -tubulin. **Biochemical Journal**, v. 449, n. 3, p. 605–612, 1 fev. 2013.
- YU, J.; AUWERX, J. The Role of Sirtuins in the Control of Metabolic Homeostasis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1173, n. s1, set. 2009.
- ZHANG, J. et al. Comparison of Implicit and Explicit Solvent Models for the Calculation of Solvation Free Energy in Organic Solvents. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 13, n. 3, p. 1034–1043, 14 mar. 2017.
- ZHANG, J.; TUGULDUR, B.; VAN DER SPOEL, D. Force Field Benchmark of Organic Liquids. 2. Gibbs Energy of Solvation. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 55, n. 6, p. 1192–1201, 22 jun. 2015.
- ZHANG, L.; LU, Q.; CHANG, C. Epigenetics in Health and Disease. Em: CHANG, C.; LU, Q. (Eds.). **Epigenetics in Allergy and Autoimmunity**. Advances in Experimental Medicine and Biology. Singapore: Springer Singapore, 2020. v. 1253p. 3–55.
- ZHENG, M. et al. Emerging role of SIRT2 in non-small cell lung cancer (Review). **Oncology Letters**, v. 22, n. 4, p. 731, 11 ago. 2021.

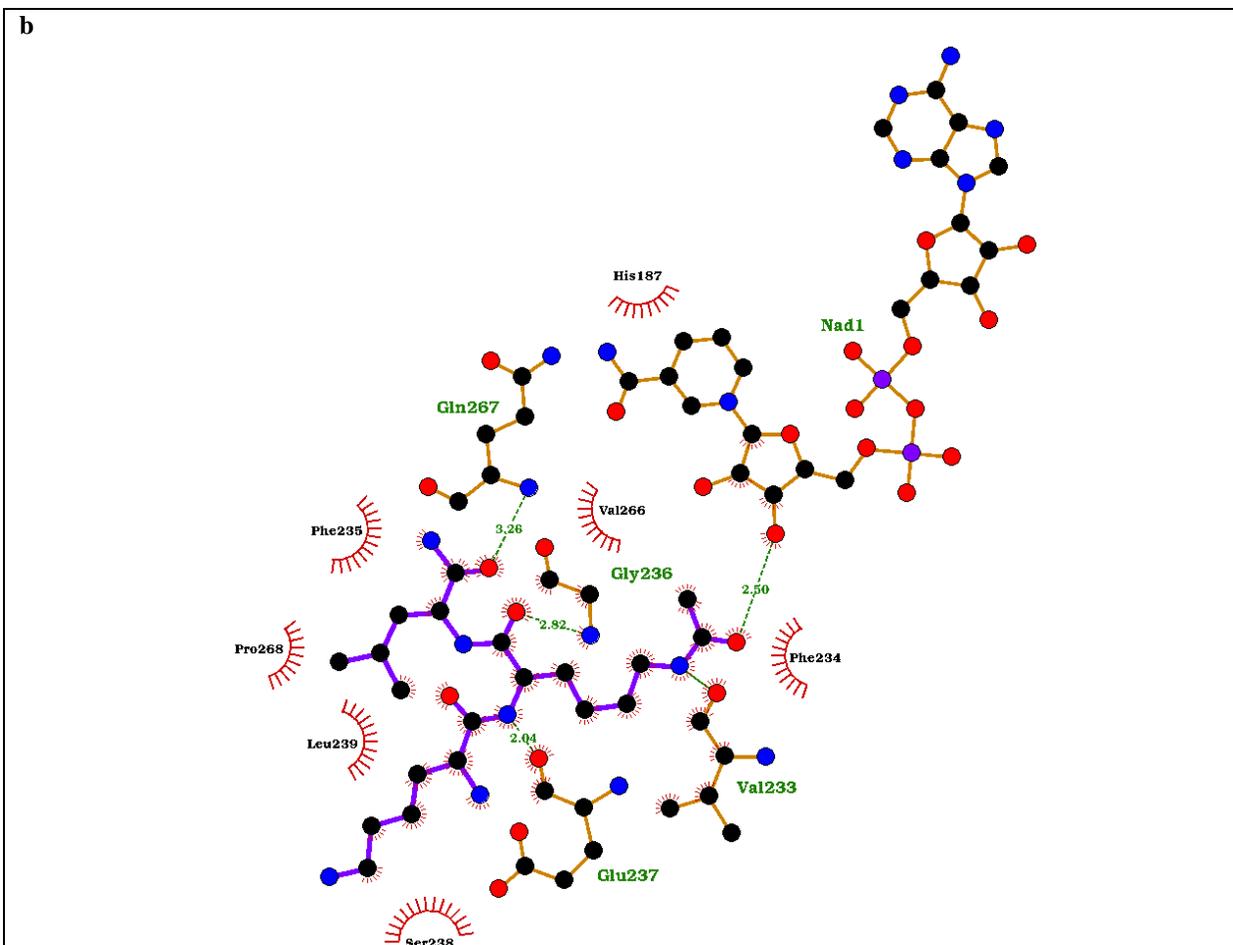


Figura S1. Diagramas de interação ligante-enzima do LigPlotPlus para os substratos da hSIRT2.

Os diagramas de interação do LigPlotPlus para o co-substrato NAD^+ (a) e o substrato peptídico segmento de antígeno tumoral celular p53 (b) são exibidos.

Os resíduos mais relevantes são a HIS187 catalítica, a PHE96 de ligação ao co-substrato e o ASP170, que participa da ligação de hidrogênio com a porção amida do grupo nicotinamida da molécula de NAD^+ .

Outros resíduos importantes são:

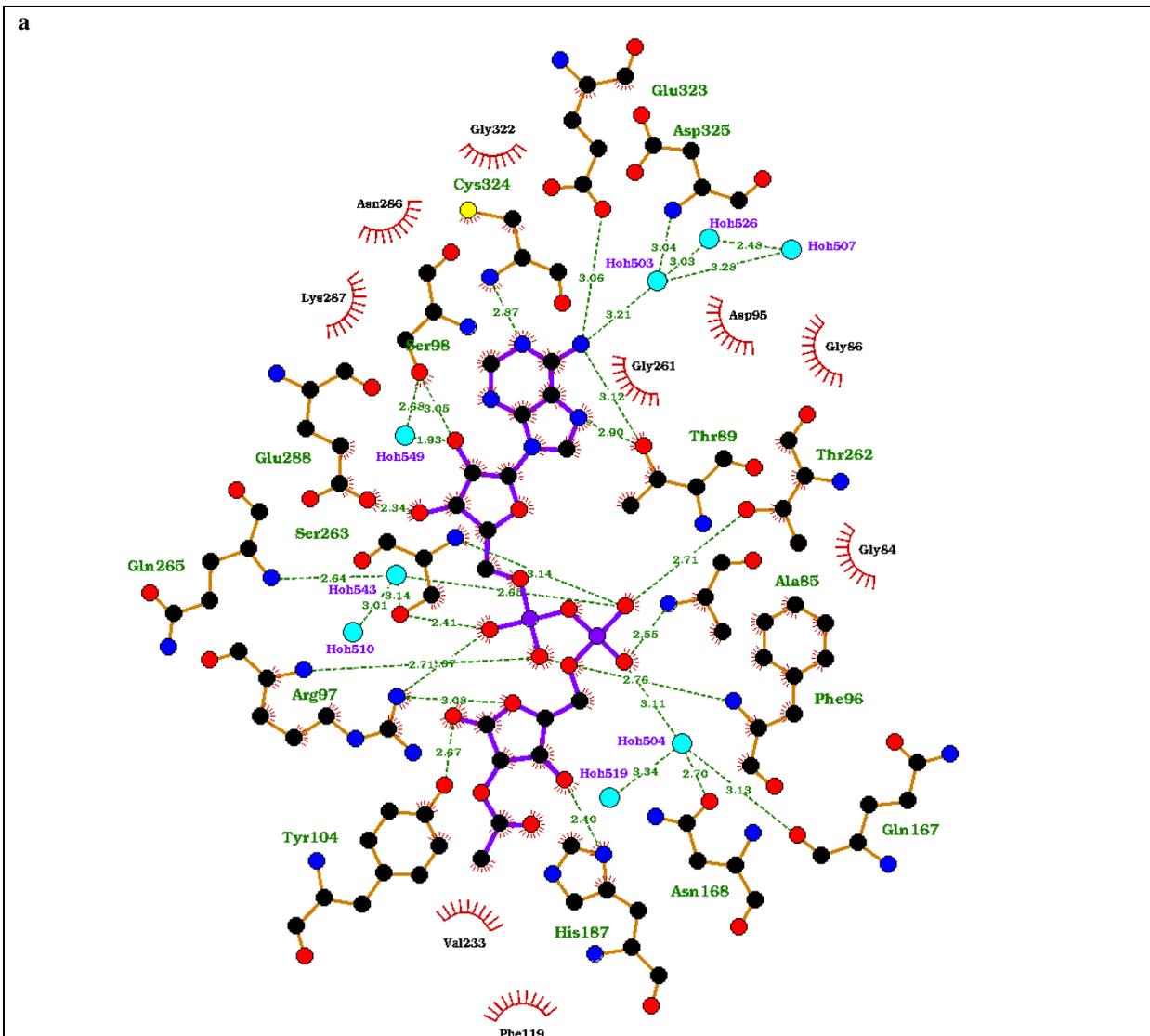
VAL233, VAL266 e PHE235 formam o túnel Ac-K.

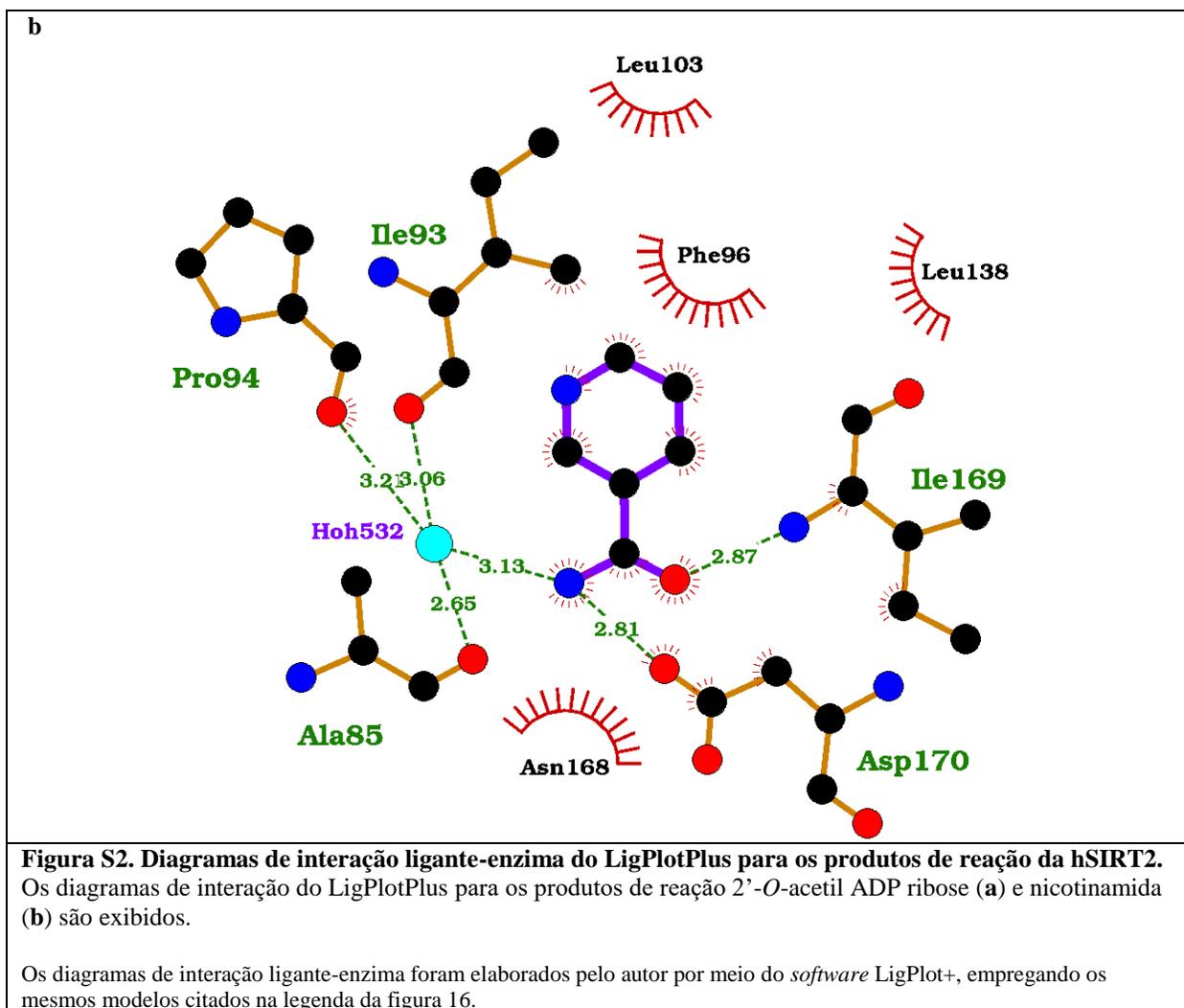
GLY86, ILE87, THR89, LYS287, GLU323 e CYS324 participam da ligação à adenina.

ASN286 e GLU288 formam ligações de hidrogênio com a ribose da adenina (ribose A).

GLY84, ALA85, THR262 e SER263 estabelecem ligações de hidrogênio com o grupamento pirofosfato, enquanto a ARG97 forma uma ponte salina com este.

O diagrama de interação ligante-enzima foi elaborado pelo autor por meio do *software* LigPlot+, empregando o mesmo modelo citado na legenda da figura 14.





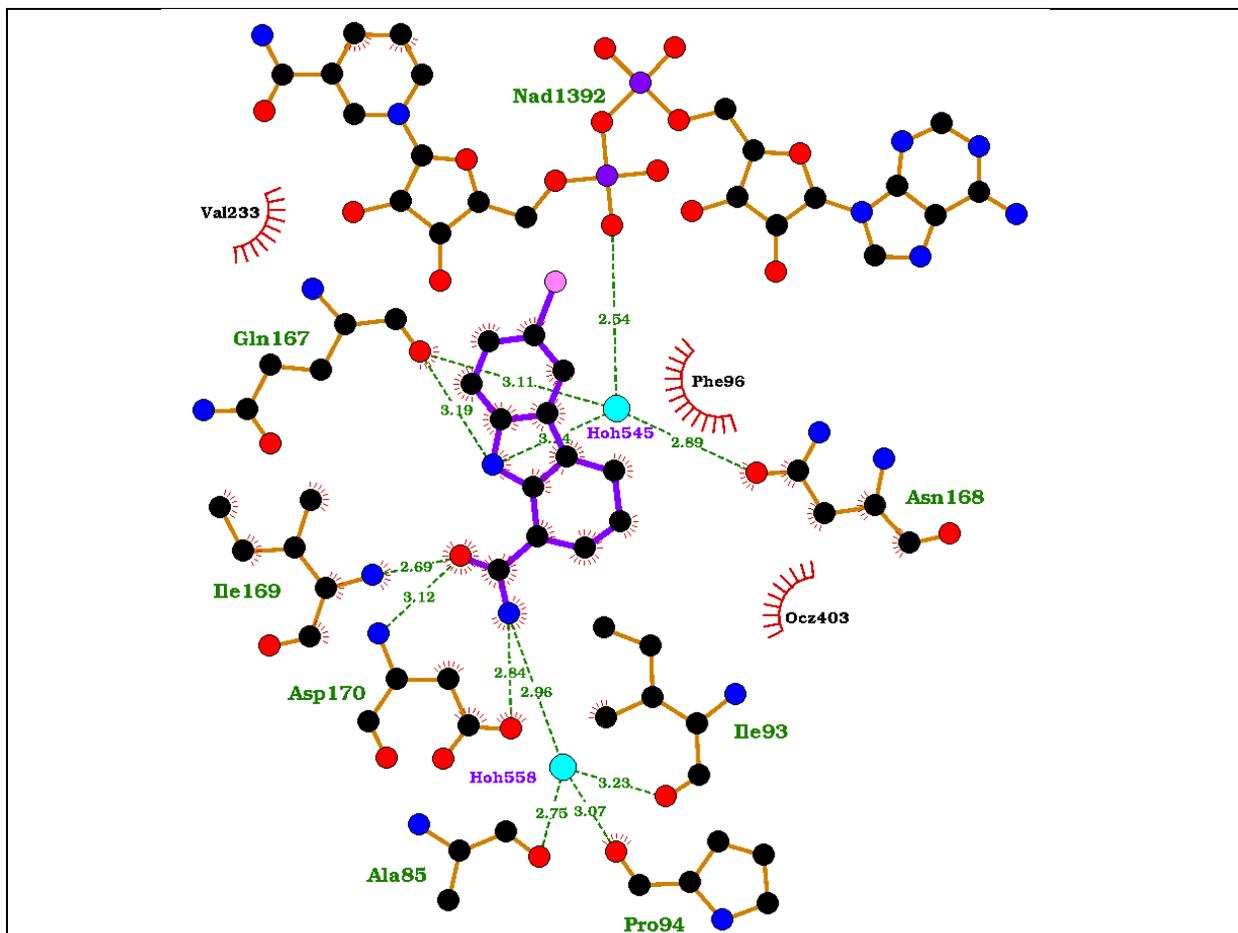
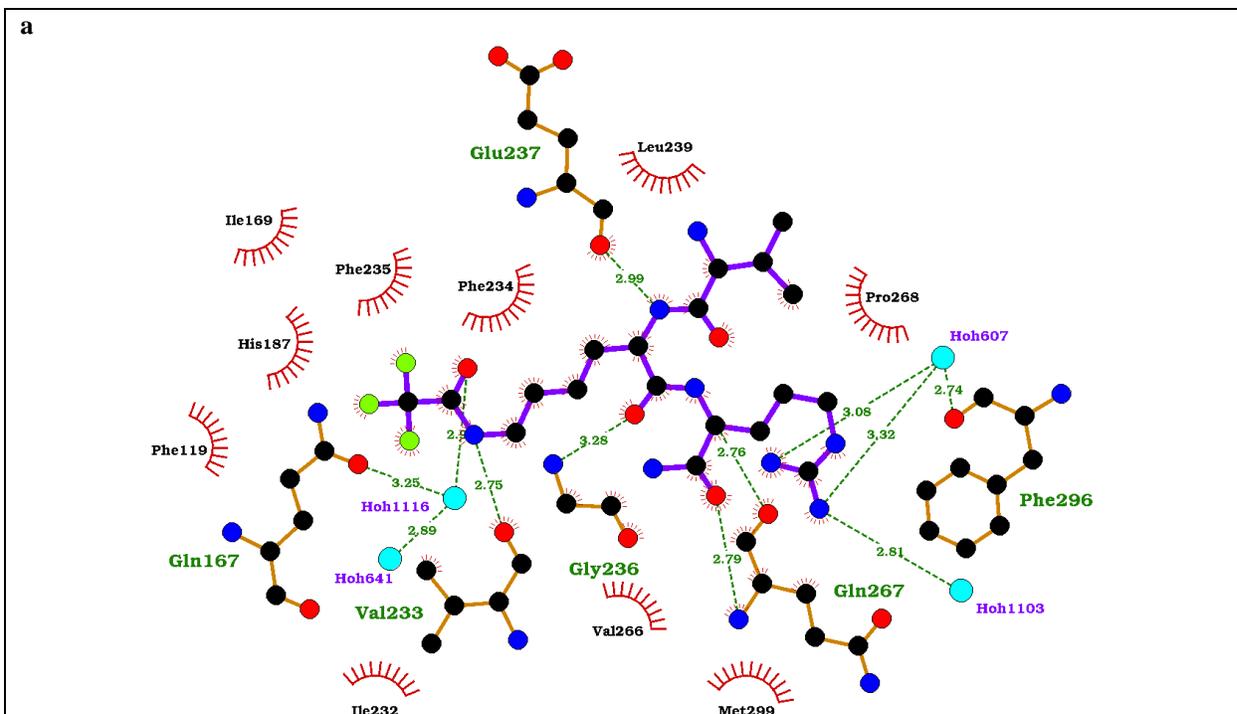


Figura S3. Diagrama de interação ligante-enzima do LigPlotPlus para o inibidor enzimático da hSIRT2, EX243.

O diagrama de interação do LigPlotPlus para o inibidor EX243 é exibido.

O diagrama de interação ligante-enzima foi elaborado pelo autor por meio do *software* LigPlot+, empregando o mesmo modelo citado na legenda da figura 18.



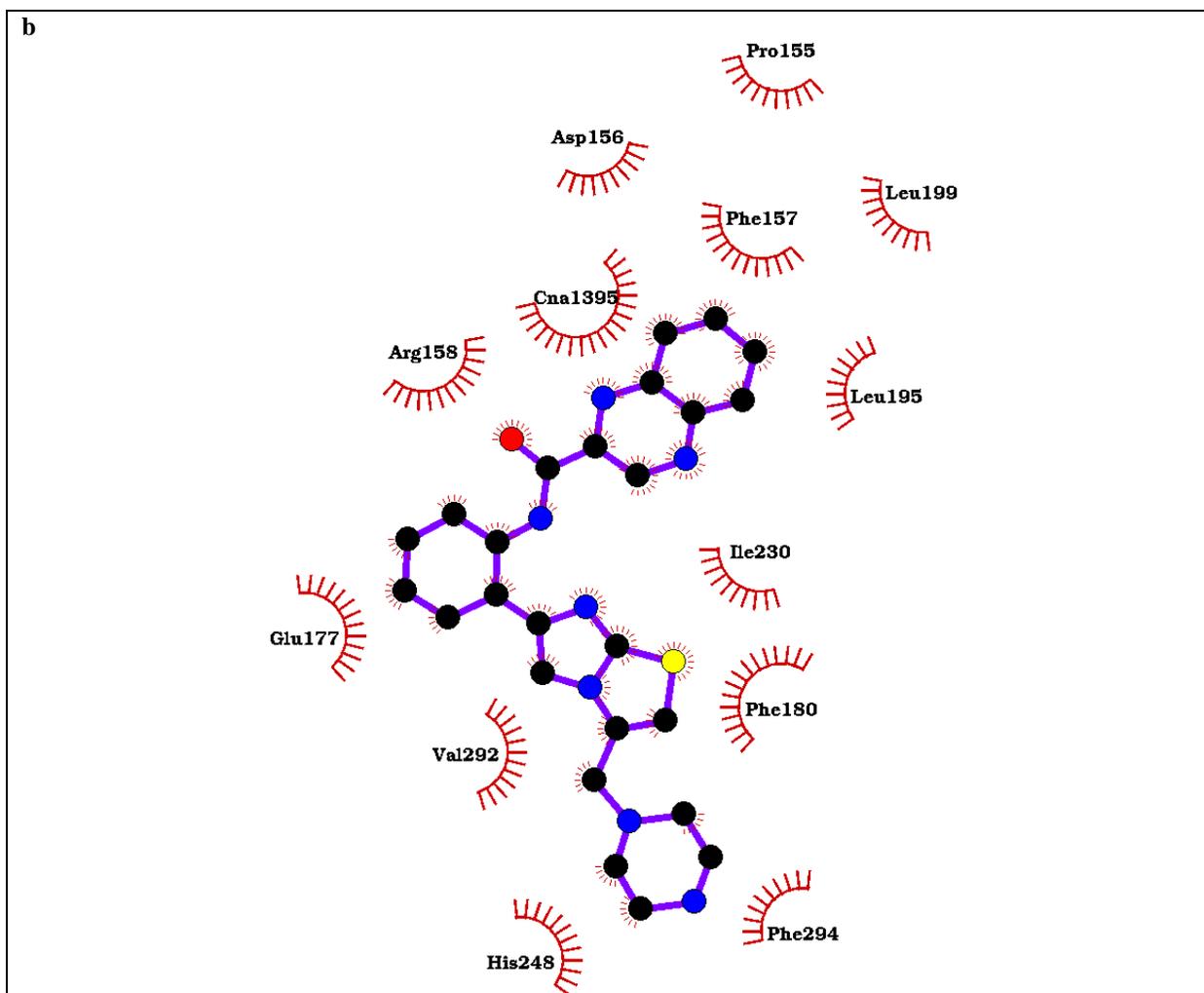
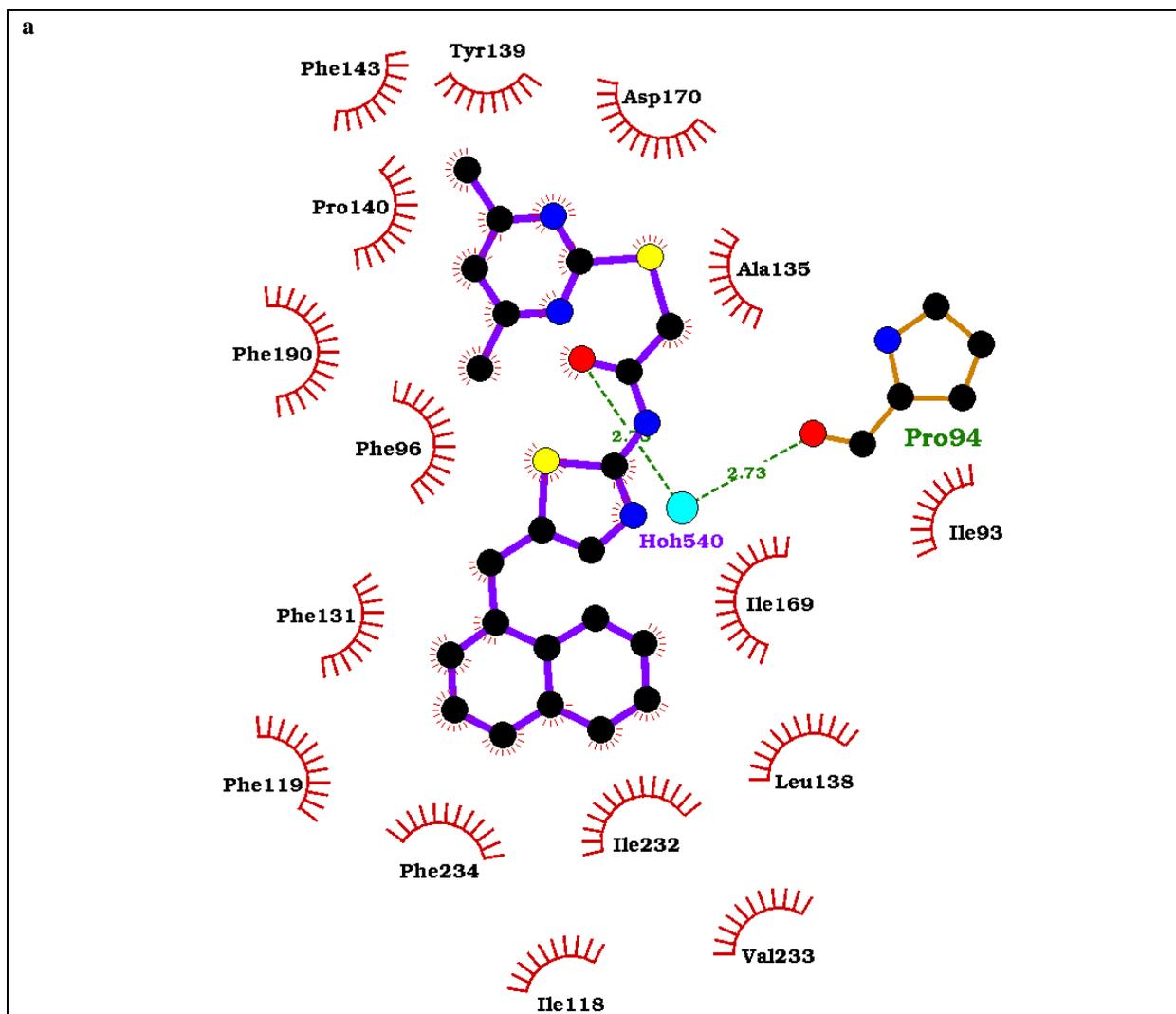


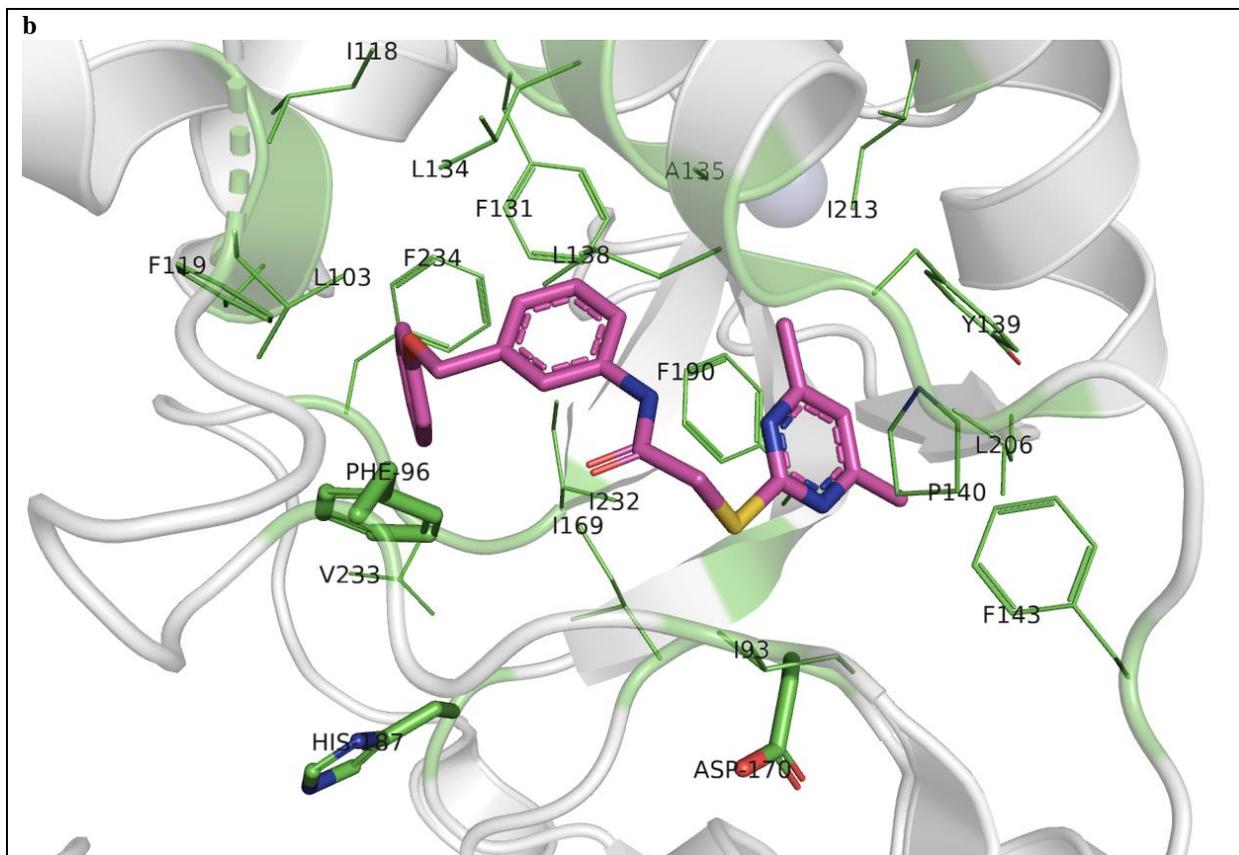
Figura S4. Diagramas de interação ligante-enzima do LigPlotPlus para inibidores enzimáticos da Sirtuína humana.

Os diagramas de interação do LigPlotPlus para os inibidores peptídeo macrocíclico trifluoroacetilado S2iL5 (a) e SRT1720 (b) são exibidos.

A PHE157 e HIS248 da hSIRT3 (b) são homólogas a PHE96 e HIS187 da hSIRT2, respectivamente.

Os diagramas de interação ligante-enzima foram elaborados pelo autor por meio do *software* LigPlot+, empregando os mesmos modelos citados na legenda da figura 19.





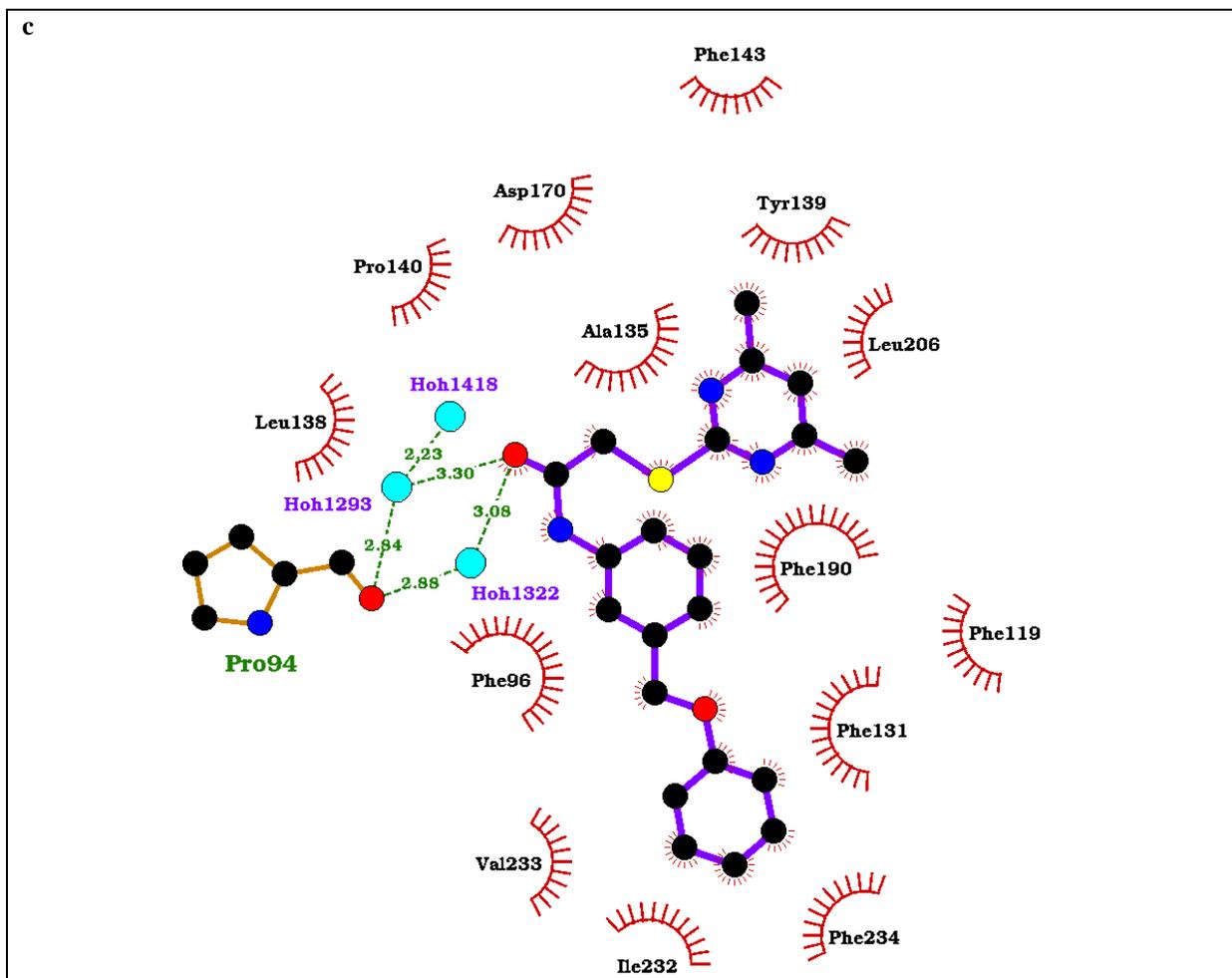


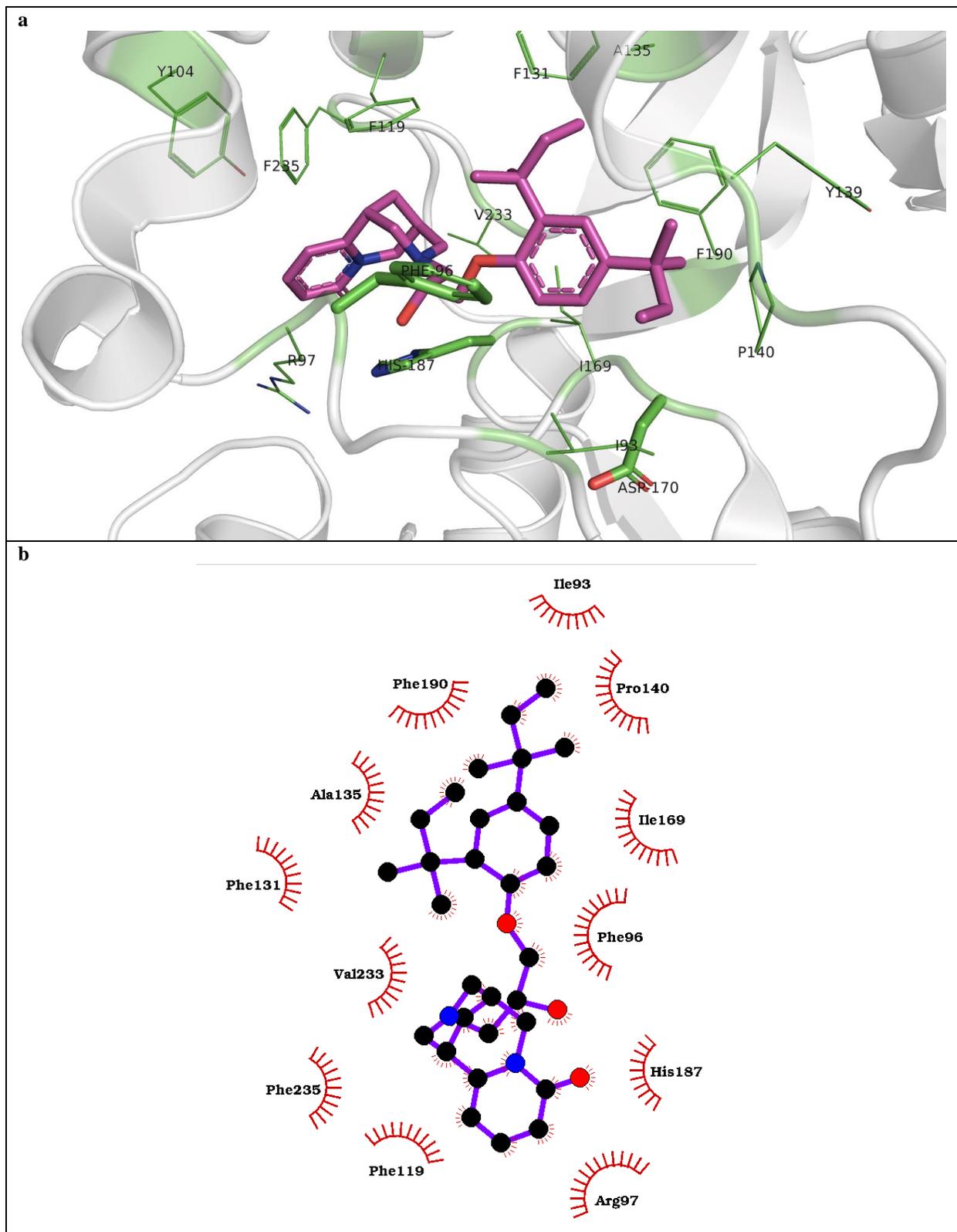
Figura S5. Representação da estrutura da hSIRT2 complexada a ligantes.

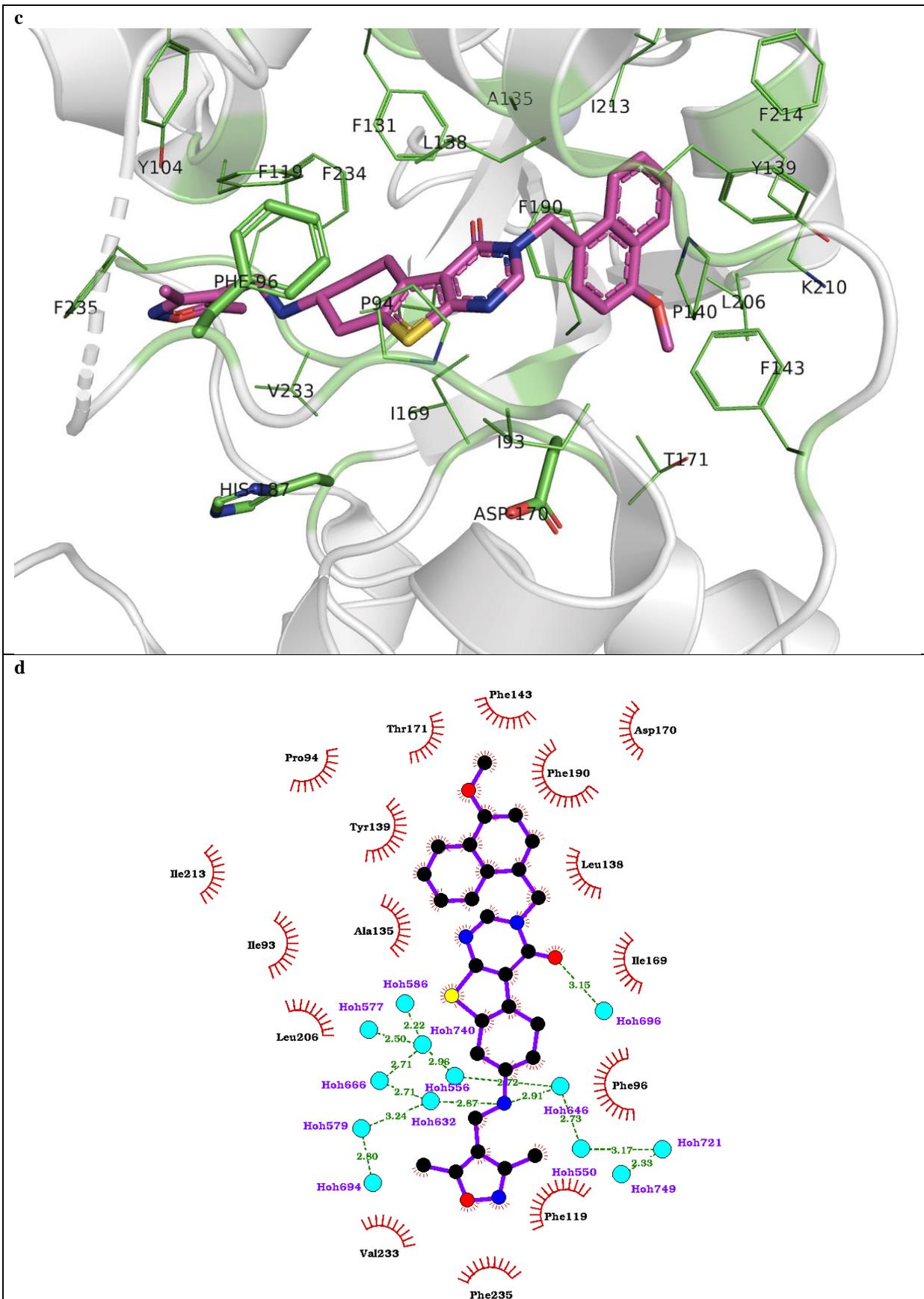
A estrutura da cadeia principal da enzima é representada em cinza claro transparente, na representação do tipo *cartoon* (b).

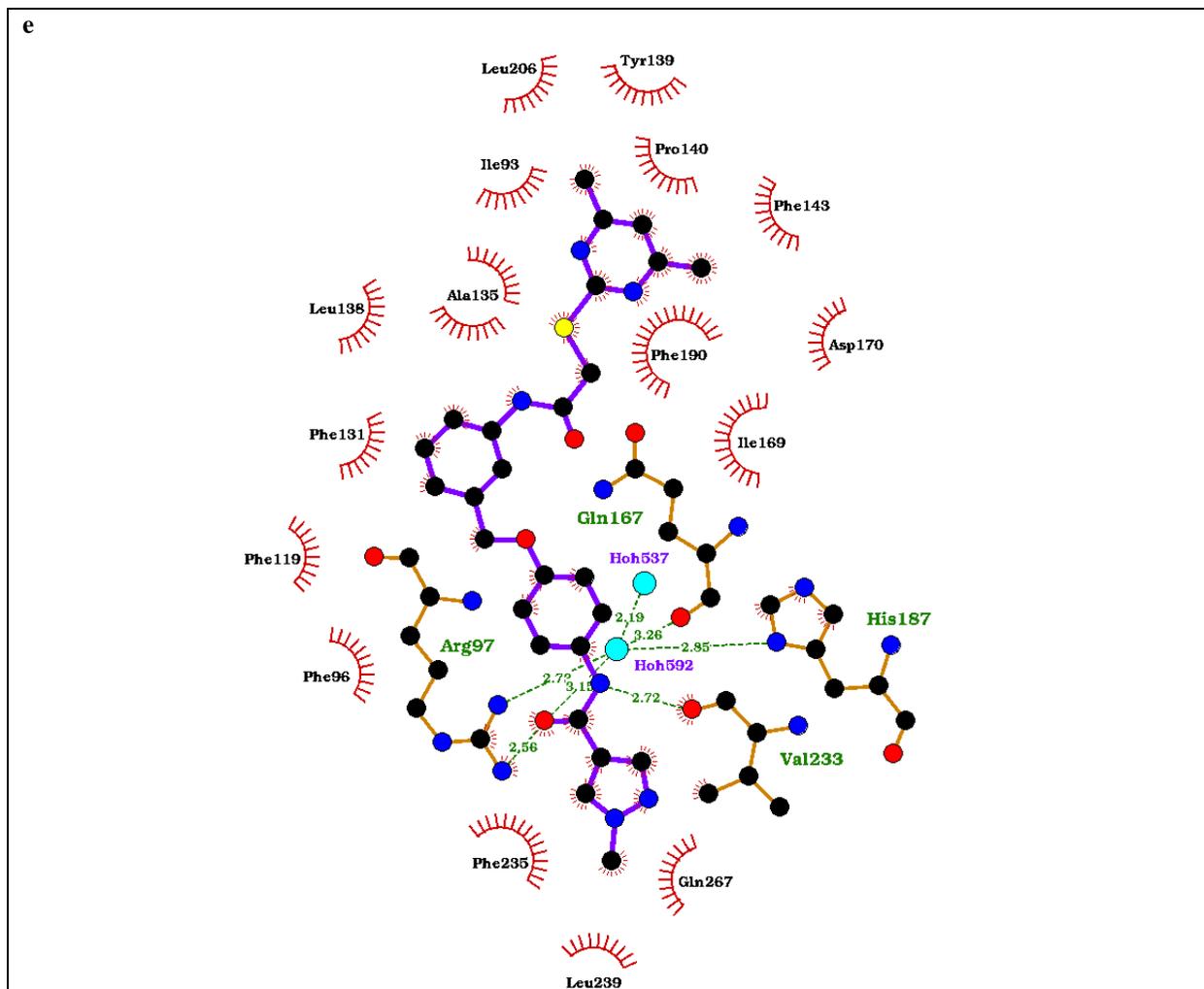
O inibidor análogo do SirReal1 (b) é representado com seus átomos de carbono coloridos em magenta e as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos relevantes em verde, nas representações do tipo bastões e linhas. Os átomos de nitrogênio estão representados em azul, oxigênio em vermelho e enxofre em amarelo.

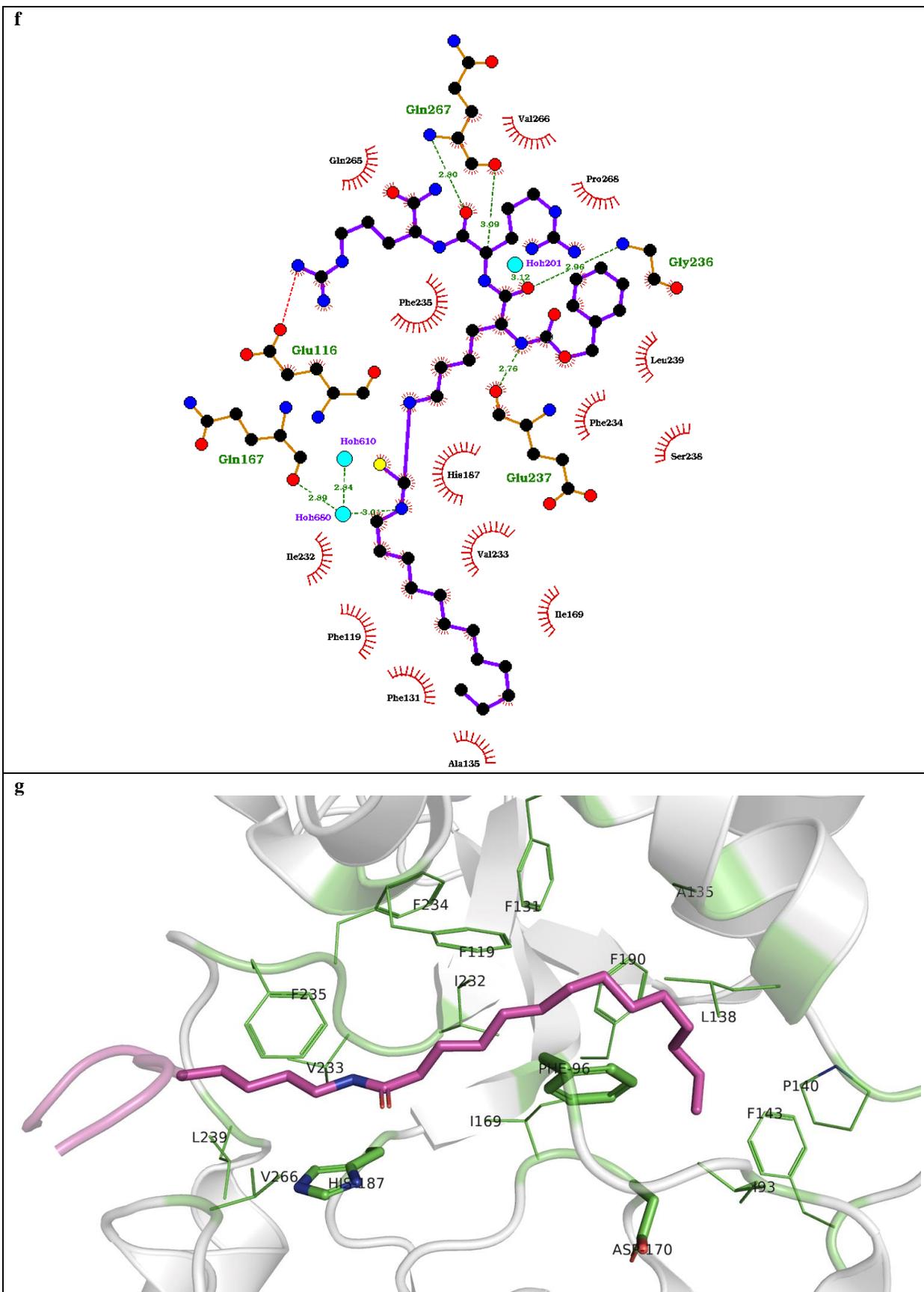
Os diagramas de interação do LigPlotPlus para os inibidores SirReal2 (a) e análogo do SirReal1 (b) são exibidos.

Os diagramas de interação ligante-enzima e a figura da estrutura do complexo ligante-enzima (b) foram elaborados pelo autor por meio dos *softwares* LigPlot+ e PyMol, respectivamente, empregando o modelo citado na legenda da figura 20 e o complexo do inibidor análogo do SirReal1 com a estrutura da hSIRT2 como depositado no banco de dados PDB sob o código 5YQL.









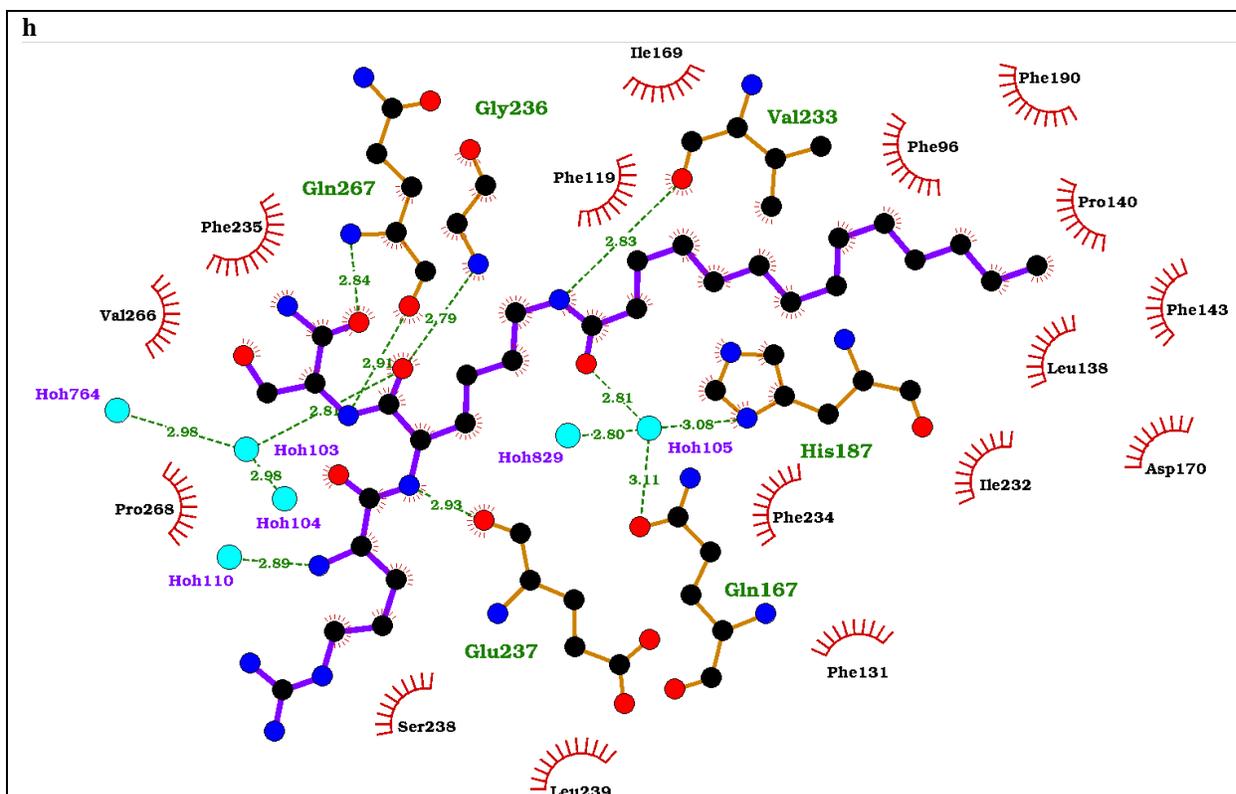


Figura S6. Representação da estrutura da hSIRT2 complexada a ligantes.

A estrutura da cadeia principal da enzima é representada em cinza claro transparente, na representação do tipo *cartoon* (a, c, e e g).

Os inibidores não peptídicos dos bolsos C-estendido e Ac-K (a) e (c) são representado com seus átomos de carbono coloridos em magenta na representação do tipo bastões.

O substrato peptídico *N*-miristoil-lisina (fragmento da histona H3) (g) é representado com sua cadeia principal em magenta transparente e seus átomos de carbono da cadeia lateral do resíduo de lisina em magenta, nas representações do tipo *cartoon* e bastões, respectivamente.

As cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos relevantes estão representadas em verde, nas representações do tipo bastões e linhas.

Os átomos de nitrogênio estão representados em azul, oxigênio em vermelho e enxofre em amarelo.

Os diagramas de interação do LigPlotPlus para os inibidores dos bolsos C-estendido e Ac-K (b), (d), (e) e (f) e para o substrato peptídico miristoilado (h) são exibidos.

Os diagramas de interação ligante-enzima e as figuras das estruturas dos complexos ligante-enzima foram elaborados pelo autor por meio do *software* LigPlot+ e PyMol, respectivamente, empregando os modelos citados na legenda da figura 21 (e e f), a estrutura hSIRT2 complexada com o inibidor NPD11033 (a e b) depositada no banco de dados PDB com código de acesso 5Y0Z, a estrutura hSIRT2 complexada com o inibidor tienopirimidinona (c e d) depositada no banco de dados PDB com código de acesso 5MAT e a estrutura hSIRT2 complexada com o substrato peptídico *N*-miristoil-lisina (g e h), conforme depositada no banco de dados PDB com código de acesso 4Y6L.

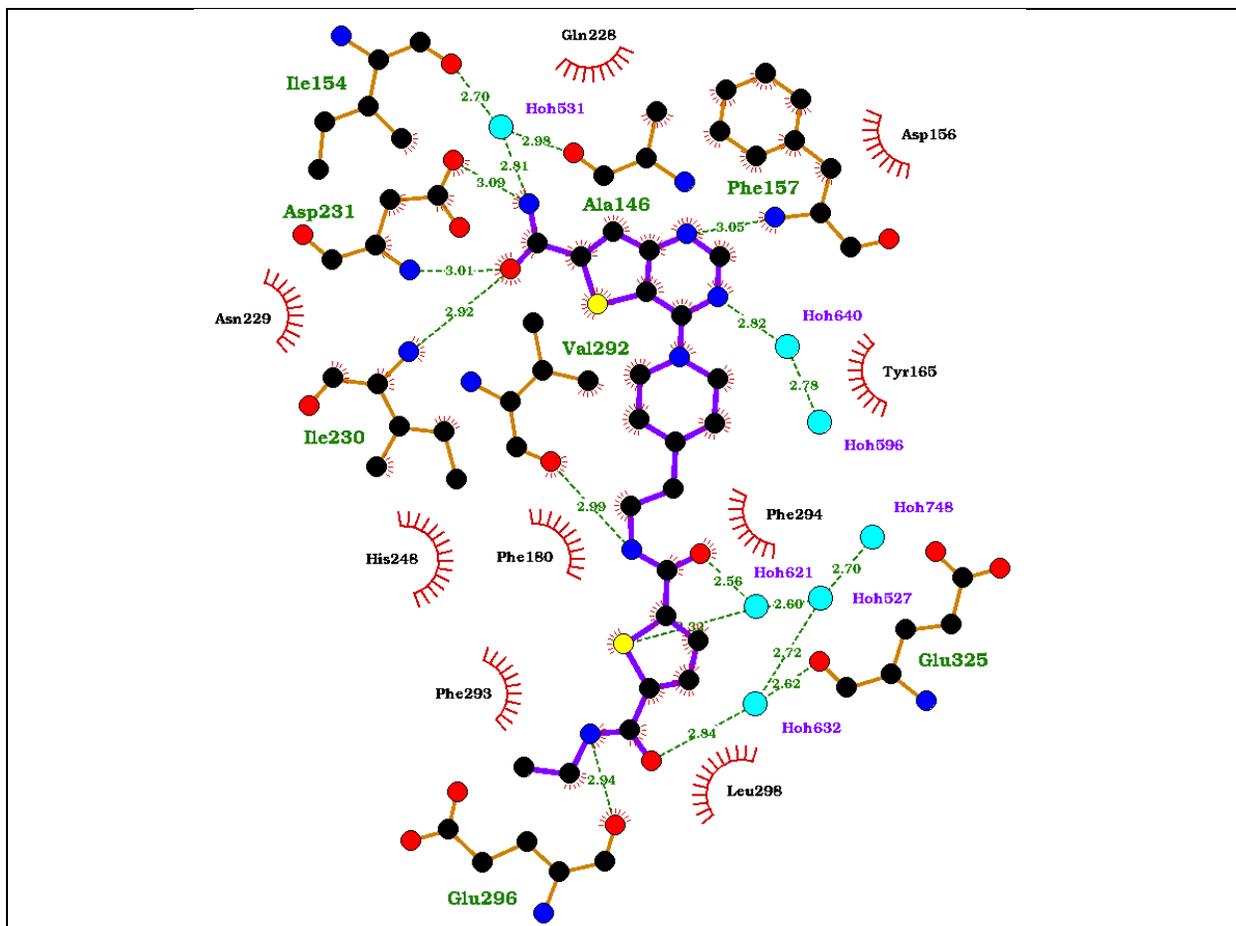


Figura S7. Diagrama de interação ligante-enzima do LigPlotPlus para um inibidor competitivo da nicotinamida e do substrato peptídico da hSIRT3.

O diagrama de interação do *LigPlotPlus* para o inibidor tienopirimidina é exibido.

A PHE157, o ASP231 e a HIS248 da hSIRT3 (b) são homólogos a PHE96, ao ASP170 e a HIS187 da hSIRT2, respectivamente.

O diagrama de interação ligante-enzima foi elaborado pelo autor por meio do *software* LigPlot+, empregando o mesmo modelo citado na legenda da figura 22.

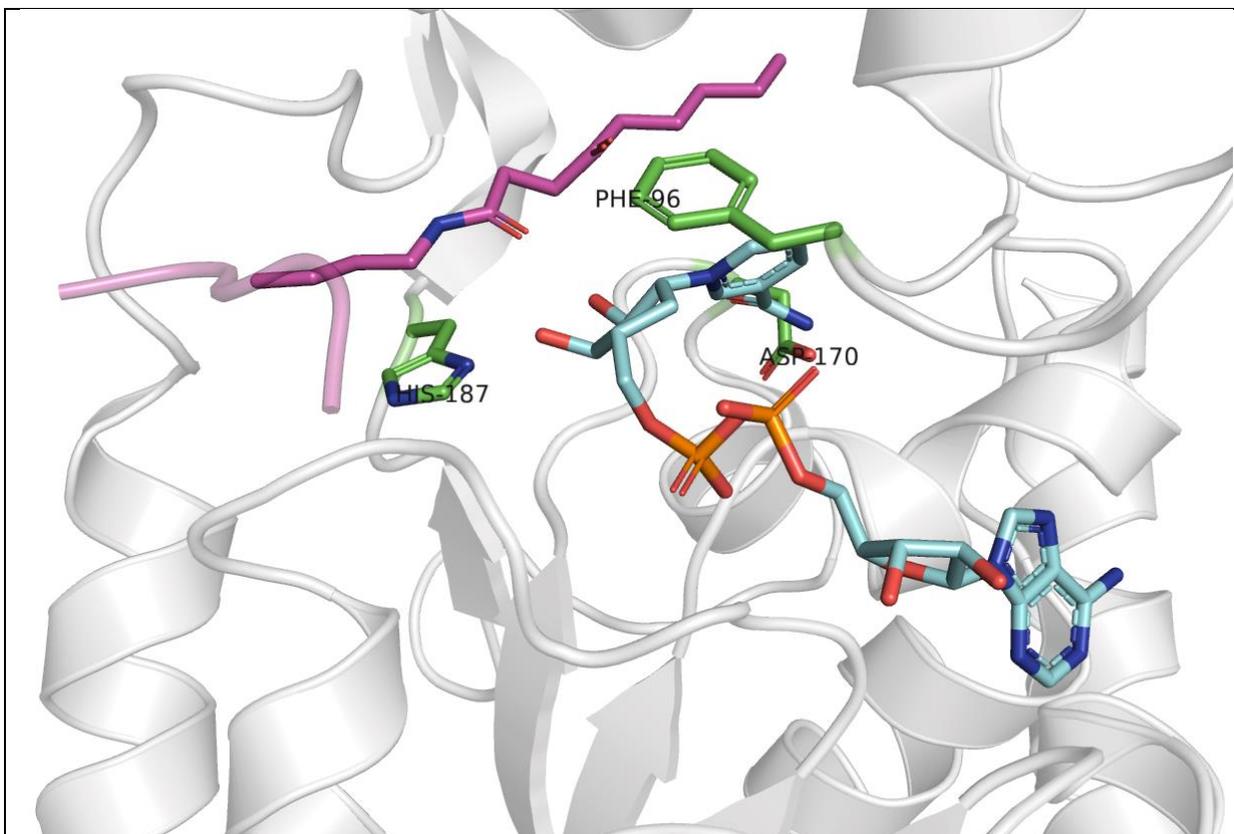


Figura S8. Representação da estrutura da hSIRT2 complexada a ligantes.

A estrutura da cadeia principal da enzima é representada em cinza claro transparente, na representação do tipo *cartoon*.

O inibidor análogo do co-substrato, Carba-NAD é representado com seus átomos de carbono coloridos em ciano na representação do tipo bastões.

O substrato peptídico *N*-4-oxonanoil-lisina (fragmento da histona H3) é representado com sua cadeia principal em magenta transparente e seus átomos de carbono da cadeia lateral do resíduo de lisina em magenta, nas representações do tipo *cartoon* e bastões, respectivamente.

As cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos relevantes estão representadas em verde, na representação do tipo bastões.

Os átomos de nitrogênio estão representados em azul, oxigênio em vermelho e fósforo em laranja.

Observe a substituição de um átomo de oxigênio do anel ribose N do análogo do NAD⁺ por um grupo metileno, adjacente ao átomo C1 que forma a ligação anomérica ao grupo nicotinamida.

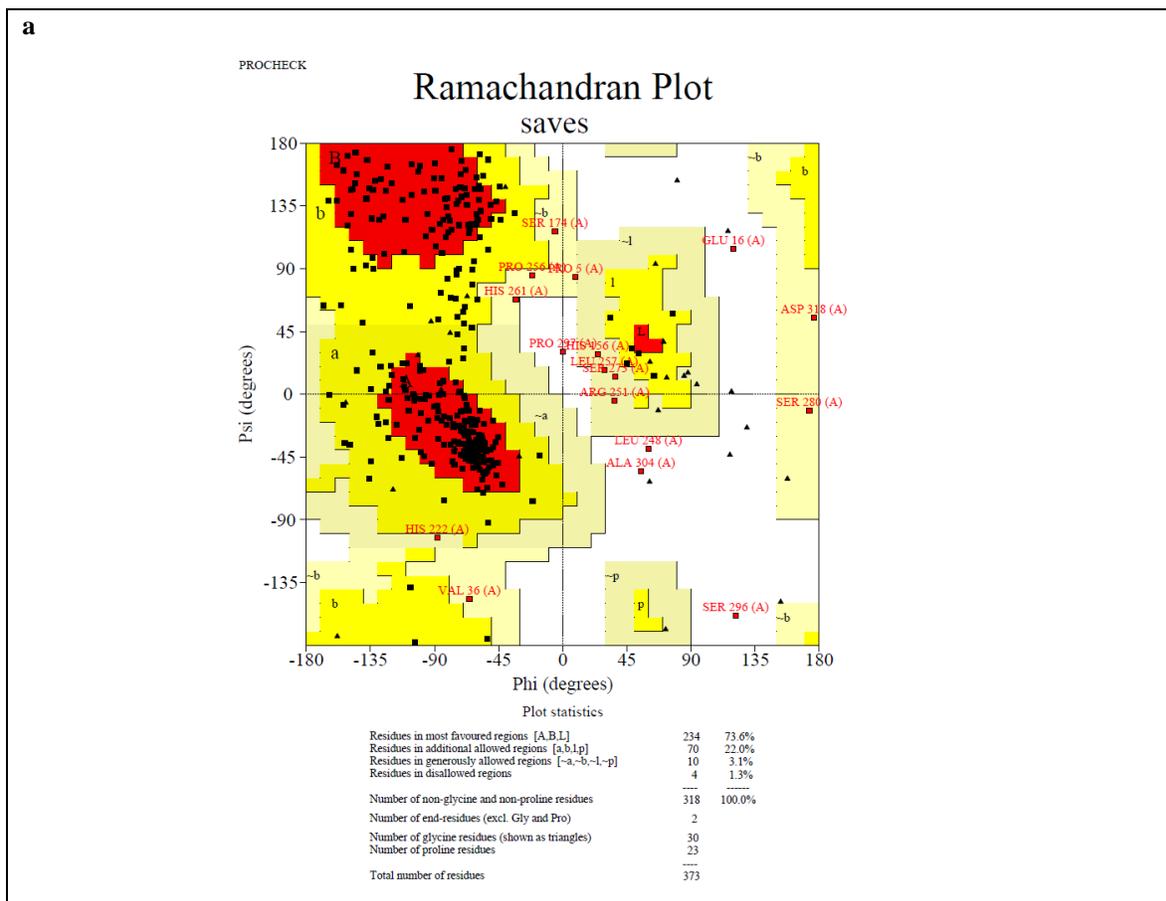
A figura da estrutura do complexo ligantes-enzima foi elaborada pelo autor por meio do *software* PyMol, utilizando a estrutura hSIRT2 complexada com o inibidor análogo de co-substrato Carba-NAD e o substrato peptídico *N*-4-oxonanoil-lisina, conforme depositado no banco de dados PDB com código de acesso 5G4C.

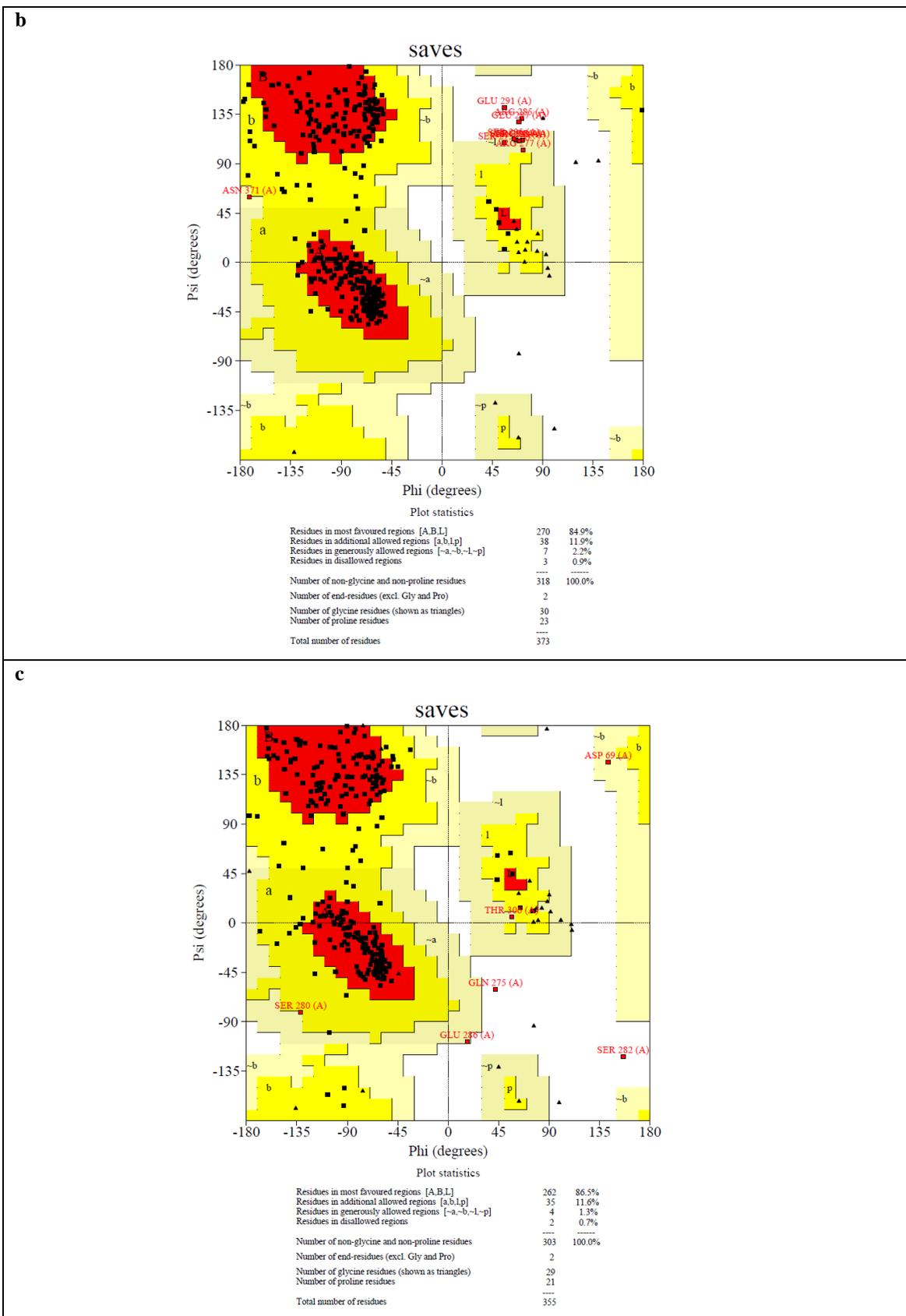
S2. ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE DIFERENTES PLATAFORMAS DE MODELAGEM MOLECULAR

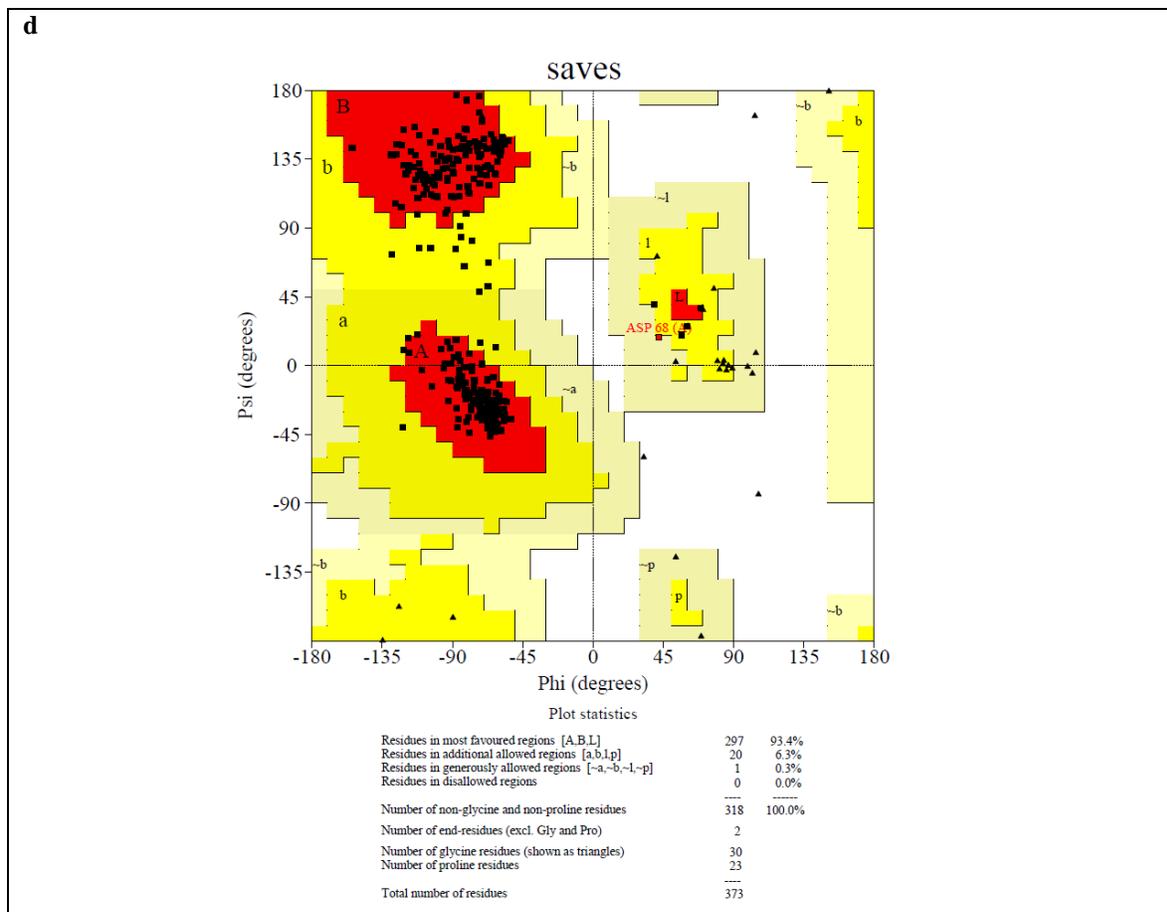
No início do trabalho, outras plataformas de modelagem molecular foram testadas em experimentos preliminares para comparação entre os modelos gerados por estas, sendo elas o I-Tasser, o RaptorX, o Swiss-Model e o AlphaFold, porém os resultados obtidos por meio destas ferramentas foram inferiores àqueles obtidos através do *software* Modeller. Para fins de comparação entre as plataformas de modelagem estudadas neste trabalho, utilizamos os modelos de Sir2rp1 da espécie *Leishmania major*, modelados por meio das várias ferramentas estudadas, tendo como base a sequência canônica desta proteína com código de acesso UniProt Q25337 (JUMPER et al., 2021; THE UNIPROT CONSORTIUM et al., 2021; WATERHOUSE et al., 2018; WEBB; SALI, 2016; XU; MCPARTLON; LI, 2021; YANG et al., 2015).

A seguir, uma comparação entre as avaliações de qualidade estereoquímica referentes aos modelos de Sir2rp1 de *L. major* gerados por diferentes plataformas de modelagem de proteínas é explorada (FERREIRA, 2019; GOMES, 2021; HOOFT et al., 1996; LASKOWSKI et al., 1993; RAMACHANDRAN; RAMAKRISHNAN; SASISEKHARAN, 1963; STUDER et al., 2020; VERLI, 2015; WILLIAMS et al., 2018).

S2.1 Diagramas de Ramachandran dos modelos de Sir2rp1 de *L. major*







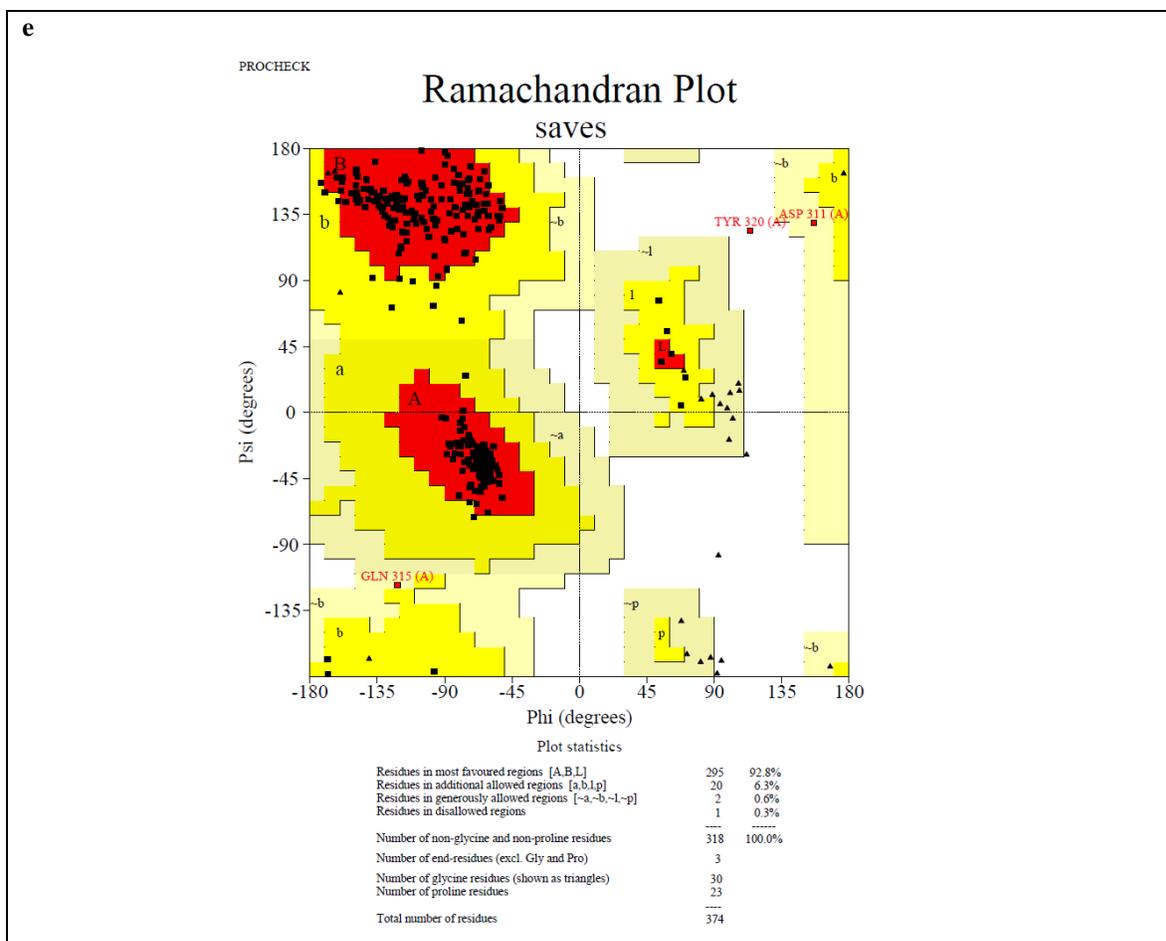


Figura S9. Comparação entre os diagramas de Ramachandran dos modelos de Sir2rp1 de *L. major* gerados por diferentes plataformas de modelagem.

- (a) iTasser
- (b) AlphaFold
- (c) SwissModel
- (d) RaptorX
- (e) Modeller

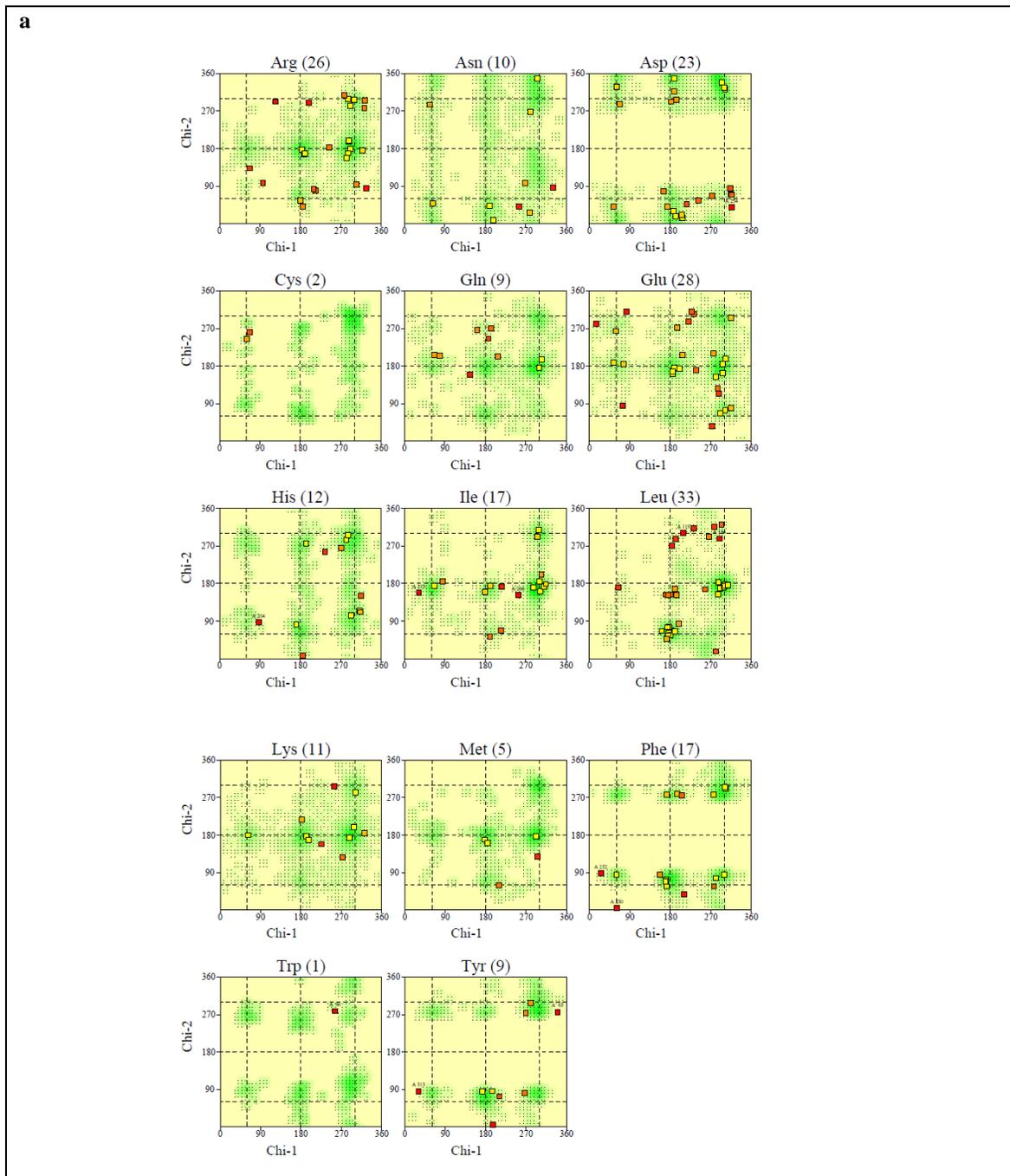
As regiões em vermelho representam as combinações de ângulos mais favoráveis termodinamicamente, sendo a superior esquerda, demarcada com a letra “B”, referente às fitas β e a central/inferior esquerda, demarcada com a letra “A”, correspondente às hélices α . As regiões em amarelo representam combinações de ângulos favoráveis, porém não ideais. As regiões na cor creme representam combinações aceitáveis, porém pouco favoráveis. Em branco, seriam as combinações desfavoráveis.

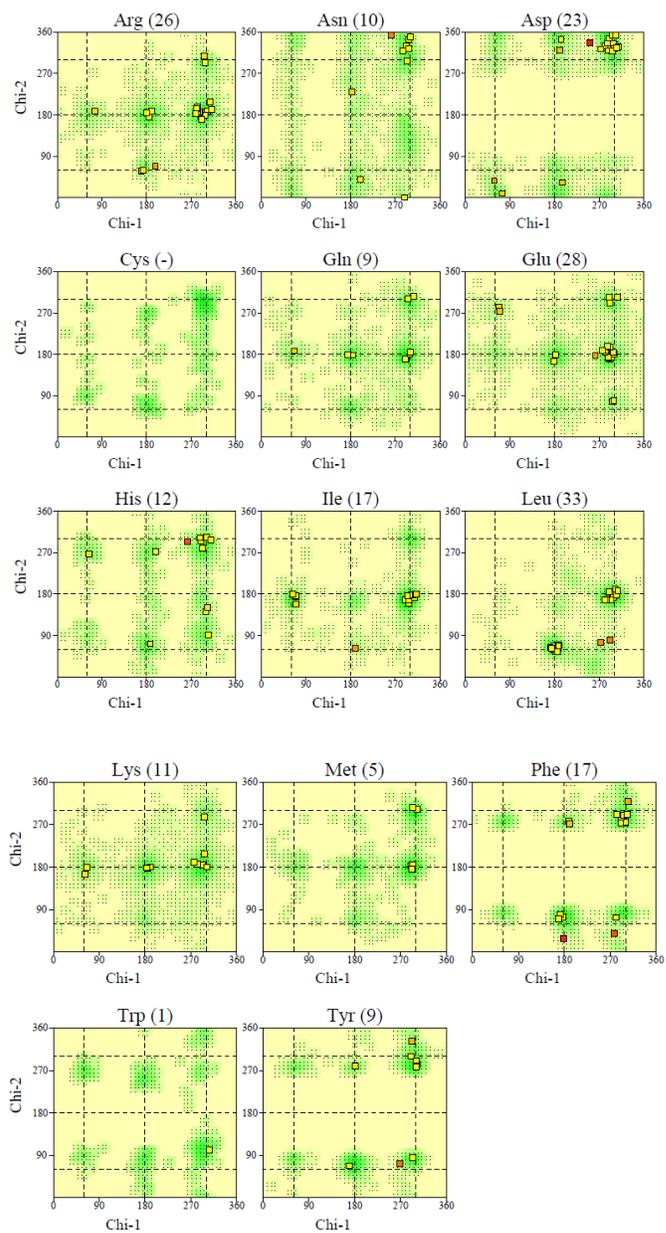
A região central demarcada com a letra “L” corresponde às hélices α levorotatórias e a região central inferior, demarcada com a letra “p” corresponde a uma combinação favorável para resíduos de prolina. Cada quadrado preto no diagrama representa um resíduo de aminoácido da cadeia polipeptídica e os resíduos de glicina, que apresentam regiões termodinamicamente favoráveis distintas dos demais aminoácidos (ver figura 25a), são representadas por triângulos pretos.

Os resíduos que aparecem em vermelho com seu nome e número na sequência demarcados são aqueles que apresentam uma configuração estereoquímica desfavorável.

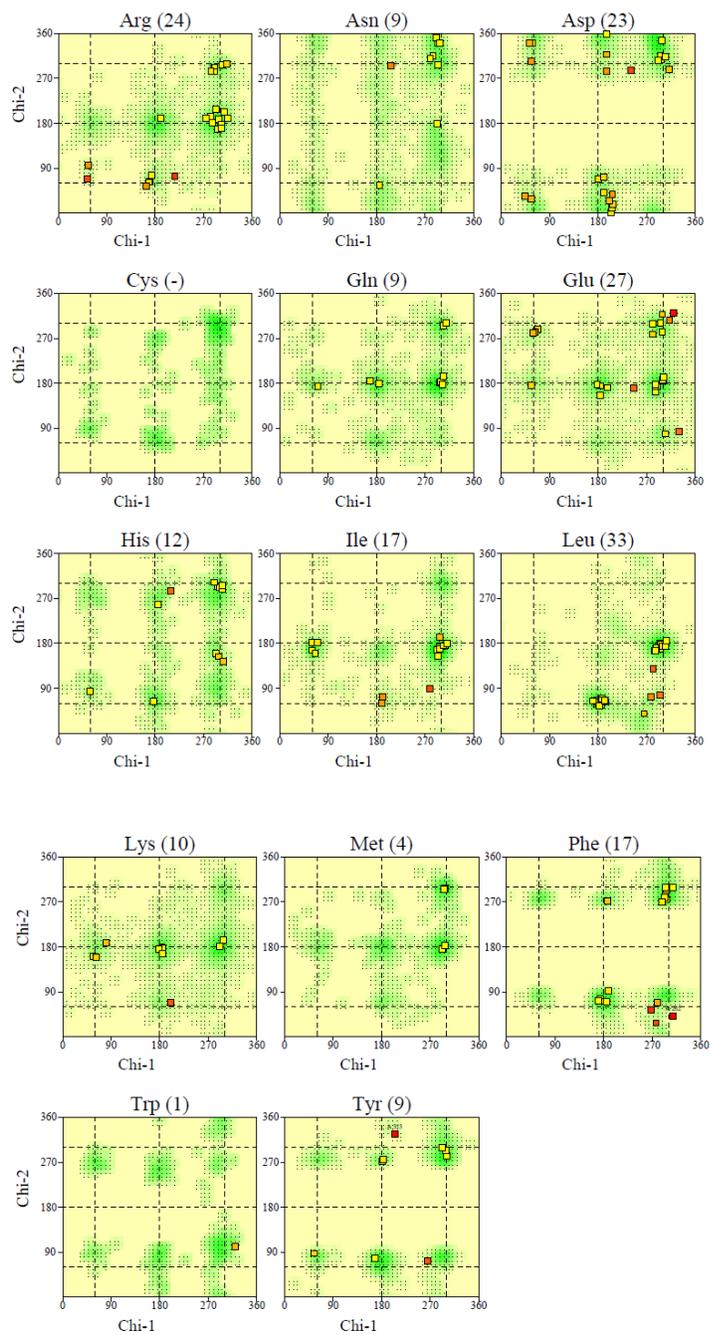
Diagramas elaborados pelo autor por meio da plataforma PROCHECK do servidor SAVES.

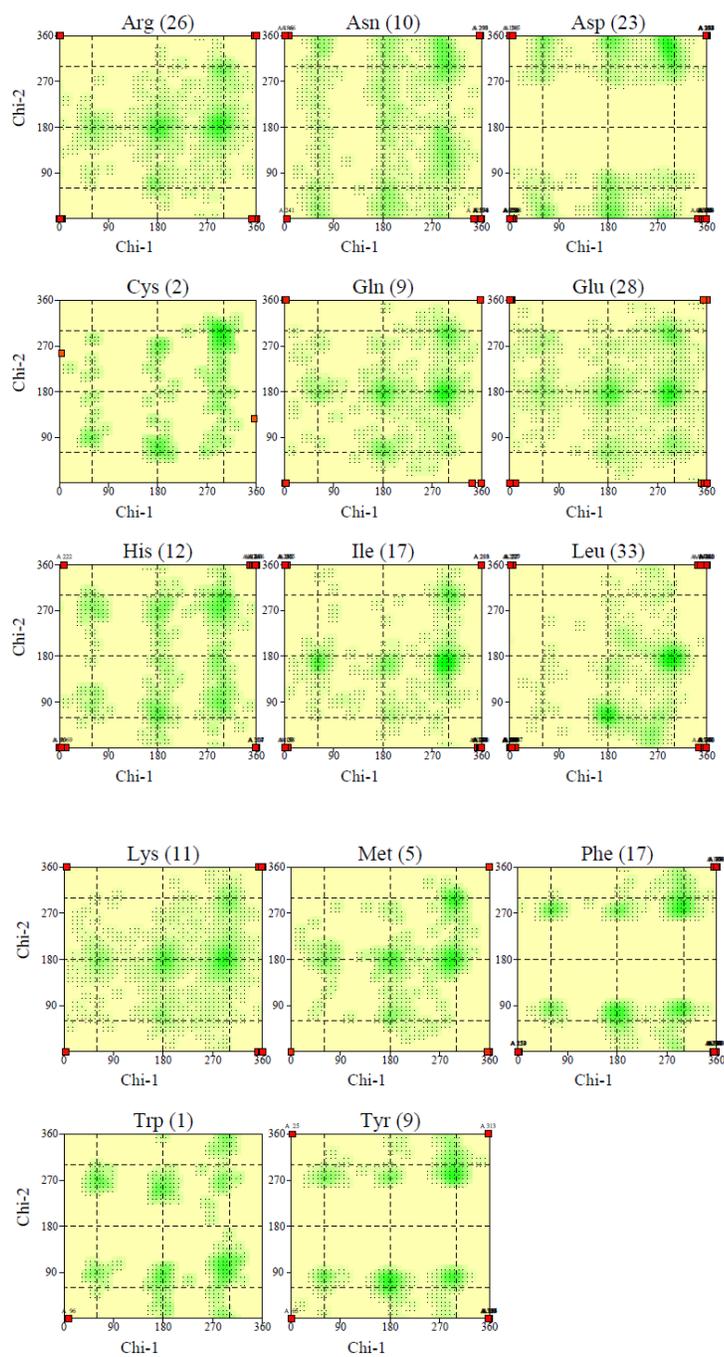
Ao comparar os modelos de Sir2rp1 de *L. major* gerados por plataformas de modelagem diferentes, podemos observar que em termos de diagrama de Ramachandran, o pior dos modelos foi aquele gerado pelo iTasser, com 14 resíduos *outliers*, sendo quatro em regiões desfavoráveis (Em branco, no diagrama. Figura S9a). Em seguida, em termos de qualidade do diagrama de Ramachandran, vem o modelo gerado pelo AlphaFold, apresentando 10 *outliers*, sendo três em regiões desfavoráveis (Figura S9b). O modelo gerado pelo SwissModel apresentou 6 *outliers* de Ramachandran, sendo dois deles em regiões desfavoráveis (Figura S9c). Já o modelo gerado por meio do RaptorX apresentou apenas um *outlier*, estando este em uma região pouco favorável (denominada “~|”, Figura S9d). Enquanto o modelo gerado pelo Modeller apresentou três *outliers*, sendo um destes em uma região desfavorável (Figura S9e). Dentre os modelos gerados, considerando os resultados da análise do diagrama de Ramachandran, os modelos do AlphaFold e do iTasser apresentam qualidade estereoquímica de suas cadeias principais inaceitável (FERREIRA, 2019; GOMES, 2021; HOOFT et al., 1996; LASKOWSKI et al., 1993; WILLIAMS et al., 2018).

S2.2 Diagramas de ângulos Chi1-Chi2 dos modelos de Sir2rp1 de *L. major*

b

c



d

e

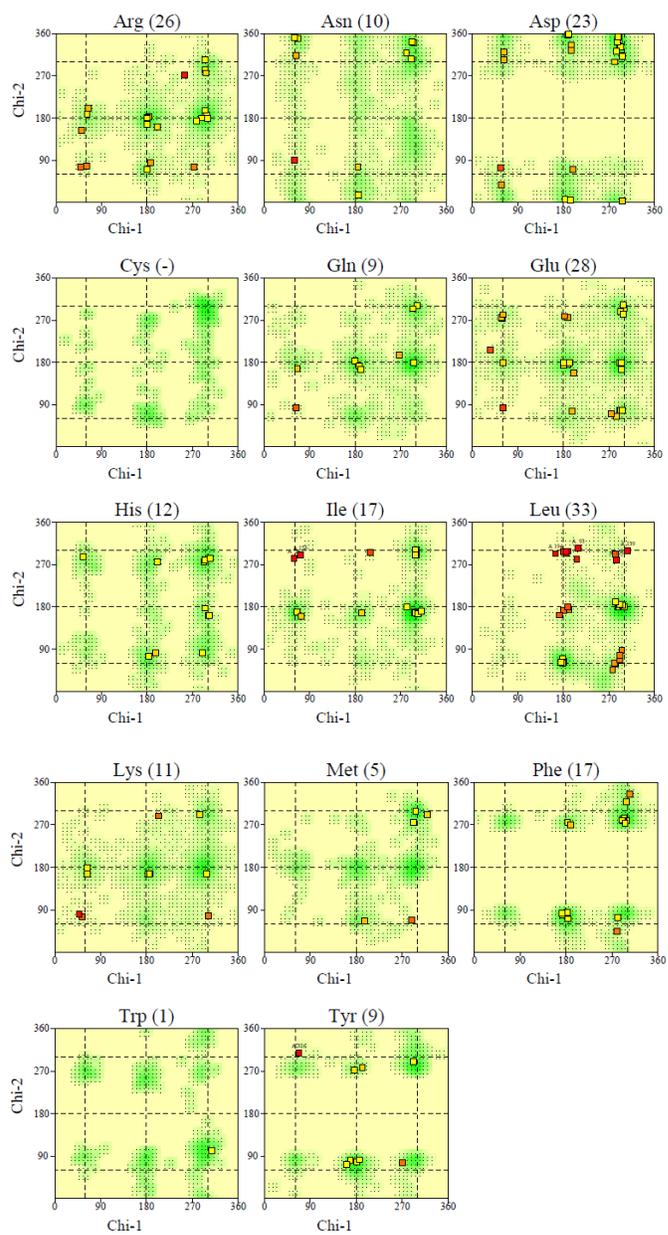


Figura S10. Comparação entre os diagramas de ângulos Chi1-Chi2 dos modelos de Sir2rp1 de *L. major* gerados por diferentes plataformas de modelagem.

- (a) iTasser
- (b) AlphaFold
- (c) SwissModel
- (d) RaptorX
- (e) Modeller

Os diagramas são dados para cada tipo de resíduo de aminoácido das cadeias polipeptídicas, seu nome dado pelo código de três letras e o número de resíduos deste tipo presentes no modelo a seguir entre parênteses.

As regiões em verde representam as combinações de ângulos mais favoráveis termodinamicamente.

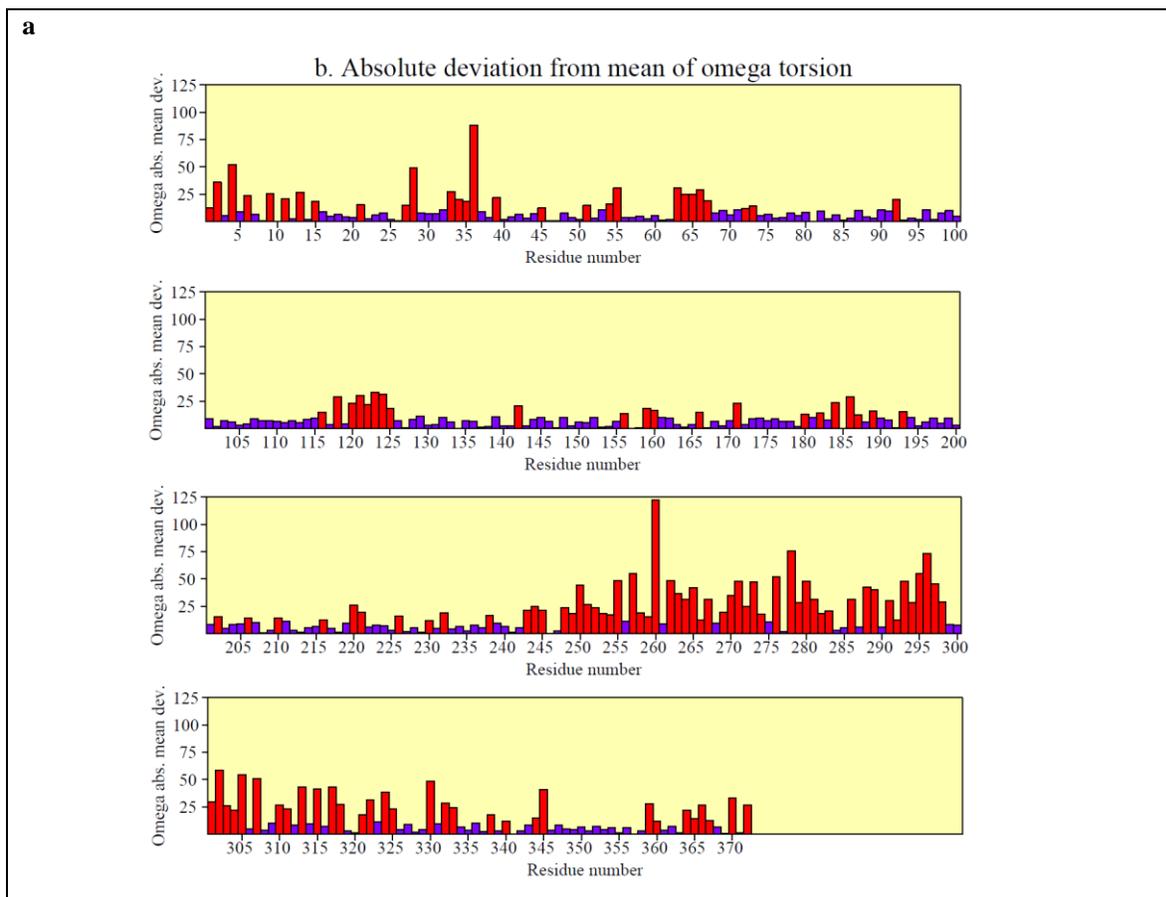
Cada quadrado nos diagramas representa um resíduo de aminoácido, sendo os que aparecem na cor amarela aqueles que apresentam uma configuração favorável de sua cadeia lateral, enquanto aqueles que aparecem em vermelho encontram-se em uma configuração pouco favorável.

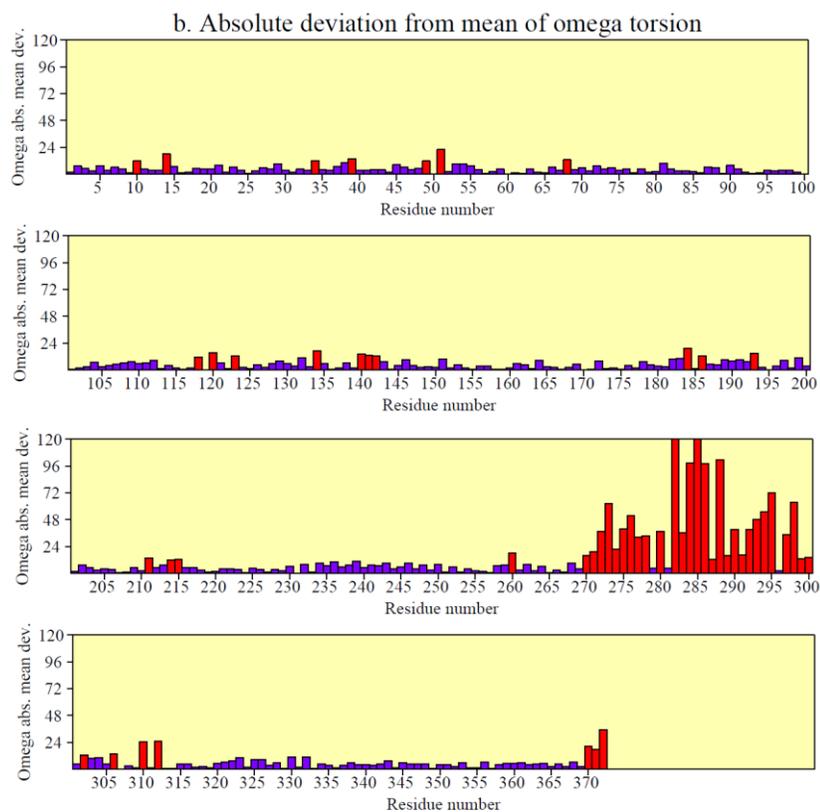
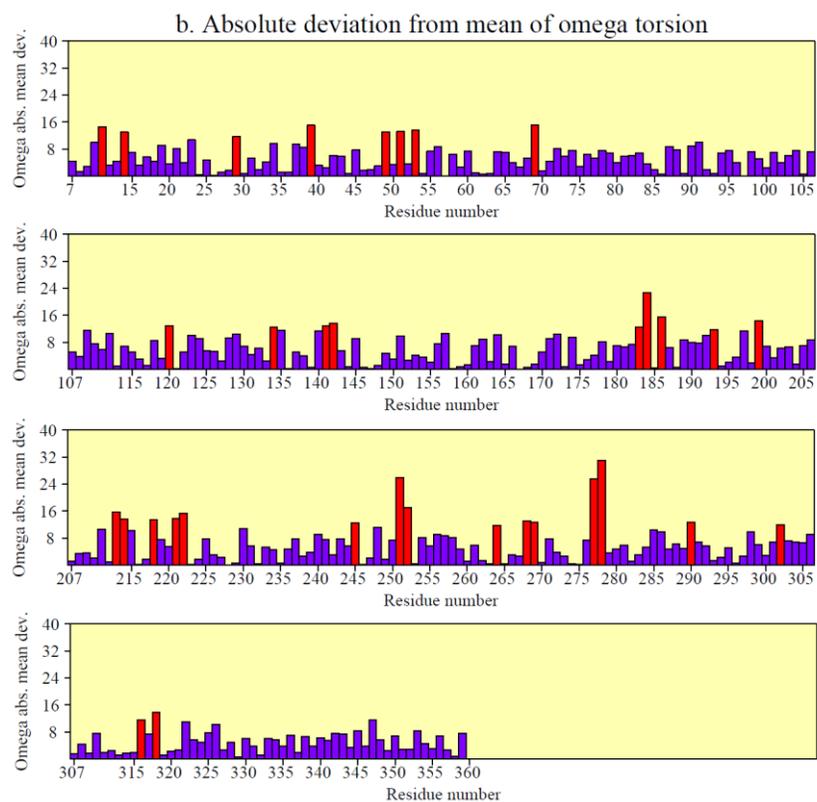
Os resíduos que aparecem em vermelho e com seu número na cadeia polipeptídica demarcado acima de seu quadrado são considerados *outliers* de ângulos Chi1-Chi2.

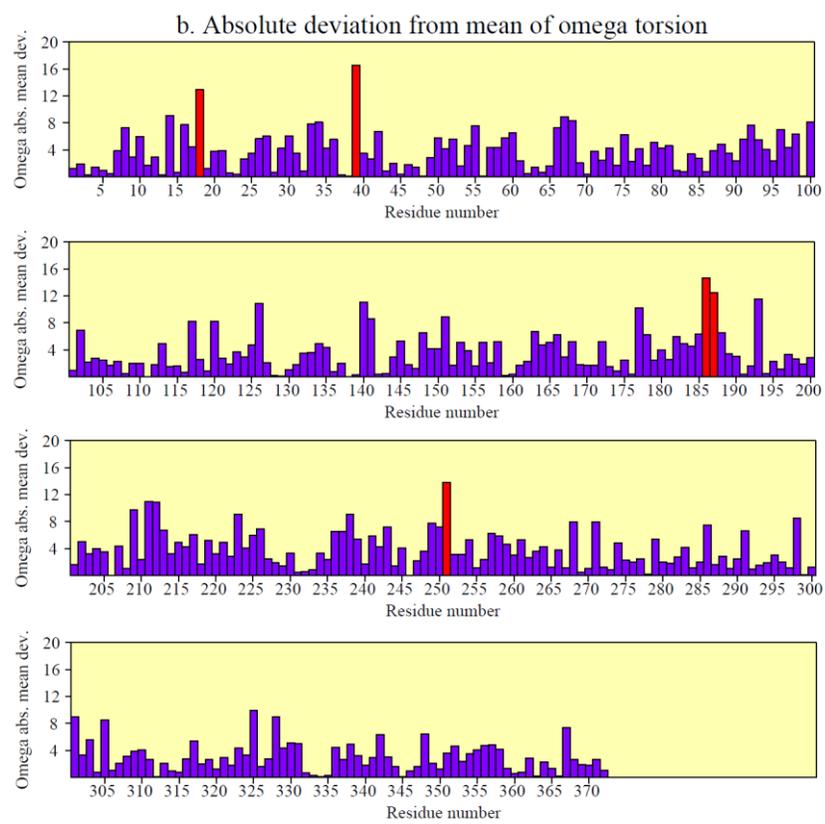
Diagramas elaborados pelo autor por meio da plataforma PROCHECK do servidor SAVES.

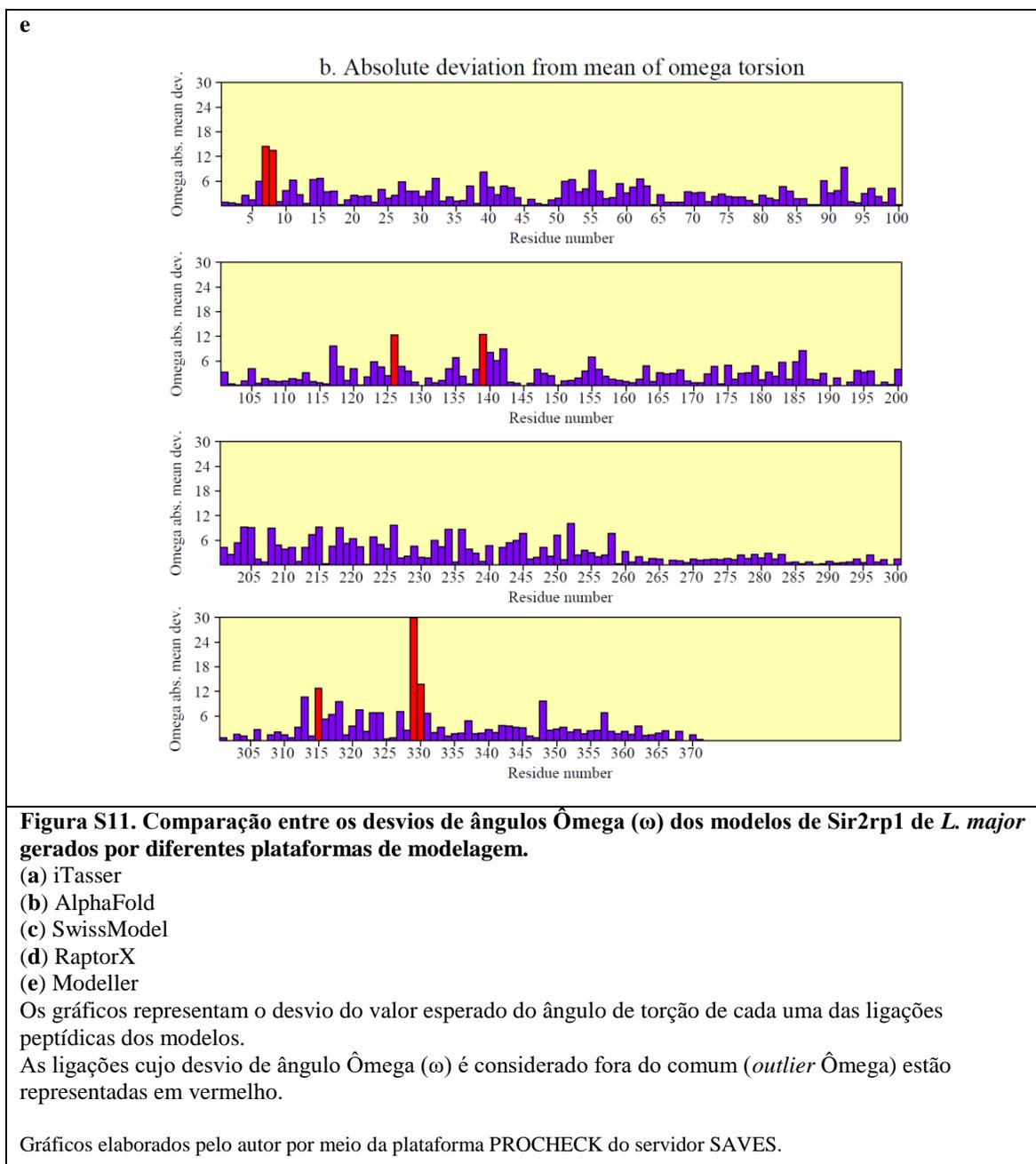
Ao analisar os diagramas de ângulos Chi1-Chi2 para os modelos de Sir2rp1 de *L. major* gerados por plataformas de modelagem diferentes (Figura S10), podemos observar que, curiosamente, o modelo gerado por meio da plataforma RaptorX, que apresentou o melhor resultado em termos de diagrama de Ramachandran (Figura S9d), apresentou o pior resultado de diagramas de ângulos Chi1-Chi2, estando todos os seus resíduos de aminoácidos com configurações estereoquímicas desfavoráveis em suas cadeias laterais (Figura S10d). Neste caso, o modelo que apresentou a melhor qualidade estereoquímica das cadeias laterais de seus resíduos de aminoácidos foi aquele gerado pelo AlphaFold (Figura S10b), porém, com exceção do modelo gerado pelo RaptorX, todos os modelos apresentaram qualidade estereoquímica das cadeias laterais de seus resíduos aceitável (GOMES, 2021; HOOFT et al., 1996; LASKOWSKI et al., 1993; WILLIAMS et al., 2018).

S2.3 Desvios de ângulos $\hat{\Omega}$ dos modelos de *Sir2rp1* de *L. major*



b**c**

d



Ao analisar os gráficos de desvio de ângulos $\hat{\omega}$ para os modelos de Sir2rp1 de *L. major* gerados por plataformas de modelagem diferentes (Figura S11), podemos observar que o único modelo cujo resultado indica uma baixíssima qualidade estereoquímica de suas ligações peptídicas é aquele gerado pelo iTasser (Figura S11a). Através dessa análise, podemos inferir que a plataforma AlphaFold apresenta uma dificuldade considerável na predição com qualidade da estrutura tridimensional dos resíduos de aminoácidos que compõem a grande alça

desordenada presente nas Sir2rp1 de Tripanosomatídeos (Figura S11b, reparar nos resíduos de número 270 a 300, Figura 11, reparar na hélice $\alpha 12$, Figuras 25f e 29d). Neste caso, o modelo que apresentou a maior qualidade em termos da estereoquímica de suas ligações peptídicas foi aquele gerado pela plataforma RaptorX, apresentando apenas cinco *outliers* de ângulos Ômega (Figura S11d). O modelo gerado pelo *software* Modeller também apresentou um resultado satisfatório, com apenas sete *outliers* de ângulos Ômega. Como discutido anteriormente, para os diagramas de Ramachandran, considerando cada caso de enovelamento como sendo único, o microambiente local de cada resíduo da cadeia individualmente, as interações químicas e estéricas entre as cadeias laterais dos mesmos e outras possíveis perturbações da estereoquímica e casos especiais, como a presença de ligantes, é comum observar alguns resíduos com desvio de ângulos Ômega (ω) maiores do que o esperado, mesmo em estruturas resolvidas por técnicas empíricas e modelos de altíssima qualidade (GOMES, 2021; HOOFT et al., 1996; LASKOWSKI et al., 1993; WILLIAMS et al., 2018).

S3. ESTUDO DOS PARÂMETROS DE SIMULAÇÃO DE DM E DE DIFERENTES CAMPOS DE FORÇA

S3.1 Estudo preliminar dos campos de força OPLS-AA/M e GROMOS54a7

Inicialmente foram realizados alguns experimentos para determinar o campo de força mais adequado para a parametrização dos modelos aqui estudados. Primeiro, consideramos o campo de força OPLS-AA/M para a condução das simulações de DM, porém este campo de força não apresenta parâmetros para o íon de zinco(II), presente na estrutura das Sirtuínas, e resultados preliminares de simulações conduzidas com este produziram modelos de baixa qualidade, então optamos por experimentar com outros campos de força (ROBERTSON; TIRADO-RIVES; JORGENSEN, 2015).

Em seguida foram conduzidos experimentos com o campo de força GROMOS54a7, porém apesar de apresentar parâmetros para o íon de zinco, este não possui parâmetros para as cisteínas aniônicas que formam um complexo com o mesmo na estrutura das Sirtuínas, então apesar das simulações conduzidas com

este campo de força produzirem modelos de ótima qualidade, concluímos não ser adequado para a parametrização dos modelos estudados neste trabalho (HUANG; LIN; VAN GUNSTEREN, 2011).

S3.2 Estudos preliminares com o campo de força CHARMM36

O próximo campo de força testado, CHARMM36, não só apresenta parâmetros para ambos o íon de zinco e os cisteínatos que formam o complexo com o mesmo, mas também possui parâmetros para a molécula do co-substrato das Sirtuínas, o NAD⁺. Primeiramente, as simulações conduzidas com este campo de força produziram modelos de qualidade geral mediana. Porém, uma análise mais minuciosa revelou dois problemas maiores (HUANG; MACKERELL, 2013).

O primeiro problema foi que a parametrização do íon de zinco deste campo de força leva invariavelmente a formação de um complexo octaédrico, com seis ligantes coordenados ao íon, mesmo partindo de um modelo com geometria tetraédrica tendo o íon complexado com quatro cisteínas aniônicas (Figura S12a-b). A configuração octaédrica para o Zn²⁺ de fato ocorre, dependendo dos ligantes envolvidos em sua coordenação, e é comumente observada quando o íon encontra-se simplesmente solvatado em meio aquoso (coordenado com seis moléculas de água). Porém, considerando sua característica de um metal mole, quando coordenado a ligantes moles, como átomos de enxofre, estes formam um complexo altamente estável, deformando suas nuvens eletrônicas e doando bastante densidade eletrônica para o íon metálico. Sabe-se que, quando coordenado a quatro átomos de enxofre aniônicos, o íon de zinco(II) torna-se praticamente inerte, sendo termodinamicamente difícil a quebra do complexo ou introdução de novos ligantes e conseqüente alteração do número de coordenação do íon, tanto pelo efeito de forte doação de densidade eletrônica dos ligantes para o metal, como pelo impedimento estérico provocado pelo grande volume dos átomos de enxofre. Além do mais, as estruturas de proteínas contendo domínios de ligação ao zinco(II) disponíveis na literatura mostram que a geometria de coordenação mais comum para este íon em metaloproteínas é a tetraédrica, e ainda que quando coordenado a pelo menos três átomos de nitrogênio ou de enxofre, a geometria octaédrica não é observada (SAKHAROV; LIM, 2005, 2009; STOTE; KARPLUS, 1995;

TJÖRNHAMMAR; EDHOLM, 2010; TRZASKOWSKI; ADAMOWICZ; DEYMIER, 2007).

O segundo problema envolvido no uso do campo de força CHARMM36 está relacionado com a parametrização da molécula de NAD⁺. Nas simulações conduzidas com este campo de força, a molécula do co-substrato apresentou mudanças conformacionais em desacordo com a literatura, onde seu grupamento pirofosfato assume uma configuração syn, com seus átomos de oxigênio eclipsados em uma conformação termodinamicamente desfavorável e incomum em complexos com proteínas. Adicionalmente, tal mudança conformacional leva o anel da ribose N a assumir uma orientação invertida, com relação àquelas observadas em modelos experimentais de Sirtuínas, o que posiciona o anel da nicotinamida em uma pose que também não ocorre nas estruturas elucidadas experimentalmente (Figura S12c-d), o que pode ser explicado pelo fato de que a parametrização dos grupos pirofosfato no campo de força CHARMM36 foi derivada de experimentos em solução aquosa, tendo como base a molécula de metildifosfato. Logo, optamos por descartar a possibilidade de uso deste campo de força (FINNIN; DONIGIAN; PAVLETICH, 2001; GERTZ et al., 2013; HOFF et al., 2006; MONIOT; SCHUTKOWSKI; STEEGBORN, 2013; NGUYEN et al., 2013; PAVELITES et al., 1997; RUMPF et al., 2015a, 2015b; SCHIEDEL et al., 2016; SMITH; TANNER, 2000).

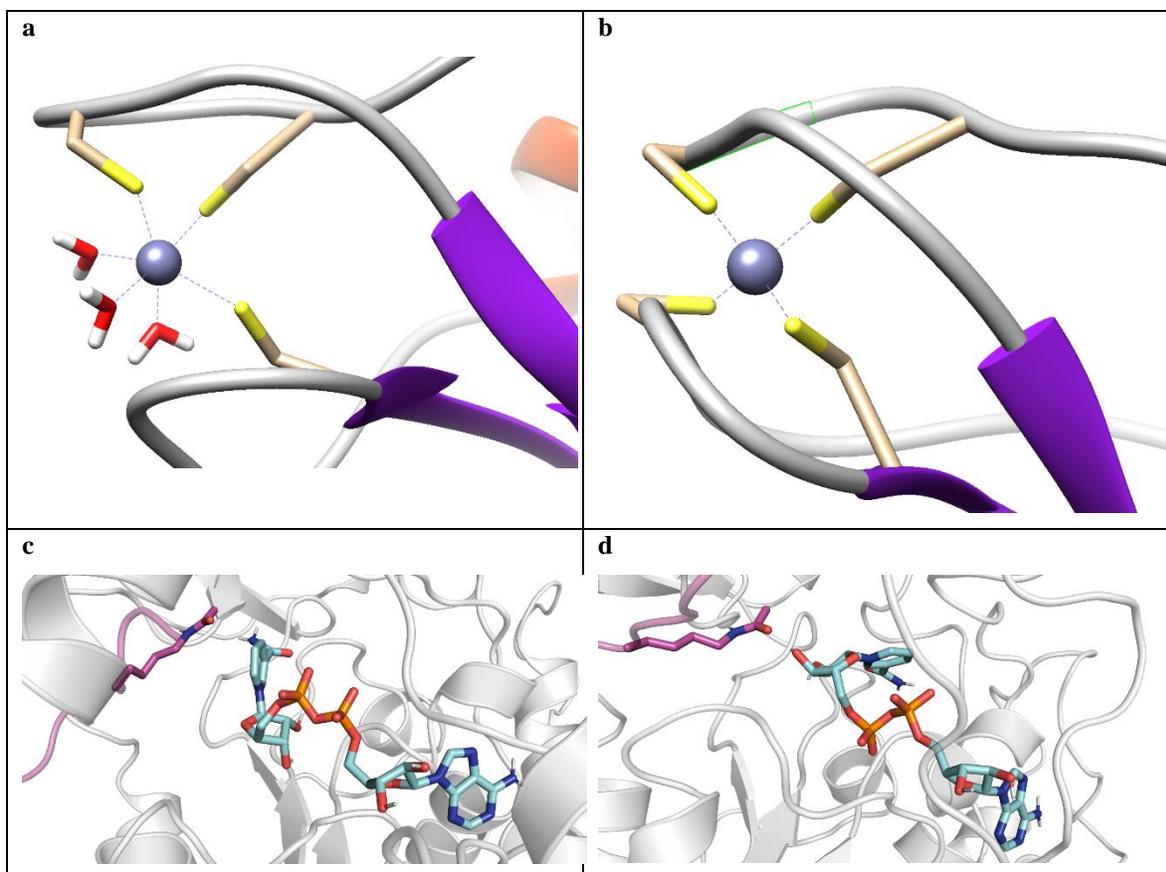


Figura S12. Comparação estrutural do modelo de Sir2rp1 de *L. major* após simulação de Dinâmica Molecular com os campos de força CHARMM36 e AMBER99SB-ILDN.

(a) Geometria de coordenação octaédrica do íon de zinco(II) após simulação de DM de 200ns com o campo de força CHARMM36. Note que neste modelo uma das quatro cisteínas foi substituída na esfera de coordenação do metal por uma molécula de água, fenômeno extremamente improvável. O desvio quadrático médio (RMSD) de uma geometria octaédrica ideal é de 0,270 Å.

(b) Geometria de coordenação tetraédrica do íon de zinco(II) após simulação de DM de 800ns com o campo de força AMBER99SB-ILDN. O desvio quadrático médio (RMSD) de uma geometria tetraédrica ideal é de 0,107 Å.

(c) Conformação do co-substrato NAD⁺ na representação do tipo bastões na cor ciano, após simulação de DM de 200ns com o campo de força CHARMM36. Note que neste modelo o grupamento pirofosfato encontra-se na configuração syn, isto é, com seus átomos de oxigênio eclipsados, e os grupos ribose N e nicotinamida apresentam uma pose incomum para modelos de Sirtuína.

(d) Conformação da molécula de NAD⁺ na representação do tipo bastões na cor ciano, após simulação de DM de 800ns com os campos de força AMBER99SB-ILDN e GAFF. Note que neste modelo a pose do co-substrato é verossímil em relação àquelas observadas na literatura.

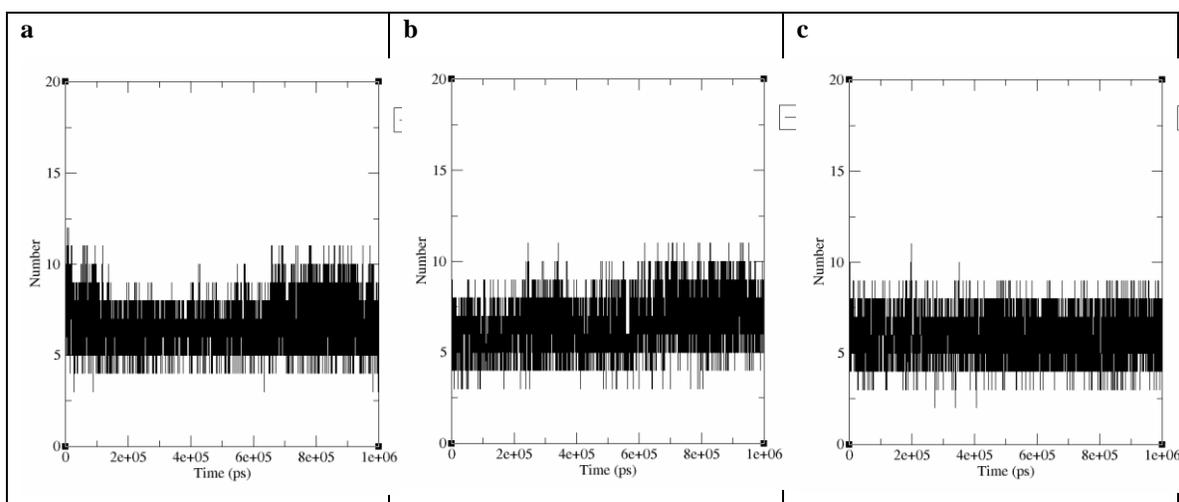
Imagens elaboradas pelo autor por meio dos *softwares* UCSF-Chimera (a e b) e PyMol (c e d).

S3.3 Estudos preliminares com o campo de força AMBER99SB-ILDN

Os experimentos de Dinâmica Molecular conduzidos com os campos de força AMBER99SB-ILDN e GAFF resultaram em modelos de Sir2rp1 de boa qualidade, apresentando consistentemente uma geometria de coordenação tetraédrica entre o íon de zinco estrutural e os cisteínatos das enzimas, as poses assumidas pela molécula do co-substrato também se mostraram em concordância com a literatura e as estruturas secundárias dos modelos se mantêm prevalentemente estáveis (ver Figuras 26, 27 e 29) (FERREIRA, 2019; FINNIN; DONIGIAN; PAVLETICH, 2001; GERTZ et al., 2013; GOMES, 2021; HOFF et al., 2006; LEMKUL, 2019; LINDORFF- LARSEN et al., 2010; MONIOT; SCHUTKOWSKI; STEEBORN, 2013; NGUYEN et al., 2013; RUMPF et al., 2015a, 2015b; SCHIEDEL et al., 2016; WANG et al., 2004).

S4. ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS MODELOS DE SIRTUÍNA CONSTRUÍDOS

S4.1 *Gráficos de variação do número de ligações de hidrogênio formadas entre o modelo construído de Sir2rp1 de L. major e seu substrato peptídico ao longo das simulações conduzidas*



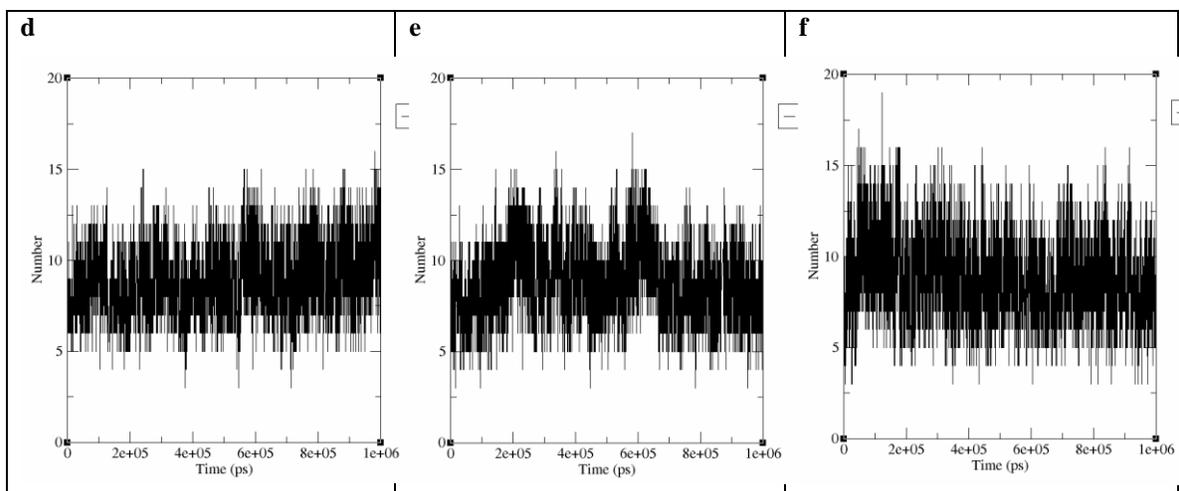


Figura S13. Gráficos de variação do número de ligações de hidrogênio formadas entre o modelo de Sir2rp1 de *L. major* e o substrato peptídico fragmento do peptídeo p53 acetilado complexado ao mesmo ao longo das replicatas das simulações de DM conduzidas com e sem restrições de posicionamento.

É possível observar que o número de ligações de hidrogênio formadas entre o modelo e seu substrato peptídico se mantém bastante estável entre as replicatas:

Entre 6 e 7 ligações no primeiro conjunto de simulações (**a**, **b** e **c**) conduzidas com restrições de posicionamento impostas aos seus ligantes;

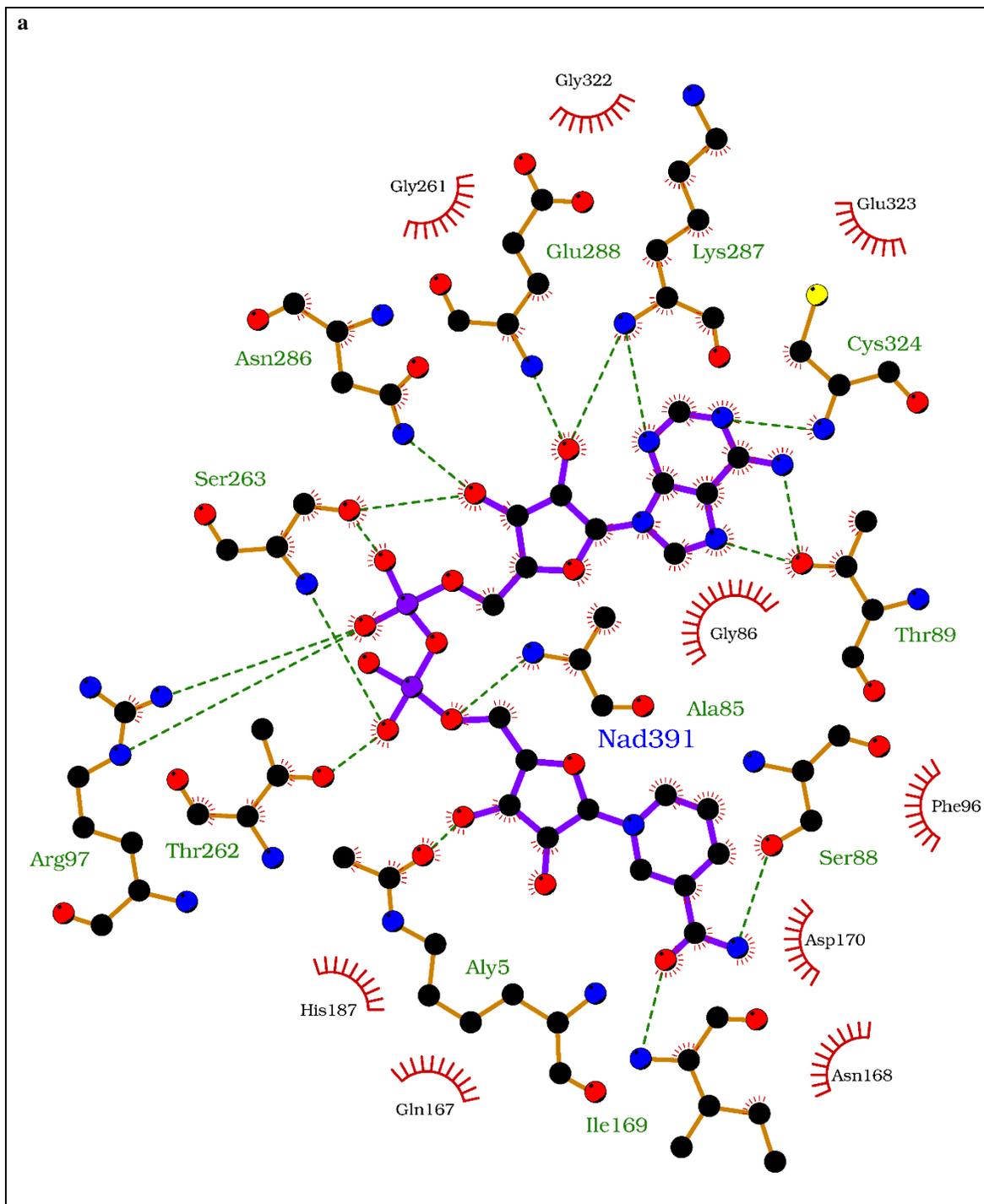
E entre 7 e 12 ligações no segundo (**d**, **e** e **f**), isto é, conduzidas sem restrições de posicionamento impostas aos seus ligantes.

É interessante notar que o conjunto de simulações conduzidas sem restrições de posicionamento apresenta uma variação maior do número de ligações de hidrogênio, além de haver ocorrido um aumento do número médio das mesmas em relação ao conjunto anterior, condizente com a ausência das restrições.

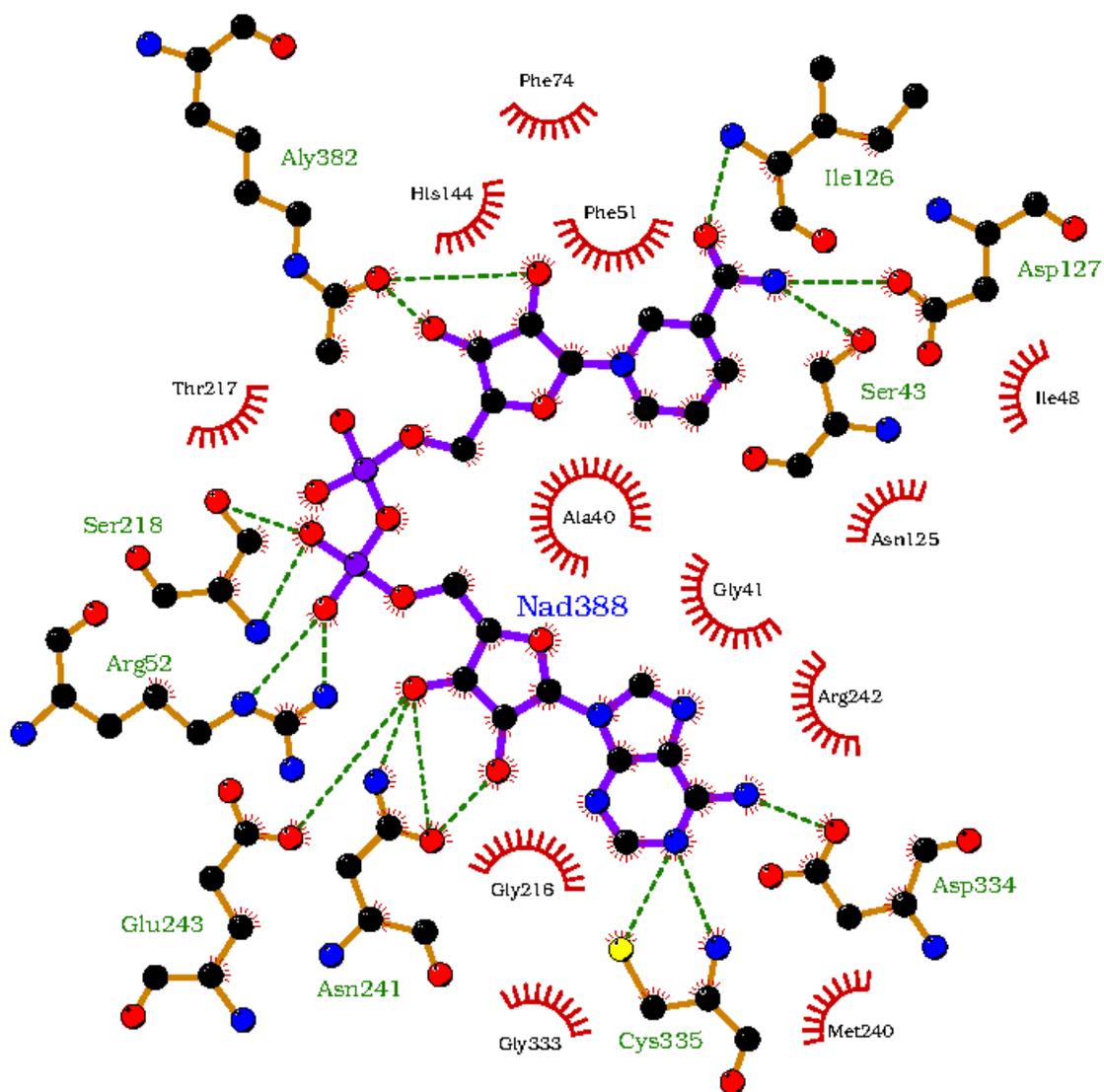
Os gráficos de variação do número de ligações de hidrogênio formadas entre o modelo de Sir2rp1 de *L. major* e o co-substrato NAD⁺ complexado ao mesmo ao longo das replicatas das simulações de DM conduzidas com e sem restrições de posicionamento são expostos na Figura 28.

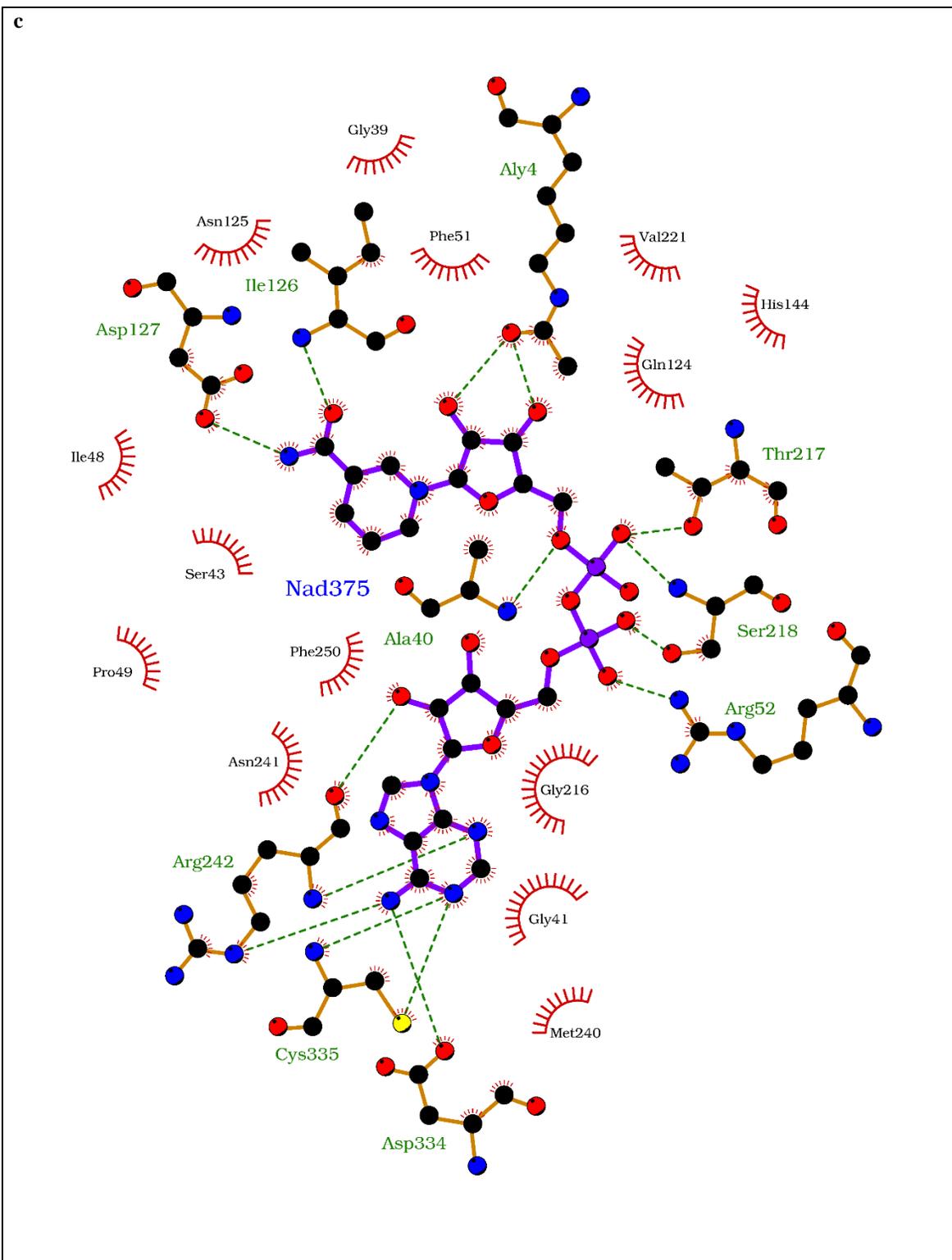
Figura elaborada pelo autor por meio do módulo hbond do pacote GROMACS e do *software* XMGrace.

S4.2 Diagramas de interação entre os ligantes naturais das Sirtuínas e as estruturas enzimáticas modeladas e refinadas



b





d

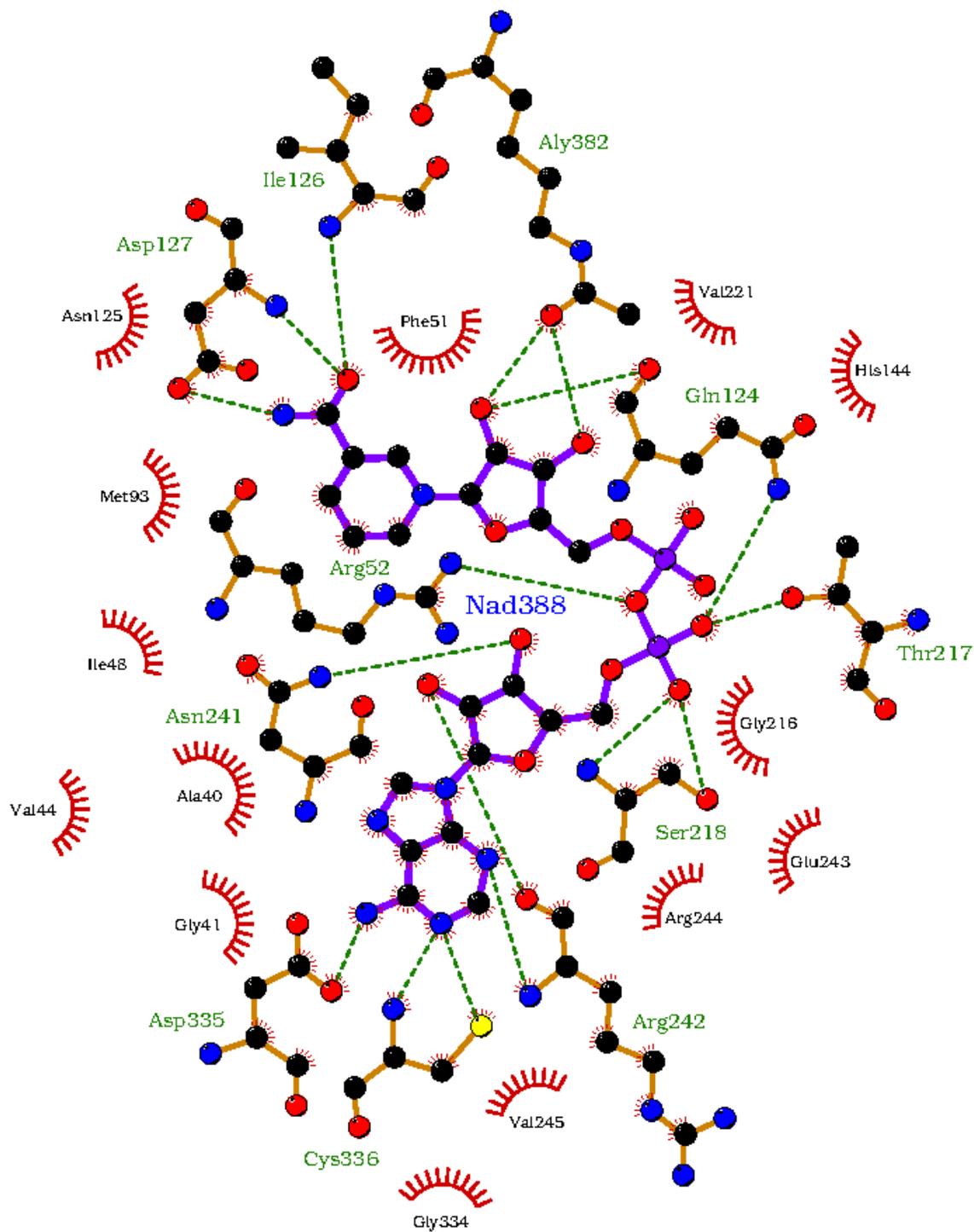


Figura S14. Diagramas de interação entre os modelos refinados de hSIRT2 e Sir2rp1 de *L. infantum*, *L. major* e *L. braziliensis* e seu co-substrato NAD⁺.

(a) hSIRT2

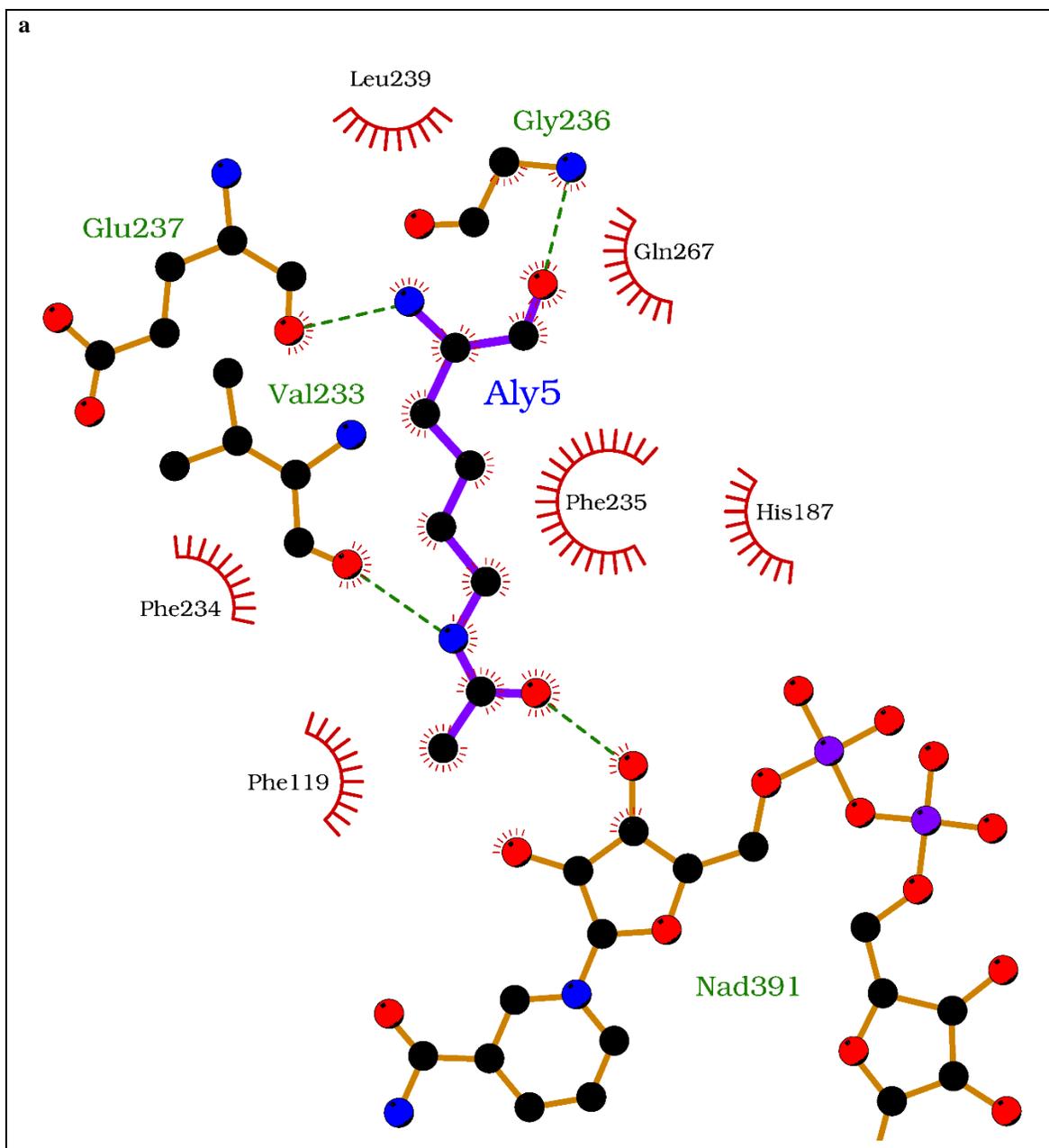
(b) *L. infantum*

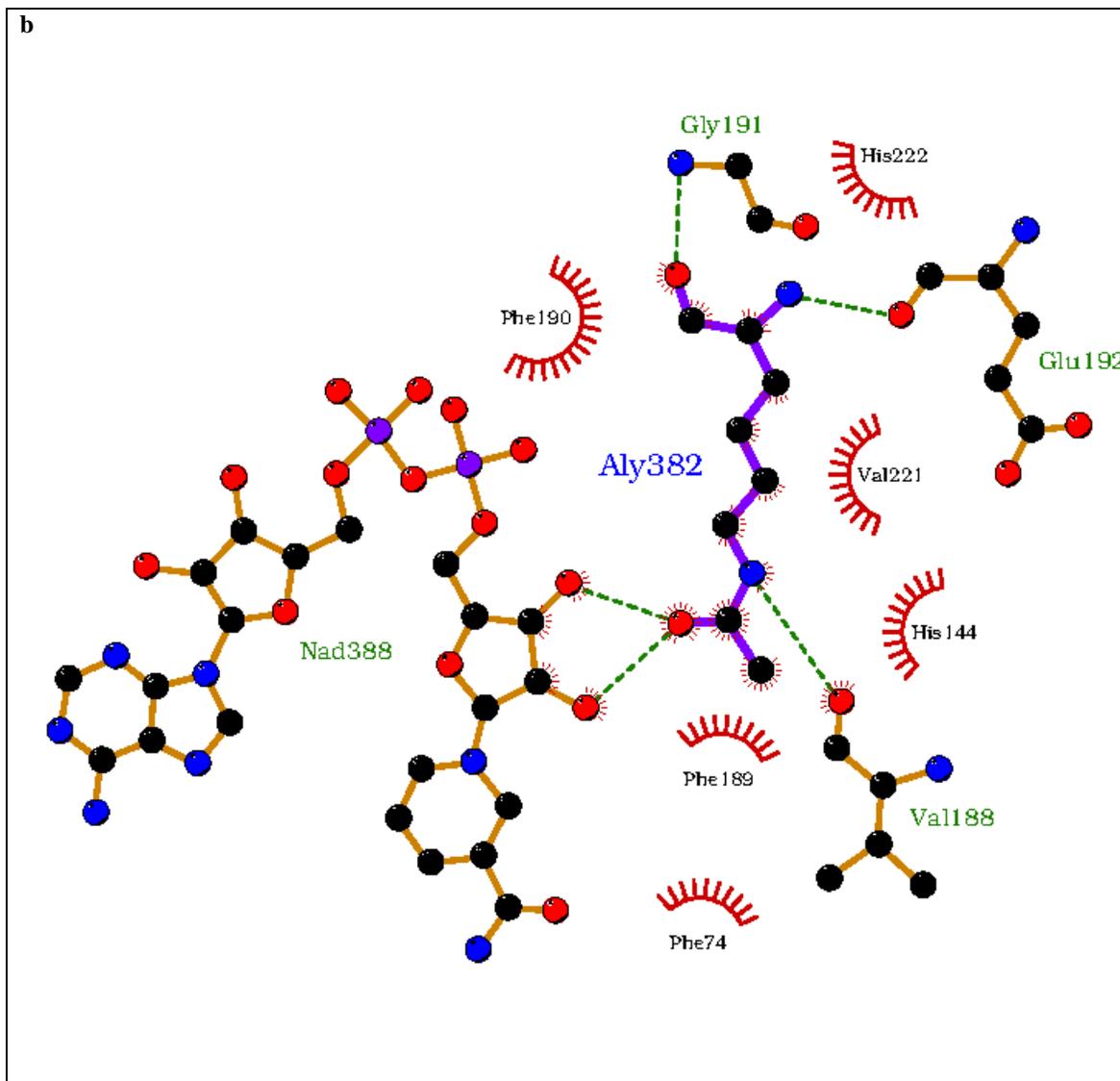
(c) *L. major*

(d) *L. braziliensis*

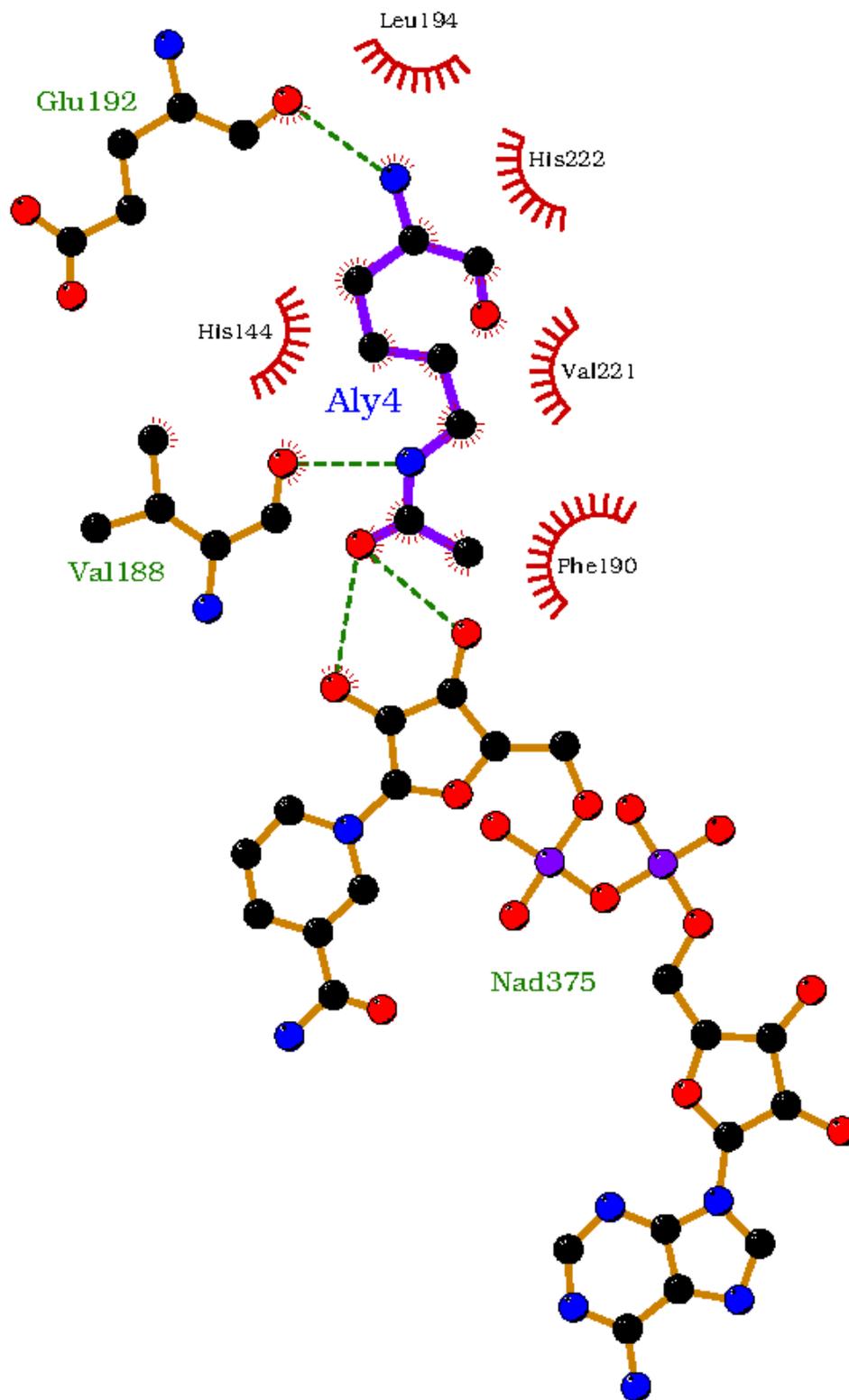
O co-substrato NAD⁺ está representado em bastões, com suas ligações covalentes na cor magenta. Os resíduos de aminoácidos que interagem com o ligante estão indicados com seu código de três letras e seu número na sequência das respectivas enzimas, em verde os que estabelecem interações polares e em preto os que estabelecem interações hidrofóbicas. Os resíduos que estabelecem ligações de hidrogênio e pontes salinas com o co-substrato estão representados em bastões, com suas ligações covalentes na cor marrom. Os átomos de oxigênio estão representados como esferas de cor vermelha, os átomos de nitrogênio na cor azul, átomos de carbono na cor preta, átomos de fósforo na cor magenta e átomos de enxofre em amarelo. Já os resíduos que estabelecem interações hidrofóbicas estão representados como arcos vermelhos estrelados. Ligações de hidrogênio e pontes salinas estão representadas como linhas tracejadas verdes, enquanto que interações hidrofóbicas estão representadas como pequenos traços vermelhos em torno dos átomos envolvidos nas mesmas, apontando na direção do(s) átomo(s)/resíduo(s) com o(s) qual(is) essas interações são formadas.

Figura elaborada pelo autor por meio do *software* LigPlotPlus.





c



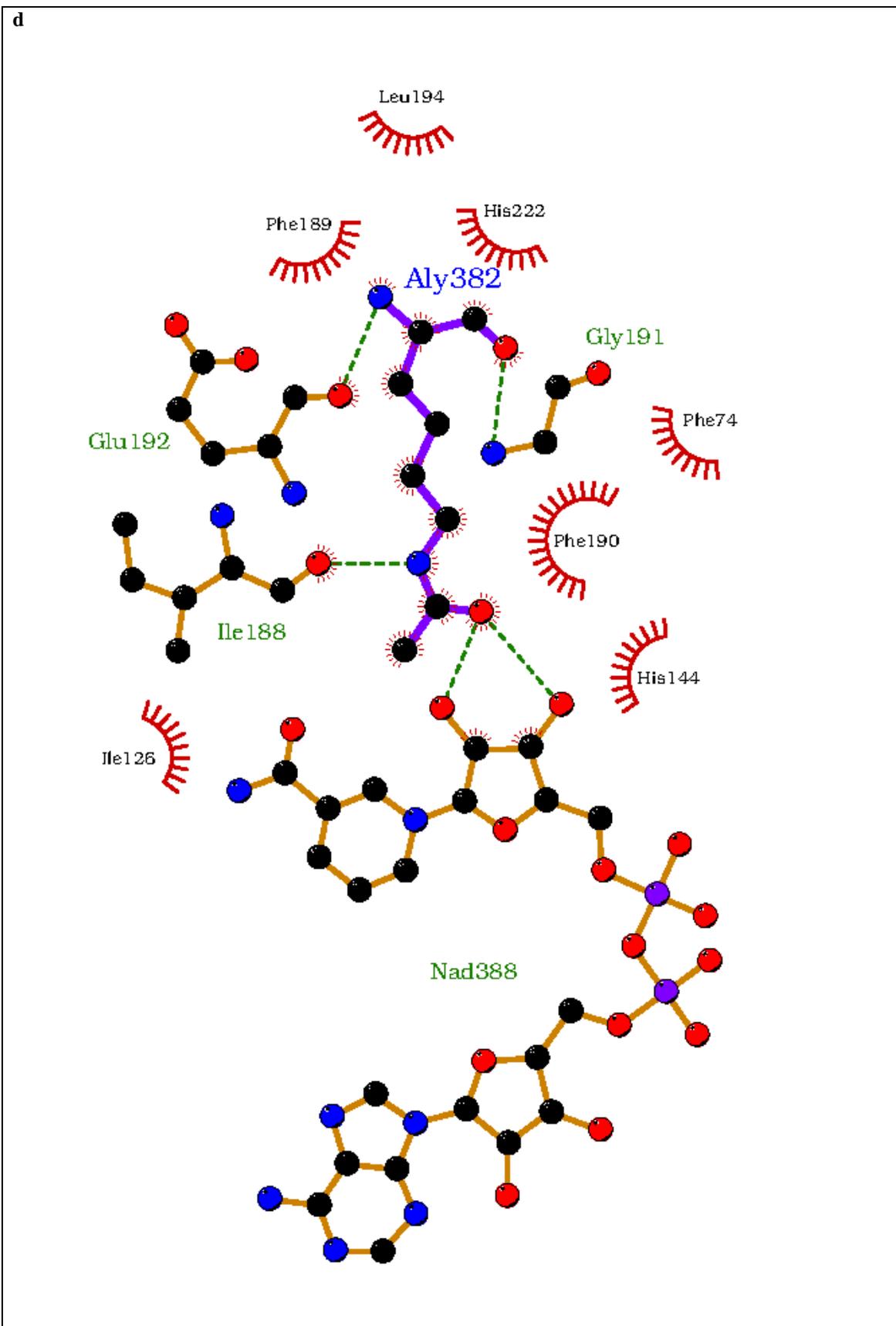


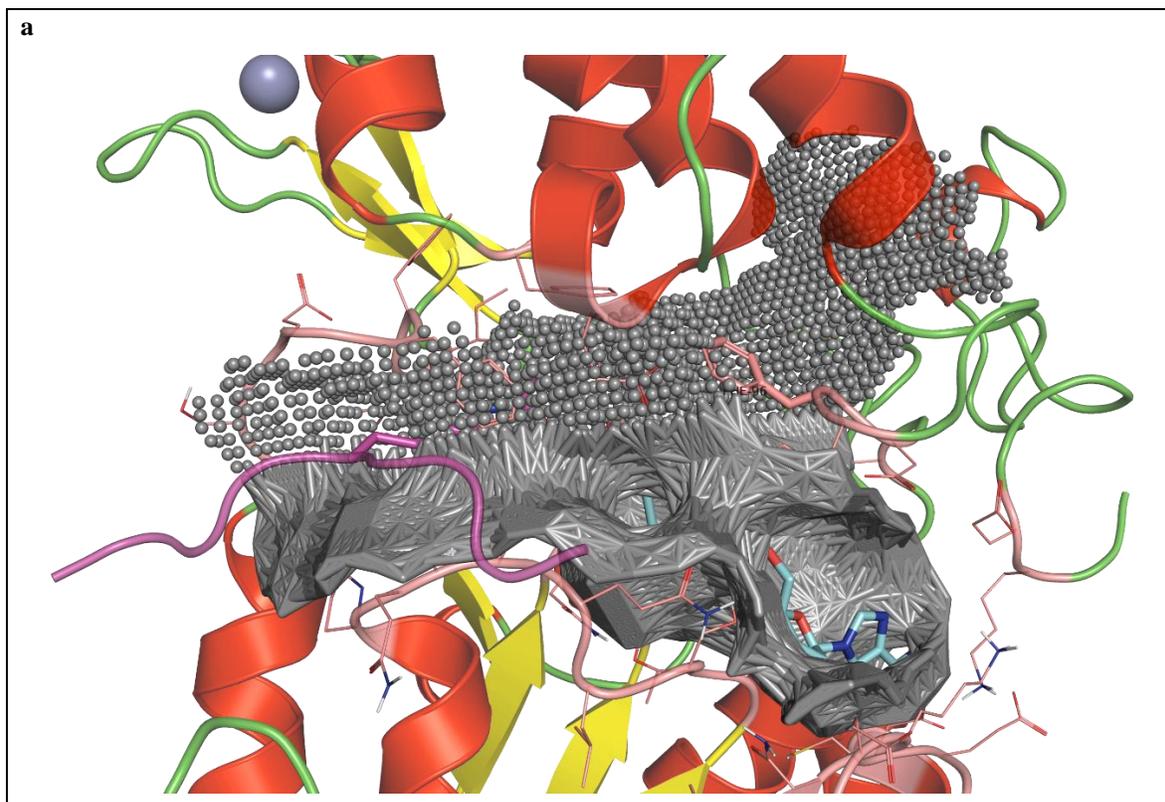
Figura S15. Diagramas de interação entre os modelos refinados de hSIRT2 e Sir2rp1 de *L. infantum*, *L. major* e *L. braziliensis* e o resíduo de lisina acetilada de seu substrato peptídico.

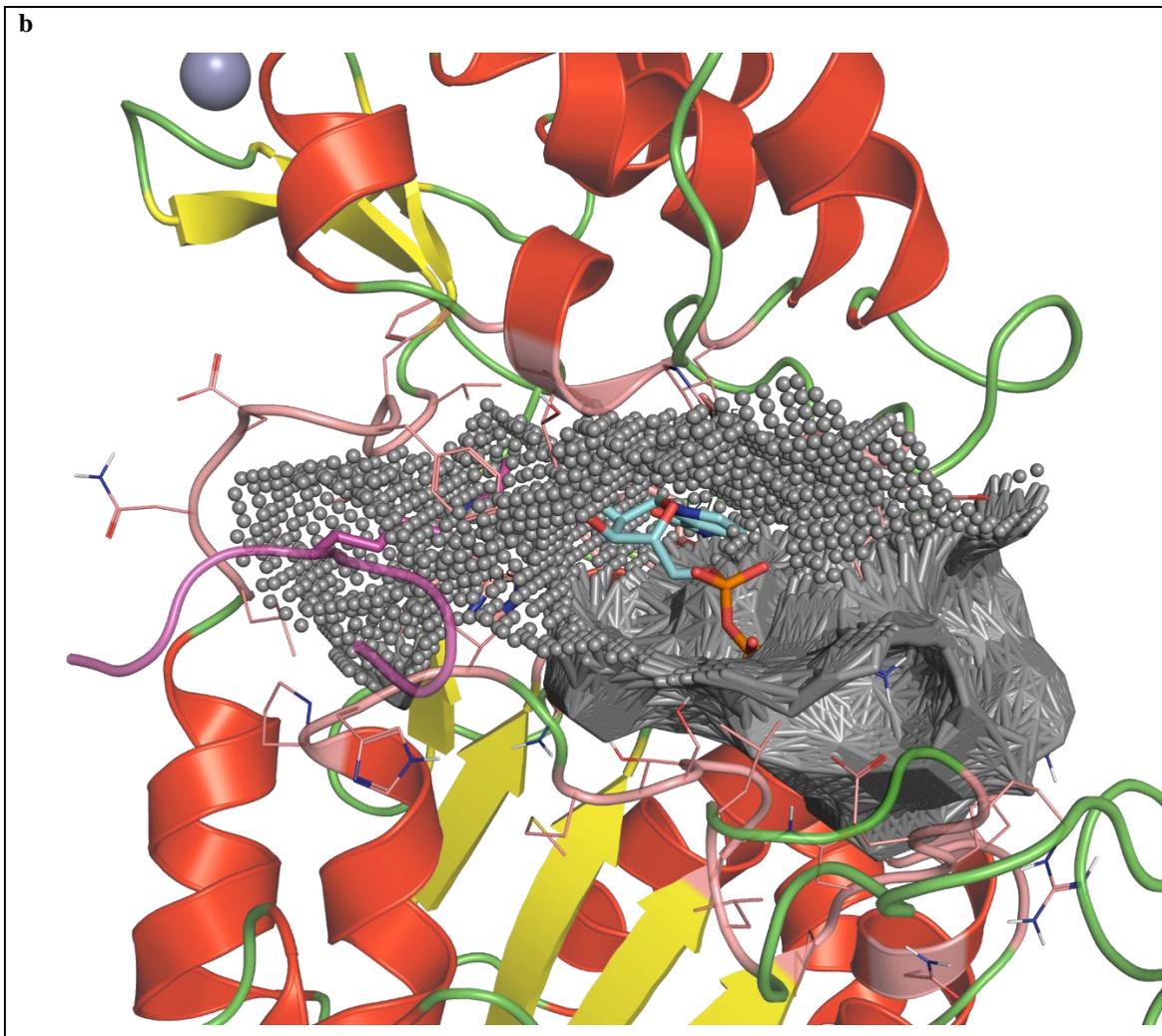
- (a) hSIRT2
- (b) *L. infantum*
- (c) *L. major*
- (d) *L. braziliensis*

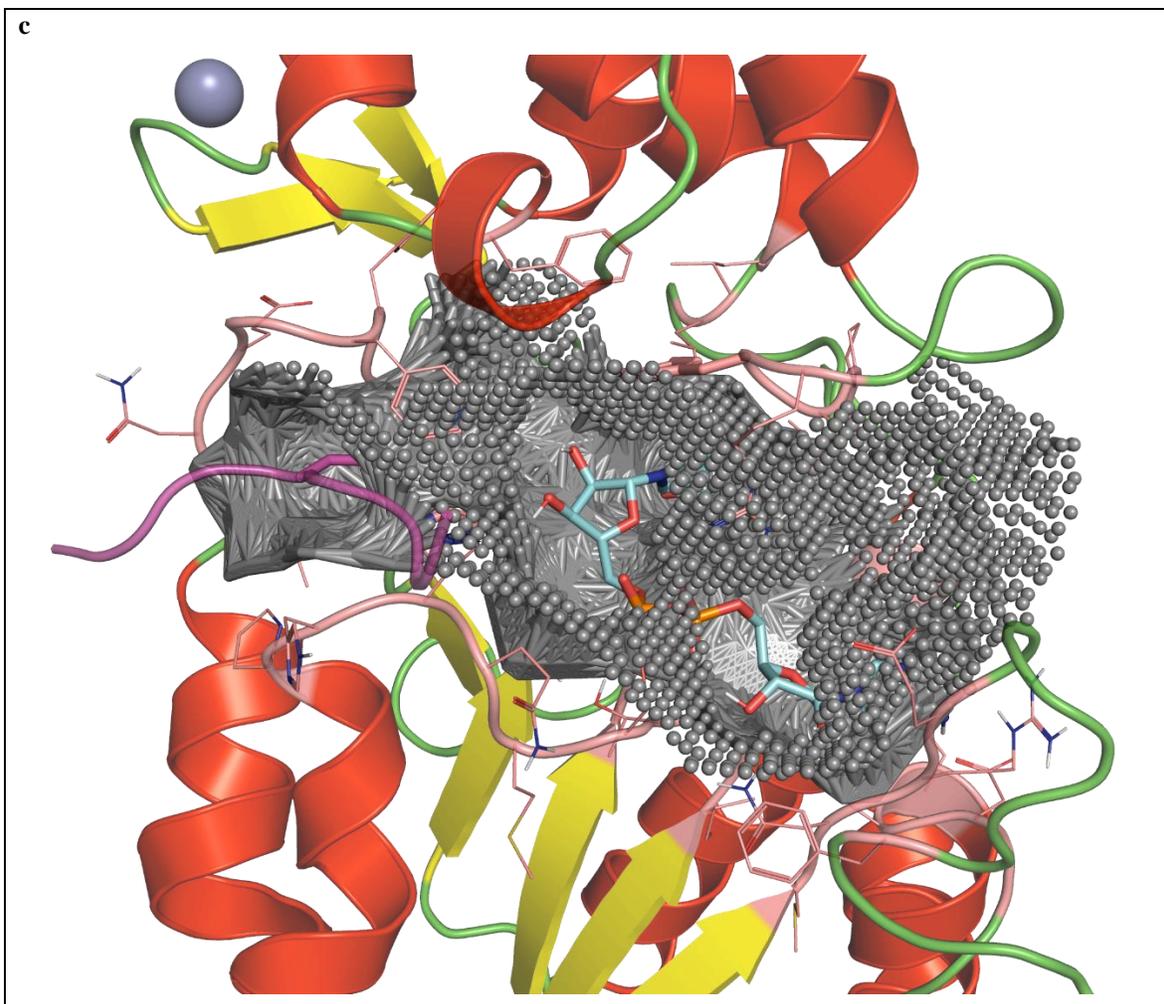
O resíduo de lisina acetilada do substrato peptídico está representado em bastões, com suas ligações covalentes na cor magenta. Os resíduos de aminoácidos que interagem com o ligante estão indicados com seu código de três letras e seu número na sequência das respectivas enzimas, em verde os que estabelecem interações polares e em preto os que estabelecem interações hidrofóbicas. Os resíduos que estabelecem ligações de hidrogênio e pontes salinas com o substrato estão representados em bastões, com suas ligações covalentes na cor marrom. Os átomos de oxigênio estão representados como esferas de cor vermelha, os átomos de nitrogênio na cor azul, átomos de carbono na cor preta e os átomos de fósforo na cor magenta. Já os resíduos que estabelecem interações hidrofóbicas estão representados como arcos vermelhos estrelados. Ligações de hidrogênio e pontes salinas estão representadas como linhas tracejadas verdes, enquanto que interações hidrofóbicas estão representadas como pequenos traços vermelhos em torno dos átomos envolvidos nas mesmas, apontando na direção do(s) átomo(s)/resíduo(s) com o(s) qual(is) essas interações são formadas.

Figura elaborada pelo autor por meio do *software* LigPlotPlus.

S4.3 Representação gráfica da cavidade formada pelo sítio catalítico das estruturas de Sirtuínas modeladas e refinadas







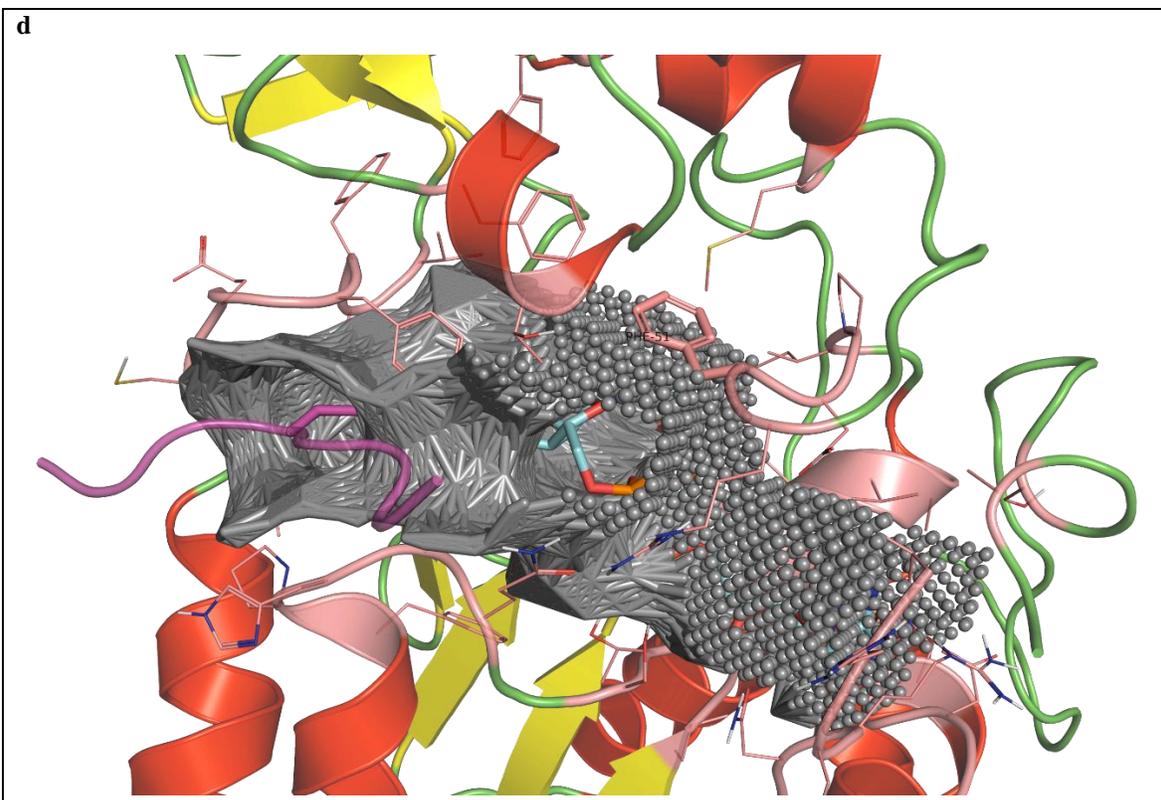


Figura S16. Ilustração da análise dos sítios de ligação aos substratos dos modelos refinados de hSIRT2 e Sir2rp1 de *L. infantum*, *L. major* e *L. braziliensis* realizada por meio do servidor CavityPlus.

(a) hSIRT2: Volume da cavidade = 2284.62 Å³; Área superficial da cavidade = 1782.50 Å².

(b) *L. infantum*: Volume da cavidade = 1828.62 Å³; Área superficial da cavidade = 1374.75 Å².

(c) *L. major*: Volume da cavidade = 1984.62 Å³; Área superficial da cavidade = 1451.50 Å².

(d) *L. braziliensis*: Volume da cavidade = 1050.12 Å³; Área superficial da cavidade = 1106.00 Å².

As hélices α estão representadas na cor vermelha, as fitas β em amarelo e as alças e voltas na cor verde, na representação do tipo *cartoon*.

A área superficial dos bolsos de ligação aos substratos enzimáticos está representada em cinza.

Um substrato peptídico contendo um resíduo de lisina *N*-acetilada (segmento do antígeno tumoral celular p53) está representado com seus átomos da cadeia principal e os carbonos da cadeia lateral de lisina em magenta, nas representações do tipo *cartoon* e bastões, respectivamente.

O co-substrato NAD⁺ está representado em ciano, na forma de bastões.

As cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos relevantes são mostradas com seus átomos de carbono coloridos em salmão, nas representações dos tipos bastões e linhas.

Os átomos de nitrogênio estão representados em azul, oxigênio em vermelho, enxofre em amarelo e fósforo em laranja.

A esfera cinza translúcida é o íon estrutural de Zn²⁺ complexado com a enzima.

Figura elaborada pelo autor por meio do servidor CavityPlus e do *software* PyMol.