

## **Análise e aplicação da técnica de Docking Molecular no estudo de compostos fenólicos (especialmente antocianinas) e suas atuações nos marcadores de inflamação em mulheres na pós menopausa.**

**Palavra-chave: menopausa, antocianinas, proteínas, docking molecular.**

### **Autores(as):**

Giovana Mab Rios, FEA - Unicamp  
Professor Dr. Mário Roberto Maróstica  
Junior, Orientador, FEA - Unicamp

### **1. Introdução**

A menopausa ocorre por volta dos 50 anos de idade nas mulheres e é caracterizada pelo ciclo final da fisiologia ovariana, decorrente da depleção dos níveis de estrogênio. Sabe-se que o estrogênio pode apresentar propriedades antioxidantes, entretanto, tal queda implica em diversos efeitos que aumentam a inflamação crônica (Santoro et al., 2021). Conforme a realização de uma revisão bibliográfica para investigação dos principais biomarcadores inflamatórios presentes em mulheres na pós menopausa, a literatura aponta que a NF- $\kappa$ B e consistentemente as interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8), TNF- $\alpha$ , PCR e ER $\alpha$  exibem um nível mais elevado durante esse período, e portanto, influenciam no aumento de doenças cardiovasculares, disfunção endotelial, inflamação sistêmica e nos sintomas vasomotores.

As antocianinas são da subclasse dos flavonóides e são responsáveis pela coloração vermelha, roxa e azul e estão presentes, em altas concentrações, em frutas e vegetais como as frutas vermelhas (berries), uva, berinjela, repolho e cebola roxa (Garcia; Blesso, 2021).. Dado a revisão, foi viável analisar os efeitos das antocianinas nas vias de sinalização. Por apresentarem efeitos bioativos com alto poder antioxidante e anti-inflamatória, o consumo diário desse composto fenólico está associado a diversas funções benéficas à saúde humana, incluindo a redução de doenças crônicas. Além disso, podem promover a supressão de atividades enzimáticas e de células pró inflamatórias (Garcia; Blesso, 2021).

Dito isto, através da revisão bibliográfica, foi possível detectar as proteínas alvos que atuam na pós menopausa e, compreender as suas vias de sinalização e o modo de ação. E além disso, analisar as principais antocianinas presentes nos alimentos, para aplicação das técnicas de Docking Molecular para análise dos mecanismos de ação dos compostos bioativos sobre os marcadores de inflamação na pós menopausa. Permitindo assim, a avaliação e estimativa da afinidade de ligação entre proteína-ligante.

### **2. Metodologia**

Para a realização desse estudo, inicialmente foi feito uma revisão bibliográfica das antocianinas e das vias de sinalização de inflamação na pós menopausa. A pesquisa foi executada através de banco de dados como o PubMed, Science Direct, The journal of

menopause society e dentre outros. E a busca foi feita por meio de termos chaves como “antocianinas”, “composto fenólicos”, “menopausa”, “inflamação” e “anti-inflamatório”.

A próxima parte consistiu na utilização do Docking Molecular através do Software Autodock 4.2. No qual apresentou algumas etapas.

## 2.1 Banco de dados de proteínas e ligantes

O primeiro passo consistiu na determinação das proteínas biomarcadoras e nos ligantes. A partir de pesquisas, determinou-se os códigos específicos referentes às proteínas: ER $\alpha$  (PDB:1X7R), TNF- $\alpha$  (PDB: 2AZ5), NF-kB (PDB: 3GUT), PCR (PDB:1B09) e as interleucinas IL-1 $\beta$  (PDB: 4DEP), IL-6 (PDB: 1IL6) e IL-8 (PDB: 6WZM), obtidos através do Banco de Dados de Proteínas (PDB). Por sua vez, os ligantes caracterizados pelas antocianinas como a cianidina (CID: 441667), delphinidina (CID: 443650), malvidina (CID: 443652), peonidina (CID: 443654) e petunidina (CID: 443651), foram obtidos através do website PubChem com as estruturas no formato em 3D.

## 2.2 Preparo de proteínas e ligantes e Grid box

Inicialmente, para o preparo dos ligantes, realizou-se a detecção da posição ideal do ligante na proteína e determinação da quantidade de torções possível através do AutoDock.

Para a proteína, realizou-se a “limpeza” da molécula através da remoção de água, de ligantes e outros resíduos presentes. Em seguida, realizou-se a adição de hidrogênio, escolha de cadeias e sítios ativos, e reparação das macromoléculas, a fim de identificar e corrigir eventuais átomos ausentes.

Para analisar de forma cadeias e sítios ativos de cada analisadas, utilizou-se o website processo de verificação dos e localização do sítio ativo para se

Em seguida, a análise de feita a fim de obter dados de inibição. Além dos valores imagem gráfica da docagem para representado na Figura 1.

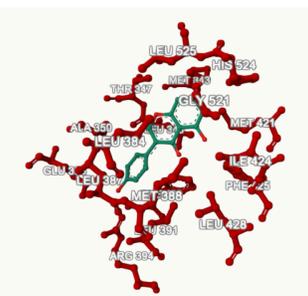


Figura 1. Aminoácidos e sítio ativo da cadeia A do ER- $\alpha$  (PDB: 1X7R).

mais ampla e encontrar as uma das proteínas a serem Prank Web, o qual auxiliou no principais aminoácidos envolvidos ligar à proteína pelo Grid Box.

docagem está pronta para ser energia de ligação e constante de numéricos, também é obtida a melhor visualização, como

## 3. Resultados e Discussão

A partir da revisão realizada sobre marcadores inflamatórios em mulheres na pós menopausa, estudos revelaram que as proteínas TNF- $\alpha$ , PCR, as interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-8), ER- $\alpha$  e NF-kB desempenham papéis importantes nas alterações fisiopatológicas durante a fase de transição entre a menopausa e pós menopausa. A ação do estrogênio é essencialmente mediada pelo receptor de estrogênio e sua queda compromete a ativação de ER $\alpha$ , promovendo o relaxamento do endotélio e aumentando o risco de inflamação crônica. De forma similar, níveis elevados de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 contribuem para um quadro de inflamação sistêmica, promovendo uma redução na atividade citotóxica de células de defesa do organismo. Além disso, a IL-6 demonstrou estar associada ao desenvolvimento de aterosclerose e doenças cardiovasculares (Chalopin et al., 2010; Gameiro et al, 2010). No que diz a respeito aos sintomas vasomotores, o TNF- $\alpha$  e IL-6 atuam como potentes vasodilatadores, enquanto os fogachos possuem ligação com aumento dos níveis séricos da

IL-8, mediada pela ativação das vias instigadas por TNF- $\alpha$  (Huang *et al.*, 2017). Ademais, a IL-6 e PCR estão relacionadas à disfunção endotelial, no qual inibem a síntese de óxido nítrico (NO), mecanismo que eleva o risco de doenças cardiovasculares (Teixeira *et al.*, 2014). O NF-kB desempenha um papel na regulação da expressão gênica envolvidas na inflamação. Sua ativação é induzida pelo estresse oxidativo e pelas citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6) (Vendrame; Klimis-Zacas, 2015).

Após a realização da docagem molecular com o software Autodock 4.2 entre as diferentes proteínas e os ligantes, obteve-se os resultados de energia de ligação, apresentados na Tabela 1.

Proteína/Ligante	ER $\alpha$ (1X7R)	TNF- $\alpha$ (2AZ5)	IL-1 $\beta$ (4DEP)	IL-6 (1IL6)	IL-8 (6WZM)	NF-kB (3GUT)	PCR (1B09)
Cianidina-3-O-glicosídeo	-7.66	-3.94	-1.77	-5.42	-5.85	-3.16	-7.17
Delfinidina-3-O-glicosídeo	-6.50	-3.68	-1.48	-5.19	-6.10	-3.84	-7.28
Malvidina-3-glicosídeo	-6.30	-3.47	-3.19	-5.59	-6.16	-3.60	-7.08
Petunidina-3-O-glicosídeo	-6.57	-3.12	-2.43	-5.50	-5.72	-2.70	-7.45
Peonidina-3-O-glicosídeo	-6.80	-3.26	-1.66	-5.46	-5.91	-3.58	-6.97

Sabe-se que quanto mais negativo o valor,

melhor será a afinidade com a proteína, e portanto, a partir da Tabela 1, é possível fazer a análise entre os resultados obtidos. Observando a interação ligantes-ER- $\alpha$ , conclui-se que as antocianinas apresentaram uma alta afinidade com a proteína. A cianidina destacou-se por apresentar a energia de ligação mais negativa, seguida pela peonidina. A análise das interações revelou que a cianidina forma 4 ligações contendo hidrogênio com os resíduos HIS524, ARG394, GLU353 e GLY521. E a peonidina, por sua vez, interage apenas com os resíduos GLU353 e GLY521 em comum com a cianidina. Notavelmente, nossos resultados divergem de Hidalgo *et al.* (2012). O estudo relata que a peonidina apresentou boa afinidade com o receptor de estrogênio alfa, a delfinidina demonstrou afinidade razoável com o receptor de estrogênio beta e, sugeriram que a cianidina e malvidina não são ligantes adequados a RE. Além disso, o estudo cita que as antocianidinas (agliconas das antocianinas) possuem uma alta afinidade pelo ER- $\alpha$ . No entanto, nossos resultados indicam que as antocianinas obtiveram uma boa ligação com a proteína, principalmente a cianidina, que apresentou a maior afinidade de ligação.

A partir da análise da interação entre a proteína TNF- $\alpha$  e as antocianinas, observa-se que os ligantes apresentam uma afinidade de ligação relativamente fraca, variando entre -3.12 e -3.94 kcal/mol. Um estudo realizado por Sari *et al.* (2019), encontraram a possibilidade de que as antocianinas do arroz preto que interagissem com a proteína TNF- $\alpha$  não tem influência na interação do receptor de TNF- $\alpha$  e TNF- $\alpha$ . Entretanto, a ligação da delfinidina e petunidina ao receptor da proteína inibiu a sinalização da proteína TNF- $\alpha$  e do receptor TNF- $\alpha$ . Comparando os valores obtidos com o tal estudo, pode-se interpretar que esses dados são esperados e são consistentes com os da literatura, visto que a eficácia da ação anti-inflamatória não ocorre pela ligação direta à proteína e sim pelo receptor.

A partir dos resultados de interação entre a citocina interleucina 1 $\beta$  e as antocianinas, conclui-se que as antocianinas apresentam a afinidade de ligação mais baixa em comparação com as outras proteínas. Dentre os ligantes, a malvidina (-3.19 kcal/mol) e a petunidina (-2.43 kcal/mol) apresentaram ligações mais significativas. Ao analisar ambas as interações, possuem

ligações contendo hidrogênio nos aminoácidos ASN129 e HIS30, contudo, a malvidina estabeleceu uma terceira ligação com o resíduo GLU11.

De forma similar, a interleucina 6 também apresentou uma afinidade de ligação negativa mais fraca, variando de -5.19 e -5.59 kcal/mol. Patera et al. (2021), previram que a antocianina foi capaz de suprir a ocorrência de citocinas inibindo a atividade da IL-6 com um valor de afinidade mais negativo que a ternatina de -6.9 kcal/mol. Comparando nossos resultados com tal literatura, observa-se uma divergência, visto que a energia de ligação é negativamente menor do que a reportada previamente no outro estudo.

Em contraste, a interleucina 8 foi o alvo mais promissor para as antocianinas. Apresenta uma energia de ligação estável, no intervalo entre -5.72 e -6.16 kcal/mol. A análise dos resíduos revelou padrões de interação específicos: a cianidina, delfinidina e petunidina compartilham ligações contendo hidrogênio com os aminoácidos SER44, ASP45 e AGR47. Em contrapartida, a malvidina interage com os resíduos TYR13 e PRO16, enquanto a peonidina estabelece ligações apenas com SER44 e TYR13.

A Proteína NF- $\kappa$ B foi outra que apresentou uma menor afinidade com as antocianinas dentre as outras proteínas, exibindo valores entre -2.50 e -3.84 kcal/mol. Sugere-se que os ligantes não possuem uma ligação promissora a proteína e portanto, não inibem a sua atividade inflamatória de forma direta a proteína.

As interações entre PCR e os ligantes indicam que a proteína é um alvo altamente promissor para as antocianinas, todas demonstrando forte afinidade de ligação variando entre -6.97 e -7.45 kcal/mol. A petunidina e delfinidina destacam-se apresentando maiores interações e, a análise detalhada do sítio ativo entre as ambas conformações com PCR, identifica 1 ligação contendo hidrogênio em comum, no aminoácido THR90. No entanto, suas interações divergem em pontos: a petunidina estabelece uma ligação adicional com GLU88, enquanto a delfinidina interage com PRO93 e ASP112. Para uma melhor avaliação, os valores obtidos foram comparados com um estudo realizado por Shafreen et al. (2021), onde avaliam a energia de ligação da proteína PCR com diferentes polifenóis presentes no vinho como a rutina, resveratrol e entre outros, no qual variam entre -7.4 e -8.7 kcal/mol. A partir disso, sugere-se que essa correspondência favorece a hipótese de que as antocianinas, de maneira análoga aos polifenóis, podem atuar como inibidores da atividade inflamatória de PCR.

#### **4. Conclusão**

A partir desse estudo, pode-se aferir a partir da simulação do docking molecular, a afinidade das antocianinas em relação aos biomarcadores inflamatórios presentes na pós menopausa. Em resumo, a docagem sugere que as proteínas alvos que obtiveram resultados mais promissores foram a proteína c reativa e o receptor de estrogênio, apresentando uma afinidade de ligação relativamente mais negativa. Dentre as diferentes ligações entre proteína-ligante, destacam-se principalmente às ligações PCR-petunidina e a Er- $\alpha$ -cianidina. Ambas interações apresentam uma constante de inibição, no qual podem expressar uma potencial função como inibidores da sinalização da PCR e ER- $\alpha$ . Em contrapartida, as interações com TNF- $\alpha$ , IL-1 e NF- $\kappa$ B foram significativamente mais fracas, sugerindo que a ação anti-inflamatória não ocorre por via direta a essas proteínas.

As divergências encontradas entre esse estudo e as demais literaturas podem ser atribuídas a diferentes parâmetros como a diferença de casas decimais durante a realização do

grid box e a escolha da delimitação de ligação, a escolha de cadeias diferentes, o método realizado no autodock e dentre outros. Portanto, para estes resultados *in silico* seria interessante considerar a realização de diferentes conformações, comparando e explorando outras hipóteses para conclusão dos dados. Além disso, incentivar a validação experimental por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo* para confirmar o potencial das antocianinas sobre os marcadores inflamatórios para averiguar a afinidade e estabilidade de ligação entre as interações entre proteínas-ligantes.

## 5. Bibliografia

CHALOPIN, M.; TESSE, A.; MARTÍNEZ, M. C.; ROGNAN, D.; ARNAL, J. F., ANDRIANTSITOHAINA, R.. Estrogen Receptor Alpha as a Key Target of Red Wine Polyphenols Action on the Endothelium. *PLOS One* v.5, n.1, e8554.

GAMEIRO, C.M., ROMÃO, F., CASTELO-BRANCO, C.. Menopause and aging: Changes in the immune system - A review. *Maturitas*, v. 67, n. 4, p. 316-320, dez 2010.

GARCIA, C., BLESSO, C. N.. Antioxidant properties of anthocyanins and their mechanism of action in atherosclerosis. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 172, p. 152-166, ago 2021.

HIDALGO, M., SANTAMARIA, S. M., RECIO, I., MORENO, C. S., TERESA, B. P., RIMBACH, G., TERESA, S. P. Potential anti-inflammatory, anti-adhesive, anti/estrogenic, and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities of anthocyanins and their gut metabolites. *Genes & Nutrition* v. 7, n. 2, p. 295–306, 2012.

HUANG, W. Y.; HSIN, I.L.; CHEN, D.R.; CHANG, C.C.; KOR, C.T.; CHEN, T.Y.; WU,H.M.. Circulating interleukin-8 and tumor necrosis factor- $\alpha$  are associated with hot flashes in healthy postmenopausal women. *PLOS One*, v. 12, n. 8, e0184011, 28 ago. 2017.

PATERA, N. A., DESINTYA, R., PUSPITANINGRUM, SHOFFA, M., RIZQIANTI, YUNIAR, KHARISMA, DHEA, V., SAVITRI, E. D. Molecular docking of anthocyanins and ternatin in *Clitoria ternatea* as coronavirus disease oral manifestation therapy. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, V. 12, N. 4, p. 362-367, Oct–Dec 2021.

SANTORO, N.; ROECA, C.; PETERS, B. A.; NEAL-PERRY, G.. The Menopause Transition: Signs, Symptoms, and Management Options. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 106, n.1, p. 1–15, 2021.

SHAFREEN, R. M. B., LAKSHMI, S. A., PANDIAN, S. K., KIM, Y. M., DEUTSCH, J., KATRICH, E., & GORINSTEIN, S. In Vitro and In Silico Interaction Studies with Red Wine Polyphenols against Different Proteins from Human Serum. *Molecules* (Basel, Switzerland), v. 26, n. 21, p. 6686, 2021.

SARI, D. R. T., CAIRNS, J. R. K., SAFITRI, A., & FATCHIYAH, F. Virtual Prediction of the Delphinidin-3-O-glucoside and Peonidin-3-O-glucoside as Anti-inflammatory of TNF- $\alpha$  Signaling. *Acta informatica medica (AIM): Journal of the Society for Medical Informatics of Bosnia & Herzegovina* : casopis Društva za medicinsku informatiku BiH, v. 27, n. 3, p. 152–157, 2019.

TEIXEIRA, B. C.; LOPES, A. L.; MACEDO, R. C. O.; CORREA, C. S.; RAMIS, T. R.; RIBEIRO, J. L.; OLIVEIRA, A. R.. Inflammatory markers, endothelial function and cardiovascular risk. *Jornal Vascular Brasileiro*, v. 12, n. 2, 108-115, abr-jun 2015.

VENDRAME, S.; KLIMIS-ZACAS, D.. Anti-inflammatory effect of anthocyanins via modulation of nuclear factor- $\kappa$ B and mitogen-activated protein kinase signaling cascades, *Nutrition Reviews*, v.73, n. 6, p. 348–358, Junho 2015.