

Diabetes II e Mal de Alzheimer: desvendando uma interconexão letal via simulações numéricas

Diabetes II and Alzheimer's Disease: Unraveling a lethal interconnection by way of numerical simulations

RESUMO

Luan Davi Rodrigues
Luan.2016@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil.

Rafael Bertolini Frigori
Frigori@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil.

Atualmente, terapias alternativas à Insulina têm sido propostas para o tratamento de Diabetes *Mellitus* II (DM2). Esta doença ocasiona, entre diversas comorbidades clínicas, uma maior prevalência do mal de Alzheimer. Visando estudar a viabilidade de uma co-formulação de insulina com algumas dessas novas drogas biotecnológicas, analisamos duas proteínas (TM_a e TM_b). Estas estruturas foram submetidas à simulação microcanônica, metodologia esta que acuradamente caracteriza interações de sistemas proteicos por meio de análises termoestatísticas. Para tal, empregamos o software SMMP e o módulo ANALYST do pacote PHAST. Pode-se observar no estudo *in silico* que as barreiras de energias, o calor latente da TM_a e TM_b se apresentaram menores do que o da Amilina humana (hIAPP), de acordo com o observado para suas energias de solvatação. Essas características mostraram que as proteínas TM_b e TM_a formam agregados mais instáveis durante transições de fases, à temperaturas fisiológicas, sugerindo sua maior solubilidade comparado à hIAPP. Esses indícios são encorajadores para seu uso em novas terapêuticas.

PALAVRAS-CHAVE: Agregação. Simulação. Solubilidade.

ABSTRACT

CURRENTLY, ALTERNATIVE THERAPIES TO INSULIN HAVE BEEN PROPOSED FOR THE TREATMENT OF DIABETES MELLITUS II (T2DM). AMONG SEVERAL CLINICAL COMORBIDITIES, THIS DISEASE CAUSES A HIGHER PREVALENCE OF ALZHEIMER'S DISEASE. IN ORDER TO STUDY THE FEASIBILITY OF AN INSULIN CO-FORMULATION WITH SOME OF THESE NEW BIOTECHNOLOGICAL DRUGS, WE ANALYZED TWO PROTEINS (TM_a AND TM_b). THESE STRUCTURES WERE SUBMITTED TO MICROCANONIC SIMULATION, A METHODOLOGY THAT ACCURATELY CHARACTERIZES INTERACTIONS OF PROTEIN SYSTEMS THROUGH THERMOSTATIC ANALYZES. TO DO THIS, WE USE THE SMMP SOFTWARE AND THE ANALYST MODULE OF THE PHAST PACKAGE. IT CAN BE OBSERVED IN THE IN SILICO STUDY THAT THE ENERGY BARRIERS, LATENT HEAT OF TM_a AND TM_b WERE LOWER THAN THAT OF HUMAN AMYLIN (hIAPP), AS OBSERVED FOR THEIR SOLVATION ENERGIES. THESE CHARACTERISTICS SHOWED THAT TM_a AND TM_b PROTEINS FORM MORE UNSTABLE AGGREGATES DURING PHASE TRANSITIONS AT PHYSIOLOGICAL TEMPERATURES, SUGGESTING THEIR HIGHER SOLUBILITY COMPARED TO hIAPP. THESE INDICATIONS ARE ENCOURAGING FOR THEIR USE IN NEW THERAPIES.

KEYWORDS: Simulation. Solubility. Aggregation.

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

A Diabetes *Mellitus* II (DM2) é um distúrbio associado a fatores genéticos e estilo de vida sedentário moderno. O doente apresenta insuficiência na secreção de insulina, devido à perda progressiva de células β pancreáticas, levando-o à hiperglicemia e, em sequência, ao desenvolvendo da resistência à insulina por outros mecanismos fisiológicos. Como consequência, a DM2 pode induzir comorbidades como cegueira, hipertensão arterial, doença renal e acidente vascular cerebral (FRIGORI, Rafael B. 2017, p. 1-2).

A Amilina humana (hIAPP), um peptídeo sinérgico à Insulina e co-secretado com ela pelo Pâncreas endócrino, apresenta vários papéis fisiológicos. Dentre eles, estão o controle do apetite e do esvaziamento gástrico, o re-estabelecimento da sensibilidade à leptina, a regulação da secreção de glucagon entre outros (DA SILVA, Dayana Cabral *et al.* 2016, p. 1). Observações correlacionam-se com a patogenicidade típica de algumas isoformas de tipo selvagem, pois tanto humanos quanto gatos tem propensão amiloidogênica, enquanto ratos (rIAPP) e porcos (pIAPP) são imunes à DM2. Vale destacar que esta amiloidose também assemelha-se a outras proteinopatias, assim, agregados proteicos induzidas por hIAPP e insulina desencadeariam o aparecimento de doenças como Alzheimer e Parkinson. (CAO, Ping *et al.*, 2013, p. 1-3; BARAM, Michal *et al.*, 2018, p. 2).

Atualmente, o design de terapias adjuntas para DM2 tem concentrado-se no desenvolvimento de drogas biotecnológicas para o combate desta doença. Tais fármacos são variantes da hIAPP, produzidos por técnicas de proteínas recombinantes, cujas substituições de resíduos estratégicos foram inspiradas por mutações que ocorrem naturalmente em rIAPP e no pIAPP (WANG, Hui *et al.*, 2014, p. 1-2). Isso inclui a Pramlintide (sIAPP), que possui com propriedades a capacidade de quebra das fibrilas β , constituindo um fraco caráter inibidor de amilóides. Idealmente, a sIAPP deve ser co-administrada com Insulina, mas isso é dificultado por seu pobre perfil de solubilidade em pHs adequados.

Nesse contexto, nosso grupo vem desenvolvendo uma metodologia para a verificação de substituições residuais estratégicas utilizando simulações numéricas com algoritmos de Monte Carlo. Nosso objetivo é executar estudos de termoestatística microcanônica nessas novas estruturas proteicas, de forma a verificar se a propensão amiloide de fato é reduzida e se ocorre um aumento da solubilidade desses análogos de IAPP.

MATERIAIS E MÉTODOS

SELEÇÃO DAS ISOFORMAS PARA A SIMULAÇÃO

Em estudos anteriores ao longo deste projeto de IC (RODRIGUES, Luan D.; SCUSSEL, Leticia F., 2019), realizou-se análises físico-químicas com softwares livres para verificar a energia estrutural ($E_{\text{Gromos 96}}$), energia de solvatação ($\Delta G^{\circ}_{\text{sol}}$) de análogos de hIAPP cujo suas estruturas foram geradas em simulação por homologia. Como critério chave para a seleção as moléculas TM_a (H18R, G24P e I26P) e TM_b (H20R, G24P e I26P), cujo suas substituições podem ser verificadas na

Fig. 1, chamaram atenção devido suas pontes dissulfetos (Cys2-Cys7) não terem sofrido afastamento e o cálculo do RMSD com valores aceitáveis.

Figura 1 – Representação dos aminoácidos quais compõem amilina humana os análogos mencionados em código fasta. Em vermelho localiza-se os resíduos substituídos e também há a caracterização das pontes dissulfeto Cys2-Cys7.

hIAPP	H ₃ N ⁺ -K C NTAT C ATQ RLANFLVHSS N N FGAILSS TNVGSNTY-(NH ₂)
rIAPP	H ₃ N ⁺ -K C NTAT C ATQ RLANFLV R SS NNLGPVLPP TNVGSNTY-(NH ₂)
sIAPP	H ₃ N ⁺ -K C NTAT C ATQ RLANFLVHSS NNFGPILPP TNVGSNTY-(NH ₂)
TM_a	H ₃ N ⁺ -K C NTAT C ATQ RLANFLV R SS NNFPAPLSS TNVGSNTY-(NH ₂)
TM_b	H ₃ N ⁺ -K C NTAT C ATQ RLANFLVH S R NNFPAPSS TNVGSNTY-(NH ₂)

Fonte: Autor próprio (2019) *apud* Wang, Hui *et al* (2014).

Frigori, Rafael B. (2017, p. 6 - 9) investigou isoformas selvagens de Amilina como rIAPP, pIAPP e hIAPP, como o análogo sIAPP quanto a sua resistência contra agregação. Aqui, selecionamos para a simulação termoestatística a TM_a e a TM_b e analisamos o comportamento termodinâmico desses sistemas quanto à propensão de agregação quando em interação com Insulina regular (*Protein Data Bank* - PDB, 4EWZ).

SIMULAÇÃO MICROCANÔNICA TERMOESTATÍSTICA

Frigori, Rafael B. (2017, p. 4) propõe que “análise da taxa de agregação peptídica pode ser amplamente facilitada ao abordar a termostabilidade de proteínas a partir da análise termostática microcanônica de simulações moleculares”. Estas descobertas levaram-nos a estudar presentemente as isoformas do IAPP, confiando na alta estatística produzida por algoritmos de Monte Carlo, apesar do custo computacional de um campo de força mais conservador com geometria fixa e solvente implícito (no caso utilizado o ECEPP/3 com solvatação SCH2). Gerando, um poderoso método teórico para estudar as transições estruturais de fase, podendo caracterizar mais facilmente a agregação entre peptídeos.

A formulação microcanônica da Mecânica Estatística permite uma conexão explícita de objetos termodinâmicos à densidade microscópica de estados, assim é possível tomar o conhecido limite termodinâmico e verificar a equivalência dos conjuntos estatísticos (RAFAEL, Frigori B., 2014, p. 4-5).

Obtendo-se as densidades de estados $\Omega(E)$, a termoestatística microcanônica é estabelecida pela fórmula de Boltzmann para entropia (Eq. 1), que é central para a termodinâmica por exemplo, derivativos da entropia são usados para cálculos microcanônicos como a curva calórica, relacionando a temperatura $T(E)$ com a energia interna E (Eq. 2), (GROSS, Dieter HE., 2001, p. 22- 32).

$$S(E) = k_B \ln \Omega(E) \quad (1)$$

$$k_B \beta(E) \equiv T^{-1}(E) = \frac{\partial E}{\partial T} \quad (2)$$

Em que k_B representa a constante de Boltzmann ($1.987 \times 10^{-3} \text{ kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$). Pode-se obter também a energia livre de Helmholtz a temperatura microcanônica fixa $T_c(E)$ é obtida imediatamente pela transformada usual de Legendre (Eq. 3) (MUÑOZ, Victor; SANCHEZ-RUIZ, Jose M, 2004, p. 2,3).

$$F(E) \equiv E - T(E) \cdot S(E) \quad (3)$$

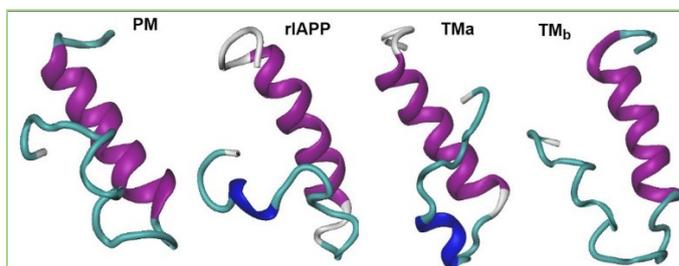
Para analisar a quantidade de dados gerados, foi utilizado o pacote ANALYST do algoritmo PHAST (FRIGORI, Rafael B., 2017, p. 3), e gerados curvas de estados termodinâmicos das interações TM_a e TM_b com a insulina humana dimerizada (4EWZ).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

SELEÇÃO DAS ISOFORMAS PARA A SELEÇÃO

A atenção especial recebida por esses análogos específicos se deve a tentativa de empregar substituições por Arginina, gerando uma molécula mais positivamente carregada. O análogo TM_a teve a substituição da Histidina ($C_{\alpha}18$) que é uma mutação local presente na rIAPP (Fig. 2), já a TM_b tem a substituição da Serina ($C_{\alpha}20$) que é um aminoácido simples e polar não carregado.

Figura 2 – Estruturas proteicas da rIAPP, sIAPP, assim como as estruturas selecionadas para a simulação microcanônica TM_a e TM_b .



Fonte: Autor próprio (2019).

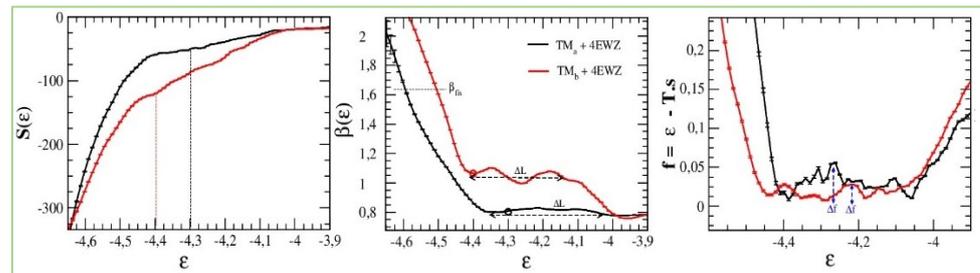
Esses mutantes, com apenas três mutações pontuais, foram idealizados na expectativa de alterar a estabilidade termodinâmica, reduzir a taxa de agregação peptídica com o mínimo de substituições possível, a estrutura de ambas moléculas pode ser observada na Fig. 2.

SIMULAÇÃO MICROCANÔNICA TERMOESTATÍSTICA

A análise microcanônica da TM_a e da TM_b , mostrou a presença de regiões termodinamicamente metaestáveis, que correspondem a intrusos convexos em $S(\epsilon)$ (Fig. 3). Essa região assinala o ponto pseudocrítico de agregação proteica, que é energeticamente associado à temperatura inversa β_c e pela Eq. 2 pode-se obter as temperaturas críticas (T_c) para TM_a (600 K) e TM_b de (483 K). Elas indicam a presença de duas fases termodinâmicas, que estão distantes da temperatura fisiológica (T_{fis} 310 K). Isso indica que o ponto inicial de heterodimerização proteica se encontra a altas temperaturas, logo, à temperatura ambiente ambos análogos

tem possibilidade de agregar-se em co-formulação com insulina. Isso leva-nos a cogitar a necessidade de pesquisar, futuramente, por análogos superiormente otimizados.

Figura 3 – Análise termoestatística da simulação microcanônica dos análogos TM_a e TM_b da hIAPP em interação com dímero 4EWZ (PDB, hIAPP), onde pode-se observar as funções de entropia $S(\epsilon)$, temperatura inversa $\beta(\epsilon)$ e a barreira de energia livre $f(\epsilon)$. Onde β_{fis} é a temperatura fisiológica inversa, ΔL é a variação de calor latente e Δf é a barreira de energia livre, a curva vermelha e preta representa os estados termodinâmicos de TM_b e TM_a em interação com a 4EWZ.



Fonte: Autor próprio (2019).

Frigori, Rafael B. (2014, p. 3) descreve que as transições microcanônicas de agregação-fragmentação de proteínas necessitam de construções auxiliares de Maxwell em suas curvas calóricas a fim de determinar suas respectivas temperaturas inversas pseudocríticas β_c . Observando a função $\beta(\epsilon)$ (Fig. 3), pode-se perceber que no intervalo da transição o calor latente ΔL da TM_a (13,7 kcal mol⁻¹) aproxima-se da TM_b (10,4 kcal mol⁻¹). Portanto, a menor variação de calor latente ocorre no análogo TM_b indicando, portanto, que essa transição de fase é mais curta e gera ligações heterodiméricas mais instável entre os dois modelos estudados.

A diferença da ΔG°_{sol} da TM_a (-539 kcal mol⁻¹) e TM_b (-633 kcal mol⁻¹) em modelos proteicos simulados por homologia, mostram que a solubilidade da TM_b é relativamente melhor. A função para os modelos (Fig. 3) aponta uma diferença na barreira de energia livre (Δf) entre a TM_a (3.87 kcal mol⁻¹) e a TM_b (1.67 kcal mol⁻¹). Comparando os valores referentes às energias envolvidas (ΔG°_{sol} , ΔL e Δf) da TM_a e TM_b , pode-se verificar tendência do modelo TM_b se destacar quanto à otimização da solubilidade entre os modelos citados, seguido da TM_a . Dados que estão positivamente colididos por Wang, Hui *et al.* (2014, p. 6-7) cujos experimentos compararam a solubilidade entre os análogos (TM_a , TM_b e hIAPP) em tampão PBS em pH 7,4 e mostraram que a TM_b é mais solúvel.

CONCLUSÕES

O presente trabalho ilustra uma abordagem computacional, de simulações microcanônicas e suas respectivas análises termoestatísticas de peptídeos amiloides, como uma tentativa de resolução de um clássico problema de saúde pública que tem se tornado progressivamente mais dispendioso. Assim, temos a possibilidade do melhoramento de drogas que atuam sobre a DM2, dentre cujas comorbidades temos doenças degenerativas como o mal Alzheimer e Parkinson.

Nesse contexto, nossas análises *in silico* mostraram que as moléculas TM_a e TM_b (apesar de não-ideais) são promissoras, concordando com a abordagem empiricamente desenvolvida pela substituição de certos aminoácidos da HIAPP por Prolinas e Argininas. Como visto em Wang, Hui *et al.* (2014, p. 6-7), de fato, confirmamos que TM_a e TM_b poderiam ser seguramente coformuladas com Insulina.

AGRADECIMENTOS

A esta produção agradeço ao Prof. Dr. Rafael B. Frigori cujo a orientação foi imprescindível, a Universidade Tecnológica Federal do Paraná e a Fundação Araucária especialmente pela Bolsa de Pesquisa e Desenvolvimento provocando essa onda de incentivos positivos não só para mim, como em toda a Ciência Paranaense. Em agradecimento também aos meus colegas e familiares e minha querida Sara Elen que incentivaram e apoiaram para que esta pesquisa fosse concluída.

REFERÊNCIAS

BARAM, Michal *et al.* Mechanistic perspective and functional activity of insulin in amylin aggregation. **Chemical science**, v. 9, n. 18, p. 4244-4252, 2018. Acessado em 09/08/2019.

CAO, Ping *et al.* Islet amyloid: from fundamental biophysics to mechanisms of cytotoxicity. **FEBS letters**, v. 587, n. 8, p. 1106-1118, 2013.

DA SILVA, Dayana Cabral *et al.* Amyloidogenesis of the amylin analogue pramlintide. **Biophysical chemistry**, v. 219, p. 1-8, 2016.

FRIGORI, Rafael B. Be positive: Optimizing pramlintide from microcanonical analysis of amylin isoforms. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 19, n. 37, p. 25617-25633, 2017.

FRIGORI, Rafael B. PHAST: Protein-like heteropolymer analysis by statistical thermodynamics. **n**, v. 215, p. 165-172, 2017.

FRIGORI, Rafael B. Breakout character of islet amyloid polypeptide hydrophobic mutations at the onset of type-2 diabetes. **Physical Review E**, v. 90, n. 5, p. 052716, 2014.

GROSS, Dieter HE. Microcanonical thermodynamics: phase transitions in "small" systems. **World Scientific**, 2001.

MUÑOZ, Victor; SANCHEZ-RUIZ, Jose M. Exploring protein-folding ensembles: a variable-barrier model for the analysis of equilibrium unfolding experiments. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 51, p. 17646-17651, 2004.

WANG, Hui *et al.* Rationally designed, nontoxic, nonamyloidogenic analogues of human islet amyloid polypeptide with improved solubility. **Biochemistry**, v. 53, n. 37, p. 5876-5884, 2014.