

Potencial inibitório do ácido elágico sobre a formação do complexo keap1-Nrf2: implicações terapêuticas em doenças crônico-degenerativas

Inhibitory potential of ellagic acid on the formation of the keap1-Nrf2 complex: Therapeutical implications in chronic-degenerative diseases

Gabriel Elias de Lima Barros¹, Carolina Silva Oliveira¹, Vinicius Barreto da Silva¹

¹Escola de Ciências Médicas e da Vida, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil.

Resumo

Objetivos – Avaliar o potencial inibitório do ácido elágico sobre as interações do complexo Keap1-Nrf2, com o intuito de esclarecer um dos eventuais mecanismos associado à atividade antioxidante do ácido elágico. **Métodos** – Foram empregadas simulações de docagem molecular para prever o modo de ligação do ácido elágico no sítio ligante da proteína Keap1, o qual foi comparado com o modo de ligação obtido experimentalmente e descrito na literatura para o ligante natural, a proteína Nrf2, e um potente inibidor monoácido do complexo Keap1-Nrf2. **Resultados** – As simulações de docagem revelaram que o ácido elágico apresenta potencial para realizar uma rede de ligações de hidrogênio com resíduos de aminoácidos da proteína Keap1 considerados importantes para o reconhecimento do Nrf2, se assemelhando ao perfil observado para inibidores do complexo Keap1-Nrf2 descritos na literatura. **Conclusão** – O ácido elágico apresenta características químicas e espaciais favoráveis para a inibição do complexo Keap1-Nrf2 e a elucidação do seu modo de ligação pode auxiliar na identificação de novos produtos naturais com propriedades antioxidantes e potencializar o desenvolvimento de fármacos contra doenças crônico-degenerativas.

Descritores: Produtos biológicos; Antioxidantes; Desenho de fármacos

Abstract

Objectives – To evaluate the inhibitory potential of ellagic acid on interactions within the Keap1-Nrf2 complex, aiming to elucidate one of the potential mechanisms associated with the antioxidant activity of ellagic acid. **Methods** – Molecular docking simulations were employed to predict the binding mode of ellagic acid in the binding site of the Keap1 protein. This binding mode was compared to the experimentally obtained binding mode described in the literature for the natural ligand, the Nrf2 protein, and a potent monoacid inhibitor of the Keap1-Nrf2 complex. **Results** – Docking simulations revealed that ellagic acid has the potential to form a network of hydrogen bonds with amino acid residues of the Keap1 protein that are considered important for Nrf2 recognition. This profile is similar to that observed for inhibitors of the Keap1-Nrf2 complex described in the literature. **Conclusion** – Ellagic acid possesses favorable chemical and spatial characteristics for inhibiting the Keap1-Nrf2 complex, and elucidating its binding mode may aid in the identification of new natural products with antioxidant properties and enhance the development of drugs for chronic-degenerative diseases.

Descriptors: Biological products; Antioxidants; Drug design

Introdução

O Ácido Elágico é um composto fenólico natural encontrado em inúmeras frutas e vegetais, especialmente na romã, framboesa, caqui, morango, pêssego e nozes. A molécula pode ser encontrada em sua forma livre ou na forma de derivados mais complexos denominados elagitaninos, os quais podem ser hidrolisados em ácido elágico diante da ação do pH ou da microbiota intestinal. Sua estrutura é polifenólica e apresenta uma porção hidrofílica, com quatro grupos hidroxila e duas lactonas, e uma porção lipofílica, composta por um sistema de quatro anéis aromáticos fundidos (Figura 1), o que garante ao ácido elágico a capacidade de receber elétrons de diferentes substratos e se relaciona a uma de suas atividades biológicas mais marcantes, ou seja, a sua ação antioxidante¹⁻³.

Ao lado das vitaminas C (ácido ascórbico) e E (alfatocoferol), o ácido elágico é um dos principais agentes antioxidantes encontrados na natureza. Suas propriedades biológicas têm sido atribuídas à sua capacidade de inativar radicais livres, semelhante ao que é obser-

vado com as vitaminas essenciais, propriedades que o credenciam a atuar na melhoria de diversas condições de saúde associadas ao dano oxidativo, incluindo doenças hepáticas e cardiovasculares, neurológicas, inflamatórias e o câncer^{4,5}. As quatro hidroxilas e os dois grupos lactona presentes na molécula garantem ao ácido elágico um alto potencial antioxidante, sobretudo para neutralizar espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio⁶.

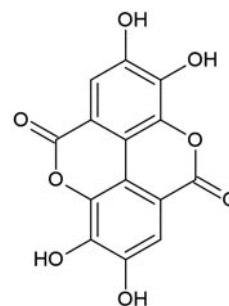


Figura 1. Estrutura química do ácido elágico desenhada por meio do programa ACD/ChemSketch (Freeware) 2022.2.3

Apesar disso, a ação do ácido elágico no bloqueio do processo oxidativo ainda não é completamente elucidada, entretanto sabe-se que ela se dá por meio da regulação de múltiplas vias. Destaca-se a sua ação na ativação da resposta antioxidante ligada ao Nrf2 (nuclear fator erythroid 2-related fator 2). O Nrf2 é o principal fator de transcrição antioxidante em boa parte das células e estimula a síntese de enzimas antioxidantes, como a superóxido desmutase (SOD), gama-glutamilmilcisteína sintetase (γ -GCS) e heme oxigenase-1 (HO-1). Ademais, também é descrito que o Nrf2 tem um alto potencial anti-inflamatório e antifibrótico ao suprimir a ação de fatores de crescimento. O processo de degradação do Nrf2 ocorre por intermédio da proteína Keap1, a qual promove a sua degradação após interagir com o Nrf2. Apesar do reconhecimento do ácido elágico como agente capaz de estimular a ação do Nrf2 em processos antioxidantes, o mecanismo pelo qual esse efeito é alcançado ainda não está claramente definido. Um dos mecanismos hipotéticos é a inibição da interação proteína-proteína entre Keap1 e Nrf2^{7,8}.

A descoberta de moléculas capazes potencializar a atividade do Nrf2 abre o caminho para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas capazes de proteger o organismo contra danos gerados por moléculas reativas, permitindo enriquecer o arsenal terapêutico contra doenças em que o estresse oxidativo é um mecanismo fisiopatológico crucial, incluindo a nefropatia diabética, a doença pulmonar obstrutiva crônica, o câncer, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares, a depressão e a dor neuropática associada ao diabetes^{8,9}. Devido à necessidade de implementação de pesquisas que contribuam com a elucidação dos mecanismos relacionados à atividade antioxidante de moléculas de interesse terapêutico, como o ácido elágico, o presente estudo busca avaliar o potencial inibitório do ácido elágico sobre as interações do complexo Keap1-Nrf2 através do emprego de técnicas de modelagem molecular.

Métodos

A estrutura química do ácido elágico foi modelada em representações 2D e 3D através do programa computacional ACD/ChemSketch Freeware Version (Advanced Chemistry Development, Inc.). Foram gerados arquivos moleculares nos formatos sk2 e mol. Posteriormente, foi gerado um arquivo no formato mol2 através do programa Discovery Studio Visualizer v21.1.0.20298. As interações intermoleculares do tipo proteína-proteína que governam a formação do complexo Keap1-Nrf2 foram visualizadas e descritas com o auxílio do programa Pymol Viewer 1.1r1 a partir das coordenadas depositadas no PDB (Protein Data Bank) com código 2FLU¹⁰. O mesmo procedimento foi realizado com para o complexo formado entre Keap1 e inibidor triazólico monoácido, depositado no PDB com o código 5FNU¹¹. O mapa 2D das interações dos complexos 2FLU e 5FNU foi gerado através do programa Discovery Studio Visualizer v21.1.0.20298.

As simulações de docagem molecular foram realiza-

das com o programa DockThor¹². Inicialmente foi realizada a redocagem do ligante cristalográfico do complexo 5FNU e o parâmetro definido para considerar o sucesso na reprodução do modo de ligação do ligante foi o RMSD ≤ 2 . Os parâmetros do algoritmo de busca definidos para a reprodução do modo de ligação do ligante triazólico monoácido incluíram: number of evaluations = 1.000.000; population size = 750; initial seed = -1985; number of runs = 24; soft docking. O centro do grid foi definido a partir das seguintes coordenadas: X=19.673; Y=60.669; Z=29.766. O tamanho do grid foi definido em 16 Å nos três eixos a partir do centro do grid, a discretização em 0,25 e o número total de pontos do grid em 531.441. As simulações com o ácido elágico foram realizadas empregando como arquivos de entrada as coordenadas da proteína Keap1 do complexo 5FNU e o arquivo mol2 gerado anteriormente para o ácido elágico. Os parâmetros da simulação foram os mesmos empregados no processo de redocagem do ligante cristalográfico. O ponto de corte do RMSD para agrupar conformeros foi definido em 2, sendo obtida ao final do processo apenas uma pose para o ácido elágico. O mapa 2D das interações do modelo gerado para o ácido elágico com a proteína Keap1 foi gerado através do programa Discovery Studio Visualizer v21.1.0.20298. O modelo farmacofórico baseado em estrutura do ligante monoácido foi gerado através do programa Pharmit¹³ para a estrutura com código PDB 5FNU, selecionando como ligante a substância com código L6I (inibidor monoácido) e ignorando as moléculas de água.

Resultados

A proposta da pesquisa consiste em elucidar o mecanismo vinculado às propriedades antioxidantes do ácido elágico. Assim, foi analisado o potencial inibitório do ácido elágico diante do complexo Keap1-Nrf2, tendo em vista que esse é um dos mecanismos hipotéticos levantados pela comunidade científica para justificar a reconhecida ação antioxidante do ácido elágico. Com o intuito de validar a hipótese do ácido elágico como ligante da Keap1 e, conseqüentemente, inibidor do complexo Keap1-Nrf2, foram realizadas simulações de docagem molecular do ácido elágico com a cavidade do domínio Kelch da proteína Keap1, a qual é responsável por interagir e degradar o Nrf2, um fator de transcrição antioxidante, aumentando assim o seu tempo de resposta contra o estresse oxidativo¹⁰.

As simulações de docagem revelaram que o ácido elágico apresenta potencial para realizar uma rede de ligações de hidrogênio com pelo menos três resíduos de aminoácidos do domínio Kelch da proteína Keap1, incluindo Arg483, Ser508 e Ser555 (Figura 2A). Tais interações são suportadas por alguns dos átomos de oxigênio presentes em sua estrutura química. É possível observar também um conjunto de interações realizadas por meio de átomos de carbono do seu sistema de anéis aromáticos fundidos, incluindo interações de van der Waals, Pi-cátion e Pi-Pi (Figura 2B).

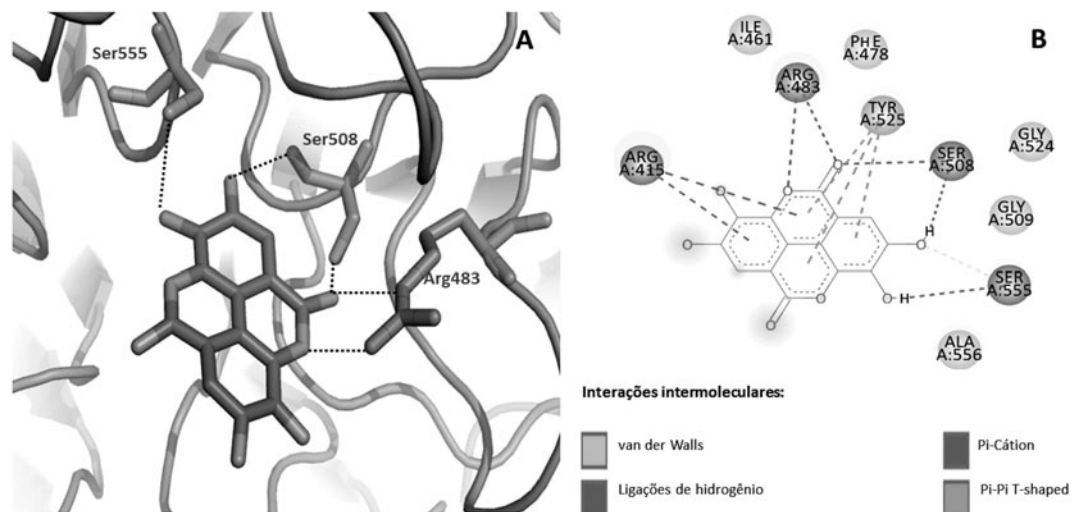


Figura 2. (A) Sugestão de modo de ligação do ácido elágico no sítio ligante da proteína Keap1, com destaque para as ligações de hidrogênio representadas por linhas tracejadas; Figura gerada através do programa PyMOL 1.1r1. (B) Diagrama 2D representado as interações intermoleculares do modo de ligação sugerido do ácido elágico no sítio ligante da proteína Keap1; Figura gerada através do programa Discovery Studio Visualizer v21.1.0.20298.

Discussão

Ao mapear as interações intermoleculares presentes no complexo proteico Keap1-Nrf2, é possível compreender como o Nrf2 se encaixa no sítio de substrato da Keap1 ao verificar a ligação entre o domínio Kelch e o Nrf2. O peptídeo Nrf2 interage com o domínio Kelch principalmente por meio de uma rede de ligações de hidrogênio. Os aminoácidos mais importantes do domínio ligante da Keap1 no processo de reconhecimento do Nrf2 constituem: Tyr334, Ser363, Arg380, Asn382, Arg415, Arg483, Ser508, Gln530, Ser555 e Ser602. Já os resíduos do Nrf2 envolvidos nas ligações de hidrogênio com Keap1 incluem Glu78, Glu79, Thr80, Glu82 e Phe8310 (Figura 3). Portanto, eventuais inibidores do complexo Keap1-Nrf2 devem ser capazes de reproduzir um padrão semelhante de ligações de hidrogênio com o domínio Kelch da proteína Keap1, impedindo o acoplamento do Nrf2.

Um dos inibidores mais potentes do complexo Keap1-Nrf2 descritos na literatura consiste em um derivado triazólico monoácido (Figura 4A), o qual possui em sua estrutura química um grupo carboxílico capaz de mimetizar o aminoácido Glu79 do Nrf2, o qual também apresenta um grupo carboxílico em sua cadeia lateral, e realizar ligações de hidrogênio com Arg483 e Ser508 da proteína Keap1¹¹. Arg483 e Ser508 são considerados resíduos importantes no processo de reconhecimento do Nrf2¹⁰. Também é possível observar que o inibidor realiza ligação de hidrogênio com Ser602 e interações hidrofóbicas com Tyr334 e Tyr525¹¹ (Figura 4B). Tyr334 e Ser602 também fazem parte do grupo de aminoácidos do domínio Kelch da Keap1 responsáveis por interagir com o Nrf2¹⁰ (Figura 3). Considerando as características farmacofóricas do inibidor monoácido (Figura 4C), é possível observar que os ele-

mentos estruturais responsáveis por sua interação com a Keap1 estão relacionados à presença em sua estrutura química de um conjunto de aceptores de ligação de hidrogênio e um ânion (grupo carboxílico), os quais apresentam a capacidade de realizar interações polares, principalmente ligações de hidrogênio, as quais são favorecidas pela composição dos resíduos de aminoácidos presentes no sítio ligante da Keap1, o qual é rico em argininas, asparaginas, serinas e tirosinas. O inibidor monoácido também apresenta grupos hidrofóbicos essenciais para a manutenção de interações hidrofóbicas no sítio ligante da proteína.

O derivado monoácido, portanto, ocupa o mesmo sítio ligante responsável pelo acoplamento do Nrf2¹⁰, impedindo a formação do complexo Keap1-Nrf2, o que retarda a degradação do Nrf2 e gera benefícios terapêuticos ao potencializar a resposta contra o estresse oxidativo. Ao comparar a estrutura química do ácido elágico com o inibidor monoácido, é possível notar que ambos compartilham características químicas espaciais, sobretudo porque o ácido elágico apresenta em sua estrutura química vários aceptores de ligação de hidrogênio combinados com grupos aromáticos, representados por seu sistema central de anéis fundidos, os quais costumam ser importantes para candidatos a inibidores do complexo Keap1-Nrf2, sobretudo o inibidor monoácido (Figura 4C). Neste caso, a exceção é o grupo carboxílico, o qual não está presente na estrutura do ácido elágico. Apesar disso, é possível estimar, a partir do modelo de docagem construído para o ácido elágico no sítio ligante da Keap1, que a molécula natural apresenta compatibilidade estereoelétrica para ocupar o mesmo sítio ligante descrito para o Nrf2 e o inibidor triazólico monoácido, mantendo, sobretudo, uma rede de ligações de hidrogênio com resíduos considerados cruciais para a degradação do Nrf2, incluindo

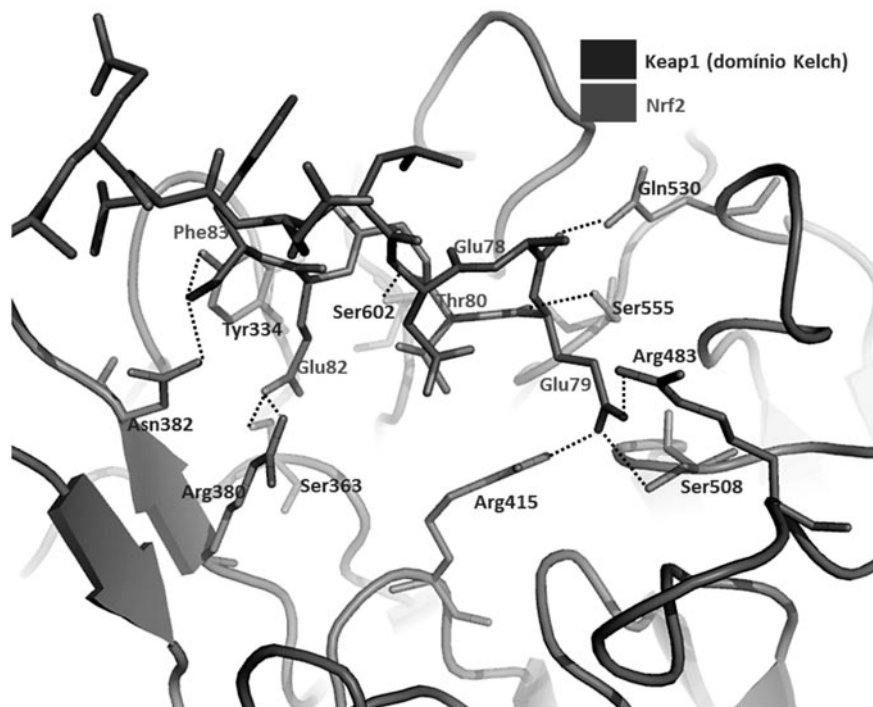


Figura 3. Modo de ligação do peptídeo Nrf2 com o sítio ligante do domínio Kelch da proteína Keap1, com destaque para as ligações de hidrogênio representadas por linhas tracejadas. As coordenadas do modelo estão depositadas no PDB (Protein Data Bank) com o código 2FLU.

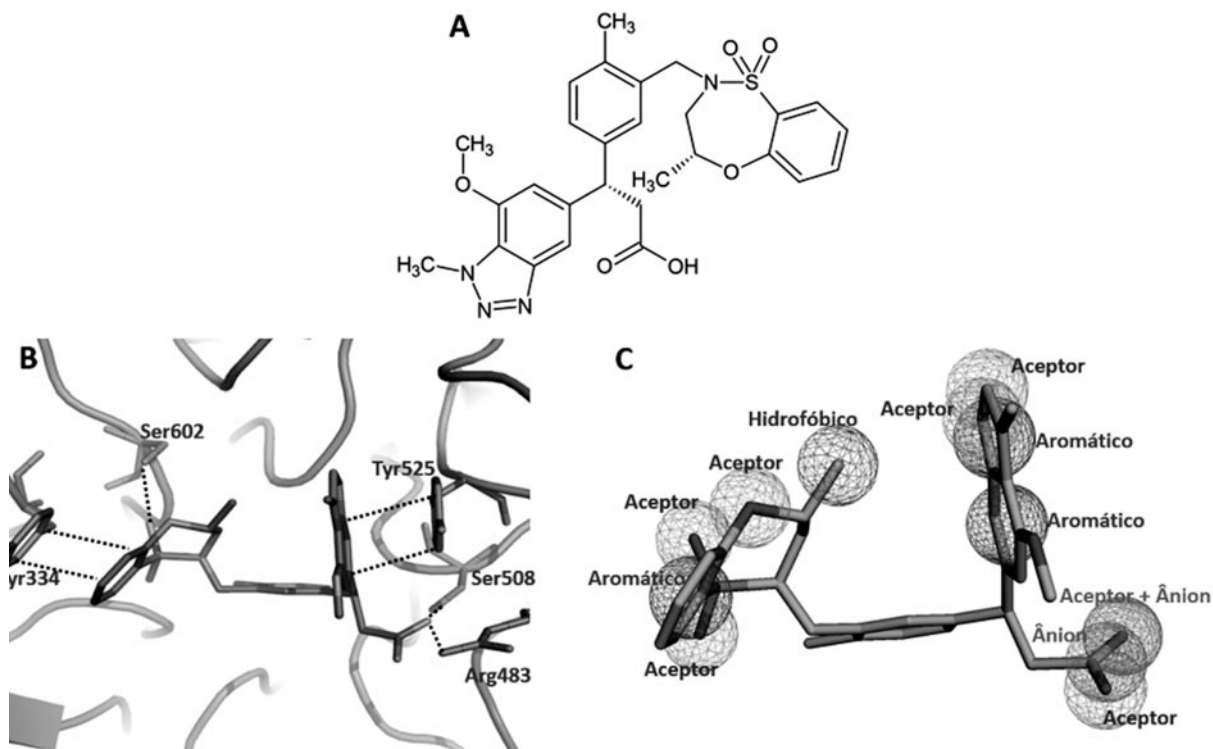


Figura 4. (A) Estrutura química do derivado triazólico monoácido inibidor do complexo Keap1-Nrf2. (B) Modo de ligação do derivado triazólico monoácido com o sítio ligante do domínio Kelch da proteína Keap1, com destaque para as principais interações intermoleculares representadas por linhas tracejadas. (C) Propriedades farmacofóricas do derivado monoácido inibidor do complexo Keap1-Nrf2. As características farmacofóricas, representadas por esferas coloridas segundo os seus atributos moleculares, foram construídas a partir das interações intermoleculares observadas com o domínio Kelch da proteína Keap1 através do programa Pharmit13 após análise das coordenadas com código 5FNU depositadas no PDB (Protein Data Bank).

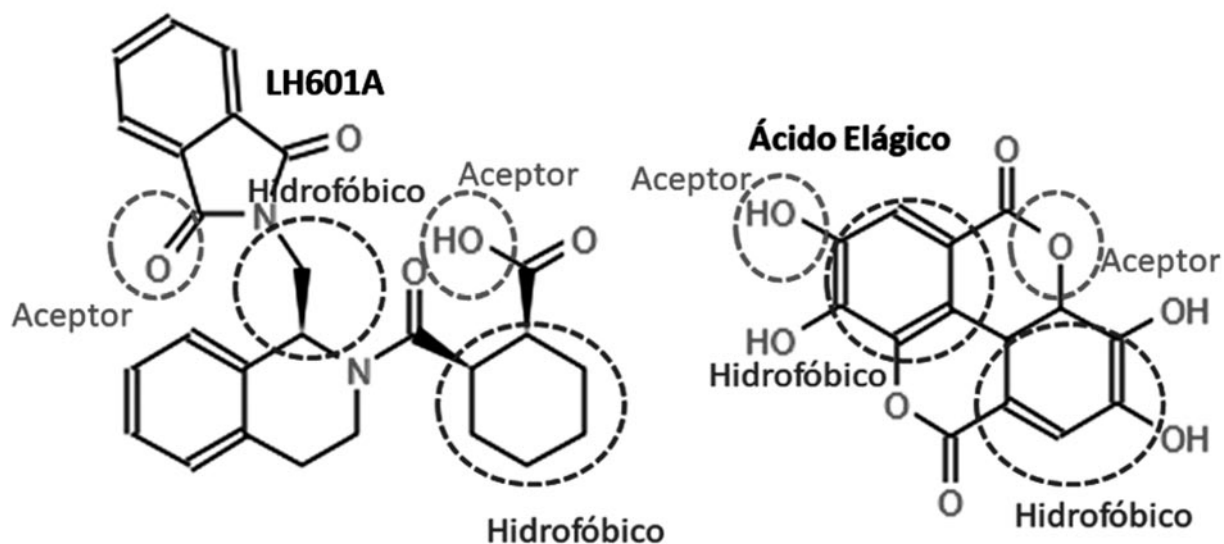


Figura 5. Diagrama 2D representando as características compartilhadas entre o ácido elágico e o inibidor LH601 no espaço químico

Arg483, Ser508 e Ser555. Isso ocorre porque o sítio ligante do domínio Kelch é rico em resíduos com cadeias laterais com substituintes polares, incluindo argininas, tirosinas, serinas e asparaginas¹⁰. Dessa forma, qualquer postulante a inibidor do complexo Keap1-Nrf2 deve ser capaz de manter interações iônicas ou ligações de hidrogênio no sítio ligante da proteína, fato que é observado na pose obtida para o ácido elágico por meio de docagem (Figura 2).

Várias outras moléculas que atuam como inibidores diretos do complexo Keap-Nrf2, além do derivado monoácido, já foram descritas na literatura. No entanto, boa parte dessas moléculas são eletrofílicas e atuam modificando grupos sulfidrilas dos resíduos de cisteína da Keap1. Entretanto, a falta de inespecificidade dos agentes eletrófilos permite que atuem modificando também resíduos de cisteína de outras proteínas fundamentais para a manutenção de funções celulares, causando, assim, efeitos adversos indesejáveis que minam o seu potencial terapêutico. Abed e colaboradores⁸ isolaram 8 moléculas com ação inibitória sobre o complexo Keap-Nrf2 a partir de um mecanismo não covalente, totalmente diferente dos compostos eletrofílicos, de modo que os efeitos colaterais são menos relevantes, tornando possível o uso dessas moléculas para finalidades terapêuticas. Das 8 moléculas descritas, o composto LH601A foi o mais promissor (Figura 5). Assim como o ácido elágico, o composto LH601A é formado por grupos aromáticos e aceptores de ligação de hidrogênio posicionados em regiões semelhantes do espaço químico (Figura 5), o que fortalece o argumento do ácido elágico como um inibidor do complexo Keap-Nrf2 associado a um baixo risco de toxicidade, visto que o seu potencial mecanismo de ação é similar aos inibidores não eletrofílicos.

Conclusão

É possível concluir, através dos estudos de modelagem molecular, que o ácido elágico apresenta características químicas e espaciais favoráveis para a inibição do complexo Keap1-Nrf2 por meio da sua capacidade de realizar ligações de hidrogênio com a proteína Keap1. Dessa forma, a inibição do complexo Keap1-Nrf2 se mostra compatível como um dos mecanismos que justifica a atividade contra o estresse oxidativo atribuída ao ácido elágico. A elucidação do modo de ligação do ácido elágico no sítio ligante da Keap1 pode funcionar como um processo indutor para a identificação de novos produtos naturais com propriedades antioxidantes e auxiliar no desenvolvimento de novos fármacos para doenças em que o dano oxidativo é um mecanismo de relevância, sobretudo nas doenças crônico-degenerativas.

Referências

1. Derosa G, Maffioli P, Sahebkar A. Ellagic acid and its role in chronic diseases. *Adv Exp Med Biol.* 2016;928:473–9. Doi: 10.1007/978-3-319-41334-1-20.
2. Silva FB, Romero WG, Rouver WN, Silva K, Almeida SA, Mengal V, et al. Ellagic acid prevents vascular dysfunction in small mesenteric arteries of ovariectomized hypertensive rats. *J Nutr Biochem.* 2022;105:108995.
3. Trujano-Fragoso DE, Trinidad-Santos A, López-Romero RM, Velasco-Cruz C, Becerril-Román AE, Cortés-Penagos CJ. Características pomológicas, capacidade antioxidante y ácido elágico em frambuesa (*Rubus idaeus* L.). *Rev Fitotec Mex.* 2017; 40(3): 261-9. Doi: 10.35196/rfm.2017.3.261.269.
4. Zeb A. Ellagic acid in suppressing in vivo and in vitro oxidative stresses. *Mol Cell Biochem.* 2018;448(1-2):27-41. Doi: 10.1007/s11010-018-3310-3.
5. Sharifi-Rad J, Quispe C, Castillo CMS, Caroca R, Lazo-Vélez MA, Antonyak H, et al. Ellagic acid: a review on its natural sour-

- ces, chemical stability, and therapeutic potential. *Oxid Med Cell Longev*. 2022;22:3848084. Doi: 10.1155/2022/3848084.
6. Ríos J-L, Giner RM, Marín M, Recio MC. A Pharmacological Update of Ellagic Acid. *Planta Med*. 2018;84(15):1068–93. Doi: 10.1055/a-0633-9492.
7. Altamimi JZ, Alfaris NA, Alshammari GM, Alagal RI, Aljabryn DH, Aldera H, et al. Ellagic acid protects against diabetic nephropathy in rats by regulating the transcription and activity of Nrf2. *J Funct Foods*. 2021;79:104397.
8. Abed DA, Goldstein M, Albanyan H, Jin H, Hu L. Discovery of direct inhibitors of Keap1 – Nrf2 protein – protein interaction as potential therapeutic and preventive agents. *Acta Pharm Sin B*. 2015;5(4):285–99. Doi:10.1016/j.apsb.2015.05.0008.
9. Pinto RB. Nrf2 como potencial alvo farmacológico no tratamento da depressão e da dor neuropática associada ao diabetes [dissertação de mestrado. Curitiba: Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Paraná; 2015.
10. Lo S, Li X, Henzl MT, Beamer LJ, Hannink M. Structure of the Keap1: Nrf2 interface provides mechanistic insight into Nrf2 signaling. *EMBO J*. 2006;25(15):3605–17. Doi: 1038/sj.emboj.7601243.
11. Davies TG, Wixted WE, Coyle JE, Griffiths-Jones C, Hearn k, Mcmenamim R, et al. Monoacidic inhibitors of the Kelch-like ECH-Associated Protein 1:Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 (KEAP1:NRF2) protein-protein interaction with high cell potency identified by fragment-based discovery. *J Med Chem*. 2016;59(8):3991–4006. Doi:10.1021/acs.jmedchem.6b00228.
12. Guedes IA, Barreto AMS, Marinho D, Krempser E, Kuennemann MA, Sperandio O, et al. New machine learning and physics-based scoring functions for drug discovery. *Sci Rep*. 2021;11:3198. Doi: 10.1038/s41598-021-82410-1.
13. Sunseri J, Koes DR. Pharmit: interactive exploration of chemical space. *Nucleic Acids Res*. 2016;44:W442–W448. Doi: 10.1093/nar/gkw287.

Endereço para correspondência:

Vinicius Barreto da Silva
Escola de Ciências Médicas e da Vida, Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Av. Universitária, 1440 – Setor Leste Universitário
Goiânia-GO, CEP 74605-010

Brasil

E-mail: vbarreto@pucgoias.edu.br

Recebido 19 de setembro de 2023
Aceito 29 de setembro de 2023