INVESTIGAÇÃO IN SILICO DE UM POSSÍVEL ALVO MOLECULAR DA HISTAMINA EM MILHO (Zea mays)

Gabriel Marcos da Silva Peruzzi (PIBIC/CNPq-FA/UEM), Wanderley Dantas dos Santos (Orientador), Amanda Castro Comar (Coorientadora). E-mail: ra134912@uem.br
Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Bioquímica, Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas / Bioquímica.
Palavras-chave: GPCR; docking molecular; dinâmica molecular.

RESUMO

A histamina é uma amina biogênica amplamente estudada em animais, enquanto seus alvos moleculares em plantas permanecem pouco caracterizados. Este trabalho teve como objetivo investigar, por bioinformática estrutural, um possível alvo molecular da histamina em milho (*Zea mays*). A histamina foi submetida à prospecção por similaridade química, utilizando os receptores humanos HRH2, HRH3 e HRH4 como referência. A busca por homólogos em *Viridiplantae* identificou candidatos com similaridade considerável e, posteriormente, uma busca direcionada para espécie *Zea mays* permitiu selecionar a proteína B6SHE2, uma GPCR que apresentou RMSD de 0,960 Å comparada com HRH4. Diferentes protocolos de docking foram empregados e as poses obtidas foram avaliadas por dinâmica molecular. Após 50 ns, o sistema ChemScore apresentou dissociação do ligante e foi descartado, já os demais sistemas foram estendidos até 150 ns. A pose ASP2 apresentou o comportamento mais consistente, com baixa variação do ligante e elevada frequência de contatos com a proteína. Os resultados indicam que a B6SHE2 constitui um possível alvo molecular da histamina, embora sejam necessárias análises complementares e validação experimental.

INTRODUÇÃO

A histamina é uma amina biogênica envolvida em diversos processos fisiológicos em mamíferos, atuando por meio de quatro subtipos de receptores acoplados à proteína G (H1R–H4R). Todos os subtipos já possuem estrutura experimental determinada em complexo com histamina, permitindo caracterizar o modo de ligação e os principais resíduos envolvidos no reconhecimento molecular (IM et al., 2023). Embora amplamente estudada em sistemas animais, os possíveis mecanismos de ação e alvos moleculares da histamina em plantas permanecem pouco caracterizados, ainda que estudos indiquem sua participação em processos fisiológicos vegetais, incluindo crescimento e desenvolvimento, respostas a estresses bióticos e abióticos, defesa contra herbivoria e interações planta–organismo, além de sua possível atuação como molécula sinalizadora. A histamina já foi detectada em diferentes espécies vegetais e apresenta alterações em seus níveis em condições de estresse, sugerindo uma possível função na modulação das

respostas fisiológicas das plantas (Roshchina, 2022; Malakar et al., 2024). A descoberta de alvos moleculares envolvidos nesse processo permitirá o desenvolvimento de produtos biotecnológicos capazes de modular respostas fisiológicas e mecanismos de defesa das plantas, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias mais eficientes e sustentáveis de manejo agrícola, aumento da tolerância a estresses bióticos e abióticos e, consequentemente, maior produtividade das culturas. Diante disso, este trabalho teve como objetivo identificar possíveis alvos moleculares da histamina em plantas, através de ferramentas de bioinformática estrutural.

MATERIAIS E MÉTODOS

A estrutura da histamina no formato SMILES foi obtida no PubChem (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/) e submetida ao servidor SEA prediction (sea.compbio.ucsf.edu/) para prospecção de alvos. A busca por homólogos foi realizada através da ferramenta BLAST do banco de dados UniProt (uniprot.org) com filtros para o táxon *Viridiplantae* e espécie *Zea mays*. Na sequência, os alvos identificados foram avaliados com base em evidências da literatura, priorizando proteínas potencialmente envolvidas em vias que promovam estímulos ao desenvolvimento vegetal. Isso resultou na identificação do receptor acoplado à proteína G (ZmGPR), IdUniprot: B6SHE2.

Posteriormente o candidato a alvo ZmGPR selecionado foi avaliado quanto a sua interação com a histamina por meio de docking molecular. Sua estrutura predita pelo AlphaFold foi utilizada nas simulações. Possíveis cavidades de ligação foram preditas pelo servidor CavityPlus (pkumdl.cn:8000/cavityplus/) e no docking molecular dois programas foram empregados: PyRx (DALLAKYAN; OLSON, 2015) operando os motores Autodock Vina e Autodock 4, e GOLD (JONES et al., 1997). Nos dois primeiros motores foram utilizados os algoritmos de amostragem e pontuação padrões e uma caixa de busca com tamanho em x, y e z de 15 Å e 40 Å, respectivamente. Para o GOLD foi aplicado o algoritmo de amostragem padrão, combinado a diferentes funções de pontuação ChemPLP, GoldScore, ChemScore e ASP. Todas as simulações foram realizadas em triplicata, utilizando uma esfera de raio 15 Å.

A partir dos diferentes complexos ZmGPR-histamina obtidos nas simulações de docking, realizou-se dinâmica molecular para observar o comportamento termodinâmico do sistema proteína-ligante em função do tempo. Para isso, inicialmente os diferentes complexos obtidos foram submetidos a servidor CHARMM-GUI (charmm-gui.org/) para a construção do sistema de simulação. As simulações de dinâmica molecular foram realizadas no GROMACS (VAN DER SPOEL et al., 2005). O complexo foi inserido em uma bicamada lipídica composta por 70 moléculas em cada monocamada de 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC), espessura de água de 30 Å e NaCl 0,2 mol/L para neutralização das cargas. Na cadeia proteica foram conectadas as cisteínas 69 e 95, originando uma ponte dissulfeto. O campo de força (FF) utilizado para a proteína foi o CHARMM36, enquanto que para a histamina, o FF foi gerado pelo servidor CGenFF (cgenff.com/) no mesmo formato. A temperatura utilizada nas simulações foi de 310 K. Todos os sistemas foram submetidos a 50 ns de simulação, como uma etapa de screening. Posteriormente os que apresentaram melhores resultados foram

submetidos a mais 100 ns. Foram realizadas análises de desvio quadrático médio (RMSD) do backbone e do ligante, raio de giro (Rg), flutuação quadrática média (RMSF) e frequência de contatos proteína–ligante, a partir das trajetórias. Os dados obtidos foram posteriormente processados e analisados no Origin.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A etapa inicial da busca por possíveis alvos moleculares da histamina em plantas possibilitou a identificação de onze proteínas com identidade em torno de 25% em relação aos receptores de histamina, H2R, H3R e H4R. Com base em evidências da literatura, priorizamos proteínas potencialmente envolvidas em vias que promovam estímulos ao desenvolvimento vegetal após a interação com ligantes. Dentre elas, o receptor acoplado à proteína G de orquídea (Dendrobium chrysotoxum), com 22,5% de identidade frente ao H4R humano, surge como um alvo promissor. Sua estrutura tridimensional possui RMSD de 1,040 Å, indicando que o dobramento é altamente semelhante. Entretanto, considerando que estudos prévios de interação com a histamina foram conduzidos em nosso laboratório com milho (Zea mays), optamos por buscar uma proteína homóloga nessa espécie (ZmGPR, UniProt ID: B6SHE2). Apesar da baixa identidade (~20%) de sequência entre B6SHE2 e H4R, a sobreposição estrutural entre ambas resultou em um valor de Root Mean Square Deviation (RMSD) de 0,960 Å, indicando elevada similaridade estrutural da cadeia principal da proteína. Algumas alterações podem ter ocorrido devido à presença da histamina no H4R, o que alterou sua conformação.

A partir da cavidade identificada em ZmGPR, foram realizadas simulações de docking molecular em diferentes programas. Ao todo foram utilizados três programas com algoritmos de amostragem e pontuação diferentes para identificar a melhor pose que a histamina poderia assumir no possível sítio de ligação**.** No total, obtivemos sete complexos com valores de afinidade não proibitivos, como pontuações positivas, o que indicaria que a histamina não se liga ao receptor. Os complexos foram identificados como ChemPLP, GoldScore, ChemScore, ASP1, ASP2, Vina e AutoDock.

Cada complexo ZmGPR-histamina obtido anteriormente foi avaliado por simulações de dinâmica molecular, com o intuito de verificar a capacidade da histamina permanecer ligada ao sítio com estabilidade. Para todos os complexos inicialmente realizamos simulações mais curtas, de 50 ns, para selecionar aqueles que poderiam ser mais estáveis. Após 50 ns, o sistema ChemScore apresentou dissociação do ligante e foi excluído da extensão da simulação. Os demais foram simulados por mais 100 ns, totalizando 150 ns. Entre os sistemas avaliados, a pose ASP2 apresentou o comportamento mais consistente, com RMSD do ligante predominantemente baixo e frequência de contato próxima de 100% com resíduos de Cys69, Ser70, Ala262, Gly263, Met265 e Gly266, incluindo a região próxima à ponte dissulfeto Cys69–Cys95. Essa consistência, em contraste com a dissociação observada para o ChemScore, indica que poses geradas por diferentes protocolos de docking podem apresentar comportamentos distintos sob simulação dinâmica. Para referência, no HRH4 humano a histamina interage com resíduos como Asp94, Tyr95, Cys98, Tyr319, Phe344, Gln347 e Trp348 (IM et al., 2023); embora não seja possível afirmar equivalência funcional direta com os resíduos da ZmGPR, a elevada similaridade estrutural sustenta essa linha de investigação.

CONCLUSÕES

Os resultados indicam que o receptor ZmGPR de *Zea mays* constitui um possível alvo molecular da histamina. Apesar da baixa identidade de sequência frente ao HRH4 humano, a elevada similaridade estrutural (RMSD de 0,960 Å) sustenta essa hipótese. Entre as poses avaliadas por docking e dinâmica molecular, a ASP2 apresentou o comportamento mais consistente ao longo de 150 ns, com manutenção do ligante e elevada frequência de contatos com a proteína, enquanto o sistema ChemScore foi descartado por dissociação precoce. Análises complementares e validação experimental ainda são necessárias para confirmar sua relevância biológica.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de iniciação científica (PIBIC), à Fundação Araucária (FA) e à Universidade Estadual de Maringá (UEM) pelo apoio institucional e infraestrutura concedidos para o desenvolvimento deste trabalho.

REFERÊNCIAS

DALLAKYAN, S.; OLSON, A. J. Small-molecule library screening by docking with PyRx**. Methods in Molecular Biology**, [S. l.], v. 1263, p. 243-250, 2015.

IM, D. et al. Structural insights into the agonists binding and receptor selectivity of human histamine H4 receptor. **Nature Communications**, [S. l.], v. 14, p. 6538, 2023.

JONES, G. et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 267, n. 2, p. 727-748, 1997.

MALAKAR, P.; GUPTA, S. K.; CHATTOPADHYAY, D. Role of plant neurotransmitters in salt stress: A critical review. **Plant Physiology and Biochemistry**, [S. l.], v. 211, p. 108601, 2024.

ROSHCHINA, V. V. Biogenic amines in plant cell at norma and stress: probes for dopamine and histamine. **In**: ELSAYED, A. I. et al. (org.). **Emerging Plant Growth Regulators in Agriculture**: Roles in Stress Tolerance. London: Elsevier, 2022. p. 357-376.

VAN DER SPOEL, D.; LINDAHL, E.; HESS, B.; GROENHOF, G.; MARK, A. E.; BERENDSEN, H. J. GROMACS: fast, flexible, and free. **Journal of Computational Chemistry**, [S. l.], v. 26, n. 16, p. 1701-1718, dez. 2005.