

Artigo

Identificação de Potenciais Inibidores da Beta-Cetoacil Sintase do *Mycobacterium tuberculosis* por Triagem Virtual

Miranda, T. F. N.; Santos Junior, M. C.*

Rev. Virtual Quim., 2016, XX (XX), no prelo. Data de publicação na Web: 4 de outubro de 2016

<http://rvq.sbq.org.br>

Identification of potential *Mycobacterium tuberculosis* beta-ketoacyl synthase inhibitors by virtual screening

Abstract: Tuberculosis (TB) is a serious public health problem because of its continued dissemination. The necessity of new and effective drugs is evident for better TB control and, to achieve this goal the key enzyme beta-ketoacyl synthase (EC 2.3.1.41) has been selected, due to its action on the synthesis of mycolic acids, and essential step to the survival of the microorganism. So, this study aimed to identify new molecular entities capable of interacting with beta-ketoacyl synthase, using virtual screening approaches. For virtual screening DOCK 6.5 program and ZINC data bank fragments has been used. After ranking the compounds by number, the top 100 structures were analyzed with the SOM algorithm available in AuPosSOM server. Intermolecular interactions resulting from the groupings generated by AuPosSOM were analyzed, and with that, new chemical entities were proposed. The theoretical affinity of these new compounds was tested against the enzyme under study. The results showed that the fragment ZINC51860757 got better affinity for the enzyme and the theoretical molecule LMM7, obtained from structural modification of the original fragment, obtained energy gain and kept the standard intermolecular interactions. Based on the strategy based on the target structure, virtual screening enable to test the putative activity before the compound is subjected to *in vitro* assays, allowing a greater planning and targeting, it can greatly reduce the cost and time employed in new drug research.

Keywords: Virtual screening; beta-ketoacyl synthase; mycolic acids.

Resumo

A tuberculose (TB) é um grave problema de saúde pública de contínua disseminação. A necessidade de novos e eficientes fármacos é evidente para um melhor controle da TB. Para atingir este objetivo foi selecionada a enzima chave beta-cetoacil sintase (EC 2.3.1.41), tendo em vista que essa enzima atua na síntese de ácidos micólicos, etapa fundamental para a sobrevivência do microorganismo. Desta forma, este trabalho objetivou a identificação de novas entidades químicas capazes de interagir com a beta-cetoacil sintase, empregando-se técnicas de triagem virtual. A triagem virtual foi realizada no programa DOCK 6.5 e utilizando o banco de fragmentos do ZINC. Após ranqueamento dos compostos por número, as 100 melhores estruturas foram submetidas a análise pelo algoritmo SOM disponível no servidor AuPosSOM. As interações intermoleculares identificadas pelo AuPosSOM foram analisadas, e com isso, novas entidades químicas foram propostas. As afinidades teóricas desses novos compostos foram avaliadas frente a enzima em estudo. Os resultados apontaram que o fragmento ZINC51860757 obteve melhor afinidade pela enzima e a moléculas teórica LMM7, obtida de modificação estrutural do fragmento de origem, obteve ganho energético e manteve o padrão de interações intermoleculares. Com base na estratégia baseada na estrutura do alvo, a triagem virtual possibilitou testar a atividade teoricamente, antes do composto ser submetido aos ensaios *in vitro*, possibilitando assim um maior planejamento e direcionamento, que pode reduzir bastante o custo e tempo empregado na pesquisa de novos fármacos.

Palavras-chave: Triagem virtual; beta-cetoacil sintase; ácidos micólicos.

* Universidade Estadual de Feira de Santana, Laboratório de Modelagem Molecular, Feira de Santana-BA, Brasil.

✉ manoelito@uefs.br

DOI:

Identificação de Potenciais Inibidores da Beta-Cetoacil Sintase do *Mycobacterium tuberculosis* por Triagem Virtual

Thiago F. N. Miranda, Manoelito C. Santos Junior*

Universidade Estadual de Feira de Santana, Laboratório de Modelagem Molecular, Feira de Santana-BA, Brasil.

* manoelito@uefs.br

Recebido em 4 de abril de 2016. Aceito para publicação em 30 de setembro de 2016

1. Introdução

2. Material e Métodos

2.1. Preparo do receptor

2.2. Preparo da base de dados

2.3. Triagem virtual por acoplamento molecular

2.4. Identificação do padrão de interações intermoleculares

3. Resultados e Discussão

4. Conclusão

1. Introdução

A tuberculose (TB) é um grave problema de saúde pública por sua contínua disseminação, agressiva evolução, pela possibilidade de recidiva e re-infecção endógena e, também, por ser uma das mais mortais doenças transmissíveis do mundo.¹

No ano de 2013, cerca de 9,0 milhões de pessoas desenvolveram tuberculose e 1,5 milhão morreram da doença, sendo 360.000 HIV-positivos. Outro agravamento importante a ser relatado refere-se ao fato de que os fármacos utilizados para o controle da tuberculose vêm apresentando resultados parcialmente satisfatórios e isso é agravado ainda mais devido ao surgimento de cepas bacterianas resistentes. Em termos globais, no ano de

2013 cerca de 3,5% dos novos casos de tuberculose e 20,5% dos doentes tratados anteriormente foram diagnosticados com tuberculose multirresistente a fármacos, o que se traduz em um número estimado de 480.000 pacientes.²

A necessidade de novos e eficientes fármacos é evidente para um melhor controle da TB. O tratamento da doença deve ser encurtado, simplificado e não deve interferir com a administração de agentes antirretrovirais. O objetivo é identificar novos tipos de fármacos contra a TB que atuem em alvos específicos, sem resistência cruzada aos medicamentos existentes.³

Neste cenário, as técnicas de triagem virtual podem ser empregadas com o intuito de otimizar a identificação (custo e tempo) de potenciais fármacos para o controle da

TB.⁴ Os programas computacionais, juntamente com os bancos de dados de proteínas e ligantes, são ferramentas úteis para a descoberta de novas substâncias com potencial biológico. O ensaio virtual por acoplamento molecular possibilita avaliar a possível afinidade entre moléculas e um determinado alvo molecular e, desta forma, a triagem em bancos de compostos químicos pode ser realizada através do critério de complementaridade ligantes/receptor⁵.

Com a utilização das ferramentas virtuais é possível direcionar os estudos para a identificação de novas substâncias para o controle da TB. No entanto, para isso, é necessário selecionar um alvo molecular importante para a sobrevivência do microorganismo. Com base neste fato, a parede celular do *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), agente causador da TB, apresenta grandes quantidades de ácidos micólicos essenciais para sua sobrevivência, que confere patogenicidade, resistência aos antibióticos intrínsecos e a capacidade do *Mtb* em persistir dentro do macrófago humano. Com isso, a via dos ácidos micólicos tem sido proposta como etapa fundamental para o desenvolvimento do *Mtb* e, com isso, pode ser considerada como uma boa via para a identificação de potenciais alvos para a pesquisa de novos fármacos contra esta bactéria.⁶ Desta forma, a enzima chave β-cetoacil sintase - KasA (EC 2.3.1.41) constitui um bom alvo, pois a mesma é responsável pela etapa limitante da biossíntese de ácido micólico.⁷

A KasA é uma transferase (EC 2.3.1.41) que realiza uma reação responsável pela etapa de alongamento da cadeia carbônica envolvida na biossíntese de ácidos graxos tipo II (*Fatty Acid Synthase* - FAS II). A primeira linha de fármacos anti-tuberculose foi iniciada com a descoberta da isoniazida, que atua inibindo a enoil-ACP redutase, validando a via FAS-II como promissora para o desenvolvimento de novos antibióticos.⁸

A KasA inicia sua catálise com a condensação dos substratos malonil-ACP e acetil-CoA, logo após, inicia-se a série cíclica de alongamento, que é repetida até que

determinado ácido graxo saturado seja produzido. O sítio ortostérico da KasA consiste de uma tríade catalítica composta por Cys171, His311 e His345. Entende-se que a reação de condensação por KasA é iniciada pela desprotonação da cisteína catalítica.^{7,8}

Após a escolha do alvo molecular, o próximo passo é a escolha da base de ligantes a ser pesquisada como fonte de novas entidades químicas capazes de inibir a *Mycobacterium tuberculosis* KasA (MtKasA). O banco de fragmentos foi o escolhido com base em uma abordagem mais racional e focada, pois permite satisfazer certas características-chave, como a diversidade química, reduzida complexidade estrutural e boa solubilidade em água.⁹

Através da constatação da necessidade de novos candidatos a fármacos para o controle da tuberculose, este trabalho teve por objetivo identificar novas substâncias com potencial capacidade de controle de *M. tuberculosis* e, para isso, optou-se pelo emprego de estratégias virtuais para triagem em bancos de fragmentos de moléculas, avaliando-se a afinidade entre estes fragmentos e a MtKasA. Espera-se, com isso, apontar novas moléculas com potencial para o controle da tuberculose, contribuindo para a pesquisa de novos fármacos.

2. Material e Métodos

2.1. Preparo do receptor

A estrutura da beta-cetoacil sintase foi selecionada no *Protein Data Bank* (PDB) baseando-se nos fatores de qualidade cristalográfica (Resolução < 2Å) e na presença de ligante para a localização das coordenadas do sítio ortostérico.¹⁰ O preparo do alvo molecular foi realizado no módulo DockPrep do programa UCSF Chimera 1.9 e, com isso, moléculas de água foram removidas e átomos de hidrogênio adicionados à estrutura, de forma a otimizar suas ligações de hidrogênio.¹¹ O estado de protonação foi

corrigido através do servidor H++ 3.0.¹²

2.2. Preparo da base de dados

O conjunto de compostos utilizados na triagem virtual foi obtido do banco de dados virtual ZINC¹³, e a base selecionada foi o banco de fragmentos. Os ligantes foram preparados segundo o protocolo do módulo DockPrep do programa UCSF Chimera 1.9, com a adição dos hidrogênios e carga atômica ff12SB.¹¹

2.3. Triagem Virtual por Acoplamento Molecular:

O acoplamento molecular foi realizado pelo programa DOCK 6.5 e seus programas acessórios.¹⁴ O DMS (*Display Midas System*) foi utilizado para criar uma superfície molecular do receptor¹⁵. O programa SPHGEN¹⁶ foi utilizado para criar o conjunto de esferas com base na superfície molecular gerada pelo DMS, e o arquivo resultante foi editado para incluir apenas as esferas no perímetro de 8,0Å do ligante cristalográfico. O programa SHOWBOX foi usado para definir a localização e o tamanho da caixa onde foi calculado o GRID¹⁴, para gerar a grade de pontuação e relevo.¹⁷ Para acelerar os cálculos, foram avaliadas 50 configurações por ciclo. Para pontuar as moléculas foram avaliadas as seguintes funções de pontuação: GRIDSCORE¹⁸, CONTINUOUS SCORE¹⁸, CONTACT SCORE¹⁸, GRIDSCORE GB/SA.¹⁹

A avaliação dos parâmetros estabelecidos no acoplamento molecular foi realizada através de duas técnicas distintas, a primeira visando avaliar a capacidade do DOCK 6.5 em reposicionar o ligante cristalográfico no sítio ortostérico da enzima, e a segunda com o objetivo de avaliar a capacidade do método em separar moléculas ativas de inativas.

A avaliação do reposicionamento foi realizada por meio da diferença do valor de RMSD (*Root Mean Square Deviation*) entre a

pose gerada pelo acoplamento molecular e a de origem do ligante cristalográfico. O RMSD foi calculado pelo programa DOCK 6.5, considerou-se satisfatório o valor de referência de RMSD < 2,0 Å.²⁰

Para avaliação global da eficiência do programa foi empregada a análise global por meio da curva ROC (*Receiver Operator Characteristic*). A avaliação por meio da curva ROC utilizou uma biblioteca de moléculas formada por ligantes ativos ($K_i < 40 \text{ } \mu\text{M}$) e moléculas inativas. As moléculas ativas foram obtidas através de revisão da literatura. As moléculas inativas foram construídas pelo servidor on-line *Directory of Useful Decoys Enhanced* (DUD-E).²¹ Sendo que para cada molécula ativa foram geradas 50 moléculas inativas. A avaliação do método foi determinada através do cálculo da área sob a curva (AUC) da curva ROC e, considerou-se ótimo o método com AUC > 0,9.²²

Após a escolha da função de pontuação todo o banco de fragmentos do ZINC foi acoplado frente à MtKasA. Os ligantes foram ordenados por número e os 100 primeiros compostos foram submetidos à etapa subsequente do trabalho.

2.4. Identificação do padrão de interações intermoleculares

O algoritmo SOM de mapas auto-organizáveis (do inglês *Self-Organizing Maps*), foi utilizado através da plataforma AuPosSOM (do inglês *Automatic Analysis of Poses Using Self-Organizing Maps*), que faz análise automática de posturas por meio de mapas auto-organizáveis, que por sua vez agrupa os compostos pela semelhança dos seus contatos intermoleculares com o receptor²³. Devido ao fato do AuPosSOM organizar os ligantes em árvores hierárquicas de acordo com a similaridade de interação intermolecular (ligações de hidrogênio, interações polares, interações lipofílicas e todos os contatos atômicos). Inicialmente procedeu-se a escolha do padrão de

organização através de uma análise ROC (maior valor de AUC), utilizando para isso o conjunto de moléculas ativas e inativas empregado na etapa anterior.

Por fim, as interações intermoleculares foram analisadas por meio dos esquemas gerados pelo programa Poseview Web 1.97.0. Este programa gera automaticamente imagem de alta qualidade em diagramas 2D do complexos de proteína-ligante onde é possível visualizar interações eletrostáticas e hidrofóbicas.²⁴

3. Resultados e Discussão

A busca no PDB apontou a existência de 29 proteínas cristalográficas da *MtKasA*. Em situações que estejam disponíveis mais de uma estrutura do mesmo alvo molecular, a escolha da proteína deve considerar a resolução e a presença de ligantes co-cristalizados, pois a estrutura tridimensional da proteína alvo deve apresentar informações úteis e de alta qualidade.²⁵ Considerando-se estes pontos, a proteína cristalográfica escolhida foi a que possui código PDB 4C6X⁷, devido ao valor satisfatório de resolução (1,95 Å) bem como

a presença de um ligante co-cristalizado (tiolactomicina-TLM). O TLM é um produto natural mais frequentemente empregado para estudos de inibição da KasA, pois o mesmo tem alta afinidade pela enzima⁷, com isso, espera-se que a orientação do mesmo, bem como as interações intermoleculares já estudadas, forneçam dados importantes para a análise dos dados obtidos na triagem virtual.

O banco de fragmentos do ZINC foi obtido no dia 14/10/14 e o mesmo possuía cerca de 1,5 milhões de estruturas. O fato de estas moléculas possuírem massa molecular abaixo de 500 Da permite que estas estruturas não ocupem o sítio ativo do alvo por completo, o que permite supor que as ligações em regiões adjacentes podem ser otimizadas com a junção de diferentes fragmentos moleculares, e assim, pode-se obter uma melhor eficiência de ligação.²⁶

Os parâmetros utilizados no programa DOCK 6.5 foram avaliados, inicialmente, através da capacidade do mesmo em reposicionar o ligante cristalográfico no sítio ortostérico da *MtKasA* o mais próximo possível da posição e orientação espacial de origem. O resultado para o reposicionamento está demonstrado na figura 1.

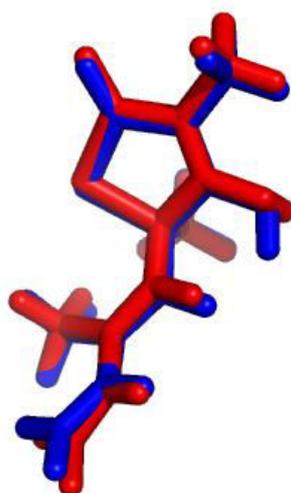


Figura 1. Representação esquemática da pose do ligante cristalográfico (Azul) e do re-ocoplamento molecular (Vermelho) com RMSD de 0,26 Å. Figura gerada no UCSF Chimera 1.9

O RMSD de 0,26 Å da pose do re-acoplamento molecular em relação ao ligante cristalográfico indica que o programa obteve sucesso em reposicionar a molécula no sítio ortostérico da enzima na mesma região e com mesma configuração espacial.²⁰

O RMSD é comumente utilizado como métrica inicial para avaliação do acoplamento molecular. No entanto, o mesmo não avalia a capacidade preditiva do programa em distinguir moléculas ativas de inativas. Para contornar tal limitação, pode-se recorrer ao emprego da curva ROC, pois esta é uma métrica bem utilizada com o objetivo de avaliar a habilidade de um determinado teste em discriminar entre duas populações.²⁷ Com isso, o mesmo pode ser utilizado para avaliar a capacidade do programa em selecionar moléculas ativas e descartar as inativas.

Quatro funções de pontuação diferentes do programa DOCK 6.5 foram avaliadas pelo teste baseado na curva ROC: GRIDSCORE¹⁸, CONTINUOUS SCORE¹⁸, CONTACT SCORE¹⁸, e GRIDSCORE GB/SA.¹⁹ A função de pontuação GRIDSCORE é baseada nas funções de interação empírica de London-Jones e eletrostática de Coulomb²⁸ (MENG; SHOICHET; KUNTZ 1992). A função CONTINUOUS SCORE baseia-se na implementação da pontuação no campo de força da mecânica molecular pela energia de interação, que consiste no somatório das energias de van der Waals e eletrostáticas.¹⁸ A partir dos resultados do GRIDSCORE foi realizada uma reclassificação utilizando a

pontuação Hawkins GB/SA que é uma implementação da Mecânica Molecular aplicada a área de superfície generalizada (MM-GB/SA), utilizando o modelo solvatação de superfície generalizada relatado nos trabalhos de Hawkins e colaboradores (1995 e 1996).¹⁹

Seis moléculas ativas foram selecionadas, após uma busca na literatura.²⁹ As estruturas moleculares e respectivos valores de Ki encontram-se na Figura 2. Basicamente são reportados a tiolactomicina (TLM1) e cinco análogos estruturais. Estas moléculas pertencem à classe de compostos conhecidos como dihidrotiofenóis orgânicos. Contêm uma porção dihidrotiofenol, que é um derivado do tiofenol com apenas uma ligação dupla.²⁹

A partir das moléculas ativas e utilizando-se o servidor DUD-E²⁰ foram geradas 50 moléculas inativas. O DUD-E gera 50 moléculas inativas para cada molécula ativa, no entanto, as moléculas TLM1, TLM3, TLM4, TLM5 podem apresentar um estado desprotonado e TLM18 um estado protonado (Figura 3), e para cada estado foram geradas 50 moléculas inativas. As moléculas inativas são estruturas com características físico-químicas semelhantes às moléculas ativas, porém, possuem topologia diferente. Esses aspectos permitem que os ligantes tenham prioridade no acoplamento molecular por possuir uma topologia que se encaixa no sítio com maior afinidade.³⁰

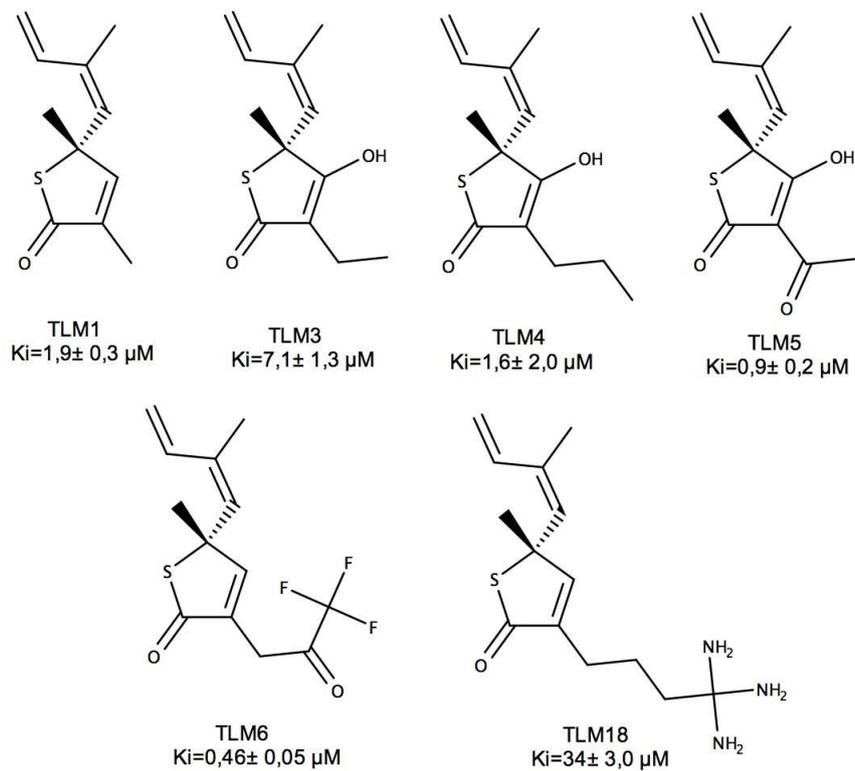


Figura 2. Moléculas ativas selecionadas e seus respectivos valores de K_i

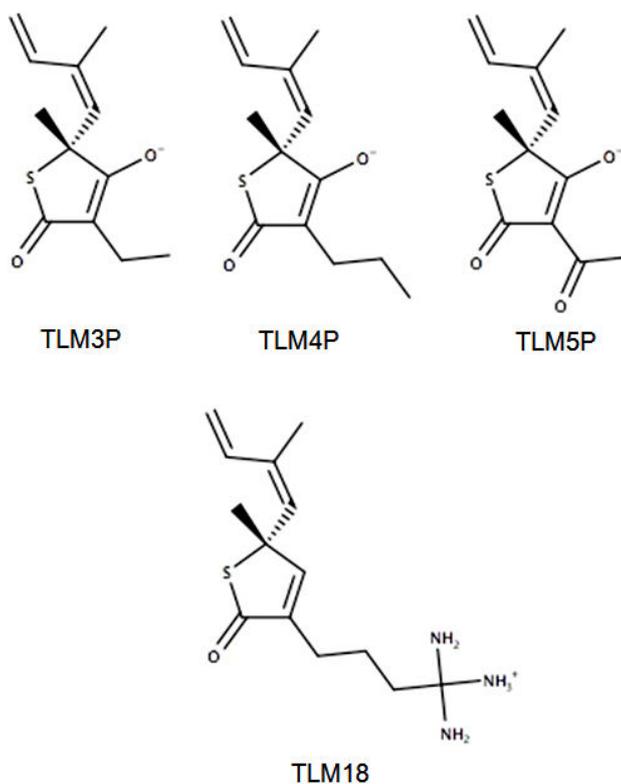


Figura 3. Estado desprotonado das moléculas TLM3, TLM4, TLM5 e protonado da molécula TLM18

A análise da curva ROC pode ser feita através da quantificação da área sob a curva (AUC), assim é possível avaliar o desempenho global de cada função de pontuação. A AUC = 1 indica que o método consegue diferenciar 100% as moléculas ativas das inativas, enquanto valor de 0,5 é interpretado como

um desempenho aleatório, ou seja, a probabilidade de detectar moléculas inativas é igual à de detectar molécula ativa. Dessa forma, para obtenção de desempenho foi adotado o valor de $AUC > 0,9^{31}$. Na figura 4 estão representadas as curvas ROC para cada função de pontuação.

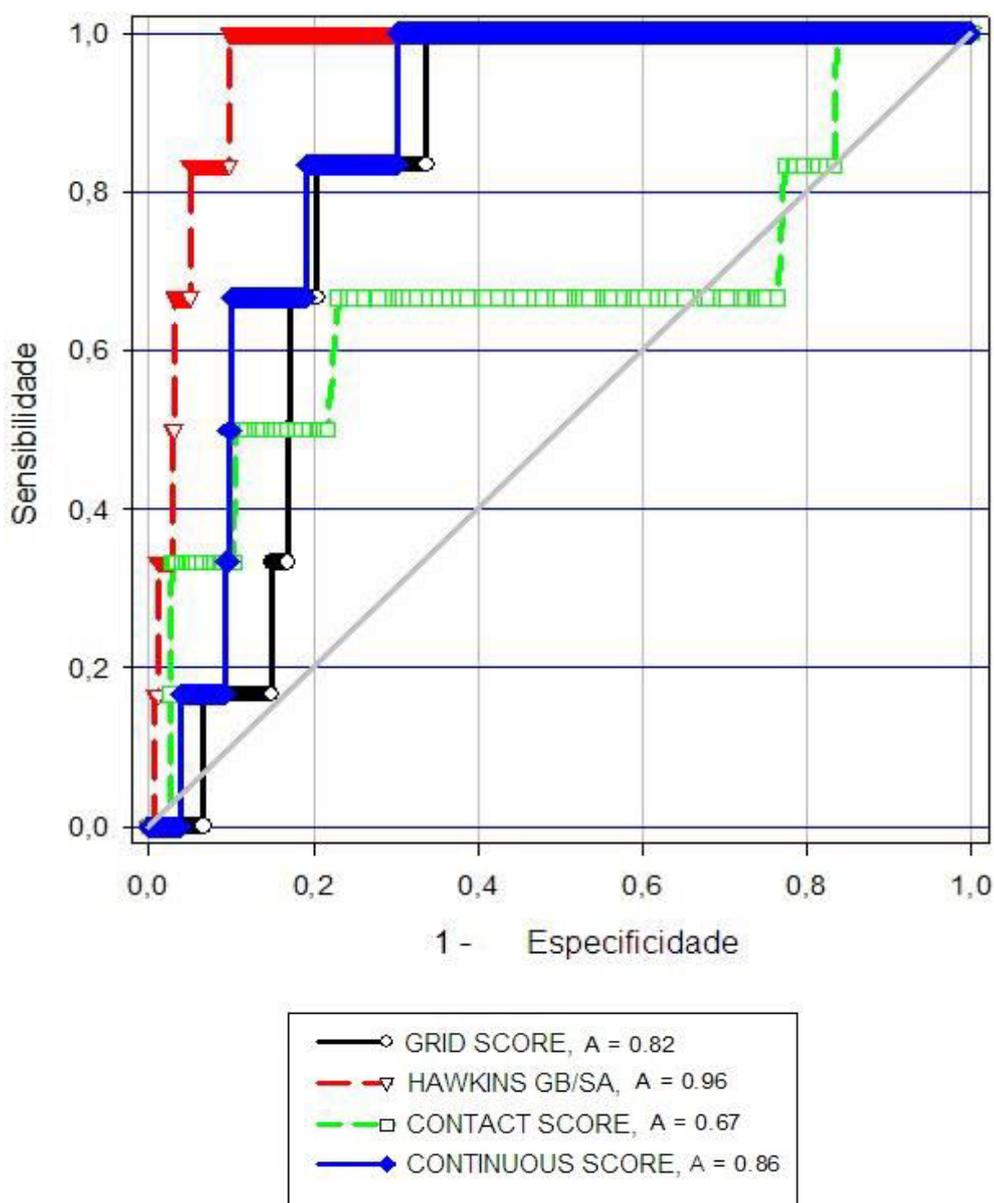


Figura 4. Curva ROC e respectivas AUC para as 4 funções de pontuação

A análise da AUC das funções de pontuações indica que o melhor resultado foi obtido pela função GRIDSCORE GB/SA (AUC=

0,96), seguida pela CONTINUOUS SCORE (AUC=0,86) e GRID SCORE (AUC=0,82), a função CONTACT SCORE não obteve

resultados satisfatórios, pois sua AUC foi inferior a 0,7 (AUC=0,67) (Figura 3). A função GRIDSCORE GB/SA foi a função escolhida para o acoplamento molecular, não somente por apresentar a AUC > 0,9, mas também devido a essa função conseguir recuperar todas as moléculas ativas com 10% do banco (Figura 4), como também, a mesma foi a única função de pontuação que não enquadrou moléculas ativas como sendo moléculas inativas no início da avaliação (valores abaixo da linha cinza do gráfico mostrado na figura 4). Com base nos aspectos apresentados a triagem virtual por acoplamento molecular foi realizada no programa DOCK 6.5 com a função de pontuação GRIDSCORE GB/SA.

GRIDSCORE GB/SA é uma função que simula o efeito de solvatação implícita nas regiões da proteína que o solvente tem acesso, utilizando conhecimentos da mecânica molecular. As interações são pontuadas de acordo com a energia de Coulomb, o potencial de Lennard Jones e mais a variação da solvatação¹⁹. A consideração desses fatores pela função de pontuação, possivelmente contribuiu para melhor reprodução do sistema enzimático em estudo. A escolha da função de pontuação deve ser feita com cautela, pois a eficiência da mesma, depende da proteína e do banco de ligantes utilizados.

As bibliotecas de fragmentos são tipicamente formadas com moléculas com massa molecular abaixo dos 250 Da, grande diversidade química e a exploração regiões de interação intermolecular com o receptor. Após a triagem virtual baseada no acoplamento molecular, os fragmentos foram ordenados por número, com o objetivo de selecionar somente os que apresentem melhor afinidade pela *MtKasA*. No entanto, o fragmento selecionado deve ser submetido a um refinamento, com o objetivo de incrementar a afinidade de ligação, e para isso foi utilizada a técnica denominada fragmentos interligados, na qual dois ou mais acessos de fragmentos são encontrados interagindo com regiões adjacentes da proteína alvo e os mesmos são unidos,

formando um novo composto que poderá interagir com dois locais distintos da proteína alvo⁹.

Com o objetivo de identificar fragmentos adjacentes foi empregado o método SOM através do servidor AuPosSOM, que ordena os resultados do acoplamento molecular em árvores hierárquicas, construídas de acordo com os contatos que os ligantes realizam com a proteína²³.

Inicialmente foi selecionado o tipo de padrão de interação intermolecular, pois a técnica precisa de um banco de dados bom para que se tenha uma maior eficiência. Assim, é preciso separar as moléculas que apresentam contatos comuns dos contatos específicos, evitando com que este banco mascare os resultados do AuPosSOM²³. A escolha do tipo de contato específico foi realizado com base no valor de AUC, utilizando o mesmo banco de moléculas ativas e inativas empregado na etapa de avaliação do acoplamento molecular. O melhor resultado foi obtido com contatos do tipo lipofílicos (AUC=0,9), métodos com AUC > 0,9 mostram que os mesmo tem excelente valor preditivo³¹. Os outros padrões de interações apresentaram os seguintes valores: ligações de hidrogênio (AUC=0,68), interações polares (AUC=0,65) e todos os contatos atômicos (AUC=0,81).

A curva ROC para os contatos lipofílicos foi a que obteve melhor resultado, pois, os aminoácidos que compõem o sitio ativo da *MtKasA* apresentam características lipofílicas. Outro achado que corrobora tal afirmação diz respeito à própria catálise realizada pela enzima, pois o ácido micólico sintetizado apresenta características lipofílicas, permitindo indicar que esse sitio seja lipofílico⁷.

As 100 melhores moléculas, ordenadas pela afinidade com a enzima (GRIDSCORE GB/SA), foram submetidas ao servidor AuPosSOM, para a organização em mapas hierárquicos baseados nos contatos lipofílicos. O resultado obtido para esta etapa estão representados na Figura 5.

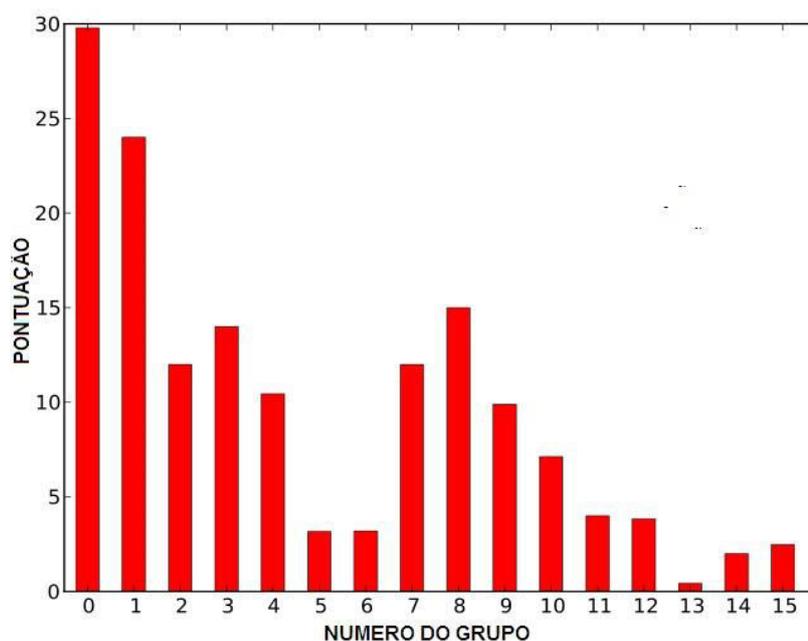


Figura 5. Pontuação dos agrupamentos com base em suas semelhanças de interação intermolecular. Imagem gerada pelo AuPosSOM

Os resultados apontam a formação de 15 grupos de contatos. Para a seleção dos grupos foi utilizado os valores pontuação dos mesmos. Desta forma, os quatro agrupamentos (0, 1, 3 e 8) com maiores pontuações foram selecionados.

Através do programa PoseView Web foi possível visualizar as interações intermoleculares dos complexos proteína/ligante, gerados pelo resultado do acoplamento realizado pelo DOCK 6.5 e ordenados por grupos de contatos de acordo com o servidor AuPosSOM.

O grupo 0 foi composto por 9 moléculas (Figura 6A-I). O principal contato observado foi do tipo hidrofóbico entre as moléculas analisadas e os aminoácidos Pro279, Ala286,

Thr312, Thr314, Gly317, Ala320, Phe401 e Phe403, sendo que os aminoácidos mais frequentemente encontrados nesse tipo de interação foram a Pro279 e Phe401. No trabalho de Schiebel *et al.* (2013) fica evidente a participação do resíduo Phe401 para o reconhecimento molecular com inibidores da enzima. São observadas ligações de hidrogênio do tipo doadora com os aminoácidos Asp272, Asn407 (Figuras 5A, 5C-H) e poucas ligações de hidrogênio do tipo acceptora, as quais foram encontradas entre os ligantes e o resíduos His310, Thr314 e His344. Três moléculas do grupo ainda apresentaram empilhamento pi com os aminoácidos Phe401 e 403 (Figura 6D, 6E e 6H).

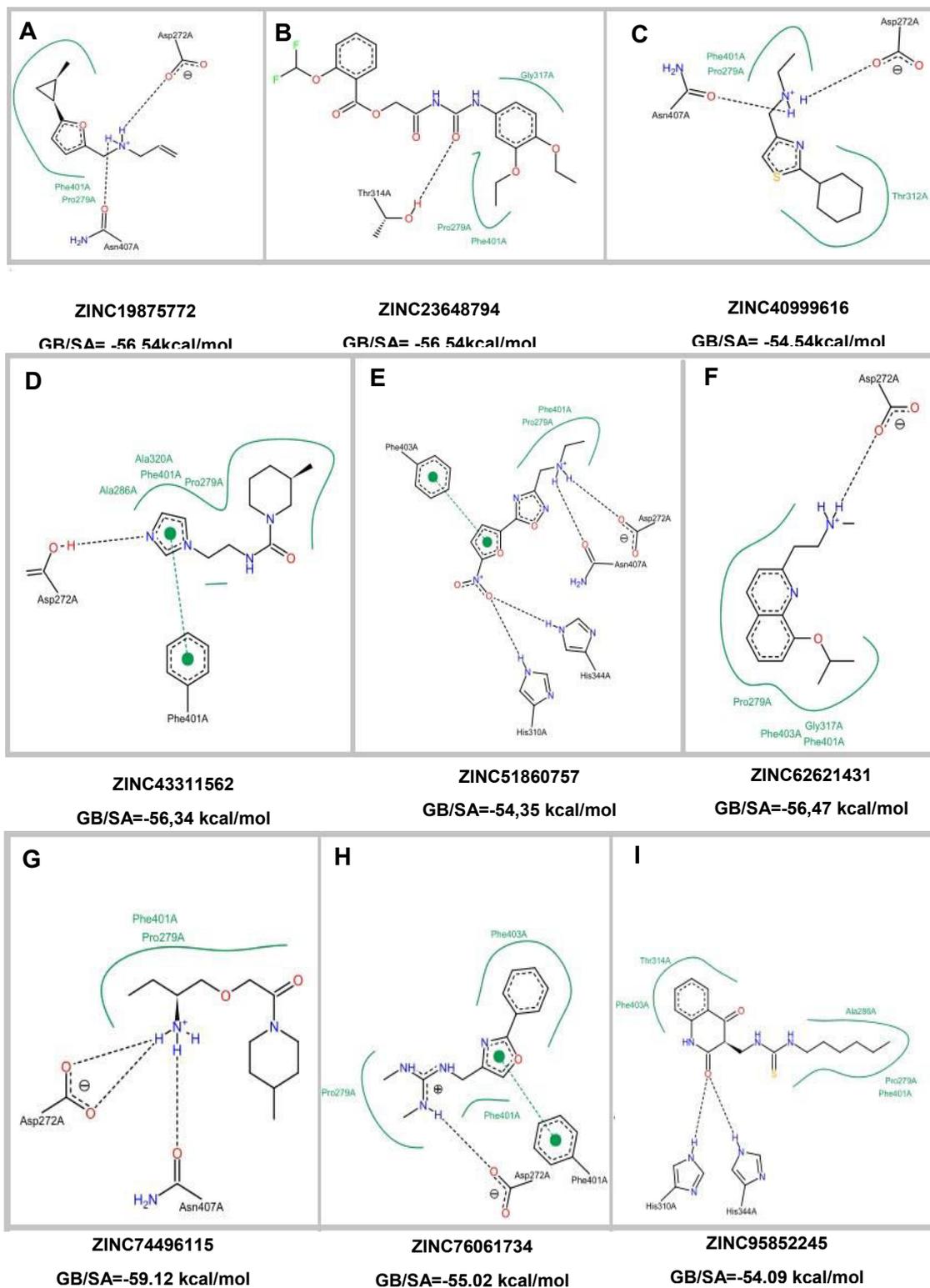


Figura 6. Imagem 2D do complexo proteína/ligantes da grupo 0, com respectivo valor de pontuação para o acoplamento molecular. Linha preta tracejada: ligações de hidrogênio; Linha verde tracejada: empilhamento pi; linha verde preenchida: interações hidrofóbicas. Imagens geradas pelo servidor PoseviewWeb 1.97.0

O grupo 1 foi composto por uma única molécula (Figura 7A). Os contatos hidrofóbicos foram realizados com os aminoácidos Pro279, Gly317 e Phe401. Foi identificada apenas uma única ligação de hidrogênio acceptora entre a carbonila do

ligante e a hidroxila de Thy314. Vale salientar que os aminoácidos Pro279 e Phe401, que realizam contatos hidrofóbicos com o ligante, também participam de interações da mesma natureza identificadas no grupo 0 (Figura 6).

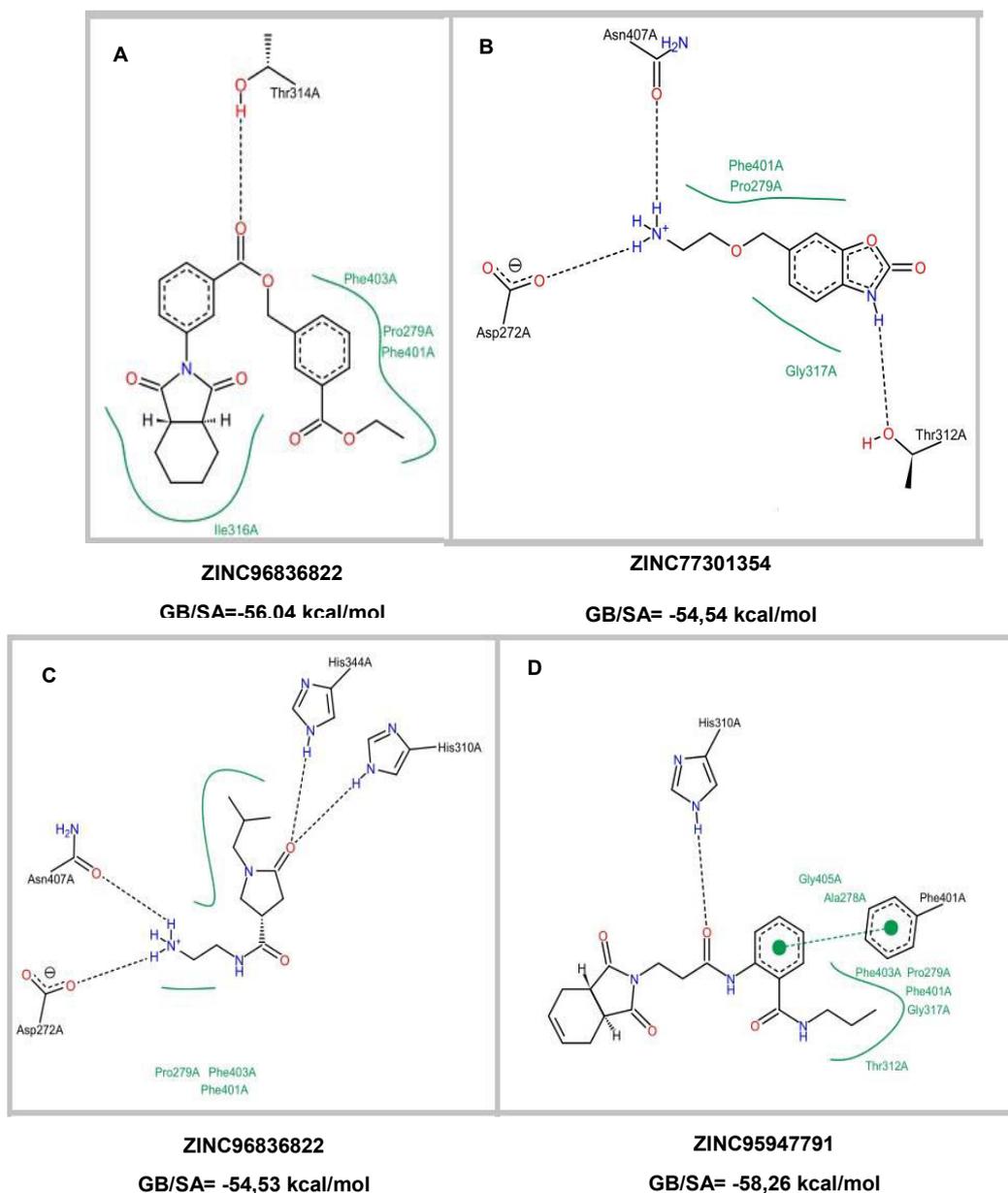


Figura 7. Imagem 2D do complexo proteína/ligante dos grupos 1 (A), 3 (B) e 8 (C e D), com respectivo valor de pontuação para o acoplamento molecular. Linha preta tracejada: ligações de hidrogênio; Linha verde tracejada: empilhamento pi; linha verde preenchida: interações hidrofóbicas. Imagens geradas pelo servidor PoseviewWeb 1.97.0

O grupo 3 foi formado pela molécula ZINC7730154 (Figura 7B). Foi possível observar um bolsão hidrofóbico formado pelos resíduos Pro279, Gly317 e Phe401. A Pro279 e Phe401 estão presentes nos dois grupos anteriormente analisados. Duas ligações de hidrogênio doadoras foram observadas entre os hidrogênios do quaternário de amônio da molécula ZINC7730154 e as carbonilas dos resíduos Asp272 e Asn407.

O grupo 8 é composto por 2 moléculas (Figuras 7C e D). Foi possível observar contatos hidrofóbicos entre os aminoácidos Pro279, Phe401 e Phe403 e a molécula ZINC96836822 e duas ligações de hidrogênio doadoras entre o quaternário de amônio e os resíduos Asp272 e Asn407 (Figura 6C). A molécula ZINC95947791 demonstra pontos de interação hidrofóbica com os aminoácidos Ala278, Pro279, Thr312 e Phe403 e 401. Além disso, observa-se, também, uma ligação de hidrogênio acceptora entre a carbonila e a His310, por fim, o anel aromático do ligante estabelece um empilhamento pi, com o anel da Phe401. Também foi possível observar a presença de ligações de hidrogênio com os aminoácidos Asp272, His310, His344 e Asn407.

Observando os resultados obtidos com os grupos gerados pelo AuPosSOM percebe-se que a presença de aminoácidos capazes de realizar interações hidrofóbicas é importante para o reconhecimento molecular da enzima com os ligantes estudados. Tal fato já era esperado pela natureza do sítio de ligação da *MtKasA*. O grupo 0 foi o que obteve maior valor de pontuação pelo AuPosSOM (Figura 5) e dentro desse grupo o composto ZINC51860757 foi o que apresentou o maior número de contatos (Figura 5E) e melhor valor de energia de interação (GB/SA = -54,35 Kcal/mol).

As interações intermoleculares formadas com a molécula ZINC51860757 também ocorrem com outras moléculas presentes em outros grupos (Figura 7), mas a Phe401 que participa principalmente da formação de interações hidrofóbicas, pode também contribuir para a formação de empilhamento

pi devido à presença do anel aromático em sua cadeia lateral. Considerando que a contribuição energética da interação aromática é maior que as interações hidrofóbicas³², realizou-se modificações estruturais utilizando o fragmento ZINC51860757 como molécula molde, os fragmentos adicionados ao ZINC51860757 foram idealizados com base nas informações dos grupos 1, 3 e 8. As modificações sugeridas encontram-se descritas na figura 7.

Com as modificações estruturais no fragmento ZINC51860757 (GB/SA = -54,35 kcal/mol) pode-se perceber que algumas moléculas obtiveram redução na interação com a proteína alvo, no entanto, a molécula LMM7, apresentou ganho energético de aproximadamente -4,83 kcal/mol (GB/SA = -59,18 kcal/mol) (Figura 8). A inserção de grupos maiores (benzeno, fenol e naftaleno) não levou a bons resultados, pois as moléculas não realizaram interações significativa com os aminoácidos do sítio, resultando em valores de energias ruins.

A análise das interações intermoleculares (Figura 9) do complexo formado entre a *MtKasA* e a LMM07 mostrou a presença de interações hidrofóbicas, empilhamento pi e ligações de hidrogênio. O anel imidazólico do ligante realiza uma interação hidrofóbica com a cadeia lateral da Pro279, neste mesmo anel do ligante, ocorre a formação de empilhamento pi com o anel aromático de Phe401. Estas duas interações podem ter contribuído para o ganho energético obtido pela molécula teórica LMM7, pois o fragmento original apresentava apenas a formação de interações hidrofóbicas com essa região. O anel furano da LMM7 se coordena com o anel aromático da Phe403 formando uma interação do tipo empilhamento pi. Foram identificadas duas ligações de hidrogênio doadoras com o grupo amino protonado, sendo uma com o Asp272 e a outra com a Asn407, as cadeias laterais polares desses aminoácidos facilitam a formação desse tipo de interação. Por fim, o grupo nitro da LMM7 realiza duas ligações de hidrogênio acceptoras com as His310 e 344.

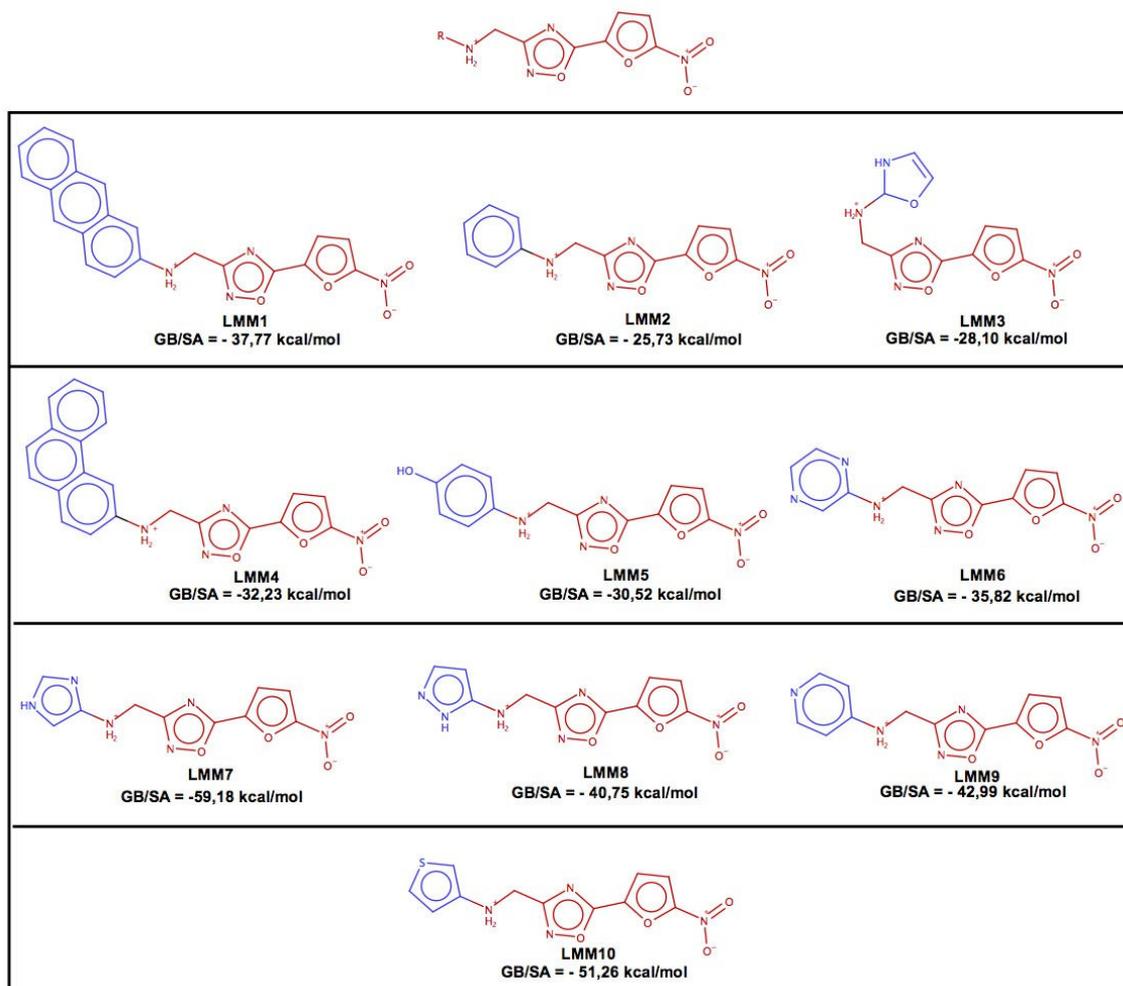


Figura 8. Estrutura molecular das moléculas teóricas propostas e respectivos valores de energia de afinidade frente a MtKasA

O padrão de interação intermolecular foi mantido para a molécula teórica LMM7, pois existem indícios que os resíduos Phe401, Phe403 realizam interações aromáticas com os inibidores TLM e seus análogos (Figura 2). As interações intermoleculares com os aminoácidos His310 e 344 também merecem destaque, pois estes resíduos fazem parte da tríade catalítica da enzima.⁷

Segundo Lipinski *et al.* (1997), um fármaco para ter boa biodisponibilidade oral

deve satisfazer os seguintes parâmetros: massa molecular ≤ 500 Da; máximo de cinco grupos doadores de ligação hidrogênio (HBD); máximo de dez grupos aceptores de ligação hidrogênio (HBA) e LogP menor do que 5, esse último corresponde a lipofilicidade da substância, e afeta no metabolismo, absorção e toxicidade da molécula. Com isso a moléculas teórica LMM7 não viola nenhum dos parâmetros da regra dos cinco de Lipinski.³³

Referências Bibliográficas

- ¹ Procópio, M. J. *Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço*. FIOCRUZ/ENSP/EAD: Rio de Janeiro, 2008. [\[Link\]](#)
- ² World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2014, Geneva. Disponível em: <<http://www.saude.mt.gov.br/upload/documento/81/control-da-tuberculose-uma-proposta-de-integracao-ensino-servico-%5B81-080909-SES-MT%5D.pdf>>. Acesso em: 2 janeiro 2014 [\[Link\]](#)
- ³ Ananthan, S.; Faaleolea, E. R.; Goldman, R. C.; Hobrath, J. V.; Kwong, C. D.; Laughon, B. E.; Maddry, J. A.; Mehta, A.; Rasmussen, L.; Reynolds, R. C.; Secrist, J. A.; Shindo, N.; Showe, D. N.; Sosa, M. I.; Suling, W. J.; White, E. L. High-throughput screening for inhibitors of Mycobacterium tuberculosis H37Rv. *Tuberculosis* **2009**, *89*, 334. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ⁴ Guido, R. V. C.; Andricopulo, A. D.; Oliva, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. *Estudos Avançados* **2010**, *24*, 81. [\[CrossRef\]](#)
- ⁵ Carvalho, I.; Pupo, M. T.; Borges, A. D. L.; Bernardes, L. S. C. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. *Química Nova* **2003**, *26*, 428. [\[CrossRef\]](#)
- ⁶ Bhatt, A.; Molle, V.; Besra, G. S.; Jacobs Jr, W. R.; Kremer, L. The Mycobacterium tuberculosis FAS-II condensing enzymes: their role in mycolic acid biosynthesis, acid-fastness, pathogenesis and in future drug development. *Molecular Microbiology* **2007**, *64*, 1442. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ⁷ Schiebel, J.; Kapilashrami, K.; Fekete, A.; Bommineni, G. R.; Schaefer, C. M.; Mueller, M. J.; Tonge, P. J.; Kisker, C. Structural basis for the recognition of mycolic acid precursors by KasA, a condensing enzyme and drug target from Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Biological Chemistry* **2013**, *288*, 34190. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ⁸ Sachdeva, S.; Musayev, F. N.; Alhamadsheh, M. M.; Scarsdale J. N.; Wright, H. T.; Reynolds, K. A. Separate entrance and exit portals for ligand traffic in Mycobacterium tuberculosis FabH. *Chemistry & Biology* **2008**, *15*, 4, 402. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ⁹ Fattori, D.; Squarcia, A.; Bartoli, S. Fragment-based approach to drug lead discovery. *Drugs in R & D* **2008**, *9*, 217. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ¹⁰ Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* **2000**, *28*, 235. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ¹¹ Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* **2004**, *25*, 1605. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ¹² Anandakrishnan, R.; Aguilar, B.; Onufriev, A. V. H++3.0: automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations. *Nucleic Acids Research* **2012**, *40*, 537 [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ¹³ Irwin, J. J.; Sterling, T.; Mysinger, M. M.; Bolstad, E. S.; Coleman, R. G.. ZINC: a free tool to discover chemistry for biology. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2012**, *52*, 1757. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ¹⁴ Ewing, T. J. A.; Makino, S.; Skillman, A. G.; Kuntz, I. D. DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **2001**, *15*, 411. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ¹⁵ Ferrin, T. E.; Huang, C. C.; Jarvis, L. E.; Langridge, R. The Midas display system. *Journal of Molecular Graphics* **1988**, *6*, 13. [\[CrossRef\]](#)
- ¹⁶ Kuntz, I. D.; Blaney, J. M.; Oatley, S. J.; Langridge, R.; Ferrin, T. E. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *Journal of Molecular Biology* **1982**, *161*, 269. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ¹⁷ Shoichet, B. K.; Kuntz, I. D.; Bodian, D. L. Molecular docking using shape

descriptors. *Journal of Computational Chemistry* **1992**, *13*, 380. [[CrossRef](#)]

¹⁸ Triballeau, N.; Acher, F.; Brabet, I.; Pin, Jean-Philippe; Bertrand, H.-O. Virtual screening workflow development guided by the “receiver operating characteristic” curve approach. Application to high-throughput docking on metabotropic glutamate receptor subtype 4. *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, *48*, 2534. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

¹⁹ Meng, E. C.; Shoichet, B. K.; Kuntz, I. D. Automated docking with grid-based energy evaluation. *Journal of Computational Chemistry* **1992**, *13*, 505. [[CrossRef](#)]

²⁰ Brozell, S. R.; Mukherjee, S.; Balius, T. E.; Roe, D. R.; Case, D. A.; Rizzo, R. C. Evaluation of DOCK 6 as a pose generation and database enrichment tool. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **2012**, *26*, 749. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

²¹ Mysinger, M. M.; Carchia, M.; Irwin, J. J.; Shoichet, B. K. Directory of useful decoys, enhanced (DUD-E): better ligands and decoys for better benchmarking. *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *55*, 6582. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

²² Matsubara, E. T. Relações entre ranking, análise ROC e calibração em aprendizado de máquina. *Tese de Doutorado*, Universidade de São Paulo, 2008. [[Link](#)]

²³ Mantsyzov, A. B.; Bouvier, G.; Evrard-Todeschi, N.; Bertho, G. Contact-based ligand-clustering approach for the identification of active compounds in virtual screening. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry* **2012**, *5*, 61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

²⁴ Stierand, K.; Rarey, M. Drawing the PDB: Protein–Ligand Complexes in Two Dimensions. *Medicinal Chemistry Letters* **2010**, *1*, 540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

²⁵ Ferreira, R. S.; Oliva, G.; Andricopulo, A. D. Integração das técnicas de triagem virtual e triagem biológica automatizada em alta escala: oportunidades e desafios em p&d de fármacos. *Química Nova* **2011**, *34*, 1770. [[CrossRef](#)]

²⁶ Scott D. E.; Coyne A. G.; Hudson S. A.; Abell C. Fragment-based approaches in drug discovery and chemical biology. *Biochemistry* **2012**, *51*, 4990. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

²⁷ Rizzo, R. C.; Aynechi, T.; Case, D. A.; Kuntz, I. D. Estimation of absolute free energies of hydration using continuum methods: accuracy of partial charge models and optimization of nonpolar contributions. *Journal of Chemical Theory and Computation* **2006**, *2*, 128. [[CrossRef](#)]

²⁸ Kapilashrami, K.; Bommineni, G. R.; Machutta, C. A.; Kim, P.; Lai, Cheng-Tsung; Simmerling, C.; Picart, F.; Tonge, P. J. Thiolactomycin-based β -Ketoacyl-AcpM Synthase A (KasA) Inhibitors: Fragment-Based Inhibitor Discovery Using Transient One-Dimensional Nuclear Overhauser Effect NMR Spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry* **2013**, *288*, 6045. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

²⁹ Meng, E. C.; Shoichet, B. K.; Kuntz, I. D. Automated docking with grid-based energy evaluation. *Journal of Computational Chemistry* **1992**, *13*, 505. [[CrossRef](#)]

³⁰ Huang, N.; Kalyanaraman, C.; Bernackia, K.; Jacobson, M. P. Molecular mechanics methods for predicting protein–ligand binding. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2006**, *8*, 5166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

³¹ Carreiras, P. M. S. G. C. Uma estratégia para a discriminação entre compostos activos e inactivos em experiências de rastreio virtual: COX-1 como caso de estudo. *Tese de Mestrado*, Faculdade de Ciências e Tecnologia, 2012. [[Link](#)]

³² Bissantz, C.; Kuhn, B.; Stahl, M. A medicinal chemist’s guide to molecular interactions. *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *53*, 5061. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

³³ Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2012**, *64*, 4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]