

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE FÍSICA

TAMIRES CRISTINA DA SILVA RIBEIRO

Biofísica Quântica da Ligação de Adutos da Isoniazida às
Enzimas Redutase do *Mycobacterium Tuberculosis*

Maceió
2012

TAMIRES CRISTINA DA SILVA RIBEIRO

**Biofísica Quântica da Ligação de Adutos da Isoniazida às
Enzimas Redutase do *Mycobacterium Tuberculosis***

*Dissertação apresentada ao Instituto de Física
da Universidade Federal de Alagoas, como parte
dos créditos para a obtenção do título de Mestre
em Física.*

Orientador: *Prof. Dr. Marcelo Leite Lyra*

Co-orientador: *Prof. Dr. Vinícius Manzoni Vieira*

**Maceió
2012**

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Fabiana Camargo dos Santos

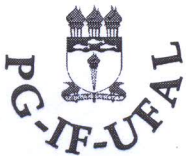
R484b Ribeiro, Tamires Cristina da Silva.
Biofísica quântica da ligação de adutos da isoniazida às enzimas redutase do *Mycobacterium tuberculosis* / Tamires Cristina da Silva Ribeiro. – 2012.
116 f. : il.

Orientador: Marcelo Leite Lyra.
Coorientador: Vinícius Manzoni Vieira.
Dissertação (Mestrado em Física) – Universidade Federal de Alagoas.
Instituto de Física. Maceió, 2012.

Bibliografia: f. 108-116.

1. Tuberculose - Tratamento. 2. Isoniazida. 3. Enzimas redutase. 4. Density functional theory (DFT). 5. Molecular fractionation with conjugate caps (MFCC). I. Título.

CDU: 539.194:544.18



Universidade Federal de Alagoas

Instituto de Física

Programa de Pós Graduação em Física

BR 104 km 14. Campus A.C. Simões
Cidade Universitária
Tabuleiro dos Martins
57072-970 Maceió - AL. Brasil
FONE : (82) 3214-1423/FAX 3214-1645

**PARECER DA BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**“Biofísica Quântica da Ligação de Adutos da Isoniazida às
Enzimas Redutase do *Mycobacterium Tuberculosis*”**

por

Tamires Cristina da Silva Ribeiro

A Banca Examinadora composta pelos professores Marcelo Leite Lyra (orientador), do Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas, Vinicius Manzoni Vieira (coorientador), do Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas, Italo Marcos Nunes de Oliveira, do Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas, Valder Nogueira Freire, do Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará, consideram a candidata aprovada com grau “A”.

Maceió, 30 de julho de 2012


Prof. Marcelo Leite Lyra


Prof. Vinicius Manzoni Vieira


Prof. Italo Marcos Nunes de Oliveira


Prof. Valder Nogueira Freire

Ao Supremo Criador, à minha família e ao meu noivo.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos vão em primeiro lugar ao Supremo Criador, quem permite a minha caminhada neste mundo.

Agradeço também à toda minha família, especialmente meus pais e meu irmão Bruno, que sempre me apoiaram e continuam ao meu lado nos momentos oportunos.

Um agradecimento especial ao meu noivo Carlos, amigo e companheiro inigualável.

Agradeço aos professores e funcionários do instituto de física da UFAL, principalmente ao meu orientador Prof. Marcelo Lyra, e ao meu co-orientador Vinícius Manzoni pela paciência e orientação durante o desenvolvimento desta dissertação.

Também não poderia deixar de agradecer ao grupo do departamento de física da UFC que forneceu o treinamento em MFCC, tão necessário para a realização deste trabalho. Meu sincero agradecimento ao Prof. Dr. Valder Freire e aos colaboradores Roner Costa e Eveline Bezerra.

Agradeço ao companheirismo dos colegas do mestrado, um agradecimento especial a Moniellen, Júlio, Alexsandro, Álvaro, Marlon, Tiago, Rosa, Jessica, Thaíla, Geovana, Ana Paula, Rafael, Wesley, Lidiane, Pedro Heades, entre outros que não são citados, mas que também participaram desta jornada.

Agradeço ao apoio financeiro cedido pela agência CAPES.

Nunca escolha desistir. Desistir não é uma opção.

Autor Desconhecido

RESUMO

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada pelo bacilo denominado *Mycobacterium tuberculosis* (MT). Segundo dados mais recentes da OMS (Organização Mundial de Saúde), aproximadamente 2 milhões de pessoas morrem anualmente, no mundo, devido à tuberculose e outras 9 milhões são afetadas por ano. Entretanto, esta doença é curável, e um dos medicamentos de primeira linha no tratamento da TB é a Isoniazida (INH). No entanto, durante os últimos anos vêm surgindo cepas multi-resistentes à INH, e a outros fármacos de primeira linha, conhecidas como MDR-TB (Multidrug Resistant Tuberculosis). Desta forma, uma das estratégias empregadas no estudo e desenvolvimento de fármacos mais potentes contra cepas MDR-TB é o uso da modelagem molecular. No presente trabalho foram realizados estudos teóricos-computacionais referentes à interação de adutos da Isoniazida (INH) ao sítio ativo das proteínas redutase do MT. Primeiramente, estudamos o composto bioativo INADH, um derivado da catálise-peroxidase da INH, complexado com a enzima redutase codificada pelo gene *inhA*. O segundo sistema estudado consistia no isômero acíclico 4R da INH (4R-INADP) ligado no sítio ativo da proteína diidrofolato redutase do MT (DHFR). Através do método quântico DFT (Density Functional Theory) aplicado na aproximação MFCC (Molecular Fractionation with Conjugate Caps), calculou-se as energias de interação entre os compostos bioativos e os aminoácidos do sítio ativo das enzimas. Assim, através dos cálculos da energia de interação dos ligantes com o sítio ativo das enzimas *inhA* e DHFR, foi mapeado o perfil energético das interações dos aminoácidos mais importantes através do gráfico BIRD (Binding site, Interaction energy an Residues Domain). Identificou-se as regiões mais ativas do fármaco e os aminoácidos mais importantes na interação dos compostos bioativos com suas respectivas enzimas. Os resultados dos cálculos de energia mostraram que para o sistema INADH-*inhA*, o aminoácido mais importante para a afinidade do ligante com o sítio da *inhA* foi o K165, com energia atrativa de -101,97 kcal/mol, enquanto que para o sistema (4R-INADP)-*dhfrA*, o aminoácido com maior interação atrativa foi o R44, possuindo uma energia de interação em torno de -272,64 kcal/mol. Quanto às regiões dos ligantes que exibiram maior afinidade com suas enzimas alvo, em ambos os casos verificou-se que as regiões referentes aos co-fatores NADH (do INADH) e NADP (do 4R-INADP) foram as que apresentaram as interações mais energéticas com os resíduos do sítio ativo das proteínas, principalmente os grupos fosfóricos.

Palavras-chave: Tuberculose, Isoniazida, enzimas redutase, DFT , MFCC.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by bacillus called *Mycobacterium tuberculosis* (MT). According to latest data WHO (World Health Organisation), approximately 2 million people die annually worldwide due to tuberculosis and other 9 million are affected each year. However, this disease is curable, and one of the first-line drugs for the treatment of TB is isoniazid (INH). However, during recent years are emerging multi-resistant strains to INH, and to other first-line drugs, known as MDR-TB (Multi-drug Resistant Tuberculosis). Thus, the use of molecular modeling has been one of the strategies employed in the study and development of drugs more potent against MDR-TB strains. In this study we carry out theoretical-computational studies concerning to the binding of adducts of isoniazid (INH) to the active site of the reductase protein MT. The first system studied was INADH bioactive compound, a derivative of peroxidase-catalyzed INH, complexed to the reductase enzyme encoded by *inhA* gene. While the second system consisted of the acyclic 4R isomer of INH (4R-INADP) bound at the active site of dihydrofolate reductase protein, called *dfrA*. Through the method quantum DFT (Density Functional Theory) applied to MFCC (Molecular Fractionation with Conjugate Caps) approach, were calculated the interaction energies between the bioactive compounds and amino acids of the active site of enzymes. Through the calculations of the interaction energy of the ligands with the active site of enzymes *inhA* and *dfrA*, was mapped the energy profile to the interaction of the most important amino acids through the BIRD (Binding site, Interaction energy and Residues Domain) graphic. So it was possible to identify the most active regions of the drug as well as the most important amino acids in the interaction of bioactive compounds with their respective enzymes. The results of energy calculations obtained by DFT, in the MFCC approach, showed that to the system INADH-*inhA*, the most important residue for the affinity ligand with the site of the *inhA* was the K165, with the attractive energy -101.97 kcal/mol, while to the system (4R-INADP)-*dfrA*, the amino acid with the most attractive interaction was the R44, having an energy of interaction around -272.64 kcal/mol. The regions that showed the highest affinity ligands with their target enzymes, in both cases it was found that the region related to the cofactors NADH (of INADH) and NADP (of 4R-INADP) showed the most energetic interactions with the active site residues of proteins, mainly the phosphoric groups.

Keywords: Tuberculosis. Isoniazid. reductase enzymes. DFT. MFCC.

LISTA DE FIGURAS

1.1	Representação do sítio ativo de uma macromolécula.	19
1.2	Representação do sítio ativo de uma macromolécula.	20
1.3	Ilustração esquemática da interação do tipo "fechadura e chave" entre o ligante biotina e a proteína receptora streptavidina, de quem a energia de ligação é de 88 KJ/Mol.	22
1.4	Esquema do processo de ativação da INH através da catálise-peroxidase KatG, resultando no complexo INADH, que é o agente inibidor da síntese de ácido micólico.	25
2.1	Ilustração dos termos da equação 2.1.	34
2.2	Esquema utilizado pelo método MFCC para o cálculo da energia de interação entre um resíduo R_i de uma proteína e a molécula do ligante L . Os caps C e C^* devem imitar o efeito da parte da molécula original que foi cortada, neste caso os caps são os aminoácidos vizinhos da cadeia peptídica.	40
3.1	Estrutura do cristal 1ZID da proteína inhA co-cristalizada com o fármaco INADH, obtido através de difração de raios-x e com resolução de 2.7 Å. Foram selecionados os resíduos no raio de 20 Å em relação ao centróide do INADH para a otimização dos hidrogênios. A estrutura do ligante está representada no formato <i>ball and sticks</i> e a proteína está representada no formato de fitas. Os átomos de hidrogênio foram ocultados para a melhor visualização dos átomos pesados do ligante.	43
3.2	A superfície que envolve o fármaco INADH representa o sítio de ligação da proteína, onde estão incluídos 45 aminoácidos para os quais foi calculada a energia de interação via método DFT, através da aproximação MFCC. As sequências peptídicas da proteína inhA também estão nomeadas de acordo com os seus respectivos tipos, dos quais se destacam as folhas- β e as α -hélices.	45

- 3.3 Resíduos para os quais foram realizados os cálculos de energia. Além dos 22 aminoácidos, do total de 45, também foram consideradas as moléculas de água presentes na estrutura do cristal 1ZID. Os átomos de hidrogênio, bem como as ligações peptídicas, foram ocultados para uma melhor visualização dos resíduos. 46
- 3.4 Na presente figura são mostrados os outros resíduos que tiveram suas respectivas energias calculadas. Além dos 23 aminoácidos, as moléculas de águas incluídas nos cálculos também são exibidas. Assim como na figura 3.3, os hidrogênios e as ligações peptídicas são ocultados. 47
- 3.5 Representação do ligante INADH, aduto da Isoniazida. A estrutura do INADH foi dividida em seis regiões, onde as regiões de i a v representam as diferentes partes do cofator NADH e a região vi destaca o grupo acyl isonicotínico derivado da INH. A nomenclatura foi feita de acordo com os dados do cristal 1ZID. 50
- 3.6 Região i do INADH com os aminoácidos mais próximos, que possuem energia maior (em módulo) que ± 8 kcal/mol. A região i é constituída pelo grupo químico adenina, e os aminoácidos mais próximos são os que possuem cadeias laterais apolares, como o F41, o V65 e o I122. Os átomos de hidrogênio foram ocultados para a melhor visualização dos resíduos. 51
- 3.7 Região ii do INADH com os aminoácidos mais próximos, que possuem energia maior (em módulo) que ± 8 kcal/mol. Tal região é composta pela ribose da adenina, de quem os aminoácidos mais próximos, tais como o G14, I15, I16 e I95, possuem radicais químicos apolares. Os átomos de hidrogênio foram ocultados para a melhor visualização dos resíduos. 52
- 3.8 Região iii do INADH com os aminoácidos mais próximos, que possuem energia maior (em módulo) que ± 8 kcal/mol. Tal região é composta por um pirofosfato. Dentre os resíduos exibidos na figura, os mais próximos são o I21, o D18, o S20 e o T196, sendo estes dois últimos favoráveis a interações de ligação de hidrogênio. Os átomos de hidrogênio foram ocultados para a melhor visualização dos resíduos. 53
- 3.9 Região iv do INADH com os aminoácidos mais próximos, que possuem energia maior (em módulo) que ± 8 kcal/mol. Esta região é formada pela ribose da nicotinamida, e os aminoácidos mais próximos, entre todos os exibidos na figura, são o K165 e o M147. Nota-se uma quantidade maior de moléculas de água próximas a esta região. Os átomos de hidrogênio foram ocultados para a melhor visualização dos resíduos. 54

- 3.10 Região v do INADH com os aminoácidos mais próximos, que possuem energia maior (em módulo) que ± 8 kcal/mol. Nesta região, formada pela nicotinamida, são exibidos 16 resíduos, sendo 9 aminoácidos (a maioria) polares e hidrófilos, enquanto que 7 são apolares. Dentre as 6 regiões, a região v apresentou a maior quantidade de resíduos mais próximos. Os átomos de hidrogênio foram ocultados para a melhor visualização dos resíduos. 55
- 3.11 Região vi do INADH com os aminoácidos mais próximos, que possuem energia maior (em módulo) que ± 8 kcal/mol. A região vi é composta pelo derivado acyl nicotinamida da isoniazida (INH), sendo encontrados 5 aminoácidos (F149, A191, P193, W222 e D261) próximos a esta região. Os átomos de hidrogênio foram ocultados para a melhor visualização dos resíduos. 56
- 3.12 Painel gráfico do BIRD (Binding site, Interaction energy and Residues Domain) onde são mostradas as energias dos 31 resíduos mais importantes. Além da estimativa quantitativa da energia, dada em kcal/mol, também são identificados os átomos dos aminoácidos mais próximos do ligante e as regiões do fármaco onde estão interagindo. As menores distâncias entre os átomos dos resíduos e o INADH também são mostrados no BIRD. Tais distâncias estão organizadas seguindo a ordem do menor para a maior valor de distância. 58
- 3.13 Distâncias interatômicas entre os principais aminoácidos da região i, os quais possuem energia, de repulsão ou de atração, superior ao módulo de ± 20 kcal/mol. As distâncias exibidas entre os átomos interagentes são dadas em angstroms. 61
- 3.14 Menores distâncias entre os principais aminoácidos da região ii do INADH. A figura da direita mostra 3 dos 7 principais aminoácidos da região ii. Já na figura da esquerda, são exibidos 4 dos 7 principais aminoácidos desta região. As distâncias são dadas em angstroms. 62
- 3.15 A presente figura mostra os aminoácidos mais importantes da região iii, e as mínimas distâncias entre tais aminoácidos e esta região do INADH. A figura do lado esquerdo mostra 3 aminoácidos (G14, I21 e D18) dos 6 principais da região do pirofosfato. Os outros 3 aminoácidos (I16, S20 e T196) são exibidos na figura do lado direito. Esta região destaca-se pelas ligações de hidrogênio formadas entre os aminoácidos (I21 e S20), e com uma molécula de água acoplada ao aminoácido G14. As distâncias exibidas são dadas em angstroms. 64

- 3.16 A presente figura mostra os aminoácidos mais energéticos e suas respectivas mínimas distâncias da região iv do fármaco. O resíduo mais atrativo, o K165, interage com a hidroxila na posição O3D do INADH, através de uma ligação de hidrogênio. O I95 também interage com a hidroxila O7N, porém através de uma interação de van der Waals. A figura também mostra uma molécula de água entre o K165 e o I95, e as duas ligações de hidrogênio formadas entre a água e estes dois resíduos. 65
- 3.17 As figuras abaixo mostram os aminoácidos com energia maior que o módulo de ± 20 kcal/mol, e suas respectivas mínimas distâncias da região v do INADH. A figura do lado esquerdo mostra 4 aminoácidos (K165, E169, D150 e E219), onde os aminoácidos D150, E169 e E219 possuem energias altamente repulsivas, sendo que os dois últimos interagem com a região v por meio de forças eletrostáticas, onde o E219 participa da formação de três ligações de hidrogênio entre duas moléculas de água que se encontram entre o fármaco e tal aminoácido. Por outro lado, o D150 interage com o fármaco por meio de forças estéricas de repulsão. Já o lado direito mostra 2 aminoácido altamente repulsivos (D234 e D148), que interagem através de forças estéricas, e 2 resíduos altamente atrativos (R195 e K233), dos quais o K233 interage com o fármaco por meio de forças eletrostáticas e o R195 interage com a região v do INADH através de forças de van der Waals. 66
- 3.18 Aminoácidos mais importantes da região vi, que representa o grupo acyl isonicotínico derivado da INH. O aminoácido W222 (-27,54 kcal/mol) interage através de uma interação de van der Waals, enquanto que o resíduo D261 (43,90 kcal/mol) interage através de forças eletrostáticas de repulsão. 67
- 3.19 Isosuperfície de potencial acoplada à densidade eletrônica total, do INADH e dos aminoácidos mais atrativos, calculada através do método DFT, com aproximação LDA e conjunto de base DNP. As regiões vermelhas indicam densidade de carga negativa, e as regiões azul indicam densidade de carga positiva. 68
- 3.20 Isosuperfície de potencial acoplada à densidade eletrônica total, do INADH e dos aminoácidos mais repulsivos, calculada através do método DFT, com aproximação LDA e conjunto de base DNP. As regiões vermelhas indicam densidade de carga negativa, e as regiões azul indicam densidade de carga positiva. 70
- 4.1 Estrutura do cristal 2CIG da proteína *dfrA* co-cristalizada com o fármaco 4R-INADP, obtido através de difração de raios-x e com resolução de 1.9 Å. Foram selecionados os resíduos no raio de 20 Å em relação ao centróide do 4R-INADP para a otimização dos hidrogênios. As estruturas do ligante e das moléculas glicerol e ânions de sulfato (substratos da enzima DHFR), estão representadas no formato *ball and sticks* e a proteína está representada no formato de fitas. Os átomos de hidrogênio foram ocultados para a melhor visualização dos átomos pesados do ligante. 76

- 4.2 A superfície que envolve o fármaco 4R-INADP representa o sítio de ligação da proteína, onde estão incluídos 47 aminoácidos para os quais foi calculada a energia de interação via método DFT, através da aproximação MFCC. 77
- 4.3 Resíduos para os quais foram realizados os cálculos de energia. Além dos 23 aminoácidos, do total de 47, também foram consideradas as moléculas de água e os substratos presentes na estrutura do cristal 2CIG. Os átomos de hidrogênio, bem como as ligações peptídicas, foram ocultados para uma melhor visualização dos resíduos. 78
- 4.4 Na presente figura são mostrados os outros resíduos que tiveram suas respectivas energias calculadas. Além dos 24 aminoácidos, as moléculas de águas incluídas nos cálculos, e as moléculas do substrato da proteína também são exibidas. Assim como na figura anterior os hidrogênios e as ligações peptídicas são ocultados. 80
- 4.5 Representação do ligante 4R-INADP, isômero acíclico da Isoniazida (INH). A estrutura do INADH foi dividida em seis regiões, onde a região vi destaca o grupo acyl isonicotínico derivado da INH, enquanto que as regiões de ii a vi representam as diferentes partes do cofator NADP. A nomenclatura foi feita de acordo com os dados do cristal 2CIG. . . . 81
- 4.6 Resíduos mais próximos da região i do 4R-INADP com. A região i é constituída pelo grupo acyl isonicotínico derivado da INH, e os aminoácidos com menores distâncias são os que possuem cadeias laterais apolares, como o F31, o A7, I94, I5 e I20. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização dos resíduos. 82
- 4.7 Resíduos mais próximos da região ii do 4R-INADP com. A região ii é constituída pela nicotinamida, e os aminoácidos com menores distâncias são os que possuem cadeias laterais apolares, como o I14, I20, A7, A9, W22, G96, G95, V46 e I94. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização dos resíduos. 83
- 4.8 Região iii do INADP e seus respectivos aminoácidos mais próximos. Tal região é composta pela ribose da nicotinamida, que interage tanto com aminoácidos apolares (V46, G15, G18, I20, A126, G96 e I14), quanto com aminoácidos polares (R16, D19, S49 e D125), os quais posicionam-se preferencialmente em torno das hidroxilas. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização dos resíduos. 85
- 4.9 Região iv do INADP com os aminoácidos mais próximos. Tal região é composta pelo pirofosfato, que interage com os aminoácidos hidrofóbicos G96, G97, V46, G46 e V99, e com os aminoácidos polares R45 e Q98 por meio de ligações de hidrogênio. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização dos resíduos. 86

- 4.10 Aminoácidos mais próximos da ribose- PO_4 (região v) do 4R-INADP. Cercada por aminoácidos polares (Q98, S66, R67, Q68, R44 e R45) e apolares (V98 e G43), assim como por 6 moléculas de água e uma de sustrato (SO_4), esta região possui alta capacidade de formar pontes de hidrogênio devido ao grupo fosfórico (PO_4) da ribose. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização dos resíduos. 87
- 4.11 Região vi do INADP com os aminoácidos mais próximos, que possuem energia maior (em módulo) que ± 8 kcal/mol. Tal região é composta pela ribose da adenina, de quem os aminoácidos mais próximos, tais como o G14, I15, I16 e I95, possuem radicais químicos apolares. 88
- 4.12 Painel gráfico do BIRD (Binding site, Interaction energy and Residues Domain) onde são mostradas as energias dos 32 resíduos mais importantes. Além da estimativa quantitativa da energia, dada em kcal/mol, também são identificados os átomos dos aminoácidos mais próximos do ligante e as regiões do fármaco onde estão interagindo. As menores distâncias entre os átomos dos resíduos e o INADH também são mostrados no BIRD. Tais distâncias estão organizadas seguindo a ordem do menor para a maior valor de distância. 90
- 4.13 Principais aminoácidos da região i do 4R-INADP com suas respectivas mínimas distâncias do fármaco. Os aminoácidos L57 (-24,48 kcal/mol) e W6 (-25,04 kcal/mol) são atrativos, enquanto que o D27 (102,10 kcal/mol) é altamente repulsivo, e interage com o fármaco por meio de forças eletrostáticas. 92
- 4.14 Aminoácidos mais importantes da região ii e suas respectivas mínimas distâncias. A figura do lado esquerdo mostra 3 aminoácidos atrativos (V46, I20 e A7) e a do lado direito mostra 2, sendo 1 atrativo (I14) e outro altamente repulsivo (E114). 93
- 4.15 Principais aminoácidos da região iii e suas mínimas distâncias em relação ao 4R-INADP. Nesta região os aminoácidos D19 (104,36 kcal/mol) e D125 (100,86 kcal/mol) possuem fortes interações repulsivas, enquanto que o aminoácido que possui maior interação atrativa é G18 (-53,83 kcal/mol). 94
- 4.16 Os principais aminoácidos da região iv e suas respectivas mínimas distâncias. A região iv, que corresponde ao pirofosfato, interage com os aminoácidos através de ligações de hidrogênio, exibindo assim interações energeticamente atrativas. 95
- 4.17 Região v com seus principais resíduos e suas respectivas distâncias entre os átomos interagentes. Todos os aminoácidos desta região são atrativos, sendo que o R44 (-272,64 kcal/mol) é o mais atrativo entre todos os 32 resíduos considerados no BIRD, e assim como a maioria dos resíduos desta região, interage com o fármaco através de pntes de hidrogênio. O G43 (-28,92 kcal/mol) é o único aminoácido que interage com o ligante principalmente por meio de forças de van der Waals. 96

-
- 4.18 Principais resíduos da região vi e suas respectivas mínimas distâncias. Os aminoácidos L102 (-24,41 kcal/mol) e G80 (-18,57 kcal/mol) interagem atrativamente com esta região por meios de forças de van der Waals e ligações de hidrogênio, respectivamente. 97
- 4.19 Isosuperfície de potencial acoplada à densidade eletrônica total, do INADH e dos aminoácidos mais atrativos, calculada através do método DFT, com aproximação LDA e conjunto de base DNP. As regiões vermelhas indicam densidade de carga negativa, e as regiões azul indicam densidade de carga positiva. 98
- 4.20 Isosuperfície de potencial acoplada à densidade eletrônica total, do INADH e dos aminoácidos mais repulsivos, calculada através do método DFT, com aproximação LDA e conjunto de base DNP. As regiões vermelhas indicam densidade de carga negativa, e as regiões azul indicam densidade de carga positiva. 99

LISTA DE TABELAS

3.1	Os 45 aminoácidos que tiveram suas energias calculadas, juntamente com seus respectivos caps, o primeiro vizinho da esquerda e o primeiro da direita. A energia de interação de cada resíduo R_i , acoplados com os caps, e o INADH foi calculada através do método DFT, com aproximação LDA e conjunto de bases DNP.	49
3.2	Energias (calculada via DFT, com base DNP e correção OBS) e mínimas distâncias em relação ao ligante, dos 45 aminoácidos que compõem o sítio de ligação considerado no estudo.	57
4.1	Energias (calculada via DFT, com base DNP e correção OBS) e mínimas distâncias em relação ao ligante, dos 47 aminoácidos que compõem o sítio de ligação considerado no estudo.	89

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Introdução ao estudo de fármacos	17
1.2	Tuberculose	22
1.3	Isoniazida (INH)	24
1.4	NADP e a enzima redutase diidrofolato do MT	27
2	Metodologia	29
2.1	Modelagem Molecular no <i>design</i> de novas drogas	30
2.2	Mecânica Molecular	31
2.2.1	Campo de força CVFF	32
2.3	Métodos Baseados em Mecânica Quântica	34
2.3.1	A teoria do funcional da densidade (DFT)	36
2.3.2	A aproximação LDA (Local Density Approximation)	38
2.4	MFCC	39
3	A ligação do aduto INADH da Isoniazida ao sítio ativo da redutase inhA do <i>Mycobacterium Tuberculosis</i>	41
3.1	Detalhes da Metodologia	42
3.2	Resultados	48
3.3	Conclusão	69
4	Inibição da diidrofolato redutase pelo isômero acíclico 4R-INADP da Isoniazida	74

SUMÁRIO	15
4.1 Detalhes da Metodologia	75
4.2 Resultados	80
4.3 Conclusão	99
5 Conclusão e Perspectivas	103
Referências	106

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

Nesta dissertação serão estudados dois sistemas macromoleculares do tipo fármaco-bioreceptor a partir de cálculos computacionais baseados principalmente em métodos de modelagem molecular. No entanto, para uma melhor sistematização de tais estudos, esta dissertação encontra-se dividida em 4 capítulos.

O primeiro capítulo introduz uma visão geral do objeto de interesse do presente trabalho, que é o estudo qualitativo e quantitativo da ligação de adutos da Isoniazida (um fármaco anti-tuberculose) à proteína redutase do *Mycobacterium tuberculosis* (a bactéria causadora da Tuberculose). Para tais estudos, foram utilizados métodos de bioquímica quântica, como o DFT (Density Functional Theory) e o MFCC (Molecular Fractionation with Conjugate Caps) a partir de dados cristalográficos dos sistemas propostos.

No segundo capítulo, são abordadas as principais teorias nas quais se baseiam os métodos de modelagem molecular empregados nos cálculos de interação das moléculas bioativas com os alvos enzimáticos. Sendo destacadas as teorias referentes à metodologia utilizada no estudo dos sistemas. Foram mostradas as bases teóricas do campo de força CVFF (Consistent Valence Forcefield) e dos métodos DFT e MFCC.

No terceiro e no quarto capítulo são mostrados os estudos de cada um dos sistemas apresentados em três partes: metodologia, resultados, e conclusão. Deste modo, o terceiro capítulo descreve a metodologia, os resultados e a conclusão referentes ao sistema composto pela proteína ACP redutase inhA, inibida pelo composto bioativo INADH. En-

quanto que no quarto capítulo são mostrados a metodologia, os resultados obtidos e a conclusão para o sistema composto pela enzima diidrofolato redutase *dhfrA* complexada com o ligante 4R-INADP.

Finalmente, o quinto capítulo trata da conclusão das análises referentes aos estudos dos dois sistemas macromoleculares. Onde são feitas as análises comparativas entre os resultados de cada um dos sistemas, bem como são mostrados os principais aspectos das ligações de tais adutos da isoniazida em suas respectivas proteínas redutase do *Mycobacterium tuberculosis*.

1.1 Introdução ao estudo de fármacos

Até o início do século 20 o uso de medicamentos pela medicina era baseado principalmente no uso de porções e ervas medicinais. No entanto, em meados do século 19, consideráveis esforços com o objetivo de isolar e purificar os princípios ativos destes remédios culminaram com o aparecimento da indústria farmacêutica e com o surgimento de um importante ramo científico na pesquisa de fármacos, a Química Medicinal, cujo o principal interesse está focado no *design* e síntese de fármacos. A partir deste período, diversas drogas ocorrentes na natureza tiveram suas estruturas determinadas, assim como milhares de análogos dos produtos naturais foram quimicamente sintetizados, com o propósito de aperfeiçoamento de tais produtos e de suas propriedades medicinais. Desenvolvidos na base de testes e erros, a maioria destes trabalhos revelou muitos dos princípios gerais envolvidos no processo de descoberta e desenvolvimento de drogas, além de proporcionar o desenvolvimento de um modelo geral para a obtenção de fármacos. Por outro lado, o entendimento dos mecanismos de ação das drogas, a nível molecular, não era satisfeito pelos métodos usuais, dos quais o principal interesse era o isolamento do princípio ativo de uma fonte natural ou sintetizada em laboratório [1].

O processo de desenvolvimento e descoberta de drogas passou por grandes transformações durante as duas últimas décadas. A metodologia tradicional para o desenvolvimento

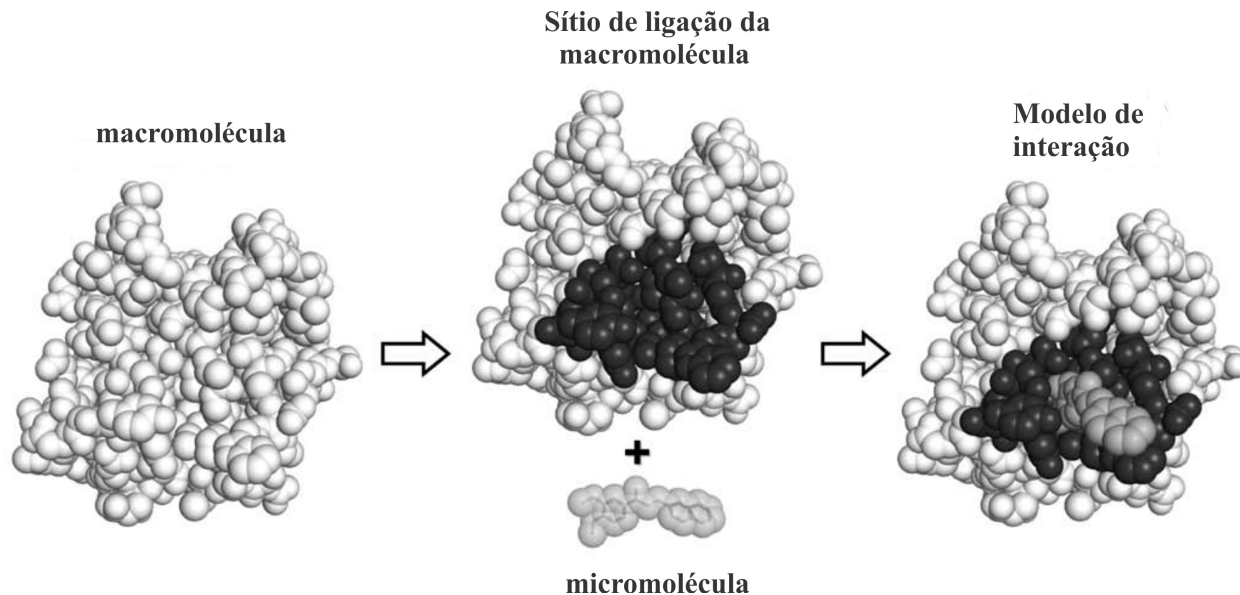
de fármacos, conhecida como triagem cega, era baseada no teste de diversos ligantes (micromoléculas), em ensaios biológicos, sem o conhecimento do mecanismo de ação ou interação dos mesmos, o que dispndia muito tempo e elevados custos envolvidos no processo de descoberta de novos fármacos, visto que em muitos casos era necessário o teste de milhões de compostos. No entanto, o grande progresso na área de Biologia Molecular ¹ possibilitou um maior entendimento do funcionamento de sistemas biológicos, no âmbito celular e molecular. Aliado ao avanço de técnicas experimentais para a identificação de alvos moleculares, o avanço na biologia molecular viabilizou a identificação e obtenção de informações estruturais dos alvos relacionados a doenças. Projetos GENOMAS e PROTEOMAS forneceram o subsídio que promoveu a obtenção das informações de seqüências e estruturas de diversas proteínas, impulsionando assim o desenvolvimento de ferramentas e métodos computacionais usadas para o planejamento racional de fármacos [2]. Esta nova metodologia adotada no planejamento de drogas se baseia no uso de modelagem computacional e tem obtido grande destaque no cenário do desenvolvimento e descoberta de novos fármacos, tendo como objetivo estudar os mecanismos envolvidos no processo de reconhecimento molecular.

A identificação de alvos para a ação de fármacos no organismo, assim como o *design* de drogas que possam interagir com o dado alvo, têm sido o foco de diversas pesquisas, não apenas das indústrias farmacêuticas mas também dos meios acadêmicos universitários. Entender a estrutura e função do alvo molecular relacionado à doença ou processo fisiopatológico para o qual se deseja desenvolver um tratamento quimioterápico, bem como compreender o mecanismo pelo qual ele interage com uma droga em potencial é muito importante no processo de descoberta de novas drogas. O estudo e análise de como uma droga interage com o seu alvo para produzir um efeito biológico é essencial para a Química Medicinal e é considerado como um ponto crucial no *design* e desenvolvimento de fármacos mais eficientes. A farmacodinâmica é o ramo responsável pelo estudo dos efeitos biológicos ou farmacológicos que as drogas podem produzir, além ter papel fundamental para a compreensão dos diferentes alvos moleculares de tais drogas.

¹Biologia molecular estuda os fenômenos bilógicos em escala atômico e molecular.

O conhecimento da estrutura do alvo macromolecular ou da estrutura de algum complexo ligante-receptor permite o planejamento racional de inibidores enzimáticos, ou de agonistas ou antagonistas de receptores [3]. Desta forma, para compreender o processo de ação que a droga desempenha no corpo é necessário conhecer a estrutura, propriedades e funções de um alvo macromolecular ² específico. Geralmente, macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos são os alvos macromoleculares dos fármacos. Em contrapartida, os fármacos são moléculas bem menores (micromoléculas) que o seu alvo de ação, fato que permite a interação direta da droga com uma pequena porção do mesmo. Esta pequena região, onde a droga interage diretamente com a macromolécula, é conhecida como o sítio de ligação ou sítio ativo, ver figura 1.1. Normalmente, o sítio de ligação possui o formato de uma cavidade, que encontra-se na superfície da macromolécula, permitindo que a droga possa "ancorar" dentro do alvo.

Figura 1.1 – Representação do sítio ativo de uma macromolécula.

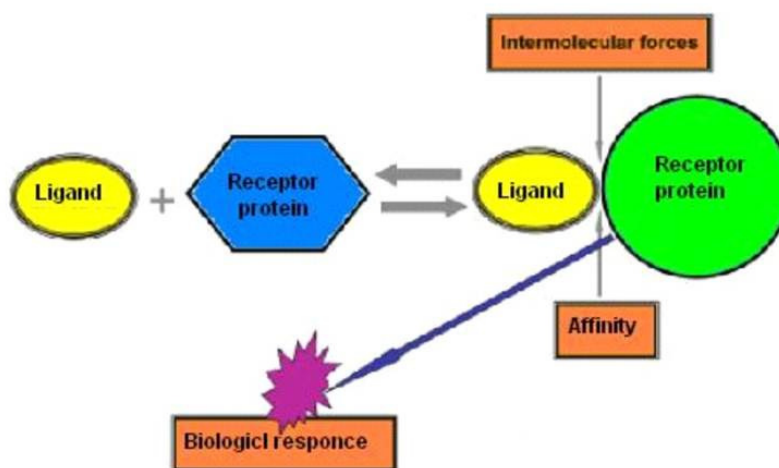


Fonte: Rafael Guido *et al.* [3], 2008

²Um alvo macromolecular é uma proteína ou enzima relacionada a uma patologia clínica.

O efeito biológico desencadeado pela droga depende não apenas do encaixe da molécula no sítio ativo do alvo macromolecular, mas também de outros fatores relacionados aos tipos de forças interagentes entre o fármaco e o sítio de ligação da macromolécula. Pois, uma vez que a droga se encaixa no sítio de ligação do alvo, diversas interações intermoleculares são dispostas, de modo que tais interações resultam nas mudanças necessárias para a produção de um efeito farmacológico. No entanto, o elemento que vai definir a possibilidade de haver ou não as interações responsáveis por um efeito biológico é a estrutura química do fármaco, isto é, os grupos funcionais que compõem a droga e a capacitam para interagir com o sítio ativo da macromolécula alvo.

Figura 1.2 – Representação do sítio ativo de uma macromolécula.



Fonte: Rafael Guido *et al.* [3], 2008

Para o desenvolvimento de novos fármacos é necessária uma descrição a nível microscópico das interações existentes entre o receptor e o ligante. Nesta abordagem, a qualidade de um bom protótipo (candidato à fármaco) está diretamente relacionada com a natureza e intensidade das interações do mesmo com o sítio ativo da proteína alvo. Por sua vez, a interação de um fármaco com o seu alvo de ação no sistema biológico ocorre durante a chamada fase farmacodinâmica e são determinadas por meio de forças intermoleculares

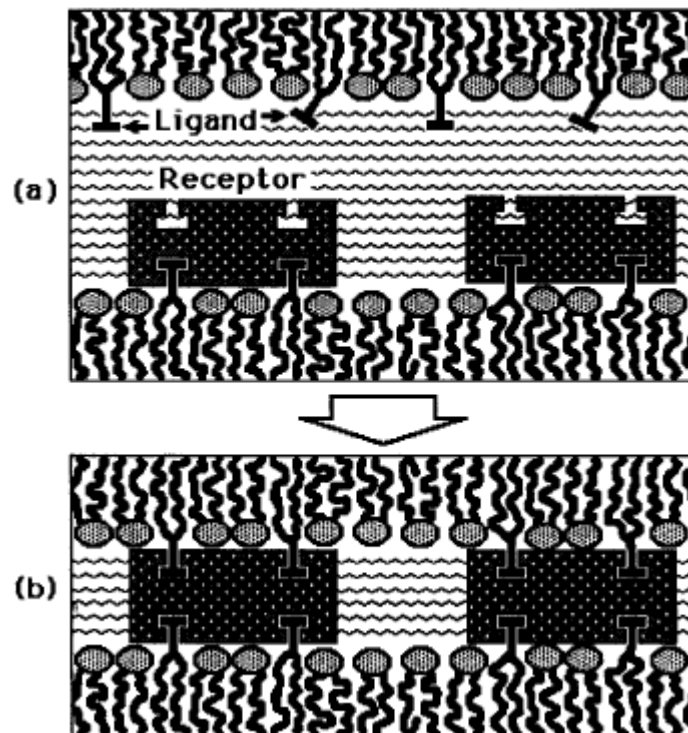
tais como: interações hidrofóbicas, polares, eletrostáticas e estéricas [4].

Quando o fármaco se encaixa no sítio ativo do receptor, as forças de interação entre a droga e seu alvo são fortes o bastante para prender a droga por um certo tempo, até que ocorra o efeito biológico no alvo, porém devem ser fracas o suficiente para permitir que a droga se separe do alvo após a ocorrência do efeito. Porém, algumas drogas reagem com o sítio ativo do receptor tornando-se permanentemente ligadas a ele através de ligações covalentes, as quais possuem intensidade de 200-400 KJ/mol. No entanto, a maioria das drogas interagem através de forças de intensidade fraca denominadas ligações intermoleculares. A quantidade e o tipo de ligações intermoleculares dependem da estrutura e dos grupos funcionais presentes na região de interação do ligante com o receptor. Dentre as diversas ligações e interações intermoleculares, pode-se citar: ligações eletrostáticas ou iônicas, que são as mais fortes de todas e possuem intensidade em torno de 20-40 KJ/mol, elas são formadas entre grupos que possuem cargas opostas; pontes de hidrogênio, que são formadas entre um heteroátomo (que pode ser O ou N) elétron-excedente e um hidrogênio elétron-deficiente, e em interações do tipo ligante-receptor sua intensidade varia de 16 a 60 KJ/mol; interações de van der Waals, que são muito fracas (intensidade típica de 2-4 KJ/mol), são exibidas entre regiões hidrofóbicas de diferentes moléculas; interações dipolo-dipolo e íon-dipolo, as quais são uma forma fraca de interações eletrostáticas; interações repulsivas, que ocorrem quando duas moléculas se aproximam muito entre si, originando então um *overlap* de seus orbitais moleculares, e também pode ocorrer quando dois grupos de cargas idênticas se repelem [1].

Em muitos sistemas biológicos as interações que envolvem reconhecimento molecular receptor-ligante são bastante específicas para cada molécula. O biólogo Paul Erlich foi um dos pioneiros em propor que certas biomoléculas deveriam ter uma forma geométrica perfeita que permitisse ligá-las fortemente, assim como uma espécie de "fechadura e chave" molecular. Na figura 1.3 é mostrado um sistema receptor-ligante, onde é evidenciado um destes mecanismos de ligação. Neste caso, o receptor é uma proteína chamada streptavidina e o ligante é uma molécula conhecida como biotina, dos quais a energia de ligação possui em torno de 88 KJ/Mol. Este representa um típico exemplo de interação "fechadura

e chave" desenvolvida naturalmente como um mecanismo de forte ligação não-covalente entre biomoléculas, tais como ligante-receptor [5].

Figura 1.3 – Ilustração esquemática da interação do tipo "fechadura e chave" entre o ligante biotina e a proteína receptora streptavidina, de quem a energia de ligação é de 88 KJ/Mol.



Fonte: Jacob Israelachvili [5], 1991

1.2 Tuberculose

A Tuberculose (TB) é uma doença infecciosa que normalmente ataca o sistema respiratório inferior, apesar de também afetar outras partes do corpo. O agente causador da TB é uma bactéria aeróbia do tipo bacilus chamada *Mycobacterium Tuberculosis* (MT), a qual foi isolada pela primeira vez em 1882 pelo médico alemão Robert Koch [6]. Esta doença contagiosa pode ser transmitida através do ar e atualmente encontra-se entre as doenças tratáveis mais mortais do mundo.

A TB é uma doença que tem afetado a humanidade a muitos séculos e continua sendo uma patogênese com considerável impacto na saúde pública, contribuindo inclusive com implicações de cunho econômico, o que pode ser verificado através de um plano internacional para a eliminação da TB, elaborado pela OMS em 2010, que aponta a necessidade de investir em torno de US\$ 47 bilhões na implementação de programas de erradicação da TB nos países que se encontram em situação alarmante, além de mais US\$ 9 bilhões para a pesquisa e desenvolvimento de novos diagnósticos e tratamentos da TB [7]. O Brasil ocupa o 14^o lugar na lista dos 22 países que apresentam elevado número de incidência de TB, correspondendo a 31 % do total de casos na América Latina.

De acordo com a OMS, em 2006 o contágio de TB resultou em 1,7 milhões de mortes em todo o mundo, além de terem sido detectados 9,2 milhões de novos casos. As regiões mais afetadas com a doença são o sudeste da Ásia, que em 2005 correspondia a 34 % de novos casos de TB, e a África, a qual em 2005 representava aproximadamente o dobro dos casos que foram detectados no sudeste da Ásia [6].

O Brasil ocupa o 15^o lugar entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos de tuberculose no mundo. Estima-se uma prevalência de 50 milhões de infectados com cerca de 111.000 casos novos e 6.000 óbitos, ocorrendo anualmente. Segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN/MS) em 2001, foram notificados 81.432 casos novos correspondendo a um coeficiente de incidência de 47,2 para cada 100.000 habitantes [8]. No estado de Alagoas, a taxa de incidência (por 100 mil hab.) em 2003 foi de 41,6 casos, enquanto que a co-infecção TB/HIV foi de 1,9% nos municípios prioritários [9].

O contínuo crescimento nas estatísticas de incidência da TB podem ser vistos como o resultado combinado de dois fatores recorrentes na literatura científica, são estes: o surgimento de cepas de MT resistentes aos antibióticos e a incidência da TB na presença de infecção do HIV (Human Immunodeficiency Virus). A ocorrência destes fatores faz com que a falha no processo de cura da TB seja muito provável, principalmente nos países em que faltam estruturas organizacionais necessárias para oferecer o longo e custoso

tratamento adaptado aos pacientes [10], pois a falta de tratamento adequado favorece o aparecimento de formas resistentes do MT às substâncias tuberculostáticas, valendo ressaltar que cerca de 70% a 90 % da mortalidade de pacientes HIV-positivos se deve à co-infecção da TB com o vírus HIV [11].

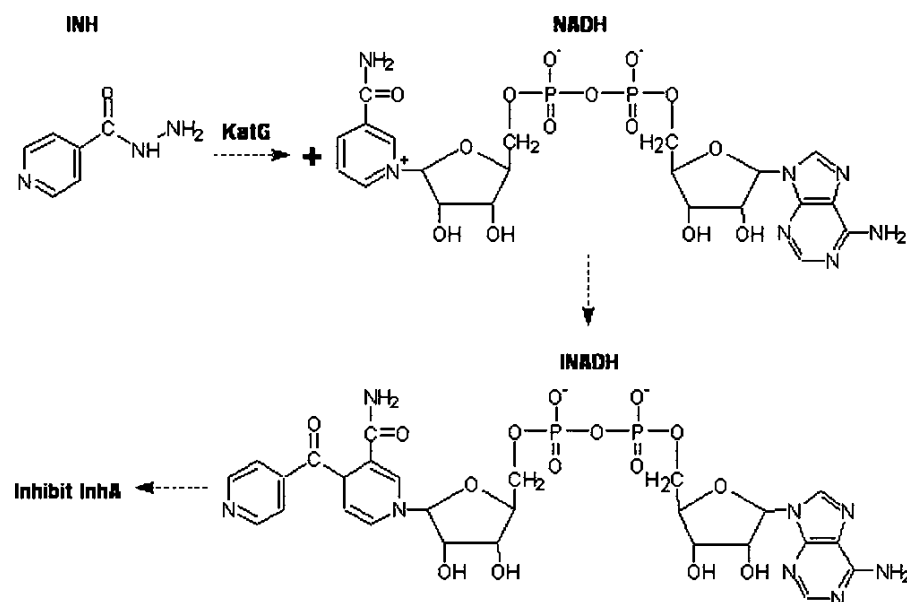
A TB pode ser eficientemente tratada através de quimioterapia, que é baseada na administração combinada de quatro principais antibióticos: Isoniazida, Rifampicina, Pirazinamida e Etambutol. Estes quatro agentes anti-TB são considerados como drogas de primeira linha no combate à TB, visto que sua ação bactericida está aliada com um elevado grau de eficácia e baixa toxicidade para o paciente [12]. Dentre os medicamentos de primeira linha no tratamento da TB, a Isoniazida (INH) se destaca como o principal agente anti-TB.

1.3 Isoniazida (INH)

Também conhecida como hidrazina de ácido isonicotínico, a INH é o mais eficiente bactericida contra o bacillus MT. Sintetizada pela primeira vez em 1912 [13], ela têm sido utilizada como o medicamento de primeira linha no tratamento da TB desde 1952 [14; 15]. A INH é uma pró-droga que deve ser ativada *in vivo* pela catálise-peroxidase codificada por KatG [16; 17], a qual acopla o ácido isonicotínico com o composto orgânico molecular NADH, formando assim o complexo isonicotínico acyl-NADH, comumente chamado de INADH [18]. O NADH é a forma reduzida da co-enzima NAD (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo), a qual está presente nas células de todos os seres vivos e desempenha importante papel como transportador de elétrons nas reações metabólicas de oxi-redução [19]. Na figura 1.4 é mostrado o processo de ativação da pró-droga INH.

Em 1994, Banerjee *et al.* identificaram a enzima *inhA* como sendo o alvo de ação do aduto INADH [20]. A *inhA* é a única enzima enoil-ACP (Acyl Carrier Protein) reductase do MT e está diretamente envolvida na biossíntese das longas cadeias de ácidos graxos que formam os ácidos micólicos, os quais são os principais componentes da parede celular da

Figura 1.4 – Esquema do processo de ativação da INH através da catálise-peroxidase KatG, resultando no complexo INADH, que é o agente inibidor da síntese de ácido micólico.



Fonte: Wahab *et al.* [18], 2008

micobactéria. O composto INADH se liga fortemente à proteína inhA bloqueando assim a biossíntese dos ácidos graxos, e conseqüentemente a síntese de ácidos micólicos, o que provoca a morte celular do MT [21; 22].

Embora a INH seja um eficiente inibidor da redutase inhA, nos últimos anos vêm surgindo cepas do MT resistentes à sua ação antimicobacteriana. A multi-resistência da TB a pelo menos dois antibióticos de primeira linha, como a Isoniazida e a Rifampicina, é definida como MDR-TB (Multidrug Resistant Tuberculosis), apesar de recentemente serem detectados uma nova classe de resistência chamada XDR-TB (Extensively Drug-Resistant Tuberculosis) que é definida como a resistência de cepas à Isoniazida e Rifampicina, além de pelo menos três dos seis principais fármacos de segunda linha [12].

Estudos recentes mostram que a maioria da resistência dos agentes anti-TB se deve às mutações na enzima KatG [23], e juntamente com mutações na proteína inhA corresponde a cerca de 80 % dos casos em que os organismos adquirem resistência clínica [24–28]. No

caso em que ocorre mutação na enzima KatG, a resistência está relacionada à produção de formas inativas da enzima, assim como à diminuição da ativação da pró-droga. No entanto, quando a inhA sofre mudanças em sua região ativa, bem como uma única mudança de aminoácidos em sua base, as ligações entre a enzima e a região do cofator do INADH, que neste caso é o NADH, são afetadas [22; 23; 26], reduzindo assim a afinidade entre ambos e por conseguinte, resultando na resistência da micobactéria à INH.

A necessidade de elucidar os mecanismos de resistência aos fármacos tuberculostáticos é uma tendência que têm impulsionado renovado interesse em estudos e desenvolvimento de novos agentes anti-TB, que sejam mais potentes contra cepas MDR-TB. Neste sentido, as técnicas de modelagem molecular vêm surgido como uma eficiente ferramenta para a análise e entendimento, a nível atômico e molecular, dos mecanismos de ação dos fármacos, bem como das interações entre os alvos de ação e os ligantes com potencial farmacológico.

Muitas informações sobre o mecanismo de ação da INH acoplada à inhA podem ser obtidas através de dados de cristalografia de raio-X e espectroscopia de massa. Em um dos trabalhos pioneiros que se utilizaram destes tipos de dados para a compreensão dos mecanismos de ação da INH, Rozwarski *et al.* [22] estudou a relação entre a capacidade do composto NADH se ligar no sítio ativo da inhA e a habilidade de a proteína inhA ser inibida pela forma ativa da isoniazida. A partir dos estudos da estrutura cristalizada da proteína inhA inibida pela INH, foi constatado que a localização e orientação do grupo acyl isonicotínico (a INH) sugeriam uma região de ligação específica para o grupo INH. Além disso, através da comparação dos cristais da inhA complexada com o NADH e com o NADH ligado com o INH, isto é com o composto INADH, verificou-se que a proteína não sofreu mutação em sua base enzimática, sendo a única diferença significativa uma rotação de 90° na cadeia lateral do aminoácido Phe149, favorecendo assim uma interação do tipo $\pi-\pi$ com o anel piridínico do grupo acyl isonicotínico. Também, constatou-se que o arranjo estrutural do INADH proporcionou um aumento na afinidade com o alvo, em relação ao NADH isolado. Por outro lado, mutações (tais como S94A) provocam aumento na afinidade da proteína alvo com o NADH, por outro lado diminuem a afinidade do alvo com o grupo acyl isonicotínico derivado da isoniazida [22].

1.4 NADP e a enzima redutase diidrofolato do MT

Embora a atividade do composto INADH com a *inhA* tenha sido amplamente estudada, a INH também pode reagir com o composto NADP e formar adutos INH-NADP (INADP) [29], similares aos adutos INH-NAD (INADH) formados a partir do NAD [30]. O NADP, assim como a co-enzima NAD, participa como transportador de elétrons na transdução de energia e processos biossintéticos [19]. Um dos adutos INADP, o isômero acíclico 4R, inibe a enzima diidrofolato redutase (DHFR) [31]. A DHFR inibe a síntese de ácidos nucleicos [32], fundamentais para o controle celular, visto que contêm a informação genética. A enzima DHFR do MT é codificada pelo gene *dfrA* e possui afinidade subnanomolar comparável à afinidade do INADH com a *inhA* (ambas proteínas possuem MIC³ de 0,06 $\mu\text{g/ml}$) [33], além de ser sensível à inibição por uma gama de antibióticos em procarióticos, e quimioterápicos de câncer em humanos [34; 35].

Em 2006, Argyrou *et al.*, baseados no fato de que vários derivados de deazapteridinas (os quais possuem estrutura molecular semelhante aos adutos INADP) inibem enzimas DHFR micobacterial *in vitro*, consideraram a DHFR como um alvo no MT [36]. Eles estudaram a possibilidade da *dfrA* ser alvejada pela isoniazida e mostraram que o isômero acíclico 4R do INADP (4R-INADP) é um bisubstrato subnanomolar capaz de inibir a enzima DHFR do MT [31]. De acordo com dados cristalográficos, a *dfrA* se caracteriza por possuir 2 subsítios [37], sendo um deles estendido por toda a superfície da proteína, e o outro sítio, o qual confirma que o 4R-INADP é um bisubstrato inibidor, é formado por uma cavidade lipofílica em torno, principalmente, do grupo isonicotínico derivado da isoniazida.

Apesar das observações a respeito da DHFR apontarem no sentido de que esta proteína seja um provável alvo da isoniazida, em 2010, Wang *et al.* [38] publicaram um estudo que refuta a hipótese de que a DHFR (com qualquer aduto INADP ligado a ela) seja um alvo biologicamente relevante, pois de acordo com análises de espectroscopia de massa da enzima inibida com o 4R-INADP, este aduto não é gerado através da KatG. Por outro

³MIC (Minimum Inhibitory Concentration) é a concentração mínima de antibiótico necessária para inibir o crescimento de microorganismos isolados.

lado, este mesmo estudo foi confirmado que a *dfrA* não confere qualquer resistência à isoniazida [39].

Capítulo 2

Metodologia

A aplicação de métodos computacionais no estudo e no planejamento de compostos bioativos tem se tornado uma prática rotineira nos dias atuais [40]. No entanto, vale ressaltar que o processo de desenvolvimento de novos compostos bioativos não é subsidiado somente por programas computacionais, pois dada a complexidade deste processo, é necessário o envolvimento e o apoio de um conjunto multidisciplinar de estudos teóricos, computacionais e experimentais, ou seja, os métodos computacionais são obrigatoriamente meios sistemáticos de otimizar e facilitar o processo de desenvolvimento de novas moléculas bioativas, aliados às trocas de informações geradas experimentalmente. Nesse sentido, os métodos computacionais são eficientes ferramentas no planejamento de fármacos baseado nas hipóteses racionais do mecanismo de ação destes compostos [41].

Como visto na introdução deste trabalho, a atividade biológica dos ligantes bioativos está diretamente relacionada com as interações específicas, como interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio e forças de van der Waals, que são estabelecidas entre a estrutura da biomolécula e a macromolécula alvo, e também contribuem para a energia de interação deste tipo de sistema. Dito isto, a modelagem molecular é capaz de fornecer informações detalhadas das interações intra e intermoleculares ocorrentes nos mais diversos sistemas moleculares, descrevendo inclusive as reações químicas e propriedades físicas envolvidas no processo das interações de tais sistemas. Portanto, no presente capítulo serão abordados

os métodos de modelagem computacional que são amplamente utilizados no estudo e desenvolvimento de fármacos, enfatizando a base teórica dos métodos empregados nos cálculos dos sistemas moleculares propostos nesta dissertação.

2.1 Modelagem Molecular no *design* de novas drogas

Modelagem molecular é um termo referente ao uso de técnicas computacionais e teóricas utilizadas para mimetizar o comportamento de moléculas e sistemas moleculares [42]. As diversas técnicas de modelagem molecular são amplamente usadas em áreas como a química, biologia, farmacologia e ciência dos materiais [43]. Na maioria dessas áreas são empregados os métodos teóricos de minimização de energia, dinâmica molecular, simulação Monte Carlo e análise conformacional. Estes métodos têm como objetivo entender e prever estruturas moleculares, propriedades do estado de transição e equilíbrio de reações, propriedades termodinâmicas, entre outros.

No contexto da indústria farmacêutica, a modelagem molecular se destaca como uma indispensável ferramenta que auxilia não apenas na descoberta de novas drogas, mas também na otimização de estruturas moleculares previamente identificadas. O avanço de recursos computacionais, o que compreende a modernização da tecnologia de *Hardwares* e *Softwares*, bem como o avanço da biologia molecular e das técnicas experimentais para identificação, isolamento e preparação de proteínas, proporcionou uma acentuada expansão da modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de fármacos.

O processo de descoberta de novos fármacos requer uma gama de propriedades importantes para a descrição das interações correntes entre o ligante (droga) e o receptor (substrato), e neste ensejo a modelagem molecular é capaz de fornecer informações bastante específicas de uma molécula, tais como: energia, potencial eletrostáticos, orbitais de fronteira HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital*) e LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*), etc. A modelagem molecular também possibilita a visualização tridimensional de um sistema ligante-receptor, viabilizando então o planejamento teórico de

moléculas que satisfaçam as propriedades eletrônicas e estruturais necessárias para uma adequada acoplagem do fármaco no sítio ativo do substrato [44].

Em suma, um programa de modelagem molecular permite a representação, visualização, manipulação e determinação de parâmetros geométricos e eletrônicos de uma molécula isolada, além de realizar estudos em macro-moléculas (proteínas, enzimas) e complexo ligante-receptor, sendo que dentre os diversos métodos desenvolvidos para a modelagem molecular, a Mecânica Molecular e os Métodos Semi-Empíricos são os mais utilizados para a obtenção das propriedades eletrônicas e moleculares de fármacos.

2.2 Mecânica Molecular

Na Mecânica Molecular (MM), as equações utilizadas seguem leis da física clássica e são aplicadas aos núcleos atômicos, sem a consideração do elétrons. A idéia fundamental para essas considerações está baseada na aproximação de Born-Oppenheimer, a qual considera que os núcleos possuem massa muito maior do que os elétrons, o que resulta no fato de que os movimentos nuclear e eletrônico podem ser desacoplados, onde o núcleo se move mais lentamente do que a nuvem eletrônica, e o movimento destes ajusta-se quase que simultaneamente ao movimento nuclear. Essencialmente, as moléculas são tratadas como uma séries de esferas (os átomos) conectados à molas (ligações). Desta forma, as equações derivadas da mecânica clássica são usadas para calcular as diferentes interações e energias (campos de força) resultantes dos comprimentos e ângulos de ligação, ângulos de torção, interação de van der Waals, etc. Estes cálculos necessitam de informações ou parâmetros que possam descrever as interações entre diferentes conjuntos de átomos [44].

Os cálculos de MM são mais rápidos e computacionalmente menos custoso do que os cálculos de Mecânica Quântica. No entanto, não podem calcular propriedades eletrônicas de moléculas, visto que os elétrons não são inclusos nestes tipos de cálculos. Sendo assim, a MM é muito eficiente para os seguintes cálculos: minimização de energia, identificação de conformações estáveis, cálculo de energia para conformações específicas e estudo de

movimento molecular [1].

As energias calculadas pela MM não possuem significado como quantidades absolutas, porém possuem muita utilidade quando utiliza-se de comparações entre diferentes conformações da mesma molécula. A equação para a energia total de um dado sistema em estudo (potencias de interação) juntamente com os dados (parâmetros) necessários para descrever o comportamento de diferentes tipos de átomos e ligações, é chamado de campo de força [45]. Deste modo, a minimização de energia, ou otimização geométrica, está diretamente relacionada ao tipo de campo de força utilizado em tal processo. O MM (MM2 e versões posteriores) [46–50] e AMBER [51] são alguns exemplos do diversos tipos disponíveis de campo de força.

2.2.1 Campo de força CVFF

O campo de força CVFF (consistent-valence forcefield) é uma campo de força de valência generalizada [52] que fornece parâmetros para aminoácidos, água e diversos grupos químicos funcionais. A equação 2.1 mostra a forma analítica para a energia potencial usada neste campo de força.

$$\begin{aligned}
 E_{pot} = & \sum_1 D_b [1 - e^{-\alpha(b-b_0)}] + \sum_{\theta} H_{\theta} (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\phi} H_{\phi} [1 + \text{scos}(n\phi)] \\
 + & \sum_{\lambda} H_{\lambda} \chi^2 + \sum_b \sum_{b'} F_{bb'} (b - b_0)(b' - b'_0) + \sum_{\theta} \sum_{\theta'} F_{\theta\theta'} (\theta - \theta_0)(\theta' - \theta'_0) \\
 & + \sum_b \sum_{\theta} F_{b\theta} (b - b_0)(\theta - \theta_0) + \sum_{\phi} F_{\phi\theta\theta'} \cos(\theta - \theta') \\
 & + \sum_{\lambda} \sum_{\lambda'} \lambda' F_{\lambda\lambda'} + \sum \varepsilon [(\frac{r^*}{r})^{12} - 2(\frac{r^*}{r})^6] + \sum \frac{q_i q_j}{\varepsilon r_{ij}} \quad (2.1)
 \end{aligned}$$

Onde os parâmetros da equação são:

- D_b é a constante relacionada à variação da energia de ligação entre dois átomos.
- H_{θ} é a constante relacionada à energia decorrente da variação do ângulo definido

entre três átomos.

- H_ϕ é a constante relacionada à energia dependente da variação do ângulo diedral (que é o ângulo definido entre três átomos fixos em um plano perpendicular ao plano de rotação de um quarto átomo).

- H_χ é a constante associada à variação de energia decorrente de variações das interações atômicas fora do plano.

- b_0 é a distância de equilíbrio da ligação entre dois átomos.

- θ_0 é o ângulo de equilíbrio entre duas ligações químicas.

- n é o número de mínimos decorrentes da variação do ângulo diedral.

- ϕ é o ângulo diedral definido para a ligação central entre uma seqüência de quatro átomos.

- χ é a variável relacionada às interações fora do plano.

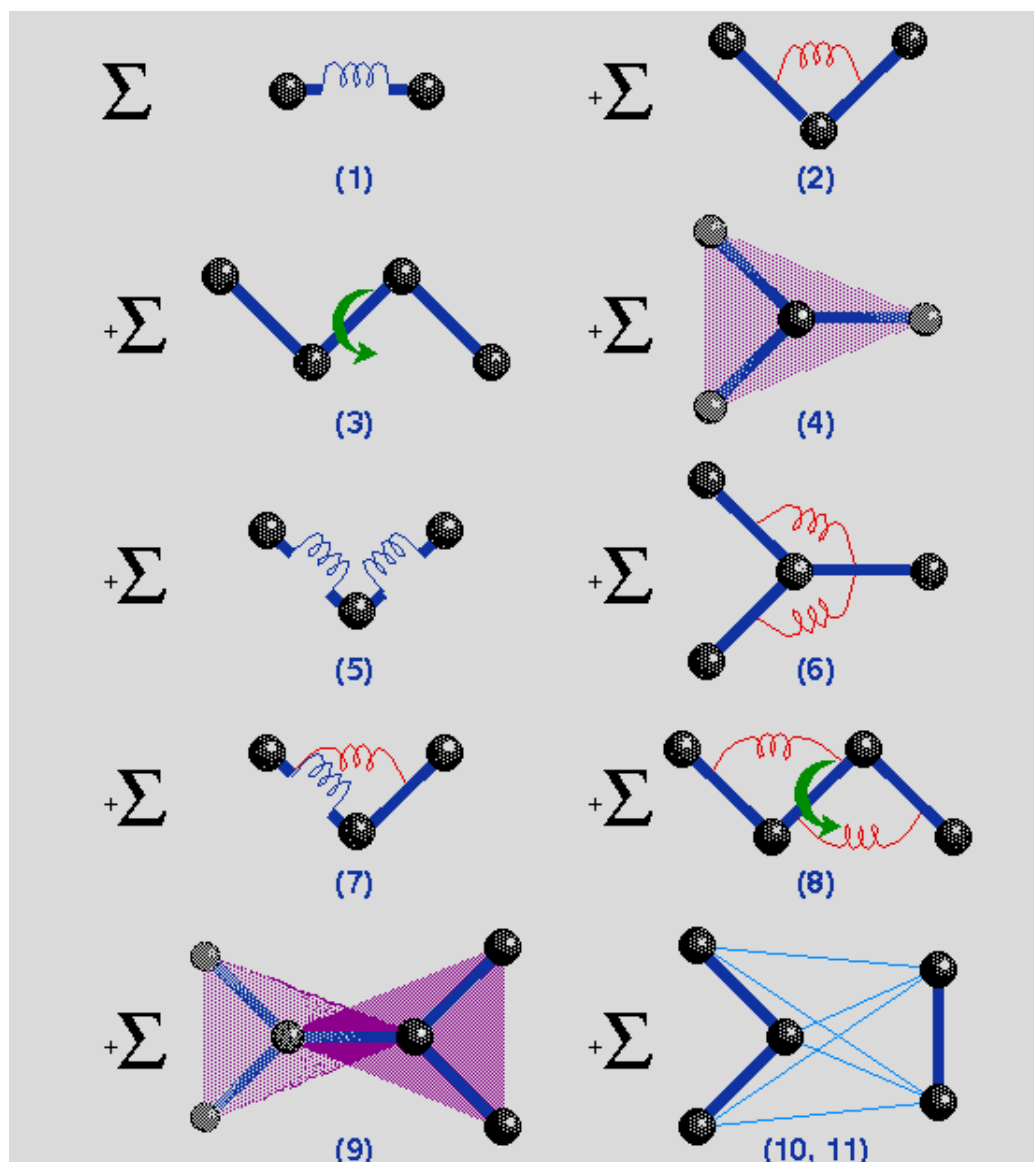
- ε é a polarizabilidade dos átomos.

- $q_i e q_j$ são as cargas atômicas dos sítios i e j , respectivamente.

Do primeiro ao quarto termo do lado direito da equação 2.1 são representadas as energias de deformação dos comprimentos de ligação, ângulos de ligação, ângulos de torção e interações fora do plano, respectivamente. O primeiro termo, correspondente ao potencial de Morse, descreve o estiramento das ligações. Já os termos de 5 a 9 representam acoplamentos entre deformações de coordenadas internas. Tais termos são necessários para aumentar a precisão na reprodução de propriedades experimentais de frequências vibracionais e as propriedades dinâmicas das moléculas em geral. Finalmente, o termo 10 se refere às interações de van der Waals (com um termo de Lennard-Jones), enquanto que o termo 11 representa o potencial de Coulomb, que descreve as interações eletrostáticas.

A figura 2.1 mostra a representação de cada termo da equação 2.1, os quais descrevem as variações nas interações interatômicas nas moléculas, assim como as interações intermoleculares.

Figura 2.1: Ilustração dos termos da equação 2.1.



Fonte: Retirada do site www.quimica.urv.es

2.3 Métodos Baseados em Mecânica Quântica

Em 1931, os cientistas Michael Polanyi (1891-1976) e Henry Eyring (1901-1981) publicaram um importante trabalho cujo objetivo era descrever e construir superfícies de energia potencial através da combinação de resultados teóricos e experimentais, dando origem ao nome semi-empírico para métodos com esse tipo de abordagem. Os métodos

semi-empíricos foram desenvolvidos visando reduzir o tempo gasto na obtenção de propriedades eletrônicas que exigem certo esforço computacional, assim como diminuir o tempo gasto no tratamento de sistemas moleculares com grande quantidade de átomos [2]. Sendo assim, os métodos semi-empíricos são capazes de calcular propriedades eletrônicas que dificilmente seriam tratados por métodos *ab initio* (os quais se baseiam integralmente em primeiros princípios), além de serem considerados mais rápidos do que cálculos realizados via métodos *ab initio*, apesar de também serem mais lentos que cálculos MM.

De forma geral, pode-se afirmar que os métodos semi-empíricos são baseados no mesmo formalismo *ab initio*, e o seu principal objetivo é resolver as equações de Hartree-Fock-Roothaan, de forma auto-consistente e utilizando-se de parâmetros obtidos por ajuste numérico, ou derivados de dados experimentais. Normalmente é utilizado um conjunto de base mínima de valência formado por funções do tipo Slater, STOs (Slater Type Orbitals), além de também ser utilizada a teoria de orbitais moleculares, a partir da combinação linear de orbitais atômicos.

Os métodos semi-empíricos mais atuais são AM1 (Austin Model 1) [53] e PM3 (Parametric Method 3) [54] que estão contidos em diversos pacotes computacionais. Estes tipos de métodos são recomendados principalmente para os seguintes cálculos: energias e coeficientes de orbitais moleculares, calor de formação para conformações específicas, cargas atômicas parciais obtidas de coeficientes de orbitais moleculares, potenciais eletrostáticos, momentos de dipolo, geometria e energia de estados de transição e energias de dissociação de ligações [1]. Os métodos semi-empíricos podem ser empregados preferencialmente nas situações em que são exigidos: cálculos de um número muito grande de moléculas pequenas (como no caso de estudo de efeitos de substituintes para o projeto de fármacos); inúmeros e repetidos cálculos de um mesmo sistema (como em simulações Monte Carlo ou de Dinâmica Molecular); cálculos de moléculas grandes.

As diversas aproximações semi-empíricas permitem evitar o cálculo de um grande número de integrais, possibilitando então a aplicação destes métodos a sistemas com grande número de átomos, que é o caso do presente estudo, onde são considerados sistemas

macromoleculares de proteínas co-cristalizadas com moléculas candidatas à fármacos.

2.3.1 A teoria do funcional da densidade (DFT)

Neste trabalho, os cálculos de energia foram efetuados utilizando-se o método DFT (Density Functional Theory). Este método é baseado na resolução da equação de Schrödinger para um sistema de N elétrons, escrita em termos da densidade eletrônica total $\rho(r)$ em um determinado ponto r no espaço [55; 56]. Deste modo, o método DFT é uma alternativa para resolver problemas de muitos corpos, onde a equação de Schrödinger de N elétrons com a função de onda com $4N$ coordenadas ($3N$ espaciais e N de spin) pode ser escrita como uma equação da densidade eletrônica com apenas três coordenadas espaciais. A solução exata para tal equação foi dada em 1964 por Hohenberg e Kohn [57], sendo que sua aplicabilidade a cálculos de estrutura eletrônica de moléculas e sólidos sofreu grandes avanços a partir dos trabalhos desenvolvidos por Kohn e Sham [56; 58; 59].

O conceito fundamental em que se baseia o método DFT, é que a energia de um sistema eletrônico é dita como sendo um funcional da densidade eletrônica e é denotada por $E[\rho]$, de modo que para uma dada função $\rho(r)$ existe uma energia correspondente [60; 61]. Outra noção usual considerada por Kohn e Sham na aproximação DFT é a introdução de *elétrons fictícios não interagentes* com a mesma densidade que os elétrons interagentes verdadeiros [62].

Considerando um sistema no qual elétrons emparelhados são descritos por um mesmo orbital espacial, Kohn e Sham demonstraram que a energia eletrônica E do estado fundamental de um sistema de N elétrons é dada por:

$$E[\rho] = - \sum_{i=1}^N \int \psi_i^*(\vec{r}_1) \nabla_1^2 \psi_i(\vec{r}_1) d\vec{r}_1 - \sum_{I=1}^N \frac{Z_I}{r_{I1}} \rho(\vec{r}_1) d\vec{r}_1 + \frac{1}{2} \int \frac{\rho(\vec{r}_1)\rho(\vec{r}_2)}{r_{12}} d\vec{r}_1 d\vec{r}_2 + E_{XC}[\rho] \quad (2.2)$$

onde as funções dos orbitais espaciais para cada elétron ψ_i é a solução para a equação

2.2 e são chamadas de orbitais de Konh-Sham. A densidade eletrônica exata do estado fundamental, que é dada por 2.3, considera a soma sobre todos os orbitais de Konh-Sham ocupados, sendo que à medida em que estes orbitais são calculados, ρ é conhecida.

$$\rho(\vec{r}) = \sum_{i=1}^n |\psi_i(\vec{r})|^2 \quad (2.3)$$

O primeiro termo do lado direito da equação 2.2 representa a energia cinética dos elétrons, enquanto que o segundo representa a atração elétron-núcleo, sendo que o somatório é feito sobre todos os núcleos com índice I e número atômico Z_I . Já o terceiro membro da equação representa a interação de Coulomb entre a distribuição de carga total (somada sobre todos os orbitais de konh-Sham) em \vec{r}_1 e \vec{r}_2 . O último termo, E_{XC} , se refere à energia de *exchange-correlation* (correlação e troca) do sistema, a qual também é um funcional de densidade e leva em conta todas as interações elétron-elétron não-clássicas. Vale ressaltar que como a forma analítica exata deste termo não é conhecida, normalmente são usadas expressões aproximadas para descrevê-lo.

Aplicando-se o princípio variacional para a minimização da energia eletrônica $E[\rho]$, os orbitais de Konh-Sham são encontrados através da seguinte equação:

$$\left\{ -\frac{\hbar^2}{2m_e} \nabla_1^2 - j_0 \sum_{I=1}^N \frac{Z_I}{r_{I1}} + j_0 \int \frac{\rho(\vec{r}_2)}{r_{12}} d\vec{r}_2 + V_{XC}[\vec{r}_1] \right\} \psi_i(\vec{r}_1) = \varepsilon_i \psi_i(\vec{r}_1) \quad (2.4)$$

onde ε_i são as energias dos orbitais de Konh-Sham e $V_{XC}[\rho] = \frac{\delta E_{XC}[\rho]}{\delta \rho(\vec{r})}$ é um funcional derivado da energia de correlação e troca, e é um potencial local chamado de potencial de *exchange-correlation* (troca e correlação).

As equações de Konh-Sham são formalmente exatas, apesar de também possuírem a forma das equações de campo-auto-consistente de Hartree, as quais são aproximadas. O potencial auto-consistente que age sobre os elétrons da equação 2.4 é dado pela soma do potencial externo, do potencial de Hartree e do potencial de correlação e troca. Sob a ação deste potencial auto-consistente, os elétrons não-interagentes adquirem a mesma densidade dos elétrons interagentes verdadeiros. Deste modo, após a resolução da equação

2.4, a densidade eletrônica é calculada através da equação 2.3 e a energia do estado fundamental (dos elétrons interagentes verdadeiros) finalmente é calculada por meio da equação 2.2.

2.3.2 A aproximação LDA (Local Density Approximation)

A forma exata do funcional da energia de correlação e troca $E_{XC}[\rho]$ não é conhecida, sendo necessário recorrer a aproximações. Uma destas aproximações, dentre outras aproximações propostas na literatura [63–66], a LDA (Local Density Approximation) que foi a primeira a ser introduzida [62], assume que a energia de correlação e troca de um elétron em um ponto r depende unicamente da densidade daquele ponto, em vez da densidade de todos os pontos no espaço. Nesta aproximação o funcional de correlação e troca é dado por:

$$E_{XC} = \int [\rho(\vec{r})] \varepsilon_{XC}[\rho(\vec{r})] d\vec{r} \quad (2.5)$$

onde $\varepsilon_{XC}[\rho(\vec{r})]$ é a energia de correlação e troca por elétron em um gás homogêneo de elétrons de densidade $\rho = \rho(\vec{r})$.

Apesar da equação 2.5 ser claramente uma aproximação, visto que em moléculas reais as cargas eletrônicas e as cargas positivas não são distribuídas uniformemente, o uso da aproximação é bastante preciso para o cálculo de propriedades estruturais, sendo que conforme a densidade eletrônica no sistema é variada, ou o número de moléculas é aumentado, o nível de acurácia desta aproximação diminui. No entanto, nos cálculos de energia realizados neste trabalho, foi utilizado esta aproximação para o funcional de energia de correlação e troca.

2.4 MFCC

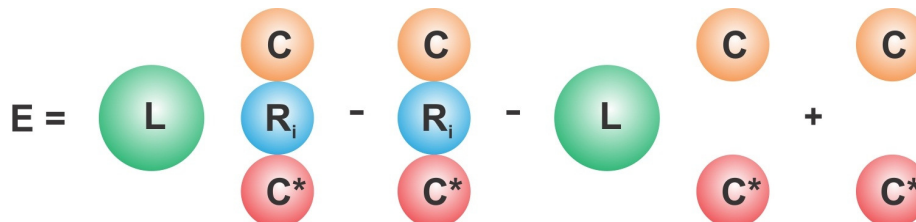
O método MFCC (Molecular Fragmentation with Conjugate Caps) é uma aproximação de escala linear capaz de fornecer cálculos quantitativos e eficientes da energia de interação de proteínas com compostos moleculares através de métodos quânticos mais sofisticados (como o DFT), os quais exigiriam alto custo computacional para sistemas macromoleculares (da ordem de milhares de átomos). A idéia principal é dividir a energia de interação de pequenas moléculas com macromoléculas (como uma proteína, por exemplo), em somas individuais de interação que podem ser facilmente calculadas por métodos quânticos [67]. Visto que este método se baseia nas propriedades locais de interação, considerando que a energia de perturbação numa área é geralmente localizada dentro de sua vizinhança e decai rapidamente fora dela [68; 69], a proteína é fragmentada a partir da quebra das ligações peptídicas, onde somente o aminoácido de interesse é considerado para o cálculo de energia, e no lugar em que a quebra das ligações é feita, com o intuito de simular o ambiente protéico, são colocados os aminoácidos vizinhos da direita e da esquerda (da cadeia peptídica), os quais são chamados de "caps" (ou caps, em inglês).

Através da equação 2.6 calcula-se a energia de interação $E_{(L-R_i)}$ entre o ligante L e um resíduo R_i . A expressão 2.6 foi adaptada a partir do trabalho de Zhang *et al.* [67] por Costa *et al.* [70], onde denota-se os caps da direita e da esquerda por C e C^* , respectivamente:

$$E_{(L-R_i)} = E_{(L-CR_iC^*)} - E_{(CR_iC^*)} - E_{(L-CC^*)} + E_{(CC^*)} \quad (2.6)$$

O primeiro termo do lado direito da equação 2.6 se refere à energia de interação entre o ligante e o resíduo (ou aminoácido) de interesse acoplado com seus respectivos caps, o segundo termo representa somente a interação do resíduo de interesse com seus caps, o terceiro termo representa a energia do ligante com os caps e o quarto termo representa apenas a energia de interação dos caps. A figura 2.2 mostra de forma pictórica o esquema dos cálculos de energia através do uso da aproximação MFCC.

Figura 2.2: Esquema utilizado pelo método MFCC para o cálculo da energia de interação entre um resíduo R_i de uma proteína e a molécula do ligante L . Os caps C e C^* devem imitar o efeito da parte da molécula original que foi cortada, neste caso os caps são os aminoácidos vizinhos da cadeia peptídica.



Fonte: Autora , 2012

De um modo geral, através do MFCC o problema de se calcular a energia entre o ligante e a proteína se resume a cálculos individuais da energia de interação do ligante com cada aminoácido componente da proteína em questão, acoplado com seus caps, o que diminui consideravelmente o tamanho do sistema a ser estudado. Desta forma, normalmente cada cálculo possui um número pequeno de átomos, possibilitando o uso de métodos quânticos com maior precisão. Neste caso, o uso do método DFT é bastante favorável, sendo então utilizado nos cálculos realizados para os sistemas considerados nesta dissertação.

Capítulo 3

A ligação do aduto INADH da Isoniazida ao sítio ativo da redutase inhA do *Mycobacterium Tuberculosis*

Neste capítulo serão mostrados os resultados referentes aos cálculos de energia do sistema biomolecular composto pela molécula INADH dentro do sítio de ligação da proteína nativa inhA. Como já visto no capítulo 1 desta dissertação, inhA é o gene que está envolvido no processo de biossíntese do ácido micólico que forma a parede celular da micobactéria causadora da Tuberculose, o *Mycobacterium Tuberculosis* (MT). Por sua vez, o composto orgânico INADH inibe o processo de produção de ácidos micólicos, causando a ruptura da parede celular do MT e provocando a morte da micobactéria.

A molécula INADH é o complexo orgânico derivado da pró-droga Isoniazida (INH). Através do processo de catálise-peroxidase, mediado pela proteína katG, o composto orgânico NADH é ligado covalentemente à pró-droga INH, dando origem ao fármaco acyl-NADH (INADH). Diversos estudos [20; 71; 72] apontam a inhA como o alvo preferencial da INH. De acordo com Rozwarski [22], o processo de formação do INADH ocorre no interior do sítio ativo da proteína inhA, que é uma enzima enoil-ACP (Acyl carrier protein) redutase que age como um catalisador na principal reação do processo de biossíntese de

ácidos-graxos. Este tipo de enzima também é responsável pela regulação do ciclo de alongamento de ácidos graxos.

Apesar da INH ser o fármaco base na quimioterapia da TB e ser um eficiente inibidor da inhA, nota-se que a mutação enzimática próximo do sítio ativo da proteína alvo, como por exemplo, a troca do aminoácido serina pelo aminoácido alanina na posição 94 (S94A), conferem resistência do alvo à INH [22]. No entanto, mesmo que as mutações no gene inhA possibilitem a ocorrência de resistência do alvo à INH, a proteína inhA continua sendo um alvo promissor em estudos para o desenvolvimento racional de fármacos antituberculares. Desta forma, este trabalho empenha-se no objetivo de fornecer o perfil energético das interações características da INH ativada com a proteína alvo inhA, em uma tentativa de compreender as causas moleculares para o problema da resistência deste alvo ao fármaco INH. Através do uso de um conjunto de métodos teóricos-computacionais, foram calculadas as energias de interação dos principais aminoácidos do sítio ativo e regiões vizinhas da enzima inhA. Além do uso do campo de força clássico CVFF (Consistent Valence Forcefield) para a otimização dos átomos de hidrogênio, também utilizou-se o método quântico DFT (Density Functional Theory) para a obtenção da energia de interação do ligante (o qual é o complexo INADH) com o receptor (o qual é a proteína inhA). Os cálculos de energia via DFT foram implementados no modelo aproximativo MFCC (Molecular Fractionation with Conjugate Caps). Os detalhes dos cálculos e os resultados obtidos são apresentados nas seções subsequentes.

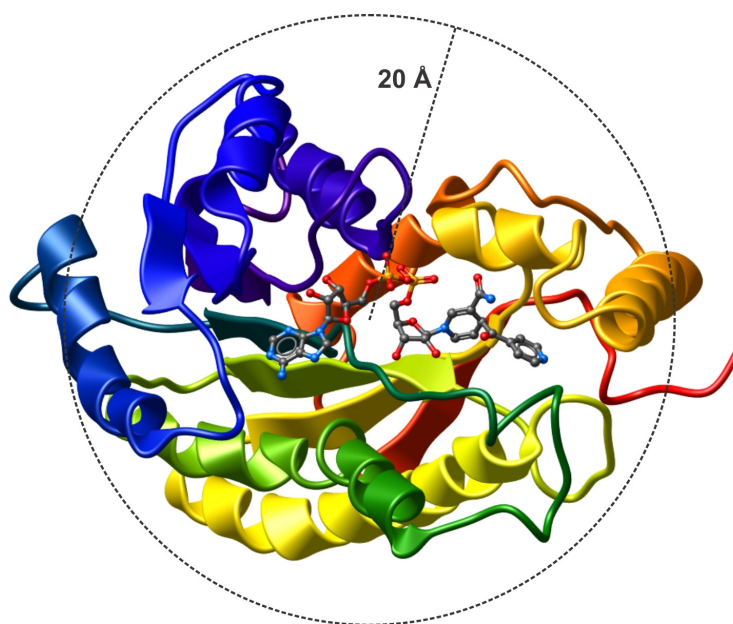
3.1 Detalhes da Metodologia

O estudo do perfil energético das interações, entre fármaco e bioreceptor, foi realizado partindo da estrutura da proteína alvo inhA co-cristalizada com o ligante INADH. O arquivo PDB com id 1ZID [22], que encontra-se disponível no banco de dados RCS-PDB [73], fornece os dados do cristal produzido a partir da enzima inhA inibida pelo INADH. Obtido através do método experimental de difração de raio-x, com resolução de 2,7 Å, o cristal da proteína inhA complexada com o fármaco INADH está representado na figura

3.1.

O arquivo 1ZID não fornece as coordenadas atômicas dos átomos de hidrogênios, visto que tal cristal foi obtido através de difração de raios-x, que por sua vez não difrata em átomos leves como os de hidrogênio. Sendo assim, primeiramente foi selecionado um raio de 20 Å em relação ao centróide do fármaco INADH, isto é, a proteína foi "cortada", sendo selecionados somente os resíduos dentro do raio de 20 Å. Em seguida, os átomos pesados como carbono (C), oxigênio (O), nitrogênio (N) e fósforo (P) foram mantidos fixos em suas respectivas posições atômicas no cristal, e somente os átomos de hidrogênio foram deixados livres para serem otimizados. Desta forma, a otimização dos hidrogênios foi realizada utilizando-se o campo de força clássico CVFF (Consistent Valence Forcefield) [74; 75], que é um campo de força de valência generalizada e fornece parâmetros para aminoácidos, água e diversos grupos funcionais [52].

Figura 3.1: Estrutura do cristal 1ZID da proteína inhA co-cristalizada com o fármaco INADH, obtido através de difração de raios-x e com resolução de 2.7 Å. Foram selecionados os resíduos no raio de 20 Å em relação ao centróide do INADH para a otimização dos hidrogênios. A estrutura do ligante está representada no formato *ball and sticks* e a proteína está representada no formato de fitas. Os átomos de hidrogênio foram ocultados para a melhor visualização dos átomos pesados do ligante.



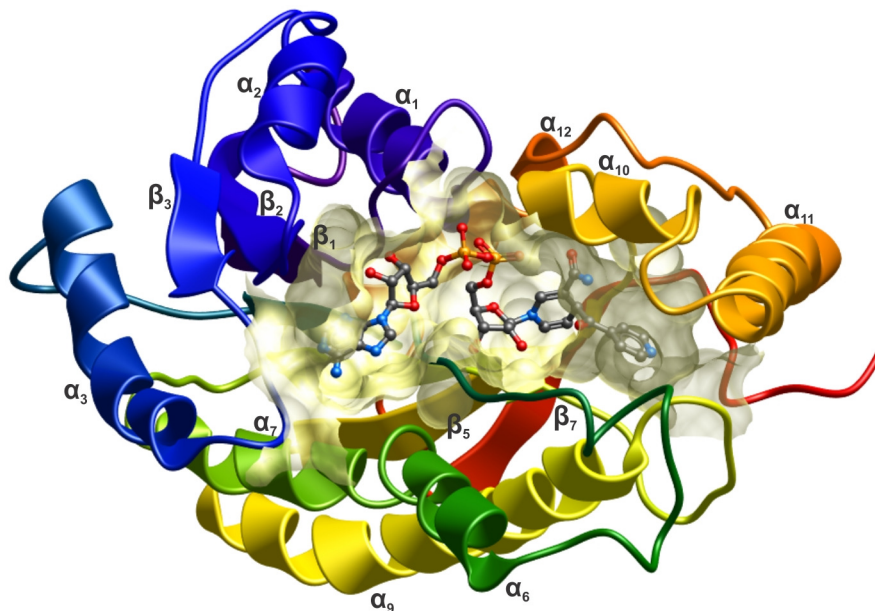
Fonte: Autora, 2012

Após a otimização dos hidrogênios, foram realizados os cálculos de energia via método DFT (Density Functional Density), através do pacote DMOL³ implementado no programa Accelrys Materials Studio 5.0, utilizando o método aproximativo MFCC (Molecular Fractionation with Conjugate Caps). Com o método aproximativo MFCC, foram calculados apenas os aminoácidos do sítio ativo e vizinhanças da proteína inhA. Segundo com os dados cristalográficos da proteína complexada com o INADH, o sítio ativo possui 23 aminoácidos. Porém, em nossos cálculos além dos 23 aminoácidos do sítio ativo, foram incluídos alguns aminoácidos próximos ao sítio ativo fornecido pelo cristal, numa região de até 5 Å em relação aos átomos do ligante, ou que possuíam carga formal diferente de zero, mas que estavam em regiões mais distantes, ou seja, regiões em um raio maior que 5Å. No total, isto é, aminoácidos do sítio ativo e regiões vizinhas, foram considerados 45 aminoácidos para o cálculo da energia de interação da proteína com o fármaco. Cabe ressaltar que nos cálculos da energia de interação da proteína com o fármaco, também foram consideradas as moléculas de água presentes no cristal do sistema macromolecular. Na figura 3.2 o sítio ativo e vizinhanças são representados pela superfície que envolve a estrutura do ligante.

As figuras 3.3 e 3.4 mostram explicitamente os aminoácidos representados pela superfície em torno do INADH, e para os quais foi calculada a energia de interação. Na figura 3.3 são mostrados 22 dos 45 aminoácidos de interesse, e na figura 3.4 são exibidos 23 aminoácidos. Em ambas as figuras, também são exibidas as moléculas de água que foram consideradas nos cálculos de energia. Tais moléculas foram incluídas nos cálculos de acordo com sua posição atômica no cristal 1ZID, sendo incorporadas como parte integrante do aminoácido do qual estivesse mais próximo, isto é, as moléculas de água mais próximas do aminoácido de interesse foram consideradas em todos os cálculos em que tal aminoácido estivesse presente.

Na figura 3.3 é possível visualizar as cadeias laterais dos aminoácidos que fazem parte do sítio de ligação da proteína em torno do ligante, nota-se que o grupo acyl isonicotínico derivado da INH é envolvido por uma espécie de cavidade formada pelos aminoácidos P193, Y158, W222, E169, D150 e E219. Além disso, o anel aromático da cadeia lateral do

Figura 3.2: A superfície que envolve o fármaco INADH representa o sítio de ligação da proteína, onde estão incluídos 45 aminoácidos para os quais foi calculada a energia de interação via método DFT, através da aproximação MFCC. As sequências peptídicas da proteína inhA também estão nomeadas de acordo com os seus respectivos tipos, dos quais se destacam as folhas- β e as α -hélices.

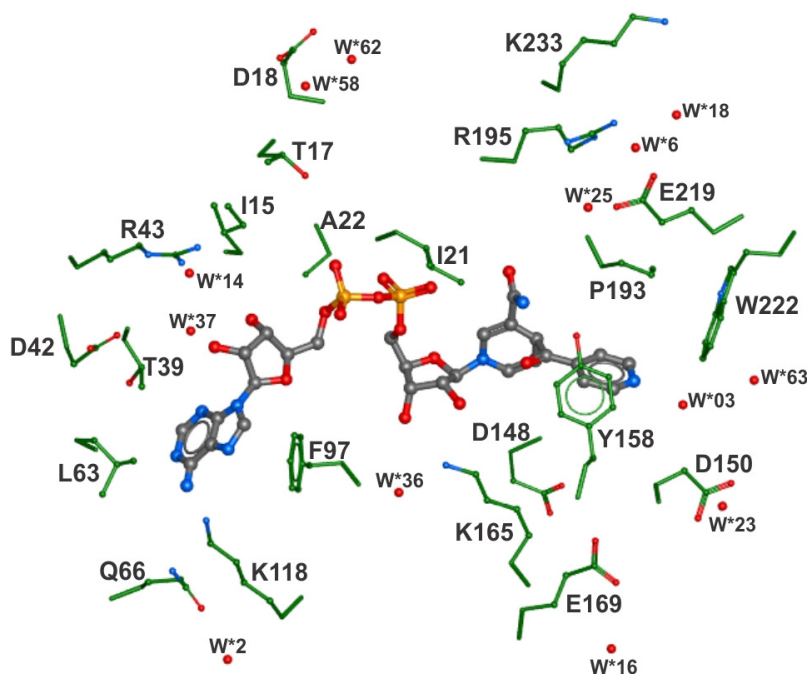


Fonte: Autora, 2012

Y158 forma uma interação do tipo próton- π com o anel aromático do INH. A presença de uma molécula de água próximo ao nitrogênio da purina do INH indica a formação de uma ligação de hidrogênio nesta região. Já nas proximidades do cofator NADH, a posição da cadeia lateral do K165 em relação à hidroxila da ribose sugere a formação de um ligação de hidrogênio deste aminoácido com o fármaco. A presença de outras moléculas de água nessa região, assim como a posição do aminoácido 148 próximo ao oxigênio da carbonila de uma das riboses, acarretam na formação de diversas ligações de hidrogênio entre o fármaco e o sítio ativo da proteína. Nesta mesma região, têm-se uma interação do tipo π - π decorrente do empilhamento do anel aromático do F97 com um anel purínico da adenina. Porém, além das ligações de ligação de hidrogênio e das interações hidrofóbicas, decorrentes dos empilhamentos entre anéis aromáticos, também estão presentes as interações de van der Waals entre o INADH e diversos aminoácidos, tais como A21, A22, P193, I15, e E219.

Na figura 3.4 extão expostos 23 dos 45 aminoácidos que compõem o sítio ativo e

Figura 3.3: Resíduos para os quais foram realizados os cálculos de energia. Além dos 22 aminoácidos, do total de 45, também foram consideradas as moléculas de água presentes na estrutura do cristal 1ZID. Os átomos de hidrogênio, bem como as ligações peptídicas, foram ocultados para uma melhor visualização dos resíduos.



Fonte: Autora, 2012

regiões vizinhas. Assim como na figura anterior, as coordenadas atômicas, extraídas do cristal, mostram a formação de uma região de ligação entre o grupo derivado do INH do fármaco e a proteína, porém, neste caso esta região é composta pelos aminoácidos A191, G192, F149, M155 e L218. O anel aromático do F149 forma uma interação do tipo π - π com o anel puínico do grupo acyl isonicotínico do INH. Da mesma forma, na região do NADH, o aminoácido F41 também interage com o anel aromático da adenina através de uma interação do tipo π - π . No entanto, em contraste com a região relativa ao INH, que caracteriza-se pela forte ocorrência de interações hidrofóbicas devido ao anel da purina presente no grupo acyl isonicotínico, a região do cofator NADH apresenta significativa quantidade de interações não hidrofóbicas, destacando-se nesta região, as interações de ligação de hidrogênio. Aminoácidos como S20, T196 e I194, formam pontes de hidrogênio

equação:

$$E_{(L-R_i)} = E_{(L-CR_iC^*)} - E_{(CR_iC^*)} - E_{(L-CC^*)} + E_{(CC^*)} \quad (3.1)$$

Onde o aminoácido de interesse, isto é cada um dos 45 aminoácidos considerados, é representado por R_i , e as "capas" (caps), que são os aminoácidos vizinhos da esquerda e da direita, são representadas por C e C^* , respectivamente. O primeiro termo do lado direito da equação 3.1 se refere à energia de interação do ligante L , que neste caso é o INADH, com o aminoácido de interesse R_i e seus caps C e C^* , o segundo termo representa a energia de interação apenas do aminoácido de interesse R_i com os caps C e C^* , já o terceiro termo da equação é a energia de interação do ligante INADH com os caps C e C^* , enquanto que o último termo refere-se à energia de interação somente dos caps. Vale ressaltar, que nos cálculos do presente sistema, INADH-inhA, foram considerados somente um cap de cada lado do resíduo, ou seja, somente o primeiro vizinho da esquerda e o primeiro vizinho da direita. A tabela 3.1 mostra os aminoácidos de interesse e seus respectivos caps.

A energia de cada termo da equação 3.1 foi calculado através do método DFT (Density Functional Theory), com nível de aproximação LDA (Local Density approximations) e conjunto de base DNP (Double Numeric Polarized). Os cálculos foram realizados utilizando-se o módulo DMOL³ através do programa computacional Accelrys Materials Studio 5.0.

3.2 Resultados

Para sistematizar a análise das interações do ligante com os aminoácidos do sítio de ligação da inhA, a estrutura do INADH apresenta-se dividida em seis regiões, sendo estas: i, ii, iii, iv, v e vi. Como é exibido na figura 3.5, o cofator NADH é representado da região i até a região v, onde os grupos químicos encontram-se distribuídos da seguinte forma: adenina na região i, ribose da adenina na região ii, pirofosfato na região iii, ribose da nicotinamida na região iv e nicotinamida na região v. Já o grupo acyl isonicotínico derivado da INH encontra-se na região vi.

Tabela 3.1: Os 45 aminoácidos que tiveram suas energias calculadas, juntamente com seus respectivos caps, o primeiro vizinho da esquerda e o primeiro da direita. A energia de interação de cada resíduo Ri, acoplados com os caps, e o INADH foi calculada através do método DFT, com aproximação LDA e conjunto de bases DNP.

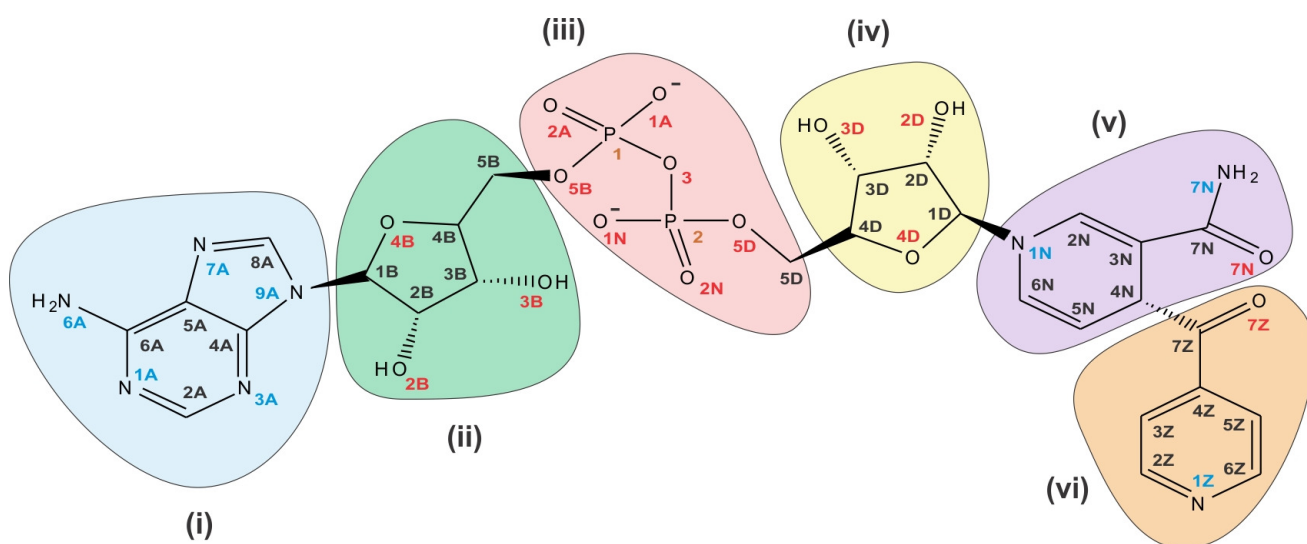
C	Ri	C*	C	Ri	C*
Ser13	Gly14	Ile15	Gly192	Pro193	Ile194
Ala198	Met199	Ser200	Gly40	Phe41	Asp42
Ser19	Ser20	Ile21	Trp160	Met161	Thr162
Ser20	Ile21	Ala22	Ala15	Tyr158	Asn159
Asp148	Phe149	Asp150	Ala154	Met155	Pro156
Ile15	Ile16	Thr17	Gly14	Ile15	Ile16
His121	Ile122	Ser123	Leu38	Thr39	Gly40
Leu63	Asp64	Val65	Leu217	Leu218	Glu219
Asp64	Val65	Gln66	Ile21	Ala22	Phe23
Ala164	Lys165	Ser166	Ile16	Thr17	Asp18
Gly96	Phe97	Met98	Thr39	Gly40	Phe41
Pro193	Ile194	Arg195	Ile194	Arg195	Thr196
Ser94	Ile95	Gly96	Phe41	Asp42	Arg43
Gly146	Met147	Asp148	Ala260	Asp261	Gly262
Arg195	Thr196	Leu197	Phe149	Asp150	Pro151
Ala190	Ala191	Gly192	Ser117	Lys118	Gly119
Ala191	Gly192	Pro193	Asp42	Arg43	Leu44
Val65	Gln66	Asn67	Leu218	Glu219	Glu220
Glu62	Leu63	Asp64	Thr17	Asp18	Ser19
His93	Ser94	Ile95	Met232	Lys233	Asp234
Gly221	Trp222	Asp223	Leu168	Glu169	Ser170
Ile95	Gly96	Phe97	Lys233	Asp234	Ala235
Met147	Asp148	Phe149	-	-	-

Fonte: Autora, 2012

As figuras de 3.6 a 3.11 mostram os aminoácidos mais próximos de cada uma das seis regiões do INADH. Além das menores distâncias entre os resíduos e as regiões específicas do INADH, outro critério adotado para a seleção dos aminoácidos que aparecem nas figuras a seguir é a energia de corte, isto é, as figuras de 3.6 a 3.11 exibem os aminoácidos que possuem energia de interação maior, em módulo, que a energia de corte adotada neste trabalho, a qual é ± 8 kcal/mol.

A figura 3.6 mostra os aminoácidos mais próximos da região i, sendo encontrados 7 aminoácidos nesta região, dos quais 5 (G14, F41, V65, I95 e I122) são apolares e 2 (D64 e K118) possuem cadeias laterais eletricamente carregadas. Nota-se claramente que o em-

Figura 3.5: Representação do ligante INADH, aduto da Isoniazida. A estrutura do INADH foi dividida em seis regiões, onde as regiões de i a v representam as diferentes partes do cofator NADH e a região vi destaca o grupo acyl isonicotínico derivado da INH. A nomenclatura foi feita de acordo com os dados do cristal 1ZID.

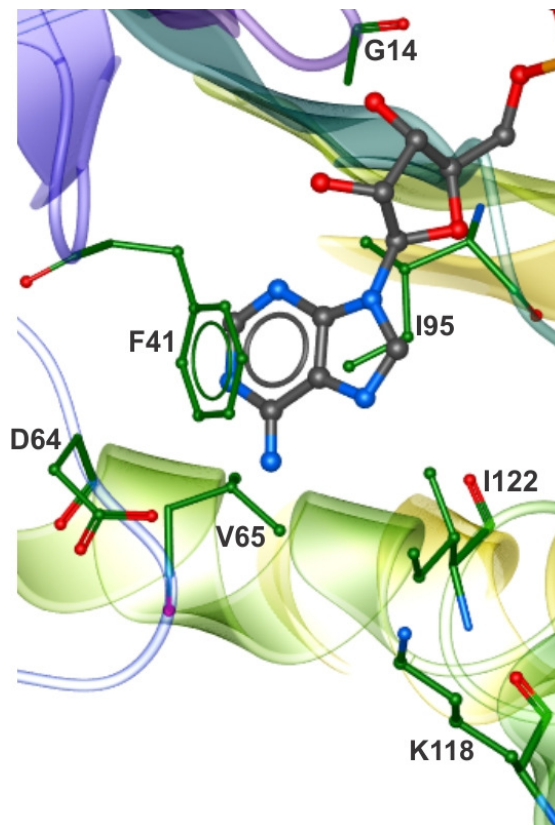


Fonte: Autora, 2012

pillamento do anel aromático do F41 com um dos anéis purínicos da adenina, formando assim uma interação do tipo π - π , o que caracteriza uma interação hidrofóbica nesta região. A presença dos aminoácidos V65 e I122 também indica a hidrofobicidade desta região, visto que tais aminoácidos possuem cadeias laterais apolares com substituintes hidrofóbicos. Os resíduos K118 (carregado positivamente) e D64 (carregado negativamente), apesar de serem aminoácidos polares, não apresentam nenhum tipo de interação eletrostática ou quimicamente favorável à ligações de hidrogênio, sendo caracterizados principalmente por interações do tipo de van der Waals. Deste modo, a região i é caracterizada pela presença de uma cavidade hidrofóbica formada pelos resíduos apolares mais próximos da adenina.

A região ii apresenta 8 aminoácidos mais próximos, sendo 5 apolares (I15, I16, F41, G14 e I95) e 3 polares (S20, D42 e R43). O R43 (carregado positivamente) e o D42 (carregado negativamente) estão localizados a distâncias superiores a 5 Å apresentando somente interações de van der Waals. O aminoácido G14 está localizado de modo que sua

Figura 3.6: Região i do INADH com os aminoácidos mais próximos, que possuem energia maior (em módulo) que ± 8 kcal/mol. A região i é constituída pelo grupo químico adenina, e os aminoácidos mais próximos são os que possuem cadeias laterais apolares, como o F41, o V65 e o I122. Os átomos de hidrogênio foram ocultados para a melhor visualização dos resíduos.

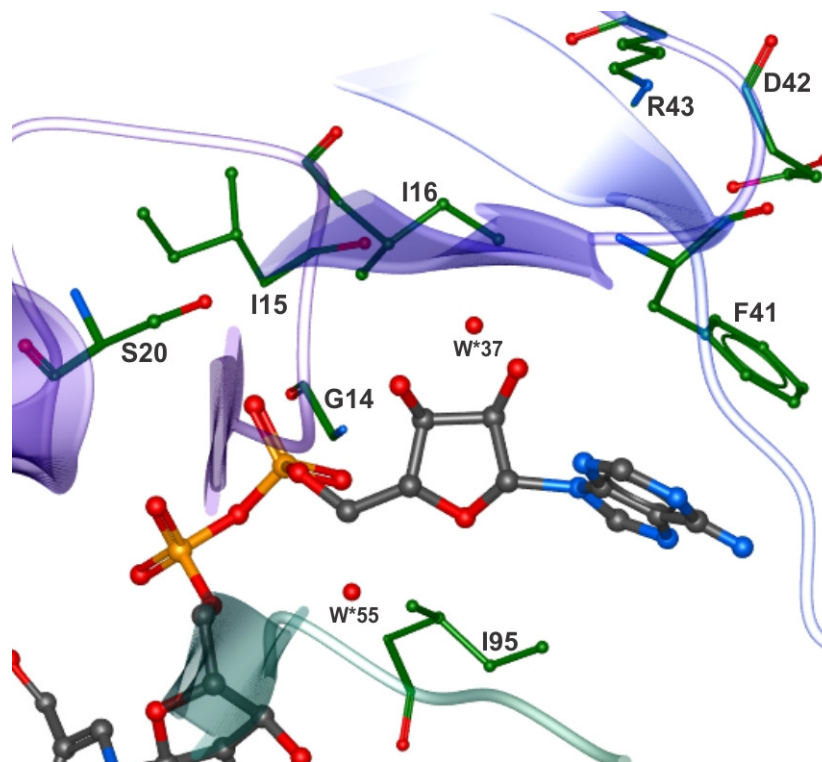


Fonte: Autora, 2012

cadeia lateral interage com uma das hidroxilas da ribose através de pontes de hidrogênio. Já o aminoácido I15 interage com uma das hidroxilas da ribose, através de uma ligação de hidrogênio mediada por uma molécula de água localizada entre o resíduo e a região ii do INADH. Desta forma, a ribose da adenina confere uma característica hidrofílica à região ii do INADH.

A região iii, representada na figura 3.8, é composta pelo grupo químico pirofosfato, que é um ânion do ácido pirofosfórico. Os aminoácidos mais próximos a esta região são: T196 (polar neutro), S20 (polar neutro), D18 (polar ácido), I16 (apolar), G14 (apolar), I95 (apolar), M147 (apolar) e I21 (apolar). A presença do pirofosfato favorece a formação de ligações de hidrogênio, principalmente com aminoácidos que possuem cadeias

Figura 3.7: Região ii do INADH com os aminoácidos mais próximos, que possuem energia maior (em módulo) que ± 8 kcal/mol. Tal região é composta pela ribose da adenina, de quem os aminoácidos mais próximos, tais como o G14, I15, I16 e I95, possuem radicais químicos apolares. Os átomos de hidrogênio foram ocultados para a melhor visualização dos resíduos.

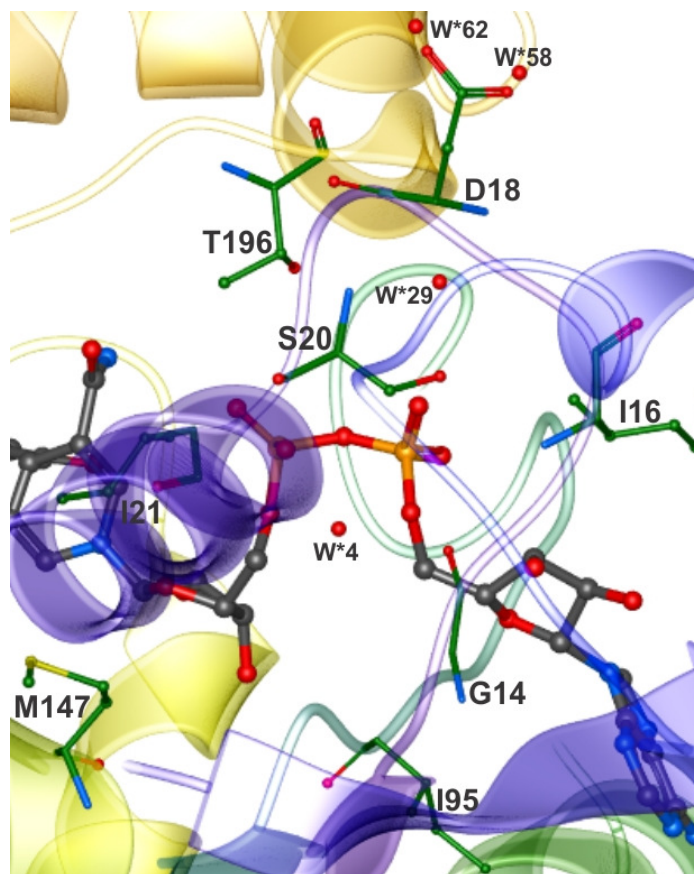


Fonte: Autora, 2012

polares eletricamente neutras, e como na região iii são encontrados dois aminoácidos com esta natureza, existe a possibilidade de haver interações de ligação de hidrogênio nesta região. Por outro lado, também são encontrados diversos aminoácidos apolares, que geralmente são hidrofóbicos. Porém, diferente da região i, tais aminoácidos não formam nem uma espécie de cavidade hidrofóbica. Logo, a região iii apresenta um certo equilíbrio entre aminoácidos hidrofóbicos e hidrófilos.

A região iv é composta pela ribose da nicotinamida, e os aminoácidos mais próximos desta região são o I21, M147, I95, K165 e F149, dos quais o K165 e o M147 são os resíduos com as menores distâncias em relação a esta região. O único resíduo polar dentre todos é o K165, o qual possui uma cadeia lateral carregada positivamente e é um aminoácido hidrófilo. Os aminoácidos apolares (I21, M147, I95 e F149) não viabilizam a formação de

Figura 3.8: Região iii do INADH com os aminoácidos mais próximos, que possuem energia maior (em módulo) que ± 8 kcal/mol. Tal região é composta por um pirofosfato. Dentre os resíduos exibidos na figura, os mais próximos são o I21, o D18, o S20 e o T196, sendo estes dois últimos favoráveis a interações de ligação de hidrogênio. Os átomos de hidrogênio foram ocultados para a melhor visualização dos resíduos.

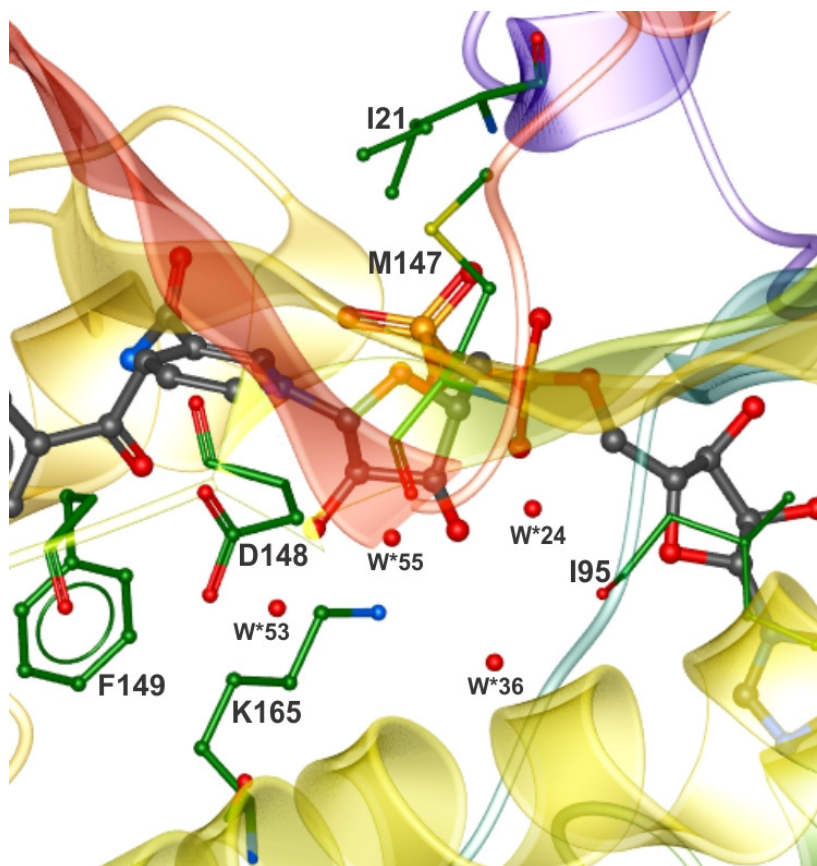


Fonte: Autora, 2012

nenhuma cavidade hidrofóbica, e o resíduo D148 (polar ácido) apresenta sua cadeia lateral em posição oposta às hidroxilas da ribose inviabilizando possíveis ligações de hidrogênio. Esta região apresenta uma quantidade maior de moléculas de água, do que as regiões analisadas anteriormente, fato que pode ser explicado pela presença das duas hidroxilas da ribose e dos aminoácidos polares carregados.

Composta pela nicotinamida do INADH, a região v destaca-se pela quantidade de resíduos próximos a mesma, sendo um total de 16 aminoácidos, dos quais 7 são apolares (I21, M147, A191, F149, P193, M199 e I194), 1 é polar neutro (T196), 5 são polares ácidos (D148, D150, D234, E169 e E219) e 3 são polares básicos (K233, K165 e R195). Desta

Figura 3.9: Região iv do INADH com os aminoácidos mais próximos, que possuem energia maior (em módulo) que ± 8 kcal/mol. Esta região é formada pela ribose da nicotinamida, e os aminoácidos mais próximos, entre todos os exibidos na figura, são o K165 e o M147. Nota-se uma quantidade maior de moléculas de água próximas a esta região. Os átomos de hidrogênio foram ocultados para a melhor visualização dos resíduos.

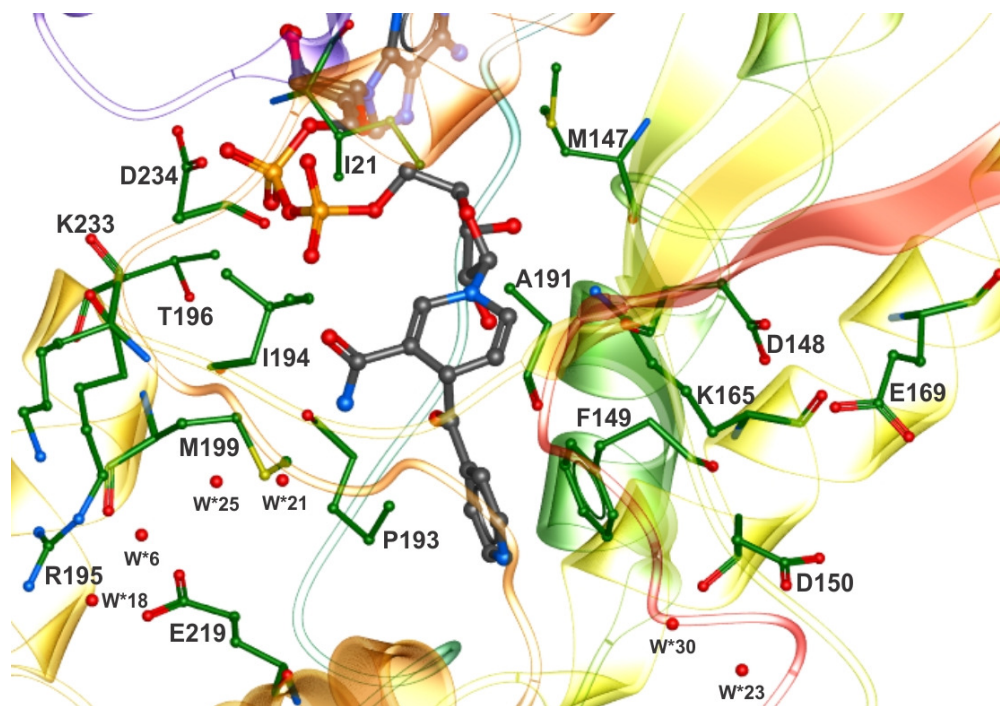


Fonte: Autora, 2012

forma, a região v possui tanto aminoácidos suscetíveis à interações hidrofóbicas, quanto aminoácidos que favorecem interações de ligação de hidrogênio, além de aminoácidos que interagem através de forças eletrostáticas e de van der Waals. Portanto, esta região possui um amplo espectro de interações intermoleculares com os aminoácidos do sítio ativo da enzima inhA. No entanto, através da figura 3.10, é possível notar que dentre todos os resíduos, os aminoácidos apolares P193, F149, M199, I194 e D148 encontram-se mais próximos da nicotinamida, formando assim uma cavidade hidrofóbica. Portanto, a região v, torna-se suscetível ao efeito de interações estéricas com energias altamente repulsivas.

A região vi é composta pelo grupo acyl isonicotínico derivado da isoniazida (INH),

Figura 3.10: Região v do INADH com os aminoácidos mais próximos, que possuem energia maior (em módulo) que ± 8 kcal/mol. Nesta região, formada pela nicotinamida, são exibidos 16 resíduos, sendo 9 aminoácidos (a maioria) polares e hidrófilos, enquanto que 7 são apolares. Dentre as 6 regiões, a região v apresentou a maior quantidade de resíduos mais próximos. Os átomos de hidrogênio foram ocultados para a melhor visualização dos resíduos.

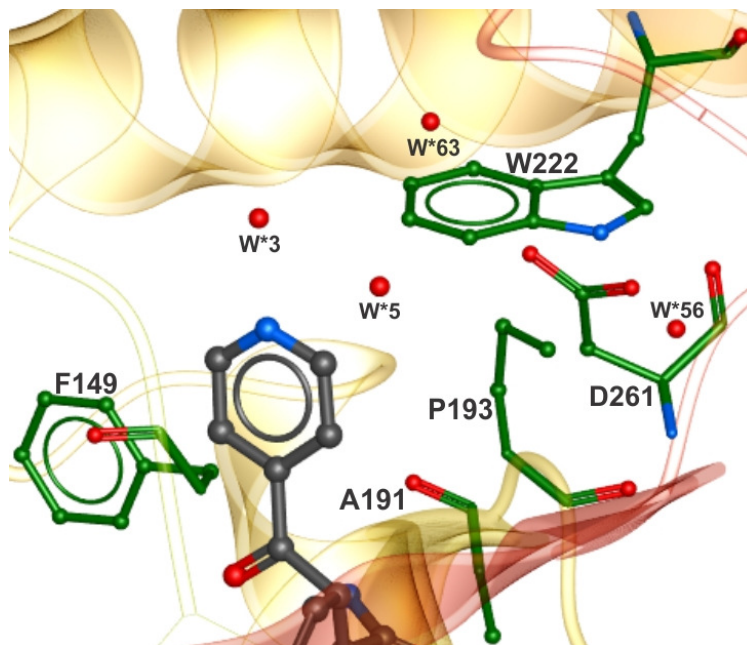


Fonte: Autora, 2012

e os aminoácidos mais próximas a esta região são: F149 (apolar), A191 (apolar), P193 (apolar), W222 (apolar) e D261 (polar ácido). Esta região possui uma molécula de água que faz uma ligação hidrogênio com o nitrogênio do anel purínico. O empilhamento entre o anel da purina do derivado do INH e o anel aromático do aminoácido F149 gera uma interação do tipo π - π . De forma semelhante às regiões i e iv, uma cavidade hidrofóbica é formada pelos aminoácidos com as menores distâncias da região, sendo que neste caso, os aminoácidos apolares (W222, F149, A191 e P193) são os responsáveis pela formação da cavidade, que gera um efeito estérico nas interações da região vi com o sítio ativo da proteína.

Partindo dos resultados dos cálculos da energia de interação entre o fármaco INADH e o sítio ativo e aminoácidos de regiões vizinhas, obtidos via método DFT com a aproximação MFCC, foi feito o gráfico BIRD (Binding site, Interaction energy and Residues

Figura 3.11: Região vi do INADH com os aminoácidos mais próximos, que possuem energia maior (em módulo) que ± 8 kcal/mol. A região vi é composta pelo derivado acyl nicotinamida da isoniazida (INH), sendo encontrados 5 aminoácidos (F149, A191, P193, W222 e D261) próximos a esta região. Os átomos de hidrogênio foram ocultados para a melhor visualização dos resíduos.



Fonte: Autora, 2012

Domain) mostrando as energias de interação entre o fármaco INADH e os aminoácidos mais importantes do sítio ativo e vizinhança da proteína inhA. No entanto, na tabela 3.2 são mostrados todos os resíduos do sítio de ligação que tiveram suas energias calculadas utilizando o método DFT (a nível LDA com base DNP e correção OBS) na aproximação MFCC. As menores distâncias entre os átomos interagentes (os átomos do resíduo e do ligante) também são mostradas na tabela.

O BIRD, cujo acrônimo em inglês representa o termo Binding site, Interaction energy and Residues Domain, e que significa, sítio de ligação, energia de interação e domínio de resíduos, exibe o perfil energético das interações dos aminoácidos mais importantes do sítio ativo e região próximas. Através das barras laterais presentes no BIRD, as interações dos resíduos no sítio ativo são expressas quantitativamente, de modo que através do perfil energético, exibido pelos aminoácidos do sítio de ligação considerado, é possível estimar a eficiência, tanto de atração quanto de repulsão, que os resíduos possuem em relação ao

Tabela 3.2: Energias (calculada via DFT, com base DNP e correção OBS) e mínimas distâncias em relação ao ligante, dos 45 aminoácidos que compõem o sítio de ligação considerado no estudo.

Resíduo	E (kcal/mol)	d (Å)	Resíduo	E (kcal/mol)	d (Å)
Gly14	-23,00	1,58	Pro193	-19,58	2,77
Met199	-13,92	1,79	Phe41	-21,03	2,78
Ser20	-40,85	1,81	Met161	2,89	3,00
Ile21	-33,37	1,90	Tyr158	-7,30	3,02
Phe149	-19,89	2,00	Met155	0,48	3,05
Ile16	-22,07	2,02	Ile15	-22,27	3,17
Ile122	-8,67	2,10	Thr39	-0,66	3,56
Asp64	10,78	2,10	Leu218	-3,55	3,61
Val65	-16,55	2,11	Ala22	-5,90	3,66
Lys165	-101,97	2,12	Thr17	2,31	3,83
Phe97	-7,02	2,16	Gly40	-1,18	3,89
Ile194	-14,54	2,20	Arg195	-67,31	4,99
Ile95	-22,13	2,27	Asp42	59,39	5,21
Met147	-11,04	2,30	Asp261	43,90	5,27
Thr196	-26,54	2,35	Asp150	46,53	5,28
Ala191	-9,74	2,41	Lys118	-55,35	5,33
Gly192	0,51	2,46	Arg43	-50,75	5,95
Gln66	-2,97	2,48	Glu219	43,19	6,25
Leu63	-1,49	2,51	Asp18	54,74	7,67
Ser94	-3,63	2,52	Lys233	-52,11	7,88
Trp222	-27,54	2,61	Glu169	44,03	8,46
Gly96	-5,01	2,64	Asp234	59,33	8,64
Asp148	49,33	2,65	-	-	-

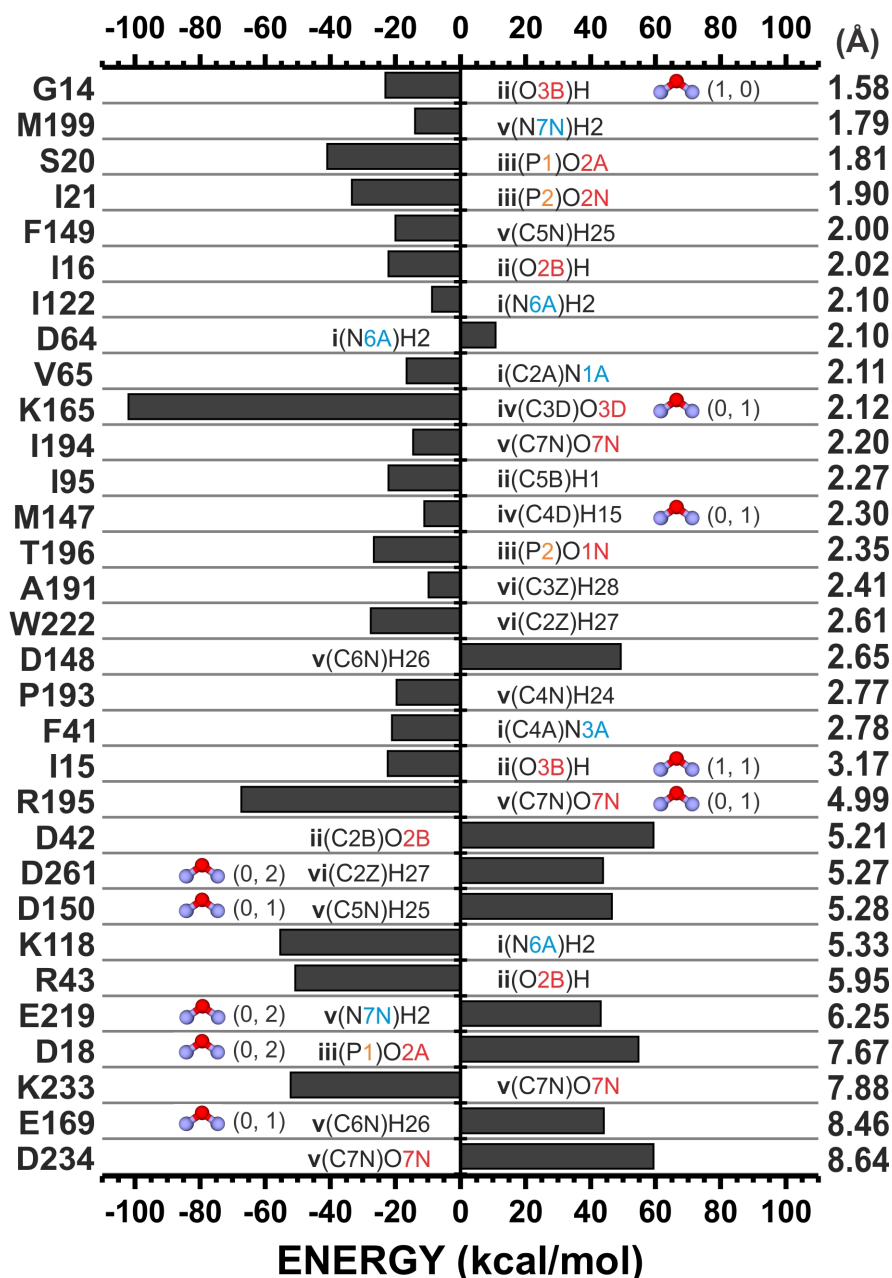
Fonte: Autora, 2012

fármaco.

Neste trabalho as energias negativas são ditas atrativas e as positivas são repulsivas. Sendo assim, foram considerados como sendo os aminoácidos mais importantes, aqueles que apresentaram energias repulsivas maior que 8 kcal/mol, ou energia atrativa maior que o módulo de - 8 kcal/mol. Deste modo, o gráfico BIRD exibido na figura 3.12 foi plotado considerando-se somente os 31 aminoácidos mais importantes, isto é, os que ultrapassam a energia de corte de ± 8 kcal/mol.

O painel gráfico mostrado na figura 3.12 consiste no BIRD da interação do INADH com os principais aminoácidos do sítio de ligação da enzima inhA, onde as barras horizontais

Figura 3.12: Painel gráfico do BIRD (Binding site, Interaction energy and Residues Domain) onde são mostradas as energias dos 31 resíduos mais importantes. Além da estimativa quantitativa da energia, dada em kcal/mol, também são identificados os átomos dos aminoácidos mais próximos do ligante e as regiões do fármaco onde estão interagindo. As menores distâncias entre os átomos dos resíduos e o INADH também são mostrados no BIRD. Tais distâncias estão organizadas seguindo a ordem do menor para a maior valor de distância.



Fonte: Autora, 2012

representam a energia de cada aminoácido considerado, sendo as barras do lado esquerdo do BIRD referentes às energias atrativas e o lado direito do gráfico representa as energias dos aminoácidos que apresentaram interações mais repulsivas. Também são mostradas as regiões do INADH, com as quais cada aminoácido está interagindo, assim como as menores distâncias entre os aminoácidos e as regiões de interação do INADH, sendo que tais distâncias estão organizadas do menor para o maior valor. As moléculas de água que formaram ligações de hidrogênio com algum aminoácido, ou intermediaram ligações de hidrogênio entre aminoácido e fármaco, também estão presentes no BIRD da figura 3.12, onde aparecem referindo-se ao aminoácido com o qual formou ligação de hidrogênio, sendo que a quantidade de moléculas de água que intermediaram ligação de hidrogênio entre o aminoácido e o INADH está definida pelo índice m , e a quantidade de águas que formaram ligações de hidrogênio somente com o respectivo aminoácido é indicada pelo índice n do termo (m,n) do gráfico. Quanto à representação das regiões do fármaco interagentes com os aminoácidos, a indicação de tais regiões segue em acordo com a nomenclatura do INADH, que é mostrada na figura 3.5. Sendo que o termo dentro do parênteses identifica a parte do fármaco onde está ligado o átomo do ligante que está interagindo com o referido aminoácido. Lembrando que os átomos interagentes mostrados no BIRD, são aqueles que possuem a menor distância do respectivo aminoácido, e que tal distância também é exibida no gráfico.

Quanto à classificação dos valores de energia expostos no BIRD, evidenciam-se os aminoácidos atrativos que possuem altas energias de interação, entre -40kcal/mol e -100kcal/mol . Tais aminoácidos são caracterizados por participarem na formação de ligações de hidrogênio, sendo a maioria deles aminoácidos polares básicos com radicais polares carregados positivamente, como a Lisina (K ou Lys) e a Arginina (R ou Arg). Dentre os aminoácidos com maior energia de atração, estão o K165, que é o aminoácido mais atrativo de todos (com $-101,97\text{kcal/mol}$), o R195 (com $-67,31\text{kcal/mol}$), o K118 (com $-55,35\text{kcal/mol}$), o K233 (com $-52,11\text{kcal/mol}$) e o R43 (com $-50,75\text{kcal/mol}$). Entretanto, aminoácidos polares eletricamente neutros, isto é, que possuem radicais polares sem cargas tais como a serina (S ou Ser) e treonina (T ou Thr), também participam das interações

atrativas fortes, onde o S20 exibe uma energia de interação em torno de -40,85 kcal/mol, e o T196 possui energia atrativa em torno de -26,54 kcal/mol. Já os aminoácidos apolares como a alanina (A ou Ala), isoleucina (I ou Ile), valina (V ou Val) e metionina (M ou Met), contribuem com algumas interações energéticas menos fortes, que variam entre -8,67 kcal/mol (energia do I122) e -16,55 kcal/mol (energia do resíduo V65).

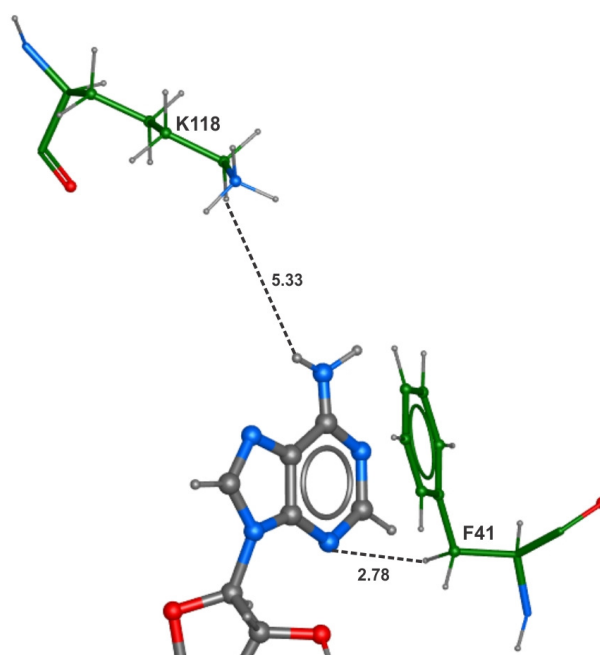
Os aminoácidos com altas energias repulsivas também estão presentes no perfil energético do INADH, sendo destacados os dois aminoácidos polares ácidos, ácido aspártico (D ou Asp) e ácido glutâmico (E ou Glu), como sendo os únicos aminoácidos repulsivos entre os 31 resíduos do BIRD. O resíduo com menor energia repulsiva é o D64 (com energia de 10,78 kcal/mol), enquanto que os resíduos mais repulsivos são o D42 (59,39 kcal/mol) e o D234 (59,33 kcal/mol).

Outro resultado importante que é feito a partir das informações do painel gráfico BIRD, é a análise da distribuição espacial dos aminoácidos que exibem contribuição relevante para as interações com o fármaco, isto é, baseando-se no perfil energético gerado no BIRD, se faz necessário analisar a disposição atômica dos aminoácidos em relação às diferentes regiões do fármaco, assim como os tipos de interações intermoleculares entre os grupos farmacofóricos do ligante e os aminoácidos estudados. Neste propósito, a estrutura atômica do cristal 1ZID com os hidrogênios otimizados foi analisada, a fim de obter-se a visualização das distâncias dos principais aminoácidos em torno das seis regiões do INADH, a fim de analisar os tipos de interações entre os átomos do aminoácido de interesse e o fármaco. Para a seguinte análise, foi definida a energia de corte de ± 20 kcal/mol como sendo o critério para se considerar os aminoácidos mais importantes de cada região.

Na figura 3.13 são mostradas as distâncias entre os átomos dos principais aminoácidos da região i. Os aminoácidos K118 (com energia de -55,35 kcal/mol) e F41 (com energia de -21,03 kcal/mol) possuem energia atrativa, sendo que o F41 apresenta uma interação energética menos atrativa do que o K118, fato que se pode ser explicado levando-se em consideração a polaridade das cadeias laterais destes aminoácidos, onde o K118 apresenta

um radical carregado positivamente, enquanto que o F41 possui radical eletricamente neutro. Deste modo, a partir da análise dos átomos explícitos na figura 3.13, é possível diferenciar os tipos de forças envolvidas nas interações energéticas. No presente caso, um dos átomos de hidrogênio (ligado a um carbono) da cadeia lateral do K118 interage com um dos hidrogênios do NH₂ da adenina a uma distância de 5,33 Å, caracterizando uma interação do tipo de van der Waals. Por outro lado, a menor distância de interação entre o F41 e o fármaco, a qual mede 2,78 Å, se dá entre um átomo de hidrogênio, ligado a um carbono da cadeia lateral deste aminoácido, e o nitrogênio na posição 3A do INADH. O tipo de força exibida na interação do F41 com a adenina do INADH, também é do tipo de van der Waals.

Figura 3.13: Distâncias interatômicas entre os principais aminoácidos da região i, os quais possuem energia, de repulsão ou de atração, superior ao módulo de ± 20 kcal/mol. As distâncias exibidas entre os átomos interagentes são dadas em angstroms.



Fonte: Autora, 2012

A figura 3.14 mostra os sete principais aminoácidos da região ii, e as menores distâncias entre eles e a região ii do INADH. Na figura da esquerda são mostrados os aminoácidos D42 (59,39 kcal/mol), R43 (-50,75 kcal/mol) e I15 (-22,27 kcal/mol), enquanto que na

figura da direita são exibidos os aminoácidos I16 (-22,13 kcal/mol), S20 (-40,85 kcal/mol), G14 (-23,00 kcal/mol) e I95 (-22,07 kcal/mol). A figura do lado esquerdo mostra que o I15 interage com a hidroxila na posição O3B da ribose da adenina através de forças de van der Waals, e a uma distância de 3,2 Å, além de interagir com a outra hidroxila na posição O2B através da interação de ligações de hidrogênio mediadas por uma molécula de água. Já o aminoácido polar D42, que apresenta alta energia de repulsão, interage com a hidroxila na posição O2B do INADH através de forças eletrostáticas, com uma distância de 5,2 Å. Já na figura do lado direito, o S20 destaca-se por formar duas pontes de hidrogênio, uma com o aminoácido I16 e outra com a hidroxila na posição O3B da ribose. O I95 (com distância de 2,27 Å) e o I16 (com distância 2,02 Å) interagem com a região ii através de forças de van der Waals e o G14 forma uma ligação de hidrogênio (de 1,58 Å) com a hidroxila na posição O3B do INADH.

Figura 3.14: Menores distâncias entre os principais aminoácidos da região ii do INADH. A figura da direita mostra 3 dos 7 principais aminoácidos da região ii. Já na figura da esquerda, são exibidos 4 dos 7 principais aminoácidos desta região. As distâncias são dadas em angstroms.

Fonte: Autora, 2012

A região iii do INADH, a qual é formada por um pirofosfato destaca-se por suscetível à formação de ligações de hidrogênio. Deste modo, a figura 3.15 exhibe algumas ligações de hidrogênio formadas na região do pirofosfato, assim como mínimas distâncias entre tal região e os principais aminoácidos da mesma. No entanto, assim como em algumas figuras anteriores, a figura abaixo encontra-se dividida em duas, onde a figura da esquerda exhibe os aminoácidos G14, D18 e I21, e a figura da direita exhibe os I16, S20 e T196. A menor distância entre o G14 e a região iii é de 4,33 Å, e a interação entre um de seus hidrogênio (ligado a um átomo de carbono) e um dos hidrogênios ligados ao carbono 5D do INADH deve-se principalmente a forças de van der Waals. Porém, o G14 também participa na formação de uma ligação de hidrogênio, intermediada por uma molécula de água, com oxigênio na posição O2N do pirofosfato. O I21 interage com o O2N através de

uma ligação de hidrogênio com uma distância de 1,9 Å. Por sua vez, o aminoácido D18 exibe uma distância de 7,67 Å do O2A, com o qual interage através de forças eletrostáticas, conferindo a este aminoácido uma energia bastante repulsiva, em torno de 54,74 kcal/mol. O aminoácido I16 interage com a região iii por meio de forças de van der Waals (interage com o O2A a uma distância de 2,79 Å) e com o aminoácido S20 através uma ligação de hidrogênio com 2,2 Å de distância. Já o S20 forma não apenas uma ligação de hidrogênio com o I16, mas também forma uma ligação de hidrogênio com o O2A do INADH a uma distância de 1,81 Å. Apesar do T196 possuir cadeia lateral polar neutra, o que favorece ligações de hidrogênio, a menor distância (em torno de 2,35 Å) exibida entre tal aminoácido e a região iii do INADH se deve a uma interação de van der Waals, entre um dos seus hidrogênios, ligado a um carbono, e o O1N do fármaco.

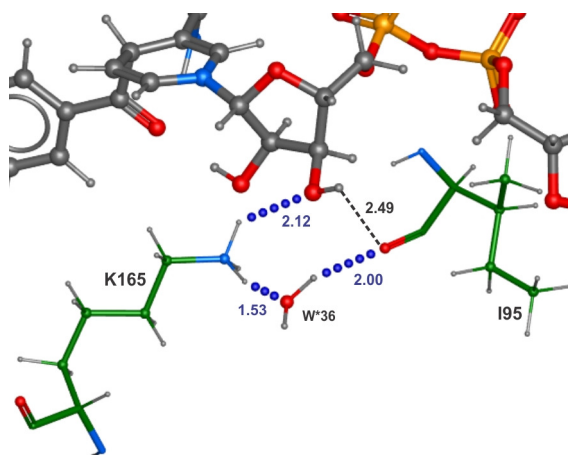
Os aminoácidos da região iv com energia maior que a de corte, em torno de ± 20 kcal/mol, estão dispostos na figura 3.16 juntamente com suas respectivas mínimas distâncias. O aminoácido K165, que possui a maior energia de atração (-101,97 kcal/mol) de todos os aminoácidos estudados, interage com O3D do INADH através de uma ligação de hidrogênio com distância de 2,12 Å, além de interagir com o aminoácido I95 através de duas ligações de hidrogênio intermediadas por uma molécula de água. O I95, além de formar ponte com uma molécula de água, que também interage com o K165 via ligação de hidrogênio, está a uma distância de 2,49 Å do hidrogênio da hidroxila na posição O3D do INADH, sendo tal interação caracterizada por forças de van der Waals.

Figura 3.15: A presente figura mostra os aminoácidos mais importantes da região iii, e as mínimas distâncias entre tais aminoácidos e esta região do INADH. A figura do lado esquerdo mostra 3 aminoácidos (G14, I21 e D18) dos 6 principais da região do pirofosfato. Os outros 3 aminoácidos (I16, S20 e T196) são exibidos na figura do lado direito. Esta região destaca-se pelas ligações de hidrogênio formadas entre os aminoácidos (I21 e S20), e com uma molécula de água acoplada ao aminoácido G14. As distâncias exibidas são dadas em angstroms.

Fonte: Autora, 2012

A região v, como já dito anteriormente, se destaca por ter a maior quantidade de aminoácidos, dentre os que tiveram suas energias calculadas. A figura da esquerda possui 4 aminoácidos, dos quais o E169, D150 e E219 são polares ácidos e possuem altas energias

Figura 3.16: A presente figura mostra os aminoácidos mais energéticos e suas respectivas mínimas distâncias da região iv do fármaco. O resíduo mais atrativo, o K165, interage com a hidroxila na posição O3D do INADH, através de uma ligação de hidrogênio. O I95 também interage com a hidroxila O7N, porém através de uma interação de van der Waals. A figura também mostra uma molécula de água entre o K165 e o I95, e as duas ligações de hidrogênio formadas entre a água e estes dois resíduos.



Fonte: Autora, 2012

de repulsão. O D150 interage através de forças de van der Waals com o hidrogênio do carbono na posição 5N do INADH, a uma distância de 5.28 Å. O E169 forma uma ligação de hidrogênio com o K165, além de interagir com o hidrogênio do carbono 6N a uma distância de 8,46 Å, através de forças eletrostáticas, visto que nesta distância, o grupo ácido carboxílico de sua cadeia lateral interage com energia fortemente repulsiva (44,03 kcal/mol). O E219 interage com o grupo amina na posição 7N do INADH, por meio de duas moléculas de água que se encontram entre o aminoácido e o fármaco, formando três ligações de hidrogênio que intermediam a interação deste aminoácido com o INADH. No entanto, apesar das ligações de hidrogênio intermediadas pelas moléculas de água, a uma distância de 6,25 Å, a carboxila do E219 interage com um dos hidrogênios do N7N através de uma força eletrostática de repulsão, que confere a este aminoácido uma energia de repulsiva de 43,19 kcal/mol. O único aminoácido polar básico que aparece na figura do lado esquerdo é o K165, que também interage com a região v, e a uma distância de 3.51 Å interage com o hidrogênio do carbono C6N através de forças de van der Waals. Já na

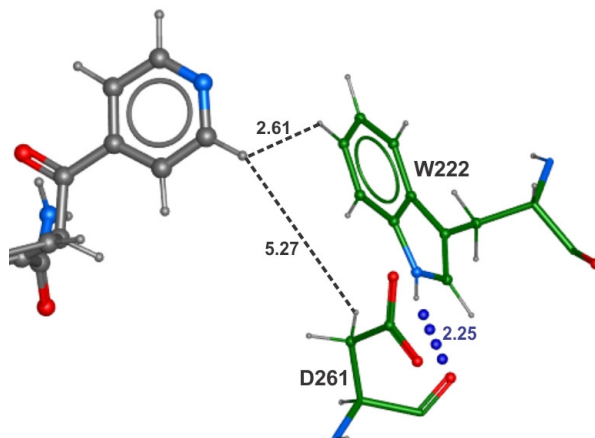
figura do lado direito, são mostrados 2 aminoácidos básicos (R195 e K233) e 2 aminoácidos ácidos (D234 e D148). o R195 e o K233 interagem mutuamente com o oxigênio na posição 7N do fármaco, com distâncias de 4,99 Å e 7,88 Å respectivamente. A interação entre um nitrogênio da cadeia peptídica do R195 e o O7N do INADH indica que tal interação é intermediada por forças eletrostáticas de atração entre os átomos interagentes, visto que este aminoácido apresenta energia de atração em torno de -67,31 kcal/mol. O K233 está a uma distância de 7,88 Å do oxigênio 7N do INADH, e apesar de a energia deste aminoácido ser atrativa (-52,11 kcal/mol), a interação interatômica ocorre com um hidrogênio da ligação peptídica do aminoácido, e sua cadeia lateral encontra-se exatamente em posição oposta ao O7N do ligante, o que pode indicar que esta interação é intermediada por forças de van der Waals. Quanto às interações entre os resíduos D234 e D148, com distâncias em relação ao fármaco de 8,64 Å e 2,65 Å, respectivamente, a interação entre D234 é proporcionada por forças estéricas de repulsão, visto que sua cadeia lateral posiciona-se contrariamente ao fármaco, caracterizando assim uma alta energia repulsiva de 59,33 kcal/mol, que é a segunda maior energia de repulsão. Do mesmo modo, o D148 possui uma alta energia de repulsão (49,33 kcal/mol) provocada pela interação estérica entre o oxigênio de sua cadeia peptídica e o hidrogênio ligado ao nitrogênio da posição 1N do INADH, o que pode ser identificado devido ao posicionamento de sua cadeia lateral, que encontra-se do lado oposto da interação de mínima distância com o fármaco.

A figura 3.18 mostra os aminoácidos mais energéticos da região vi (grupo acyl isonicotínico derivado do INH) e suas respectivas mínimas distâncias em relação a esta região do fármaco. Neste caso, somente os aminoácidos D261 (com energia de 43,90 kcal/mol) e W222 (com energia de -27,54 kcal/mol) apresentaram energias maiores que a energia de corte. O D261, que possui energia repulsiva, interage com o hidrogênio do carbono na posição 6Z do grupo acyl isonicotínico a uma distância de 5,27 Å, através de forças estéricas causadas pela cavidade hidrofóbica formada pelos aminoácidos apolares que encontram-se próximos a esta região do fármaco. Já o W222, também interage com o hidrogênio da C6Z, porém a interação é do tipo de van der Waals e a distância entre os átomos interagentes é de 2,61 Å.

Figura 3.17: As figuras abaixo mostram os aminoácidos com energia maior que o módulo de ± 20 kcal/mol, e suas respectivas mínimas distâncias da região v do INADH. A figura do lado esquerdo mostra 4 aminoácidos (K165, E169, D150 e E219), onde os aminoácidos D150, E169 e E219 possuem energias altamente repulsivas, sendo que os dois últimos interagem com a região v por meio de forças eletrostáticas, onde o E219 participa da formação de três ligações de hidrogênio entre duas moléculas de água que se encontram entre o fármaco e tal aminoácido. Por outro lado, o D150 interage com o fármaco por meio de forças estéricas de repulsão. Já o lado direito mostra 2 aminoácido altamente repulsivos (D234 e D148), que interagem através de forças estéricas, e 2 resíduos altamente atrativos (R195 e K233), dos quais o K233 interage com o fármaco por meio de forças eletrostáticas e o R195 interage com a região v do INADH através de forças de van der Waals.

Fonte: Autora, 2012

Figura 3.18: Aminoácidos mais importantes da região vi, que representa o grupo acyl isonicotínico derivado da INH. O aminoácido W222 (-27,54 kcal/mol) interage através de uma interação de van der Waals, enquanto que o resíduo D261 (43,90 kcal/mol) interage através de forças eletrostáticas de repulsão.



Fonte: Autora, 2012

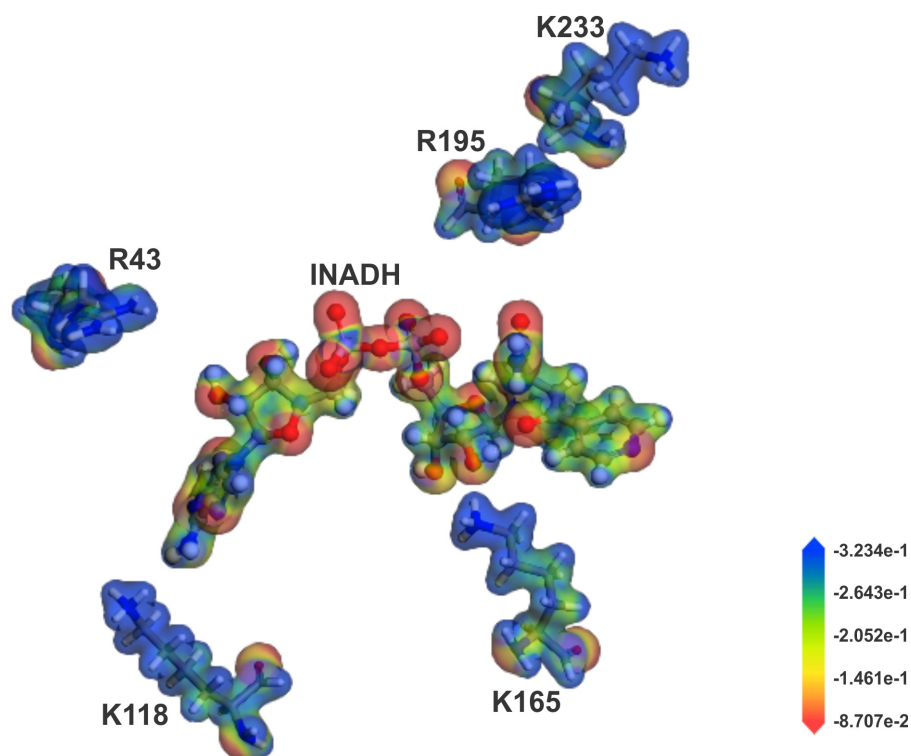
As isosuperfícies do potencial eletrostático em torno do INADH e dos aminoácidos mais atrativos e dos mais repulsivos, mostrados na figura 3.19 e 3.20, respectivamente, foram calculadas via método DFT, com aproximação LDA e conjunto de base DNP. A partir da densidade eletrônica total projetada dentro destas superfícies, foi possível

obter as densidades de carga, e conseqüentemente a eletronegatividade, do fármaco e dos resíduos considerados. As regiões vermelhas indicam densidade de carga negativa, e as região em azul significam densidade de carga positiva.

Na figura 3.19 estão os aminoácidos com as maiores energia atrativas. A sobreposição da isosuperfície do potencial eletrostático com a densidade eletrônica total revelou uma densidade de carga negativa principalmente no pirofosfato (região iii) e, com menor intensidade, nas hidroxilas. Por outro lado, os aminoácidos possuem maior densidade de carga positiva, o que é esperado visto que tais aminoácidos (R43, K118, K165, R195 e K233) possuem cadeias laterais carregadas positivamente. O K165, que é o aminoácido atrativo mais importante, encontra-se próximo da hidroxila na posição O3D da região iv do INADH, a qual possui densidade de carga negativa, gerando portanto uma forte interação atrativa, indicando assim que a energia deste resíduo possui uma significativa contribuição eletrostática.

A figura 3.20 mostra os aminoácidos mais repulsivos, dos quais, 2 são ácidos glutâmicos (E219 e E169) e 6 são ácidos aspárticos (D234, D18, D42, D148, D150 e D261). A isosuperfície do potencial eletrostático acoplado a densidade eletrônica total, mostra que as acadeias laterais destes aminoácidos possuem alta densidade de carga, o que é condizente com o esperado, pois todos os aminoácidos repulsivos considerados para o cálculo do potencial eletrostático, possuem o grupo carboxila em sua cadeia lateral. Dentre os aminoácidos repulsivos, o D42 (com energia de 59,39 kcal/mol) e o D234 (com energia de 59,33 kcal/mol) se destacam como sendo os mais importantes, e como é mostrado na figura 3.20 a carboxila do D42 encontra-se próxima à hidroxila na posição O2B do ligante, que é uma região igualmente com densidade de carga negativa, fato que indica a forte repulsão de tal aminoácido. Já no caso do D234, sua cadeia lateral está posicionada em uma direção oposta oposta à região v do INADH, fazendo que a ligação peptídica (que possui densidade de carga negativa) seja a região mais próxima do O7N do INADH, que também possui densidade de carga negativa. Através da isosuperfície da figura, nota-se que os dois ácidos glutâmicos têm suas cadeias laterais próximas à regiões com densidade de carga positiva, mostrando que a interação destes aminoácidos possui forte compo-

Figura 3.19: Isosuperfície de potencial acoplada à densidade eletrônica total, do INADH e dos aminoácidos mais atrativos, calculada através do método DFT, com aproximação LDA e conjunto de base DNP. As regiões vermelhas indicam densidade de carga negativa, e as regiões azul indicam densidade de carga positiva.



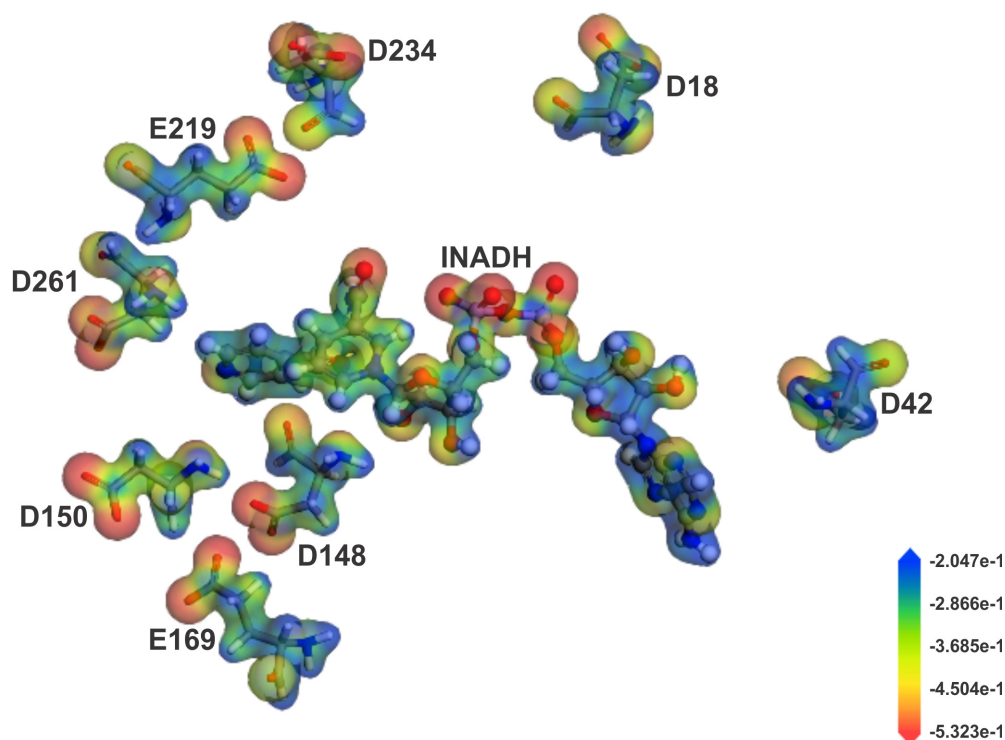
Fonte: Autora, 2012

nente eletrostática. Já os ácidos aspárticos, geralmente têm suas cadeias laterais voltadas para longe das regiões eletropositivas do INADH, o que mostra o caráter repulsivo destes aminoácidos.

3.3 Conclusão

Partindo de dados cristalográficos de difração de raios-x da estrutura da proteína inhA inibida pelo ligante INADH, foi realizado o estudo da interação deste composto bioativo com o sítio de ligação e regiões vizinhas da proteína alvo. A , foi obtida obtido através de difração de raios-x com resolução máxima de 2.7 Å. Através da estrutura do cristal (com

Figura 3.20: Isosuperfície de potencial acoplada à densidade eletrônica total, do INADH e dos aminoácidos mais repulsivos, calculada através do método DFT, com aproximação LDA e conjunto de base DNP. As regiões vermelhas indicam densidade de carga negativa, e as regiões azul indicam densidade de carga positiva.



Fonte: Autora, 2012

código PDB 1ZID) da proteína inhA complexada com o aduto INADH, foram selecionados o ligante e todos os resíduos em um raio de 20 Å, onde os átomos de carbono, nitrogênio, oxigênio e fósforo foram fixados, enquanto que os átomos de hidrogênio passaram por uma otimização geométrica utilizando-se o campo de força CVFF. Então, foi considerada uma região de interesse (com 45 aminoácidos) na proteína, para o cálculo da energia de interação com o fármaco. Sendo assim, além dos 23 aminoácidos do sítio ativo definido no cristal 1ZID, foram estudados mais 22 resíduos, os quais ou estavam localizados em um raio de 6 Å em relação aos átomos do INADH, ou possuíam cadeias laterais carregadas. Desta forma, prosseguiu-se com a obtenção da energia de interação através do aproximação MFCC, onde a energia da interação de cada um dos 45 aminoácidos considerados com o

fármaco, foi calculada via método quântico DFT, com aproximação LDA, base numérica DNP, e correção OBS.

Através das energias obtidas via método DFT, implementado na aproximação MFCC, foi plotado o gráfico BIRD, o qual apresentou o perfil energético da interação do INADH com os 31 resíduos mais importantes (aminoácidos com energia maior que o módulo de ± 8 kcal/mol) do sítio de ligação da inhA. Sendo assim, dentre os 31 aminoácidos mostrados no BIRD, apenas 9 exibiram energia de interação repulsiva, enquanto que 23 aminoácidos demonstraram energia atrativa. O aminoácido mais atrativo foi o K165 com energia de -101,97 kcal/mol, que interage com a região com a hidroxila na posição 3D da ribose ligada à nicotinamida do INADH. Já os aminoácidos mais repulsivos são o D42 (59,49 kcal/mol) e o D234 (59,33 kcal/mol), sendo que o primeiro interage com o carbono na posição 2B da ribose ligada à adenina, e o segundo interage com o oxigênio 7N da adenina. Outra análise feita a partir das energias do gráfico BIRD, foi a afinidade de cada uma das regiões do fármaco com os resíduos, de modo que os aminoácidos mais energéticos de cada região foram analisados de acordo as interações referentes às mínimas distâncias. Neste caso as regiões do INADH que apresentaram maior afinidade com a inhA, isto é, que exibiram interação com os resíduos mais atrativos (aminoácidos com energias maiores que 20kcal/mol) do sítio de ligação, foram as seguintes regiões: ribose da adenina, cujo aminoácido mais atrativo é o R43 (-50,75 kcal/mol); pirofosfato, que interage mais fortemente com o S20 (-40,85 kcal/mol) e o I21 (-33,37 kcal/mol); nicotinamida, que apesar de interagir com diversos aminoácidos repulsivos, possui interação com o R195 (-67,31 kcal/mol), que é o segundo aminoácido mais atrativo, e com o K233 (-52,11 kcal/mol). A região da ribose da nicotinamida também possui grande afinidade com a proteína, visto que possui a interação com o aminoácido mais repulsivo, o K165 (-101,97 kcal/mol). Por outro lado, as regiões que interagiram com os aminoácidos mais repulsivos foram: a região da nicotinamida, que interage com 5 aminoácidos altamente repulsivos, sendo que o mais repulsivo é o D234 (59,33 kcal/mol); a região do grupo acyl isonicotínico derivado da INH, que interage com o D261 (43,90 kcal/mol); a região do pirofosfato, que embora possua muitas interações atrativas, interage com o D18 (54,74 kcal/mol); a região da ribose da

adenina, que mesmo interagindo com 5 aminoácidos atrativos, interage com o aminoácido mais repulsivo (dentre os 31 mais importantes), o D42 (59,39 kcal/mol).

Outro fator importante notado nos resultados, se deve ao fato de as moléculas de água serem consideradas nos cálculos de energia. Deste modo, por meio da análise das regiões do fármaco e seus aminoácidos mais importantes, foi possível identificar as ligações de hidrogênio ocorrentes nas interações entre o INADH e os resíduos mais importantes do sítio de ligação da inhA. Atribuindo assim, a importância das ligações de hidrogênio no sistema proposto, e destacando a contribuição destes tipos de interação para a energia dos resíduos interagentes com o fármaco. Deste modo, embora muitas das interações entre os resíduos considerados, tenham sido hidrofóbicas (principalmente nas regiões da adenina e do grupo derivado da INH), as regiões do pirofosfato e das riboses (tanto da adenina quanto da nicotinamida) apresentaram ligações de hidrogênio envolvendo moléculas de água presentes no cristal. O K165, por exemplo, que é o resíduo mais atrativo, possui uma interação de ligação de hidrogênio com o ligante, porém uma molécula de água forma, mutuamente, uma ligação de hidrogênio com este resíduo e com o aminoácido vizinho I21.

Para avaliar a contribuição das forças eletrostáticas nas interações dos resíduos mais atrativos e dos mais repulsivos, com o fármaco, foi calculada a isosuperfície de potencial, que acoplada com a superfície de densidade eletrônica total. Onde, foram identificadas as regiões mais eletronegativas do fármaco e dos resíduos, de modo que a partir da análise destas superfícies, ficou esclarecido que os aminoácidos mais repulsivos possuem baixa eletronegatividade, e ao interagirem com regiões do fármaco que também possuem densidade de cargas negativas, sofrem interações energeticamente repulsivas. Já no caso dos aminoácidos mais atrativos, como o K165, as cadeias laterais destes resíduos, que possuem densidade de cargas positivas, interagirem com as regiões mais eletronegativas do fármaco, gerando assim interações altamente atrativas. Sendo assim, através destes cálculos ficou evidenciada a forte contribuição das interações eletrostáticas entre o INADH e os resíduos mais energéticos (atrativos e repulsivos).

Com base nos resultados descritos acima, é razoável afirmar que, assim como diversos

trabalhos [22; 72; 76–78] têm afirmado, a região do fármaco que possui maior afinidade com o sítio de ligação da inhA, é a região referente ao co-fator NADH. Tais resultados, também mostram que o aminoácido que exibiu maior importância, no que diz respeito à afinidade energética com o fármaco, foi a Lysina na posição 165 da cadeia peptídica, ressaltando que segundo a literatura [18; 76; 79–83] a serina na posição 94 é um importante aminoácido da inhA, visto que ao ser substituído por uma alanina confere resistência à isoniazida. No entanto, de acordo com os estudos realizados nesta dissertação, este aminoácido possui uma fraca interação atrativa com o fármaco. Já os aminoácidos D42 e D234, desempenharam maior interação repulsiva com o fármaco, sendo que . Portanto a utilização do método MFCC viabilizou o estudo quantitativo e qualitativo das interações do INADH com os resíduos do sítio de ligação da inhA, através do uso do método DFT. Desta forma, o uso de métodos quânticos na descrição das energias de interação de moléculas bioativas com sistemas macromoleculares consiste em uma promissora estratégia para o desenvolvimento racional de fármacos.

Capítulo 4

Inibição da diidrofolato redutase pelo isômero acíclico 4R-INADP da Isoniazida

No presente capítulo, é expandido sobre o estudo de outro sistema macromolecular que envolve um novo alvo biomolecular inibido por um dos adutos da isoniazida. Trata-se do estudo da bioquímica quântica do aduto isômero acíclico 4R-INADP da isoniazida, ligado ao sítio ativo da proteína diidrofolato redutase (DHFR), do *Mycobacterium tuberculosis* (MT), codificada como *dfrA*. Assim como abordado anteriormente (ver capítulo 1), o isômero acíclico 4R é derivado da pró-droga isoniazida (INH) e é formado através de uma reação da INH com a co-enzima NADP (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) [30]. Este aduto da INH inibe fortemente a *dfrA* [29; 31], tornando assim a proteína DHFR *dfrA* em um importante alvo enzimático do MT, visto que sua ação biológica está diretamente relacionada ao processo de síntese de ácidos nucleicos em bactérias [32], além de possuir alta sensibilidade a outros antibióticos, tais como trimetoprima [34].

Através da estrutura da *dfrA* co-cristalizada com o isômero acíclico 4R da isoniazida-NADP (4R-INADP), os cálculos mostrados neste capítulo seguiram a mesma metodologia empregada no estudo do sistema do capítulo anterior, que mostra os resultados do estudo

do sistema inhA-INADH. Sendo assim, as interações intermoleculares da proteína (*dfrA*) e do ligante (4R-INADP) serão estudadas mediante a análise do perfil energético dos aminoácidos mais importantes do sítio de ligação da enzima *dfrA*, onde a energia dos aminoácidos serão calculadas através do método quântico DFT (Density Functional Theory) em uma aproximação chamada MFCC (Molecular Fractionation with Conjugate Caps), e o perfil energético das interações do fármaco com a proteína é dado através do painel gráfico BIRD (Binding site, Interaction energy an Residues Domain). As seções a seguir mostram os detalhes computacionais e os resultados do estudo do sistema *dfrA*-(4R-NADH).

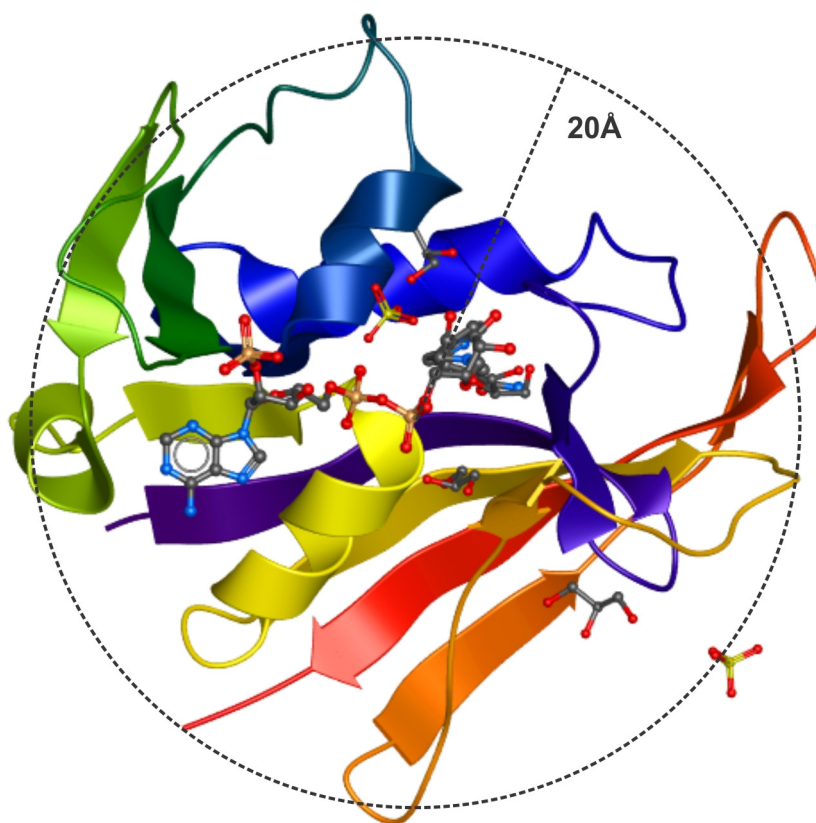
4.1 Detalhes da Metodologia

Partindo da estrutura cristalizada da proteína *dfrA* complexada com o 4R-INADP (isômero acíclico da INH), dada pelo cristal com pdb 2CIG [31], a qual é mostrada na figura 4.1, foram selecionados todos os resíduos em um raio de 20 Å para a otimização dos átomos de hidrogênio. A otimização foi realizada utilizando-se campo de força CVFF (Consistent Valence Forcefield), conforme descrito no capítulo 2. Os cálculos de otimização dos hidrogênios foram realizados através do módulo FORCITE do programa computacional Accelrys Materials Studio 5.0., ressaltando-se que somente os hidrogênios foram otimizados, enquanto que todos os átomos pesados (carbono, nitrogênio, oxigênio e fósforo) foram fixados, preservando assim as coordenadas atômicas dadas pela estrutura do cristal, o qual foi obtido via método experimental de difração de raios-x com resolução máxima de 1,9 Å.

A figura 4.1 mostra a estrutura atômica da proteína *dfrA* fortemente inibida pelo aduto 4R-INADP, fornecida pela coordenadas atômicas dadas pelo cristal 2CIG, no qual o fármaco 4R-INADP encontra-se ligado no sítio ativo da proteína *dfrA*. Nota-se que além do ligante, são mostradas as moléculas co-fatores da proteína DHFR, como o glicerol e os íons de sulfato, onde os átomos de carbono estão na cor cinza e os átomos de oxigênio na cor vermelha. Da mesma forma, no ligante, os átomos de carbono estão na cor cinza, os átomos de oxigênio encontram-se na cor vermelha, os nitrogênios na cor azul e os átomos

de fósforo na cor laranja. As moléculas do ligante e dos substratos estão representadas no formato *ball and sticks* e a proteína está representada no formato de fitas. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para uma melhor visualização das moléculas, tanto do ligante como dos cofatores da enzima.

Figura 4.1: Estrutura do cristal 2CIG da proteína *dfrA* co-cristalizada com o fármaco 4R-INADP, obtido através de difração de raios-x e com resolução de 1.9 Å. Foram selecionados os resíduos no raio de 20 Å em relação ao centróide do 4R-INADP para a otimização dos hidrogênios. As estruturas do ligante e das moléculas glicerol e ânions de sulfato (substratos da enzima DHFR), estão representadas no formato *ball and sticks* e a proteína está representada no formato de fitas. Os átomos de hidrogênio foram ocultados para a melhor visualização dos átomos pesados do ligante.

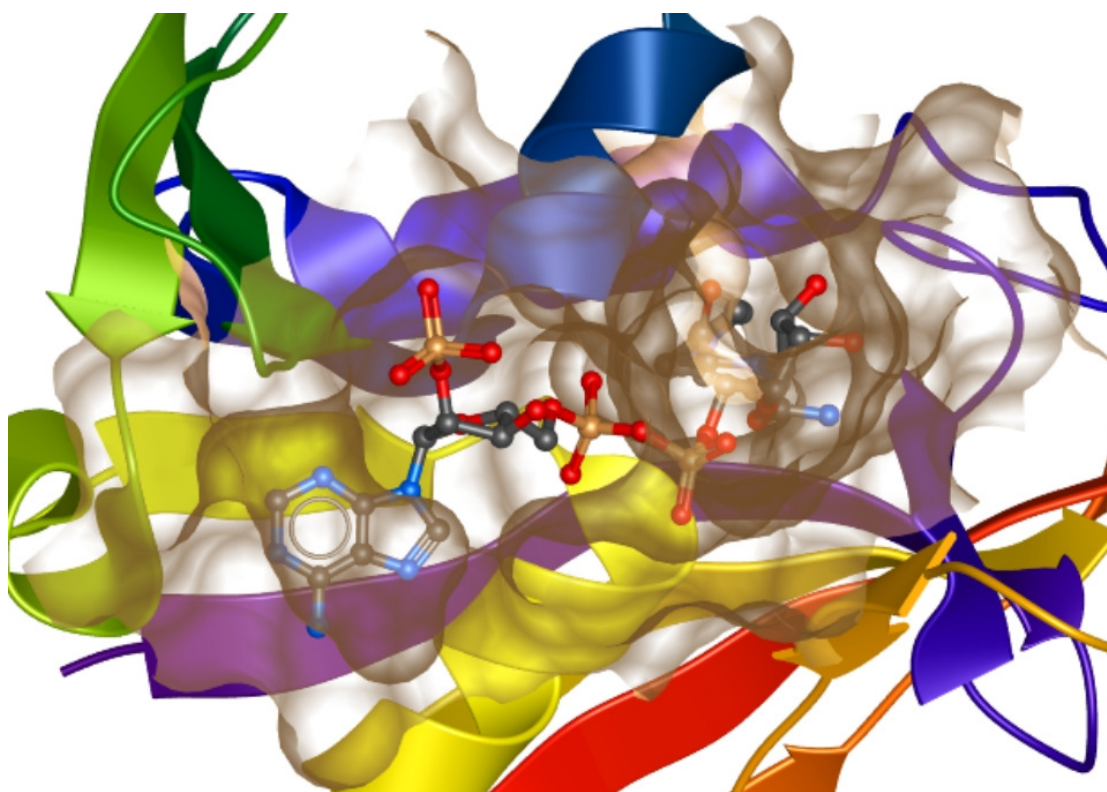


Fonte: Autora, 2012

Em seguida aos cálculos de otimização dos hidrogênios, foi definida a região do sítio de ligação a ser estudada. Neste caso, a região de interesse considerada para os cálculos quânticos corresponde ao sítio ativo, que foi fornecido pelos dados cristalográficos do arquivo 2CIG, e aos aminoácidos em um raio de 6 Å em torno do ligante. Portanto, no

total foram selecionados 47 aminoácidos na região considerada como o sítio de ligação, sendo 35 do sítio ativo fornecido pelo cristal, e 12 selecionados em regiões vizinhas ao sítio ativo, isto é, em um raio de 6 Å em relação aos átomos do 4R-INADP. Através do método aproximativo MFCC, a energia de cada um dos 47 aminoácidos do sítio de ligação foi calculada via método semi-empírico DFT. Na figura 4.2 a superfície em torno do 4R-INADP representa a região de interesse, a qual possui 47 aminoácidos para os quais foram realizados os cálculos da energia de interação.

Figura 4.2: A superfície que envolve o fármaco 4R-INADP representa o sítio de ligação da proteína, onde estão incluídos 47 aminoácidos para os quais foi calculada a energia de interação via método DFT, através da aproximação MFCC.

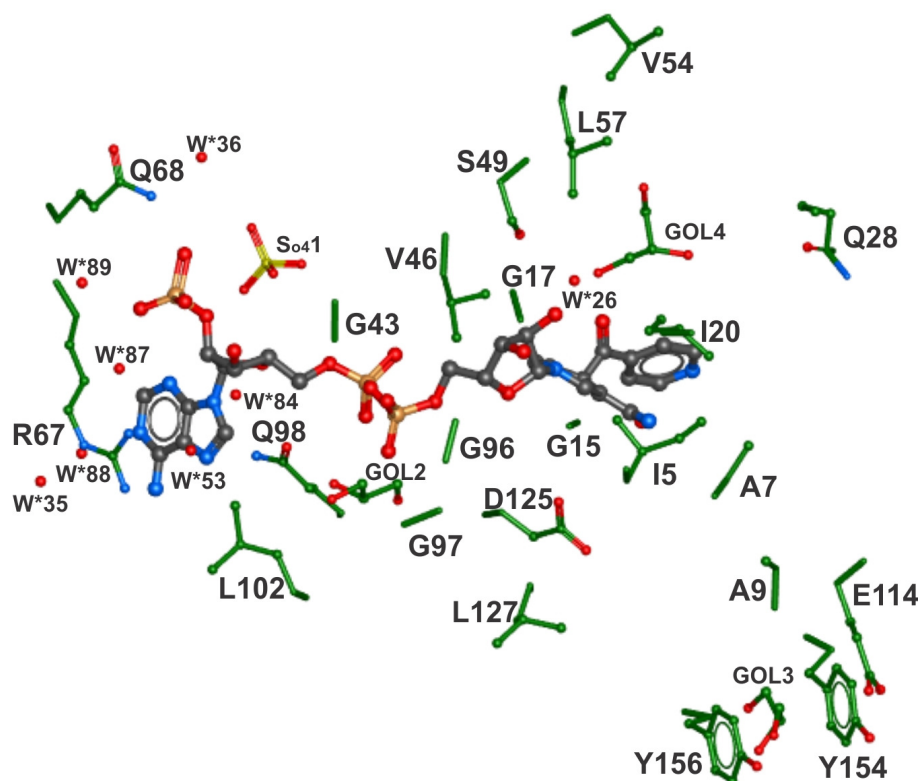


Fonte: Autora, 2012

Os resíduos do sítio de ligação, ou seja, os aminoácidos 47 considerados para os cálculos de energia, são mostrados de forma explícita nas figuras 4.3 e 4.4. Além dos aminoácidos de interesse, também são expostas tanto as moléculas de água, quanto as moléculas substrato da proteína, que foram consideradas nos cálculos de energia. Tais moléculas, de água e

substrato, foram consideradas como parte do resíduo de interesse do qual estivessem mais próximas, sendo consideradas em todos os cálculos de energia em que tal resíduo estivesse presente. Do total de 47 aminoácidos, 23 resíduos e suas respectivas moléculas de água, são expostos na figura 4.3. Os átomos de carbono dos aminoácidos estão na cor verde, para diferenciar do carbonos do ligante, que estão na cor cinza. Os hidrogênios, assim como as ligações peptídicas, foram omitidos para a melhor visualização das cadeias laterais dos resíduos de interesse.

Figura 4.3: Resíduos para os quais foram realizados os cálculos de energia. Além dos 23 aminoácidos, do total de 47, também foram consideradas as moléculas de água e os substratos presentes na estrutura do cristal 2CIG. Os átomos de hidrogênio, bem como as ligações peptídicas, foram ocultados para uma melhor visualização dos resíduos.



Fonte: Autora, 2012

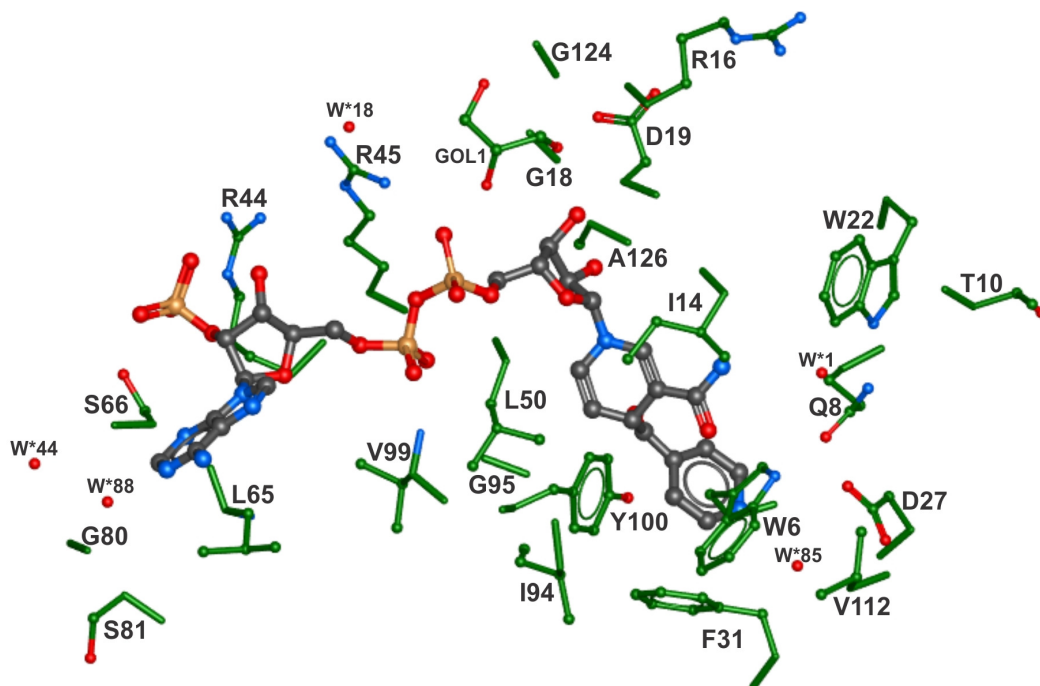
Uma significativa diferença entre o 4R-INADP e o INADH (estudado no capítulo 3) é a presença do grupo químico fosfato (PO_4) na ribose da adenina. Deste modo, pode-se afirmar que tal grupo possui grande potencial de formação de pontes de hidrogênio,

como é visto na figura 4.3, onde a amina da cadeia lateral do aminoácido Q68 forma uma ligação de hidrogênio com o fosfato do 4R-INADP. Também próximo a esta mesma região encontra-se ânion de sulfato SO_4 , que é um tipo de substrato da enzima DHFR, assim como o glicerol (GOL). Do lado esquerdo do ligante, onde encontra-se o grupo adenina, nota-se que o aminoácido mais próximo desta região é o L102. Já o grupo da ribose- PO_4 interage com alguns aminoácidos polares como R67 e Q68. Já a região do pirofosfato interage com o GOL2 e Q98 via ligação de hidrogênio. A região ribose-nicotinamida interage com aminoácidos apolares como I20, G96 e G97, mas também interage com o S49 via ponte de hidrogênio e com o aminoácidos carregado D125. Finalmente, a região derivada da isoniazida (INH) interage com o L57. Nota-se no canto inferior direito do ligante, que existe uma espécie de cavidade formada pelos aminoácidos Y156, Y152, E114 e A9, em torno do co-fator GOL3.

Localizada no lado esquerdo do ligante (figura 4.4), a adenina está envolvida em uma cavidade formada pelos aminoácidos G80, L65, S81 e S66. Sendo que o S66 também interage com a ribose- PO_4 através de ligação de hidrogênio mediada por uma molécula de água. O aminoácido R45, que forma uma ponte de hidrogênio com uma molécula de água, interage tanto com a ribose- PO_4 , quanto com o pirofosfato, região que interage com o V99. A região ribose-nicotinamida interage com o G18, que forma ponte de hidrogênio com o GOL1 e com o ligante simultaneamente, com os aminoácidos carregados D19 e R16, e com outros resíduos como Y100, G95, A126, I14, G124 e L50. Por fim, o grupo 31 derivado do INH encontra-se em uma cavidade formada por alguns aminoácidos hidrofóbicos como W22, V112, W6 e F31, assim como por alguns aminoácidos polares tais como T10, Q8 e D27, o qual forma um ligação de hidrogênio com uma molécula de água.

Sendo estabelecidos os aminoácidos de interesse para o estudo da interação do sítio de ligação com o fármaco, prosseguiu-se com os cálculos de energia através da aproximação MFCC (conforme descrito no capítulo 2), onde a energia de interação entre cada resíduo de interesse e o fármaco foi calculada no pacote computacional DMOL³ (implementado no programa Accelrys Materials Studio 5.0.) através do uso do método semi-empírico DFT, com nível LDA (Local-density approximations), conjunto de bases numéricas DNP

Figura 4.4: Na presente figura são mostrados os outros resíduos que tiveram suas respectivas energias calculadas. Além dos 24 aminoácidos, as moléculas de águas incluídas nos cálculos, e as moléculas do substrato da proteína também são exibidas. Assim como na figura anterior os hidrogênios e as ligações peptídicas são ocultados.



Fonte: Autora, 2012

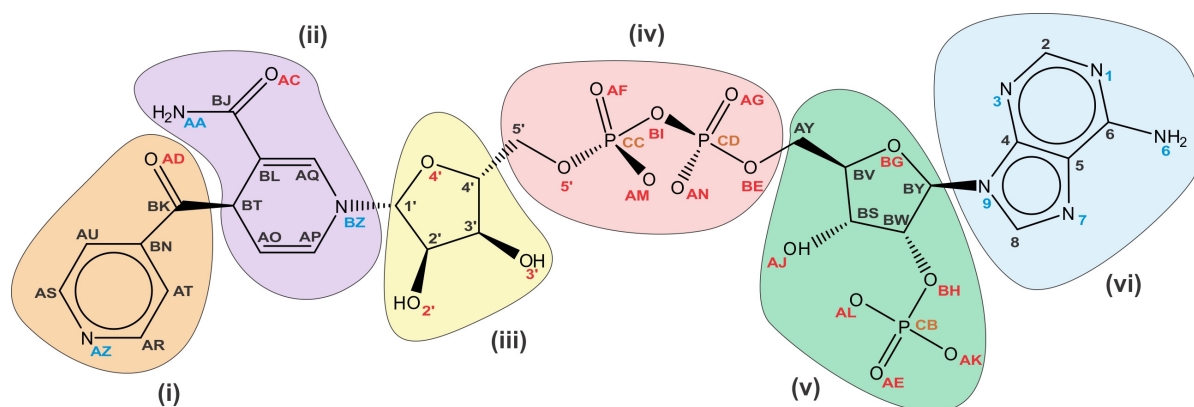
(Double Numeric Polarized) e correção OBS.

4.2 Resultados

Os resultados obtidos dos cálculos de energia, a qual foi calculada via DFT mediante a aproximação MFCC, possibilitaram mapear o perfil energético das interações entre os resíduos do sítio de ligação da proteína *dfrA* e o fármaco 4R-INADP. Através do gráfico BIRD (Binding site, Interaction energy and Residues Domain) são dados os valores da energia de interação dos principais resíduos com o ligante, bem como são descritas as

regiões de interação e as respectivas distâncias entre tais resíduos e o fármaco. Deste modo, é viável conhecer as regiões do fármaco que possuem maior ou menor afinidade com o sítio de ligação da proteína, assim como identificar os resíduos mais importantes, isto é, os aminoácidos mais energéticos e que desempenham significativa contribuição para a ligação do 4R-INADP com a proteína *dfrA*. No entanto, para tal avaliação, a estrutura molecular do fármaco é sistematicamente dividida em diferentes regiões de interação, de modo que a análise do perfil energético das interações dos resíduos da proteína com o fármaco é feita baseando-se em tal divisão. Neste caso, a estrutura do 4R-INADP é dividida em seis regiões de interação (ver figura 4.5), onde a região i destaca o grupo acyl isonicotínico derivado da isoniazida (INH), a região ii representa a nicotinamida, na região iii encontra-se a ribose da nicotinamida, o pirofosfato é representado pela região iv, enquanto que a região v destaca a ribose-PO₄ e a região vi representa a adenina. Ressaltando-se que da região ii à região vi corresponde à co-enzima NADP.

Figura 4.5: Representação do ligante 4R-INADP, isômero acíclico da Isoniazida (INH). A estrutura do INADH foi dividida em seis regiões, onde a região vi destaca o grupo acyl isonicotínico derivado da INH, enquanto que as regiões de ii a vi representam as diferentes partes do cofator NADP. A nomenclatura foi feita de acordo com os dados do cristal 2CIG.



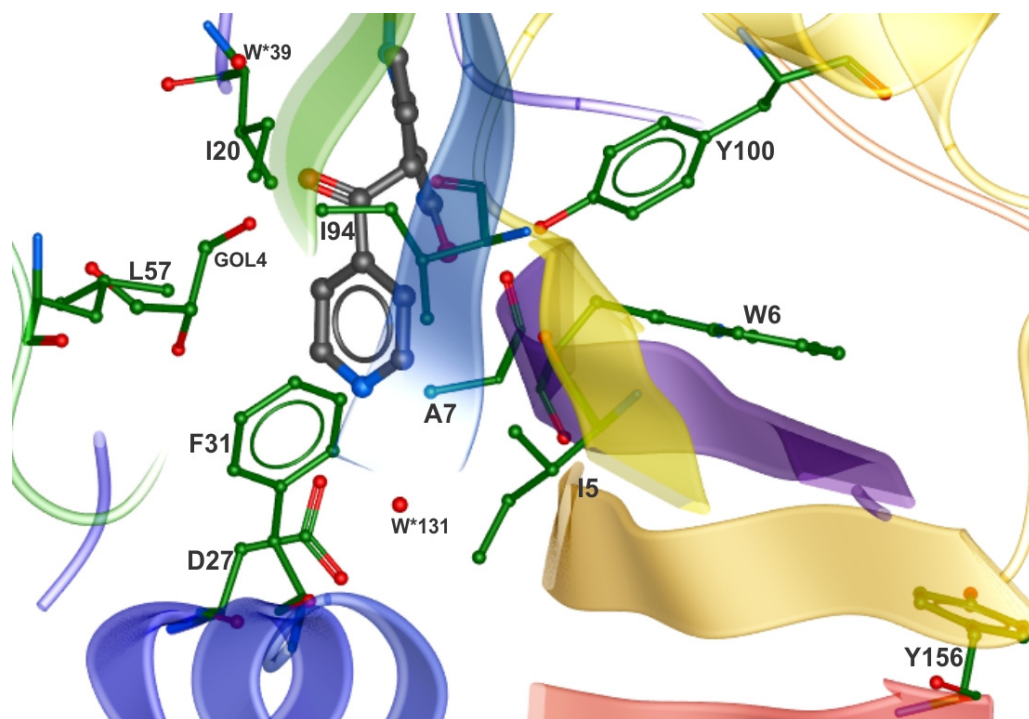
Fonte: Autora, 2012

Partindo da representação dada pela figura 4.5, foram calculadas as mínimas distâncias dos aminoácidos em relação a cada uma das 6 regiões do fármaco. Deste modo, os aminoácidos mais próximos das regiões i, ii, iii, iv, v e vi do 4R-INADP, são mostrados

juntamente com suas respectivas regiões de interação nas figuras de 4.6 a 4.11.

A região i (figura 4.6), representada pelo grupo acyl isonicotínico do INH, apresenta em torno de 13 resíduos ao seu redor, sendo 10 aminoácidos, 2 moléculas de água e 1 molécula (GOL4) do substrato da enzima DHFR. Dentre os aminoácidos, encontram-se 7 aminoácidos apolares (I20, L57, F31, A7, I5, W6 e I94) que formam uma cavidade hidrofóbica em torno do grupo acyl isonicotínico, gerando assim um efeito estérico nesta região. Deste modo, aminoácidos polares, os quais possuem cadeia lateral neutra, como o Y100 e o Y156, encontram-se em uma espécie de segunda camada formada em torno desta região do fármaco. Já o D27, que possui cadeia lateral carregada negativamente, encontra-se mais próximo ao anel purínico da região i.

Figura 4.6: Resíduos mais próximos da região i do 4R-INADP com. A região i é constituída pelo grupo acyl isonicotínico derivado da INH, e os aminoácidos com menores distâncias são os que possuem cadeias laterais apolares, como o F31, o A7, I94, I5 e I20. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização dos resíduos.

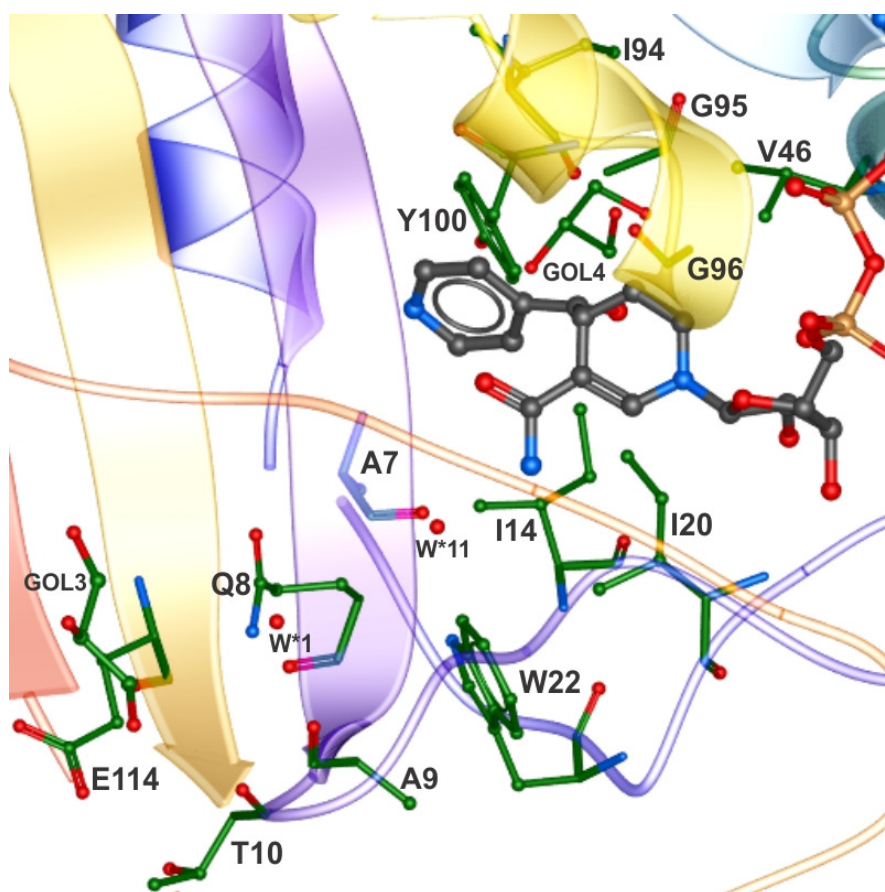


Fonte: Autora, 2012

Dos 17 resíduos encontrados próximos à região ii (figura 4.7), 13 são aminoácidos, 2

são moléculas de água e 2 (GOL3 e GOL4) são substratos da enzima alvo. Da mesma forma que na região i, a presença de aminoácidos apolares (I14, I20, A7, A9, W22, G96, G95, V46 e I94) nesta região formam uma cavidade hidrofóbica em torno da nicotinamida. O efeito estérico gerado pela cavidade cria uma espécie de segunda camada composta pelos aminoácidos polares Q8, T10, Y100 e E114. A localização dos resíduos como o GOL3 e GOL4, assim como a das moléculas de água, inviabilizam as interações de hidrogênio com a nicotinamida, indicando a possibilidade de formação de pontes de hidrogênio somente entre os aminoácidos.

Figura 4.7: Resíduos mais próximos da região ii do 4R-INADP com. A região ii é constituída pela nicotinamida, e os aminoácidos com menores distâncias são os que possuem cadeias laterais apolares, como o I14, I20, A7, A9, W22, G96, G95, V46 e I94. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização dos resíduos.



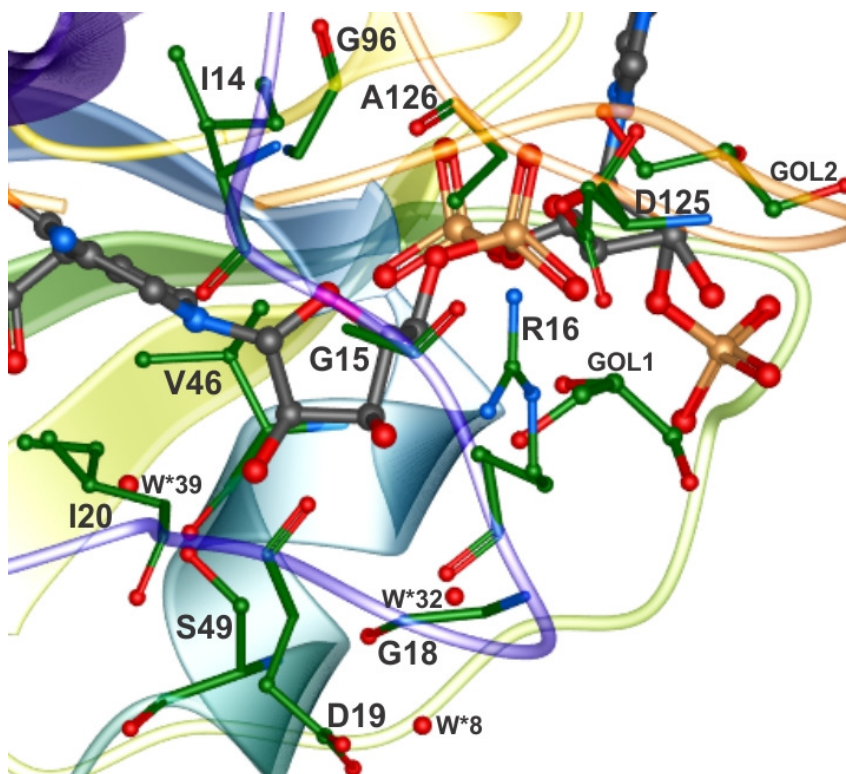
Fonte: Autora, 2012

Na figura 4.8 são mostrados os aminoácidos mais próximos da região iii do fármaco, a qual corresponde ao grupo ribose da nicotinamida. Apesar de apresentar alguns aminoácidos apolares (V46, G15, G18, I20, A126, G96 e I14), os quais posicionam-se em pontos mais distantes das hidroxilas da ribose, esta região também interage com aminoácidos polares tais como R16, D19, S49 e D125, sendo que a maioria destes posicionam-se próximos às hidroxilas da ribose, indicando que há interações de ponte de hidrogênio nesta região do fármaco. Os resíduos GOL1 e GOL2 posicionam-se preferencialmente em torno do aminoácidos polares. Algumas das moléculas de água, que também se encontram próximas a estes aminoácidos, formam pontes de hidrogênio tanto com os aminoácidos, quanto com a ribose da região iii. Uma das formações de ponte de hidrogênio que pode ser claramente vista na figura a seguir, são as ligações de hidrogênio que uma molécula de água (W*39) forma simultaneamente com a hidroxila na posição 2' da ribose do ligante e o aminoácido S49. Outro exemplo de ligação de hidrogênio que é formada nesta região, é a interação do oxigênio da ligação peptídica do D19, com a hidroxila na posição 3' da região iii do fármaco.

O grupo químico pirofosfato, correspondente à região iv do fármaco, encontra-se cercado por 14 resíduos, sendo 9 aminoácidos, 3 moléculas de água e 2 moléculas substrato (GOL1 e GOL2) da proteína. De acordo com a figura com as posições atômicas dadas pelo cristal 2CIG, os aminoácidos hidrofóbicos G96, G97, V46, G46 e V99 encontram-se distribuídos nos pontos mais próximos da região. No entanto, os aminoácidos apolares R45 e Q98 também interagem a curta distância com esta região. O aminoácido A126 forma uma ponte de hidrogênio com o substrato GOL2, que também interage com o pirofosfato através de uma ligação de hidrogênio. A disposição dos aminoácidos R45 e Q98, também sugerem que há formação de ligações de hidrogênio entre estes aminoácidos e a região iv do 4R-INADP. Desta forma, nota-se que esta região é propícia à interações de ponte de hidrogênio devido aos ânions do pirofosfato, o qual é negativamente carregado.

Ao contrário das demais regiões, os aminoácidos mais próximos da região v são, em sua maioria, polares (Q98, S66, R67, Q68, R44 e R45). Os únicos aminoácidos hidrofóbicos (V98 e G43) interagem com esta região à longa distância. Contendo 6 moléculas de água

Figura 4.8: Região iii do INADP e seus respectivos aminoácidos mais próximos. Tal região é composta pela ribose da nicotinamida, que interage tanto com aminoácidos apolares V46, G15, G18, I20, A126, G96 e I14), quanto com aminoácidos polares (R16, D19, S49 e D125), os quais posicionam-se preferencialmente em torno das hidroxilas. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização dos resíduos.

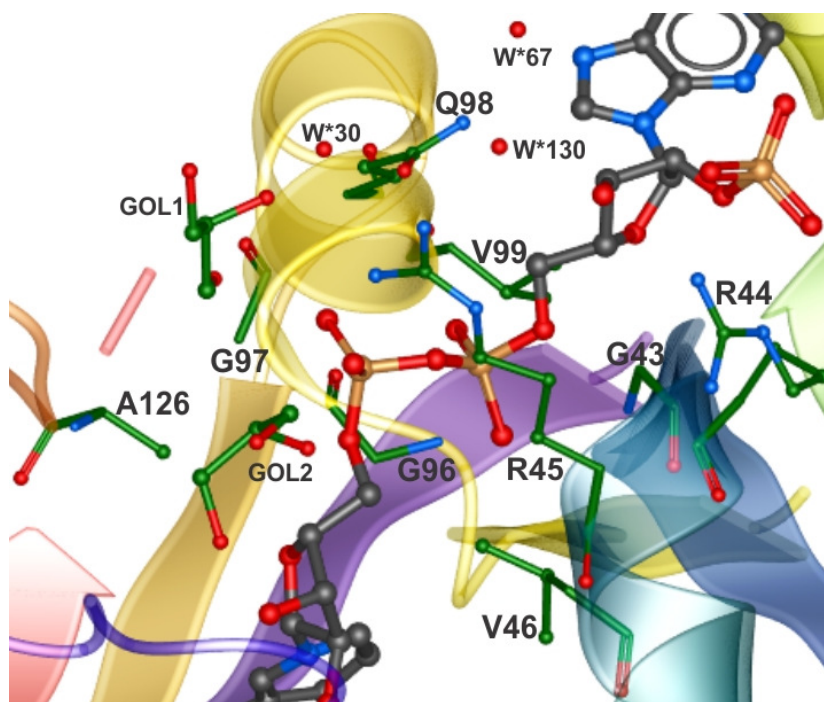


Fonte: Autora, 2012

e 1 molécula de substrato (SO_4) da enzima, a região da ribose- PO_4 , caracteriza-se pelo grande potencial de formar ligações de hidrogênio devido ao seu grupo fosfórico. Na figura 4.10 evidencia-se que o grupo químico PO_4 da ribose está cercada por algumas moléculas de água, e também por aminoácidos polares, como o S66, R44, Q68 e R67. A posição atômica dada pelo cristal indica a formação de pontes de hidrogênio entre o grupo PO_4 e os aminoácidos Q68, S66 e R44. Por outro lado, a hidroxila na posição AJ do ligante também é passível de ligações de hidrogênio. Neste caso, a cadeia lateral do Q98 encontra-se a uma curta distância desta hidroxila, indicando assim a formação de uma ligação de hidrogênio entre tal aminoácido e a ribose da região v do 4R-INADP.

Finalmente, a região vi do fármaco, correspondente ao grupo químico adenina, possui

Figura 4.9: Região iv do INADP com os aminoácidos mais próximos. Tal região é composta pelo pirofosfato, que interage com os aminoácidos hidrofóbicos G96, G97, V46, G46 e V99, e com os aminoácidos polares R45 e Q98 por meio de ligações de hidrogênio. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização dos resíduos.

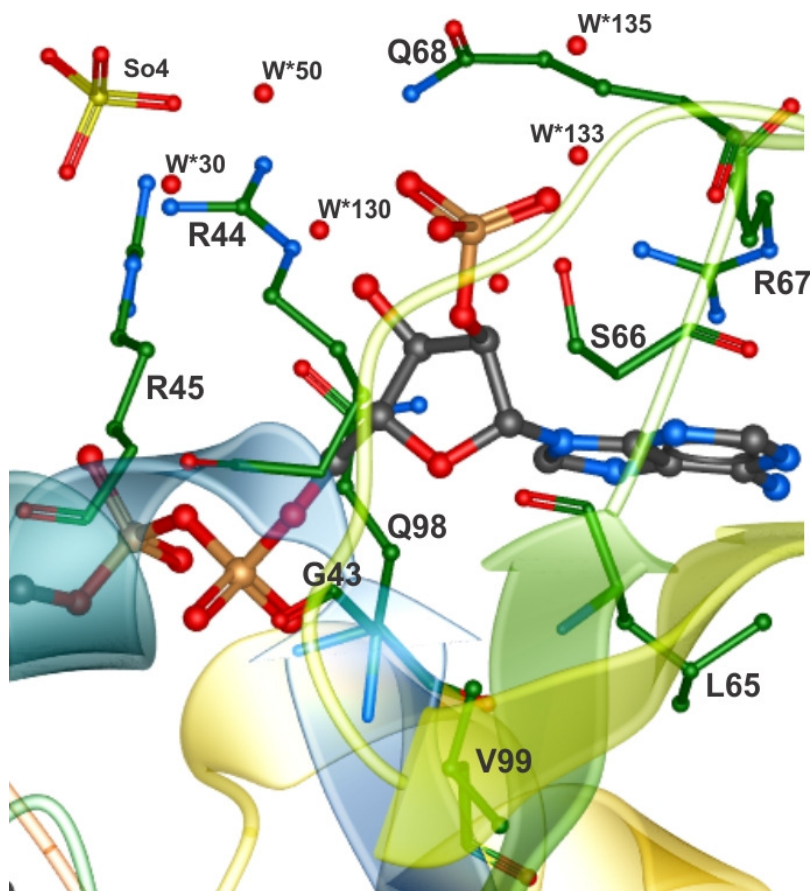


Fonte: Autora, 2012

6 aminoácidos e 7 moléculas de água em suas proximidades. Os aminoácidos polares R67, S81 e S66 interagem com à curta distância com o anel aromático da adenina, enquanto que o Q98, que também possui cadeia lateral polar, interage à longa distância com o anel purínico. O aminoácido apolar L102, encontra-se a uma curta distância do grupo amina ligado ao anel aromático, enquanto que o G80 (apolar) está posicionado de modo que a existência de uma molécula de água entre este aminoácido e o nitrogênio na posição 1 do 4R-INADP, indica que tal molécula de água forma simultaneamente duas ligações de hidrogênio, sendo uma com o fármaco e outra com este aminoácido.

O perfil energético das interações é analisado quantitativamente através dos cálculos de energia obtidos via DFT (com aproximação LDA, base DNP e correção OBS), implementado na aproximação MFCC. Na tabela 4.1 são mostrados todos os resíduos do

Figura 4.10: Aminoácidos mais próximos da ribose- PO_4 (região v) do 4R-INADP. Cercada por aminoácidos polares (Q98, S66, R67, Q68, R44 e R45) e apolares (V98 e G43), assim como por 6 moléculas de água e uma de substrato (SO_4), esta região possui alta capacidade de formar pontes de hidrogênio devido ao grupo fosfórico (PO_4) da ribose. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização dos resíduos.

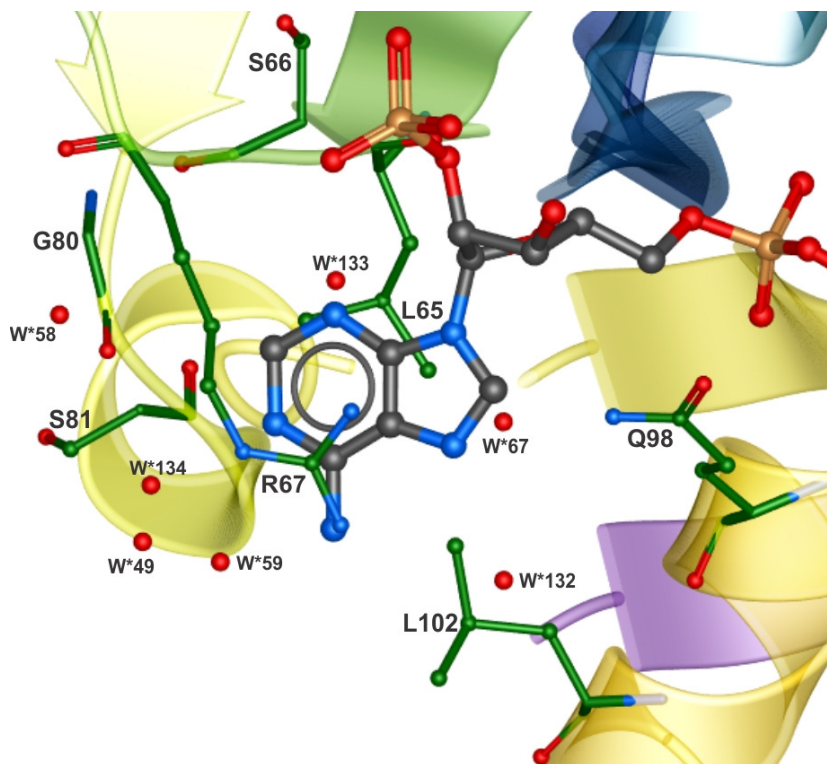


Fonte: Autora, 2012

sítio de ligação que tiveram suas energias calculadas utilizando este método. As menores distâncias entre os átomos interagentes (os átomos do resíduo e do ligante) também são mostradas na tabela.

O painel gráfico BIRD (Binding site, Interaction energy and Residues Domain) foi plotado considerando-se somente os 32 aminoácidos mais importantes do sítio de ligação, sendo estes os que obtiveram energia maior ou igual ao módulo de ± 8 kcal/mol (energia de corte). As barras laterais do lado esquerdo referem-se às energias negativas, que são

Figura 4.11: Região vi do INADP com os aminoácidos mais próximos, que possuem energia maior (em módulo) que ± 8 kcal/mol. Tal região é composta pela ribose da adenina, de quem os aminoácidos mais próximos, tais como o G14, I15, I16 e I95, possuem radicais químicos apolares.



Fonte: Autora, 2012

considerada como sendo as energias de atração, enquanto que as barras do lado direito representam as energias positivas, as quais são ditas como energias de repulsão. A menor distância entre os átomos interagentes do fármaco e de cada aminoácido é colocada na lateral direita do gráfico.

A região do fármaco em que se dá a interação com o aminoácido é mostrada no gráfico BIRD, sendo que os átomos com os quais cada aminoácido interage são indicados posteriormente à região do ligante em que se encontram e os átomos onde estão ligados (átomos entre parenteses). Outra informação encontrada no BIRD é a quantidade de moléculas de águas que fazem ponte de hidrogênio ou com o aminoácido de interesse, ou que mediam pontes de hidrogênio entre o aminoácido e o ligante. Sendo assim, quanto

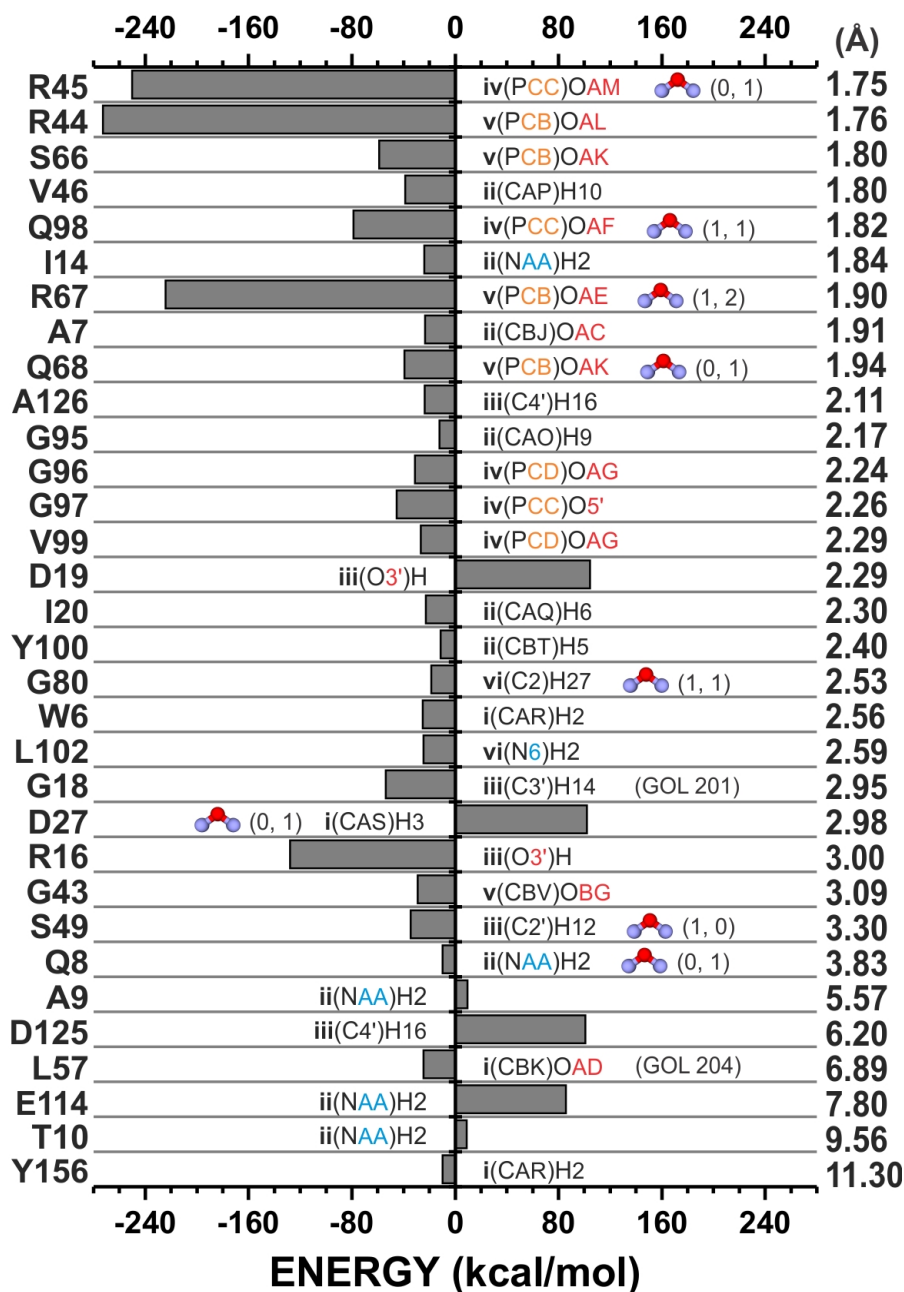
Tabela 4.1: Energias (calculada via DFT, com base DNP e correção OBS) e mínimas distâncias em relação ao ligante, dos 47 aminoácidos que compõem o sítio de ligação considerado no estudo.

Resíduo	E (kcal/mol)	d (Å)	Resíduo	E (kcal/mol)	d (Å)
ILE5	-5,50	2,17	LEU57	-24,48	6,89
TRP6	-25,04	2,56	LEU65	-6,88	2,32
ALA7	-23,22	1,91	SER66	-58,86	1,81
GLN8	-9,91	3,83	ARG67	-224,26	1,91
ALA9	9,47	5,57	GLN68	-39,28	1,94
THR10	8,88	9,56	GLY80	-18,58	2,53
ILE14	-23,82	1,84	SER81	0,91	3,54
GLY15	-7,28	2,32	ILE94	-3,25	2,25
ARG16	-127,80	3,00	GLY95	-12,18	2,17
GLY17	3,11	5,13	GLY96	-31,32	2,24
GLY18	-53,83	2,95	GLY97	-45,22	2,26
ASP19	104,36	2,29	GLN98	-78,70	1,82
ILE20	-22,77	2,31	VAL99	-26,71	2,29
TRP22	-7,31	2,87	TYR100	-11,16	2,40
ASP27	102,10	2,98	LEU102	-24,41	2,59
GLN28	1,30	5,31	VAL112	-4,02	6,41
PHE31	-6,96	2,52	GLU114	85,72	7,80
GLY43	-28,92	3,10	GLY124	7,20	6,49
ARG44	-272,64	1,76	ASP125	100,86	6,20
ARG45	-250,14	1,75	ALA126	-23,62	2,11
VAL46	-38,79	1,81	LEU127	7,19	5,52
SER49	-34,55	3,31	TYR154	-1,96	10,09
LEU50	1,69	5,17	TYR156	-9,90	11,30
VAL54	1,94	8,77	-	-	-

Fonte: Autora, 2012

aos termos dentro dos parênteses (m,n), a letra m indica a quantidade de águas que estão entre o aminoácido de interesse e o ligante, mediando pontes de hidrogênios entre os dois, simultaneamente, enquanto que a letra n indica a quantidade de moléculas de água que fazem ponte de hidrogênio somente com o resíduo de interesse. Portanto, dadas as características do painel gráfico BIRD (ver figura 4.12), tal gráfico mostra o perfil energético da interações do fármaco 4R-INADP com os aminoácidos do sítio de ligação da proteína *dfrA*, isto é, através dos valores da energia de interação do fármaco com cada aminoácido estudado, é possível identificar as regiões do fármaco que possuem maior ou menor afinidade com a proteína alvo, assim como identificar quais aminoácidos

Figura 4.12: Painel gráfico do BIRD (Binding site, Interaction energy and Residues Domain) onde são mostradas as energias dos 32 resíduos mais importantes. Além da estimativa quantitativa da energia, dada em kcal/mol, também são identificados os átomos dos aminoácidos mais próximos do ligante e as regiões do fármaco onde estão interagindo. As menores distâncias entre os átomos dos resíduos e o INADH também são mostrados no BIRD. Tais distâncias estão organizadas seguindo a ordem do menor para a maior valor de distância.



Fonte: Autora, 2012

possuem maior contribuição para as interações do fármaco dentro do sítio ativo da mesma.

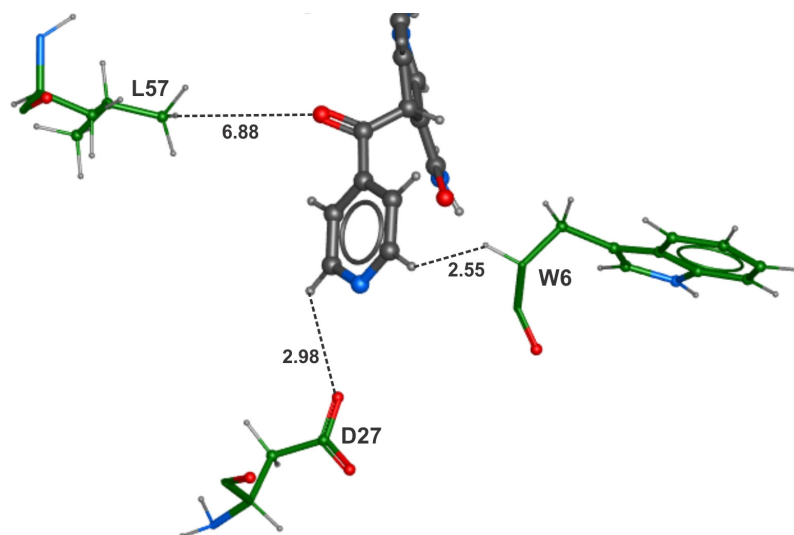
De acordo com o gráfico BIRD, o aminoácido mais importantes para interação do 4R-INADP com o sítio ativo da *dfrA* é o R44, que possui energia atrativa em torno de -272,64 kcal/mol. No entanto, há outros aminoácidos que também possuem grandes energias atrativas, tais como: R45 (-250,14 kcal/mol), R67 (-224,26 kcal/mol), R16 (-127,80 kcal/mol) e Q98 (-78,70 kcal/mol). Quanto às energias repulsivas, o aminoácido que apresentou maior repulsão ao fármaco foi o D19, com energia de 104,36 kcal/mol. Entretanto, no que se refere aos aminoácidos mais repulsivos, alguns destes exibiram um perfil energético semelhante, com pouca variação entre os valores de energia. Dito isto, os aminoácidos com maiores energias repulsivas foram: o D27 (102,10 kcal/mol), o D125 (100, 86 kcal/mol) e o E114(85,72 kcal/mol).

Dentre os principais aminoácidos, tanto atrativos quanto repulsivos, a maioria forma ligações de hidrogênio com moléculas de água. Deste modo, partindo das informações do gráfico BIRD, outra importante análise que foi realizada se refere aos tipos de interações entre os principais aminoácidos, bem como os resíduos e as regiões do fármaco que estão envolvidos nestas interações. Sendo assim, as figuras de 4.13 a 4.18 mostram estas análises, ou seja, os tipos de interações, e suas respectivas mínimas distâncias, entre os principais aminoácidos e cada uma das seis regiões do 4R-INADP. Entretanto, vale ressaltar que foram analisados apenas os principais aminoácidos de cada região do fármaco, sendo estes os que apresentaram energia com módulo maior ou igual à energia de corte adotada, que é de ± 20 kcal/mol.

A região i, correspondente ao grupo acyl isonicotínico derivado da INH, interage mais fortemente com os aminoácidos L57 (-24,48 kcal/mol) e W6 (-25,04 kcal/mol), com os quais interage com energia atrativa decorrente de forças de van der Waals. Já com o aminoácido D27 (102,10 kcal/mol) esta região exibe uma forte interação repulsiva resultante de forças eletrostáticas de repulsão, visto que apesar de estar a uma distância de 2,96 Å, a cadeia lateral deste aminoácido é negativamente carregada, provocando assim este tipo de interação. As mínimas distâncias entre os principais aminoácidos e a região i são

mostradas na figura 4.13.

Figura 4.13: Principais aminoácidos da região i do 4R-INADP com suas respectivas mínimas distâncias do fármaco. Os aminoácidos L57 (-24,48 kcal/mol) e W6 (-25,04 kcal/mol) são atrativos, enquanto que o D27 (102,10 kcal/mol) é altamente repulsivo, e interage com o fármaco por meio de forças eletrostáticas.



Fonte: Autora, 2012

Na figura 4.14 são mostrados os principais aminoácidos da região ii, e suas respectivas mínimas distâncias. Na figura da esquerda o aminoácido mais atrativo é o V46 (-38,80 kcal/mol), que interage com o fármaco através de forças de van der Waals. O A7 (-23,21 kcal/mol) interage com esta região formando duas pontes de hidrogênio com o grupo funcional carboxamida da nicotinamida. O aminoácido I14 (-23,82 kcal/mol) faz uma ponte de hidrogênio com o grupo amina, exibindo assim uma energia atrativa na região ii do ligante. Por outro lado, esta região do fármaco também interage com um aminoácido repulsivo, o E114 (85,72 kcal/mol), que se encontra a uma distância de 7,80 Å de um dos hidrogênios da amina na posição AA do 4R-INADP, interagindo com o fármaco por meio de forças eletrostáticas de repulsão.

A figura 4.15 mostra os principais resíduos da região iii. Na figura do lado esquerdo, a região iii, composta pela ribose da nicotinamida, apresenta aminoácidos com cadeias laterais eletricamente carregadas, como o D125 e D19 (que são carregados negativamente) e o R16 (carregado positivamente). Sendo assim, os aminoácidos D125 (100,86 kcal/mol)

Figura 4.14: Aminoácidos mais importantes da região ii e suas respectivas mínimas distâncias. A figura do lado esquerdo mostra 3 aminoácidos atrativos (V46, I20 e A7) e a do lado direito mostra 2, sendo 1 atrativo (I14) e outro altamente repulsivo (E114).

Fonte: Autora, 2012

e D19 (104,36 kcal/mol) são os que possuem maior energia de repulsão nesta região do 4R-INADP. O oxigênio da cadeia peptídica do D19 forma uma ponte de hidrogênio com a hidroxila, na posição O3' do ligante, e outra com o resíduo R16, porém sua cadeia lateral está voltada no sentido contrário ao fármaco, o que caracteriza a forte repulsão provocado por forças eletrostáticas entre este aminoácido e a região iii. O D125, que também interage com o fármaco via forças eletrostáticas de repulsão, também forma duas pontes de hidrogênio com a cadeia lateral do R16. As interações entre o R16 (-127,80) e esta região do fármaco é fortemente atrativa, visto que além de duas pontes de hidrogênio que este resíduo forma simultaneamente com o D19 e o D125, há uma interação de van der Waals à curta distância (3,00 Å) com a hidroxila na posição 3' do 4R-INADP. Na figura do lado direito o aminoácido mais atrativo é o G18 (-53,83 kcal/mol), que encontra-se a uma distância de 2,95 Å, e interage com o fármaco através de forças de van der Waals. Os aminoácidos S49 (-34,55 kcal/mol) e A126(-23,62 kcal/mol) também possuem energia de atração nesta região, onde o A126 exibe uma interação do tipo van der Waals, enquanto que o S49 forma uma ponte de hidrogênio com uma molécula de água a qual forma outra ponte de hidrogênio com a hidroxila da posição 2' do 4R-INADP.

Figura 4.15: Principais aminoácidos da região iii e suas mínimas distâncias em relação ao 4R-INADP. Nesta região os aminoácidos D19 (104,36 kcal/mol) e D125 (100,86 kcal/mol) possuem fortes interações repulsivas, enquanto que o aminoácido que possui maior interação atrativa é G18 (-53,83 kcal/mol).

Fonte: Autora, 2012

Os aminoácidos mais atrativos da região do pirofosfato (região iv) são o R45 (-250,14

kcal/mol) e o Q98 (-78,70 kcal/mol), os quais interagem com o fármaco através de ligações de hidrogênio com os oxigênios nas posições AM e AF, respectivamente. Os outros aminoácidos que interagem com esta região do fármaco, são G96 (-31,32 kcal/mol), G97 (-45,22 kcal/mol) e V99 (-26,71 kcal/mol), que também interagem com o fármaco por meio de ligações de hidrogênio, exibindo fortes interações atrativas. Desta forma, todos os aminoácidos desta região são energeticamente atrativos e favoráveis à ligação do fármaco no sítio ativo da proteína *dfrA*. A figura 4.16 mostra as mínimas distâncias, que correspondem às ligações de hidrogênio, entre tais aminoácidos e o pirofosfato da região iv.

Figura 4.16: Os principais aminoácidos da região iv e suas respectivas mínimas distâncias. A região iv, que corresponde ao pirofosfato, interage com os aminoácidos através de ligações de hidrogênio, exibindo assim interações energeticamente atrativas.

Fonte: Autora, 2012

Os principais aminoácidos da região v, mostrados na figura 4.17, são em sua maioria atrativos e interagem principalmente com o grupo PO_4 que está ligado à ribose. O R44 (-272,64 kcal/mol), que é aminoácido mais atrativo dentre os 32 aminoácidos exibidos no BIRD (figura 4.12), interage com os oxigênios nas posições AL e AK do grupo fosfórico do 4R-INADP, através de duas pontes de hidrogênio. O R67 (-224,26 kcal/mol) também interage por meio de duas pontes de hidrogênio, sendo uma formada entre a ligação peptídica do aminoácido e o oxigênio AE, e a outra é formada entre a cadeia lateral do R67 e uma molécula de água, a qual também interage com o OAE através de uma ligação de hidrogênio. O Q98 (-78,70 kcal/mol) é outro aminoácido que exibe interação semelhante, ou seja, forma ponte de hidrogênio com uma molécula de água que forma de modo simultâneo outra ponte de hidrogênio com o fármaco. Porém, o átomo do ligante envolvido nesta interação fortemente atrativa é o oxigênio da hidroxila na posição AJ. O G43 (-28,92 kcal/mol) é o único aminoácido que não interage com esta região por meio de ligação de hidrogênio, interagindo porém através de forças de van der Waals e exibindo

interação atrativa com tal região. Portanto, assim como na região iv, nesta região todos os aminoácidos também são energeticamente atrativos e favorecem a ligação do aduto 4R-INADP no sítio ativo da *dfrA*.

Figura 4.17: Região v com seus principais resíduos e suas respectivas distâncias entre os átomos interagentes. Todos os aminoácidos desta região são atrativos, sendo que o R44 (-272,64 kcal/mol) é o mais atrativo entre todos os 32 resíduos considerados no BIRD, e assim como a maioria dos resíduos desta região, interage com o fármaco através de pntes de hidrogênio. O G43 (-28,92 kcal/mol) é o único aminoácido que interage com o ligante principalmente por meio de forças de van der Waals.

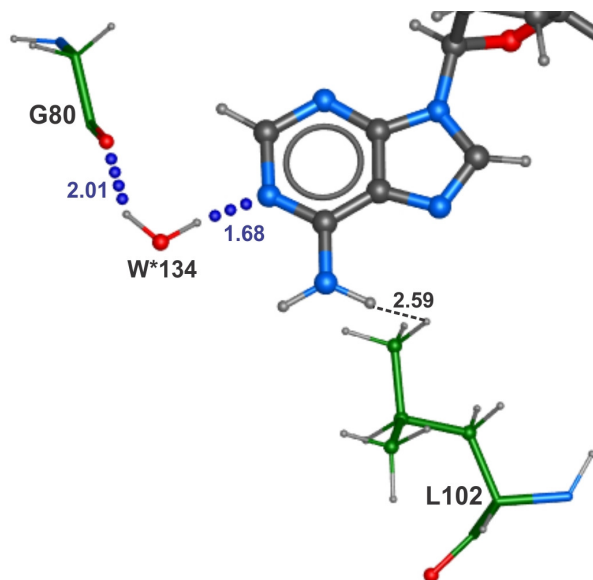
Fonte: Autora, 2012

Na região vi, os principais aminoácidos são o G80 (-18,57 kcal/mol) e o L102 (-24,41 kcal/mol), os quais são hidrofóbicos e interagem com esta região com energias atrativas. O G80 interage através de uma ligação de hidrogênio com a mesma molécula de água que forma simultaneamente uma ponte de hidrogênio com o nitrogênio 1 do fármaco. Já o L102 interage com um dos hidrogênios da amina da posição N6 do 4R-INADP, por meio de forças de van der Waals. A figura 4.18 mostra os resíduos envolvidos nas interações desta região, e suas respectivas mínimas distâncias.

A projeção da densidade eletrônica total sobre o potencial eletrostático do 4R-INADP e dos resíduos mais atrativos e repulsivos é mostrada nas figuras 4.19 e 4.20, respectivamente. Sendo que, a isosuperfície do potencial eletrostático e a densidade eletrônica total foram calculadas através do método DFT, usando aproximação LDA, base DNP e correção OBS. Os cálculos foram realizados no pacote DMOL³ do *software* Accelrys Materials Studio 5.0.

Através da sobreposição da isosuperfície de potencial com a densidade eletrônica do ligante e dos resíduos mais atrativos, é possível identificar as regiões mais eletronegativas (regiões em vermelho) e as mais eletropositivas (regiões em azul), assim como verificar os aminoácidos que possuem maior ou menor eletronegatividade. Deste modo, na figura 4.19 verifica-se que as regiões mais eletronegativas do ligante, isto é, que possuem maior

Figura 4.18: Principais resíduos da região vi e suas respectivas mínimas distâncias. Os aminoácidos L102 (-24,41 kcal/mol) e G80 (-18,57 kcal/mol) interagem atrativamente com esta região por meios de forças de van der Waals e ligações de hidrogênio, respectivamente.

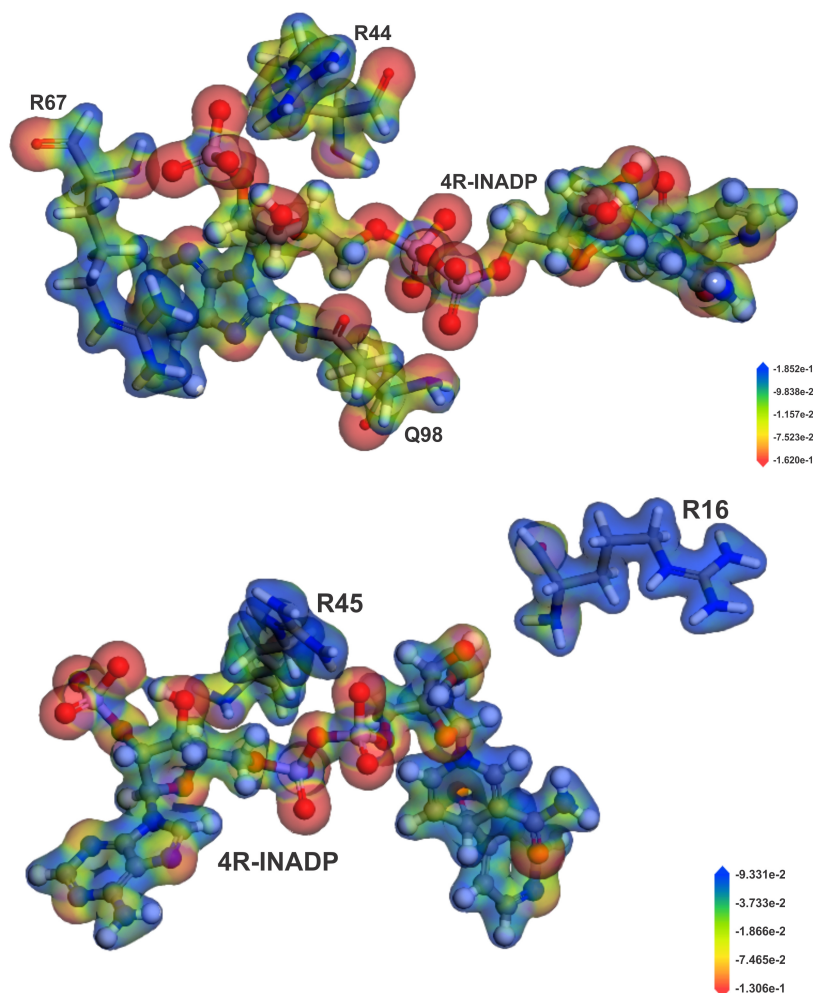


Fonte: Autora, 2012

densidade de carga negativa, são o pirofosfato (região iv do 4R-INADP) e o grupo PO_4 ligado à ribose da adenina (região v do 4R-INADP), enquanto que as amins das regiões i e v exibem densidade de carga positiva. Por outro lado, a maioria dos aminoácidos (R16, R44, R45 e R67) possuem cadeias laterais carregadas com densidade de carga positiva, exceto o Q98 que possui uma densidade de carga no negativa no oxigênio de sua cadeia lateral. Sendo assim, Os aminoácidos eletropositivos como o R44 (-272,64 kcal/mol), o R45 (-250,14 kcal/mol) e o R67(-224,26 kcal/mol), ao interagirem com as regiões mais eletronegativas (priofosfato e PO_4) exibem altas energias atrativas.

Na figura 4.20 é mostrada superfície de potencial acoplada com a densidade eletrônica total do 4R-INADP e dos aminoácidos mais repulsivos (D19, D27, D125 e E114). Visto que tais resíduos possuem o grupo carboxila em suas cadeias laterais, é verificada uma densidade de cargas negativas nas cadeias laterais dos mesmos. No entanto, a cadeia peptídica do aminoácido D19 (104,36 kcal/mol) possui átomos eletropositivos que

Figura 4.19: Isosuperfície de potencial acoplada à densidade eletrônica total, do INADH e dos aminoácidos mais atrativos, calculada através do método DFT, com aproximação LDA e conjunto de base DNP. As regiões vermelhas indicam densidade de carga negativa, e as regiões azul indicam densidade de carga positiva.

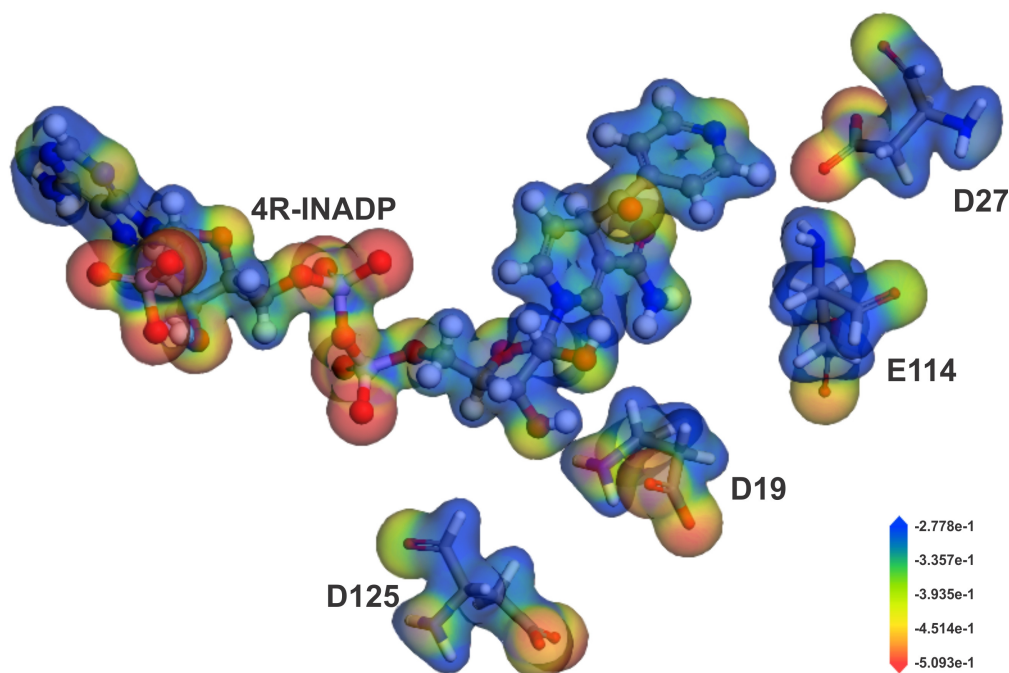


Fonte: Autora, 2012

encontra-se a uma curta distância do hidrogênio da hidroxila da posição 3' do ligante, que também possui densidade de cargas positivas, gerando assim uma forte interação repulsiva entre este aminoácido e o ligante. Já o D27 (102,10 kcal/mol), interage com o nitrogênio da posição AZ do fármaco, que possui densidade de carga negativa, através de sua cadeia lateral eletropositiva, gerando assim uma interação repulsiva nesta região. Da mesma forma, os outros resíduos exibem interações repulsivas, mostrando assim a grande

contribuição eletrostática nas interações entre os resíduos repulsivos e o 4R-INADP.

Figura 4.20: Isosuperfície de potencial acoplada à densidade eletrônica total, do INADH e dos aminoácidos mais repulsivos, calculada através do método DFT, com aproximação LDA e conjunto de base DNP. As regiões vermelhas indicam densidade de carga negativa, e as regiões azul indicam densidade de carga positiva.



Fonte: Autora, 2012

4.3 Conclusão

Mediante a mesma metodologia adotada para o sistema estudado no capítulo 3, aqui foi realizado o estudo da interação do isômero acíclico 4R da Isoniazida (4R-INADP) com o sítio de ligação da enzima redutase dihidrofolato do *Mycobacterium tuberculosis* (MT) denominada *dfrA*. Através da estrutura do cristal (código PDB 2CIG) da *dfrA* inibida pelo composto 4R-INADP, foi selecionado um raio de 20 Å em torno do centróide do ligante, e todos os resíduos, assim como a molécula do fármaco, tiveram seus átomos pesados (como carbono, nitrogênio, oxigênio e fósforo) fixados, enquanto que somente os átomos de

hidrogênio foram deixado livres para serem otimizados através do campo de força CVFF. Então, partindo da estrutura do cristal 2CIG com os átomos de hidrogênio otimizados, foi definida a região protéica para a qual seriam calculadas as energias de interação com o fármaco, neste caso a região escolhida foi o sítio ativo fornecido pelos dados cristalográficos (com 35 aminoácidos), além de mais 12 aminoácidos, os quais estavam localizados com até 6Å de distância dos átomos do ligante. Desta forma, 47 aminoácidos foram estudados, tendo suas energias de interação com o fármaco calculadas através do método quântico DFT (com aproximação LDA, base DNP e correção OBS) na aproximação MFCC.

A partir dos cálculos da energia de interação entre o fármaco e os resíduos do sítio de ligação da *dfrA*, foi possível conhecer o perfil energético das interações dos aminoácidos com fármaco, a partir do gráfico BIRD, o qual foi plotado considerando somente os 32 aminoácidos mais importantes, isto é, os resíduos com energia maior que o módulo ± 8 kcal/mol. Portanto, sendo as energia positivas ditas repulsivas e as negativas ditas atrativas, mais atrativo é o R44, com energia de -272,64 kcal/mol, e o mais repulsivo é o D19 com energia de 104,36 kcal/mol. Outro resultado analisado, foi os tipos de interação, e as regiões em que se deram as interações mais importantes.

Dentre as regiões que apresentaram maior afinidade com o fármaco, interagindo com resíduos altamente atrativos, a região da ribose- PO_4 se destaca por interagir fortemente com 5 aminoácidos, sendo os mais atrativos o R44 (-272,64 kcal/mol), que é o resíduo com maior energia de atração do BIRD, e o R67 (-224,26 kcal/mol). Entretanto, a região do pirofosfato também exibiu um importante perfil energético de interação, visto que também interage com 5 aminoácidos bastante atrativos, dos quais o R45 (-250,14 kcal/mol) e o Q98 (-78,70 kcal/mol) são os mais atrativos. Já a região da ribose da nicotinamida apresentou algumas interações importantes, no entanto interagiu mais fortemente com o R16 (-127,80 kcal/mol). Sendo assim, pode-se afirmar que as regiões constituídas por grupos fosfóricos desempenham maior afinidade com os aminoácidos do sítio de ligação, notando-se que a região do 4R-INADP que possui maior afinidade com o sítio de ligação da enzima refere-se ao cofator NADP.

Visto que algumas moléculas de água do cristal 2CIG também foram consideradas nos cálculos de energia, tais moléculas participaram em ligações de hidrogênio, intermediando assim a interação de alguns resíduos com o fármaco. Dentre os resíduos (S49 (-34,55 kcal/mol), R67 (-224,26 kcal/mol), Q98 (-78,70 kcal/mol) e G80 (-18,57 kcal/mol)) que interagem com o fármaco através de pontes de hidrogênio intermediadas por moléculas de água, o aminoácido com maior interação atrativa foi o R67, o qual também forma uma ligação de hidrogênio com o oxigênio na posição AE do grupo PO_4 da ribose ligada na adenina. Por outro lado, exceto a região derivada da isoniazida e a região da adenina, a maioria das regiões do 4R-INADP exibiram ligações de hidrogênio diretamente com alguns aminoácidos, e dentre estas regiões as que mais formaram pontes de hidrogênio foi o pirofosfato, que interagiu através de pontes de hidrogênio com o Q98, o G97, o G96, o V99 e o R45 (o aminoácido mais atrativo dentre todos), e a região da ribose PO_4 que formou ligações de hidrogênio com o Q68, o R67, o S66 e o R44 (que é o segundo resíduo mais atrativo dentre todos). Portanto, as energias dos resíduos participantes na formação de pontes de hidrogênio sugerem que este tipo de interação possui alguma contribuição para a energia de interação do fármaco.

As isosuperfícies de potencial e da densidade eletrônica total em torno do ligante e dos aminoácidos mais repulsivos e atrativos, calculadas via DFT (com aproximação LDA, base DNP e correção OBS), mostraram que as interações entre os aminoácidos mais atrativos e o 4R-INADP, possuem uma significativa componente eletrostática, visto que estes resíduos possuem cadeias laterais com densidade de carga positiva, que interagem preferencialmente com as regiões eletronegativas do fármaco, que são o pirofosfato e o grupo PO_4 da ribose ligada na adenina. Da mesma forma, os resíduos mais repulsivos, interagem com as regiões menos eletronegativas através de suas cadeias peptídicas (que também possuem densidade de carga positiva), gerando assim uma forte interação eletrostática de repulsão.

De um modo geral, pode-se afirmar que embora na literatura seja indicado que a proteína diidrofolato redutase do MT, a *dfrA*, não é um bom alvo para a isoniazida [38], o perfil energético das interações calculadas neste trabalho, indicam que o 4R-INADP

possui uma alta afinidade com o sítio ativo desta enzima, onde as regiões que possuem grupos fosfóricos são as principais responsáveis por tal afinidade. Sendo que o aminoácido com maior predominância nas interações energéticas atrativas, foi o R44 (-272,64 kcal/mol). Deste modo, a utilização do método quântico DFT, através da aproximação MFCC, possibilitou a descrição quantitativa das interações envolvidas entre o ligante 4R-INADP e o sítio de ligação da proteína *dfrA*, favorecendo assim uma melhor compreensão do mecanismo de ação deste sistema. Logo, o uso de método quânticos (como o DFT) em conjunto com a aproximação MFCC é uma importante ferramenta de apoio no estudo de fármacos.

Capítulo 5

Conclusão e Perspectivas

No presente trabalho foi realizado o estudo da bioquímica quântica dos adutos da isoniazida (INH) ligados ao sítio ativo de proteínas redutase do *Mycobacterium tuberculosis*. Através de um conjunto de ferramentas computacionais embasadas em modelos e métodos teóricos de mecânica clássica e química quântica, foram estudados dois sistemas macromoleculares. O primeiro sistema biomolecular, tratado no capítulo 3, é formado pela enzima redutase do MT codificada como *inhA*, inibida pela molécula bioativa INADH, que é um composto derivado da catálise-peroxidase da INH com o substrato NADH. Já o segundo sistema, abordado no capítulo 4, consiste na enzima diidrofolato redutase, codificada pelo gene *dfrA*, inibida pelo isômero acíclico 4R da isoniazida, denotado por 4R-INADP. Ambos os sistemas foram estudados sob a mesma metodologia, onde a partir das estruturas destas proteínas co-cristalizadas com seus respectivos inibidores, prosseguiu-se com o cálculo da energia de interação dos ligantes (adutos da INH) com seus respectivos sítios de ligação nas enzimas.

Partindo das estruturas cristalográficas dos sistemas INADH-*inhA* (código PDB 1ZID) e (4R-INADP)-*dfrA* (código PDB 2CIG), obtidas através de difração de raios-x. Após a otimização do hidrogênios (em um raio de 20 Å da proteína) usando campo de força clássico CVFF, foram calculadas as energias de interação entre os aminoácidos do sítio de

ligação e os seus respectivos ligantes, utilizando-se o método quântico DFT (com funcional LDA, base DNP e correção OBS) no esquema aproximativo MFCC. A partir do resultado destas energias, o gráfico BIRD foi plotado considerando somente os aminoácidos que apresentaram energia maior que ± 8 kcal/mol. Então, através do perfil energético das interações apresentado no BIRD, foi possível mapear as regiões do fármaco detentoras de maior afinidade com os aminoácidos do sítio ativo das enzimas, assim como identificar os aminoácidos com interações mais importantes com o ligante. Portanto, com base nos resultados obtidos para os dois sistemas, ligante-proteína, as regiões do fármaco com maior afinidade são referentes às regiões do cofator, conforme predito na literatura [22; 31]. Quanto aos aminoácidos mais importantes para as interações atrativas entre os ligantes e o sítio de suas respectivas enzimas alvo, o K165 (-101,97 kcal/mol) e o R44 (-272,64 kcal/mol) são os aminoácidos que exibiram maior interação atrativa com os ligantes INADH e 4R-INADP, respectivamente.

Comparando os perfis energéticos das interações entre os fármacos e seus respectivos sítios de ligação, de um modo geral, o ligante 4R-INADP exibiu energias de interação fortemente atrativas com o sítio de ligação da *dfrA*, de modo que seus valores são mais altos do que aqueles obtidos para o composto INADH ligado no sítio ativo da *inhA*. Deste modo, supõe-se que a proteína redutase diidrofolato *dfrA* exibe maior afinidade com o 4R-INADP, do que a proteína *inhA* para o INADH. No entanto, vale ressaltar que o estudo teórico-computacional necessita de uma constante troca de informações com os dados experimentais. Neste sentido, de acordo com as observações experimentais de espectroscopia de massa realizadas em 2010, apesar de ser um aduto extremamente potente contra a DHFR do MT *in vitro*, o 4R-INADP não é um produto da ativação da INH pela KatG dentro da proteína, ponto primordial para a consideração de alvos enzimáticos. Por este motivo, a *dfrA* não é um bom alvo para a INH [39].

Portanto, o uso do método quântico DFT aplicado à aproximação MFCC foi capaz de fornecer resultados quantitativo para a energia de interação dos compostos bioativos INADH e 4R-INADP com seus respectivos alvos enzimáticos, *inhA* e *dfrA*, de modo que tais resultados podem servir de subsídios para o entendimento mais acurado dos

mecanismos de ação envolvidos nestes sistemas, podendo levar ao aprimoramento das estruturas moleculares destes ligantes, tornando-os mais eficientes. Sendo assim, métodos quânticos em conjunto com métodos aproximativos (como o MFCC) para a descrição das energias de interação de moléculas bioativas com sistemas macromoleculares, podem ser uma ferramenta bastante útil para o planejamento e desenvolvimento racional de fármacos mais potentes.

Referências

- 1 PATRICK, G. L. et al. *An Introduction to Medicinal Chemistry*. 3^o. ed. [S.l.]: Oxford University Press, 2005.
- 2 MORGON, N. H.; COUTINHO, K. *Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular*. 1^o. ed. [S.l.]: Editora Livraria da Física, 2007.
- 3 GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D. Modelagem molecular de fármacos. *Revista Processos Químicos*, n. 4, 2008.
- 4 FRAGA, C. A. M. Razões da atividade biológica: Interações micro e biomacromoleculares. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, n. 3, p. 33, 2001.
- 5 ISRAELACHVILI, J. N. *Intermolecular and Surface Forces*. 2^o. ed. [S.l.]: Academic Press, 1991.
- 6 NEGI, A. S. et al. Antitubercular potential of plants: A brief account of some important molecules. *Medicinal Research Reviews*, v. 30, n. 4, p. 603–645, 2010.
- 7 SIEW, C. Y. *Interaction of isoniazid with mycobacterium tuberculosis enoyl-acyl carrier protein reductase (Inha): From molecular perspectives*. 2 p. Dissertação (Mestrado), Junho 2008.
- 8 SAÚDE, M. da. Relatório da tuberculose, *Programa Nacional de Controle da Tuberculose*. 2008.
- 9 SAÚDE, M. da. Relatório de Situação: Alagoas, *Sistema Nacional de Vigilância em Saúde*. 2005.

- 10 L., J. Y. et al. Antituberculosis drugs: Ten years of research. *Bioorg. Med. Chem.*, 2007.
- 11 HAZARIKA, K. K.; BARUAH, N. C.; DEKA, R. C. Molecular structure and reactivity of antituberculosis drug molecules isoniazid, pyrazinamide, and 2-methylheptylisonicotinate: a density functional approach. *Struct Chem*, v. 20, p. 1079–1085, 2009.
- 12 PUNKVANG, A. et al. Elucidating drug-enzyme interactions and their structural basis for improving the affinity and potency of isoniazid and its derivatives based on computer modeling approaches. *Molecules*, v. 15, p. 2791–2813, 2010.
- 13 MEYER, H.; MALLY, J. On hydrazine derivatives of pyridine carbonic acids (in german). *Monatshefte Chemie verwandte Teile anderer Wissenschaften*, v. 33, p. 393–414, 1912.
- 14 DESSEN, A. et al. Crystal structure and function of the isoniazid target of mycobacterium tuberculosis. *Science*, v. 267, p. 1638–1641, 1995.
- 15 BLOOM, B. R.; MURRAY, C. J. Tuberculosis: Commentary on a reemergent killer. *Science* 92, v. 257, n. 5073, p. 1055–1064.
- 16 RANGUELOVA, K. et al. Impact of distal side water and residue 315 on ligand binding to ferric mycobacterium tuberculosis catalase-peroxidase (katG)†. *Biochemistry*, v. 47, p. 12583–12592, 2008.
- 17 ZHAO, X. *The catalytic mechanism of Mycobacterium tuberculosis catalase-peroxidase (katG) and isoniazid activation*. Tese (Doutorado) — The graduate center, 2005.
- 18 WAHAB, H. A. et al. Elucidating isoniazid resistance using molecular modeling. *J. Chem. Inf. Model.*, v. 49, p. 97–107, 2008.
- 19 POLLAK, N.; DÖLLE, C.; ZIEGLER, M. The power to reduce: pyridine nucleotides – small molecules with a multitude of functions. *Biochem. J.*, v. 402, p. 205–18, 2007.

-
- 20 BANERJEE, A. et al. *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in mycobacterium tuberculosis. *Science*, v. 263, p. 227–230, 1994.
- 21 ANDRADE, C. H. et al. Abordagem racional no planejamento de novos tuberculostáticos: Inibidores da *inhA*, enoil-acp redutase do m. tuberculosis. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 44, p. 167–179, 2008.
- 22 ROZWARSKI, D. A. et al. Modification of the nadh of the isoniazid target (*inhA*) from mycobacterium tuberculosis. *Science*, v. 279, n. 2, p. 98, January 1998.
- 23 ZHANG, Y.; VILCHEZE, C.; JACOBS, W. *Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis*. In: *Tuberculosis and the tubercle bacillus*. [S.l.]: ASM Press, 2005.
- 24 MUSSER, J. M. et al. Characterization of the catalase-peroxidase gene (*katG*) and *inhA* locus in isoniazid-resistant and -susceptible strains of mycobacterium tuberculosis by automated dna sequencing: Restricted array of mutations associated with drug resistance. *J Infect Dis.*, v. 173, n. 1, p. 196–202, 1996.
- 25 ZHANG, Y. et al. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of mycobacterium tuberculosis. *Nature*, v. 358, p. 591–593, 1992.
- 26 BASSO, L. A. et al. Mechanisms of isoniazid resistance in mycobacterium tuberculosis: enzymatic characterization of enoyl reductase mutants identified in isoniazid-resistant clinical isolates. *J Infect Dis.*, v. 178, n. 3, p. 769–775, 1998.
- 27 TORRES, M. J. et al. Use of real-time pcr and fluorimetry for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance-associated mutations in mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol.*, v. 38, n. 9, p. 3194–3199, 2000.
- 28 MORRIS, S. et al. Molecular mechanisms of multiple drug resistance in clinical isolates of mycobacterium tuberculosis. *J Infect Dis.*, v. 171, n. 4, p. 954–960, 1995.

- 29 ARGYROU, A.; VETTING, M. W.; BLANCHARD, J. S. New insight into the mechanism of action of and resistance to isoniazid. *J Am Chem Soc*, v. 129, n. 31, p. 9582–9583, 2007.
- 30 DUCASSE-CABANOT, S.; et al. In vitro inhibition of the mycobacterium tuberculosis bet-ketoacyl-acyl carrier protein reductase maba by isoniazid. *Antimicrob. Agents Chemother*, v. 48, p. 242–249, 2004.
- 31 ARGYROU, A. et al. Mycobacterium tuberculosis dihydrofolate reductase is a target for isoniazid. *Nature Structural & Molecular Biology*, v. 13, n. 5, p. 408–413, may 2006.
- 32 GANGADHARAM, P. R.; SCHAEFER, W. B. Selective inhibition of nucleic acid synthesis in mycobacterium tuberculosis by isoniazid. *Nature*, v. 198, p. 712–714, 1963.
- 33 RAWAT, R.; WHITTY, A.; TONGE, P. J. The isoniazid-nad adduct is a slow, tight-binding inhibitor of inha, the mycobacterium tuberculosis enoyl reductase: Adduct affinity and drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 100, n. 24, p. 13881–13886, 2003.
- 34 MILLER, G. P.; BENKOVIC, S. J. Stretching exercises-flexibility in dihydrofolate reductase catalysis. *Chem, Biol.*, v. 5, p. R105–R113, 1998.
- 35 SCHNELL, J. R.; DYSON, H. J.; WRIGHT, P. E. Structure, dynamics and catalytic function of dihydrofolate reductase. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, v. 33, p. 119–140, 2004.
- 36 SULLING, W. J.; et al. Susceptibilities of mycobacterium tuberculosis and mycobacterium avium complex to lipophilic deazapteridine derivatives, inhibitors of dihydrofolate reductase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 42, p. 811–815, 1998.
- 37 LI, R.; et al. Three-dimensional structure of mycobacterium tuberculosis dihydrofolate reductase reveals opportunities for the design of novel tuberculosis drugs. *J. Mol. Biol.*, v. 295, p. 307–323, 2000.

- 38 WANG, F.; et al. Mycobacterium tuberculosis dihydrofolate reductase is not a target relevant to the antitubercular activity of isoniazid. *American Society for Microbiology*, v. 54, n. 9, p. 3776–3782, 2010.
- 39 WANG, F.; et al. Mycobacterium tuberculosis dihydrofolate reductase is not a target relevant to the anti-tubercular activity of isoniazid. *Antimicrob. Agents Chemother*, 2010.
- 40 SANT'ANNA, C. M. R. Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: Uma introdução. *Rev. Virtual Quim.*, v. 1, n. 1, p. 49–57, 2009.
- 41 BARREIRO, E. J. et al. Modelagem molecular: Uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. *Química Nova*, v. 20, n. 1, p. 1–11, 1997.
- 42 LEACH, A. R. *Molecular Modelling Principles and Applications*. 2^o. ed. [S.l.]: Pearson Prentice Hall, 2001.
- 43 CARVALHO, I. et al. Introdução à modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. *Química Nova*, v. 26, p. 428 – 438, 2003.
- 44 RODRIGUES, C. R. Processos modernos no desenvolvimento de fármacos: Modelagem molecular. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, n. 3, p. 43–49, 2001.
- 45 BURKERT, U.; ALLINGER, N. L. *Molecular Mechanics*. Dissertação (Mestrado) — American Chemical Society, 1982.
- 46 ALLINGER, N. L. Conformational analysis. 130. mm2. a hydrocarbon force field utilizing v1 and v2 torsional terms. *Journal of the American Chemical Society*, v. 99, n. 25, p. 8127–8134, 1977.
- 47 ALLINGER, N. L.; YUH, Y. H.; LII, J. H. Molecular mechanics. the mm3 force field for hydrocarbons. 1. *Journal of the American Chemical Society*, v. 111, n. 23, p. 8551–8566, 1989.

- 48 LII, J. H.; ALLINGER, N. L. Molecular mechanics. the mm3 force field for hydrocarbons. 2. vibrational frequencies and thermodynamics. *Journal of the American Chemical Society*, v. 111, n. 23, p. 8566–8575, 1989.
- 49 LII, J. H.; ALLINGER, N. L. Molecular mechanics. the mm3 force field for hydrocarbons. 3. the van der waals' potentials and crystal data for aliphatic and aromatic hydrocarbons. *Journal of the American Chemical Society*, v. 111, n. 23, p. 8576–8582, 1989.
- 50 ALLINGER, N. L.; CHEN, K.; LII, J.-H. An improved force field (mm4) for saturated hydrocarbons. *Journal of Computational Chemistry*, v. 17, n. 5-6, p. 642–668, 1996.
- 51 WEINER, S. J. et al. A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. *Journal of the American Chemical Society*, v. 106, n. 3, p. 765–784, 1984.
- 52 DAUBER-OSGUTHORPE, P. et al. Structure and energetics of ligand binding to proteins: E. coli dihydrofolate reductase-trimethoprim, a drug-receptor system. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, v. 4, p. 31–47, 1988.
- 53 YOUNG, D. C. *Computational Chemistry: A Practical Guide for Applying Techniques to Real-World Problems*. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2001.
- 54 ZOEBISCH, M.; HEALY, E.; STEWART, J. Mndo study of the claisen rearrangement. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 107, p. 3902, 1985.
- 55 THOMAS, L. H. The calculation of atomic fields. *Proc. Camb. Phil. Soc*, v. 23, p. 542–548, 1927.
- 56 VIANA, J. D. M.; FAZZIO, A.; CANUTO, S. *Teoria Quântica de Moléculas e Sólidos*. [S.l.]: Editora Livraria da Física, 2004. 213 p.
- 57 HOHENBERG, P.; KOHN, W. Inhomogeneous electron gas. *Phys. Rev.*, v. 136, p. B864–B871, 1964.

- 58 ATKINS, P.; FRIEDMAN, R. *Molecular Quantum Mechanics*. 4^o. ed. [S.l.]: Oxford University Press, 2005.
- 59 KOHN, W.; SHAM, L. J. Self-consistent equations including exchange and correlation effects. *Phys. Rev.*, v. 140, p. A1133–A1138, 1965.
- 60 ZIEGLER, T. Approximate density functional theory as a practical tool in molecular energetics and dynamics. *Chem. Rev.*, v. 91, p. 651–667, 1991.
- 61 BORMAN, S. New qsar techniques eyed for environmental assessments. *Chem. Eng. News*, v. 68, p. 20–23, 1990.
- 62 CAVALLI, A. et al. Density-functional theory applications in computational medicinal chemistry. *Quantum Medicinal Chemistry*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, v. 17, p. 41–67, 2003.
- 63 KOCH, W.; HOLTHAUSEN, M. C. *A Chemist's Guide to Density Functional Theory*. 2^o. ed. [S.l.]: Wiley-VCH, 2001.
- 64 ZHAO, Y.; TRUHLAR, D. G. A new local density functional for main-group thermochemistry, transition metal bonding, thermochemical kinetics, and noncovalent interactions. *J. Chem. Phys.*, v. 125, n. 19, p. 194101, 2006.
- 65 ZHAO, Y.; TRUHLAR, D. G. The m06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four m06-class functionals and 12 other functionals. *Theor. Chem. Account.*, v. 120, p. 215–241, 2008.
- 66 CHAI, J. D.; HEAD-GORDON, M. Long-range corrected hybrid density functionals with damped atom–atom dispersion corrections. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, v. 10, p. 6615–6620, 2008.
- 67 ZHANG, D. W.; CHEN, X. H.; ZHANG, J. Z. H. Molecular caps for full quantum mechanical computation of peptide–water interaction energy. *Journal of Computational Chemistry*, v. 24, n. 15, p. 1846–1852, 2003.

- 68 BEZERRA, E. M. *Simulações Computacionais de Biomoléculas: Propriedades Vibracionais da Cisteína, Ligação de inibidores na Acetilcolinesterase e Formação de dímeros da Proteína Beta Amilóide*. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal do Ceará, janeiro 2011.
- 69 COSTA, R. F. *Bioquímica Quântica das Estatinas, Aspirina e Anti-hipertensivos*. Tese (Doutorado) — Universidade Federal do Ceará, Abril 2011.
- 70 COSTA, R. F. da et al. Explaining statin inhibition effectiveness of hmg-coa reductase by quantum biochemistry computations. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, v. 14, 2012.
- 71 QUÉMARD, A. et al. Enzymatic characterization of the target for isoniazid in mycobacterium tuberculosis. *Biochemistry*, v. 34, p. 8235–8241, 1995.
- 72 VILCHÉZE, C. et al. Inactivation of the inha-encoded fatty acid synthase ii (fasii) enoyl-acyl carrier protein reductase induces accumulation of the fasi end products and cell lysis of mycobacterium smegmatis. *J. Bacteriol.*, v. 182, p. 4059–4067, 2000.
- 73 BERMAN, H. et al. *The Protein Data Bank*. 2000. 235–242 p. Disponível em: <www.rcsb.org>.
- 74 HAGLER, A. T. et al. Urey-bradley force field, valence force field, and ab initio study of intramolecular forces in tri-tert-butylmethane and isobutane. *Journal of the American Chemical Society*, v. 101, n. 4, p. 813–819, 1979.
- 75 HAGLER, A. T.; HULER, E.; LIFSON, S. Energy functions for peptides and proteins. i. derivation of a consistent force field including the hydrogen bond from amide crystals. *Journal of the American Chemical Society*, v. 96, n. 17, p. 5319–5327, 1974.
- 76 SCHROEDER, E. K. *Efeito das mutações I16T, I21V, I47T e S94A na afinidade da enzima 2-trans-Enoil-ACP (CoA) redutase de Mycobacterium tuberculosis pelo cofator NADH : estudos por simulação pela dinâmica molecular e docking molecular*. Tese (Doutorado) — Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular., 2004.

-
- 77 VILCHÉZE, C. Altered nadh/nad⁺ ratio mediates coresistance to isoniazid and ethionamide in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 49, n. 2, p. 708–720, 2005.
- 78 VILCHÉZE, C. et al. Transfer of a point mutation in *Mycobacterium tuberculosis inhA* resolves the target of isoniazid. *Nat. Med.*, v. 12, p. 1027–1029, 2006.
- 79 ROUSE, D. A.; LI, Z.; MORRIS, S. L. Characterization of the katg and inha genes of isoniazid-resistant clinical isolates of mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother*, v. 39, n. 11, p. 2472–2477, 1999.
- 80 MIESEL, L. et al. Nadh dehydrogenase defects confer isoniazid resistance and conditional lethality in mycobacterium smegmatis. *J. Bacteriol.*, v. 180, n. 9, p. 2459–2467, 1998.
- 81 MILANO, A. et al. The kate gene, which encodes the catalase hpii of mycobacterium avium. *Mol Microbiol.*, v. 19, n. 1, p. 113–123, 1996.
- 82 MCMURRY, L. M.; MCDERMOTT, P. F.; LEVY, S. B. Genetic evidence that inha of mycobacterium smegmatis is a target for triclosan. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 43, n. 3, p. 711–713, 1999.
- 83 KESSEL, J. C. *Recombineering in Mycobacteria Using Mycobacteriophage Proteins*. [S.l.]: University of Pittsburgh, 2008.