

Artigo**Identificação de Potenciais Inibidores do Antígeno 85C de *Mycobacterium tuberculosis* Oriundos de Fontes Naturais por Ensaios Virtuais****Cerqueira, E. J.; Santana, I. B.; Silva, K. S.; Santos Junior, M. C.****Rev. Virtual Quim.*, 2019, 11 (2), 449-467. Data de publicação na Web: 25 de março de 2019<http://rvq.sbg.org.br>**Identification of Potential Inhibitors of the Antigen 85C of *Mycobacterium tuberculosis* from Natural Resources by Virtual Screening**

Abstract: Tuberculosis, caused by *Mycobacterium tuberculosis*, is one of the deadliest infections in the world and, therefore, the search for new therapeutic alternatives is strongly required. A promising etiological agent's molecular target for drug development is one of the mycolyltransferase enzymes, the 85C antigen (Ag85C), since it is crucial for the biosynthesis of mycolates, essential elements of the bacterial cell wall. In this perception, the present work aimed to identify potential inhibitors against *M. tuberculosis* Ag85C by hierarchical virtual screening. For this, the ZINC15 natural products database was subjected to chemical similarity screening in order to select molecules in biologically relevant space. Subsequently, molecular docking was employed to list the natural products selected in the previous step according to their affinity to the enzyme active site. The complex with the best binding affinity was submitted to Molecular Dynamics (MD) simulation with the aim of evaluating its mechanical stability. Among 100,095 evaluated compounds, the isoxazoline derivative ZINC000107283125 was top ranked (GridScore -84.65 Kcal/mol), and therefore submitted to MD simulations. According to RMSD analysis there was less fluctuation of protein residues in the HOLO form than in the APO form, which indicates that ZINC000107283125 was able to stabilize the protein structure. The observed intermolecular (protein-ligand) interactions were similar to those described in the literature, of these, we highlight the hydrogen bond with Ser125. Therefore, this study contributed for the search of new and more selective and potent drugs against Ag85C.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; antigen 85C; hierarchical virtual screening.**Resumo**

A tuberculose, causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, é uma das infecções mais letais no mundo e, portanto, a busca por novas alternativas terapêuticas é fortemente necessária. Um alvo molecular promissor do agente etiológico para o desenvolvimento de drogas é uma das enzimas mycolyltransferases, o antígeno 85C (Ag85C), visto que ele é crucial para a biossíntese de micolatos, elementos essenciais da parede celular bacteriana. Nesta percepção, o presente trabalho teve como objetivo identificar potenciais inibidores contra o Ag85C de *M. tuberculosis* por meio de triagem virtual hierarquizada. Para isso, o banco de dados de produtos naturais ZINC15 foi submetido à triagem de similaridade química para selecionar moléculas em um espaço biologicamente relevante. Posteriormente, o acoplamento molecular foi empregado para listar os produtos naturais selecionados na etapa anterior de acordo com sua afinidade com o sítio ativo da enzima. O complexo com a melhor afinidade de ligação foi submetido à simulação de Dinâmica Molecular (DM) com o objetivo de avaliar sua estabilidade mecânica. Entre os 100.095 compostos avaliados, o derivado de isoxazolina ZINC000107283125 foi o melhor classificado (GridScore -84,65 Kcal / mol) e, portanto, foi submetido às simulações por MD. De acordo com a análise do RMSD houve menor flutuação de resíduos proteicos na forma HOLO do que na forma APO, o que indica que ZINC000107283125 foi capaz de estabilizar a estrutura da proteína. As interações intermoleculares (proteína-ligante) observadas foram semelhantes àquelas descritas na literatura, das quais, destacamos a ligação de hidrogênio com Ser125. Portanto, este estudo contribuiu para a busca de novos fármacos mais seletivos e potentes contra o Ag85C.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*; antígeno 85C; triagem virtual hierárquica.

* Universidade Estadual de Feira de Santana, Laboratório de Modelagem Molecular da UEFS (LMM-UEFS), CEP 44036-900, Feira de Santana-BA, Brasil.

 mc2500@gmail.com

DOI: [10.21577/1984-6835.20190034](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20190034)

Identificação de Potenciais Inibidores do Antígeno 85C de *Mycobacterium tuberculosis* Oriundos de Fontes Naturais por Ensaios Virtuais

Elivelton de J. Cerqueira, Isis B. Santana, Kryzia S. da Silva, Manoelito C. dos S. Junior*

Universidade Estadual de Feira de Santana, Laboratório de Modelagem Molecular da UEFS (LMM-UEFS), CEP 44036-900, Feira de Santana-BA, Brasil.

* mc2500@gmail.com

Recebido em 6 de março de 2019. Aceito para publicação em 6 de março de 2019

1. Introdução

2. Metodologia

- 2.1. Similaridade química
- 2.2. Acoplamento molecular
- 2.3. Avaliação dos compostos pela Regra de Lipinski
- 2.4. Simulações por dinâmica molecular
- 2.5. Mapas de interações intermoleculares

3. Resultados e Discussão

- 3.1. Similaridade química
- 3.2. Acoplamento molecular
- 3.3. Simulações por dinâmica molecular

4. Conclusões

1. Introdução

A tuberculose (TB), causada pela *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), é considerada uma das doenças mais relevantes para a saúde pública mundial na atualidade, estima-se que em 2016 a incidência foi de 10,4 milhões, incluindo 1,04 milhões de casos entre pessoas positivas para o vírus da imunodeficiência humana (HIV).¹ A TB levou à morte aproximadamente 1,3 milhões de

pessoas em 2016, destas, 374 mil eram HIV-positivas, o que a torna, dentre as doenças infecciosas, a principal causa de morte no mundo.¹ Nas Américas, o Brasil merece destaque por ser o país com a maior carga da doença, dos 274 mil novos casos estimados para 2016, o país foi responsável por 87 mil (32 %), bem como por ter a maior quantidade de pessoas coinfetadas pelo vírus HIV (11 mil), e além disto, por ter um papel político e econômico importante no combate à doença.²

Apesar do aumento da taxa de cura na última década, foram estimados 600 mil novos casos de resistência à rifampicina em 2016.¹ A resistência bacteriana aos fármacos utilizados no tratamento da TB configura um dos principais desafios para o controle da doença. Além do mais, problemas como abandono do tratamento, reações adversas graves e dificuldades de acesso aos medicamentos contribuem significativamente para sua prevalência.³

Haja vista a urgência da busca por novas alternativas terapêuticas no combate a TB, o emprego de estratégias voltadas para a modulação de alvos essenciais à sobrevivência de *Mtb*, bem como a intervenção em processos que aumentem a vulnerabilidade do microrganismo são desejados. Espera-se que tais estratégias limitem a patogênese e favoreçam uma maior eficácia dos mecanismos de defesa do sistema imunológico do hospedeiro, inclusive em associação aos fármacos já utilizados.⁴

No sentido de intervir em vias ligadas à virulência de *Mtb*, as enzimas antígeno 85 (Ag85), exclusivas das micobactérias^{4, 5, 6}, representadas pelas proteínas antígenos 85A, 85B e 85C (Ag85A, Ag85B e Ag85C, respectivamente), apresentam-se como alvos biológicos promissores para fármacos. As Ag85 catalisam a biossíntese do ácido micólico dimicolato de trealose (DMT), a partir de duas moléculas de monomicolato de trealose (MMT). Esses micolatos são elementos essenciais para a composição da parede celular da micobactéria, e as enzimas também os transferem ao arabinogalactano, motivo pelo qual são classificadas como micoliltransferases.

A camada de ácido micólico compõe aproximadamente 60 % do envelope celular e pela característica hidrofóbica configura-se como barreira a fármacos e como mecanismo de defesa ao ambiente hostil de macrófagos do hospedeiro, contribuindo para o surgimento de resistência bacteriana e persistência da doença.⁷

Dentre as enzimas Ag85, a Ag85C é responsável por aproximadamente 40 % da

atividade micoliltransferase, além de, possivelmente, compensar a ausência de atividade das demais representantes.⁴ Contudo, a inibição significativa do crescimento bacteriano foi verificada apenas quando a atividade das três enzimas foi modulada.^{8, 9}

Nesse sentido, a modulação exclusiva da Ag85C é justificada no fato de todas as micoliltransferases apresentarem sítio ativo altamente conservado, com 100 % de identidade para os resíduos da tríade catalítica das três enzimas: Ser124, Glu228 e His260, para Ag85C, e Ser126, Glu230 e His262, para Ag85A e Ag85B, que só apresentam alteração na numeração dos aminoácidos quando se considera a estrutura primária. A alta identidade sequencial do sítio possibilita a modulação de uma das proteínas e a extração para as demais.¹⁰

Um dos métodos de busca por potenciais moduladores proteicos é a triagem virtual, que visa selecionar compostos promissores frente a determinado alvo terapêutico com o intuito de priorizar moléculas com elevado potencial de atividade biológica para os posteriores testes bioquímicos, e também permite a diminuição do tempo de procura e avaliação destes compostos e dos custos associados.¹¹ Nesse contexto, a triagem virtual hierárquica (TVH) apresenta-se como alternativa na avaliação de bibliotecas de compostos químicos, além de reduzir o custo computacional, e melhor direcionar a seleção desses potenciais inibidores.

Como parte da TVH, a similaridade química possibilita a seleção de potenciais inibidores com base na estrutura de inibidores já conhecidos, com isto, diminui-se a chance de encontrar compostos falso-positivos, e, quando se opta por avaliar catálogos de compostos naturais, leva-se em conta tanto a diversidade química intrínseca dos produtos biogênicos como concentra-se a busca no espaço químico biologicamente relevante.¹² Dessa forma, a triagem virtual hierárquica associada a estratégias como acoplamento molecular e dinâmica molecular permite predizer o modo de ligação, por considerar o posicionamento e o tipo de interação

intermolecular realizado entre o composto e o alvo molecular, bem como estima também a afinidade entre eles; e descreve a flexibilidade conformacional de um sistema em função do tempo, pela avaliação da estabilidade e energia do complexo ligante-proteína, numa tentativa de maior aproximação aos fenômenos biológicos^{13,14}. Desta forma, esse trabalho teve como objetivo identificar potenciais inibidores para a Ag85C de Mtb, através da triagem virtual hierárquica de compostos oriundos de fontes naturais.

2. Metodologia

A identificação de potenciais inibidores para a Ag85C foi realizada através de triagem virtual hierárquica (TVH), na qual houve combinação sequencial de estratégias baseadas no ligante (similaridade química) e no alvo molecular biológico (acoplamento molecular), assim como simulações por dinâmica molecular (DM).

2.1. Similaridade química

O conjunto de inibidores com atividade conhecida frente a Ag85C foi obtido tanto no banco de dados do ChEMBL quanto no trabalho de Ibrahim e colaboradores.^{15,16} Dentre os inibidores selecionados foi dada prioridade àqueles mais potentes e, posteriormente, de acordo com sua diversidade estrutural. As moléculas selecionadas foram preparadas no UCSF CHIMERA 1.9,¹⁷ onde foram adicionados hidrogênios juntamente com cargas do tipo Gasteiger (método FF12SB).

As moléculas submetidas à triagem para identificação dos potenciais inibidores foram retiradas do banco de compostos naturais (biogenic), constituído por metabólitos primários e secundários de produtos naturais. Este banco foi obtido do ZINC15, o maior acervo digital de compostos químicos para

estudos de triagem virtual (disponíveis para compra).¹⁸

A triagem virtual por similaridade química foi realizada utilizando como compostos de referência os inibidores da Ag85C selecionados na etapa anterior, analisando-os através do programa DataWarrior 4.2.2 para busca de compostos similares no banco biogenic.¹⁹ Para avaliação dessa estratégia foi empregado o coeficiente de Tanimoto e FragFp.¹¹ como descritor de fingerprint.¹⁹ Foram selecionados os compostos com valores representativos e relevantes de similaridade acima de 0,7.

2.2. Acoplamento molecular

A seleção da estrutura cristalográfica da Ag85C foi realizada no Protein Data Bank (PDB),²⁰ sendo prioritária a proteína com a melhor resolução de qualidade cristalográfica e com ligante complexado (Holo).

Para estudos de acoplamento molecular foram utilizados os programas DOCK 6.7 e Autodock Vina 1.1.2.^{21,22} No programa DOCK 6.7, o preparo da proteína foi realizado no programa UCSF Chimera 1.9, no qual também foram adicionadas as cargas tipo Gasteiger com o campo de força AMBER ff12SB, juntamente com os hidrogênios polares. Por sua vez, no Autodock Vina 1.1.2 os hidrogênios polares juntamente com a carga Gasteiger foram adicionados utilizando o programa Autodock Tools 1.5.6.²³ A correção dos estados de protonação dos resíduos (pH ótimo de catálise = 7,5) foi realizada com auxílio do servidor H++ 3.0.^{24,25}

A avaliação dos parâmetros do acoplamento molecular utilizados nos programas DOCK 6.7 e Autodock Vina 1.1.2 foi baseada no cálculo do desvio da pose do ligante gerada pelos programas e sua respectiva orientação inicial (cristalográfica). Para tanto, utilizou-se o valor de RMSD (do inglês *Root Mean Square Deviation*) < 2,0 Å.²⁶

A delimitação da região de acoplamento molecular utilizada no programa DOCK 6.7 foi

determinada por seus programas acessórios. O DMS foi utilizado para criar a imagem negativa da superfície molecular do sítio ativo, e com isso, o volume do sítio ativo foi estimado com base nas esferas geradas pelo programa SPHGEN, cujo arquivo resultante foi editado para incluir apenas esferas no perímetro de 8,0 Å do ligante cristalográfico. A caixa de acoplamento foi construída de maneira automática pelo SHOWBOX (margem = 5 Å). O programa GRID foi utilizado para gerar a grade de pontuação e a grade de relevo, aplicando os seguintes parâmetros: distância de energia atrativa = 6,0 Å, distância repulsiva de Van der Waals = 9,0 Å, energia interna de repulsão = 9,0 Å e choque de sobreposição = 0,25 Å, os parâmetros restantes foram mantidos nas recomendações padrão do programa. Para o ranqueamento das moléculas, foram avaliadas as funções de pontuação Grid, Contact e Energy.

Para o acoplamento com o Autodock Vina 1.1.2, o Autodock Tools 1.5.6 foi utilizado para construir o espaço de procura (Grid Box), utilizando o ligante cristalográfico como referência, para obter assim um Grid Box com dimensões de 18 x 14 x 14 Å (espacamento = 1 Å) e coordenadas X (-49,6), Y (20,6) e Z (-16,2).

2.3. Avaliação dos compostos pela Regra de Lipinski

Após seleção do programa e realização da triagem virtual baseada na afinidade com a proteína, os compostos melhores ranqueados foram ordenados de acordo o melhor valor de energia de ligação e então classificados segundo a regra dos 5 de Lipinski no servidor Molinspiration 2012.05.^{27,28} Foi estabelecido como critério de exclusão a não conformidade com mais de um dos descritores físico-químicos estabelecidos pela regra.

2.4. Simulações por dinâmica molecular

O composto selecionado como melhor potencial inibidor a partir das etapas anteriores foi submetido a simulações por dinâmica molecular. Antes disso, a preparação do sistema foi feita no pacote de programas GROMACS 5.1.2 empregando-se o método de mecânica molecular com o campo de força GROMOS96 53a6.^{29,30} Os arquivos de coordenadas e topologia da proteína foram criados no pdb2gmx, bem como a adição dos átomos de hidrogênio, de acordo com o pH do ambiente a ser simulado (7,5). Já as coordenadas e a topologia do ligante foram criadas no servidor Automated Topology Builder and Repository (ATB) versão 2.2.³¹ O modelo de solvatação utilizado foi o SPC-e, com caixa de simulação cúbica de dimensões de 5,3 x 4,5 x 4,5 nm e volume de 109,47 nm³. Adicionalmente, algumas moléculas de água foram substituídas por contraíons para a neutralização do sistema. A partir daí, foi implementada a minimização de energia do complexo, utilizou-se o algoritmo Steepest Descent (SD) numa etapa inicial com os movimentos da proteína restringidos, e em outra etapa sem nenhuma restrição, ambas com tolerância energética de 200 kJ/mol. Na sequência, o sistema foi minimizado sem restrição de posições, e com critério de convergência energética de até 100 kJ/mol, pelo algoritmo Gradiente Conjugado (GC).

Após a minimização de energia do sistema, as simulações por DM foram realizadas, com o integrador Verlet³². O complexo foi aquecido à temperatura constante de 300K numa simulação por dinâmica molecular com duração de 1ns, utilizando o algoritmo LINCS³³. Em seguida, nas mesmas condições, foi realizada uma simulação por dinâmica molecular de 30ns, sem restrição.

Para avaliar o equilíbrio mecânico e energético do complexo ao longo da trajetória, foi calculado o desvio médio quadrático padrão (RMSD) dos átomos da cadeia central, bem como, a flutuação desse desvio por resíduo (RMSF). A energia potencial foi utilizada para avaliar se a proteína se mantinha enovelada durante a simulação.

2.5. Mapas de interações moleculares

A análise do padrão de interações intermoleculares foi verificada utilizando o servidor *Protein-Ligand Interaction Profiler* (PLIP).³⁴

Estruturas oriundas de produtos naturais possuem maiores chances de estarem presentes no espaço químico biologicamente relevante, ou seja, moléculas com probabilidade de complementariedade a macromoléculas pertencentes a um espaço biológico envolvendo alvos relacionados a patologias.^{12,35}

3. Resultados e Discussão

3.1. Similaridade química

Para realização da TVH, o passo inicial foi a seleção dos compostos molde para a identificação dos potenciais inibidores. A pesquisa realizada no ChEMBL identificou um total de 35 inibidores da Ag85C, destes, foram selecionados cinco compostos: CHEMBL325304 (I1), CHEMBL118252 (I2), CHEMBL326268 (I3) e CHEMBL227546 (I4) (Tabela 1 e Figura 1), os quais atenderam aos critérios de seleção estabelecidos.¹⁵ Do trabalho de Ibrahim e colaboradores foram selecionados três compostos, identificados como: 13a (I6), 13b (I7) e 14 (I8) (Tabela 2).¹⁶

No momento da coleta (março de 2017), o BIOGENICS compilava mais de 180 mil moléculas e após a retirada das duplicatas o banco foi reduzido para 100.095 moléculas.

Além disso, cerca de 80 % de seus representantes atendem à regra dos cinco de Lipinski e possuem propriedade *drug-like*, ou seja, características aceitáveis de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicológica, fatores que aumentam as chances de passarem pela fase I de ensaios clínicos em humanos; além de apresentarem maior diversidade estrutural.³⁶

A similaridade química parte do princípio de que compostos estruturalmente similares possuem alta probabilidade de apresentarem características físico-químicas e atividade biológica semelhantes.³⁷ Nesse sentido, analisando-se a similaridade das moléculas presentes no BIOGENICS frente aos inibidores selecionados, foi possível observar que para os inibidores I1, I2, I3 e I4 não foram encontrados compostos com similaridade maior que 0,7. Por sua vez, foram obtidas 1.363 moléculas para os inibidores I5, I6 e I7 (Tabela 3).

Tabela 1. Estrutura dos inibidores da Ag85C extraídos do CHEMBL e seus respectivos valores de atividade biológica

Inibidores	IC ₅₀ (μM)	Estrutura Química
I1	1,06	
I2	1,30	
I3	1,47	
I4	2,00	

Tabela 2. Estrutura dos inibidores da Ag85C extraídos do trabalho de Ibrahim e colaboradores e seus respectivos valores de atividade biológica

Inibidores	Valor de K_i (μM)	Estrutura Química
I5	18,2	
I6	34,8	
I7	47,1	

Tabela 3. Quantidade de compostos selecionados por similaridade química.

Inibidores	Quantidade inicial de compostos selecionados	Duplicatas removidas	Quantidade final de compostos selecionados
I1	0	0	0
I2	0	0	0
I3	0	0	0
I4	0	0	0
I5	266	37	229
I6	44	15	29
I7	1142	37	1105
Total Selecionado			1.363

3.2. Acoplamento molecular

Dentre as 13 estruturas cristalográficas de Ag85C, a codificada como 1VA5 (PDB-ID) foi selecionada. Isso se deve ao fato de 1VA5 ser a estrutura com melhor valor de resolução (2,02 Å) e apresentar ligante (octil tioglicosideo - OGS) em seu sítio ortostérico. Estruturas cristalográficas com resolução satisfatória garantem maior confiabilidade entre as ligações interatômicas e a presença do ligante cristalográfico facilita as estratégias para os estudos de acoplamento molecular.³⁸

Os reacoplamientos realizados com o objetivo de avaliar a orientação e o posicionamento espacial do OGS em relação a

pose cristalográfica inicial foram os seguintes: no programa Autodock Vina 1.1.2 foi obtido RMSD = 3,04 Å (Figura 1A); Já no DOCK 6.7, para a função de pontuação *Grid Score*, RMSD = 1,23 Å (Figura 1B), para a *Contact Score*, RMSD = 2,42 Å (Figura 1C), e para a *Energy Score*, RMSD = 1,90 Å (Figura 1D).

Tendo em vista um valor de referência de RMSD < 2 Å para que a geração da pose do ligante em relação ao ligante cristalográfico fosse considerada satisfatória,²⁶ e assim, se garantisse a precisão do método para a etapa de triagem por acoplamento molecular dos potenciais inibidores, a função de pontuação *Grid Score* do DOCK (Figura 1B) foi a selecionada.

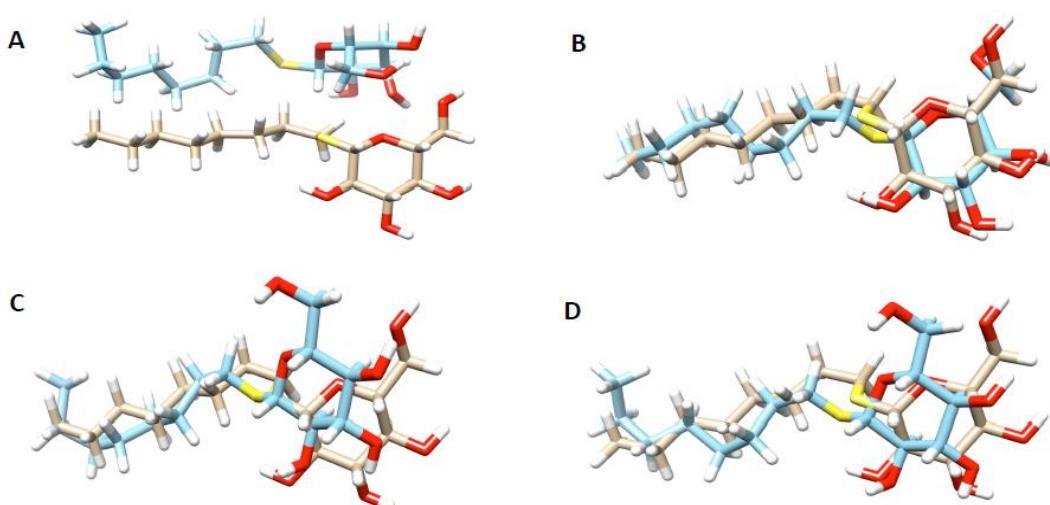


Figura 1. Disposição espacial do OGS no reacoplamento com os programas de acoplamento molecular/funções de pontuação: Autodock Vina (A); *Grid Score* (B); *Contact Score* (C) e *Energy Score* (D). Em bege, o ligante cristalográfico em sua posição original; em azul, a pose gerada pelo programa

O acoplamento molecular visa, de maneira geral, verificar o modo de ligação, levando em consideração o posicionamento e o tipo de interação intermolecular realizado entre um ligante e um alvo molecular, estimando também a afinidade entre eles.²¹

Após o acoplamento molecular, os compostos melhores ranqueados foram classificados de acordo com a regra dos 5 de Lipinski, que avalia o perfil de biodisponibilidade por via oral através da

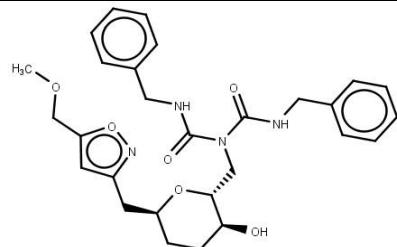
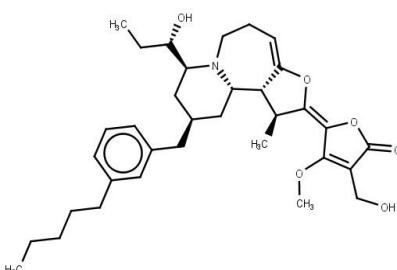
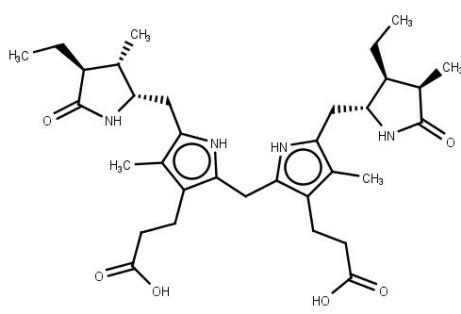
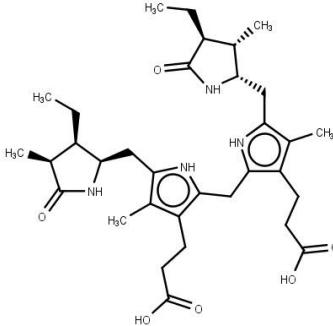
aplicação dos seguintes critérios: Peso Molecular (PM) não deve ser superior a 500 Da; Log P menor ou igual a 5; número de átomos aceitadores de ligação de hidrogênio, do inglês *Hydrogen Bond Acceptor* (HBA), menor ou igual a 10; e número de átomos doadores de hidrogênio, do inglês *Hydrogen Bond Donor* (HBD), deve ser no máximo 5.³⁹

Com isto, os cinco compostos melhores classificados (Tabela 4) foram selecionados como promissores para a inibição da atividade

da Ag85C, dos quais o ZINC000107283125 foi designado para análise das interações intermoleculares, descritas na figura 3. Destaca-se que um desses compostos apresentou 3 enantiômeros, de modo que estes foram agrupados e considerados

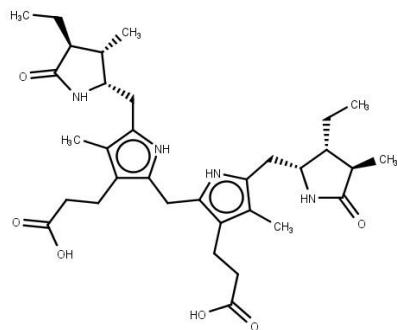
relevantes por possuírem valores de energia de afinidade próximos e atenderem aos critérios adotados pela regra dos 5 de Lipinski. Desse modo, foram selecionados 08 compostos como promissores.

Tabela 4. Compostos melhor ranqueados no acoplamento molecular com a função de pontuação *Grid Score*, após aplicação do filtro de Lipinski

Código	Grid Score (Kcal/mol)	Compostos
ZINC000107283125	-84,65	
ZINC000085532485	-84,62	
ZINC00008551906 ¹	-84,58	
ZINC00008551907 ¹	-84,39	

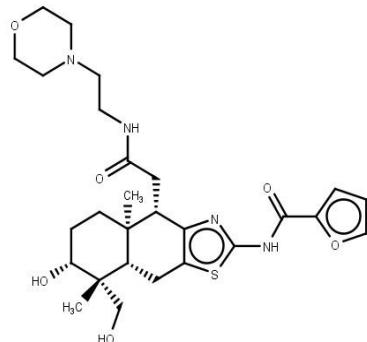
ZINC000008551905¹

-83,83

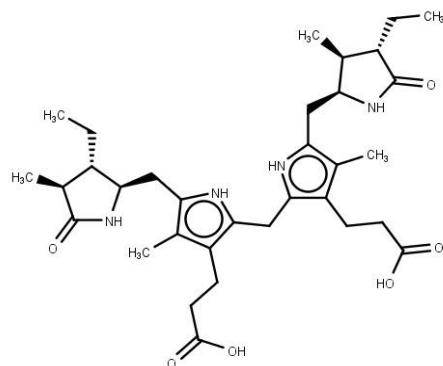


ZINC000035978075

-82,82

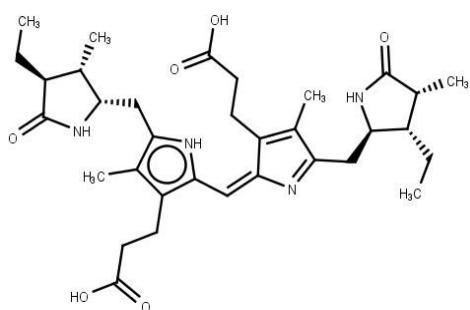
ZINC000008551908¹

-82,55



ZINC000032789734

-82,22

¹Estruturas relacionadas.

O composto ZINC000107283125 (Figura 2), melhor ranqueado, apresentou interações hidrofóbicas com os resíduos Trp159, Leu162, Ile163, Leu165, Ala166, Asp169, Leu228, Trp266, principalmente a partir de seus anéis terminais. Este composto realizou apenas ligações de hidrogênio do tipo acceptora entre: o átomo de oxigênio do anel isoxazol e a

amina do resíduo Gly40 e o átomo de nitrogênio do mesmo anel e os grupamentos amino da *backbone* dos resíduos Leu41 e Arg42; a amina de uma das extremidades e a amina terminal da Arg42; o átomo de oxigênio do grupo metoxi terminal e a amina terminal do resíduo Asn53; e entre uma das carbonilas centrais e a hidroxila da Ser125. Nele também

foi observado a formação de uma interação de empilhamento π do tipo paralela entre um dos

anéis terminais do composto e o anel da Phe151.

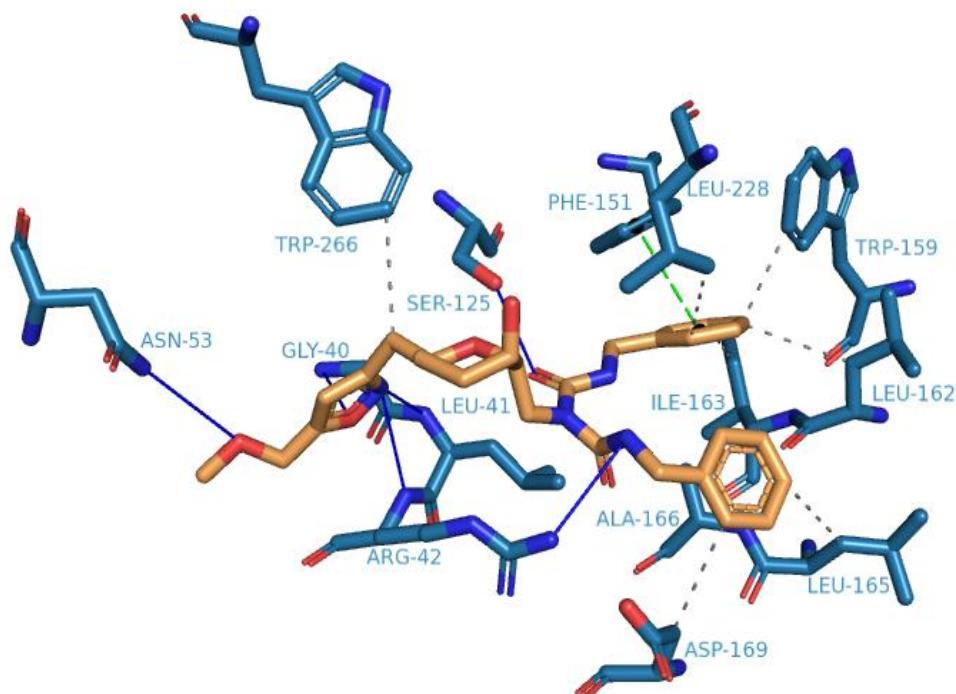


Figura 2. Mapa 3D de interações intermoleculares do composto ZINC85627062 com a Ag85C do acoplamento molecular. Linha preenchida azul: ligação de hidrogênio. Linha tracejada cinza: interação hidrofóbica. Linha tracejada verde: empilhamento π paralela

3.3. Simulações por dinâmica molecular

O acoplamento molecular fornece informações quanto ao modo de interação e a energia de afinidade entre um complexo ligante-proteína. No entanto, limitações são observadas na descrição da flexibilidade e estabilidade desse complexo e o papel do solvente nesse sistema. Tendo em vista essa realidade, a DM é uma ferramenta útil para a investigação dessas características, tornando mais completo o conhecimento acerca do comportamento desse sistema, numa tentativa de aproximação aos fenômenos biológicos.⁴⁰

Nesse estudo, a DM foi utilizada para descrever a flexibilidade conformacional, a estabilidade e a energia do complexo formado entre o composto ZINC000107283125 e a

Ag85C em função do tempo, além de mensurar o modo de ligação, levando em consideração o posicionamento e o tipo de interação intermolecular realizada entre o ligante e a proteína.

Inicialmente foi avaliada a estabilidade durante a simulação de 30 ns através da análise da energia do sistema, tanto para a Ag85C em sua forma APO (sem o ligante) quanto para a forma HOLO (complexada). Observou-se que para ambos os sistemas a energia total manteve-se em torno de -6,7 kJ/mol, certificando o enovelamento da proteína durante todo o tempo de simulação.

Em seguida, a estabilidade estrutural foi avaliada pelos valores de RMSD (Figura 3), indicando a variação de cada átomo da cadeia *backbone* em relação a estrutura de partida. Nas duas simulações, o RMSD da fase produtiva se manteve dentro da faixa de 3 \AA ,

o que indica a equilização do sistema dentro desse patamar até o fim da simulação.¹⁴ Verificou-se que a forma APO estabilizou a partir de 14 ns de simulação, apresentando no início da estabilização, RMSD por volta de 2,5 Å, com o alcance máximo de aproximadamente 3,1 Å e término em torno

de 2,7 Å (valor predominante durante a fase produtiva), com variação total em torno de 2,7 Å. Já a forma HOLO estabilizou a partir de 11 ns, com predominância de 2,2 Å em toda fase produtiva e um aumento ao final da simulação até a faixa de 2,5 Å, com variação total em torno de 2,2 Å.

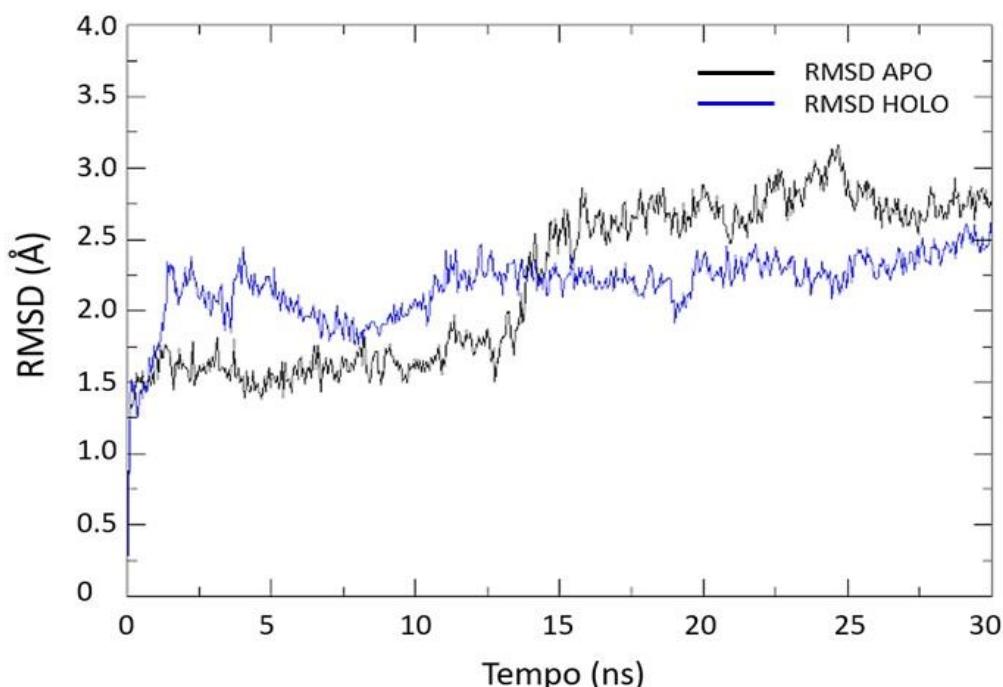


Figura 3. Representação gráfica do RMSD para a cadeia central das formas APO e HOLO da Ag85C durante a simulação por DM

Sendo assim, constatou-se que a acomodação do ligante no sítio ativo da enzima proporcionou maior estabilidade em relação à proteína livre. O que possivelmente ocorreu devido a influência direta das interações intermoleculares na oscilação das posições atômicas, em especial, no sítio ativo.

A análise do RMSD demonstrou a estabilidade dos sistemas, contudo, foi necessário verificar a contribuição de determinadas regiões da proteína para um maior detalhamento e melhor compreensão do comportamento do sistema. Desse modo, o RMSF (do inglês *Root Mean Square Fluctuation*) dos resíduos da cadeia central (Figura 4), auxiliou no entendimento de como

o composto ZINC000107283125 influenciou na estabilidade de determinadas regiões da estrutura. As regiões de alça são conhecidas por sua maior instabilidade conformacional em relação às demais estruturas secundárias predominantes em proteínas.⁴¹ Em consonância com essa afirmativa, as regiões com maiores flutuações no gráfico de RMSF foram aquelas correspondentes às alças da Ag85C.

A proteína APO apresentou desvio padrão médio de 9,5 Å, já o complexo de 5,3 Å (Figura 4). Logo, pode-se afirmar que ZINC000107283125 foi capaz de induzir modificações conformacionais e, de modo geral, tendeu a estabilizar a estrutura.

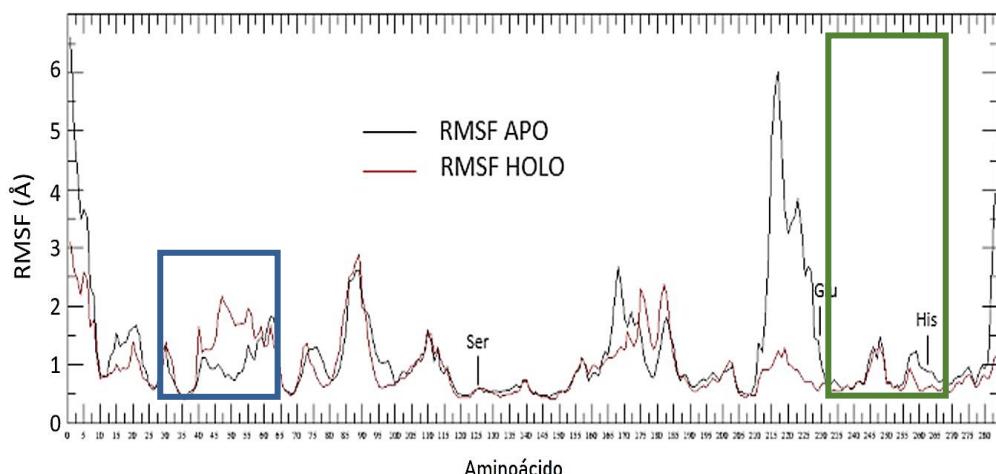


Figura 4. Representação gráfica do RMSF para a cadeia central das formas APO e HOLO durante a simulação por DM, resíduos da tríade catalítica e regiões de alça localizadas no sítio ativo em destaque

Quanto aos resíduos da tríade catalítica, Ser125 apresentou flutuação semelhante nas representações APO e HOLO, entretanto Glu229 e His261, no complexo, tiveram menor flutuação que na proteína livre. Além desses resíduos, algumas regiões da proteína merecem destaque. Dentre essas, está a região compreendida entre os resíduos Asp39 e Ala56 (Figura 4, retângulo azul), na qual a flutuação dos resíduos do complexo (especialmente os que compreenderam resíduos do sítio de ligação do substrato e resíduos adjacentes ao mesmo) foi maior. A grande diferença de flutuação tende a ser decorrente do efeito induutivo que a acomodação do ligante pode causar.

Evidencia-se também a proeminente diferença de flutuação na região entre Asn212 e Gly230 (Figura 4, retângulo verde), localizada, também, na região do sítio de ligação do substrato, contudo com uma menor flutuação para o complexo Ag85C-ZINC000107283125. Neste caso, parece que a formação de ligações intermoleculares fortes, como por exemplo, ligações de hidrogênio, associadas ao efeito estérico causado pela presença do ligante, foram responsáveis pelo deslocamento dos resíduos. Na figura 5 estão evidenciadas as regiões entre Asp39 e Ala56, e Asn212 e Gly230, as quais foram verificadas como as de maior flutuação e de relevância para o estudo.

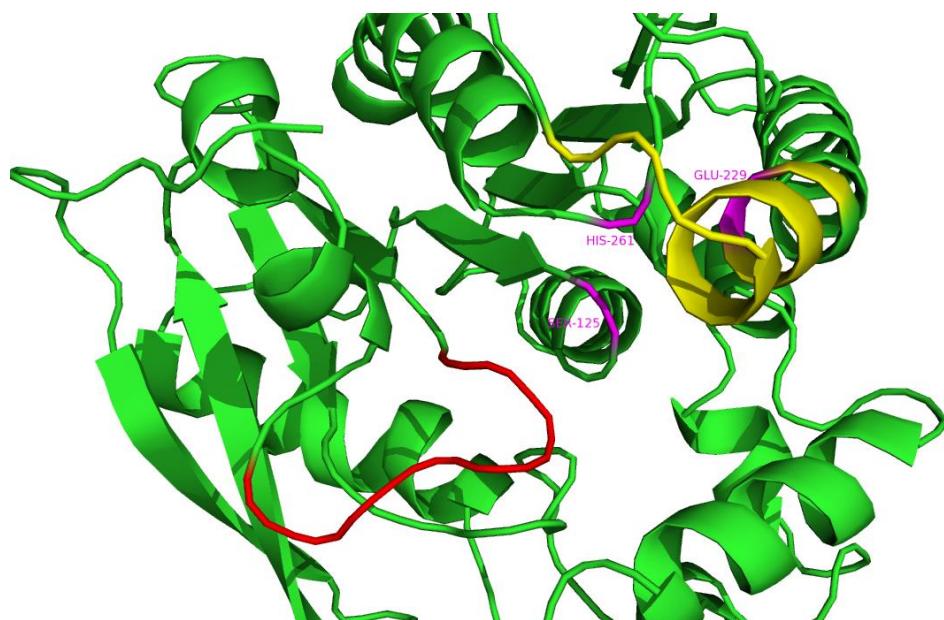


Figura 5. Representação gráfica das regiões de maior flutuação. Em vermelho, os resíduos do sítio ativo da região entre Asp39 e Ala56; em amarelo, os resíduos do sítio ativo da região entre Asn121 e Gly230; e em magenta, a tríade catalítica

No intuito de extrair uma estrutura representativa do complexo e, assim, avaliar suas interações intermoleculares, foi implementada a seguinte estratégia: todas as estruturas na trajetória produtiva da dinâmica - após os 11 ns - (considerando apenas a movimentação da cadeia central da proteína - *backbone*) foram agrupadas de acordo com os valores de RMSD (ponto de corte de 0,15 nm). Com isto, foram obtidos 13 grupos, e uma estrutura central do grupo mais populoso foi escolhida, o qual continha 137 representantes.

A partir da estrutura representativa foi possível verificar que ZINC000107283125 (Figura 6), realizou interações hidrofóbicas com os resíduos Trp159, Leu162, Leu165, Leu228. Destaca-se que os quatro resíduos participantes das interações hidrofóbicas, após a DM, coincidiram com os resíduos verificados no acoplamento molecular, incluindo a região do composto envolvido nessas interações: os dois anéis terminais. Observou-se também a realização de ligações de hidrogênio do tipo acceptora entre o grupamento amida do anel isoxazol do composto e a hidroxila da Ser125; a hidroxila do anel central e a amina da Ala225; e a

mesma hidroxila, contudo, com o nitrogênio da amida da Asn222. A hidroxila do anel central do composto também realiza ligação de hidrogênio, só que do tipo doadora, com o oxigênio carbonílico da amida da Asn222. Enfatiza-se que a ligação de hidrogênio entre ZINC000107283125 e a Ser125 também ocorreu no acoplamento molecular.

Vale ressaltar que os resíduos Asn222 e Ala225 estão na faixa que compreendeu a principal diferença de flutuação entre as estruturas APO e HOLO na análise do RMSF, portanto, confirma-se que essas ligações de hidrogênio contribuíram diretamente para a maior estabilização, naquela região, do complexo em relação à proteína livre.

É importante destacar que os estudos detectaram os resíduos Leu41, Arg42, Ser125, Phe151, Trp159, Leu162, Leu228, His261 e Trp263 como relevantes para o reconhecimento do substrato e/ou inibição da atividade da Ag85C,^{10,16} os quais corroboraram com os achados do acoplamento molecular e da DM. Destes resíduos, a Ser125 merece maior atenção, pois o mecanismo de catálise proposto para a Ag85C indica que o átomo de oxigênio da serina está envolvido no ataque nucleofílico

ao intermediário acil, e a literatura aponta a serina como um aminoácido crítico para o adequado funcionamento da enzima.⁴²

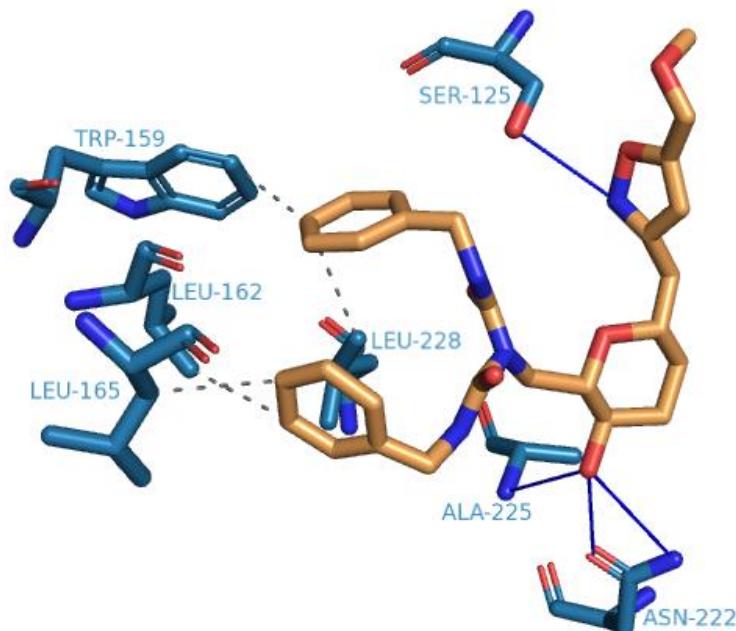


Figura 6. Mapa 3D de interações intermoleculares do composto ZINC85627062 com a estrutura representativa da Ag85C após a DM. Linha preenchida azul: ligação de hidrogênio. Linha tracejada cinza: interação hidrofóbica

Os resultados dos estudos virtuais para a Ag85C do *M. tuberculosis* foram promissores devido à identificação da ligação de hidrogênio com a Ser125. Esse achado destaca-se também pelo fato desse tipo de ligação predizer padrões de seletividade, dada a dependência de estrita angulação e distância entre os átomos para sua realização.

Diante dos dados apresentados, tanto ligados ao comportamento da proteína, na presença do ligante ou não, quanto aqueles relacionados às interações intermoleculares, é possível afirmar que ZINC85627062 estabilizou a Ag85C ao estabelecer interações (interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio) com resíduos importantes para atividade micolittransferase, já descritos como de relevância para o reconhecimento do substrato no sítio ativo e para a inibição de sua atividade, evidenciadas pelas mudanças de conformação.

4. Conclusões

A abordagem baseada na triagem virtual hierárquica pode, de forma significativa, diminuir o tempo de busca por um potencial inibidor da Ag85C e o custo computacional associado à mesma, por reduzir o número de compostos de uma biblioteca e ao mesmo tempo garantir diversidade química dos selecionados para serem submetidos ao acoplamento molecular.

A aplicação da similaridade química reduziu o banco de compostos naturais (biogenic) para aproximadamente 1,5 % do tamanho inicial, e por se basear em inibidores já conhecidos, direcionou a seleção de estruturas químicas pertencentes a um espaço químico biologicamente relevante para a Ag85C, minimizando a possibilidade de falso-positivos.

O uso da função de pontuação *Grid Score* permitiu selecionar 8 possíveis inibidores, dos quais ZINC000107283125 foi o melhor ranqueado segundo a energia de afinidade e, paralelamente, classificado com maior capacidade para apresentar alta biodisponibilidade por via oral.

Com os resultados da DM, foi possível verificar que tanto a Ag85C quanto o seu complexo com ZINC000107283125 mantiveram-se estáveis durante a fase produtiva e que o composto conferiu maior estabilidade ao sistema. Em associação aos resultados do acoplamento molecular, interações importantes para o reconhecimento no sítio ativo e inibição da atividade da Ag85C foram mimetizadas, com destaque para a ligação de hidrogênio realizada com Ser125, resíduo participante do mecanismo catalítico.

Assim, os estudos realizados contribuíram para a pesquisa de novos candidatos a fármacos mais seletivos e potentes frente a Ag85C e, possivelmente, às demais proteínas antígeno 85 de Mtb.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao apoio financeiro da Universidade Estadual de Feira de Santana por garantir as condições e materiais necessários para a realização desse trabalho.

Referências Bibliográficas

¹ World Health Organization (WHO). *Global tuberculosis report*. 22a. Ed. Geneva: WHO, 2017.

² Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde departamento de vigilância das doenças transmissíveis. *Brasil livre da tuberculose: plano nacional pelo fim da tuberculose como problema de saúde pública*. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

³ Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de vigilância epidemiológica. *Manual de recomendações para o controle da tuberculose no brasil*. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

⁴ Jackson, M.; Raynaud, C.; Lanéelle, M. A.; Guilhot, C.; Laurent-Winter, C.; Ensergueix, D.; Gicquel, B.; Daffé, M. Inactivation of the antigen 85c gene profoundly affects the mycolate content and alters the permeability of the *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope. *Molecular Microbiology* **1999**, *31*, 1573. [CrossRef] [PubMed]

⁵ Belisle, J. T.; Vissa, V. D.; Sievert, T.; Takayama, K.; Brennan, P. J.; Besra, G. S. Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science* **1997**, *276*, 1420. [CrossRef][PubMed]

⁶ Ronning, D. R.; Klabunde, T.; Besra, G. S.; Vissa, V. D.; Belisle, J. T.; Sacchettini, J. C. Crystal structure of the secreted form of antigen 85c reveals potential targets for mycobacterial drugs and vaccines. *Nature Structural Biology* **2000**, *7*, 2. [CrossRef][PubMed]

⁷ Marrakchi, H.; Lanéelle, Marie-Antoinette; Daffé, M. Mycolic acids: structures, biosynthesis, and beyond. *Chemistry & Biology* **2014**, *21*, 67. [CrossRef][PubMed]

⁸ Harth, G.; Horwitz, M. A.; Tabatadze, D.; Zamecnik, P. C. Targeting the *Mycobacterium tuberculosis* 30/32-kDa mycolyl transferase complex as a therapeutic strategy against tuberculosis: proof of principle by using antisense technology. *Proc Natl Acad Sci USA* **2002**, *99*, 15614. [CrossRef][PubMed]

⁹ Puech, V.; Guilhot, C.; Perez, E.; Tropis, M.; Armitige, L. Y.; Gicquel, B.; Daffé, M. Evidence for a partial redundancy of the fibronectinbinding proteins for the transfer of mycoloyl residues onto the cell wall arabinogalactan termini of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology* **2002**, *44*, 1109. [CrossRef][PubMed]

¹⁰ Ronning, D. R.; Vissa, V.; Besra, G. S.; Belisle, J. T.; Sacchettini, J. C. *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85a and 85c structures

- confirm binding orientation and conserved substrate specificity. *The Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 36771. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ¹¹ Rodrigues, R. P.; Mantoani, S. P.; De Almeida, J. R.; Pinsetta, F. R.; Semighini, E. P.; Da Silva, V. B.; Da Silva, C. H. P. Estratégias de triagem virtual no planejamento de fármacos. *Revista Virtual de Química* **2012**, *4*, 739. [\[CrossRef\]](#)
- ¹² Harvey, A. L.; Edrada-Ebel, R.; Quinn, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nature Reviews Drug Discovery* **2015**, *14*, 111. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ¹³ Tang, Y. T.; Marshal, G. R. Virtual screening for lead discovery. *Drug design and discovery* **2011**, *716*, 1. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ¹⁴ Verli, H.; Dinâmica molecular. Em *bioinformática da biologia à flexibilidade molecular*. 1a. ed., SBBQ: Porto Alegre, 2014.
- ¹⁵ Bento, A. P.; Gaulton, A.; Hersey, A.; Bellis, L. J.; Chambers, J.; Davies, M.; Krüger, F. A.; Light, Y.; Mak, L.; Mcglinchey, S.; Nowotka, M.; Papadatos, G.; Santos, R.; Overington, J. P. The ChEMBL bioactivity database: an update. *Nucleic Acids Research* **2014**, *42*, 1083. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ¹⁶ Ibrahim, D. A.; Boucau, J.; Lajiness, D. H.; Veleti, S. K.; Trabbic, K. R.; Adams, S. S.; Ronning, D. R.; Scheck, S. J. Design, synthesis, and x-ray analysis of a glycoconjugate bound to *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85c. *Bioconjugate Chemistry* **2012**, *23*, 2403. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ¹⁷ Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* **2004**, *25*, 1605. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ¹⁸ Sterling, T.; Irwin, J. J. Zinc 15 – ligand discovery for everyone. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2015**, *55*, 2324. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ¹⁹ Sander, T.; Freyss, J.; Von Korff, M.; Rufener, C. Datawarrior: an open-source program for chemistry aware data visualization and analysis. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2015**, *55*, 460. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ²⁰ Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* **2000**, *28*, 235. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ²¹ Lang, P. T.; Moustaka, D.; Brozell, S.; Carrasca, N.; Mukherjee, S.; Balus, T.; Allen, W. J.; Holden, P.; Pegg, S.; Raha, K.; Shivakumar, D.; Rizzo, R.; Case, D.; Shoiche, B.; Kuntz, I. Dock 6.7 users manual. *Regents of the University of California* 2015.
- ²² Trott, O.; Olson, A. J. Autodock vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry* **2010**, *31*, 455. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ²³ Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. Autodock4 e autodocktools4: automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry* **2009**, *31*, 2785. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ²⁴ Boucau, J.; Sanki, A. K.; Voss, B. J.; Scheck, S. J.; Ronning, D. R. A coupled assay measuring *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85c enzymatic activity. *Analytical Biochemistry* **2009**, *385*, 120. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ²⁵ Anandakrishnan, R.; Aguilar, B.; Onufriev, A. V. H++3.0: automating pk prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations. *Nucleic Acids Research* **2012**, *40*, w537. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ²⁶ Brozell, S. R.; Mukherjee, S.; Balus, T. E.; Roe, D. R.; Case, D. A.; Rizzo, R. C. Evaluation of dock 6 as a pose generation and database enrichment tool. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **2012**, *26*, 749. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ²⁷ Lipinski, C. A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug*

- Discovery Today: technologies* **2004**, 1, 4. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ²⁸ Ertl, P. Molecular structure input on the web. *Journal of Cheminformatics* **2010**, 2, 1. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ²⁹ Pronk, S.; Páll, S.; Schulz, R.; Larsson, P.; Bjelkmar, P.; Apostolov, R.; Shirts, M. R.; Smith, J. C.; Kasson, P. M.; Van Der Spoel, L. D.; Hess, B.; Lindahl, E. Gromacs 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics (oxford, england)* **2013**, 29, 845. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ³⁰ Oostenbrink, C.; Villa, A.; Mark, A. E.; Van Gunsteren, W. F. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the gromos force-field parameter sets 53a5 and 53a6. *Journal of Computational Chemistry* **2004**, 25, 1656. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ³¹ Koziara, K. B.; Stroet, M.; Malde, A. K.; Mark, A. E. Testing and validation of the automated topology builder (atb) version 2.0: prediction of hydration free enthalpies. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **2014**, 28, 221. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ³² Verlet, L. Computer "experiments" on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. *Physical Review* **1967**, 158, 1. [\[CrossRef\]](#)
- ³³ Hess, B.; Bekker, H.; Berendsen, H. J. C.; Fraaije, J. G. E. M. Lincs: a linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of Computational Chemistry* **1997**, 18, 1463. [\[CrossRef\]](#)
- ³⁴ Salentin, S.; Schreiber, S.; Haupt, V. J.; Adasme, M. F.; Schroeder, M. Plip: fully automated protein-ligand interaction profiler. *Nucleic Acids Research* **2015**, 43, w443. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ³⁵ Wess, G.; Urmann, M.; Sickenberger, B. Medicinal chemistry: challenges and opportunities. *Angewandte Chemie International Edition in English* **2001**, 40, 3341. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ³⁶ Quinn, R. J.; Carroll, A. R.; Pham, N. B.; Baron, P.; Palframan, M. E.; Suraweera, L.; Pierens, G. K.; Muresan, S. Developing a drug-like natural product library. *Journal of Natural Products* **2008**, 71, 464. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ³⁷ Johnson, M. A.; Maggiora, G. M.; *Concepts and applications of molecular similarity*, Wiley: New York, 1990.
- ³⁸ Protein Data Bank. Guide to understanding pdb data: resolution. Disponível em: <<http://pdb101.rcsb.org/learn/guide-to-understanding-pdb-data/resolution>>. Acesso em: 3 agosto 2016.
- ³⁹ Nogueira, L. J.; Montanari, C. A.; Donnici, C. L. Histórico da evolução da química medicinal e a importância da lipofilia: de Hipócrates e Galeno a Paracelsus e as contribuições de Overton e de Hansch. *Revista Virtual de Química* **2009**, 1, 3. [\[CrossRef\]](#)
- ⁴⁰ Namba, A. M.; Silva, V. B.; Silva, C. H. T. P. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. *Ecletica Química* **2008**, 33, 13. [\[CrossRef\]](#)
- ⁴¹ Nelson, D. L.; Cox, M. M.; *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 5a. Ed. Porto alegre: Artmed, 2011.
- ⁴² Gahoi, S.; Mandal, R. S.; Ivanisenko, N.; Shrivastava, P.; Jain, S.; Singh, A. K.; Raghunandanan, M. V.; Kanchan, S.; Taneja, B.; Mandal, C.; Ivanisenko, V. A.; Kumar, A.; Kumar, R.; Open Source Drug Discovery Consortium, Ramachandran, S. Computational screening for new inhibitors of *Mycobacterium Tuberculosis* mycolyltransferases antigen 85 group of proteins as potential drug targets. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* **2013**, 31, 30. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)