

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

ÍCARO ARIEL SIMON

**DESENVOLVIMENTO DE INIBIDORES DA BIOSÍNTESE DE PETROBACTINA:
DEIDROSHIKIMATO DESIDRATASE COMO ALVO DE TERAPIAS ANTI-
ANTRAZ**

Porto Alegre, 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

ÍCARO ARIEL SIMON

**DESENVOLVIMENTO DE INIBIDORES DA BIOSSÍNTESE DE PETROBACTINA:
DEIDROSHIKIMATO DESIDRATASE COMO ALVO DE TERAPIAS ANTI-
ANTRAZ**

Trabalho de conclusão apresentado junto à atividade de ensino “Trabalho de Conclusão de Curso – QUI” do curso de Química como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Química.

Prof. Dr. Paulo Augusto Netz
Orientador

Porto Alegre, 2015

AGRADECIMENTOS

Àquele cujo nome desconheço e cuja compreensão vai muito além da minha capacidade, por meio de quem cada átomo, cada reação, cada molécula – inclusive as enzimas – vieram a existir. Cada palavra deste texto é um pequeno milagre, que só há de ocorrer uma única vez na história desse Universo até onde sabemos, por isso, ainda que eu tente me convencer de que tudo é uma mera casualidade, meus olhos e meu coração sempre irão me contrariar. Obrigado pela força, coragem e inspiração e por toda a bondade, misericórdia e graça para com este pequeno grão de poeira que sou.

Ao meu orientador, Dr. Paulo A. Netz, por aceitar o desafio que propus há um ano, quando ainda estávamos cada um em um canto diferente do Mundo. Muito obrigado por todo ensino, suporte e compreensão. Uma vez me disseste: quem não arrisca, não petisca. Obrigado por ter se arriscado!

Ao Dr. Andrew Koppisch e sua esposa Dra. Cindy Browder da Northern Arizona University (Flagstaff, Estados Unidos) por aceitarem esse *Brazilian* no seu grupo de pesquisa e em suas vidas durante meio ano e por acreditarem no meu potencial, ajudando-me a apresentar esse trabalho na 249^o Reunião Anual da American Chemical Society. Andy, valeu pelos inúmeros cafés, as boas conversas e rodadas de Flagstaff IPA!

À Vanessa Petry por toda a ajuda e suporte me ensinando a operar as máquinas e rodar os programas no período em que o Prof. Netz ainda estava na Alemanha.

Aos meus pais e minha família pelo suporte emocional e financeiro, não necessariamente nessa ordem. Obrigado por me incentivarem a correr atrás desse meu sonho louco de me tornar um químico. Eu não seria nada sem vocês!

Aos grandes mestres que iluminaram minha jornada orientando, instruindo e compartilhando comigo seu conhecimento, Dra. Jaqueline Argüello, Dr. João Henrique Zimnoch, Dra. Leandra Campo, Dra. Fernanda Stedile e demais professores do IQ.

Aos amigos por todo o incentivo, compreensão e por me ajudarem rir em alguns momentos que o mais provável seria chorar: Marlon, Greice, Camila, Filipe, Lucas M., Allan, Julia, Silvana, Diéssica, Cristiano, Victor, Sandra, Aline, Dani, Raul, Eduarda, Molly, Tyler, Joy, Jasmine e tantos outros amigos e colegas... A vida não seria a mesma sem vocês!

Por fim, mas não menos importante, ao Brasil e aos brasileiros pelo financiamento público de toda a minha educação, desde o nível pré-escolar à Universidade, inclusive pela assistência estudantil da UFRGS, bolsa de intercâmbio Ciência sem Fronteiras CAPES, auxílios financeiros da Propesq-UFRGS para participação em congressos, bolsas de iniciação científica e de monitoria.

“Ousar é perder o equilíbrio momentaneamente. Não ousar é perde-se definitivamente.”

(Søren Kierkegaard)

RESUMO

O *Bacillus anthracis*, bactéria causadora do antraz, se constitui uma importante ameaça como agente de bioterrorismo. A elucidação recente do mecanismo de biossíntese da petrobactina – molécula essencial na aquisição de ferro por esse micro-organismo – indicou a possibilidade de inibição da enzima *desidroshikimato desidratase* no desenvolvimento de medicamentos anti-antraz. Assim, uma biblioteca de 48 moléculas foi estudada *in vitro* e *in silico* por docking e dinâmica molecular a fim de se descobrir potenciais inibidores, compreender-se as propriedades relacionadas com a resposta biológica e obter-se um modelo capaz de predições quantitativas para o desenho de moléculas com ação antibacteriana aprimorada. A enzima foi superexpressada por DNA recombinante, isolada, purificada e utilizada nos ensaios físico-químicos de inibição. O docking molecular foi realizado com o programa AutoDock Vina ao passo que a simulação de dinâmica molecular foi realizada com o pacote de programas Gromacs e campo de forças Amber03, durante 60 ns. Vinte e cinco compostos apresentaram potencial inibitório mensurável com destaque para o ácido gálico (IC₅₀ de 4,4 µM) e o produto enzimático 3,4-DHB (IC₅₀ de 38 µM), retroinibidor. Carboxilato livre e hidroxila na posição *três* de um anel aromático demonstram ser as características estruturais mais importantes na ação inibitória. Baixa correlação entre IC₅₀ e o escore de *docking* foi observada, ainda que uma tendência coerente seja percebida, possivelmente pela desconsideração da flexibilidade do receptor. O ácido gálico forma cinco ligações de hidrogênio (LHs) com os resíduos Tyr-217, Arg-102, His-144, His-175 e Phe-211 do sítio ativo. Pouca alteração estrutural foi observada durante a simulação de DM, porém a análise de RMSF e do padrão de interações sugere alterações conformacional importantes do sítio ativo capazes de alterar os modos de ligação. O ácido gálico interage com uma média de 4,51 ligações de hidrogênio, enquanto o produto forma em média de 2,10 LHs e o substrato uma média de 1,92 ligações, números significativamente relacionados com as afinidades experimentais, sugerindo que um composto capaz de maximizar o número médio de LHs atuaria como inibidor ainda mais potente do que o ácido gálico.

Palavras-chave: *Bacillus anthracis*, desidroshikimato desidratase, inibidores, *docking*, dinâmica molecular.

LISTA DE ACRÔNIMOS E ABREVIATURAS

3-DHS	ácido 3-dehidroshikímico ou 3-dihidroshikimato
3,4-DHB	ácido 3,4-dihidroxibenzóico ou 3,4-dihidroxibenzoato
ADT	AutoDockTools
AsbF	deidroshikimato desidratase (grupo gênico)
BSA	albumina de soro bovino
DM	dinâmica molecular
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfônico
IC ₅₀	concentração inibitória média
IPTG	isopropyl- β -D-1-tiogalactopiranosídeo
LB	meio de cultura Luria-Bertani
LH	ligação de hidrogênio
MES	ácido 2-N-morfolino-etanosulfônico
NTA	ácido nitrilotriacético
OD ₆₀₀	densidade ótica em 600 nm
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
PDB	banco de dados de proteínas
PMSF	fluoreto de fenilmetanosulfonila
RMSD	deslocamento quadrático médio
RMSF	mobilidade quadrática média
SDS	dodecil sulfato de sódio
TRIS	2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estruturas da bacilobactina (a) e petrobactina (b).....	11
Figura 2 – Desidratação do ácido 3-dehidroshikímico catalisada pela enzima AsbF	12
Figura 3 – Estrutura cristalográfica da enzima DHS desidratase de <i>B. anthracis</i> , conforme depositada por Pflieger e colaboradores no <i>Protein Data Bank</i> (PDB ID: 3DX5)	13
Figura 4 – Mecanismo proposto para a catálise enzimática da desidratação de ácido 3-dehidroshikímico a ácido 3,4-dihidroxibenzóico	13
Figura 5 – Padrão de ligações de hidrogênio que forma a estrutura de uma hélice- α (a) e representação da estrutura tridimensional formada com cadeias laterais dos aminoácidos orientadas para o exterior da hélice (b)	18
Figura 6 – Estrutura e padrão de interações de folhas- β antiparalelas (a), paralelas (b) e de uma curvatura- β	18
Figura 7 – Mecanismo geral da catálise enzimática ácida (a) e básica (b)	20
Figura 8 – Mecanismo da enzima acetoacetato decarboxilase ilustrando como se processa a catálise enzimática nucleofílica ou covalente.....	21
Figura 9 – Mecanismo de atuação de termolisina, demonstrando a atuação de um cofator eletricamente carregado na catálise enzimática	22
Figura 10 – Esquema da interação enzima-substrato (a) e da ação de inibidores competitivos clássicos (b), anti-competitivos (b) e não competitivos (c).....	23
Figura 11 – Eletroforese em gel de poliacríamida em presença de SDS corado com azul de Coomassie na presença do marcador de pesos moleculares Benchmark (faixa A), do lisato de <i>E. coli</i> não induzidas (faixas B e C) e induzidas para a superexpressar DHS desidratase (faixas D e E)	42
Figura 12 – Eletroforese SDS-PAGE corado com azul de Coomassie na presença do marcador de pesos moleculares Benchmark (faixa A) e dois eluatos com concentrações aumentadas de imidazol, de 0 mM até 250 mM (faixa B até F)	43
Figura 13 – Conversão de ácido 3-dehidroshikímico a ácido 3,4-dihidroxibenzóico é acompanhada de descolamento do comprimento de onda de máxima absorção, permitindo acompanhamento da cinética de formação de produto	44
Figura 14 – Curva da absorção em 290 nm em função do tempo na ausência e na presença de 12,5 μ M, 25 μ M e 50 μ M de galato de metila	45
Figura 15 – Taxa de reação, calculada entre 2 e 8 minutos, em função da concentração de galato de metila, ajuste de curva logística e IC ₅₀ determinado.....	45
Figura 16 – Comparativo entre o potencial do ácido gálico (inibidor 4) com o galato de metila (inibidor 7) mostrando a importância do grupo ácido carboxílico no potencial inibitório	50
Figura 17 – Comparativo dos IC ₅₀ do ácido gálico (inibidor 4), do 3,4-DHB (inibidor 5) e do ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico (inibidor 34) demonstrando o efeito sinérgico que aumento do número de grupos OH tem sobre o potencial inibitório.....	51
Figura 18 – Efeito do padrão de substituição do anel aromático na potência inibitória por comparação entre os ácido <i>m</i> -hidroxibenzóico (inibidor 1), <i>o</i> -hidroxibenóico (inibidor 27) e <i>p</i> -hidroxibenzóico (inibidor 34).....	51
Figura 19 – Efeito da proteção dos grupos OH nas posições <i>para</i> e <i>meta</i> do anel benzóico demonstrando que a hidroxila em <i>meta</i> está envolvida em uma ligação de hidrogênio de grande importância com o sítio ativo	52
Figura 20 – Efeito aparentemente controverso de um grupo doador de ligação de hidrogênio em posição <i>orto</i> , demonstrado na comparação do salicilato de metila (inibidor 22), ácido salicílico (inibidor 27) e 2,3-DHB (inibidor 37).....	53

Figura 21 – Ineficácia de compostos estruturalmente similares ao substrato como os ácidos shikímico (inibidor 26) e quínico (inibidor 17) demonstra a importância da rigidez/aromaticidade.....	53
Figura 22 – Compostos com substituintes aceptores ou doadores de ligação de hidrogênio nas posições 3 e 4 diferentes de OH apresentam potencial inibitório, entretanto há uma aparente rejeição moléculas muito volumosas	54
Figura 23 – Alguns compostos estruturalmente diferentes de dihidroxibenzoatos demonstram um potencial inibitório significativo como inibidores 13 e 46, indicando a existência de outro modo de ligação	54
Figura 24 – Correlação linear entre o logarítmico da concentração inibitória média e a energia livre de ligação (em kcal/mol) calculada por docking, considerando-se inibidores desprotonados	57
Figura 25 - Sobreposição das estruturas ancoradas com melhores energias livres para os 25 compostos experimentalmente ativos na inibição enzimática. O cofator magnésio e os resíduos principais estão destacados da estrutura secundária	58
Figura 26 – A sobreposição dos compostos do grupo secundário mostra que as interações mais favoráveis no docking ocorrem junto à abertura de entrada do sítio ativo, destacado em azul na superfície de densidade da enzima.....	59
Figura 27 – Sobreposição das estruturas resultantes do <i>docking</i> dos compostos do grupo secundário utilizando-se um <i>grid</i> envolvendo toda a enzima. Apenas o ácido 5-sulfossalicílico e 7-hidroxicromona não se coordenaram à entrada do sítio ativo (em destaque).....	60
Figura 28 – Sobreposição das estruturas com melhores resultados no docking para os compostos do grupo principal (a) e do grupo secundário após o docking cego (b), demonstrando a boa sobreposição entre moléculas nos dois grupos	61
Figura 29 – Padrão de interações do ácido gálico (inibidor 4) com o sítio ativo obtido por meio do <i>docking</i> molecular indicando a formação de cinco ligações de hidrogênio (pontilhado em verde).....	62
Figura 30 – Padrão de interações do produto da reação (3,4-DHB) com o sítio ativo segundo determinado por cristalografia (a) e pelo docking computacional (b)	63
Figura 31 – Padrão de interações de inibidor 37 (ácido 2,3-dihidroxibenzóico) com o sítio ativo segundo o resultado de <i>docking</i>	64
Figura 32 – Interações do inibidor 46 (ácido indol-2-carboxílico) com alguns resíduos da entrada do sítio ativo segundo apontado pelo docking molecular	65
Figura 33 – Docking dos inibidores 13 (a) e 47 (b) representando pela superfície de densidade. Apesar de não haver formação de ligações de hidrogênio, interações de Van der Waals são possíveis com resíduos hidrofóbicos na entrada do sítio ativo	65
Figura 34 – A proximidade espacial entre os inibidores do sítio ativo como o ácido gálico (em rosa) com os inibidores de um possível sítio alostérico na entrada do sítio principal, como o indol-2-carboxilato (verde), levanta a hipótese do possível efeito sinérgico no potencial inibitório de um <i>link</i> entre as duas moléculas	66
Figura 35 - Evolução temporal do deslocamento quadrático médio das posições dos carbonos- α para o sistema enzima livre (azul), enzima+substrato (vermelho), enzima+produto (roxo) e enzima+ligante 4 (verde)	67
Figura 36 – Desvio quadrático média das posições atômicas dos 15 resíduos que compõem o sítio ativo e do cofator Mg durante a simulação dos sistemas sistema enzima livre (azul), enzima+substrato (vermelho), enzima+produto (roxo) e enzima+ligante 4 (verde)	68
Figura 37 – Mobilidade quadrática média (RMSF) dos resíduos do sítio ativo durante os 60 ns simulados para os sistemas enzima livre (azul), enzima+substrato (vermelho), enzima+produto (roxo) e enzima+ligante 4 (verde)	69

Figura 38 – Evolução do número de ligações de hidrogênio entre a enzima e o ácido gálico durante os 60 ns da simulação	70
Figura 39 – Evolução do número de ligações de hidrogênio entre a enzima e o substrato (a) e entre enzima e produto (b) durante a simulação	71
Figura 40 – Padrão de interações de hidrogênio entre o produto e o sítio ativo na estrutura média do complexo durante a simulação	72
Figura 41 – Interações de ligação de hidrogênio (pontilhado em verde) entre enzima e ácido gálico em 59610 picossegundos	72
Figura 42 – Seis resíduos do sítio ativo diametralmente opostos representando os eixos X, Y e Z escolhidos para se avaliar alterações do volume do sítio ativo durante a simulação.....	74
Figura 43 – Evolução temporal da distância entre os eixos X (azul), Y (vermelho) e Z (verde) ao longo da trajetória simulada (a) e da soma das distâncias nas três dimensões consideradas (b)	74
Figura 44 – Sobreposição da estrutura inicial (laranja) com a estrutura após 55640 picossegundos (azul) mostrando as alterações na estrutura secundária e nos resíduos definidos como X, Y e Z, em destaque	75
Figura 45 – Posicionamento do inibidor 13 (a) e do inibidor 46 após docking utilizando-se a estrutura de receptor com maior alteração no volume do sítio ativo. A porção do sítio ativo está destacada em verde	76
Figura 46 – Padrão de interações entre o ácido indol-2-carboxílico (a) e 7-metóxi-2-benzofurancarboxílico (b) após novo docking utilizando-se a estrutura do receptor com maior desvio das distâncias do sítio ativo em relação à estrutura de referência	76

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
3.3	ENZIMAS	16
3.1.1	Aspectos estruturais	16
3.1.2	Interações enzima-substrato e catálise enzimática	19
3.1.3	Inibidores enzimáticos	22
3.2	DOCKING MOLECULAR	24
3.2.1	Algoritmos de busca	26
3.2.2	Função de escore	28
3.3	DINÂMICA MOLECULAR	29
4	METODOLOGIA	33
4.1	MÉTODOS EXPERIMENTAIS	33
4.1.1	Clonagem, superexpressão e purificação da enzima DHS desidratase	33
4.1.2	Estudos de inibição de DHS desidratase	34
4.2	MÉTODOS COMPUTACIONAIS	38
4.2.1	Docking molecular	38
4.2.2	Dinâmica molecular	39
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1	RESULTADOS EXPERIMENTAIS	42
5.1.1	Superexpressão e purificação da enzima	42
5.1.2	Estudo de potenciais inibidores	43
5.1.3	Relações estrutura-atividade	50
5.2	RESULTADOS COMPUTACIONAIS	55
5.2.1	Docking molecular	55
5.2.2	Dinâmica molecular	66
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	78
	REFERÊNCIAS	81
	ANEXOS	85

1 INTRODUÇÃO

O aumento da resistência de bactérias patogênicas a antibióticos se desenha um dos problemas de saúde pública mais graves a ser enfrentado no século XXI, tanto a nível global e nacional quanto em nível regional, como pode ser constatado recentemente pelo fechamento de duas UTIs neonatal na cidade de Porto Alegre devido à contaminação por *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenemas.¹

Segundo o relatório mais recente da Organização Mundial de Saúde (OMS) sobre o tema, publicado em 2014, altas taxas de resistência tem sido observadas em bactérias comuns como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* responsáveis por problemas de saúde triviais até então, como pneumonias e infecções urinárias.²

A distribuição generalizada de cepas resistentes – presentes em 114 dos 129 países que compõem o Órgão - aliado ao rápido desenvolvimento de tolerância aos medicamentos ainda ativos se constitui "uma ameaça às realizações da medicina moderna", nas palavras da própria OMS, com vias de tornar o presente século em uma era pós-antibiótica, “na qual pequenos ferimentos e infecções comuns podem matar”.² Esses fatos reforçam a necessidade de maiores investimentos em pesquisa e desenvolvimento de compostos com ação antibacteriana.

Dentre os micro-organismos que se destacam como ameaça à saúde pública, não apenas pelo desenvolvimento de cepas resistentes e pela alta letalidade, mas também devido à grande dificuldade terapêutica intrínseca está o *Bacillus anthracis*, uma bactéria aeróbica Gram positiva, com formato de bastonete, causadora do antraz ou carbúnculo³ e endêmica em praticamente todas as regiões do mundo, inclusive no Brasil.^{4,5}

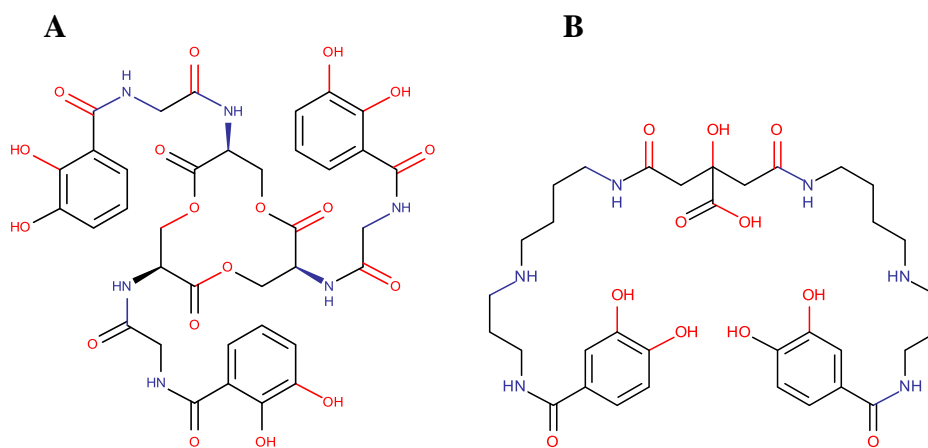
Observada originalmente em animais herbívoros domésticos, essa doença infecciosa aguda acomete seres humanos por meio do contato, inalação ou ingestão de esporos da bactéria presentes na carne, sangue, lã, couro ou outros tecidos de animais infectados, sendo normalmente caracterizada por lesões cutâneas pretas, mas que também pode afetar a região nasal, faringe, pulmões, coração e intestinos, dependendo da rota de contaminação.^{4,6}

Apesar de ainda não ser reportada a transmissão direta entre seres humanos, a possibilidade de formação de esporos altamente resistentes, capazes de permanecer viáveis por décadas, aliada ao fato de que a forma respiratória da doença tem uma taxa de mortalidade superior a 85% e de não haver um tratamento específico⁷ tornam o *B. anthracis* um dos organismos com maior potencial como arma biológica ou agente de bioterrorismo – propósito para o qual já foi utilizado em 2001, nos Estados Unidos, matando cinco pessoas.^{8,9}

Assim como em outros micro-organismos patogênicos, o estabelecimento de virulência pelo *B. anthracis* está relacionado com sua capacidade de adquirir ferro, um micronutriente essencial para seu crescimento e proliferação dentro do organismo hospedeiro.¹⁰ Entretanto, ao contrário dos organismos superiores que são capazes de obter esse nutriente a partir de suas dietas, as bactérias precisam adquiri-lo do ambiente, o que fazem por meio da liberação de agentes quelantes com alta afinidade por ferro denominados sideróforos.¹¹

No *B. anthracis* dois sideróforos demonstram desempenhar um papel importante na aquisição de ferro, a bacilobactina e a petrobactina (Figura 1).¹² Entretanto apenas a petrobactina apresenta-se como absolutamente essencial para o estabelecimento de virulência em mamíferos¹³ pois além de apresentar uma afinidade por ferro cem vezes superior à da transferrina – a principal proteína transportadora de ferro do plasma sanguíneo¹⁴ – também escapa de ser sequestrada pela siderocalina, uma proteína do sistema imunológico especializada na captura de sideróforos com sítio de complexação catecolatos e que tem alta afinidade por bacilobactina porém afinidade desprezível por petrobactina.¹⁵

Figura 1 – Estruturas da bacilobactina (a) e petrobactina (b)



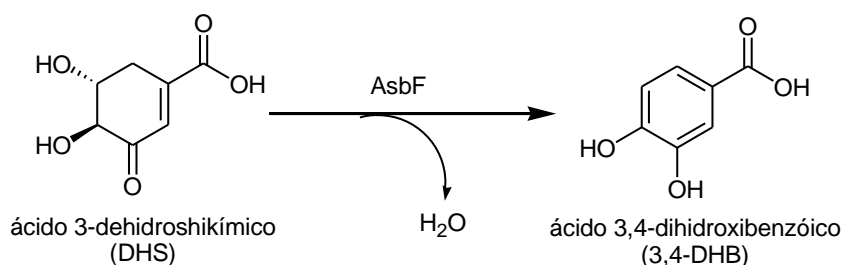
A petrobactina foi originalmente isolada da bactéria marinha *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, responsável pela degradação de hidrocarbonetos presente no petróleo, de onde o composto herdou seu nome.¹⁶ O grupo de genes (operon) *asbABCDEF* do *B. anthracis* apresenta homologia com o operon responsável pela biossíntese de petrobactina em *Marinobacter*, o que permitiu, por meio de investigações experimentais, a elucidação do mecanismo de síntese biológica desse sideróforo em *B. anthracis*.¹⁷

Esse mecanismo envolve a participação de três unidades biossintéticas básicas -

citrato, espermidina e ácido 3,4-dihidroxi-benzóico (3,4-DHB).¹⁸ Enquanto citrato e espermidina são metabólitos prontamente disponíveis à célula bacteriana, 3,4-DHB é um precursor pouco usual especialmente quando se considera que grande maioria dos sideróforos com grupos catecolatos utiliza o isômero estrutural 2,3-DHB.¹⁹ Essa diferença pode estar relacionada com a dificuldade de captura da petrobactina pelo sistema imunológico, sendo então crucial para a elevada letalidade desse micro-organismo.¹⁸

Através de mutações genéticas nos diferentes segmentos do operon *asb*ABCDEF com o propósito de inativar as enzimas por eles codificadas, Lee e colaboradores (2007) observaram que todos os mutantes eram capazes de produzir 3,4-DHB, exceto quando a mutação ocorria no gene *AsbF*.²⁰ Posteriormente, Fox e colaboradores (2008) demonstraram através da superexpressão desse gene em um hospedeiro *Escherichia coli* que a enzima *asbF* atua na desidratação do 3-dihidrosikimato (3-DHS), um metabólito da rota do ácido shikímico – relacionada com a biossíntese dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano em bactérias – convertendo esse composto em 3,4-DHB, o que a caracteriza como uma *dehidrosikimato desidratase*.²¹ A reação catalisada por essa enzima está esquematizada na figura 2.

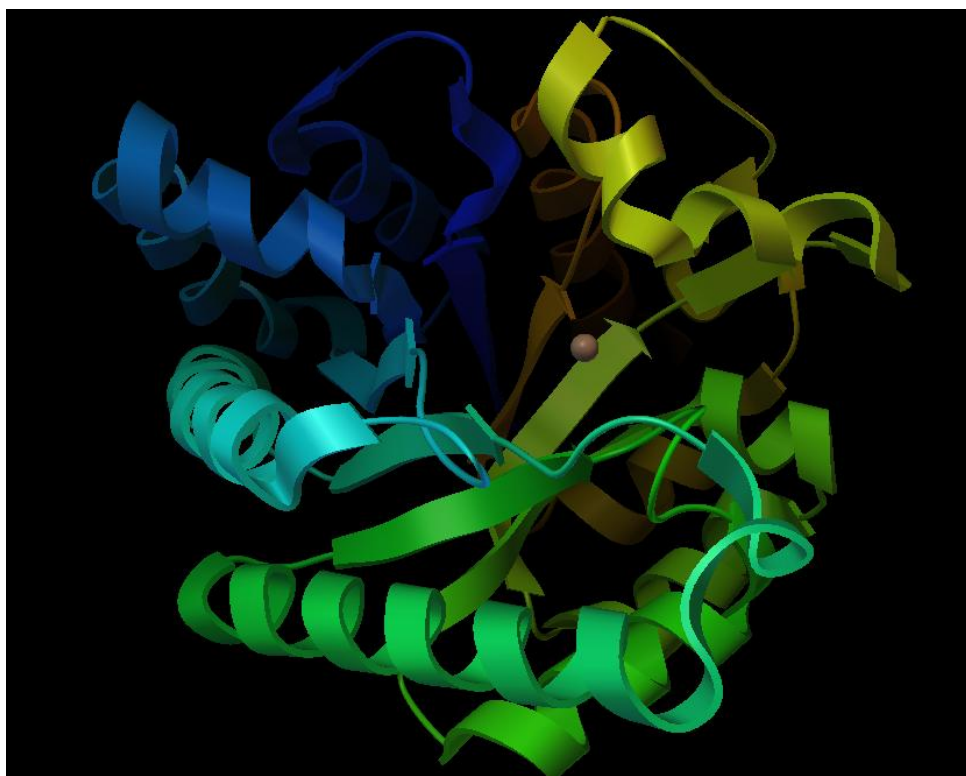
Figura 2 – Desidratação do ácido 3-dehidrosikímico catalisada pela enzima *AsbF*



Fox e colaboradores também demonstraram que essa enzima tem uma exigência absoluta por metais bivalentes, sobretudo magnésio, manganês e cobalto, tendo a eficiência reduzida quando zinco, cálcio ou níquel são utilizados. Além disso, o pH de funcionamento ótimo foi determinado como sendo entre 8,3 e 8,8, com uma atividade residual inferior a 15% em pH fisiológico. Nesse mesmo ano, Pflieger e colaboradores publicaram a estrutura cristalográfica da enzima (Figura 3).²²

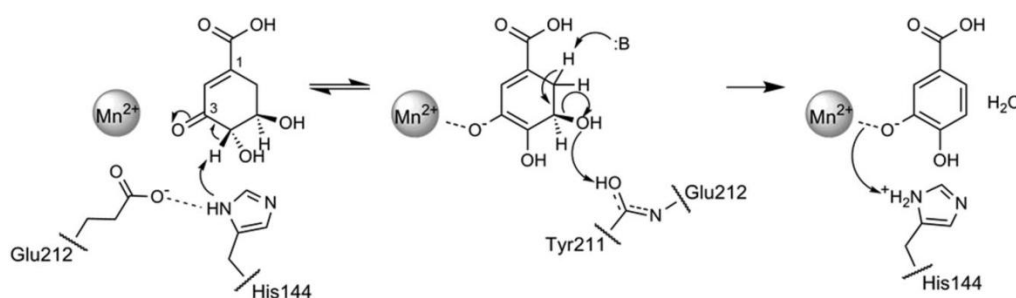
A análise da estrutura cristalográfica obtida utilizando-se manganês como cofator metálico mostra que a enzima apresenta estrutura terciária em forma de barril, composta por oito hélices- α e oito folhas- β paralelas que se alternam, com a porção N-terminal se localizando na parte interna do barril e a porção C-terminal na superfície.²²

Figura 3 – Estrutura cristalográfica da enzima DHS desidratase (AsbF) de *B. anthracis*, conforme depositada por Pflieger e colaboradores no *Protein Data Bank* (PDB ID: 3DX5)²²



O produto da reação (3,4-DHB) foi encontrado coordenado ao sítio ativo, cercado por resíduos aromáticos fenilalaninas (255, 211, 104), tirosina-217 e histidina-144 e em interação com as tirosinas 70 e 217, arginina-102, histidina-175, entre outros resíduos, além de interagir com o íon metálico. Através dessas observações estruturais e de mutagênese sítio-específica com o propósito de se descobrir os resíduos chaves na catálise enzimática, Pflieger e colaboradores propuseram o mecanismo demonstrado na Figura 4.²²

Figura 4 – Mecanismo proposto para a catálise enzimática da desidratação de ácido 3-dehidroshikímico a ácido 3,4-dihidroxibenzóico. Adaptado de Pflieger e colaboradores.²²



Considerando-se o papel primordial da petrobactina no estabelecimento de virulência e, conseqüentemente, na alta taxa de mortalidade da infecção por *Bacillus anthracis* bem como a importância que o ácido 3,4-dihidroxibenzóico desempenha dentre as unidades

biossintéticas desse composto, a inibição da enzima DHS desidratase se constitui de um alvo interessante para o desenvolvimento de novas terapias anti-antraz. Esse alvo é particularmente estratégico na medida em que não há outro mecanismo conhecido de geração de 3,4-DHB nesse micro-organismo tampouco existem enzimas homólogas a esta em seres humanos.

Assim, no presente trabalho, a inibição de DHS desidratase é estudada por meio da triagem *in vitro* de uma biblioteca de compostos, a quantificação comparativa da ação inibitória destes e a aplicação das metodologias computacionais de *docking* e simulação de dinâmica molecular na compreensão das características estruturais responsáveis pela atuação dessas moléculas como inibidores. O conhecimento dessas propriedades, por sua vez, visa o futuro planejamento racional de moléculas com maior potência, eficácia e seletividade e potencial aplicação como antibióticos contra o *Bacillus anthracis* e cepas relacionadas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar inibidores da enzima deidroshikimato desidratase por meio da triagem *in vitro* de moléculas com potencial inibitório, determinação das características estruturais responsáveis pelos efeitos biológicos e da aplicação das metodologias computacionais de *docking* e simulação de dinâmica molecular na compreensão das interações enzima-inibidores e no planejamento racional de moléculas com maior potência, eficácia e seletividade e com potencial aplicação como antibióticos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Superexpressar o gene que codifica deidroshikimato desidratase do *Bacillus anthracis* em células hospedeiras de *Escherichia coli* e purificar a enzima.
- Avaliar o potencial de uma biblioteca de moléculas na inibição da enzima e determinar as concentrações inibitórias médias (IC₅₀) a fim de se elucidar o papel de grupos funcionais ou subunidades estruturais no efeito farmacológico desejado pela comparação dos IC₅₀.
- Realizar o *docking* computacional dos potenciais inibidores a fim de se avaliar o modo e a intensidade das interações destes com a enzima, permitindo sua classificação de acordo com a energia livre de interação (scores).
- Comparar os resultados experimentais e de *docking* e analisar qualitativamente os resultados a fim de se determinar as características estéricas e eletrônicas essenciais que uma molécula deve possuir para atuar como um potente inibidor dessa enzima.
- Simular por dinâmica molecular os inibidores melhor classificados experimentalmente e avaliar os resultados da simulação através de programas do pacote Gromacs.
- Aperfeiçoar o *docking* computacional através da obtenção de um conjunto de estruturas da enzima, extraídas das simulações de dinâmica molecular, visando a obtenção um modelo que permita predições quantitativas e a realização da triagem virtual de novas moléculas.
- Planejar racionalmente novas moléculas visando um aumento da potência e eficácia (diminuição do IC₅₀) e da seletividade (obtenção de moléculas menos promíscuas) com potencial aplicação como medicamentos no combate a antraz e outras infecções por bactérias do gênero *Bacillus*.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 ENZIMAS

O processamento contínuo de energia e informação dentro das células – a definição biológica de vida - consiste em milhares de reações químicas individuais, que para serem fisiologicamente úteis necessitam ocorrer em velocidades que se enquadrem às necessidades celulares e serem específicas, de tal forma que um determinado reagente sempre produza um produto em particular, minimizando-se a formação de subprodutos nocivos ou inutilizáveis. Por essa razão, os organismos vivos desenvolveram um grupo especial de moléculas capazes de aperfeiçoar a eficiência e seletividade dessas reações e impor ordem a este “caos” bioquímico intracelular, as *enzimas*.²³

De uma forma geral, enzimas podem ser definidas como uma classe de proteínas que catalisam reações bioquímicas. Essas macromoléculas são notáveis não apenas por sua alta complexidade estrutural tridimensional, resultado de um dobramento espontâneo de uma cadeia polipeptídica linear, mas principalmente por suas propriedades catalíticas impressionantes e muito superiores aos melhores catalisadores já desenvolvidos pelo Homem, muitas vezes demonstrando alta enantiosseletividade e enantioespecificidade com taxas de reações que se aproximam da “perfeição catalítica”.²⁴

As taxas de reação enzimáticas são normalmente de 10^6 a 10^{12} vezes maiores do que as taxas observadas para reações não catalisadas e várias ordens de magnitude mais rápidas que reações catalisadas quimicamente, mesmo ocorrendo em condições reacionais muito mais brandas que estas, como temperaturas inferiores a 100°C , pH neutro e pressão atmosférica. Além disso, enzimas apresentam grande capacidade de controle, na medida em que respondem a variações de concentração de outros compostos que não sejam reagentes e produtos, e raramente geram produtos secundários, sendo, portanto específicas tanto na reação que catalisam quanto nos reagentes (substratos) que necessitam.²³

3.1.1 Aspectos estruturais

Enzimas, assim outras proteínas, são constituídas de sequências lineares de α -aminoácidos unidas por ligações amida, também chamadas de ligações peptídicas. Essa cadeia polipeptídica linear se dobra sobre si mesma gerando uma estrutura tridimensional única.²⁴

Apesar dos aminoácidos existirem como isômeros L e D em função da configuração do carbono- α , todas as proteínas são compostas exclusivamente por L-aminoácidos, sendo,

portanto moléculas intrinsecamente quirais. Há apenas 20 L-aminoácidos diretamente decodificados pelo código genético, os quais constituem todas as proteínas e variam na natureza do grupo lateral ligado ao carbono- α .²⁵ A estrutura, nomes e abreviaturas dos 20 aminoácidos proteínogênicos estão mostradas no anexo A.

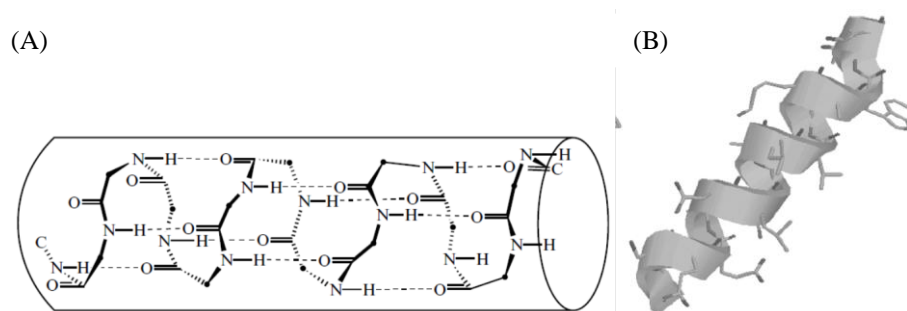
Quatro níveis estruturais distintos podem ser observados em proteínas. O primeiro deles – a *estrutura primária* – é constituído pela cadeia peptídica propriamente dita, na qual cada aminoácido está ligado ao seguinte por meio de ligações amida, formando uma sequência de 100 até 1000 ou mais aminoácidos que contém toda a informação necessária para produzir a estrutura tridimensional das proteínas de uma forma geral e em particular a atividade catalítica das enzimas.²⁵

A sequência de aminoácidos de cada proteína é determinada por uma sequência de nucleotídeos em uma porção particular de DNA chamada de *gene*, que decodifica uma proteína específica em um determinado organismo. Inicialmente, essa sequência de DNA é transcrita para uma sequência de RNA mensageiro. Essa sequência de RNA é então traduzida em proteína em conjuntos de três bases nucleotídicas (códon), com cada trio decodificando um único aminoácido em um código universal, seguido pelos mecanismos de biossíntese de proteínas em todos os organismos.²³

Quando essa sequência linear de aminoácidos é formada a cadeia polipeptídica se dobra espontaneamente formando a estrutura tridimensional das proteínas. Essa organização se inicia em grupos pequenos, entre 10 e 20 aminoácidos, que formam estruturas estáveis e ordenadas entre si por meio de ligações de hidrogênio, isto é, ligações não covalentes entre hidrogênio ácidos (O-H, N-H) e pares de elétrons isolados. Esse nível de organização local é chamado de *estrutura secundária*, cujas três formas mais comumente observadas são hélices- α , folhas- β e curvas- β .²⁵

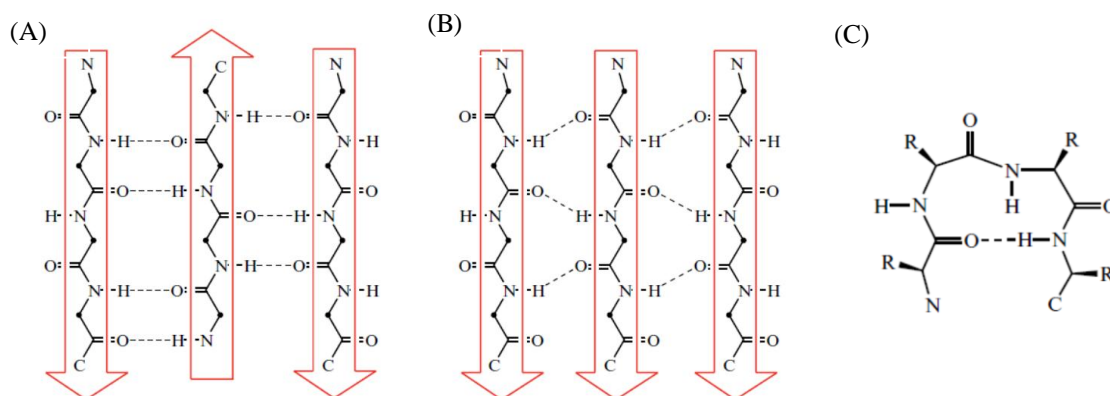
As hélices- α são formadas por uma única cadeia peptídica, na qual as ligações de hidrogênio ocorrem entre o oxigênio carboxílico de um aminoácido e o N-H de outro, quatro resíduos à frente na cadeia, como mostrado na figura 5. Cada aminoácido forma duas ligações de hidrogênio, o que torna essa unidade estrutural muito estável. Além disso, o formato de hélice faz com que os grupos laterais dos aminoácidos apontem para fora, permitindo outras interações que influenciam a estrutura total da enzima.²⁴

Figura 5 – Padrão de ligações de hidrogênio que forma a estrutura de uma hélice- α (a) e representação da estrutura tridimensional formada com cadeias laterais dos aminoácidos orientadas para o exterior da hélice (b). Adaptado de Bugg (2012)²⁴



As folhas- β são formadas por duas ou mais cadeias peptídicas unidas por uma série de ligações de hidrogênio entre as cadeias, que podem ser paralelas, quando seguem a mesma orientação amina-carbonila ou antiparalelas, quando seguem direções opostas (Figura 6). Folhas- β antiparalelas acabam sendo mais estáveis devido a um melhor posicionamento das ligações de hidrogênio. Curvas- β , por sua vez, são estruturas formadas na porção final de uma folha- β e que levam a uma volta de 180° na direção da cadeia polipeptídica (Figura 6c).

Figura 6 – Estrutura e padrão de interações de folhas- β antiparalelas (a), paralelas (b) e de uma curva- β . Adaptado de Bugg (2012)²⁴



O empacotamento conjunto de diversos elementos de estrutura secundária forma uma conformação global estável denominada de *estrutura terciária*. Esse empacotamento está relacionado com o deslocamento dos grupos laterais hidrofóbicos dos aminoácidos para parte interna da proteína e dos grupos laterais hidrofílicos para a superfície da mesma, o que produz no caso das enzimas, sua forma cataliticamente ativa. Proteínas grandes muitas vezes são formadas por mais de uma estrutura terciária, que se ligam formando homodímeros, trímeros, tetrâmeros ou mesmo formadas por unidades não idênticas. Esse nível mais elevado de organização é chamado de *estrutura quaternária*.²³

3.1.2 Interações enzima-substrato e catálise enzimática

Apesar de quase todas as enzimas serem proteínas, nem todas as proteínas são enzimas. A diferença reside na atividade catalítica que as enzimas possuem e que está relacionada com uma parte da estrutura terciária denominada *sítio ativo*, que corresponde entre 10 e 20% do seu volume total, onde a “química enzimática” acontece.²⁴

O sítio ativo é geralmente uma fenda ou cavidade hidrofóbica que contém um arranjo de grupos laterais capazes de se ligar ao substrato e realizar a reação enzimática. Em alguns casos, o sítio ativo também contém um ou mais cofatores que podem ser íons metálicos, como Mn^{2+} e Mg^{2+} , complexos metálicos ou compostos orgânicos não proteicos cujo papel é auxiliar a catálise enzimática.²⁵

A alta seletividade ao substrato – por vezes até enantiosseletividade – está relacionada com a natureza quiral do sítio ativo, que é capaz de executar uma série de interações não covalentes específicas entre enzima e substrato. Essas interações podem ser de quatro tipos:

- 1) *Interações eletrostáticas*: ocorrem entre substratos que contém grupos ionizáveis eletricamente carregados em pH fisiológico, os quais se ligam a resíduos com grupos laterais de carga oposta. É o que ocorre, por exemplo, com ácidos carboxílicos que em pH 7 estão negativamente carregados (ânion carboxilato), os quais podem interagir com resíduos positivamente carregados nessas condições, como a guanidina de uma arginina ou o grupo ϵ -amino lateral protonado de uma lisina. Esse tipo de interação tem energia de ligação entre 25-50 kJ/mol, porém sendo um potencial coulômbico, sua intensidade é *inversamente* proporcional à distância entre as cargas ($1/r$).
- 2) *Ligação de hidrogênio*: interações formadas entre umceptor de ligação de hidrogênio que contém um par de elétrons isolado e um doador de ligação de hidrogênio contendo um hidrogênio ácido. Esse tipo de interação é muito utilizada para coordenar substratos com grupos polares e sua força depende tanto da natureza química quanto do alinhamento geométrico dos grupos interagentes. As energias de ligação para aceptores/doadores neutros é da ordem de 2-7,5 kJ/mol enquanto que com aceptores/doadores eletricamente carregados esse valores aumenta para 12,5-25 kJ/mol.
- 3) *Interações não-polares (Van der Waals)*: são interações decorrentes dos contatos interatômicos do substrato com sítio ativo. Devido ao formato altamente complementar com o substrato, a soma das interações de Van der Waals pode ser

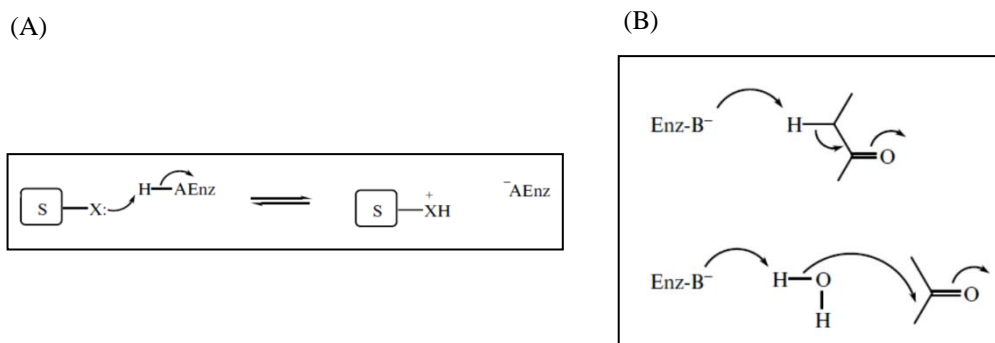
significativamente substancial (50-100 kJ/mol) ainda que as interações individuais sejam tão pequenas quanto 6-8 kJ/mol. A intensidade dessas interações varia com $1/r^6$, sendo, portanto de curtíssimo alcance e requerendo um bom “encaixe” do substrato no sítio ativo.

- 4) *Interações hidrofóbicas*: esse tipo de interação está relacionado com a tendência de moléculas orgânicas hidrofóbicas se agregarem e extraírem em solventes apolares ao invés de permanecer em solução aquosa. Esse processo é energeticamente favorável na medida em que maximiza das ligações de hidrogênio da água as quais seriam rompidas pela presença e solvatação da molécula orgânica. Se o substrato contém um grupo ou superfície hidrofóbica haverá um ganho energético se essas porções puderem interagir com grupos hidrofóbicos do sítio ativo.²⁴

Uma vez tendo complexado o substrato, a enzima então realiza a catálise da sua reação específica por meio de grupos catalíticos do sítio ativo e finalmente libera seu produto de volta à solução. Três tipos principais de mecanismos podem ser definidos para a compreensão da ação enzimática: catálise ácido-básica, catálise covalente ou nucleofílica e catálise eletrostática.²⁵

A *catálise ácido-básica* está envolvida em todos os processos enzimáticos que envolvem transferência de prótons, sendo poucas as enzimas que não possuem grupos ácidos ou básicos cataliticamente ativos. A catálise ácida envolve a ativação do substrato por meio da sua protonação por um resíduo cataliticamente ativo enquanto que na catálise básica o substrato é desprotonado ou então água é desprotonada antes de atacar o substrato (Figura 7).²³

Figura 7 – Mecanismo geral da catálise enzimática ácida (a) e básica (b). Adaptado de Bugg (2012)²⁴

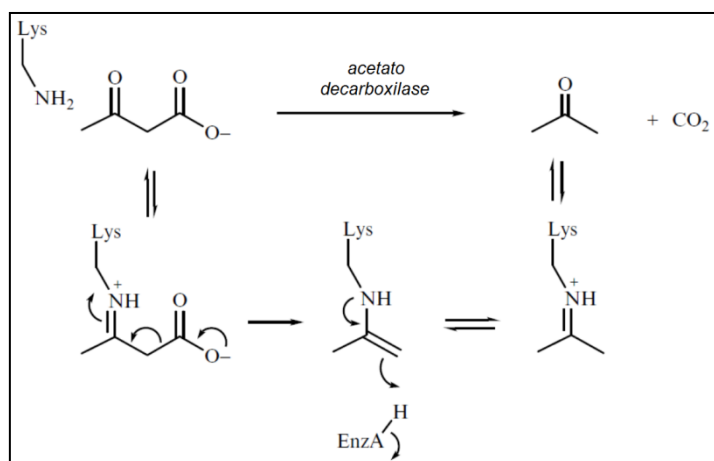


Apesar do pequeno número de aminoácidos com grupos laterais ionizáveis e de operar em condições fisiológicas, uma ampla faixa de pKa's é obtida para os resíduos do sítio ativo

graças ao microambiente criado pela estrutura tridimensional da enzima. Assim, por exemplo, a aproximação de um resíduo positivamente carregado a uma amina torna sua forma protonada termodinamicamente menos favorável e reduz seu pKa, permitindo que esta possa atuar como uma base sobre o substrato mas como um ácido sobre a água, mediando a transferência de prótons. Ou ainda colocando resíduos cataliticamente ativos em regiões hidrofóbicas, o que desfavorece sua forma eletricamente carregada, alterando drasticamente seu pKa.²³

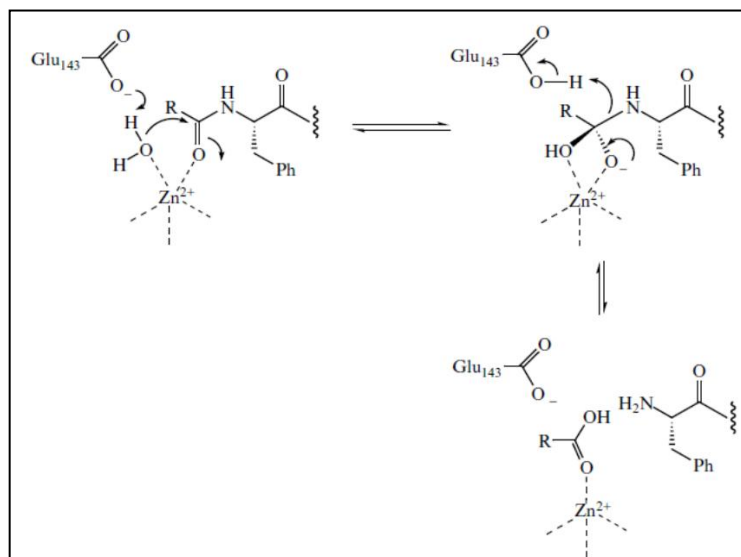
A *catálise covalente* envolve o ataque nucleofílico de um resíduo do sítio ativo ao substrato, formando uma ligação covalente entre a enzima e o substrato, e, portanto um intermediário covalente no mecanismo da reação, como exemplificado no mecanismo da acetoacetato decarboxilase (Figura 8). O nucleófilo mais poderoso disponível ao sítio ativo enzimático é o grupo tiol da cisteínas, que pode ser desprotonado para formar o ânion tiolato, ainda mais nucleofílico, seguido do grupo ε-amino de lisinas, muito utilizado para formação de ligações imina com grupos cetona de substratos, além de oxigênios nucleofílicos de serinas, treoninas, tirosinas e os resíduos carboxilados.²⁴

Figura 8 – Mecanismo da enzima acetoacetato decarboxilase ilustrando como se processa a catálise enzimática nucleofílica ou covalente. Adaptado de Bugg (2012)²⁴



A *catálise eletrostática* está relacionada com a estabilização de intermediários carregados por meio da formação de ligações iônicas com resíduos eletricamente carregados ou cofatores metálicos como zinco e magnésio. As propriedades de ácidos de Lewis de íons metálicos tem especial aplicação enzimática na medida em que, sendo aceptores de elétrons, permitem a ativação de substratos ou mesmo da água, cujo pKa pode ser reduzido a ponto de atuar como um nucleófilo, como o que ocorre na enzima termolisina (Figura 9).

Figura 9 – Mecanismo de atuação de termolisina, demonstrando a atuação de um cofator eletricamente carregado na catálise enzimática. Adaptado de Bugg (2012) ²⁴



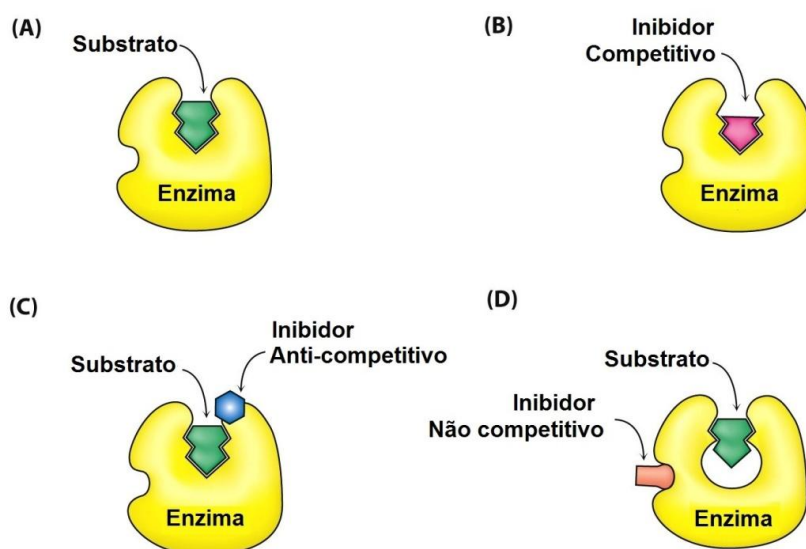
3.1.3 Inibidores Enzimáticos

A inibição enzimática ocorre quando uma molécula diferente do substrato se liga ao sítio ativo e previne a reação enzimática de ocorrer. Há dois tipos principais de inibidores normalmente observados: os *reversíveis*, compostos que se ligam de forma não covalente ao sítio ativo ou outra porção da enzima, impedindo o substrato de se coordenar e os inibidores *irreversíveis*, que se ligam permanentemente à enzima por meio da reação com algum resíduo do sítio ativo formando uma ligação covalente. O sítio ativo é então permanentemente bloqueado e a enzima irreversivelmente desativada.²³

Esse tipo de inibidor geralmente contém grupos funcionais eletrofílicos como substituintes halogênio ou epóxido que sofrem um ataque nucleofílico de algum resíduo do sítio ativo (catálise enzimática nucleofílica) produzindo um complexo energeticamente mais estável e levando à modificação covalente permanente desse resíduo.²⁴

Os inibidores reversíveis – mais comumente observados – podem ser de três tipos principais: competitivo, anti-competitivo e não competitivo, os quais variam em função da natureza da interação com a enzima e do efeito que produzem na cinética enzimática (Figura 10).²⁶

Figura 10 – Esquema da interação enzima-substrato (a) e da ação de inibidores competitivos clássicos (b), anti-competitivos (b) e não-competitivos (c). Adaptado de Tymoczko (2010).²³



Os *inibidores competitivos* (Figura 10b) são moléculas que se assemelham estruturalmente ao substrato (S) e se que ligam ao sítio ativo da enzima (E) impedindo que o substrato possa interagir e de fato competindo com este pelo sítio ativo. Nessa situação, a enzima pode se ligar ao substrato, formando o complexo ES ou se ligar ao inibidor (complexo EI) mas não pode se ligar aos dois ao mesmo tempo (ESI).²⁶

Esses inibidores reduzem a velocidade da reação enzimática por reduzirem a proporção de moléculas de enzima ligadas ao substrato. Assim, a ação desses inibidores pode ser desfeita aumentando-se a concentração de substrato, o que favorece a formação do complexo ES – e conseqüentemente a reação enzimática – por deslocar o equilíbrio termodinâmico a favor dessa reação.²⁶

Inibidores *anti-competitivos* se distinguem pelo fato do inibidor se ligar apenas ao complexo enzima-substrato e não à enzima sozinha. Para esse tipo de inibidor, o sítio de ligação é criado apenas quando a enzima se liga ao substrato (Figura 10c) e a inibição não pode ser superada pela adição de mais substrato.²⁶

Inibidores *não-competitivos*, por sua vez, podem se ligar tanto à enzima (EI) quanto ao complexo enzima-substrato (ESI), na medida em que o inibidor e o substrato interagem em porções distintas da enzima (Figura 10d). Esse tipo de inibidor atua reduzindo a número geral de moléculas de enzima ativas ao invés de apenas diminuir a proporção de enzima ligada ao substrato e por essa razão a inibição não diminui com o aumento da concentração do substrato.²⁶

Tendo em vista o papel primordial que as enzimas desempenham no controle dos processos metabólicos e nos mecanismos de biossíntese celular, não é surpresa que mais de 47% de todas as drogas atualmente comercializadas tenham como alvo a inibição dessa classe de biomoléculas, segundo Copeland (2013),²⁶ a exemplo do ibuprofeno e do ácido acetilsalicílico, dois dos medicamentos mais consumidos do mundo os quais atuam na inibição de ciclooxigenase, enzima responsável pelo estabelecimento de respostas inflamatórias.²⁷

Inibidores enzimáticos também se destacam pela aplicação como antibióticos, sobretudo devido à existência de enzimas essenciais em bactérias que não possuem homólogos em organismos superiores, limitando os possíveis efeitos colaterais desses compostos.^{27,28}

Um dos primeiros exemplos de inibidor enzimático com ação antibiótica foi a sulfanilamida, composto estruturalmente similar ao ácido *p*-aminobenzóico (PABA), um metabólito requerido por bactérias na biossíntese do ácido fólico, composto essencial em diversas funções bioquímicas. A sulfanilamida atua como inibidor competitivo da enzima que metaboliza PABA, inviabilizando a célula bacteriana, mas sem qualquer efeito sobre humanos que adquirem ácido fólico exclusivamente pela dieta.²⁸

3.2 DOCKING MOLECULAR

O *docking* ou ancoragem molecular em uma tradução literal do inglês é uma metodologia utilizada para a predição computacional da energia de interação e da estrutura de complexos ligante-receptor, no qual o ligante é uma pequena molécula e o receptor é normalmente um alvo macromolecular, como uma proteína ou ácido nucleico, tendo especial aplicação do estudo da forma de atuação e na otimização de inibidores enzimáticos.²⁹

Em linhas gerais - considerando-se o caso enzimático - o docking se constitui em dois processos inter-relacionados que são a *amostragem* ou busca das possíveis conformações do ligante no sítio ativo da enzima e a classificação dessas conformações (em termos de energia livre) por meio de uma *função de score*. Idealmente os algoritmos de busca devem ser capazes de reproduzir o modo de ligação experimental e a função de score deveria classificar esse modo como o melhor entre todas as conformações geradas.^{30,31}

O problema, entretanto, está no fato do docking molecular envolver um grande número de graus de liberdade, pois além dos seis graus de liberdade translacional e rotacional de cada molécula, os inúmeros graus de liberdade conformacional, sobretudo do receptor

macromolecular, necessitariam ser considerados, gerando um número enorme de possíveis modos de ligação entre as duas moléculas e demandando um custo computacional proibitivo para se amostrar todas as configurações possíveis.^{29,32}

Diversas metodologias de docking distintas têm sido desenvolvidas para abordar esse problema, as quais se distinguem no número de graus de liberdade que ignoram. O caso mais simples - e computacionalmente mais econômico - é considerar o ligante e o receptor como sendo corpos rígidos, resumindo o problema aos seis graus de liberdade translacionais e rotacionais.³⁰

Essa ideia, baseada no conceito de chave-fechadura proposto por Emil Fisher em 1894, se fundamenta na premissa de que alta especificidade de uma enzima por seu substrato está relacionada à complementaridade geométrica tal como uma chave é complementar a uma única fechadura. Dessa forma, essas metodologias buscam encontrar moléculas com um alto grau de complementaridade espacial com o sítio ativo.²⁹ A flexibilidade do ligante pode ser considerada por meio do docking de um conjunto pré-calculado de conformações distintas, mas não no docking em si.³⁰

O comportamento real, entretanto, está mais relacionado ao modelo de encaixe induzido, postulado por Daniel Koshland em 1958, no qual a interação inicial relativamente fraca do substrato com o sítio ativo induz alterações conformacionais tanto na enzima quanto no ligante que provocam o fortalecimento dessa interação (encaixe perfeito) e o ajuste dos resíduos do sítio ativo para as posições precisas que possibilitam a catálise enzimática.²⁹

Como a consideração da flexibilidade do ligante e do receptor é custosa computacionalmente, o melhor custo-benefício entre exatidão e tempo computacional é essa situação intermediária, amplamente implementada em diversos softwares como AutoDock e FlexX.³¹

Essa situação intermediária - e mais comumente utilizada - diz respeito a considerar o ligante flexível e o receptor rígido, o que representa uma significativa evolução em relação ao modelo chave-fechadura, mas ainda é incapaz de expressar apropriadamente a natureza flexível e dinâmica da interação enzima-ligante em condições fisiológicas.^{30,31}

No outro extremo está a consideração de todos os graus de liberdade do sistema, que pode ser realizada por meio de simulação de dinâmica molecular (MD, do inglês *molecular dynamics*). Ao mover cada átomo do sistema independentemente dos demais, há a representação completa da flexibilidade do ligante e da proteína. Entretanto, o progresso em passos muito pequenos e a impossibilidade de sobrepujar grandes barreiras de energia conformacional – o que pode levar à amostragem inadequada das possíveis conformações –

aliado ao elevado custo computacional impossibilita a aplicação dessa técnica no estudo de bibliotecas de moléculas, ainda que pequenas.^{29,31}

Vários outros métodos tem sido implementados para a consideração da flexibilidade do receptor. O mais simples, chamado de “*soft-docking*”, consiste em reduzir a energia de repulsão de Van der Waals na função de score, permitindo assim certo grau de sobreposição atômica entre o ligante e o receptor, o que não inclui adequadamente a flexibilidade, mas é computacionalmente eficiente e representa alguma melhora em relação à estrutura completamente rígida.³⁰

Outra possibilidade é a utilização de bibliotecas de rotâmeros, um conjunto de conformações das cadeias laterais dos aminoácidos determinadas pela análise estatística de dados cristalográficos experimentais, permitindo a consideração da flexibilidade dessas cadeias laterais em uma amostragem relativamente rápida. Diversas cadeias laterais podem ser selecionadas e amostradas simultaneamente com o ligante, enquanto as outras porções do receptor permanecem rígidas.^{29,31}

Recentemente, uma nova metodologia tem se destacado na amostragem da flexibilidade do receptor, unindo a dinâmica molecular aos métodos clássicos de docking, o chamado *ensemble docking*. Por essa metodologia, um conjunto de conformações distintas do receptor macromolecular é obtido a partir da simulação por dinâmica molecular (ou de uma série de estruturas experimentais distintas, se disponíveis) e os ligantes são docados sequencialmente nessas diversas estruturas do receptor.³³

Além de ser computacionalmente mais eficiente que realizar a simulação de dinâmica molecular de cada ligante individualmente, essa estratégia permite a seleção da melhor estrutura do receptor para a interação com cada ligante e se fundamenta no modelo de seleção conformacional, uma diferente perspectiva do encaixe induzido, que afirma que ligantes interagem seletivamente com uma conformação específica dentre um conjunto de possíveis conformações do receptor.^{29,33}

3.2.1 Algoritmos de busca

Diversos algoritmos de busca diferentes foram criados na tentativa de reproduzir satisfatoriamente o modo de ligação experimental, os quais se encontram amplamente implementados em softwares de docking molecular, com destaque para os algoritmos de correspondência, construção incremental, Monte Carlo e algoritmos genéticos.^{30,31}

Algoritmos de correspondência se baseiam no mapeamento do formato molecular de um ligante no sítio ativo em função de características estruturais e informação química tais como grupos doadores ou aceptores de ligação de hidrogênio. Nessa metodologia, a proteína e o ligante são representados por grupos farmacofóricos - o conjunto de características eletrônicas e estéricas que caracterizam subunidades estruturais e grupos funcionais.²⁹

A distância entre grupos farmacofóricos complementares na enzima e no ligante é calculada para cada diferente conformação do ligante, predominando as combinações que maximizem as interações e diminuam as distâncias. Devido à rapidez esse tipo de algoritmo é muito aplicado na triagem computacional de bibliotecas de moléculas na busca por compostos líderes, compostos com possível aplicação farmacêutica em função de alta potência.³⁰

Nos métodos de construção incremental (IC) o ligante é dividido em diversos fragmentos pela quebra das ligações móveis e um desses fragmentos, chamado de âncora - geralmente o maior ou com o papel funcional mais significante na interação com a enzima - é docado no sítio ativo primeiro. Os demais fragmentos são então acrescentados um a um em diferentes orientações de forma a se encaixar no sítio ativo da forma mais satisfatória possível.³¹

Os algoritmos genéticos e de Monte Carlo fazem parte dos métodos estocásticos, isto é, cada novo estado do sistema tem origem em um evento aleatório. Assim, o espaço conformacional é examinado pela modificação aleatória da conformação do ligante, possibilitando mudanças grandes e saltos na barreira de energia potencial e permitindo a consideração de configurações que não seriam aceitas em um método sequencial.^{29,31}

Os algoritmos de busca Monte Carlo geram um conjunto aleatório de configurações do ligante por meio de rotações, translações e rotação de ligações. Cada uma dessas conformações é então avaliada por um critério de seleção baseado na energia. Se passar por esse critério, essa configuração será armazenada e modificada para gerar a próxima conformação, repetindo-se esse processo até que um número pré-definido de conformações seja obtido.^{29,31}

Os algoritmos genéticos, por sua vez, foram inspirados na teoria da evolução de Darwin e se baseiam na codificação dos graus de liberdade do ligante em cadeias binárias denominadas "genes". Esses genes se organizam formando "cromossomos", cada um representando uma determinada configuração do ligante. Um operador genético atua promovendo mutações - a troca aleatória de um desses genes por outro - ou então cruzamentos, no qual porções do gene são trocados entre um cromossomo e outro, o que gera uma nova configuração estrutural para o ligante.³¹

Essas novas estruturas são avaliadas pela função de escore e aquelas que sobreviverem, isto é, superarem a linha de corte, serão usadas para a próxima geração. Essa é a metodologia implementada no software AutoDock, e de forma aprimorada no AutoDock Vina, o programa de docking utilizado nesse trabalho.³⁴

3.2.2 Função de Escore

Os algoritmos de busca são capazes de produzir um conjunto amplo de possíveis soluções, algumas das quais podem ser facilmente desconsideradas em função de sua alta energia por colidirem com a enzima. As outras possibilidades, entretanto, precisam ser classificadas de modo que a orientação do complexo proteína-ligante mais próxima da “verdadeira” seja encontrada e de que seja possível classificar um conjunto de ligantes em razão de suas capacidades de ligação – o que é primordial na triagem virtual de compostos. Essa classificação é feita pela *função de escore*.³⁰

Devido ao grande número de orientações que são geradas durante uma simulação de docking, a classificação das soluções necessita ser realizada de forma rápida. Por essa razão, as funções de escore normalmente envolvem uma estimativa ao invés de um cálculo preciso da energia livre de ligação proteína-ligante, adotando diversas suposições e simplificações.^{30,31}

As funções de escore mais amplamente utilizadas são aquelas baseadas em campos de força, que avaliam a energia livre de ligação por meio da soma das interações não ligadas como interações eletrostáticas e de Van der Waals. As interações eletrostáticas são calculadas por potenciais de Coulomb utilizando uma função dielétrica dependente da distância ao invés de considerar a enzima como um conjunto de cargas pontuais, ao passo que os termos de Van der Waals são descritos por potenciais de Lennard-Jones, ajustados para controlar quão próximo o contato entre os átomos da proteína e do ligante podem ser aceitáveis.^{29,31}

O cálculo dessas funções, que convergem à distância infinita, é computacionalmente custoso. Assim, um raio de corte é utilizado para as interações não ligadas, o que acaba reduzindo a exatidão dos efeitos de longo alcance envolvidos na ligação. A função de escore do software AutoDock é baseada no campo de forças AMBER³⁵ e inclui termos de Van der Waals, ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, entropia conformacional e dessolvatação, em que cada termo é ponderado por um fator obtido a partir de um conjunto de dados experimentais.^{34,35}

As funções de escore empíricas decompõem a energia livre em diversos componentes, como ligações de hidrogênio, interações iônicas, efeitos hidrofóbicos, entre outras, que são multiplicados por um determinado coeficiente e somadas para produzir o escore final. Esses coeficientes são obtidos pelo ajuste de funções de regressão em conjuntos de complexos proteína-ligante com energias livres de ligação conhecidas.^{29,30}

Há ainda funções de escore baseadas no conhecimento de estruturas cristalinas, na qual as distâncias e frequências de contato interatômico de complexos enzima-ligante conhecidos são utilizadas para parametrizar o campo de forças e depois aplicados a sistemas em geral, além do escore de consenso, que combina diversas metodologias diferentes para avaliar as conformações de docking. Nesse método, uma determinada configuração do complexo enzima-ligante só será aceita quando apresentar um bom escore em todas as diferentes metodologias de escore aplicadas.²⁹

3.3 DINÂMICA MOLECULAR

A simulação por dinâmica molecular (DM) é um dos métodos computacionais mais amplamente utilizados no estudo de macromoléculas biológicas como enzimas, receptores, ácidos nucleicos e até mesmo agregados macromoleculares como membranas celulares.³¹

Tais sistemas, compostos por um número muito grande de átomos, não podem ser tratados quanticamente em função da complexidade matemática das equações envolvidas, sobretudo em função dos graus de liberdade eletrônicos, o que demandaria um elevado custo computacional e um tempo de processamento proibitivo.^{30,31}

Nesses sistemas, efeitos de natureza quântica podem ser incorporados dentro de uma descrição clássica, na medida em que as massas e energias envolvidas são muito maiores que as envolvidas em fenômenos quânticos, permitindo uma descrição contínua das transferências de energia e a aplicação da termodinâmica estatística na determinação das suas propriedades macroscópicas, sem perdas importantes da exatidão frente ao resultado real.³⁶

A ideia central da dinâmica molecular é estudar a evolução temporal das partículas de um sistema do qual se conhecem os potenciais de interação entre as partículas e as equações que regem seu movimento. Assim, conhecendo-se as posições e velocidades iniciais das partículas que compõem o sistema, pode-se calcular as forças que atuam sobre cada um delas em função da interação com as demais e determinar novas posições e velocidades em um instante posterior por meio das equações do movimento de Newton.³¹

Essas novas posições são então utilizadas para calcular novas forças, que produzem novas posições e velocidades e assim sucessivamente, gerando-se trajetórias moleculares para todo o sistema. Através das médias dessa trajetória as propriedades macroscópicas podem ser determinadas.³¹

A realização de uma simulação de dinâmica molecular envolve quatro etapas fundamentais, que são a inicialização, o cálculo das forças exercidas sobre cada partícula devido à interação com as demais, a integração das equações do movimento e a amostragem, que envolve a análise e o armazenamento das trajetórias. O cálculo de forças e a movimentação das partículas é realizado recursivamente durante o intervalo de simulação determinado.^{30,36}

A *inicialização* consiste na determinação da configuração inicial do sistema (as posições de cada átomo) e a das velocidades iniciais, que podem ser nulas para o sistema evoluir a partir do repouso ou determinadas pela temperatura numa distribuição de Maxwell-Boltzmann.³¹

Em sistemas biológicos, como é o caso de enzimas, as posições iniciais dos átomos e seus modos de ligação são geralmente obtidas a partir da estrutura cristalográfica da macromolécula. Outras moléculas (ligantes) podem já estar previamente na estrutura experimental ou serem colocadas computacionalmente, inclusive por meio de docking molecular, em uma posição favorável à interação com a enzima.³¹

O sistema é então centrado em uma caixa de simulação, normalmente cúbica, à qual se adicionam um determinado número de moléculas de solvente tal que a densidade numérica corresponda à densidade real nas condições desejadas, além de contra íons para neutralizar quaisquer cargas residuais do sistema. Uma minimização de energia é normalmente efetuada para recomodar todas as moléculas dentro da caixa, eliminando possíveis sobreposições atômicas que prejudicariam o cálculo de forças.^{30,31}

A fim de se eliminar efeitos relacionados com a borda da caixa de simulação, *condições periódicas de contorno* são definidas. Para isso, cópias idênticas da caixa original são dispostas em todas as direções ao redor da caixa central e suas partículas devem se mover de maneira idêntica à da caixa principal. Dessa forma, se um átomo sai por uma das seis faces da caixa principal, sua imagem periódica entra pela face oposta com velocidade idêntica ao que saiu. Assim, o número de partículas permanece inalterado durante toda a simulação.^{31,36}

Um problema surge ao se utilizar condições periódicas de contorno que é a possibilidade de interação entre uma partícula e diversas imagens periódicas de outra, o que eleva o custo computacional. Quando essa interação é de curto alcance (potencial de Lennard-

Jones) utiliza-se a convenção da imagem mínima, segundo a qual uma determinada partícula pode interagir apenas com a imagem mais próxima de outra. Além disso, define-se um raio de corte para esses potenciais, a partir do qual a interação é considerada nula, evitando-se a interação com sua própria imagem ou com a mesma partícula duas vezes.³¹

Para as interações de longo alcance (potencias de Coulomb), cujas forças decaem lentamente com a distância, limitar um raio de corte compromete severamente os resultados da simulação. Assim, a força de interação entre duas partículas é substituída por uma força efetiva, calculada pelo método de Ewald, que soma as interações de uma partícula com todas as imagens periódicas de outra, convergindo no limite infinito, como é o caso do método PME (do inglês, *Particle Mesh Ewald*), uma das variantes da soma de Ewald, que apresenta melhor precisão e velocidade de processamento.^{30,31}

A etapa seguinte, o *cálculo de forças*, é a etapa mais custosa computacionalmente e inicia-se com a determinação das distâncias entre os átomos, comprimentos e ângulos de ligação, ângulos diedros e dos raios de interações inter e intramoleculares de curto e longo alcance. As forças resultantes sobre cada uma das partículas são então calculadas numericamente segundo um conjunto de equações e parâmetros denominado campo de forças.³¹

Esse campo descreve as interações intra e intermoleculares como funções potenciais classificadas como potenciais ligados e não ligados.^{30,31}

Os potenciais ligados se referem aos estiramentos e deformações angulares das ligações químicas bem como a torção de ângulos diedros próprios e impróprios, movimentos que envolvem dois, três ou quatro átomos, respectivamente. As interações de átomos não ligados são tratadas por potenciais efetivos, compostos por uma soma de termos que incluem a repulsão das nuvens eletrônicas e a atração de Van der Waals - comumente descrita pelo potencial de Lennard-Jones - ambos de curto alcance, e o termo eletrostático de Coulomb, de longo alcance.^{31,36}

Com exceção dos átomos vizinhos que estão quimicamente ligados, a interação entre os átomos de uma mesma molécula também é descrita por potenciais não ligados. Essas interações estão intimamente relacionadas com a formação da estrutura tridimensional das macromoléculas biológicas, sendo imprescindível sua parametrização adequada para a simulação satisfatória desse tipo de sistema.³¹

Diversos campos de força foram desenvolvidos para o estudo dos mais diversos sistemas, com destaque para os campos AMBER³⁵, CHARMM³⁷ e GROMOS³⁸, que apresentam uma boa parametrização para simulações de biomoléculas em geral. O campo de

forças AMBER03, utilizados nesse trabalho é do tipo *all-atom*, isto é, todos os átomos do sistema, inclusive hidrogênios apolares são descritos explicitamente, ao contrário dos campos da família GROMOS, que são do tipo *united atom*, não explicitando hidrogênios alifáticos, mas sim os unindo aos átomos pesados visando o aumento do desempenho computacional.^{35,38}

Após o cálculo das forças, a *movimentação das partículas* é realizada por meio da resolução das equações diferenciais do movimento que as controlam. Como o sistema é conservativo, isto é, o potencial interno não depende das velocidades nem do tempo, a força resultante (F_i) atuando sobre uma determinada partícula i (já calculadas pelo campo de força) em um determinado instante de tempo t , é uma função apenas das coordenadas da partícula (r_i) segundo a equação clássica do movimento newtoniano:

$$a_i = \frac{d^2 r_i}{dt^2} = \ddot{r}_i(t) = \frac{F_i(t)}{m_i} \quad (1)$$

Onde a_i é a aceleração da partícula, m_i é sua massa e r_i sua posição no tempo t . Assim, conhecendo-se a força resultante e a massa das partículas, suas posições em um tempo ($t + \delta t$) podem ser determinadas, em que δt , normalmente da ordem de femtossegundos (10^{-15} s), é chamado de passo de integração. Diversos algoritmos de integração numérica podem ser utilizados na simulação de DM, com destaque para os algoritmos de *Verlet* e *leap-frog*.³¹

Após o cálculo das novas posições e velocidades (atualização da trajetória), as forças resultantes são novamente calculadas, produzindo outras posições e velocidades, processo que se repete alguns milhões de vezes, de tal forma que intervalos da ordem de dezenas a centenas de nanossegundos sejam simulados.^{30,31}

Naturalmente, a memória necessária para armazenar as informações de posição, velocidades e aceleração em três dimensões para todas as partículas que compõem o sistema em cada um desses milhões de passos é absolutamente grande. Por essa razão, após um determinado número de etapas ou passos de integração pré-determinados, as trajetórias são gravadas, num processo chamado de amostragem.^{31,36} Com as trajetórias do sistema, expressas em função das posições e velocidades atômicas, propriedades termodinâmicas como a energia interna, entalpia e capacidade calorífica, propriedades estruturais e propriedades dinâmicas podem ser determinadas.³¹

4 METODOLOGIA

4.1 MÉTODOS EXPERIMENTAIS

4.1.1 Clonagem, superexpressão e purificação da enzima DHS desidratase

O gene *AsbF* que decodifica dehidroshikimato desidratase em *Bacillus thuringiensis* 97-27 foi clonado nos sítios de restrição *NdeI/EcoRI* de um vetor pET28a(+) similarmente digerido para expressão em *Escherichia coli*. O vetor resultante, denominado pDTF_asbF_1191, foi transformado em *E. coli* BL21 utilizando-se o método de choque térmico.

Essa etapa do trabalho foi realizada por Dr. David T. Fox e equipe no Laboratório Nacional de Los Alamos (Los Alamos, Estados Unidos). Todas as demais etapas experimentais foram realizadas pelos autores no Laboratório de Bioquímica da Northern Arizona University (Flagstaff, Estados Unidos) sob supervisão do Dr. Andrew Koppisch e da Dra. Cindy Browder, com suporte financeiro da Capes por meio do programa Ciência sem Fronteiras.

Uma colônia piloto de *E. coli* transformada com o vetor pDTF_asbF_1141 foi cultivada em 10 mL de meio de cultura Luria-Bertani (LB) na presença de canamicina (50 µg/mL) a 37°C de um dia para o outro. Essa colônia foi então transferida para um frasco contendo 1000 mL de meio LB e igual concentração de canamicina, sendo incubada a 37°C até atingir uma densidade ótica em 600 nm (OD₆₀₀) de aproximadamente 0,5. Em seguida, a produção de DHS desidratase foi induzida por meio da adição de 1 mL de IPTG (0,5 mol/L) ao meio de cultura. Uma alíquota de 40 mL dessa cultura, retirada anteriormente à adição de IPTG, foi separada a fim de ser utilizada como controle. As culturas foram então incubadas a 25°C durante 15 horas sob agitação constante.

Após esse período de incubação, as culturas foram separadas em frações e centrifugadas a 4000 rpm durante 40 minutos, ao final dos quais o sobrenadante foi separado e o sólido (pelota de células) foi armazenado a -80°C.

Amostras de células induzidas e não induzidas foram colocadas em tubos Eppendorff aos quais se adicionou 1 mL do reagente de extração de proteína BugBuster™ (Novagen). Essas células foram ressuspensas e sonicadas por 2 minutos (20 kHz, 120 W) para promover a abertura da parede celular e liberação de seu conteúdo (lise das células), e centrifugadas a 13000 rpm durante 10 minutos, a fim de se separar os detritos celulares do lisato. Em seguida, alíquotas de 5 e 10 µL dos lisatos induzido e não induzido foram colocadas em tubos

Eppendorff aos quais se adicionou 15 e 10 μL , respectivamente, de uma mistura de dodecil sulfato de sódio (SDS), solução tampão e corante azul de coomassie, seguido de um tratamento térmico a 80°C durante 5 minutos.

Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi realizada utilizando-se essas amostras e a escada de proteínas BenchMark™ (Life Technologies) a fim de verificar a superexpressão de DHS desidratase em comparação com o grupo de controle que não foi induzido a produzir essa enzima. A corrida foi realizada com uma tensão de 200 V e corrente de 125 mA durante 40 minutos em tampão MES (1X).

Após, as células de *E. coli* induzidas foram resuspensas em 20 mL de tampão de lise (50 mM de tampão HEPES pH 7.5, 10 mM de β -mercaptoetanol, 10 mM de imizadol, 1 mM de inibidor de protease PMSF e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de lisozima) e incubadas em gelo com agitação suave durante 1 hora, seguida da sonicação (20 kHz, 120 W) em seis períodos de um minuto com um minuto de intervalo entre eles e centrifugação a 4000 rpm durante 40 minutos. Os detritos celulares foram então separados do sobrenadante, o qual foi adicionado à resina Ni-NTA agarose e incubado por 10 horas a 4°C, a fim de garantir máxima imobilização da enzima recombinante, marcada com seis histidinas na porção N-terminal, na resina de níquel.

Em seguida, a suspensão foi vertida em uma coluna e eluída com um conjunto de soluções tampão contendo 50 mM de tampão HEPES pH 7.5, 10 mM de β -mercaptoetanol e concentrações maiores de imizadol (de 10 a 250 mM). Alíquotas de 10 μL de cada eluato foram colhidas, adicionadas a 10 μL de solução SDS, tampão e corante azul de coomassie, tratadas a 80°C durante 5 minutos e alocadas no gel de eletroforese juntamente com a escada de proteínas BenchMark™. SDS-PAGE foi realizada utilizando-se um potencial de 120 V e corrente de 55 mA durante 2 horas.

A fração contendo enzima pura, segundo julgado pela análise de SDS-PAGE, foi concentrada por meio de centrifugação a 4000 rpm em um tubo de diálise durante 10 minutos e lavada pela adição de 5 ml de solução tampão (50 mM HEPES pH 7.5, 10 mM de 2-mercaptoetanol) e nova centrifugação. A enzima recombinante DHS desidratase foi congelada como uma solução estoque em 30% de glicerol e armazenada a -80°C.

4.1.2 Estudos de inibição de DHS desidratase

Um conjunto de 48 pequenas moléculas comercialmente disponíveis foi avaliado a fim de se encontrar potenciais inibidores, quantificar e comparar sua potência e avaliarem-se relações entre estrutura-atividade. Tais moléculas foram selecionadas principalmente em

função de sua similaridade estrutural com o produto ou com o substrato da reação enzimática. As estruturas químicas e os respectivos códigos utilizados nesse trabalho para tais compostos podem ser encontrados na tabela 1.

Os ensaios inibitórios foram realizados a 30°C em placas de microtitulação de 96 poços com volumes totais de 200 µL, consistindo de 50 mM de agente tamponante HEPES em pH 8.3, 50 mM de NaCl, 7,5 mM de MgCl₂, 0,1 µg/mL de albumina de soro bovino (BSA), 100 µM de β-mercaptoetanol e 25 mM de ácido 3-dehidroshikímico (DHS), além de 12 concentrações distintas do potencial inibidor (0, 12.5, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600 e 700 µM).

As misturas reacionais foram inicialmente incubadas a 30°C durante 5 minutos, seguida da adição simultânea de 75 nM de enzima purificada em cada um dos 12 poços de trabalho utilizando-se micropipeta multicanal. Imediatamente após essa adição, a formação de produto foi mensurada por meio do aumento da absorção em 290 nm durante 15 minutos, com 16 segundos de intervalo entre as medidas, em uma leitora de microplacas BioTek HD[®].

As taxas iniciais de reação foram medidas durante o aparecimento dos primeiros 3-10% de 3,4-dihidróxibenzoato, o que corresponde ao intervalo entre 2 e 8 minutos do ensaio cinético. Tais taxas foram determinadas por meio da inclinação (“*slope*”) da curva de absorção versus tempo nesse intervalo. Por meio da correlação entre as taxas de reação e a concentração do inibidor de estudo foi possível estimar a concentração inibitória média (CI₅₀ ou IC₅₀) e assim comparar a ação dessas moléculas como inibidores de DHS desidratase.

Os dados cinéticos foram ajustados utilizando-se o software OriginPro 9.0. Os ensaios foram realizados em duplicata para cada um dos compostos.

Tabela 1 – Estrutura química e códigos adotados nesse trabalho dos potenciais inibidores estudados.

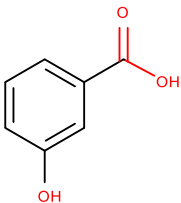
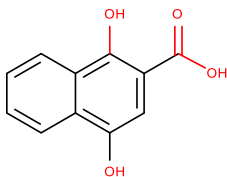
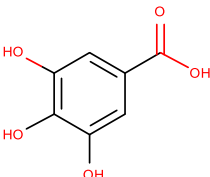
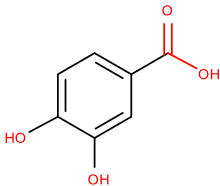
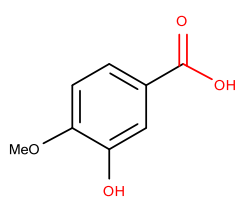
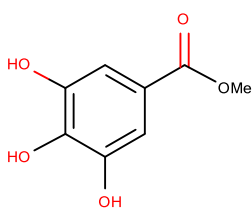
			
Inibidor 1	Inibidor 2	Inibidor 4	Inibidor 5

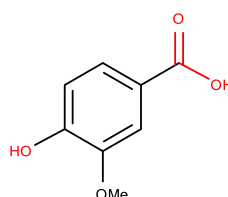
Tabela 1 cont. – Estrutura química e códigos adotados nesse trabalho dos potenciais inibidores estudados.



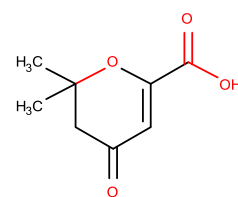
Inibidor 6



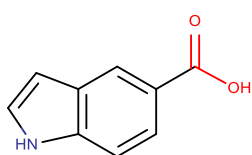
Inibidor 7



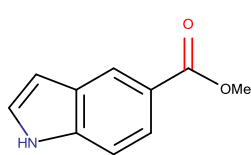
Inibidor 8



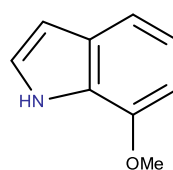
Inibidor 9



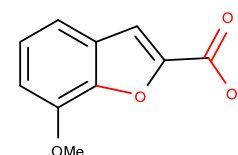
Inibidor 10



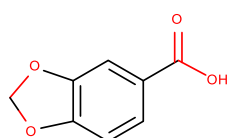
Inibidor 11



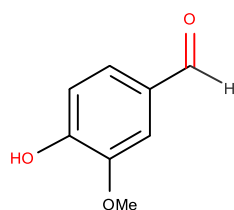
Inibidor 12



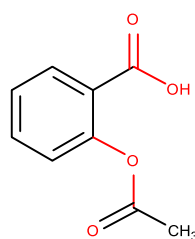
Inibidor 13



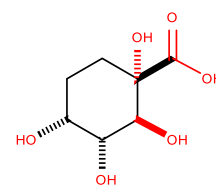
Inibidor 14



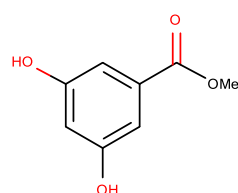
Inibidor 15



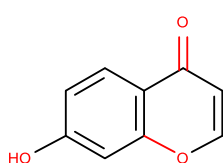
Inibidor 16



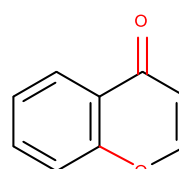
Inibidor 17



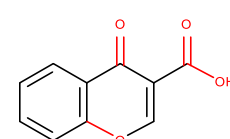
Inibidor 18



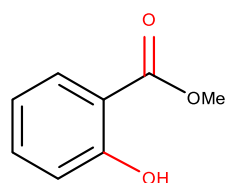
Inibidor 19



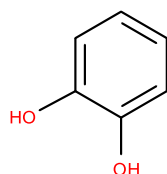
Inibidor 20



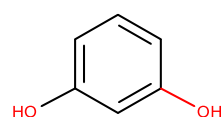
Inibidor 21



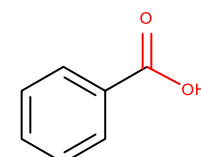
Inibidor 22



Inibidor 23

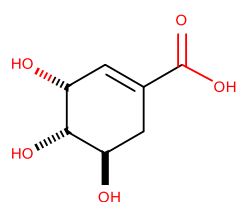


Inibidor 24

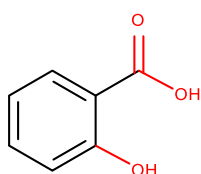


Inibidor 25

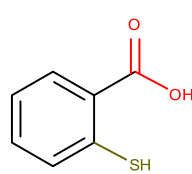
Tabela 1 cont. – Estrutura química e códigos adotados nesse trabalho dos potenciais inibidores estudados.



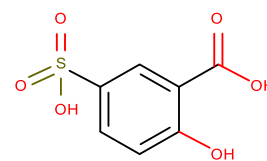
Inibidor 26



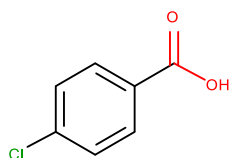
Inibidor 27



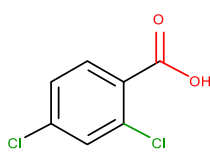
Inibidor 28



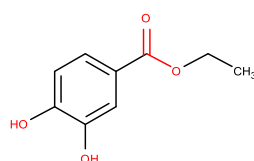
Inibidor 29



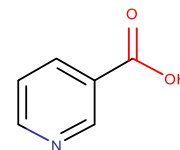
Inibidor 30



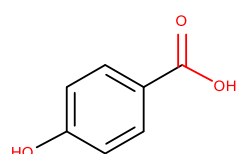
Inibidor 31



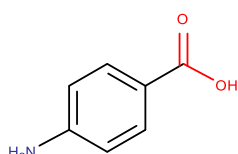
Inibidor 32



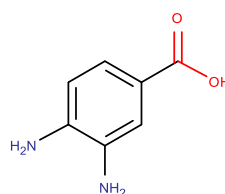
Inibidor 33



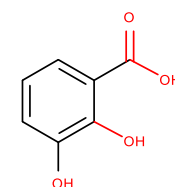
Inibidor 34



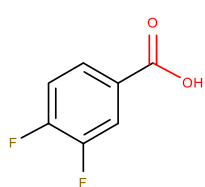
Inibidor 35



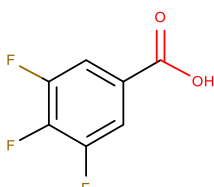
Inibidor 36



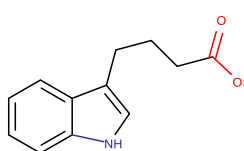
Inibidor 37



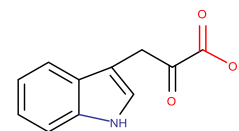
Inibidor 38



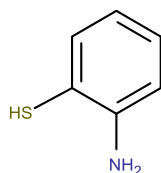
Inibidor 39



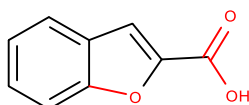
Inibidor 40



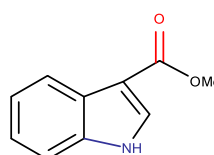
Inibidor 41



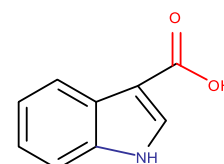
Inibidor 42



Inibidor 43

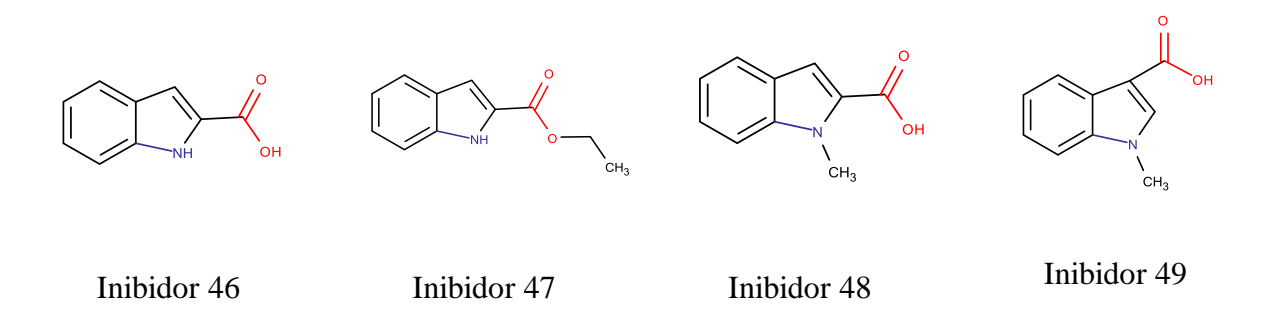


Inibidor 44



Inibidor 45

Tabela 1 cont. – Estrutura química e códigos adotados nesse trabalho dos potenciais inibidores estudados.



4.2 MÉTODOS COMPUTACIONAIS

4.2.1 Docking molecular

A estrutura do receptor (AsbF) foi obtida do *Protein Data Bank*³⁹ a partir da estrutura cristalográfica determinada por Pflieger e colaboradores (PDB ID 3DX5)²². Além da proteína, a estrutura original continha moléculas de glicerol, ácido 3,4-dihidroxibenzóico (DHB), 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol (TRIS) além de águas de cristalização e íons cloreto e manganês. Apenas as coordenadas da enzima e dos íons foram mantidas nos arquivos de entrada, tanto do docking como da dinâmica molecular.

Tendo crescido em um meio enriquecido em selenometionina a proteína apresentava resíduos selenometionina ao invés de metionina.⁴⁰ Igualmente, a estrutura cristalográfica foi obtida utilizando-se manganês como cofator, ao passo em que os estudos experimentais de potenciais inibidores foram realizados na presença de magnésio. Assim uma substituição direta de Se por S, nos resíduos metionina, e de Mn^{2+} por Mg^{2+} foi realizada no arquivo de coordenadas do receptor, de modo a reproduzir mais fielmente as condições experimentais empregadas.

O padrão de protonação da enzima, após tais modificações, foi analisado por meio do programa PROPKA^{41,42} resultando em uma carga total média entre -13,41 para a proteína desnaturada e de -15,17 na sua forma envelopada em pH 7. Como nenhum resíduo apresentou pKa entre 7 e 8,3, o padrão de protonação médio da enzima é o mesmo no pH experimental de 8,3.

O arquivo de entrada para o docking, no formato *pdqt* foi gerado por meio do programa AutoDockTools (ADT)^{43,44} a partir do arquivo *pdb*. Para tanto, todos os hidrogênio polares foram adicionados à estrutura, cargas de Kollman (-5) foram adicionadas e tipos

atômicos AD4 foram assinalados. O programa de interfaceamento ADT assinalou uma carga total final de -14 para a proteína.

A estrutura dos 48 potenciais inibidores foi construída utilizando-se o programa MarvinSketch⁴⁵, que permitiu o cálculo do pKa e do padrão de protonação das moléculas em função do pH. Para alguns inibidores houve mais do que um estado de protonação relevante em condições de pH 8,3. Nesses casos, todos os demais estados relevantes foram considerados. O número total de estruturas obtido foi 91.

As estruturas de todos os inibidores, do substrato, 3-dehidroshikimato (3-DHS) e do produto, ácido 3,4-dihidroxibenzoico (3,4-DHB) foram construídas com o programa GaussView⁴⁶ e otimizadas por meio de cálculo quântico *ab initio* utilizando-se o conjunto de base RHF/6-31G(d,p) por meio do GAUSSIAN09.⁴⁷

Após a otimização, os arquivos de saída do GAUSSIAN, no formato *log*, foram convertidos para o formato mol2, que preserva as cargas quânticas calculadas, por meio do programa Babel⁴⁸ e os arquivos de entrada para o docking, no formato *pdbqt*, foram construídos a partir dos arquivos *mol2* por meio do AutoDockTools. Nessa conversão, os hidrogênios apolares foram unidos aos átomos pesados e tipos atômicos padrão AD4 foram assinalados.

Dockings preliminares foram realizados com o programa AutoDock⁴⁹, utilizando-se a interface AutoDockTools. Como passo inicial, um docking “cego” foi realizado, isto é, um docking com um *grid* capaz de envolver toda a proteína, utilizando 3,4-DHBA como o ligante. A configuração mais favorável mostrou o ligante no sítio ativo, em uma conformação quase coincidente com o resultado cristalográfico, apesar de um padrão diferente de ligações de hidrogênio ser encontrado.

Nos cálculos de docking posteriores, uma caixa de dimensões 26 x 26 x 26 Å foi construída ao redor do sítio ativo. Os cálculos de docking foram realizados com o programa AutoDock Vina³⁴ em triplicata, para cada estado de protonação relevante de molécula. A média aritmética da menor energia livre de ligação obtida em cada um desses três dockings independentes foi calculada para todas as estruturas (*escore* final, em kcal/mol).

4.2.2 Dinâmica molecular

As simulações por dinâmica molecular (DM) foram realizadas utilizando-se os programas do pacote GROMACS^{50,51,52} com o campo de forças Amber03⁵³. Quatro sistemas distintos foram simulados: *enzima livre*, que corresponde à proteína isolada em água pura;

enzima-ligante 4, isto é, a proteína complexada com ácido gálico, o inibidor mais potente segundo resultados experimentais; *enzima-produto*, o conjunto da enzima em complexo com o ácido 3,4-dihidroxibenzóico, o produto da reação enzimática; e *enzima-substrato*, a proteína em complexo com 3-dehidroshikimato.

As coordenadas de entrada dos ligantes (ácido gálico, 3,4-DHBA e 3-DHS) foram obtidas a partir do resultado de docking com a menor energia livre de ligação (melhor docking score), no formato *pdbqt*, o que corresponde aos ligantes já posicionados na região do sítio ativo. Esses arquivos foram convertidos para o formato *mol2* por meio do programa Babel⁴⁸ e cargas do modelo AM1BCC⁵⁴, utilizadas para produzir cargas atômicas que mimetizam o potencial eletrostático HF/6-31G*, foram assinaladas por meio do programa ACPYPE⁵⁵, que também foi utilizado para gerar arquivos de topologia e coordenadas dos ligantes próprios para o Gromacs (formatos *itp* e *gro*, respectivamente).

Os arquivos de entrada do receptor, incluindo a topologia, foram gerados pelo programa *pdb2gmx* do pacote Gromacs a partir dos dados do Protein Data Bank, no formato *pdb*, após as modificações anteriormente descritas.

Cada sistema foi centrado em uma caixa cúbica, cujas paredes distanciavam-se em pelo menos 1,0 nanômetro da enzima. A caixa foi então preenchida com aproximadamente 15.000 moléculas de água do tipo TIP3P⁵⁶. Em seguida fez-se uma minimização de energia por meio do algoritmo *steepest descendent*, seguida da inserção de 64 íons sódio e 47 íons cloreto, de forma a neutralizar as cargas e aproximar o sistema das condições fisiológicas.

Logo após fez-se novamente uma minimização energética, seguida de uma simulação de dinâmica molecular com restrição de posições na qual apenas as moléculas de solvente são permitidas a se moverem, de tal forma que interações desfavoráveis solvente-soluto sejam minimizadas ou eliminadas. Essa simulação foi realizada em 50.000 passos de 1,0 femtossegundos, totalizando 50 ps. Os sistemas obtidos nessa etapa foram considerados o tempo inicial.

Em seguida, fez-se a simulação de dinâmica molecular propriamente dita, na qual todos os graus de liberdade do sistema são considerados. A duração total de cada simulação foi de 60 ns, com passo de integração de 2 fs, totalizando 30 milhões de passos para cada sistema. As trajetórias foram salvas em intervalos de 5 ps.

Todas as simulações foram realizadas no ensemble NPT, isto é, com número de partículas, pressão e temperatura constantes. A temperatura de 303K (30°C) foi ajustada com o termostato V-rescale⁵⁷, ao passo em que a pressão de 1 bar foi ajustada com barostato de Parrinello-Rahman⁵⁸. As interações eletrostáticas de longo alcance foram corrigidas pelo

método PME⁵⁹, com um raio de corte de 1,4 nm para interações de longo alcance do tipo Lennard-Jones e de 1 nm para as interações do tipo Coulomb.

Gráficos e figuras desse trabalho foram gerados utilizando-se os programas ADT, RasMol⁶⁰, MarvinSketch e XMGRACE.⁶¹

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

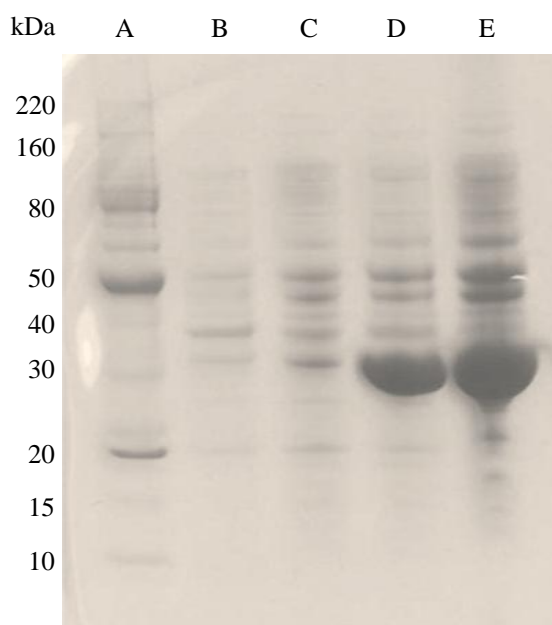
5.1 RESULTADOS EXPERIMENTAIS

5.1.1 Superexpressão e purificação da enzima

Inicialmente, avaliou-se se a superexpressão da enzima foi realizada satisfatoriamente. Na figura 11 está mostrado o resultado da eletroforese em gel de poliacríamida na presença de SDS (SDS-PAGE) comparando-se o conteúdo proteico dos lisatos de *E. coli* não induzidos e induzidos para a síntese de DHS desidratase.

Pode-se observar a presença de uma mancha muito intensa em torno de 36 kDa para as bactérias que foram induzidas para a síntese da enzima, ao passo em que o lisato das bactérias não induzidas apresenta uma marca muito tênue nessa mesma região. Esse resultado, em concordância com o esperado pra DHS desidratase, indica que a modificação genética de *E. coli* e a produção de enzima recombinante foram satisfatórias.

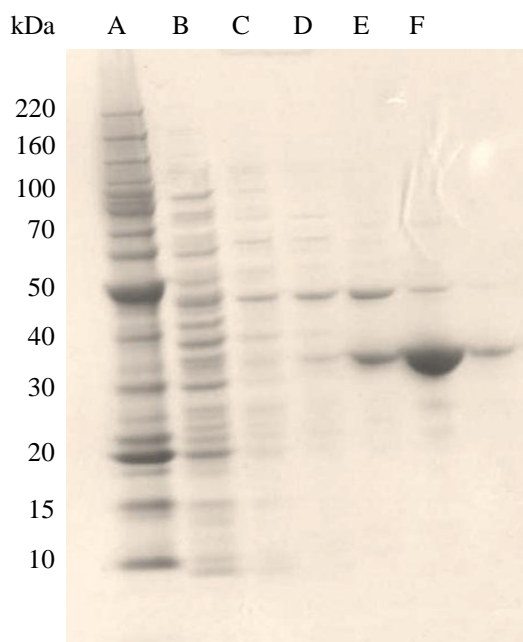
Figura 11 – Eletroforese em gel de poliacríamida em presença de SDS corado com azul de Coomassie na presença do marcador de pesos moleculares Benchmark (faixa A), do lisato de *E. coli* não induzidas (faixas B e C) e induzidas para a superexpressar DHS desidratase (faixas D e E).



De posse desse resultado, procedeu-se à purificação da enzima de interesse por meio de cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados, utilizando-se a resina níquel-NTA, tendo em vista que a DHS desidratase recombinante foi marcada com seis histidinas na porção N-terminal, resíduos que, pela presença do grupo imidazol, apresentam forte capacidade de interação com íons metálicos, sobretudo níquel.

Na figura 12 pode-se observar o gel utilizado em SDS-PAGE após revelação com o corante azul de Coomassie de cinco frações coletadas após eluição em concentrações aumentadas de imidazol em comparação com o padrão de pesos moleculares. Pode-se observar que a fração com concentração de 250 mM de imidazol apresenta praticamente uma única mancha em torno de 36 kDa, como o esperado para DHS desidratase. Essa fração foi posteriormente concentrada e lavada para remover resíduos de imidazol, permitindo assim a obtenção de enzima recombinante pura para os ensaios cinéticos.

Figura 12 – Eletroforese SDS-PAGE corado com azul de Coomassie na presença do marcador de pesos moleculares Benchmark (faixa A) e dos eluatos com concentrações aumentadas de imidazol, de 0 mM até 250 mM (faixa B até F).



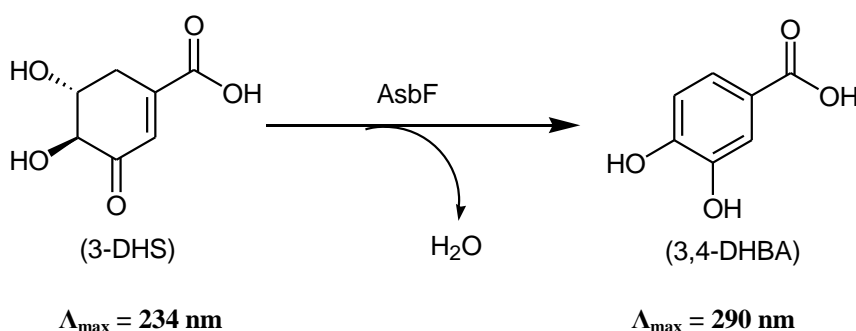
5.1.2 Estudo de potenciais inibidores

Um conjunto de 48 pequenas moléculas disponíveis comercialmente foi analisado a fim de se encontrar potenciais inibidores e de avaliar relações entre as modificações estruturais e a atividade.

O potencial inibitório dessas moléculas foi avaliado por meio da determinação da concentração inibitória média (CI_{50} ou IC_{50}), um parâmetro determinado cineticamente e que corresponde à concentração de uma droga ou composto necessária para diminuir pela metade uma resposta biológica.²⁶ Nesse caso em particular, o IC_{50} corresponde à concentração necessária para diminuir em 50% a velocidade da reação catalisada pela enzima DHS desidratase, *in vitro*.

Os estudos cinéticos utilizados para essa determinação estão baseados no fato de que a conversão de substrato a produto, isto é, a desidratação de 3-desidroschikimato a 3,4-dihidroxibenzoato (Figura 13) é acompanhada de uma mudança no comprimento de onda de absorção máxima no UV-visível de 234 nm para 290 nm.

Figura 13 – A conversão de ácido 3-dehidroschikímico a ácido 3,4-dihidroxibenzoico é acompanhada de deslocamento do comprimento de onda de máxima absorção, permitindo o acompanhamento da cinética de formação de produto.

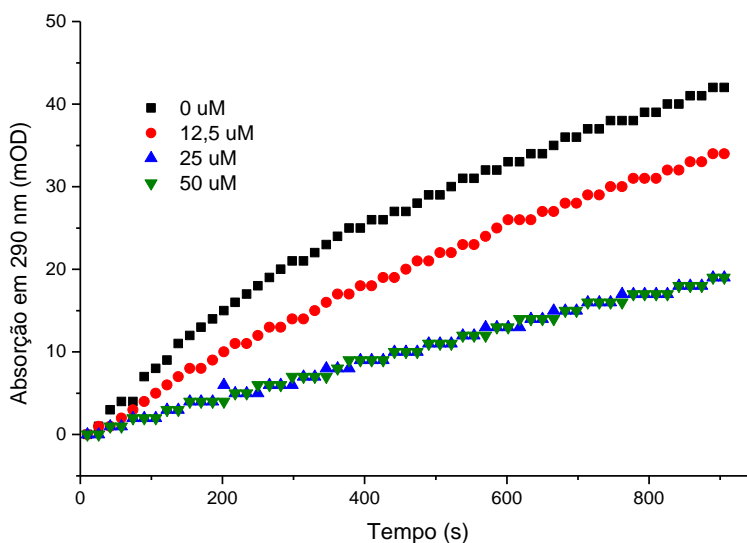


É esse deslocamento da absorção que permite o acompanhamento da cinética de formação de produto, o que por sua vez permite inferir se as moléculas estudadas tem alguma influência sobre a velocidade da reação, atuando eventualmente como inibidores da enzima, tendo em vista que essa reação não ocorre sem a catálise enzimática. Portanto, mantidas iguais condições experimentais, apenas a ação desses compostos sobre a enzima poderia justificar a diminuição das taxas de reação, indicando um efeito inibitório.

Dessa forma, para cada um dos 48 compostos estudados, a absorção em 290 nm imediatamente após a adição da enzima foi registrada em função do tempo, durante 15 minutos com 16 segundos de intervalo entre as medições e na presença de 12 concentrações distintas do potencial inibidor, as quais variaram de 0 μM (controle) até 700 μM . Esse procedimento foi realizado em duplicata para cada molécula de estudo, utilizando-se placas de microtitulação em uma leitora UV-visível adequada e equipada com controle térmico.

Tomando-se como exemplo o composto 7, galato de metila, pode-se observar na figura 14 o gráfico da absorção em 290 nm em função do tempo sem inibidor e na presença de três concentrações distintas de galato de metila, após correção da linha base.

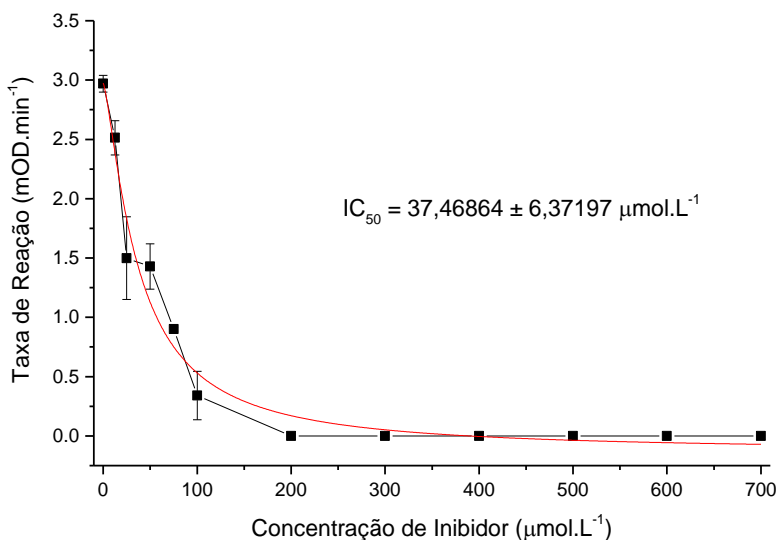
Figura 14– Curva da absorção em 290 nm em função do tempo na ausência (■) e na presença de 12,5 μM (●), 25 μM (▲) e 50 μM (▼) de galato de metila.



Claramente observa-se uma diferença no perfil das curvas na medida em que a concentração do composto 7 aumenta, uma vez que mais tempo é necessário para se obter a mesma absorção diante do aumento da concentração de galato de metila.

Na figura 15 está mostrado a taxa de reação, obtida pela inclinação (“*slope*”) da curva de absorção versus tempo, entre 2 e 8 minutos, em função da concentração de galato de metila. Pode-se observar que há o decréscimo da velocidade de reação na medida em que ocorre o aumento da concentração desse composto, atingindo-se um patamar de taxa de reação nula, isto é, completa inibição da enzima, a partir de 200 μM do composto.

Figura 15 – Taxa de reação, calculada entre 2 e 8 minutos, em função da concentração de galato de metila, ajuste de curva logística e IC_{50} determinado.



O IC₅₀ pode então ser calculado por meio do ajuste de uma curva não linear (linha vermelha no gráfico da figura 15), como uma curva de dose-resposta, definida como:

$$y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + 10^{(LOGx0-x)p}} \quad (2)$$

Onde A_1 é o valor da assíntota inferior, A_2 é o valor da assíntota superior, p é a declividade da curva, também chamado de coeficiente de Hill e $LOGx0$ é o valor de x na posição de meia altura da sigmoide, isto é, o IC₅₀.²⁶

Quando o valor da assíntota inferior é nulo, como no caso em questão, a equação de dose-resposta se torna uma função logística,²⁶ definida nos mesmos parâmetros, a saber:

$$y = \frac{A_2}{1 + 10^{(LOGx0-x)p}} \quad (3)$$

Para o galato de metila, o IC₅₀ determinado por meio do ajuste de uma curva logística foi de $37,47 \pm 6,37 \mu\text{M}$.

Dentre os 48 compostos avaliados, 25 tiveram um potencial inibitório mensurável. Esses compostos, listados em ordem crescente de IC₅₀, isto é, em ordem decrescente de potencial inibitório estão mostrados na tabela 2.

Tabela 2 - Lista de compostos com potencial inibitório mensurável em ordem crescente de IC₅₀

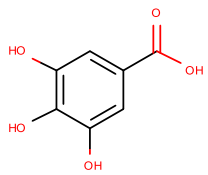
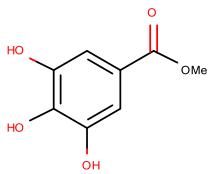
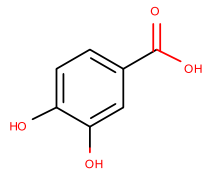
Código	Nome	Estrutura	IC ₅₀ ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
4	Ácido gálico		4.36 ± 0.80
7	Galato de metila		37.5 ± 6.4
5	Ácido 3,4-dihidroxibenzóico		38.0 ± 3.5

Tabela 2 cont. - Lista de compostos com potencial inibitório mensurável em ordem crescente de IC₅₀

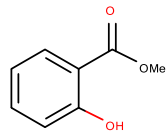
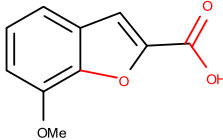
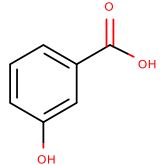
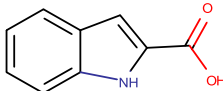
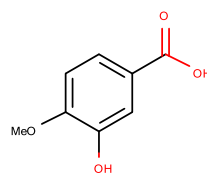
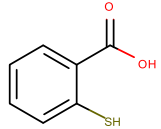
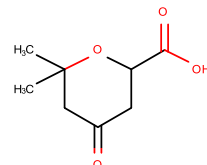
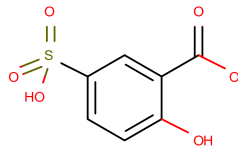
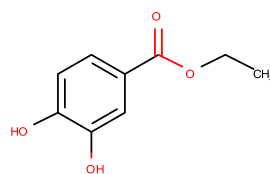
Código	Nome	Estrutura	IC ₅₀ (μmol.L ⁻¹)
22	Salicilato de metila		56.7 ± 44.8
13	Ácido 7-metóxi-2-benzofurancarboxílico		68.5 ± 18.0
1	Ácido 3-hidroxibencóico		71.5 ± 6.9
46	Ácido indol-2-carboxílico		90.0 ± 9.6
6	Ácido isovanílico		92.1 ± 10.4
28	Ácido tiosalicílico		108.2 ± 29.1
9	3,4-dihidro-2,2-dimetil-4-oxo-2H-pirano		190.7 ± 14.5
29	Ácido 5-sulfosalicílico		221.3 ± 95.2
32	3,4-dihidroxibenzoato de etila		225.0 ± 55.1

Tabela 2 cont. - Lista de compostos com potencial inibitório mensurável em ordem crescente de IC₅₀

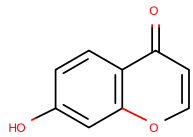
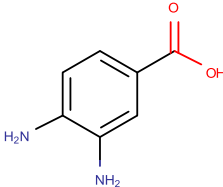
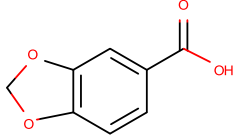
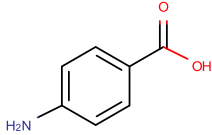
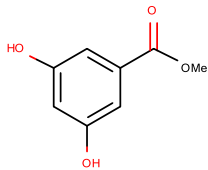
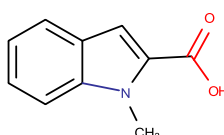
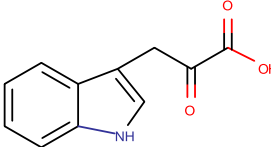
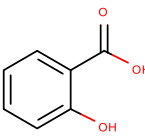
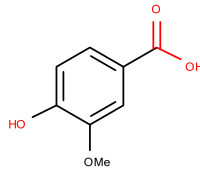
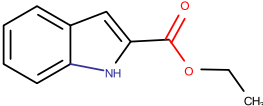
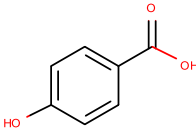
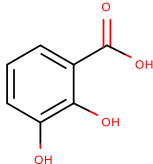
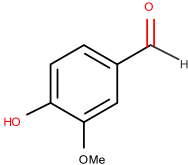
Código	Nome	Estrutura	IC ₅₀ (μmol.L ⁻¹)
19	7-hidroxicromona		246.4 ± 29.1
36	Ácido 3,4-diaminobenzóico		273.0 ± 15.3
14	Ácido Piperonílico		286.7 ± 96.4
35	Ácido 4-aminobenzóico		304.4 ± 39.7
18	3,5-dihidroxi benzoato de metila		350.1 ± 38.8
48	Ácido 1-metil-indol-2-carboxílico		355.8 ± 55.1
41	Ácido indol-3-pirúvico		386.5 ± 58.5
27	Ácido salicílico		423.7 ± 29.8
8	Ácido vanílico		440.8 ± 16.3

Tabela 2 cont. - Lista de compostos com potencial inibitório mensurável em ordem crescente de IC₅₀

Código	Nome	Estrutura	IC ₅₀ (μmol.L ⁻¹)
47	Indol-2-carboxilato de etila		480.1 ± 125.8
34	Ácido 4-hidroxibenzoico		536.4 ± 114.1
37	Ácido 2,3-dihidroxibenzoico		542.8 ± 20.6
15	Vanilina		857.748

Dentre esses resultados, destaca-se o fato do produto da reação, o ácido 3,4-dihidroxibenzoico aqui denominado inibidor 5, apresentar um excelente potencial inibitório: o terceiro melhor da série analisada. Pflieger e colaboradores (2008) observaram por meio da cristalografia de raios-X a presença desse composto coordenado à região da enzima que corresponde ao sítio ativo, inclusive deduzindo algumas possíveis interações do tipo ligação de hidrogênio entre o ácido 3,4-dihidroxibenzoico e os resíduos dessa região.²² Entretanto, esta é a primeira comprovação experimental da existência de retroinibição e a quantificação da sua magnitude.

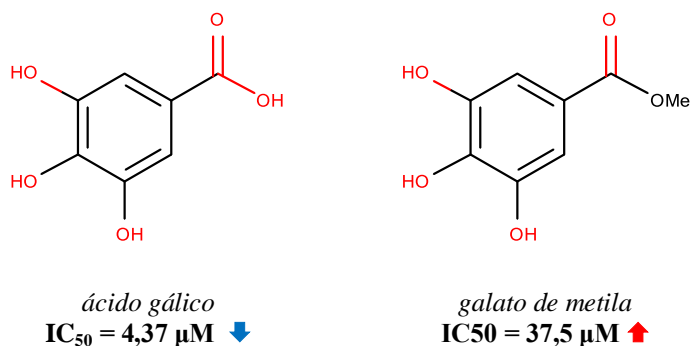
Essa observação é importante, não só no que se refere ao desenvolvimento de inibidores, mas também quando se considera a potencial aplicação desse sistema na biossíntese de 3,4-DHB, um insumo industrial de grande importância como intermediário na síntese de resinas, poliésteres, plastificantes, corantes, entre outros produtos orgânicos, além de medicamentos, onde o próprio composto é utilizado como agente anticarcinogênico e intermediário de diversas classes de fármacos. Atualmente, a produção desse insumo advém exclusivamente de derivados de petróleo.⁶²

5.1.3 Relações estrutura-atividade

A partir da comparação dos resultados experimentais com a estrutura química dos compostos estudados, pode-se observar uma série de fatores determinantes para a atuação de uma molécula como inibidor de DHS desidratase.

O primeiro desses fatores estruturais é a presença de um grupo carboxílico livre que possa atuar como acceptor de ligação de hidrogênio, como se pode observar por meio da comparação entre o ácido gálico e o galato de metila (Figura 16).

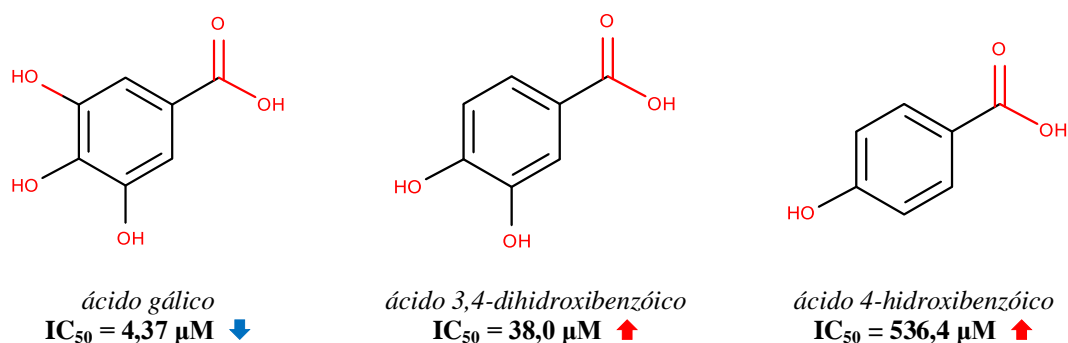
Figura 16 – Comparativo entre o potencial do ácido gálico (inibidor 4) com o galato de metila (inibidor 7) mostrando a importância do grupo ácido carboxílico no potencial inibitório.



Considerando-se que no pH experimental de 8,3 o grupo ácido encontra-se desprotonado, pode-se inferir que essa região da molécula atua como acceptor de ligação de hidrogênio ou então coordena-se ao sítio ativo por meio de uma interação eletrostática – possivelmente com cofator magnésio. A proteção desse por metilação reduz em quase 10 vezes o poder inibitório, indicando que esta é uma característica estrutural de extrema importância, que deve ser levada em consideração no desenho de novos fármacos.

Outro fator estrutural de grande importância é a presença dos grupos hidroxila no anel aromático, os quais permanecem protonados neste pH para a grande maioria dos compostos, atuando assim como doadores de ligação de hidrogênio. Comparando-se o potencial inibitório do ácido 4-hidroxibenzoico com seus análogos –di e –trihidroxilados (Figura 17) pode-se observar que há um efeito sinérgico entre o aumento no número de grupos hidroxila e a diminuição do IC_{50} .

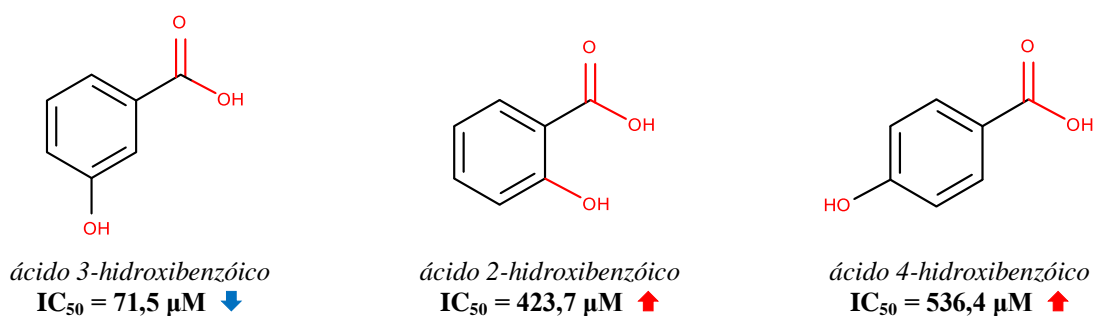
Figura 17 – Comparativo dos IC_{50} do ácido gálico (inibidor 4), do 3,4-DHB (inibidor 5) e do ácido *p*-hidróxibenzóico (inibidor 34) demonstrando o efeito sinérgico que o aumento no número de grupos OH no anel tem sobre o potencial inibitório.



De fato, passando-se de um para dois grupos OH, a capacidade de uma molécula inibir DHS desidratase aumenta 14 vezes, ao passo em que alterando-se de dois para três grupos hidroxila (ácido gálico) o potencial inibitório apresenta uma melhora por um fator de aproximadamente 9. Esse resultado indica que há pelo menos outras três regiões aptas a interações do tipo ligação de hidrogênio no sítio ativo enzimático além daquela que envolve o ácido carboxílico, as quais devem também serem exploradas no desenvolvimento de novos inibidores.

Quando se considera o padrão de substituição aromático individualmente (Figura 18), pode-se observar que a presença de um grupo doador de hidrogênio na posição *meta* tem o efeito inibitório mais significativo enquanto que os isômeros *orto* e *para*-substituídos apresentam pouca diferença entre si. Isso indica que a ligação de hidrogênio mais intensa ocorre entre a hidroxila na posição *três* do anel aromático e o algum resíduo – possivelmente receptor de hidrogênio – do sítio ativo em função de uma maior proximidade ou melhor direcionalidade.

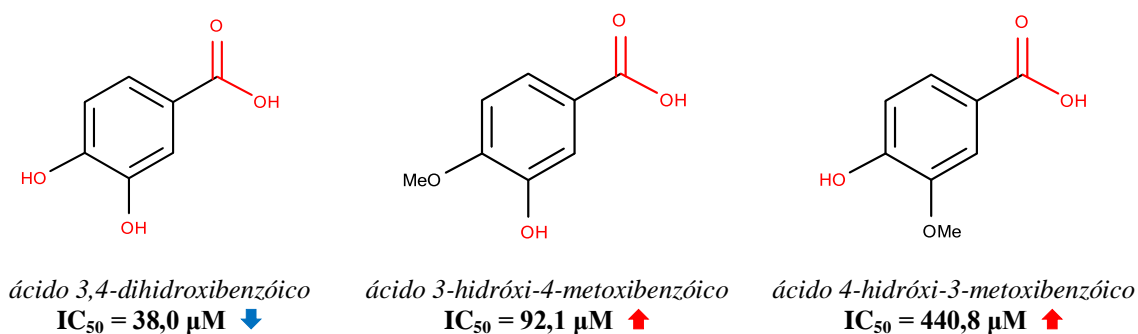
Figura 18 – Efeito do padrão de substituição do anel aromático na potência inibitória na comparação entre os ácidos *m*-hidroxibenzóico (inibidor 1), *o*-hidroxibenzóico (inibidor 27) e *p*-hidroxibenzóico (inibidor 34).



Essa hipótese é corroborada quando se considera o sistema *di*-hidroxilado, no qual o efeito sinérgico dos grupos OH se mostra presente. Avaliando-se a influência da proteção consecutiva das hidroxilas nas posições *meta* e *para* (Figura 19) pode-se observar que a metilação da posição *para* leva a um decréscimo do potencial inibitório pela metade ao passo em que a proteção da hidroxila em *meta* produz uma diminuição em mais de dez vezes no IC₅₀.

Esse resultado enfatiza o papel primordial dessa posição na interação entre inibidor e o sítio ativo por meio de ligação de hidrogênio. Além disso, permite estimar a magnitude do efeito sinérgico dos grupos OH nas posições *meta* e *para*, tendo em vista que dois grupos aptos à ligação de hidrogênio incrementam a atividade inibitória por um fator de 2.

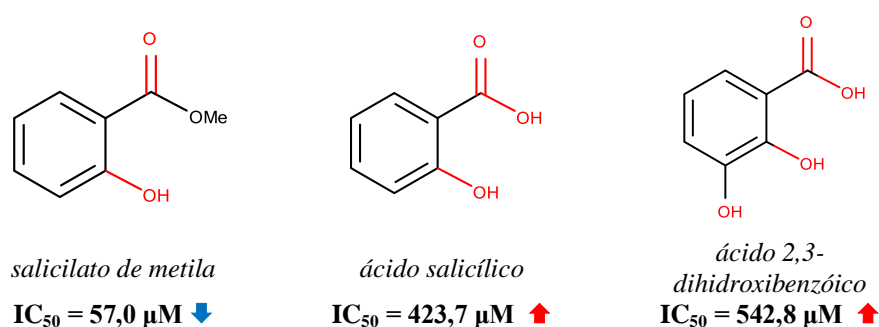
Figura 19 – Efeito da proteção dos grupos OH nas posições *para* e *meta* do anel benzóico demonstrando que a hidroxila em *meta* está envolvida em uma ligação de hidrogênio de grande importância com o sítio ativo.



Outra série de comparações permite compreender o papel por vezes controverso de um grupo doador de ligação de hidrogênio na posição *orto* (Figura 20). Salicilato de metila demonstra um potencial inibitório muito mais significativo do que o ácido salicílico, ainda que este tenha a função ácida livre para interagir com o sítio ativo. Além do mais, o ácido 2,3-dihidroxi-benzóico (2,3-DHB), que não apenas tem a função ácido livre, mas também outro grupo hidroxila na posição *meta*, apresentou um dos piores potenciais inibitórios dentre os 25 compostos ativos.

A explicação dessa aparente contradição reside no fato de que no pH de estudo a função ácido encontra-se desprotonada, portanto, negativamente carregada e muito apta a formar ligação de hidrogênio – inclusive intramolecularmente – o que ocorre tanto para o ácido salicílico quanto para o 2,3-DHB, mas não para o metil salicilato devido ao grupo protetor.

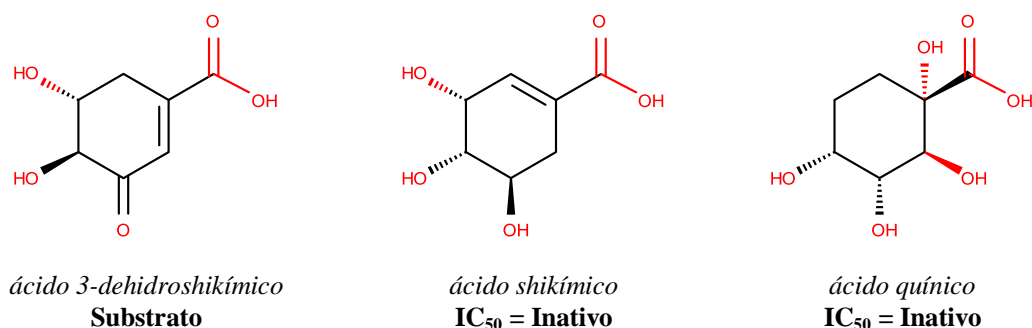
Figura 20 – Efeito aparentemente controverso de um grupo doador de ligação de hidrogênio em posição *orto*, demonstrado na comparação do salicilato de metila (inibidor 22), ácido salicílico (inibidor 27) e 2,3-DHB (inibidor 37)



A formação de ligação de hidrogênio intramolecular tem um efeito antagônico na medida em que impede a interação do grupo OH *orto* com o sítio ativo e perturba a atuação do grupo carboxilato ao estabilizar a carga negativa deste, dificultando a ancoragem do ligante. Por essa razão, 2,3-DHB acaba tendo um saldo de única ligação de hidrogênio efetiva para se coordenar ao sítio ativo, tornando-se de fato um dos piores inibidores dentre os de atividade mensurável.

Outra observação importante é que compostos similares ao substrato como os ácidos shikímico e quínico (Figura 21) são incapazes de atuar como inibidores. Apesar do escopo de compostos com essa característica que foram estudados ser pequeno, esse resultado indica que a rigidez/aromaticidade tem um papel na importante na direcionalidade das interações com o sítio ativo e também sugere que um estado de transição tardio, mais similar com o produto, está envolvido.

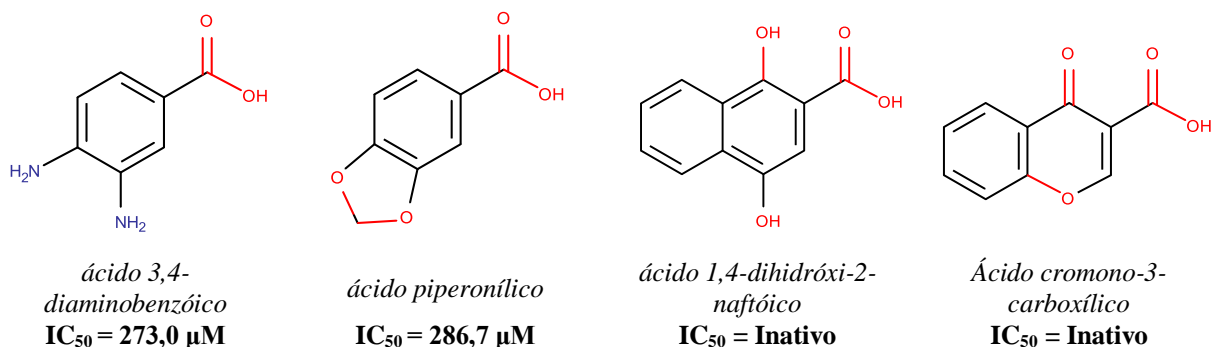
Figura 21 – Ineficácia de compostos estruturalmente similares ao substrato como os ácidos shikímico (inibidor 26) e quínico (inibidor 17) demonstra a importância da rigidez/aromaticidade.



Outros grupos nas posições 3 e 4 do anel aromático (Figura 22), tanto com caráter mais doador de ligação de hidrogênio – como é o caso dos grupos amina – quanto receptor

(éteres) permitem uma interação significativa com o sítio ativo, ainda que mais fraca do que com grupos OH.

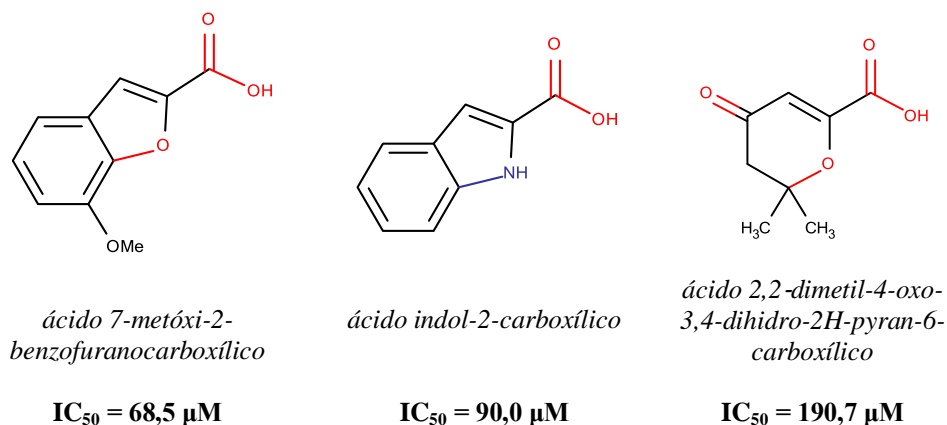
Figura 22 – Compostos com substituintes aceptores ou doadores de ligação de hidrogênio nas posições 3 e 4 diferentes de OH apresentam potencial inibitório, entretanto há uma aparente rejeição moléculas muito volumosas.



Por outro lá, há uma aparente rejeição a moléculas muito volumosas na porção 4-5 (considerando-se o anel central), tais como os ácidos 1,4-dihidróxi-2-naftóico e 1,4-dihidróxi-2-naftóico, ainda que estas apresentem os principais grupos de interação nas posições 1 e 3. Esse é um forte indicativo de uma restrição espacial nessa região do sítio ativo, a qual também necessita ser levada em consideração do desenho de novos compostos.

Outro grupo de composto se destaca pelo alto potencial inibitório, porém com características estruturais bem distintas das abordadas anteriormente (Figura 23). Considerando-se novamente a porção anelar central, tais compostos compartilham, além da função ácido carboxílico, um heteroátomo β-carboxílico capaz de atuar como acceptor de ligação de hidrogênio.

Figura 23 – Alguns compostos estruturalmente diferentes de dihidroxibenzoatos demonstram um potencial inibitório significativo, como os inibidores 13 e 46, indicando a possibilidade de outro modo de ligação.



Tais compostos não podem ser interpretados como homólogos estruturais do ácido salicílico tampouco compartilham similaridade com o ácido m-hidroxibenzóico, tendo em vista o ângulo e o comprimento das possíveis ligações de hidrogênio é completamente distinto destes. Isso indica que tais moléculas podem atuar como inibidores ao se coordenar em outra região do sítio ativo – ou mesmo outra região da enzima – diferente daquela a que o substrato de coordena.

5.2 RESULTADOS COMPUTACIONAIS

5.2.1 Docking molecular

A fim de se compreender melhor as interações dessas moléculas com a enzima DHS desidratase, de tal forma que fosse possível o desenho racional de novos compostos com maior potência, eficácia e seletividade, todos os compostos – protonados e em seus estados desprotonados mais relevantes – foram *docados* no receptor por meio do programa AutoDock Vina.

As energias livres de ligação, também chamadas de *escores de docking*, correspondentes à média do menor valor de três cálculos de docking independentes para cada molécula estão mostrados na tabela 3. Os valores destacados correspondem a escores superiores aos obtidos para o substrato em cada série, sendo, portanto, potenciais inibidores na medida em que possuem uma afinidade maior pelo sítio ativo que o próprio substrato, segundo o resultado *in silico*.

Pode-se observar que diversos inibidores experimentalmente efetivos, tais como o ácido gálico (4), o ácido 3,4-DHB (5), galato de metila (7) e o salicilato de metila (22) também se destacaram como inibidores potentes por docking, sobretudo quando se consideram as moléculas em seu estado desprotonado.

Entretanto, diversos compostos experimentalmente ineficazes atingiram valores muito negativos de energia livre de ligação, como é o caso do ácido 1,4-dihidróxi-2-naftóico (2), ácido indol-3-butírico (40) e, sobretudo do ligante 37, o ácido 2,3-dihidroxibenzóico – o segundo pior inibidor dentre as moléculas ativas – o que pode ser explicado pelo fato do docking não considerar a possibilidade de ligação de hidrogênio intramolecular dessa molécula e tampouco ser capaz de mensurar seu efeito na interação desta com o sítio ativo.

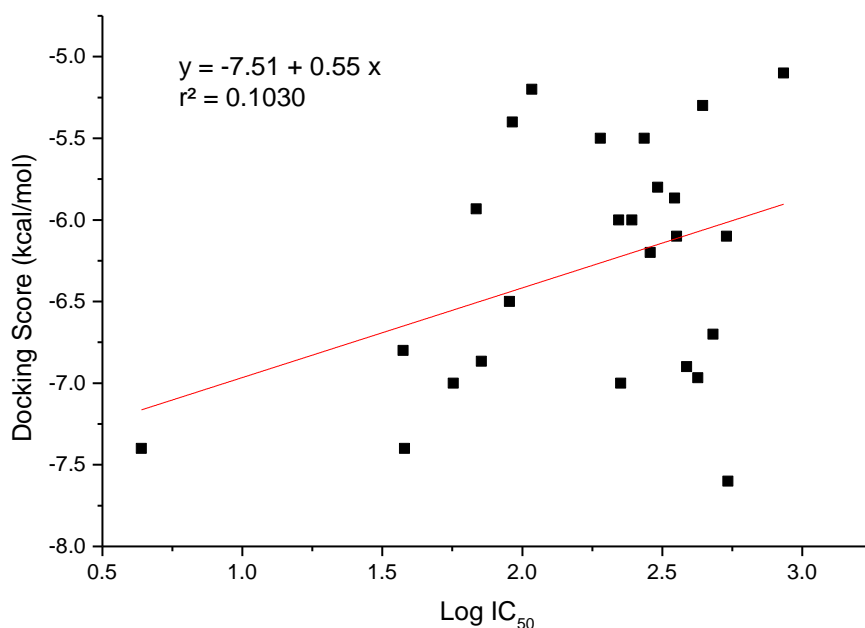
Tabela 3 – Média das três melhores (mais negativas) energias de ligação obtidas por docking para os compostos protonados e na forma desprotonada mais abundante. Em destaque os escores superiores aos do substrato em cada série.

Escore de Docking (kcal/mol)					
Código	Protonado	Desprotonado	Código	Protonado	Desprotonado
* 1	-6.7	-6.9	26	-6.3	-5.5
2	-6.8	-6.7	* 27	-5.5	-7.0
3	-5.6	-5.5	* 28	-7.0	-5.2
* 4	-7.2	-7.4	* 29	-5.5	-6.0
* 5	-7.2	-7.4	30	-6.1	-5.4
* 6	-5.9	-5.4	31	-5.4	-5.5
* 7	-6.8	--	* 32	-5.6	-7.0
* 8	-6.0	-5.3	33	-7.1	-5.8
* 9	-5.8	-5.5	* 34	-6.0	-6.1
10	-6.2	-5.8	* 35	-6.0	-5.8
11	-5.8	--	* 36	-5.7	-5.5
12	-5.1	--	* 37	-5.6	-7.6
* 13	-6.2	-5.9	38	-7.6	-6.3
* 14	-6.4	-6.2	39	-6.1	-6.4
* 15	-5.1	--	40	-6.3	-6.9
16	-6.0	-5.7	* 41	-7.1	-6.9
17	-5.0	-5.1	42	-7.0	-4.8
* 18	-5.9	--	43	-4.7	-6.3
* 19	-6.0	--	44	-6.3	--
20	-5.8	--	45	-6.1	-5.9
21	-6.5	-6.6	* 46	-6.2	-6.5
* 22	-7.1	-7.0	* 47	-6.5	--
23	-6.2	-6.1	* 48	-6.7	-6.1
24	-5.9	-6.1	49	-6.2	-6.1
25	-6.3	-5.9	Substrato	-6.4	-6.7

(*) Compostos com potencial inibitório experimentalmente mensurável

Essas divergências observadas entre os valores experimentais e a modelagem computacional se tornam ainda mais evidentes ao se correlacionar os valores de IC₅₀ com as energias livres de ligação para os compostos em sua forma desprotonada (Figura 24). O coeficiente de correlação linear é extremamente baixo ($r^2 = 0,1030$) e se torna ainda menor se o estado de protonação não for considerado ($r^2 = 0,0951$).

Figura 24 – Correlação linear entre o logarítmico da concentração inibitória média e a energia livre de ligação (em kcal/mol) calculada por docking, considerando-se inibidores no estado desprotonado mais abundante.



Apesar dessa baixíssima correlação, observa-se que a curva é crescente, isto é, há um aumento da energia livre de ligação calculada proporcional ao aumento do IC₅₀, o que significa que ligantes pouco eficientes em se ancorar ao sítio ativo, segundo o modelo computacional, também serão inibidores ineficientes na prática.

Esse resultado demonstra que embora o docking por si mesmo não possa ser utilizado como uma ferramenta quantitativa para investigar ou prever a intensidade da inibição, ainda é uma ferramenta capaz de expressar a tendência experimental, permitindo uma análise qualitativa. Tal análise pode levar a um entendimento detalhado das geometrias moleculares no sítio ativo, permitindo uma compreensão do padrão de interação e eventualmente a proposição de novos compostos que maximizem a intensidade e quantidade dessas interações, o que resultaria na melhora de suas propriedades inibitórias.

Dentre as razões que justificam essa dificuldade de se obter resultados quantitativos pode-se citar o fato de que o nesse tipo de abordagem computacional os graus de liberdade do receptor não são amostrados, isto é, a enzima é considerada como sendo um corpo rígido, seguindo o modelo “chave-fechadura” proposto por Emil Fisher em 1894. Nesse modelo, a alta especificidade da enzima por seu substrato pode ser explicada por fatores geométricos complementares, tais como uma fechadura é específica para o encaixe de uma única chave.²⁵

Atualmente, entretanto, sabe-se que esse modelo não expressa apropriadamente os sistemas biológicos, altamente flexíveis. Hoje o modelo mais aceito é o de “encaixe induzido”

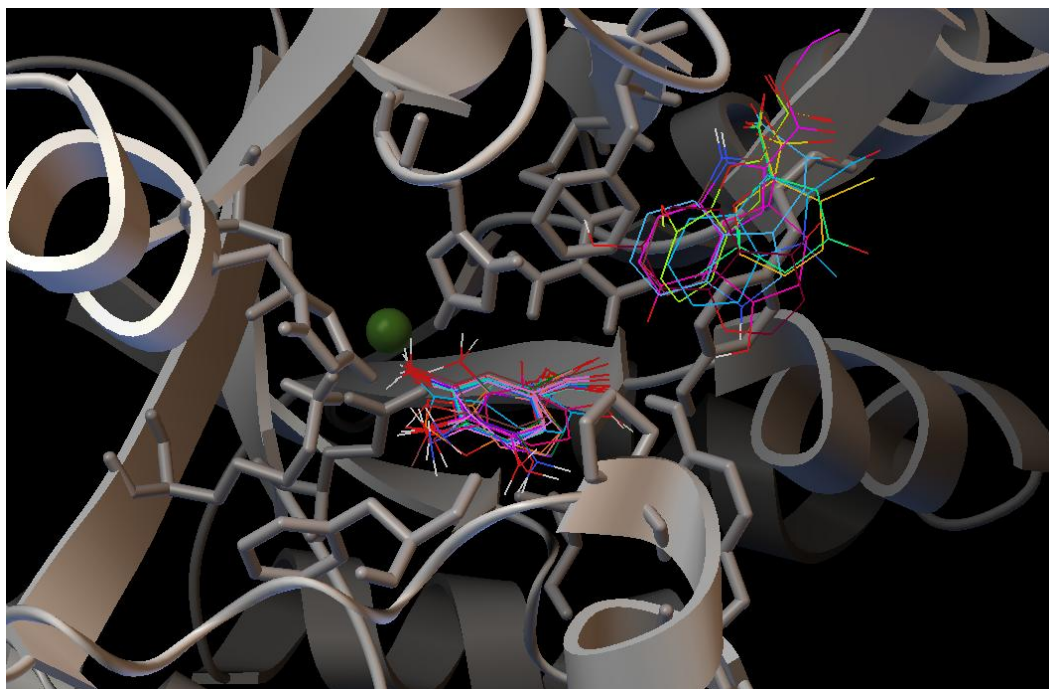
que pressupõe que a interação com o substrato provoca alterações conformacionais, tanto no sítio ativo quanto em outras porções enzima, as quais são capazes de aumentar a intensidade da interação receptor-ligante.²³ Essas alterações estruturais também levam o substrato a se ligar em uma forma tensionada, mais próxima conformacionalmente ao estado de transição, o que reduz a barreira energética entre a conformação ligada e o estado de transição, acelerando a reação.²⁴

Além disso, a estrutura do receptor utilizada nesses cálculos foi gerada a partir da estrutura cristalográfica da enzima e certamente as interações e a conformação que esta adota em um sólido cristalino são diferentes daquelas apresentadas em condições fisiológicas ou nos ensaios *in vitro*. Assim, não é surpreendente que houvesse uma baixa correlação numérica entre resultados computacionais e experimentais.

Simulações por dinâmica molecular, que levam em consideração todos os graus de liberdade – tanto da enzima quanto dos ligantes – e que, portanto, consideram a flexibilidade do sistema às custas de maior demanda computacional podem ser utilizadas para se gerar um conjunto de estruturas diferentes da enzima permitindo a obtenção de resultados mais confiáveis por docking, em uma metodologia conhecida como *ensemble docking*.

Em termos qualitativos, a primeira abordagem realizada foi sobreposição das estruturas com melhor escores para os 25 compostos experimentalmente ativos, o que pode ser observado na figura 25.

Figura 25 - Sobreposição das estruturas ancoradas com melhores energias livres para os 25 compostos experimentalmente ativos na inibição enzimática. O cofator magnésio e os resíduos principais estão destacados da estrutura secundária.

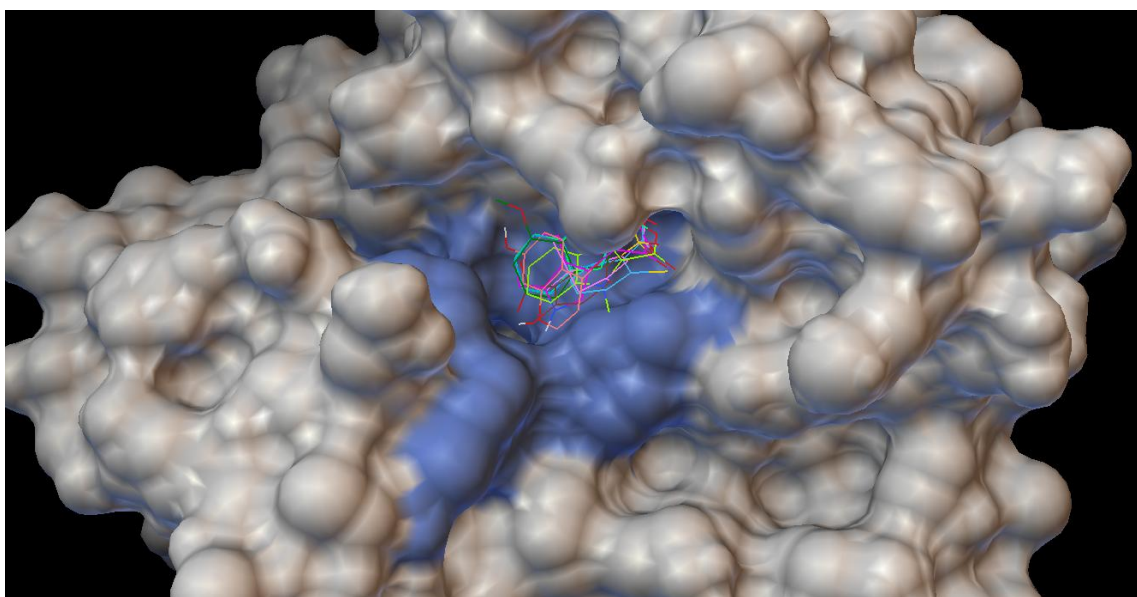


Pode-se perceber pela figura que os compostos se distribuem em dois grupos. O grupo principal, que interage no sítio ativo da enzima, é composto por 16 moléculas – todas elas derivadas do ácido benzóico – e tem como representante maior o ácido gálico, sendo exemplos típicos de inibidores competitivos. O grupo secundário, por sua vez, é composto por 9 moléculas levemente maiores, que inclui todos os derivados indol e benzofurano, além do derivado de oxopirano (9), dos ácidos tio- e sulfossalicílico (28 e 29) e da 7-hidroxicromona (19). Seus representantes mais proeminentes são os ácidos indol-2-carboxílico (inibidor 49) e 7-metóxi-2-benzofuranocarboxílico (inibidor 13).

Esse segundo grupo se coordena à entrada do sítio ativo, como pode ser observado na figura 26, na qual a enzima está representada por uma superfície de densidade, com porção do sítio ativo destacada em azul.

O posicionamento dessas moléculas pode ser interpretado de duas maneiras. A primeira deles é o simples fato de que, por serem volumosos, tais compostos não conseguem se encaixar no sítio ativo da enzima – que é mantido rígido durante o docking – ainda que o façam experimentalmente, sendo por isso bons inibidores na prática, na medida em que a enzima em solução seria flexível a ponto de ampliar sua cavidade interna para receber e interagir com tais moléculas.

Figura 26 – A sobreposição dos compostos do grupo secundário mostra que as interações mais favoráveis no docking ocorrem junto à abertura de entrada do sítio ativo, destacado em azul na superfície de densidade da enzima.

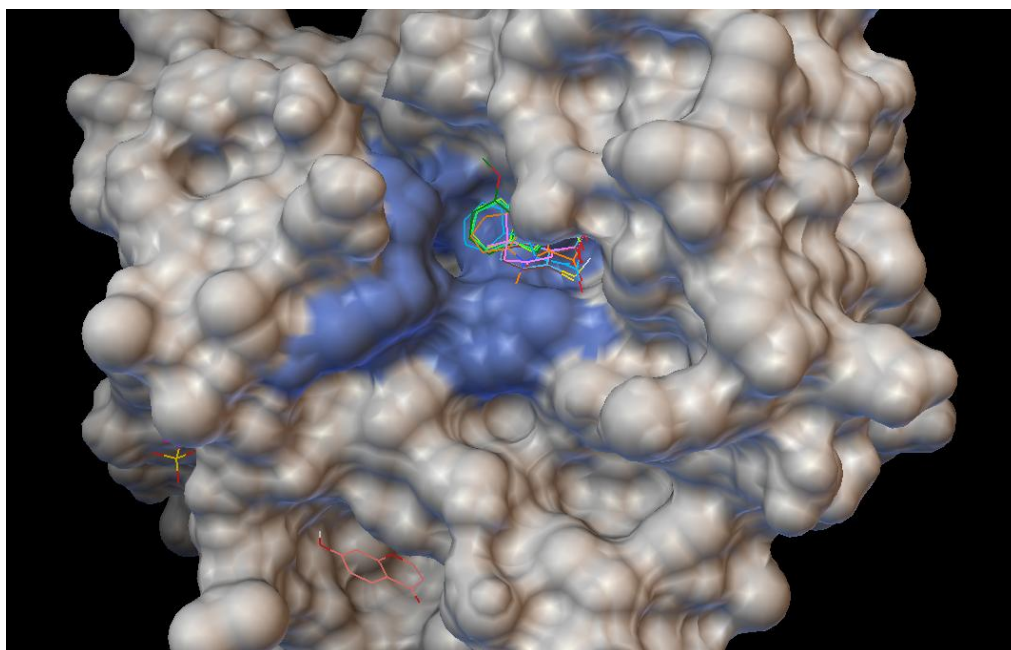


Por outro lado, é possível que esses compostos de fato se coordenem fortemente à abertura do sítio ativo, impedindo tanto a entrada do substrato quanto a saída do produto e

consequentemente inativando a enzima, agindo assim como inibidores não competitivos ou anti-competitivos.

Como o *grid* utilizado para o docking foi centrado no sítio ativo, um novo docking foi feito para os compostos desse grupo utilizando-se um *grid* de dimensões maiores (50x50x50 Å) capaz de envolver toda a enzima, a fim de verificar se a interação poderia ocorrer em outras partes do receptor. Os resultados desse docking (Figura 27) mostraram que apenas dois compostos, ácido 5-sulfossalicílico e 7-hidroxicromona – cujas estruturas destoam significativamente dos demais – não se coordenam a essa região de entrada.

Figura 27 - Sobreposição das estruturas resultantes do *docking* dos compostos do grupo secundário utilizando-se um *grid* envolvendo toda a enzima. Apenas o ácido 5-sulfossalicílico e 7-hidroxicromona não se coordenam mais à entrada do sítio ativo (em destaque).



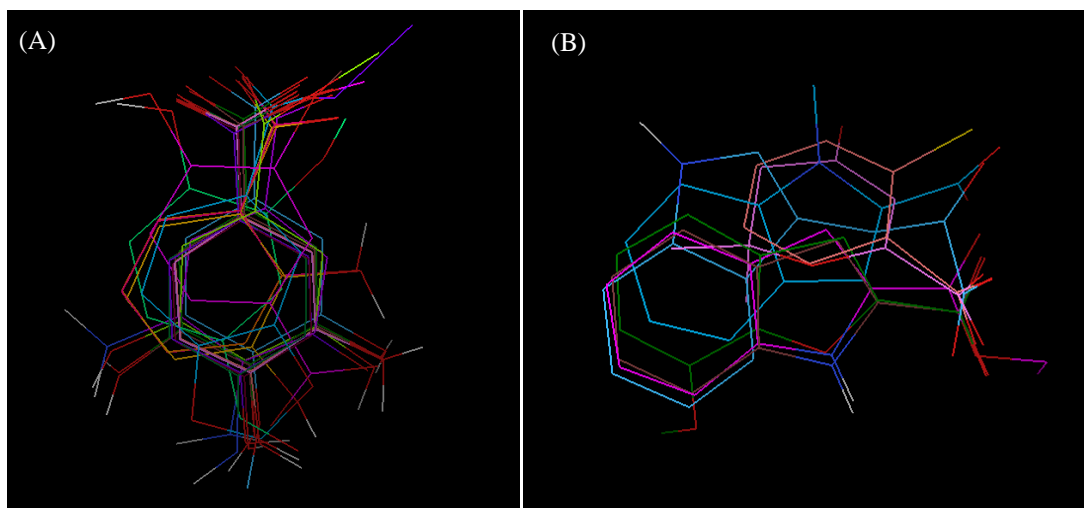
Essa constatação é um forte indicativo de que a coordenação nessa porção da enzima não é uma mera casualidade causada por um mau encaixe no sítio ativo, uma vez que um *grid* envolvendo todo o receptor aumenta significativamente o número de possibilidades de interação, sobretudo com os resíduos hidrofílicos da superfície enzimática. Ainda assim, a preferência estatística é por essa região estreita na abertura do sítio ativo.

Esse fato é apoiado pela divergência que esses compostos apresentam em relação ao padrão estrutural da maioria dos inibidores (análogos de 3,4-dihidroxibenzoato) segundo apontaram as relações estrutura-atividade. Apenas o ácido 5-sulfossalicílico e a 7-hidroxicromona seguem esse padrão e provavelmente não se coordenam ao sítio ativo por serem muito volumosos em semelhança ao observado para os ácidos 1,4-dihidróxi-2-naftóico

e cromono-3-carboxílico (Figura 22). São justamente esses dois compostos que não permanecem no grupo secundário após o docking cego.

Analisando-se a geometria com que os compostos se organizam em cada grupo (Figura 28), pode-se observar que as moléculas que interagem no sítio ativo apresentam uma sobreposição estrutural quase perfeita, indicando que de fato interagem com os mesmos resíduos, apenas variando no número de interações – o que conseqüentemente resulta em uma variação no potencial inibitório – como demonstrado experimentalmente. Destoam levemente os compostos com grupos OH na posição 2 (salicilatos), vanalina e os ácidos piperonílico e vanilínico.

Figura 28 – Sobreposição das estruturas com melhores resultados no docking para os compostos do grupo principal (a) e do grupo secundário após o docking cego (b), demonstrando a boa sobreposição entre moléculas nos dois grupos.



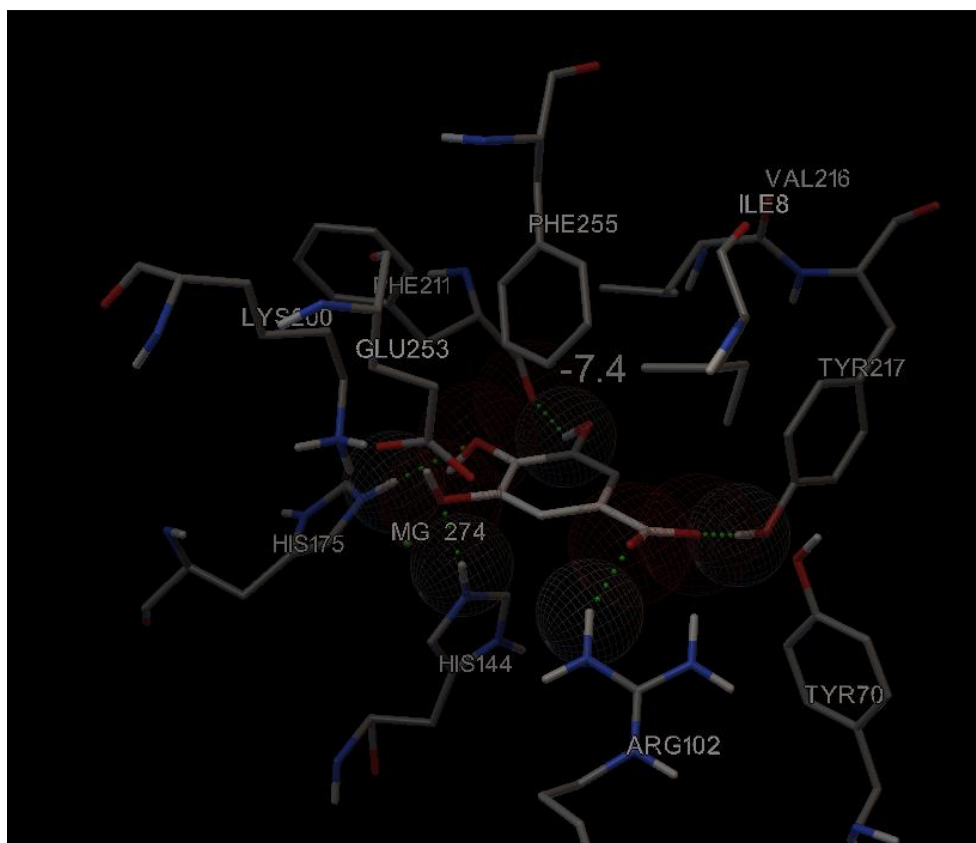
Os compostos do grupo secundário, por sua vez, apresentam uma maior variação na sobreposição (Figura 28b), ainda que grande parte dos indoles e o ácido 7-metóxi-2-benzofuranocarboxílico se sobreponham muito bem, em acordo com a interpretação experimental de que tais compostos partilham interações de mesma natureza e geometria com a enzima.

Na figura 29, observa-se o padrão de interações do ácido gálico (inibidor 4) com o sítio ativo, com o qual interage através de 5 ligações de hidrogênio. Pode-se observar o papel importante desempenhado pelo grupo carboxilato, que atua como acceptor de duas ligações de hidrogênio, uma à hidroxila da tirosina-217 e outra com um hidrogênio guanidínico da arginina-102. Os três grupos OH do anel aromático também estão envolvidos em uma ligação de hidrogênio cada, em concordância com a observação experimental relacionada ao efeito sinérgico da presença desses grupos (Figura 17).

Duas dessas interações, das hidroxilas em posição *meta* e *para* ocorrem entre seus oxigênios e os hidrogênios ácidos das histidinas 144 e 175, respectivamente, ao passo em que a terceira, do OH na posição 5, se dá entre o hidrogênio da hidroxila e a carboxila da fenilalanina-211 que faz parte da estrutura polipeptídica da enzima.

Pode-se destacar também a possibilidade de interação eletrostática entre o íon Mg^{2+} e a oxigênio do grupo OH na posição 3, o que contribuiria para acentuar sua interação e destacar sua importância na atuação das moléculas como inibidores. O papel determinante desse grupo OH na potência inibitória dos compostos também foi uma característica constatada experimentalmente.

Figura 29 – Padrão de interações do ácido gálico (inibidor 4) com o sítio ativo obtido por meio do *docking* molecular indicando a formação de cinco ligações de hidrogênio (pontilhado em verde).

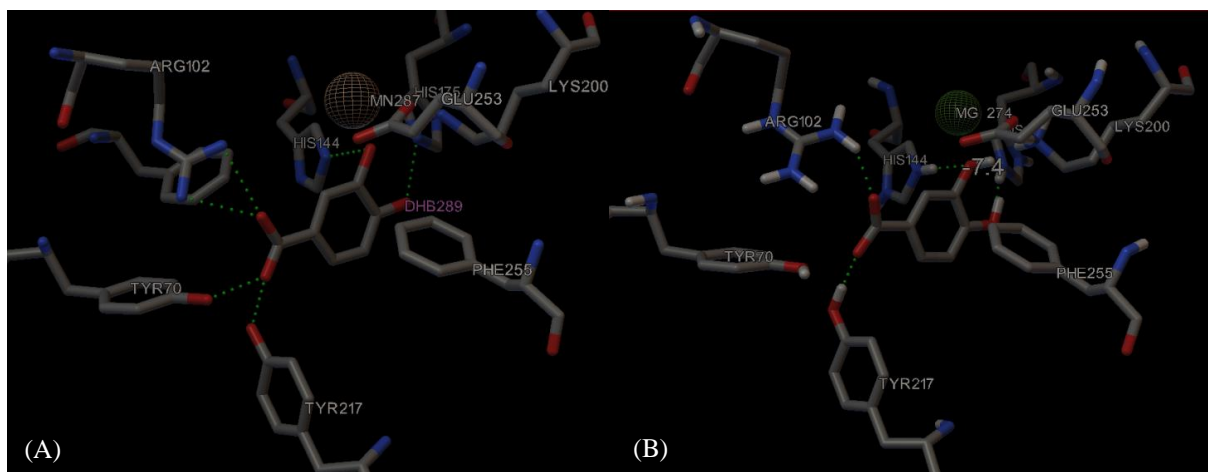


Pelo modelo computacional não se constata a possibilidade de interações do tipo empilhamento π - π entre o anel aromático do ácido gálico e outros resíduos aromáticos do sítio ativo. Entretanto, os cinco pontos simultâneos de interação por ligação de hidrogênio justificam a necessidade de um sistema planar rígido e explicam por que compostos alifáticos como os ácidos quínico (17) e shikímico (26) não atuam como inibidores, ainda que compartilhem alto grau de similaridade estrutural com o substrato.

Na figura 30 está mostrado o padrão de interações do produto (3,4-DHB) com o sítio ativo, comparando-se a estrutura cristalográfica determinada por Pflieger e colaboradores (Figura 30a) com o resultado de docking molecular (Figura 30b).

Pode-se observar que o resultado computacional é plenamente coincidente com o obtido experimentalmente, com a diferença de que a cristalografia de raios-X não tem resolução para discernir os hidrogênios, enquanto que no modelo computacional os hidrogênios polares são considerados. Por essa razão, a análise cristalográfica considera a existência de 6 ligações de hidrogênio enquanto que o docking mostra apenas 4 como sendo principais.

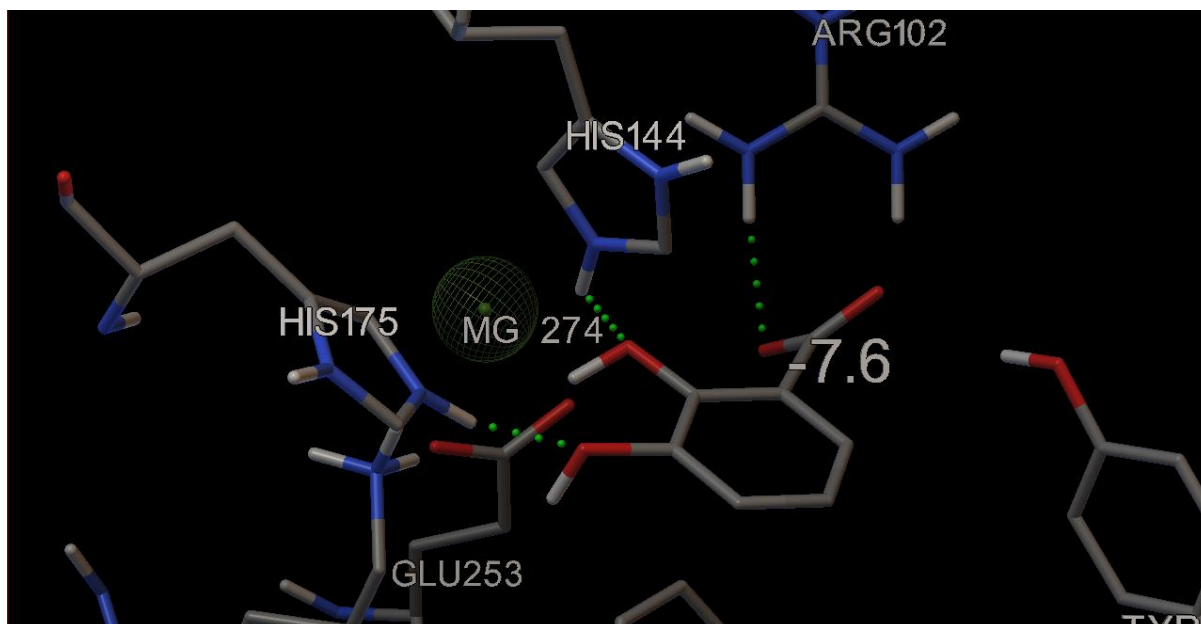
Figura 30 – Padrão de interações do produto da reação (3,4-DHB) com o sítio ativo segundo determinado por cristalografia (a) e pelo docking computacional (b)



Esse padrão de ligações de hidrogênio também é o mesmo do observado para o ácido gálico. A porção carboxilato interage por duas ligações de hidrogênio com os resíduos arginina-102 e tirosina-217 enquanto que as hidroxilas se ligam às histidinas 175 e 144 bem como há possibilidade de interação entre o oxigênio do OH *meta*-carboxílico com os íons magnésio ou manganês.

A maioria dos compostos do grupo principal, como mostrado anteriormente, segue esse mesmo padrão de interações. Dentre os que divergem merece destaque o ácido 2,3-dihidroxibenzóico (inibidor 37), que apresentou a mais intensa energia livre de ligação segundo o docking (Figura 31).

Figura 31 – Padrão de interações de inibidor 37 (ácido 2,3-dihidroxibenzoico) com o sítio ativo segundo o resultado de *docking*



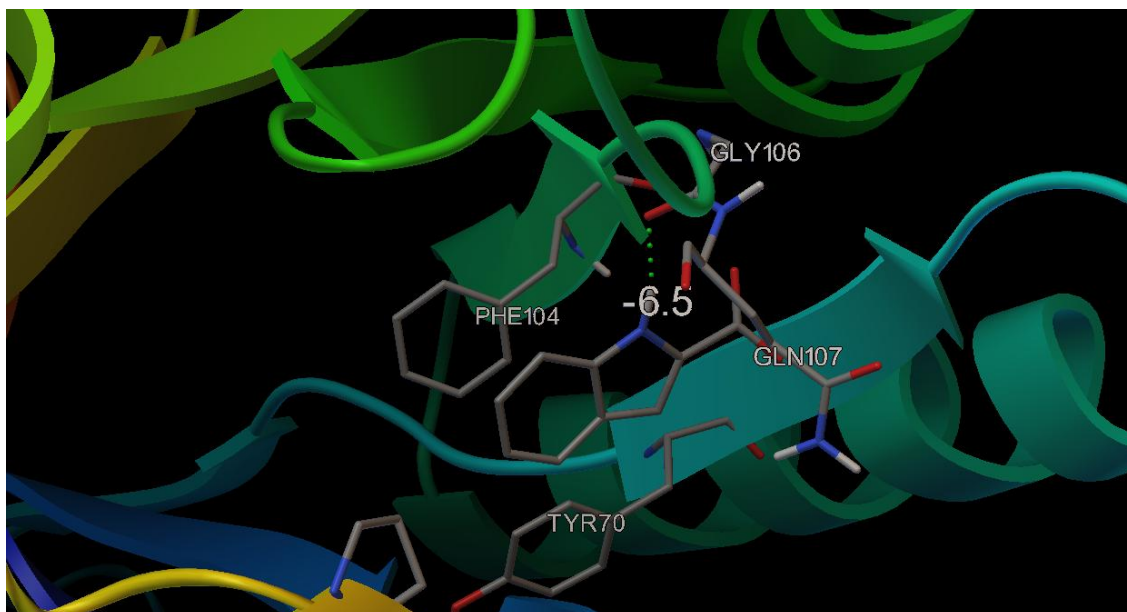
O padrão de interações mostra que são realizadas três ligações de hidrogênio, novamente envolvendo os resíduos arginina-102, histidina-144 e histidina-175.

Considerando-se que há duas interações a menos para este composto do que há para o ácido gálico, a justificativa para esse escore mais proeminente está na maior proximidade entre o grupo hidroxila em *orto* da histidina-144, que leva a uma interação de hidrogênio mais forte do aquela que ocorre com o ácido gálico.

Entretanto, o *docking* não considera a possibilidade de formação de uma forte ligação de hidrogênio intermolecular, estabilizada pela formação de um anel de seis membros, que diminuiria a disponibilidade desse oxigênio interagir com a histidina-144 e da carboxila interagir com a arginina. Assim, na prática haveria apenas uma ligação de hidrogênio efetiva, com a histidina-175, o que justificaria o baixo desempenho deste composto como inibidor.

Em relação aos compostos que aparentemente interagem na entrada do sítio ativo, merece destaque a ácido indol-2-carboxílico (46), tanto por seu significativo escore no docking quanto por sua eficiência experimental. Podem-se observar na figura 32 as interações calculadas para esse composto.

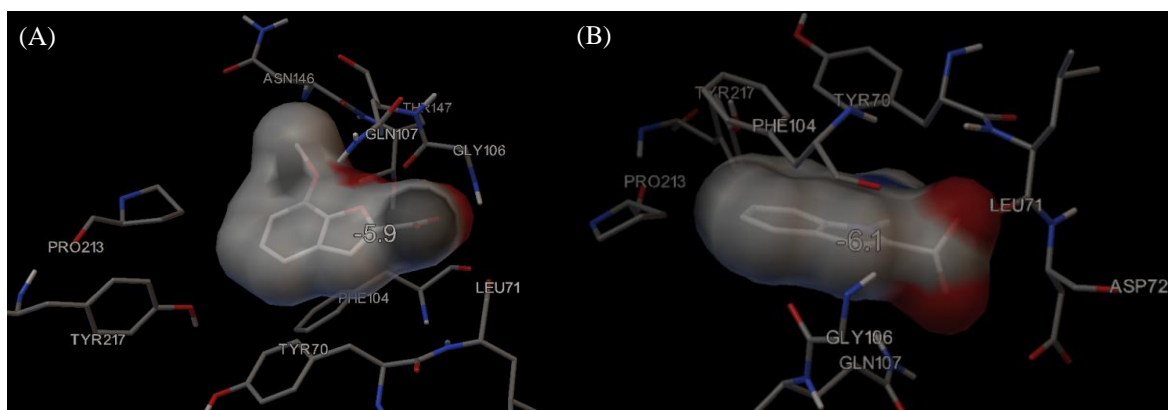
Figura 32 – Interações do inibidor 46 (ácido indol-2-carboxílico) com alguns resíduos da entrada do sítio ativo segundo apontado pelo docking molecular.



Pode-se observar que há a formação de apenas uma ligação de hidrogênio entre o N-H indólico e a carboxila da ligação amida do resíduo glicina-106. Destaca-se ainda a possibilidade de interações π - π entre o indol e o anel aromático da fenilalanina-104, que estão paralelamente alinhados – o que não pode ser visto plenamente pela perspectiva da figura – além de outras interações hidrofóbicas ou de Van der Waals que são possíveis entre este composto e outros resíduos dessa região, com a tirosina-70.

Outros compostos como o ácido 7-metóxi-2-benzofurancarboxílico (inibidor 13) e 1-metil-indol-2-carboxílico (inibidor 47) apresentam um potencial inibitório experimental considerável, no entanto não tem capacidade de atuar como aceptores de ligação de hidrogênio (Figura 33). Assim, as únicas interações possíveis seriam de natureza hidrofóbica ou forças de Van der Waals, de caráter nitidamente mais fraco.

Figura 33 – Docking dos inibidores 13 (a) e 47 (b) representando pela superfície de densidade. Apesar de não haver formação de ligações de hidrogênio, interações de Van der Waals são possíveis com resíduos hidrofóbicos na entrada do sítio ativo

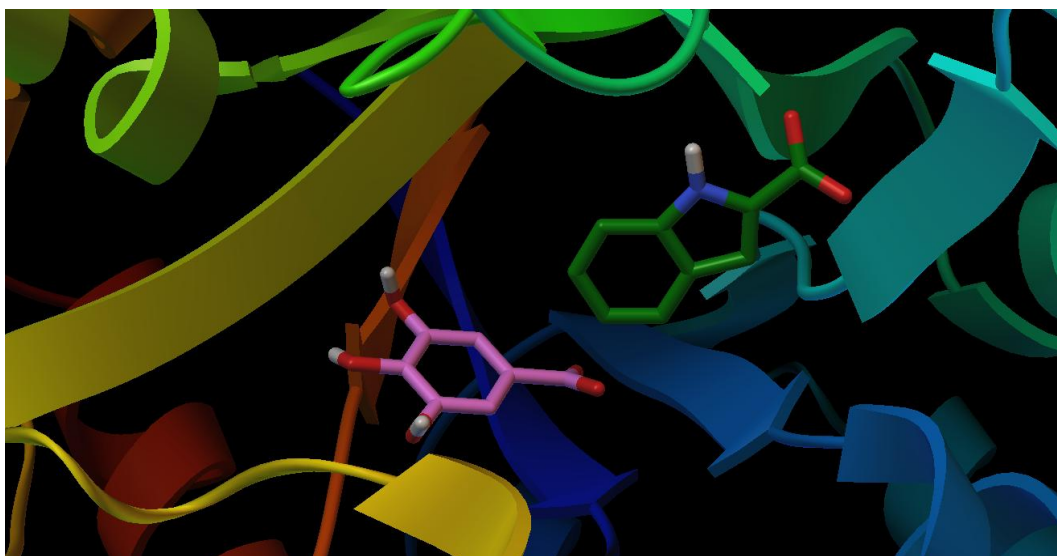


Seriam essas interações suficientes fortes para que esses compostos se coordenem a esta região da enzima e atuem como inibidor ou tais compostos apenas não podem se coordenar satisfatoriamente ao sítio ativo por seu elevado volume e a rigidez do receptor? E se de fato há dois sítios de inibição espacialmente próximos, qual seria o efeito da união em uma única molécula de uma fração apta a inibir o sítio ativo e outra capaz de inibir o sítio alostérico (Figura 34)?

Tais perguntas apenas reforçam a necessidade de se amostrar computacionalmente mais graus de liberdade do receptor por meio da simulação de dinâmica molecular, de tal forma que a flexibilidade possa ser levada em consideração.

Assim, uma compreensão mais clara dos processos e interações que regem a inibição de DHS desidratase seria obtida, eventualmente permitindo a construção de um modelo capaz de estimar quantitativamente e de forma confiável a intensidade dessas interações, auxiliando no desenho racional de novos inibidores.

Figura 34 – A proximidade espacial entre os inibidores do sítio ativo como o ácido gálico (em rosa) e inibidores de um possível sítio alostérico na entrada do sítio principal como o indol-2-carboxilato (verde) levanta a hipótese do possível efeito sinérgico no potencial inibitório de um *link* entre as duas moléculas



5.2.2 Dinâmica molecular

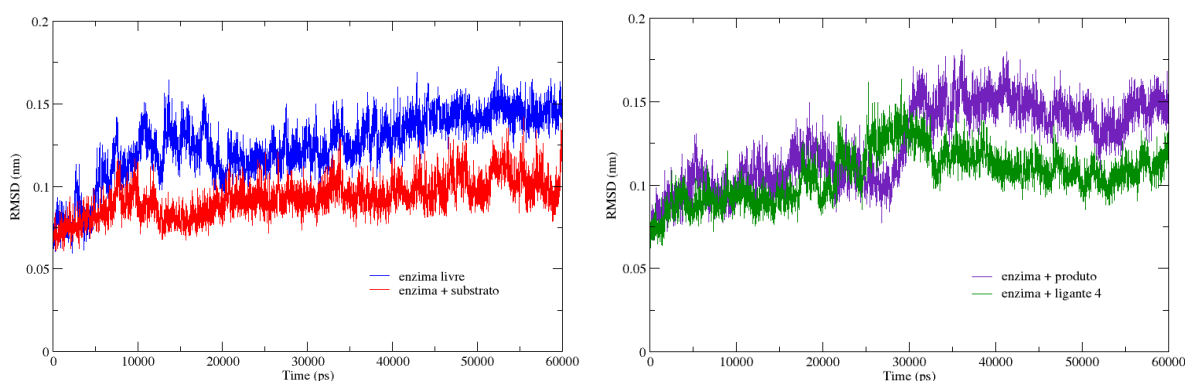
Com o propósito de se obter um número maior de estruturas do receptor, de forma que sua flexibilidade fosse levada em consideração tornando possível a obtenção de resultados mais acurados por docking, simulações de dinâmica molecular foram realizadas utilizando-se o pacote de programas Gromacs.

Utilizando-se o campo de forças Amber03, foram simulados inicialmente quatro sistemas durante 60 ns: *enzima livre*, que corresponde à enzima isolada em água, *enzima+substrato*, o complexo entre a DHS desidratase e ácido 3-dehidroshikímico, *enzima+produto*, o complexo da enzima com o ácido 3,4-dihidroxibenzóico, o produto da reação e o complexo *enzima+inibidor 4*, na qual o ácido gálico encontra-se inicialmente coordenado ao sítio ativo da enzima – uma escolha baseada no fato deste ter sido o inibidor que apresentou o melhor resultado experimental.

A primeira consideração a ser feita é o acompanhamento da evolução temporal do sistema por meio do deslocamento quadrático médio das posições atômicas (RMSD, do inglês *root mean square deviation*) em função do tempo de simulação.

Na figura 35 pode-se observar a evolução temporal do RMSD dos carbonos- α para os quatro sistemas simulados em relação à estrutura cristalográfica de referência. A análise dos deslocamentos desse conjunto de átomos é especialmente interessante na medida em que permite avaliar como o esqueleto proteico evolui durante a simulação, permitindo a observação de alterações conformacionais da enzima.

Figura 35 - Evolução temporal do deslocamento quadrático médio das posições dos carbonos- α para o sistema enzima livre (azul), enzima+substrato (vermelho), enzima+produto (roxo) e enzima+ligante 4 (verde)



Pode-se observar na figura 35 que os valores de RMSD são relativamente baixos, inferiores a 1,7 Å para todos os sistemas. Igualmente, não há alterações bruscas, mas sim pequenas variações em torno de uma posição de equilíbrio, indicando que não houve uma modificação estrutural significativa durante a simulação, possivelmente devido à estrutura terciária em forma de barril, que por ser composta por hélices- α e folhas- β sistematicamente alternadas impõem uma baixa mobilidade estrutural.

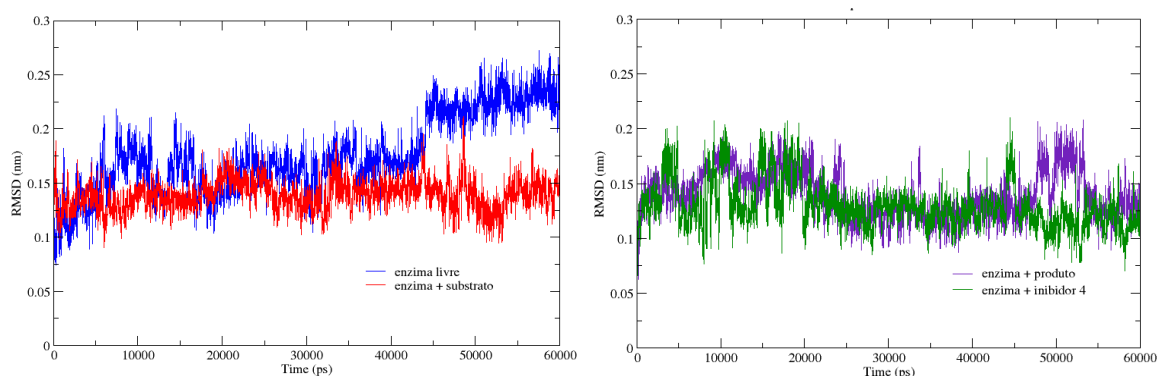
Além disso, pode-se perceber que ao final da simulação, sobretudo nos últimos 15ns, há uma diminuição da intensidade das flutuações do RMSD e um “patamar” é obtido. Esse é

um forte indicativo que o sistema atingiu uma condição de equilíbrio, com o alívio das interações desfavoráveis presentes na estrutura cristalográfica e a obtenção de uma conformação mais próxima da natural e mais similar ao que seria encontrado em condições fisiológicas.

Como essa relaxação estrutural pode ter um reflexo grande no modo e intensidade com que inibidores interagem com o sítio ativo, considerou-se como os resíduos que compõem essa porção da enzima se comportaram durante a simulação. Na figura 36 está mostrada a evolução temporal do RMSD para esses 15 resíduos do sítio ativo e o cofator magnésio dos quatro sistemas avaliados.

Foram considerados como parte do sítio ativo os resíduos Ile8, Tyr70, Arg102, Phe104, Glu142, His144, Asp172, His175, Lys200, Phe211, Pro213, Val216, Tyr217, Glu253, Phe255 e Mg274 por meio da observação das interações dos ligantes com a enzima na estrutura cristalográfica e por docking.

Figura 36 – Desvio quadrático médio das posições atômicas dos 15 resíduos que compõem o sítio ativo e do cofator Mg durante a simulação dos sistemas enzima livre (azul), enzima+substrato (vermelho), enzima+produto (roxo) e enzima+ligante 4 (verde)



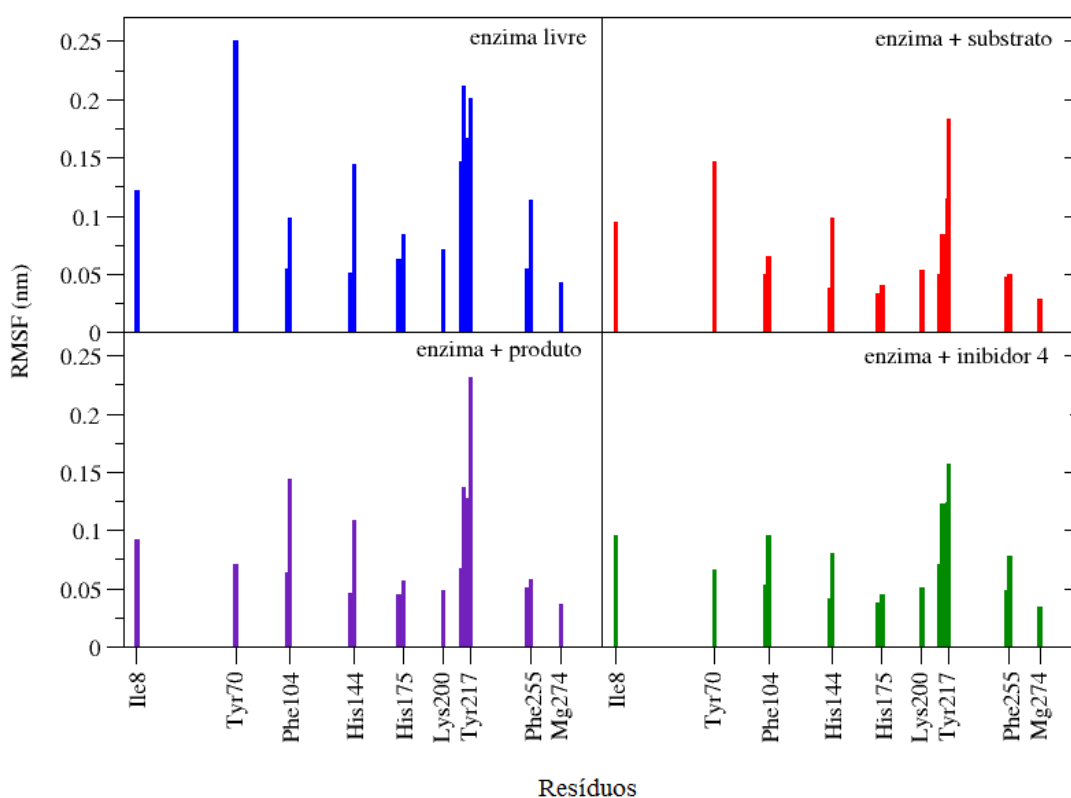
Pode-se observar que a variação temporal do RMSD desses resíduos é significativamente menor para os complexos da enzima com substrato, produto ou ácido gálico do que para a enzima livre. Ao final da simulação os sistemas com ligantes convergem para um valor similar de RMSD ao passo em que a enzima livre diverge e apresenta valores significativamente superiores. Isso indica que em todos os complexos os ligantes permanecem fortemente coordenados ao sítio ativo durante a simulação, mantendo sua estrutura significativamente mais rígida na comparação com a enzima sem ligante.

Avaliando-se a mobilidade quadrática média (RMSF, do inglês *Root Mean Square Fluctuation*) dos resíduos do sítio ativo durante a simulação, o que possibilita uma estimativa da mobilidade média dessa porção da enzima para cada sistema (Figura 37), pode-se observar que o sítio ativo da enzima livre é o que apresenta a maior mobilidade dos resíduos, o que era

esperado na medida em que liberdade conformacional é maior pela ausência de ligante na cavidade do sítio ativo.

Destaca-se, no entanto, a diferença significativa do padrão de resíduos mais móveis entre a enzima livre e os demais sistemas, com destaque para a tirosina-70, com RMSF de 25 Å no sistema sem ligante, valor que é reduzido para 15 Å na presença do substrato e para menos de 7,5 Å com o ácido gálico. Esse resultado demonstra a possibilidade de uma interação importante entre este resíduo e os potenciais inibidores, ao contrário do que foi apontado pelo docking, de que interação mais importante se daria com a tirosina-217. Os dois resíduos estão muito próximos no ativo e tem a capacidade formar uma ligação de hidrogênio com o grupo carboxilato dos ligantes (Figura 30).

Figura 37 – Mobilidade quadrática média (RMSF) dos resíduos do sítio ativo durante os 60 ns simulados para os sistemas enzima livre (azul), enzima+substrato (vermelho), enzima+produto (roxo) e enzima+ligante 4 (verde)

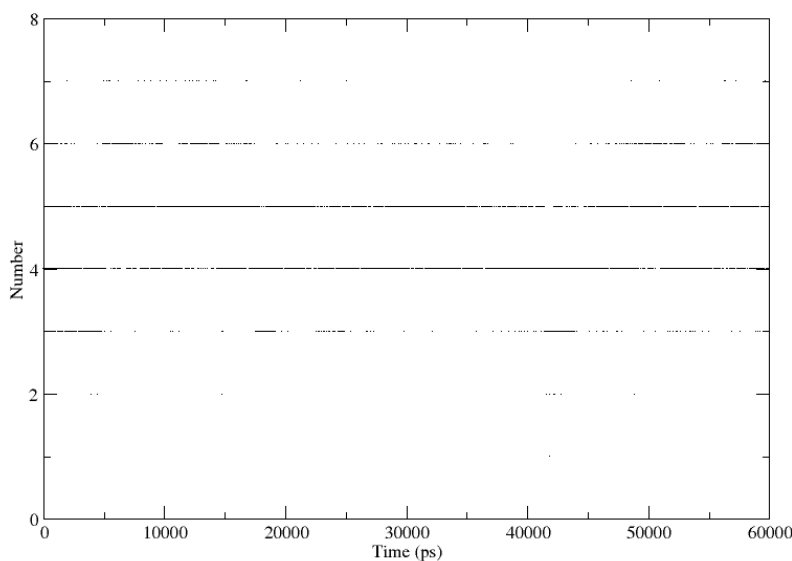


É interessante observar que ao passo em que a mobilidade da tirosina-70 é reduzida na presença dos inibidores, a mobilidade da tirosina-217 permanece elevada e em alguns casos até mesmo aumenta, como no sistema enzima+produto. Isso demonstra que esse resíduo de fato apresenta uma baixa interação com os ligantes, diferentemente do que previu o docking possivelmente em função de uma mudança conformacional do sítio ativo durante simulação capaz de alterar o modo de ligação.

Sendo a formação de ligação de hidrogênio um fator decisivo na atuação de uma determinada molécula como inibidor de DHS desidratase, conforme demonstraram os resultados experimentais, é importante avaliar como essas interações se comportam durante a simulação bem como as possíveis alterações dos modos de ligação frente à situação estática para que seja possível o desenho de moléculas com propriedades inibitórias melhores. Propor um novo composto pela análise das interações com uma estrutura rígida pode ser contraprodutivo se a conformação dessa estrutura não for similar à conformação na média temporal, pois o padrão de interações pode ser significativamente diferente.

Assim, na figura 38 está mostrada a evolução temporal no número de ligação de hidrogênio (LH) entre a enzima e o ácido gálico. Pode-se observar que o ligante forma no mínimo uma ligação de hidrogênio durante toda a simulação e no máximo sete ligações. Entretanto, a frequência com que um número menor do que quatro ligações de hidrogênio simultâneas ocorre é extremamente baixa, ou seja, é um evento raro.

Figura 38 – Evolução do número de ligações de hidrogênio entre a enzima e o ácido gálico durante os 60 ns da simulação.



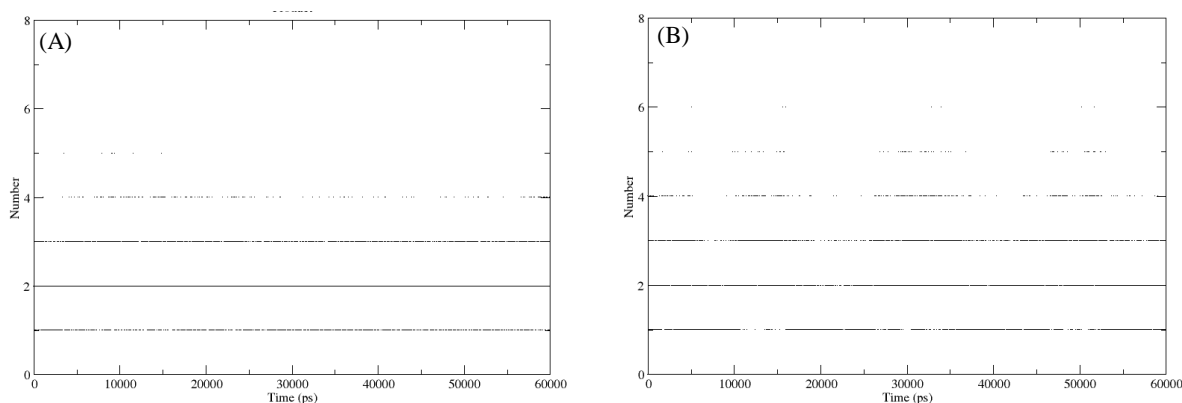
De fato, em média, o ácido gálico interage formando 4,51 ligações de hidrogênio com a enzima, o que está de acordo com o número obtido durante o docking molecular, que produziu o mesmo escore para os complexos com quatro e cinco LHs. O substrato, por outro lado, interage por uma média de apenas 1,92 ligações de hidrogênio ao passo em que o para o produto essa média sobe para 2,10 (Figura 39).

Isso significa que a afinidade da enzima por seu substrato, ao menos em termos de LHs, é menor do que afinidade pelo produto e *muito* menor que a afinidade pelo ácido gálico,

condizente com o observado experimentalmente, visto que o ácido gálico se mostrou 9 vezes mais potente que o produto, ainda que ambos sejam inibidores poderosos.

Esse resultado é mais um indicativo do papel decisivo que as ligações de hidrogênio desempenham na atuação dos inibidores e sugere que um composto capaz de maximizar o número médio e eventualmente a intensidade dessas interações poderia ser um inibidor ainda mais potente do que o ácido gálico.

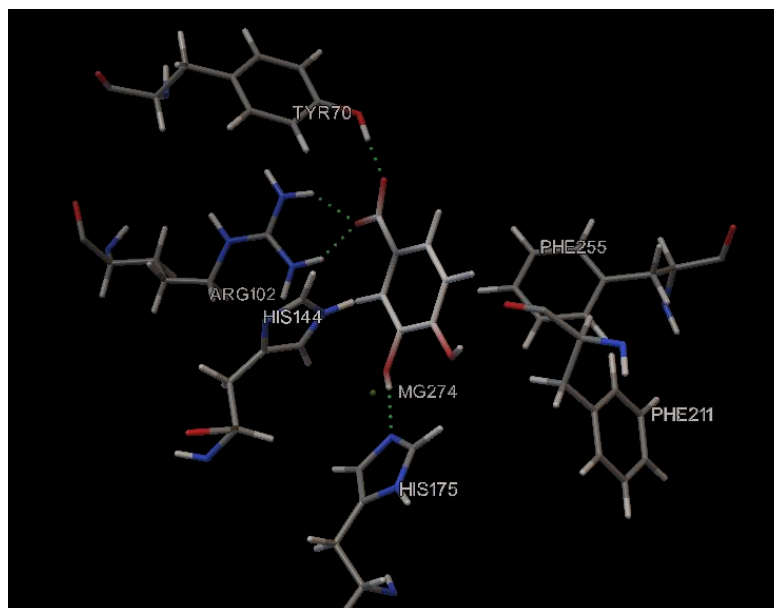
Figura 39 – Evolução do número de ligações de hidrogênio entre a enzima e o substrato (a) e entre enzima e produto (b) durante a simulação.



Além disso, observa-se que o produto raramente forma mais do que quatro ligações de hidrogênio com o sítio ativo, o que diverge do apontado pela estrutura cristalográfica, que estimou a ocorrência de seis LBs, e do que foi mostrado pelo docking, quatro ligações. Isso demonstra que, de fato, a estrutura obtida por cristalografia não é a mais provável, o que pode justificar a divergência entre a potência experimental dos inibidores e os resultados do docking dos compostos nessa estrutura rígida.

Na figura 40 está mostrado o padrão de interações entre o ácido 3,4-dihidroxibenzóico e o sítio ativo na estrutura média do complexo durante a simulação. Nesse caso, o programa ADT estimou a formação de 4 ligações de hidrogênio entre o produto e o sítio ativo: um entre os resíduos His175 e o grupo hidroxila na posição *meta*, e duas entre a carboxila e os resíduos Arg102 e Tyr70.

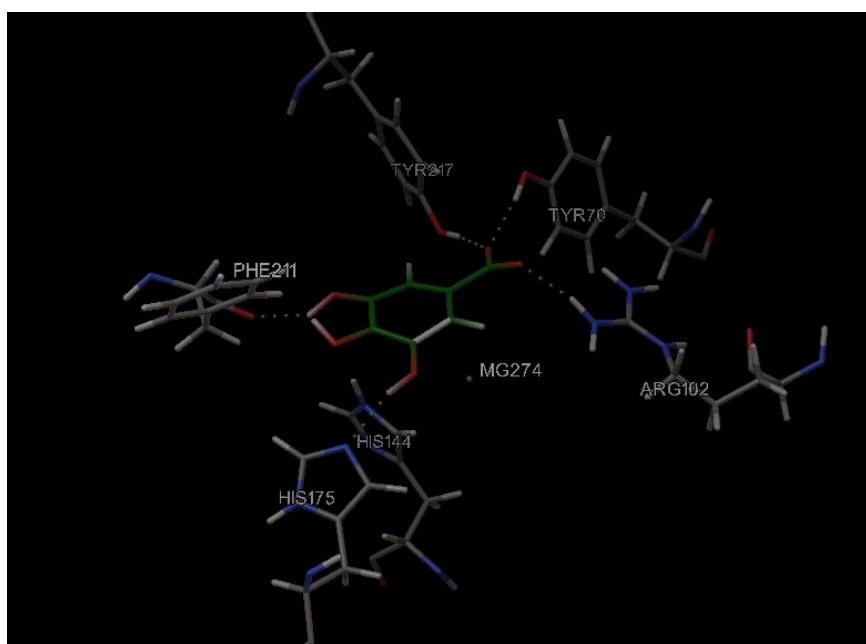
Figura 40 – Padrão de ligações hidrogênio (pontilhado em verde) entre o produto e o sítio ativo na estrutura média do complexo durante a simulação.



A cristalografia de raios-X e o docking anterior (figura 30) haviam apontado a histidina-144 e não a histidina-175 como participante da interação com o grupo OH em *meta*. Além disso, ambas apontavam a interação entre as tirosinas 70 e 217 com o grupo carboxílico, enquanto que na simulação de DM a relaxação da lateral externa do sítio ativo levou ao afastamento da Tyr217, impedindo sua interação.

As interações do ácido gálico com o sítio ativo em 59610 picossegundos, momento mais ao fim da simulação em que se estabelecem 7 ligações de hidrogênio – o que representa o número máximo de HBs possíveis dentre os ligantes avaliados – está mostrado na figura 41.

Figura 41 – Interações de ligação de hidrogênio (pontilhado em verde) entre enzima e ácido gálico em 59610 picossegundos.



Apesar de o software AutoDockTools indicar a formação de apenas cinco ligações de hidrogênio devido à distância em que as considera, é fácil observar pelo posicionamento e a proximidade dos resíduos que as duas ligações não mostradas são entre a histidina-144 com o oxigênio da hidroxila em *para* bem como entre o hidrogênio dessa hidroxila e a carboxila do esqueleto da Phe-211.

As demais interações se dão entre a arginina-102 e as tirosinas 70 e 217 com o carboxilato, a histidina-175 com o OH em *meta* – de maneira semelhante ao observado anteriormente para o produto – e entre a carboxila do esqueleto da Phe-211 com o hidrogênio da hidroxila em posição 5.

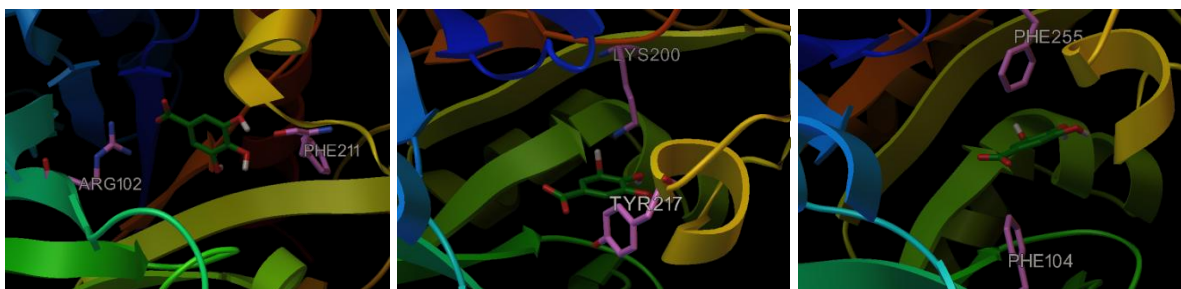
Outra vez se observa que há um padrão significativamente distinto de interações frente ao observado por meio do docking molecular (Figura 29), sobretudo devido à aparente inversão do padrão de ligações de hidrogênio das histidinas. Ou seja, realmente houve alterações significativas no sítio ativo durante a simulação capaz de alterar o modo de ligação. Isso demonstra a real necessidade de se considerar a flexibilidade do receptor para a obtenção de um modelo capaz de gerar resultados quantitativos e permitir a previsão do potencial de novos compostos como inibidores enzimáticos.

Uma das hipóteses levantadas por meio do *docking* molecular é a existência de outra região na enzima – aparentemente bem próxima do sítio ativo – capaz coordenar alguns dos inibidores um pouco mais volumosos, como derivados de ácidos indol-carboxílicos e benzofuranocarboxílicos. Por outro lado, a falha desses compostos em se coordenar ao sítio ativo durante o *docking* poderia ser mera consequência de seus elevados volumes, tornando-os inaptos de se encaixar no sítio ativo em razão da utilização de um receptor rígido.

Dessa forma, com o propósito de se verificar essas hipóteses, avaliou-se a evolução temporal do “volume” do sítio ativo durante a simulação por meio do acompanhamento da distância entre resíduos diametralmente opostos. Naturalmente, esse comportamento foi estudado na enzima livre, na medida em que a presença de ligantes reduz a mobilidade dos resíduos em função das interações, como mostrado anteriormente na comparação do RMSD e do RMSF do sítio ativo para os diferentes sistemas simulados.

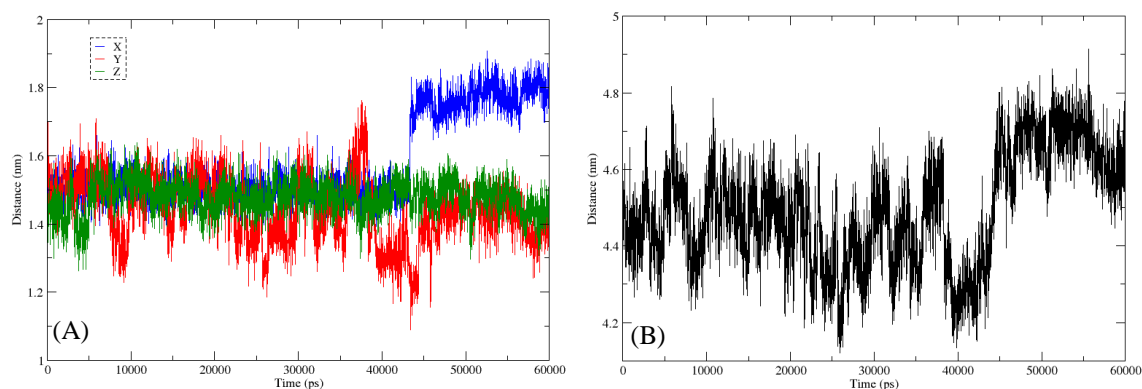
Seis resíduos foram escolhidos de forma que as três dimensões espaciais do sítio ativo fossem amostradas: o par arginina-102 e fenilalanina-211 foi escolhido como eixo X, tirosina-217 e lisina-200 como eixo Y e fenilalanina-255 e fenilalanina-104 como representantes do eixo Z. A localização desses resíduos no sítio ativo em relação ao ácido gálico (molécula de referência) está mostrada na figura 42.

Figura 42 – Seis resíduos do sítio ativo diametralmente opostos representando os eixos X, Y e Z escolhidos para avaliar alterações do volume do sítio ativo durante a simulação.



Na figura 43a está mostrado o gráfico de como a distância entre os resíduos nessas três dimensões variou durante a simulação ao passo em que na figura 43b está mostrada a soma das alterações em X, Y e Z. Percebe-se que há um aumento abrupto nas distâncias dos resíduos na dimensão X durante a simulação enquanto que as distâncias em Y e Z permanecem pouco alteradas, oscilando em torno de um valor central.

Figura 43 – Evolução temporal da distância entre os eixos X (azul), Y (vermelho) e Z (verde) ao longo da trajetória simulada (a) e da soma das distâncias nas três dimensões consideradas (b)



Essa alteração brusca aparentemente está relacionada com a reorganização da parede externa do sítio ativo, ao qual a fenilalanina-211 está ligada, como pode ser observado na figura 44, onde a estrutura inicial (em laranja) está sobreposta à estrutura em 55640 picossegundos (azul). A estrutura em azul representa o valor máximo das distâncias somadas e foi escolhida a partir do gráfico da soma das distâncias nas três dimensões em função do tempo de simulação (figura 43b).

Figura 44 – Sobreposição da estrutura inicial (laranja) com a estrutura após 55640 picossegundos (azul) mostrando as alterações na estrutura secundária e nos resíduos definidos como X,Y e Z, em destaque.

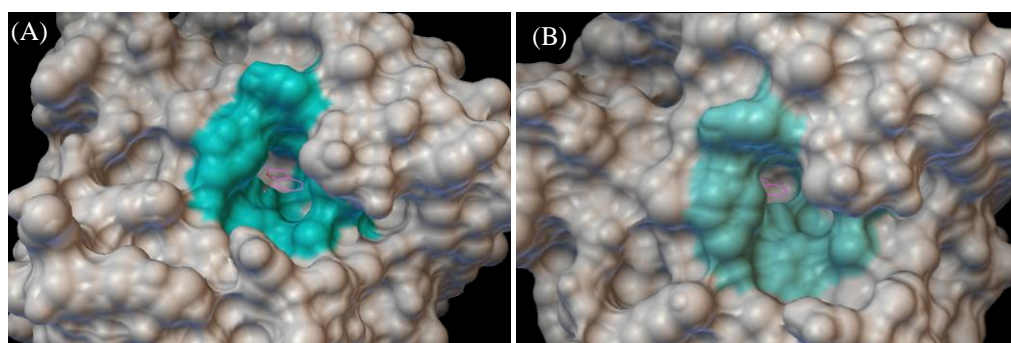


Se a razão pela qual ligantes como ácido indol-2-carboxílico (inibidor 46) e 7-metóxi-2-benzofurancarboxílico (inibidor 13) não foram ancorados adequadamente for devido ao pequeno volume do sítio ativo na estrutura utilizada, o novo docking desses compostos na estrutura em azul – que é 4,9 nm maior que a estrutura inicial na soma das três dimensões – deveria permitir a interação desses compostos no sítio ativo, se este for de fato seu local preferencial de interação.

Assim, utilizando-se essa estrutura e um *grid* capaz de envolver toda a enzima, os ligantes 13 e 46 foram docados novamente utilizando-se o AutoDock Vina.

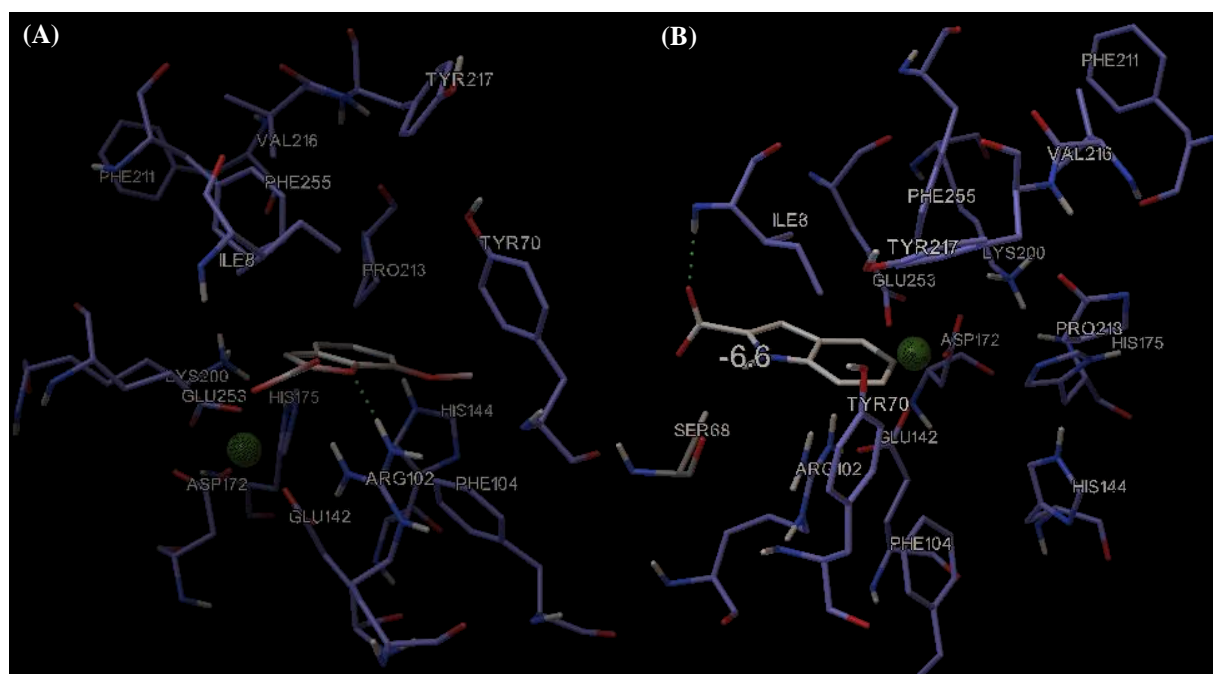
Na figura 45 o posicionamento desses dois compostos após o docking é comparado, com a porção da enzima correspondente ao sítio ativo em destaque. Aparentemente enquanto o inibidor 13 se mantém da entrada do sítio ativo, o inibidor 46 se mostra coordenado no interior do mesmo. O escore desses ligantes foi de -6,5 kcal/mol e de -6,6 kcal/mol, respectivamente e, portanto significativamente maiores do que escore obtido na estrutura inicial, que foram de -5,9 kcal/mol para o ligante 13 e de -6,5 kcal/mol para o ligante 46.

Figura 45 – Posicionamento do inibidor 13 (a) e do inibidor 46 (b) após docking utilizando-se a estrutura de receptor com maior alteração no volume do sítio ativo. A porção do sítio ativo está destacada em verde



Avaliando-se os modos de interação desses ligantes nesse novo docking (Figura 46) pode-se observar que ambos realmente interagem com resíduos do sítio ativo. O inibidor 13 apresenta uma ligação de hidrogênio entre o oxigênio do furano e um dos hidrogênios do NH da arginina-102 enquanto que o indol demonstra interagir com o hidrogênio da amida da isoleucina-8 por meio do seu carboxilato e possivelmente com o oxigênio da serina-68 com pelo hidrogênio do NH aromático.

Figura 46 – Padrão de interações dos ácidos 7-metóxi-2-benzofurancarboxílico (a) e indol-2-carboxílico (b) após novo docking utilizando-se a estrutura do receptor com maior desvio das distâncias do sítio ativo em relação à estrutura de referência



Os modos de ligação, no entanto, demonstram ser bem diferentes do observado para os demais ligantes – em parte provavelmente devido à grande alteração na disposição dos resíduos do sítio ativo nesse momento em particular da simulação. O fato dos ligantes se

coordenarem ao sítio ativo nessa estrutura não prova que isso é o que acontece na realidade, especialmente porque essa estrutura aparenta ter ocorrência improvável. Porém, caso falhassem em interagir com o sítio ativo *mesmo* nessa estrutura de grande volume isso demonstraria que os compostos dessa família são de fato inibidores não competitivos ou anti-competitivos, devendo interagir em outra parte da molécula.

Os resultados experimentais, no entanto, parecem indicar que tais compostos devem ter um modo de ligação muito diferente dos demais em função da divergência estrutural com os outros ou então devem se ligar em outra região da enzima. A verificação real dessa hipótese – sobretudo da existência de coordenação na entrada do sítio ativo – só pode ser realizada por meio da simulação de DM com esses compostos.

Inicializando-se as moléculas na entrada do sítio ativo, se elas de fato interagirem nessa região deverão permanecer coordenadas a ela durante toda a simulação e se interagirem preferencialmente no interior do sítio ativo um deslocamento em direção ao interior seria observado. Novas simulações já estão sendo realizadas com esses compostos para avaliação definitiva dessas hipóteses.

Além disso, as diversas estruturas diferentes do receptor obtidas por meio dos diversos sistemas simulados por dinâmica molecular serão utilizadas na realização de *ensemble docking* a fim de se obter uma (ou um conjunto) de estruturas do receptor que seja capaz de produzir escores de alta correlação com a potência experimental. Esse *modelo aprimorado* será então utilizado na avaliação computacional de novos compostos, desenvolvidos com base em um desenho racional para maximizar as diversas interações enzima-ligante observadas, muitas das quais descritas nesse trabalho.

Os compostos assim obtidos e que forem virtualmente efetivos serão sintetizados e avaliados experimentalmente, podendo então servir ao desenvolvimento de novas drogas com potencial antibacteriano.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

DHS desidratase foi superexpressada satisfatoriamente em *E. coli* por DNA recombinante, de onde foi isolada, purificada e então utilizada nos ensaios de inibição *in vitro*. Dentre os compostos estudados, 25 apresentaram potencial inibitório mensurável com IC₅₀ que variaram entre 4,4 µM para o líder ácido gálico e 857 µM para a vanilina.

Destaca-se que o produto da reação, ácido 3,4-dihidroxibenzóico, apresentou o terceiro melhor potencial inibitório da série analisada (38 µM). Esta é a primeira comprovação experimental e quantificação de retroinibição nessa enzima, uma observação é importante tanto no desenvolvimento de novos inibidores como na possível aplicação desse sistema na biossíntese de 3,4-DHB, um insumo industrial importante.

A comparação entre estrutura e atividade mostrou que um grupo carboxilato livre capaz de atuar como acceptor de LH é uma característica estrutural importante no poder inibitório. Igualmente, o aumento no número de substituintes OH no anel benzóico tem um efeito sinérgico sobre o IC₅₀, indicando a existência de outras três regiões aptas à ligação de hidrogênio no sítio ativo enzimático além da que envolve o ácido carboxílico. Dentre essas, a hidroxila na posição *três* do anel aromático demonstra papel primordial gerando mudanças dramáticas no potencial inibitório se alterada.

Alguns compostos similares ao substrato se mostraram incapazes de atuar como inibidores em função da ausência da rigidez ou aromaticidade, essencial no direcionamento das interações com o sítio ativo bem como houve uma aparente rejeição a moléculas muito volumosas na porção 4,5 do anel central, indicativo de uma restrição espacial nessa região do sítio ativo. Tais fatores têm de ser levados em consideração no desenho de novos compostos.

Derivados de indol-carboxilatos e benzofurano-carboxilatos mostraram alto potencial inibitório, mesmo sendo estruturalmente distintos dos outros compostos. Isso sugere um modo de ligação diferente ou a atuação inibitória em outra região da enzima.

A correlação entre o potencial inibitório experimental e a energia livre de ligação calculada por *docking* foi extremamente baixa, ainda que uma tendência coerente com os resultados experimentais pudesse ser observada. Essa baixa correlação está provavelmente relacionada com a desconsideração dos graus de liberdade do receptor durante o *docking*, ignorando sua flexibilidade intrínseca em condições fisiológicas.

O posicionamento das melhores interações calculado por *docking* resultou na distribuição dos compostos em dois grupos. Um grupo principal, dos derivados do ácido benzóico, interagindo no sítio ativo da enzima como inibidores competitivos típicos e um

grupo secundário, composto por moléculas levemente maiores, que se coordena à entrada do sítio ativo, onde atuariam como inibidores não competitivos ou anti-competitivos.

A análise do padrão de interações do grupo principal, representado pelo ácido gálico, indica a formação de 5 LHs com o sítio ativo, com o carboxilato atuando como aceptor de duas ligações de hidrogênio com a tirosina-217 e a arginina-102 e com cada um dos três grupos OH do anel envolvidos em uma ligação de hidrogênio com as histidinas 144 e 175 e a carboxila da fenilalanina-211, comprovando o que foi inferido pela observação experimental. Além disso, a possibilidade de interação eletrostática entre o íon Mg^{2+} e o oxigênio do grupo OH na posição três (*meta*) do anel aromático parece acentuar a intensidade da interação, justificando a importância experimental constatada para esse grupo no poder de inibição.

Os compostos do grupo secundário, representados pelo ácido indol-2-carboxílico (46) tem possibilidade de formar apenas uma ligação de hidrogênio com a carboxila da ligação amida do resíduo glicina-106. Entretanto há a possibilidade de interações do tipo π - π entre o indol e o anel aromático da fenilalanina-104, paralelamente alinhados além de outras interações hidrofóbicas ou de Van der Waals com resíduos dessa região.

RMSD relativamente baixos e sem alterações bruscas indicam que não houve uma modificação estrutural significativa durante os 60 ns da simulação de dinâmica molecular possivelmente devido à estrutura terciária em forma de barril, relativamente rígida, ainda que a obtenção de um patamar nos gráfico de RMSD ao final da simulação demonstre que o equilíbrio foi atingido, com o alívio de interações desfavoráveis e obtenção de uma conformação mais próxima da que seria encontrada em condições fisiológicas.

A avaliação comparativa do RMSF dos resíduos do sítio ativo indicou que a tirosina-70 participa de uma interação mais importante com os inibidores do que tirosina-217, contrariando o apontado por docking e sugerindo uma mudança conformacional do sítio ativo durante simulação capaz de alterar os modos de ligação.

A evolução temporal no número de LHs mostrou que o ácido gálico interage com uma média de 4,51 ligações de hidrogênio, enquanto o produto forma em média de 2,10 LHs e o substrato uma média de apenas 1,92 ligações, números significativamente relacionados com as afinidades experimentais, sugerindo que um composto capaz de maximizar o número médio de LHs atuaria como inibidor ainda mais potente do que o ácido gálico.

O padrão médio de interações entre produto e enzima apontado pela dinâmica diverge do obtido tanto por cristalografia quanto por docking, indicando que a estrutura cristalográfica não é a mais provável e justificando a divergência entre a potência experimental dos inibidores e os resultados do *docking* nessa estrutura rígida. Isso demonstra a real necessidade

de se considerar a flexibilidade do receptor para a obtenção de um modelo capaz de gerar resultados quantitativos e capaz de permitir a previsão do potencial de novos compostos como inibidores enzimáticos.

O novo docking dos inibidores 13 e 46 na estrutura da enzima com o maior volume do sítio ativo, segundo a simulação de dinâmica, mostrou a possibilidade de interação desses compostos no sítio. Ainda que isso não prove a atuação dessas moléculas como inibidores competitivos ao invés de *anti* ou não competitivos, reforça a hipótese de que a coordenação desses compostos na entrada do sítio ativo seja mais um falha de encaixe no sítio ativo estreito da estrutura inicial do que um fenômeno real.

Assim, como uma perspectiva futura desse projeto, simulações de DM serão realizadas com esses compostos, partindo-se dos complexos em interação na entrada do sítio ativo. Se de fato houver preferência pela coordenação nessa região, tais moléculas deverão permanecer coordenadas a ela durante toda a simulação. A comprovação da existência de um segundo sítio de inibição abriria a possibilidade de construção de novos inibidores capazes de unir em uma única molécula uma porção apta a inibir o sítio ativo e outra capaz de inibir esse sítio alostérico e, portanto com potência e seletividades aumentadas.

Além disso, estruturas diferentes do receptor extraídas da simulação de dinâmica molecular serão utilizadas na realização de *ensemble docking* a fim de se obter uma ou um conjunto de estruturas do receptor capaz de reproduzir sua flexibilidade natural e permitindo assim o cálculo de energias livre de ligação por docking com alta correlação com a potência experimental.

Esse modelo aprimorado será então utilizado na avaliação computacional do potencial de novas moléculas construídas para maximizar as diversas interações importantes enzima-ligante descritas nesse trabalho, aumentando assim a eficácia, potência e seletividade desses novos inibidores. Os compostos assim obtidos e que forem virtualmente efetivos serão sintetizados e avaliados experimentalmente, podendo então servir ao desenvolvimento de novos medicamentos com potencial aplicação como antibióticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

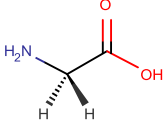
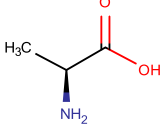
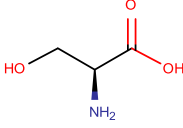
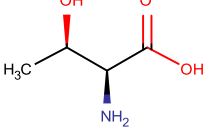
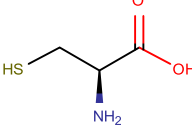
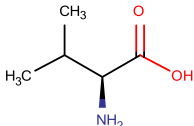
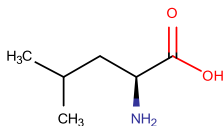
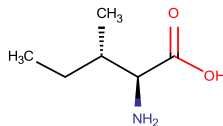
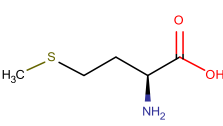
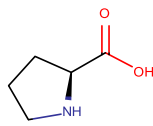
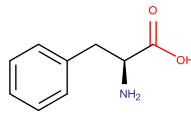
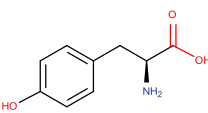
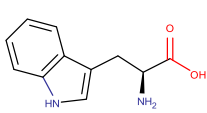
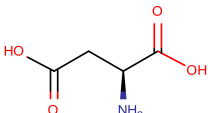
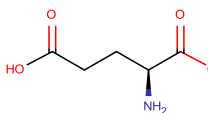
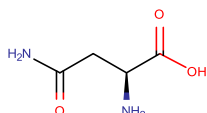
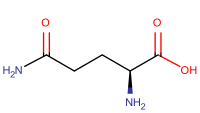
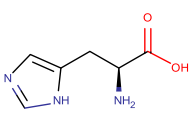
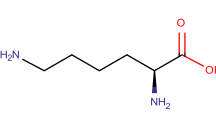
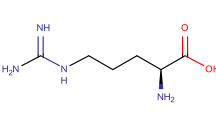
1. MATOS, E. Suspeita de bactéria fecha mais uma UTI Neonatal. *Zero Hora*. Porto Alegre, 30 abr. **2015**. Edição Digital. Disponível em: <<http://zh.clicrbs.com.br/rs/porto-alegre/noticia/2015/04/suspeita-de-bacteria-fecha-mais-uma-uti-neonatal-4751256.html>>. Acesso em: 25 mai. 2015.
2. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*. Genebra: WHO Press, **2014**. Disponível em: <http://www.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf> Acesso: 27 mai. 2015.
3. CIESLAK, T. J.; EITZEN, E. M. J. Clinical and epidemiologic principles of anthrax. *Emerg. Infect. Dis.*, **1999**, 5 (4), 552 - 555.
4. SCHILD, A. L.; SALLIS, E. S. V.; SOARES, M. P.; LADEIRA, S. R. L.; SCHRAMM, R.; PRIEBE, A. P.; ALMEIDA, M. B.; RIET-CORREA, F. Anthrax in cattle in southern Brazil: 1978 – 2006. *Pesq. Vet. Bras.*, **2006**, 26 (4), 243-248.
5. LANGENEGGER, J. Ocorrência do carbúnculo hemático em animais no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.*, **1994**, 4, 135-136.
6. FASANELLA, A.; GALANTE, D.; GAROFOLO, G.; HUGH-JONES, M. Anthrax undervalued zoonosis. *Vet. Microbiology*, **2010**, 140, 318–333.
7. BRAVATA, D. M.; HOLTY, J. E.; LIU, H.; MCDONALD, K. M.; OLSHEN, R. A.; OWENS, D. K. Systematic review: a century of inhalational anthrax cases from 1900 to 2005. *Ann. Intern. Med.* **2006**, 144 (4), 270–280.
8. LANGSTON, S. M. *The threat of domestic bioterrorism: fact or fiction?*. 2005. 74 p. Dissertação (Master of Science). The University of Texas at El Paso, El Paso, **2013**.
9. INGLESBY, T. V. Anthrax: a possible case history. *Emerg. Infect. Dis.*, **1999**, 05 (04), 556-560.
10. ANDREWS, S. C.; ROBINSON, A. K.; RODRIGUEZ-QUINONES, F. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.*, **2003**, 27, 215–237.
11. BOUKHALFA, H.; CRUMBLISS, A. L. Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *Biometals.*, **2002**, 15, 325–339
12. WILSON M. K.; ABERGEL R. J.; RAYMOND K. N.; ARCENEUX J. E.; BYERS B. R. Siderophores of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2006**, 348, 320-325.
13. CENDROWSKI S.; MACARTHUR W.; HANNA P. *Bacillus anthracis* requires siderophore biosynthesis for growth in macrophages and mouse virulence. *Mol Microbiol.*, **2004**, 51, 407-417.
14. ZHANG, G.; AMIN, S. A.; KUPPER, F. C.; HOLT, P. D.; CARRANO, C. J.; BUTLER, A. Ferric stability constants of representative marine siderophores: marinobactins, aquachelins, and petrobactin. *Inorg. Chem.*, **2009**, 48, 11466-11473.
15. ABERGEL, R. J.; ZAWADZKA, A. M.; RAYMOND, K. N. Petrobactin-mediated iron transport in pathogenic bacteria: coordination chemistry of an unusual 3,4-catecholate/citrate siderophore. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 2124-2125.
16. BARBEAU, K.; ZHANG, G.; LIVE, D. H.; BUTLER, A. Petrobactin, a photoreactive siderophore produced by the oil-degrading marine bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 378-379.
17. KOPPISCH, A. T.; BROWDER, C. C.; MOE, A. L.; SHELLEY, J. T.; KINKEL, B. A.; HERSMAN, L. E.; IYER, S.; RUGGIERO, C. E. Petrobactin is the primary siderophore synthesized by *Bacillus anthracis* str. Sterne under conditions of iron starvation. *Biometals*, **2005**, 18, 577-585.

18. HOTTA, K.; KIM, C. Y.; FOX, D. T.; KOPPISCH, A. T. Siderophore-mediated iron acquisition in *Bacillus anthracis* and related strains *Microbiology.*, **2010**, *156*, 1918–1925
19. FISCHBACH, M. A.; LIN, H.; LIU, D. R.; WALSH, C. T. How pathogenic bacteria evade mammalian sabotage in the battle for iron. *Nat. Chem. Biol.*, **2006**, *2*, 132-138.
20. LEE, J. Y.; JANES, B. K.; PASSALACQUA, K. D.; PFLEGER, B. F.; BERGMAN, N. H.; LIU, H.; HÅKANSSON, K.; SOMU, R. V.; ALDRICH, C. C.; CENDROWSKI, S.; HANNA, P. C.; SHERMAN, D. H. Biosynthetic analysis of the petrobactin siderophore pathway from *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.*, **2007**, *189*, 1698-1710.
21. FOX, D. T.; HOTTA, K.; KIM, C. Y.; KOPPISCH, A. T. The missing link in petrobactin biosynthesis: *asbF* encodes a (-)-3-dehydroshikimate dehydratase. *Biochemistry*, **2008**, *47*, 12251-1225.
22. PFLEGER, B. F.; KIM, Y.; NUSCA, T. D.; MALTSEVA, N.; LEE, J. Y.; RATH, C. M.; SCAGLIONE, J. B.; JANES, B. K.; ANDERSON, E. C.; BERGMAN, N. H.; HANNA, P. C.; JOACHIMIAK, A.; SHERMAN, D. H. Structural and functional analysis of *AsbF*: origin of the stealth 3,4-dihydroxybenzoic acid subunit for petrobactin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **2008**, *105*, 17133-17138.
23. TYMOCZKO, J. L.; BERG, J. M.; STRYER, L. *Biochemistry: a short course*. 2nd. ed. New York: W. H. Freeman and Company, **2010**. 727 p.
24. BUGG, T. D. H. *Introduction to enzyme and coenzyme chemistry*. 3rd. ed. Chichester: John Wiley and Sons, **2012**. 279 p.
25. VOET, D.; VOET, J. G. *Biochemistry*. 4th. ed. Hoboken, John Wiley and Sons, **2011**. 1428 p.
26. COPELAND, R. A. *Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery: a guide for medicinal chemists and pharmacologists*. 2nd. ed. Hoboken, John Wiley and Sons, **2013**. 538 p.
27. WERMUTH, C. G. *Medicinal chemistry*. 3rd. ed. Londres: Elsevier, **2008**. 942 p.
28. PATRICK, G. L. *An introduction to medicinal chemistry*. 5th. ed. Oxford: Oxford University Press, **2009**. 789 p.
29. MENG, X. Y.; ZHANG, H. X.; MEZEI, M.; CUI, M. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr. Comput. Aided Drug Des.*, **2011**, *7*(2), 146-157.
30. LEACH, A. R. *Molecular modelling: principles and applications*. 2nd. ed. Harlow: Pearson Prentice Hall, **2001**. 744 p.
31. KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature*, **2004**, *3*, 935-949.
32. MORGON, N. H.; COUTINHO, K. *Métodos de química teórica e modelagem molecular*. São Paulo: Livraria da Física, **2007**. 539 p.
33. HUANG, S. Y.; ZOU, X. Ensemble docking of multiple protein structures: considering protein structural variations in molecular docking. *Proteins*, **2007**, *66*, 399-421
34. TROTT, O.; OLSON, A. J. J. Auto-DockVina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Comput Chem.*, **2010**, *31*, 455-461.
35. CORNELL, W.D.; CIEPLAK, P.; BAYLY, C. I.; GOULD, I. R.; MERZ, K. M. JR.; FERGUSON, D. M.; SPELLMEYER, D. C.; FOX, T.; CALDWELL, J. W.; KOLLMAN, P. A. A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 5179–5197.
36. FRENKEL, D.; SMIT, B. *Understanding molecular simulation: from algorithms to applications*. 2nd. ed. San Diego: Elsevier, **2002**. 638 p.

37. BROOKS, B.R.; BRUCCOLERI, R. E.; OLAFSON, B. D.; STATES, D. J.; SWAMINATHAN, S.; KARPLUS, M. CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations". *J. Comp. Chem.*, **1983**, *4* (2), 187-217.
38. OOSTENBRINK, C.; VILLA, A.; MARK, A. E.; GUNSTEREN, W. F. V. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *J. Comput. Chem.*, **2004**, *25*, 1656-1676.
39. BERMAN, H. M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T. N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I. N.; BOURNE, P. E. The protein data bank. *Nucl. Acids Res.* **2000**, *28* (1), 235-242. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/home/home>>
40. HENDRICKSON, W. A. J. Synchrotron crystallography. *Synchrotron Rad.*, **1999**, *6*, 845-851.
41. LI, H.; ROBERTSON, A. D; JENSEN, J. H. Very fast empirical prediction and rationalization of protein pKa values. *Proteins*, **2005**, *61*, 704-721.
42. BAS, D, C.; ROGERS, D. M.; JENSEN, J. H. Very fast prediction and rationalization of pKa values for protein-ligand complexes. *Proteins*, **2008**, *73*, 765-783.
43. SANNER, M. F. Python: a programming language for software integration and development. *J. Mol. Graph. Model.*, **1999**, *17*, 57-61.
44. MORRIS, G. M.; HUEY, R.; LINDSTROM, W.; SANNER, M. F.; BELEW, R. K.; GOODSSELL, D. S.; OLSON, A. J. Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.*, **2009**, *16*, 2785-2791.
45. MARVIN BEANS SUITE v. 5.12.3. Evaluation Mode. Budapest: ChemAxon, **2013**. Disponível em: <<http://www.chemaxon.com/marvin/sketch/index.php>>
46. DENNINGTON, R.; KEITH, T.; MILLAM, J. *GaussView Version 4.1*. Shawnee Mission: Semichem Inc, **2007**.
47. FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J.R.; SCALMANI, G. et al. Gaussian 09, Revision A.1. Wallingford: Gaussian, Inc., **2009**.
48. O'BOYLE, N. M.; BANCK, M.; JAMES, C. A.; MORLEY, C.; VANDERMEERSCH, T.; HUTCHISON, G. R. Open Babel: an open chemical toolbox. *J. Cheminformatics*, **2011**, *3*(33), 35-47.
49. MORRIS, G.M.; GOODSSELL, D. S.; HALLIDAY, R. S.; HUEY, R.; HART, W. E.; BELEW, R. K.; OLSON, A. J. Automated docking using Lamarckian Genetic Algorithm and an empirical binding free-energy function. *J. Comput. Chem.*, **1998**, *19*, 1639-1662.
50. BERENDSEN, H. J. C.; VAN DER SPOEL, D.; VAN DRUNEN, R. Gromacs: a message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Comput. Phys. Commun.*, **1995**, 43-56.
51. VAN DER SPOEL, D.; LINDAHL, E.; HESS, B.; GROENHOF, G.; MARK, A. E.; BERENDSEN, H. J. C. Gromacs: fast, flexible, and free. *J. Comput. Chem.*, **2005**, 1701-1718.
52. VAN DER SPOEL, D.; LINDAHL, E.; HESS, B.; VAN BUUREN, A. R.; APOL, E.; MEULENHOF, O. J.; TIELEMAN, D. P.; SIJBERS, A. L. T. M.; FEENSTRA, K. A.; VAN DRUNEN, R.; BERENDSEN, H. J. C. Gromacs. Groningen: **2010**.
53. DUAN, Y.; WU, C.; CHOWDHURY, S.; LEE, M. C.; XIONG, G.; ZHANG, W.; YANG, R.; CIEPLAK, P.; LUO, R.; LEE, T.; CALDWELL, J.; WANG, J.; KOLLMAN, P. A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations. *J. Comput. Chem.*, **2003**, *24* (16), 1999-2012.

54. JAKALIAN, A.; JACK, D. B.; BAYLY, C. I. Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: II. Parameterization and validation. *J. Comput. Chem.*, **2002**, 23 (16), 1623-1641.
55. SOUSA DA SILVA, A. W.; VRANKEN, W. F. ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interface. *BMC Res. Notes*, **2012**, 5, 367-384
56. JORGENSEN, W. L.; CHANDRASEKHAR, J.; MADURA, J. D.; IMPEY, R. W.; KLEIN, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.*, **1983**, 79, 926-935.
57. BUSSI, G.; DONADIO, D.; PARRINELLO, M. Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys.*, **2007**, 126(1), 14-101.
58. PARRINELLO, M.; RAHMAN, A. Polymorphic transitions in single crystals: a new molecular dynamics method *J. Appl. Phys.*, **1981**, 52, 7182-7190.
59. DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle Mesh Ewald-an N.Log(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.*, **1993**, 98, 10089-10092.
60. SAYLE, R. *Rasmol: molecular graphics visualisation tool*. v. 2.7. Hertfordshire: Glaxo Wellcome Research & Development, **2000**. Disponível em: <<http://rasmol.org>>
61. TURNER, P. J.; STAMBULCHIK, E. *XMGRACE*. Portland: WIS Plasma Laboratory, **1991**. Disponível em: <<http://plasmagate.weizmann.ac.il/Grace>>
62. KAKKAR, S.; BAIS, S. A review on protocatechuic acid and its pharmacological potential. *ISRN Pharmacol.*, **2014**, article ID 952943. 9 p.

ANEXO A – Estrutura, denominação e classificação por natureza química dos 20 L-aminoácidos constituintes de proteínas e enzimas.

Pequenos		Nucleofílicos		
				
<i>Glicina</i> (Gly, G)	<i>Alanina</i> (Ala, A)	<i>Serina</i> (Ser, S)	<i>Treonina</i> (Thr, T)	<i>Cisteína</i> (Cys, C)
Hidrofóbicos				
				
<i>Valina</i> (Val, V)	<i>Leucina</i> (Leu, L)	<i>Isoleucina</i> (Ile, I)	<i>Metionina</i> (Met, M)	<i>Prolina</i> (Pro, P)
Aromáticos		Ácidos		
				
<i>Fenilalanina</i> (Phe, F)	<i>Tirosina</i> (Tyr, Y)	<i>Triptofano</i> (Trp, W)	<i>Ácido Aspártico</i> (Asp, D)	<i>Ácido glutâmico</i> (Glu, E)
Amidas		Básicos		
				
<i>Asparagina</i> (Asn, N)	<i>Glutamina</i> (Gln, Q)	<i>Histidina</i> (His, H)	<i>Lisina</i> (Lys, K)	<i>Arginina</i> (Arg, R)

Fonte: VOET, D.; VOET, J. G. *Biochemistry*. 4.ed. Hoboken, John Wiley and Sons, 2011. 1428 p.