



MARCO ANTONIO DE MECENAS FILHO

**AVALIAÇÃO DAS INTERAÇÕES ENTRE POTENCIAIS
INIBIDORES DA PROTEÍNA DI-HIDROFOLATO
REDUTASE DO *Mycobacterium tuberculosis* E *Homo sapiens***

**LAVRAS-MG
2019**

MARCO ANTONIO DE MECENAS FILHO

**AVALIAÇÃO DAS INTERAÇÕES ENTRE POTENCIAIS INIBIDORES DA
PROTEÍNA DI-HIDROFOLATO REDUTASE DO *Mycobacterium tuberculosis* E
*Homo sapiens***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de Mestre.

Prof(a). Dr(a). Elaine Fontes Ferreira da Cunha
Orientadora

**LAVRAS-MG
2019**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Filho, Marco Antonio de Mecnas.

Avaliação das interações entre potenciais inibidores da
proteína di-hidrofolatoredutase do *mycobacterium tuberculosis* e
homo sapiens / Marco Antonio de Mecnas Filho. - 2019.

72 p. : il.

Orientador(a): Elaine Fontes Ferreira da Cunha.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Tuberculose. 2. Mycobacterium tuberculosis. 3.
Ancoramento Molecular. I. Ferreira da Cunha, Elaine Fontes. II.
Título.

MARCO ANTONIO DE MECENAS FILHO

**AVALIAÇÃO DAS INTERAÇÕES ENTRE POTENCIAIS INIBIDORES DA
PROTEÍNA DI-HIDROFOLATO REDUTASE DO *Mycobacterium tuberculosis* E**

Homo sapiens

**“EVALUATION OF THE INTERACTIONS BETWEEN POTENTIAL
INHIBITORS OF THE *Mycobacterium tuberculosis* AND *Homo sapiens*
DIHYDROFOLATE REDUCTASE PROTEIN”**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em 25 de fevereiro de 2019.
Dr^a. Elaine Fontes Ferreira da Cunha
Dr. Daniel Henriques Soares Leal
Dr. Marcus Vinícius Juliaci Rocha

Prof(a). Dr(a). Elaine Fontes Ferreira da Cunha
Orientadora

**LAVRAS-MG
2019**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha querida avó Iracema Rabello. Que durante toda vida batalhou pelos seus sonhos. Lutou contra muitas doenças, mas pereceu para o tempo. Uma mulher forte, determinada e inabalável. Sendo ao mesmo tempo doce, que nos alegrava com suas danças e resolvia qualquer problema do mundo, com um pastel de nata. Aonde quer que ele esteja, sei que está feliz por esta minha conquista.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a toda minha família que me ensinou a compreensão, o respeito, a responsabilidade e a gratidão. Valores esses que me proporcionaram muitas conquistas ao longo da minha trajetória, principalmente a minha mãe e meu pai, Maria Angélica e Marco Antônio pelo amor, confiança e dedicação.

Aos meus irmãos e irmãs pelo carinho, compreensão e amizade.

A minha namorada Bárbara, pela compreensão, amizade, confiança, paciência, carinho e cuidado em momentos difíceis durante todos esses anos.

Aos amigos que conquistei durante esta jornada, e a todos aqueles que estiveram juntos de mim nos momentos bons e ruins, obrigada pela amizade.

A minha orientadora, Prof(a). Dr(a). Elaine, pela oportunidade, paciência, confiança, incentivo, apoio e principalmente pelo carinho.

Aos colegas e companheiros do Grupo de Química Computacional, a "era do gelo" pelo apoio e parceria durante este ano de convivência.

A todos os professores que participaram da minha formação desde o ensino fundamental até a graduação que nos transmitiram conhecimento da melhor forma possível.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Química, pela oportunidade de realização do curso.

O presente trabalho foi realizado com apoio das agências de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

A tuberculose é uma doença transmitida pelo ar, atacando principalmente os pulmões. É causada pelo patógeno *Mycobacterium tuberculosis*. Um importante alvo para o tratamento desta doença é a proteína di-hidrofolato redutase, pois sua inibição leva a morte celular. Porém, a espécie humana também possui essa proteína, assim, é necessário que os fármacos tenham uma seletividade pela bactéria. Métodos de química teórica são utilizados para auxiliar na pesquisa por novos fármacos e neste trabalho enfatizou-se o *docking*, o qual analisa a estabilidade de um ligante no sítio de interação nas proteínas di-hidrofolato redutase do *Mycobacterium tuberculosis* (MtbDHFR) e *Homo sapiens* (HuDHFR). Onde mostra que compostos pouco volumosos e com grupos retirados de elétrons apresentam maior seletividade pela MtbDHFR. Um mutante da proteína do patógeno criado, onde foi mostrado que composto muito volumosos apresentam dificuldade de interação no sítio ativo da proteína, causado por um possível efeito estérico.

Palavras-chave: Tuberculose. *Mycobacterium tuberculosis*. Ancoramento molecular. Di-hidrofolato redutase

ABSTRACT

Tuberculosis is a disease transmitted by air, attacking mainly the lungs. It is caused by the pathogen *Mycobacterium tuberculosis*, which has a permanence or persistence ability within the host cells for a period, as well as achieved by the action of the immune system and can be activated. An important target for the treatment of this disease is the dihydrofolate reductase protein, as its inhibition leads to cell death. However, the human species also has this protein, so it is necessary that the drugs have a selectivity for the bacteria. Theoretical chemistry methods are used to aid in the search for new drugs and in this work we emphasize docking, which analyzes the stability of a ligand at the site of interaction in the dihydrofolate reductase proteins of *Mycobacterium tuberculosis* (MtbDHFR) and *Homo sapiens* (HuDHFR). Where it shows that little bulky compounds with groups withdrawn from electrons have greater selectivity for MtbDHFR. A mutant of the protein of the pathogen created, where it was shown that very voluminous compounds present difficulty in the active site of the protein caused by a possible steric effect.

Key-Words: Tuberculosis. *Mycobacterium tuberculosis*. Docking. Dihydrofolate Reductase

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - ESTRUTURAS DOS PRINCIPAIS FÁRMACOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DA TB...	4
FIGURA 2 - REDUÇÃO DEPENDENDO DE NADPH DE DI-HIDROFOLATO PARA TETRAHIDROFOLATO.....	6
FIGURA 3 - SEQUÊNCIA DE ALINHAMENTO ENTRE HUDHFR E MTBDHFR. AS HÉLICES ESTÃO REPRESENTADAS EM CILINDROS AZUIS E AS FOLHAS- SÃO AS SETAS VERMELHAS. OS TURNS E LOOPS EM LARANJA. OS RESÍDUOS SUBLINHADOS ESTÃO ENVOLVIDOS EM INTERAÇÕES COM NADPH E O INIBIDOR. AS REGIÕES DE R1 A R5 NA SEQUÊNCIA DE HUDHFR COMPARADA COM A MTBDHFR EM LARANJA.....	7
FIGURA 4 – SOBREPOSIÇÃO DAS DUAS DHFRs, ENTRE MTBDHFR (AZUL) E HUDHFR (CIANO). A ESTRUTURA EM AMARELO REPRESENTA O MTX, INDICANDO O LOCAL DO SÍTIO ATIVO, E A COLORIDA É O NADPH. R1-R5 SÃO AS REGIÕES COM MAIOR DIFERENÇA ESPACIAL.....	8
FIGURA 5 - AS QUATRO PRINCIPAIS CLASSES DE INIBIDORES DHFR E ALGUMAS DE SUAS CARACTERÍSTICAS.	9
FIGURA 6 - ESTRUTURA GERAL DAS DIAMINOPTERIDINAS.	9
FIGURA 7 - ESTRUTURA GERAL DE MONO OU DI-DIAMINOPTERIDINAS SUBSTITUÍDAS.....	10
FIGURA 8 - ESTRUTURA DO TRIMETOPRIM.	10
FIGURA 9 - ESTRUTURA GERAL DA NOVA CLASSE DE ESTRUTURAS MODIFICADAS.....	11
FIGURA 10 - ESTRUTURA DA TRIMETOTREXATO.	11
FIGURA 11 - ESTRUTURA GERAL DA ENZIMA DHFR.....	12
FIGURA 12 - ESTRUTURA DO CICLOGUANIL.	12
FIGURA 13 - ESTRUTURA GERAL DE N1 BENZIL OU BENZILOXI DIAMINODI-HIDROTRIAZIN. ..	13

FIGURA 14 - CAVIDADES OBTIDAS DAS PROTEÍNAS HUDHFR E MTBDHFR.	23
FIGURA 15 - DISTRIBUIÇÃO DE VALORES DE PIC50 EXPERIMENTAL VERSUS LIGAÇÃO DE HIDROGÊNIO (KCAL MOL ⁻¹), DOS COMPOSTOS DESENVOLVIDOS POR HAJIAN ET AL (2016) E SHELKE ET AL (2016). QUANDO ANCORADOS A PROTEÍNA MTBDHFR.	28
FIGURA 16 - DISTRIBUIÇÃO DE VALORES DE PIC50 EXPERIMENTAL VERSUS LIGAÇÃO DE HIDROGÊNIO (KCAL MOL ⁻¹), DOS COMPOSTOS DESENVOLVIDOS POR HAJIAN ET AL (2016). QUANDO ANCORADOS A PROTEÍNA HUDHFR.	29
FIGURA 17 - ANCORAMENTO DAS CONFORMAÇÕES DOS COMPOSTOS NO SITIO DAS PROTEÍNAS MTBDHFR E HUDHFR. (A)2k:MTBDHFR, (B)2k:HUDHFR, (C)UCP1106:MTBDHFR E (D)3UCP1106:HUDHFR.	31
FIGURA 18 - ANCORAMENTO DAS CONFORMAÇÕES DOS COMPOSTOS NO SITIO DAS PROTEÍNAS MTBDHFR E HUDHFR. O TRACEJADO VERDE CORRESPONDE À LIGAÇÃO DE HIDROGÊNIO. (A)3E:MTBDHFR E (B)3E:HUDHFR.	33
FIGURA 19 - ANCORAMENTO DAS CONFORMAÇÕES DO COMPOSTO NO SITIO DAS PROTEÍNAS MTBDHFR E HUDHFR. O TRACEJADO VERDE CORRESPONDE À LIGAÇÃO DE HIDROGÊNIO. (A)UCP1084:HUDHFR E (B)UCP1084:MTBDHFR, ..	34
FIGURA 20 - ANCORAMENTO DAS CONFORMAÇÕES DOS COMPOSTOS NO SITIO DAS PROTEÍNAS MTBDHFR E HUDHFR. O TRACEJADO VERDE CORRESPONDE À LIGAÇÃO DE HIDROGÊNIO. (A) 2i:HUDHFR, (B)2i:MTBDHFR, (C)2k:HUDHFR, (D)2k:MTBDHFR, (E)2m:HUDHFR E (F)2m:DHFR.	35
FIGURA 21 - ESTRUTURAS DO COFATOR NADPH E DO RESIDUO TYR100 E POSSÍVEL EFEITO ESTÉRICO.	37
FIGURA 22 - ESTRUTURA DOS AMINOÁCIDOS TIROSINA E FENILALANINA.	38
FIGURA 23 - ANCORAMENTO DAS CONFORMAÇÕES DOS COMPOSTOS NO SITIO DAS PROTEÍNAS MTBDHFR E Y100F. (A)2G:MTBDHFR, (B)2G:Y100F, (C)2M:MTBDHFR E (D)2M:Y100F.	45
FIGURA 24 - ANCORAMENTO DAS CONFORMAÇÕES DOS COMPOSTOS NO SITIO DAS PROTEÍNAS MTBDHFR E Y100F. O TRACEJADO VERDE CORRESPONDE À LIGAÇÃO DE	

HIDROGÊNIO. (A) 2L:MTBDHFR, (B)2L:Y100F, (C)3C:MTBDHFR,
(D)3C:Y100F. 47

FIGURA 25 - ANCORAMENTO DAS CONFORMAÇÕES DO COMPOSTO NO SITIO DAS PROTEÍNAS
MTBDHFR E Y100F. O TRACEJADO VERDE CORRESPONDE À LIGAÇÃO DE
HIDROGÊNIO. (A) 2J:MTBDHFR, (B)2J:Y100F. 48

FIGURA 26 - ANCORAMENTO DAS CONFORMAÇÕES DOS COMPOSTOS NO SITIO DAS PROTEÍNAS
MTBDHFR E Y100F. O TRACEJADO VERDE CORRESPONDE À LIGAÇÃO DE
HIDROGÊNIO. . (A) UCP1098:MTBDHFR, (B)UCP1098:Y100F.
(C)UCP1106:MTBDHFR, (D)UCP1106:Y100F, (E)UCP1164:MTBDHFR E
(F)UCP1164:Y100F, 50

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ESTRUTURAS DOS POTENCIAIS INIBIDORES SELETIVOS E SUAS RESPECTIVAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS SHELK ET AL. (2016).	16
TABELA 2 - ESTRUTURAS DOS POTENCIAIS INIBIDORES SELETIVOS E SUAS RESPECTIVAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS (HAJIAN. ET AL., 2016).....	19
TABELA 3 - ESTRUTURAS DE INIBIDORES JÁ CONHECIDOS MTX E TMP.....	21
TABELA 4 - VALORES DE MOLDOCK SCORE (kcal mol^{-1}), PARA OS COMPOSTOS, DESENVOLVIDOS POR SHELKE E COLABORADOS, ANCORADOS NAS PROTEÍNAS MTBDHFR E HUDHFR.....	24
TABELA 5 - VALORES DE ENERGIA INTERMOLECULAR (kcal mol^{-1}) PARA OS COMPOSTOS, DESENVOLVIDOS POR SHELKE E COLABORADOS, ANCORADOS NAS PROTEÍNAS MTBDHFR E HUDHFR.....	25
TABELA 6 - VALORES DE LIGAÇÃO DE HIDROGÊNIO (kcal mol^{-1}), PARA OS COMPOSTOS, DESENVOLVIDOS POR SHELKE E COLABORADOS, ANCORADOS NAS PROTEÍNAS MTBDHFR E HUDHFR.....	26
TABELA 7 - VALORES DE MOLDOCK SCORE (kcal mol^{-1}), PARA OS COMPOSTOS, DESENVOLVIDOS POR HAJIAN E COLABORADOS, ANCORADOS NAS PROTEÍNAS MTBDHFR E HUDHFR.....	27
TABELA 8 - VALORES DE ENERGIA INTERMOLECULAR (kcal mol^{-1}) PARA OS COMPOSTOS, DESENVOLVIDOS POR HAJIAN ET AL., ANCORADOS NAS PROTEÍNAS MTBDHFR E HUDHFR.	27
TABELA 9 - VALORES DE LIGAÇÃO DE HIDROGÊNIO (kcal mol^{-1}), PARA OS COMPOSTOS, DESENVOLVIDOS POR HAJIAN E COLABORADOS, ANCORADOS NAS PROTEÍNAS MTBDHFR E HUDHFR.....	28
TABELA 10 - VALORES DE MOLDOCK SCORE (kcal mol^{-1}) E ENERGIA INTERMOLECULAR (kcal mol^{-1}) PARA OS COMPOSTOS 2K E UCP1106.....	30
TABELA 11 - VALORES DE LIGAÇÃO DE HIDROGÊNIO (kcal mol^{-1}) PARA OS COMPOSTOS 2I, 2K, 3E E UCP1084.	32

TABELA 12 - VALORES DE ENERGIA MOLDOCK SCORE (KCAL MOL ⁻¹) PARA OS COMPOSTOS, DESENVOLVIDOS POR SHELKE E COLABORADOS, ANCORADOS NA PROTEÍNA MTBDHFR E MUTANTE Y100F.	39
TABELA 13 - VALORES DE ENERGIA INTERMOLECULAR (KCAL MOL ⁻¹) PARA OS COMPOSTOS, DESENVOLVIDOS POR SHELKE E COLABORADOS, ANCORADOS NA PROTEÍNA MTBDHFR E MUTANTE Y100F.	40
TABELA 14 - VALORES DE LIGAÇÃO DE HIDROGÊNIO (KCAL.MOL ⁻¹), PARA OS COMPOSTOS, DESENVOLVIDOS POR SHELKE E COLABORADOS, ANCORADOS NA PROTEÍNA MTBDHFR E MUTANTE Y100F.	41
TABELA 15- VALORES DE MOLDOCK SCORE (KCAL MOL ⁻¹), PARA OS COMPOSTOS, DESENVOLVIDOS POR HAJIAN E COLABORADOS, ANCORADOS NA PROTEÍNA MTBDHFR E MUTANTE Y100F.	42
TABELA 16 - VALORES DE ENERGIA INTERMOLECULAR (KCAL MOL ⁻¹), PARA OS COMPOSTOS, DESENVOLVIDOS POR HAJIAN E COLABORADOS, ANCORADOS NA PROTEÍNA MTBDHFR E MUTANTE Y100F.	42
TABELA 17 - VALORES DE LIGAÇÃO DE HIDROGÊNIO (KCAL.MOL ⁻¹), PARA OS COMPOSTOS, DESENVOLVIDOS POR HAJIAN E COLABORADOS, ANCORADOS NA PROTEÍNA MTBDHFR E MUTANTE Y100F.	43
TABELA 18 - VALORES DE MOLDOCK SCORE (KCAL MOL ⁻¹) E ENERGIA INTERMOLECULAR (KCAL MOL ⁻¹) PARA OS COMPOSTOS 2G E 2M.	44
TABELA 19 - VALORES DE LIGAÇÃO DE HIDROGÊNIO (KCAL MOL ⁻¹) PARA OS COMPOSTOS 2J, 2L, 3c, UCP1106, UCP1098 E UCP1164.	46

LISTA DE ABREVIATURAS

Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asp	Aspartato
DHFR	Di-hidrofolato redutase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Gln	Glutamina
Gly	Glicina
HuDHFR	<i>Homo Sapiens</i> di-hidrofolato redutase
Ile	Isoleucina
MDR-TB	Resistência a multidrogas usados contra a tuberculose
Mtb	<i>Mycobacterium Tuberculosis</i>
MtbDHFR	<i>Mycobacterium Tuberculosis</i> di-hidrofolato redutase
MTX	Metotrexato
Phe	Fenilalanina
RNA	Ácido ribonucleico
Ser	Serina
TB	Tuberculose
THF	Tetrahidrofolato
Thr	Treonina
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
Val	Valina

LISTA DE SIGLAS

AIDS	Human immunodeficiency syndrome
BGC	Bacilo de Calmett-Guérin
HIV	Human immunodeficiency vírus
MDV	Molegro Virtual Docking
NADPH	Dinucleotideo reduzido da nicotinamida e adenina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVO	2
3	REFERENCIAL TEÓRICO	3
3.1.	Tuberculose.....	3
3.2.	Proteína di-hidrofolato redutase (DHFR).....	5
3.3.	Inibição da DHFR	8
3.4.	Técnicas Computacionais	13
3.4.1.	Ancoramento molecular (<i>Docking</i>).....	13
4	METODOLOGIA	16
4.1.	Dados biológicos	16
4.2.	Ancoramento molecular.....	21
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1.	Estudos do ancoramento molecular	23
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
7	PERSPECTIVAS.....	54
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença que ataca vários órgãos, principalmente os pulmões. É causada pelo patógeno *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), que possui a capacidade de permanecer adormecido ou resistente dentro das células hospedeiras por um grande período, sendo capaz de escapar do sistema imunológico e podendo ser ativado posteriormente (LIU et al., 2012).

A TB é uma das mais letais doenças transmissíveis do mundo, com uma taxa de mortalidade de 1,5 milhões de pessoas a cada ano (KOZAKEVIC; DA SILVA, 2016). Além disso, cerca de 48 mil pessoas em todo mundo desenvolveram resistência a multidrogas usadas contra a TB (MDR-TB) no ano de 2014. Desta maneira, o tratamento da TB é complexo, necessitando assim, o desenvolvimento de novas drogas anti-Tb com certa urgência (SHELKE et al., 2016).

A proteína di-hidrofolato redutase (DHFR), presente no homem e no Mtb, é uma importante enzima do ciclo do folato, responsável por catalisar a redução de di-hidrofolato (DHF) a tetrahidrofolato (THF), dependente do NADPH (dinucleotídeo reduzido da nicotinamida adenina). Tetra-hidrofolato atua como coenzima no metabolismo dos aminoácidos, na formação dos ácidos nucleicos, na conversão da serina em glicina, na metilação da homocisteína (Hcy) transformando-a em metionina e formando o nucleotídeo timidilato. Quando a DHFR é inibida, todo o suprimento de THF da célula é convertido em DHF, bloqueando todas as reações biológicas dependentes de THF, interrompendo a síntese de DNA, ocasionando a morte celular (KUMAR; VIJAYAKRISHNAN; RAO, 2010).

Existem fatores estruturais envolvidos na inibição da DHFR, podendo ser estudados por meio do método de ancoramento molecular (*docking*), do qual é possível avaliar a interação de ligantes (inibidores) no sítio de interação para entender aspectos importantes na seletividade destes compostos.

2 OBJETIVO

Temos como objetivo principal por meio desse trabalho estudar várias classes de inibidores da DHFR humana e do Mtb através da técnica de ancoramento molecular (*Docking*), buscando compostos protótipos mais seletivos, para combater a tuberculose.

Como objetivos específicos analisou-se as interações dos compostos ancorados nos sítios ativos das proteínas di-hidrofolato redutase humana (HuDHFR) e *Mycobacterium Tuberculosis* (MtbDHFR), para melhor compreensão de como o volume molecular e grupos funcionais alteram as interações.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa que afeta diferentes órgãos, principalmente os pulmões. É transmitida pelo patógeno *Mycobacterium tuberculosis*, conhecido também comumente como bacilo de Koch, nome dado pelo descobridor Dr. Robert Koch, em 1882. Um dos agravantes da doença é que o patógeno pode permanecer adormecido ou persistente dentro das células hospedeiras por um longo período, conseguindo escapar da ação do sistema imunológico (LIU et al., 2012).

Existem relatos de médicos sobre a TB na Grécia e na Roma antiga, além de existir a possibilidade que esta doença já era conhecida no antigo Egito, pois pesquisadores encontraram lesões de tuberculoses em múmias. Entre os séculos XIX e XX, era uma “doença romântica”, sendo relacionada com um estilo de vida boêmio, comum entre artistas e intelectuais (SOUZA; VASCONCELOS, 2005).

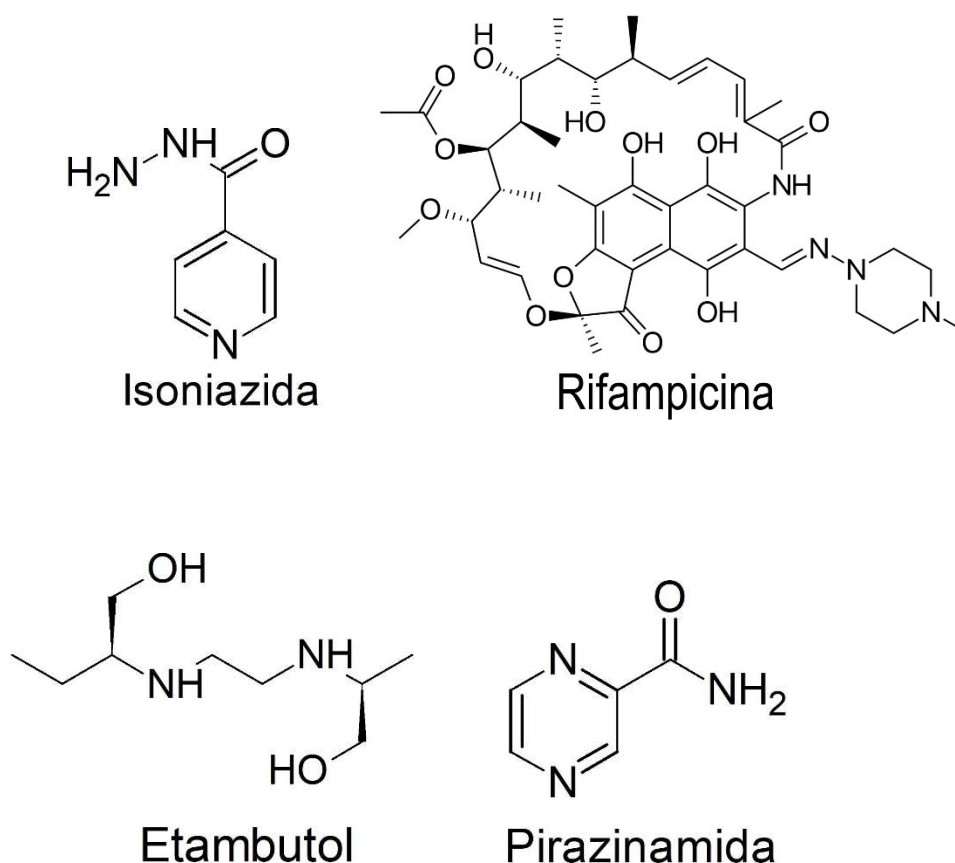
Após a primeira infecção tuberculosa, chamada de primo-infecção, cerca de 10% dos casos, as defesas imunes são vencidas e o indivíduo adoece, podendo atacar gânglios e pulmão. Quando as defesas imunes são efetivas ao deter a infecção inicial, mas a doença se desenvolve posteriormente a partir de um foco latente, ela é chamada de tuberculose de reinfeção endógena, porém se o indivíduo vir a ter uma nova infecção, será chamado de tuberculose de reinfeção exógena. Na maioria das vezes, as formas clínicas extrapulmonares ocorrem devido à disseminação dos bacilos nas correntes sanguíneas e/ou linfática, sendo mais comuns a oftálmica, sistema nervoso central, urinária, intestinal e cutânea (CAMPOS, 2006).

Um aspecto interessante é a relação entre a TB e o HIV (do inglês, *Human Immunodeficiency Virus*), onde pessoas com AIDS (do inglês, *Acquired Immunodeficiency Syndrome*) têm 20 vezes mais chance de desenvolver a TB quando comparado a uma pessoa que não possui o vírus. O número aumenta com a progressão da doença (PADMAPRIYADARSINI; NARENDRAN; SWAMINATHAN, 2011).

Os principais sintomas da tuberculose são a tosse por um período muito extenso, falta de apetite, emagrecimento, suor noturno acompanhado de febre baixa. O diagnóstico da TB é feito através do histórico de adoecimento do paciente e por exames clínicos, em sua maioria específicos, como raio-X do tórax e em casos que afetam outros órgãos a biópsia (RIBEIRO, MAYARA SEGUNDO et al, 2016).

O principal modo de prevenção da TB é por meio da vacina BCG (bacilo de Calmette-Guérin), a qual recomenda-se que seja aplicada no primeiro mês de vida, mas não é eficaz contra TB pulmonar. A tuberculose tem cura e o seu tratamento é em torno de seis meses, usando principalmente quatro fármacos, rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol (HORSBURGH; BARRY; LANGE, 2015), cujas estruturas são mostradas na Figura 1.

Figura 1 - Estruturas dos principais fármacos utilizados no tratamento da Tb



Fonte: HORSBURGH; BARRY; LANGE, 2015

O mecanismo de ação da rifampicina se dá por ligação à enzima RNA polimerase, inibindo-a e a síntese de RNA mensageiro que produz proteínas importantes para a informação genética (SINGH et al, 2017). A isoniazida atua produzindo radicais reativos de oxigênio e radicais orgânicos que inibem a formação de ácido micólico na parede celular, causando danos ao DNA e posteriormente levando a morte do bacilo (UNISSA et al, 2016). O mecanismo da pirazinamida depende da entrada da mesma de forma passiva no bacilo, sendo convertida em ácido pirazinoico pela pirazinamidase, atingindo altas concentrações no citoplasma bacteriano, com o acúmulo de ácido, levando à a diminuição do pH

intracelular a níveis que causam a inativação de enzimas (UNISSA et al, 2017). O etambutol tem seu mecanismo baseado na inibição da biossíntese da arabinogalactano, principal polissacarídeo da parede celular das microbactérias (ARBEX et al, 2010).

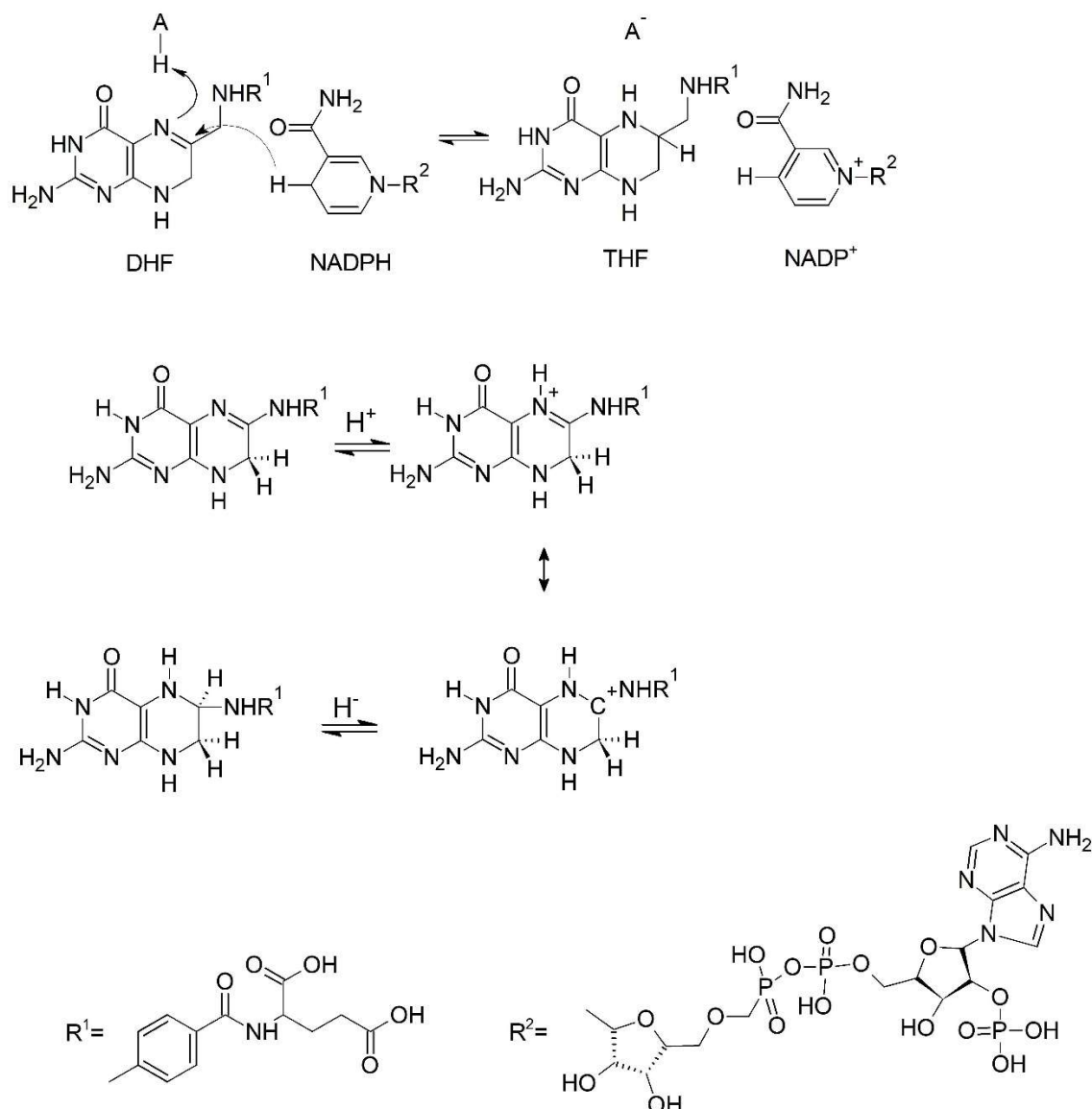
O aumento constante dos casos de TB está relacionado principalmente à pequena variedade de fármacos ativos e ao fracasso no tratamento da doença, seja por abandono da terapia ou a erros na administração dos medicamentos (RIBEIRO, MAYARA SEGUNDO et al, 2016).

3.2. Proteína di-hidrofolato redutase (DHFR)

A proteína DHFR catalisa a redução de DHF para THF dependente do NADPH, sendo o THF precursor de cofatores necessários para síntese de timidilato, nucleotídeos de purina, metionina, serina e glicina, necessária para a síntese de DNA, RNA e proteínas. A inibição da DHFR impede a síntese de DNA levando a morte celular (KUMAR; VIJAYAKRISHNAN; RAO, 2010).

O mecanismo catalítico inicia quando o NADPH e o substrato interagem com o sítio ativo da proteína DHFR, seguido pela protonação provinda de uma molécula de água e transferência de um hidreto provindo do cofator NADPH (WAN, Q. et al., 2014). O mecanismo enzimático (Figura 2) possui dependência do pH, principalmente no passo de transferência do hidreto, uma vez que a variação de pH tem influência sobre a eletrostática no sítio de ligação e o estado de ionização de seus resíduos. Onde em pH muito ácidos a reação se torna irreversível (WAN, Q. et al., 2014; LIU C. T, et al., 2014).

Figura 2 - Redução dependendo de NADPH de di-hidrofolato para tetrahidrofolato



Fonte: Adaptado de RAO et al. (2013)

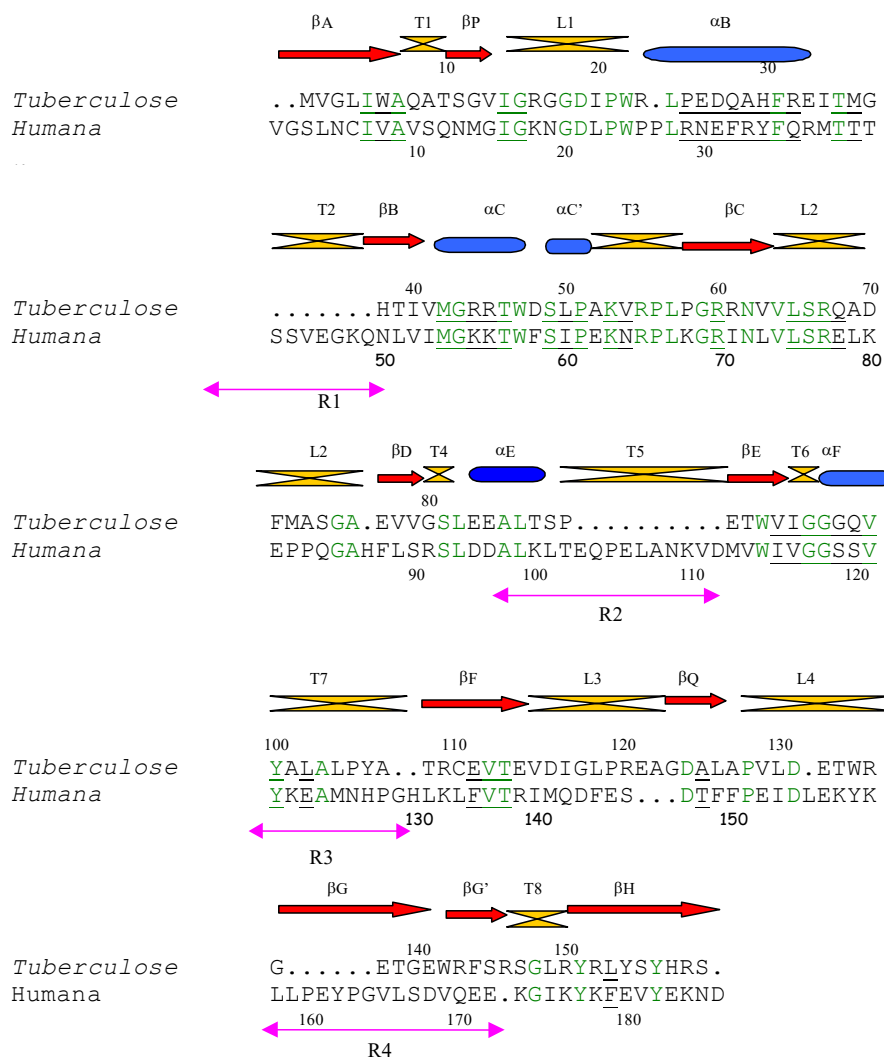
Além disso, acredita-se que o resíduo ácido conservado Asp ou Glu desempenhe alguma função crucial no mecanismo catalítico da enzima, em virtude da sua presença em todas as DHFR conhecidas, interagindo por ligações de hidrogênio com o substrato.

A proteína DHFR pode ser encontrada em células de inúmeros organismos, porém o foco deste trabalho é em células bacterianas (patógeno) tuberculosas (MtbDHFR) e humanas (Hospedeiro) (HuDHFR).

A proteína MtbDHFR possui 159 resíduos de aminoácidos, enquanto a HuDHFR possui 187 resíduos, com 26% de sequência semelhante (Figura 3). Através de uma

superposição das proteínas, mostrou-se que elas são estruturalmente similares, mesmo que a HuDHFR seja significativamente maior.

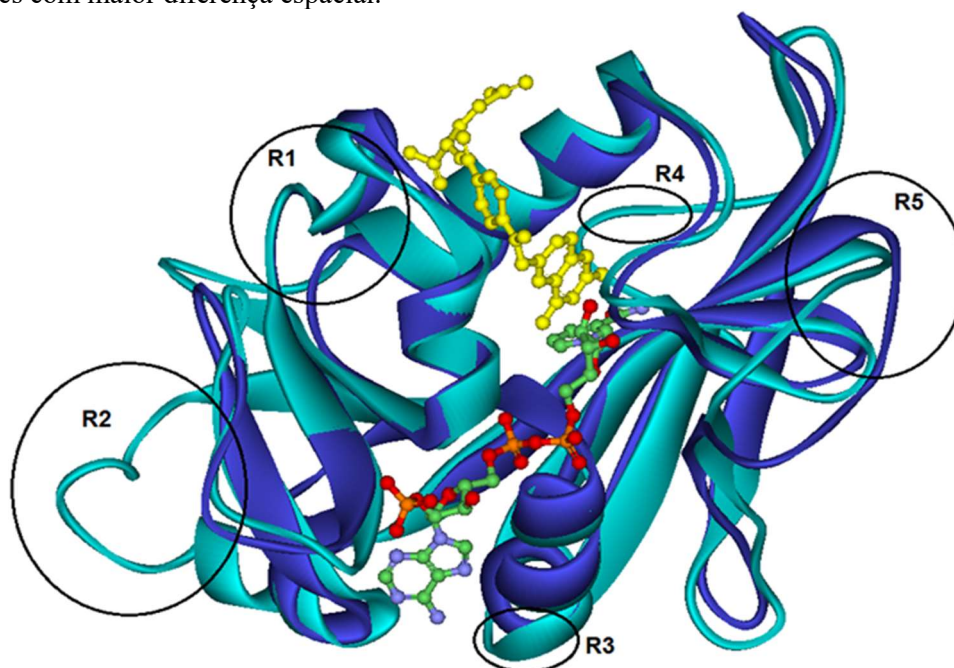
Figura 3 - Sequência de alinhamento entre HuDHFR e MtbDHFR. As hélices estão representadas em cilindros azuis e as folhas- são as setas vermelhas. Os turns e loops em laranja. Os resíduos sublinhados estão envolvidos em interações com NADPH e o inibidor. As regiões de R1 a R5 na sequência de HuDHFR comparada com a MtbDHFR em laranja.



Fonte: Elaine Fontes Ferreira da Cunha (2018)

Apesar de toda a semelhança, as proteínas possuem diferenças importantes, como por exemplo, no sítio ativo da proteína do patógeno MtbDHFR há um resíduo de Asp27 e na proteína do hospedeiro HuDHFR na mesma posição espacial, há o Glu30. As principais diferenças estruturais ocorrem em regiões externas (Figura 4), formada pelas alças ou loops. R1 apresenta uma leve curvatura por inserção de sete aminoácidos na HuDHFR; a curvatura R2 representa uma alça mais longa pela inserção de dez aminoácidos em HuDHFR.

Figura 4 – Sobreposição das duas DHFRs, entre MtbDHFR (azul) e HuDHFR (ciano). A estrutura em amarelo representa o MTX, indicando o local do sítio ativo, e a colorida é o NADPH. R1-R5 são as regiões com maior diferença espacial.



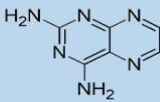
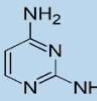
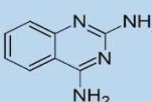
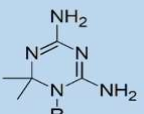
Fonte: Elaine Fontes Ferreira da Cunha (2018).

Essas diferenças entre o patógeno e o hospedeiro, trazem possibilidade de novas pesquisas em buscas de inibidores mais seletivos para a inibição do patógeno (LI, R. et al.; 2000; EL-HAMAMS et al., 2007).

3.3. Inibição da DHFR

As quatro maiores classes de inibidores da DHFR incluem diaminopteridinas, diaminopirimidinas, diaminoquinazolininas e di-hidrodiaminotroazininas. Algumas características estão descritas na Figura 5 (CHANDRASHEKHAR et al., 2016).

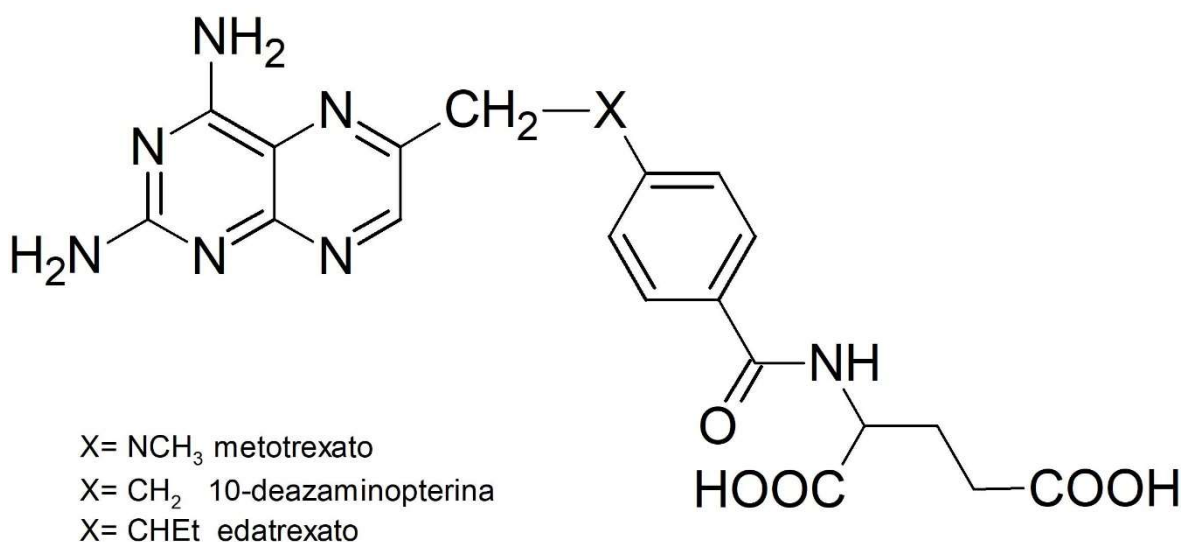
Figura 5 - As quatro principais classes de inibidores DHFR e algumas de suas características.

Inibidores DHFR	Classe de inibidores	Usos iniciais	Usos pretendidos
		Diaminopteridina	Anticâncer
	Diaminopirimidina	Antibacteriana	Anti-inflamatório, anti-infeccioso e imunossupressor
	Diaminoquinazolina	Anticâncer e anti-infeccioso	Anti-infeccioso e tratamento de atrofia muscular espinhal
	Diaminohidrotiazina	Antimalarial	Anti-infeccioso, antiepilético e antiproliferativo

Fonte: Adaptado de CHANDRASHEKHAR et al. (2016).

A primeira classe é das diaminopteridinas (Figura 6), tendo como principais exemplos, o metotrexato (MTX) e a aminopterina. O MTX é o inibidor mais conhecido do DHFR ligando-se ambas as proteínas MtbDHFR e HuDHFR com uma seletividade pela MtbDHFR (PIPER, et al., 1997).

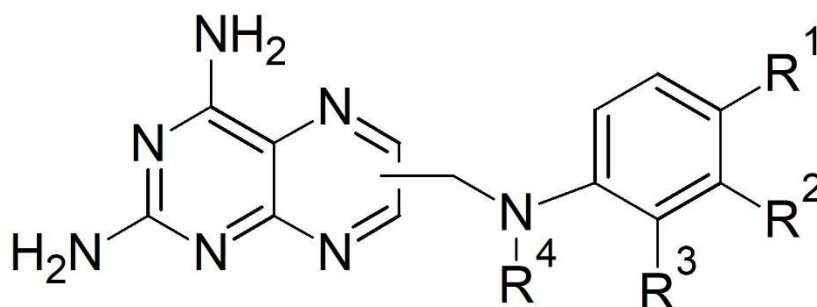
Figura 6 - Estrutura geral das diaminopteridinas.



Fonte: PIPER et al (1997).

Novos padrões de diaminopteridinas modificadas de foram propostos por Coish *et al.* (2010), patente WO2010110907A1, baseando-se em mono ou di-diaminopteridinas substituídas como demonstrado na Figura 7, sendo úteis sozinhos ou em combinação com agentes antibacterianos, conhecidos em vários tratamentos de infecções bacterianas como, antissépticos, agentes esterilizantes e desinfetantes.

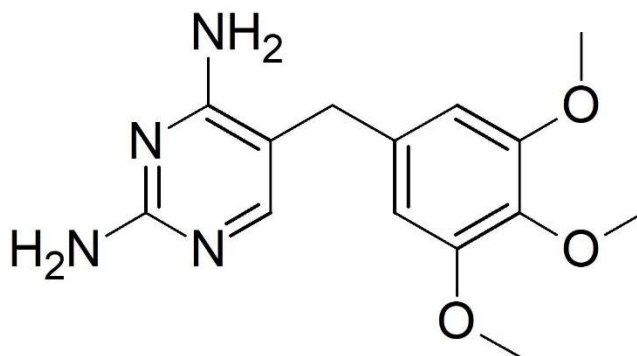
Figura 7 - Estrutura geral de mono ou di-diaminopteridinas substituídas.



Fonte: COISH *et al.* (2010).

A segunda classe de inibidores é a diaminopirimidinas, tendo como exemplo o primeiro composto desenvolvido, o trimetoprim, um agente antibacteriano (BUSHBY; HITCHINGS, 1968), cuja estrutura é mostrada na Figura 8.

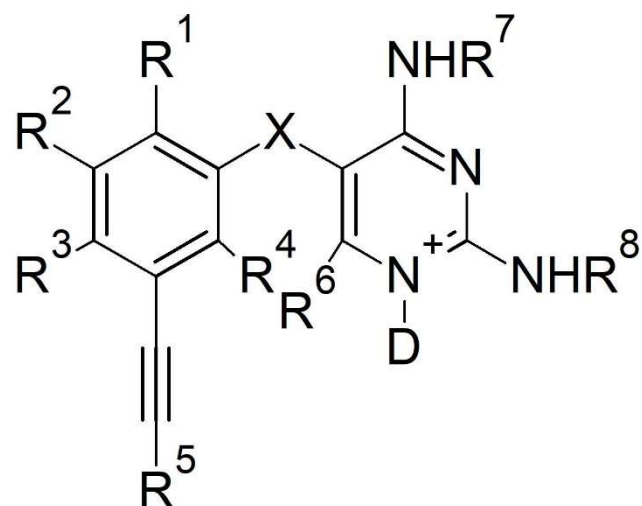
Figura 8 - Estrutura do trimetoprim.



Fonte: BUSHBY; HITCHINGS (1968).

Uma nova classe geral de estruturas modificadas de diaminopirimidinas foi proposta por Dillon *et al.* (2007), sendo poderosas no tratamento de doenças urinárias, respiratórias, gastrointestinais e dores condicionais. Sua estrutura geral é apresentada na Figura 9.

Figura 9 - Estrutura geral da nova classe de estruturas modificadas.

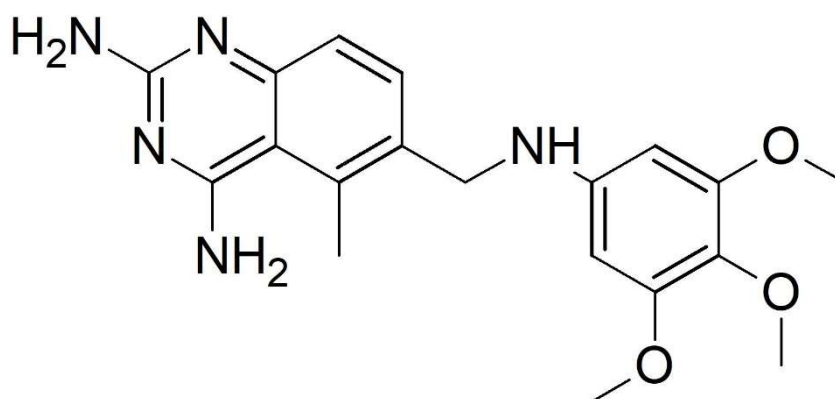


X= -CH₂-; -O-; -S(O)_n- ou -NR-
D= Oxigênio opcional

Fonte: DILLON (2007).

A terceira classe de inibidores é a diaminoprimidopiridina, tendo como exemplo, o primeiro composto descoberto, o trimetrexato, sendo usado inicialmente no tratamento de pneumonia e câncer (ROSOWSKY; MOTA; QUEENER, 1995). Sua estrutura é apresentada na Figura 10.

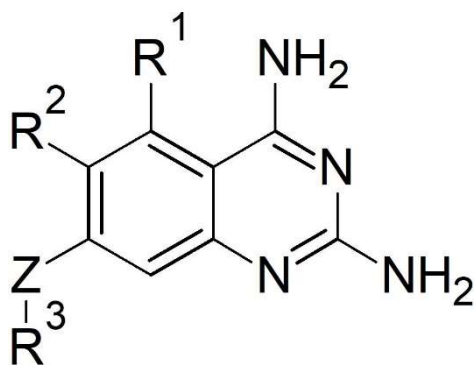
Figura 10 - Estrutura da trimetotrexato.



Fonte: ROSOWSKY; MOTA; QUEENER (1995).

Uma nova classe geral de estruturas modificadas de diaminoprimidopiridina, foi proposta por Chen *et al.* (2011) para inibição da enzima DHFR. Os compostos são ativos contra uma vasta gama de bactérias. Sua estrutura geral é apresentada na Figura 11.

Figura 11 - Estrutura geral da enzima DHFR.

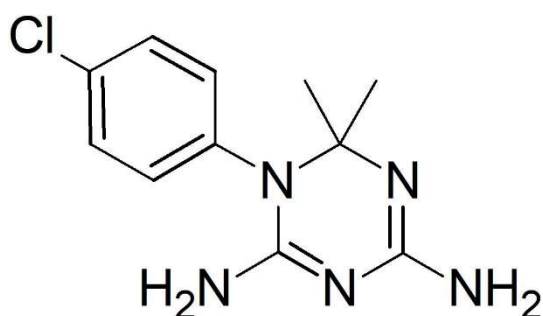


Z= arila ou heteroarila

Fonte: CHEN (2011).

A quarta classe de inibidores é a diaminodihidrotriazina, tendo como exemplo, o primeiro composto descoberto, o cicloguanil, usado com agente antimalárico, além de ser um potente inibidor DHFR parasítico (CARRINGTON et. al., 1952). Sua estrutura é apresentada na Figura 12.

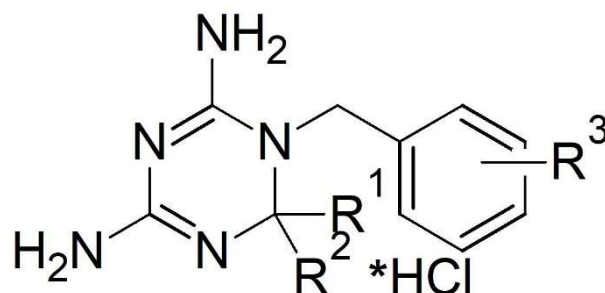
Figura 12 - Estrutura do cicloguanil.



Fonte: CARRINGTON et. al., (1952).

Uma nova classe geral de estruturas modificadas de diaminodihidrotriazina foi proposta por Ma *et al.* (2011), o qual pesquisou derivados N1 benzil ou Benziloxi diaminodihidrotriazina, como agentes antimicrobianos. Testes foram feitos com as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium smegmatis* que apresentaram sensibilidade por alguns compostos. Sua estrutura geral é apresentada na Figura 13.

Figura 13 - Estrutura geral de N1 benzil ou Benziloxi diaminodihidrotriazin.



Fonte: Ma et. al. (2011).

3.4. Técnicas Computacionais

A Química Medicinal engloba principalmente o planejamento racional de novos compostos bioativos, envolvendo a síntese e modificação molecular de substâncias, o isolamento de princípios ativos naturais, a compreensão em nível molecular de processos bioquímicos/farmacológicos, toxicológicos e farmacocinéticos (AMARAL; MONTANARI, 2002).

A combinação de programas computacionais de química e de bancos de dados em rede são ferramentas elementares para a descoberta e planejamento de fármacos. Estas informações permitem uma investigação das interações entre ligante e receptor, elucidação de mecanismos de reação, assim como, a relação entre a estrutura química e atividade biológica (CARVALHO et al., 2003).

3.4.1. Ancoramento molecular (*Docking*)

Para entender o mecanismo de interação de um fármaco, é essencial saber o posicionamento tridimensional para a sua interação molecular com a macromolécula alvo. Uma das confirmações estruturais mais confiáveis é obtida por análise de raios-X ou ressonância de cristais do complexo, mas não é fácil obter dados experimentais de todos os compostos de interesse. O ancoramento molecular é uma técnica computacional criada para ajudar a investigar as interações moleculares (DE OLIVEIRA, R. G.; ALENCAR-FILHO, E. B.; VASCONCELLOS, M. L., 2014).

Este processo, conhecido mais comumente como *Docking molecular*, ou também como ancoramento ou atracamento molecular, envolve a predição da conformação do ligante dentro do sítio de interação da proteína. Esta se dá através de cálculos de energia dos

complexos gerados. A hipótese geral é que, valores mais baixos de energia representam melhores interações entre proteína-ligante em comparação com valores mais elevados de energia (THONSEN; CHRISTENSEN, 2006).

No entanto, para encontrar a estrutura do complexo proteína-ligante mais estável é necessário analisar todos os modos de interação, considerando a flexibilidade conformacional do ligante e da proteína. (MIZUTANI et al., 1994).

Para o desenvolvimento deste trabalho o software de ancoramento Molegro Virtual Docker (MDV) foi utilizado. Os valores da função do desempenho do ancoramento (*Docking Scoring Function*), E_{score} , são definidos pela Equação 1:

$$E_{score} = E_{inter} + E_{intra} \quad \text{Equação 1}$$

Em que, o termo E_{inter} , corresponde à energia de interação ligante-proteína, definido de acordo com a Equação 2

$$E_{inter} = \sum_{i \in \text{ligante}} \sum_{j \in \text{proteína}} \left[E_{PLP}(r_{ij}) + 332.0 \frac{q_i q_j}{4r_{ij}^2} \right] \quad \text{Equação 2}$$

O primeiro termo representado na Equação 2 (E_{PLP}) é referente à energia potencial do inibidor, sendo usado dois conjuntos diferentes de parâmetros: um para a aproximação do termo estérico (van der Waals) entre átomos, e outro potencial para a ligação de hidrogênio. O segundo termo descreve as interações eletrostáticas entre átomos carregados, sendo um potencial de Coulomb com uma constante dielétrica dependente da distância ($D(r) = 4r$). O valor numérico de 332,0 fixa as unidades de energia eletrostática para kcal mol^{-1} .

O termo E_{intra} corresponde a energia interna do ligante é definido de acordo com a Equação 3:

$$E_{intra} = \sum_{i \in \text{ligante}} \sum_{j \in \text{ligante}} E_{PLP}(r_{ij}) + \sum_{\text{ligações flexíveis}} A[1 - \cos(m \cdot \theta - \theta_0)] + E_{penalizada} \quad \text{Equação 3}$$

As duas primeiras somatórias referem-se a todos os pares de átomos do ligante excluindo os pares de átomos que estão conectados por duas ligações. O segundo termo é a energia de torção, em que θ é o ângulo de torção da ligação. A média da contribuição de torção da ligação da energia é usada se várias torções são determinadas. O último termo, $E_{penalizada}$, designa uma penalidade de 1.000 se a distância entre dois átomos pesados (mais de duas ligações distantes) for menor que 2,0 Å, punindo conformações inexistentes do ligante. (RAMALHO et al., 2009; THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

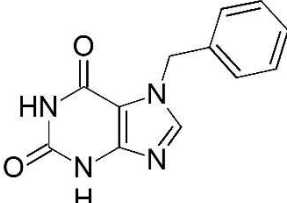
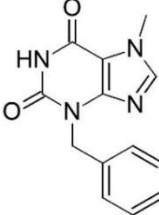
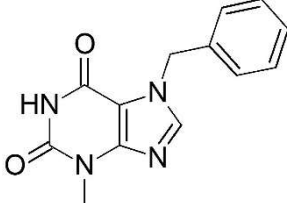
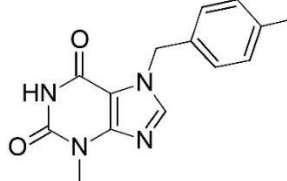
Os ligantes mudam sua conformação à medida que se acopla ao sitio ativo da proteína. Mudanças de conformações também ocorrem no receptor quando induzidas pelo ligante, assim é importante também considerar a flexibilidade da proteína (ASSIS, 2013).

4 METODOLOGIA

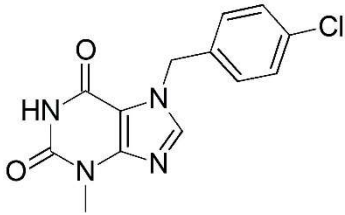
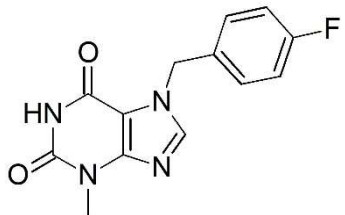
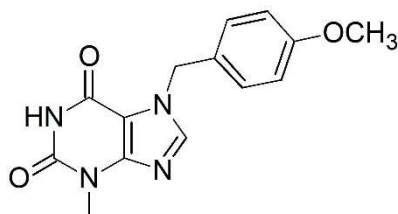
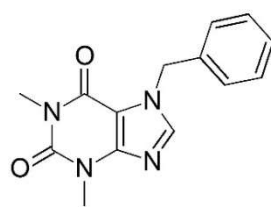
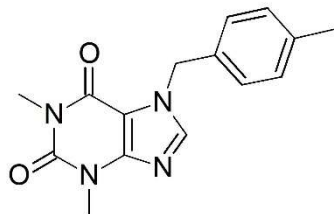
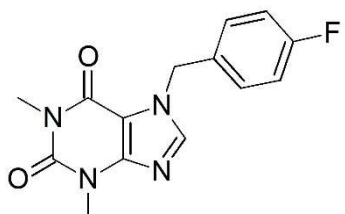
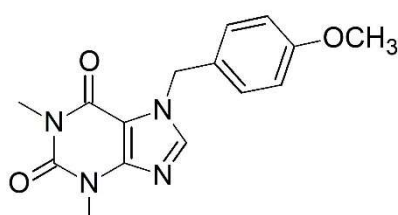
4.1. Dados biológicos

As tabelas a seguir mostram as estruturas de inibidores já conhecidos (MTX e 51P), e dos potenciais inibidores seletivos da MtbDHFR e HuDHFR e seus respectivos valores da concentração necessária para inibir 50% da proteína (IC_{50}). Foi utilizado o pIC_{50} ($-\log IC_{50}$), para melhor compreensão. Onde maiores valores, tem maior capacidade inibitória. Os compostos foram sintetizados e avaliados farmacologicamente por SHELK et al (2016) e HAIJAN et al (2016). Esses compostos foram selecionados, pois em estudo prévio experimental, eles apresentaram atividade inibitória com a proteína DHFR.

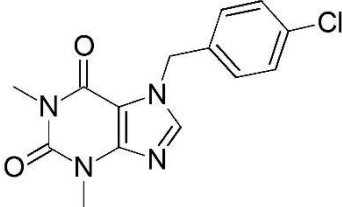

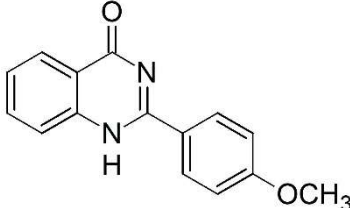
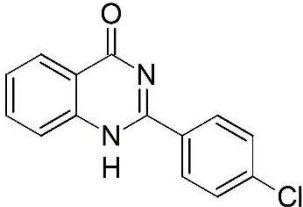
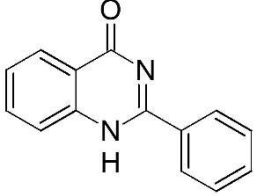
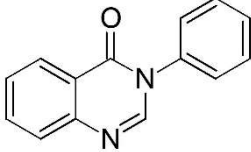

Tabela 1 - Estruturas dos potenciais inibidores seletivos e suas respectivas atividades biológicas SHELK et al. (2016).

Nome	Estrutura	pIC_{50} (MtbDHFR (M))
2b		4,41
2c		4,11
2d		4,26
2e		4,06

“Tabela 1, continuação”

Nome	Estrutura	pIC ₅₀ (MtbDHFR (M))
2f		4,31
2g		4,14
2h		4,19
2i		4,30
2j		4,27
2k		4,04
2l		4,38

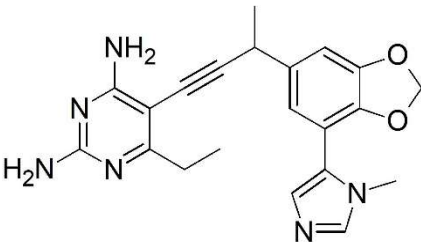
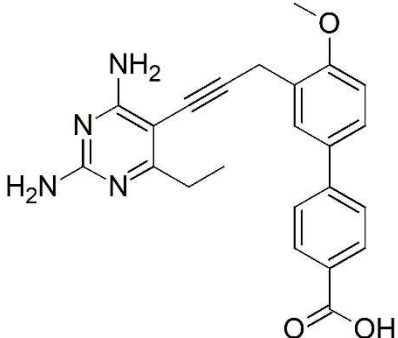
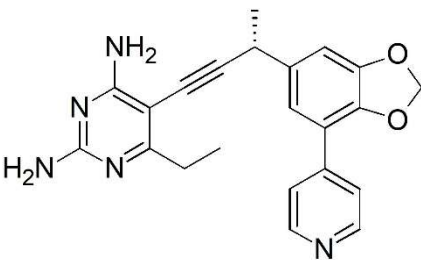
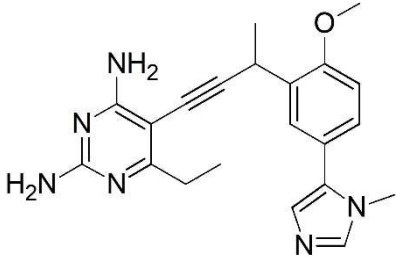
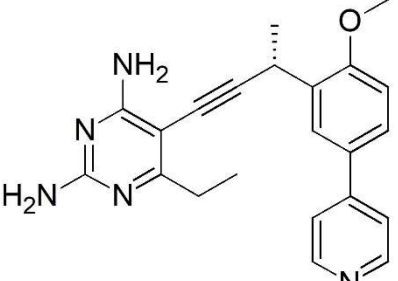
“Tabela 1, continuação”

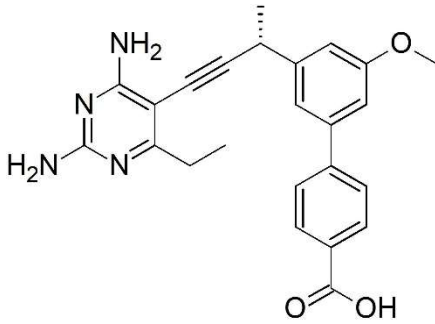
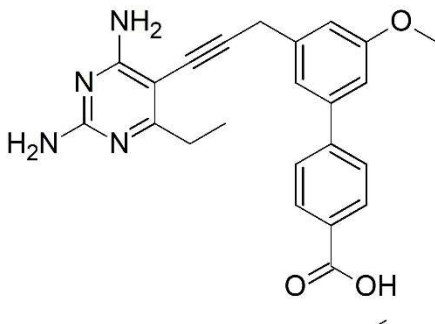
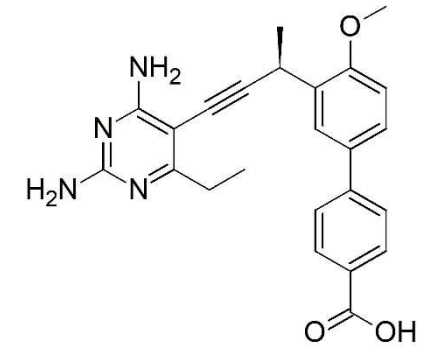
Nome	Estrutura	pIC ₅₀ vs. (MtbDHFR (M))
2m		4,39
3a		4,38
3b		4,30
3c		4,18
3d		4,29
3e		4,15
4		ND

Fonte: SHELK et al. (2016)

“Tabela 1, conclusão”

Tabela 2 - Estruturas dos potenciais inibidores seletivos e suas respectivas atividades biológicas (HAJIAN. et al., 2016).

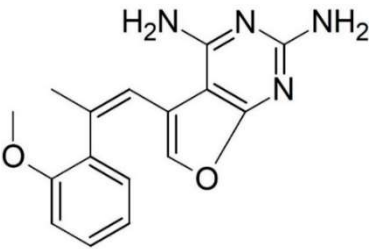
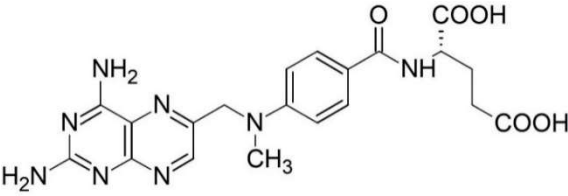
Composto	Estrutura	MtbDHFR (pIC ₅₀ (M))	HuDHFR (pIC ₅₀ (M))
UCP1102		6,48	6,49
UCP1106		6,76	6,06
UCP1098		6,68	5,53
UCP1084		6,89	5,83
UCP1063		7,13	6,84

Composto	Estrutura	MtbDHFR (pIC ₅₀ (M))	HuDHFR (pIC ₅₀ (M))
UCP1172		6,75	5,99
UCP1175		6,33	6,12
UCP1164		6,95	5,70

Fonte: HAJIAN. et al. (2016).

“Tabela 2, conclusão”

Tabela 3 - Estruturas de inibidores já conhecidos MTX e TMP.

Composto	Estrutura
51P	
MTX	

Fonte: Protein Data Bank, código:1DF7 (2000); 3GYF (2009).

4.2. Ancoramento molecular

Para o estudo de ancoramento molecular utilizou-se a estrutura tridimensional (3D) da proteína MtbDHFR obtida por difração de raio-X, disponível no *Protein Data Bank* (PDB) sob o código 1DF7, com resolução de 1.70 Å. Essa estrutura está complexada com o inibidor MTX. A estrutura tridimensional (3D) da proteína HuDHFR foi obtida por difração de raio-X, no mesmo banco de dados, sob o código 3GYF, com resolução de 1.70 Å. Essa estrutura está complexada com o inibidor 5-[(1Z)-2-(2-methoxyphenyl)prop-1-en-1-yl]furo[2,3-d]pyrimidine-2,4-diamine (51P). Os átomos de hidrogênio foram adicionados à estrutura do complexo. O sistema foi minimizado utilizando o Software Accelrys Discovery Studio 2.1. seguindo os seguintes passos para relaxar a proteína:

- i) Usando-se o algoritmo *steepest descente* (ST) seguido do *conjugate gradiente* (CG), mantendo-se fixos todos os átomos pesados, até a norma de gradiente de 0,1 kcal mol⁻¹Å.

- ii) Cadeia principal fixa e cadeias laterais parcialmente livres até o gradiente de $0,1 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}$ usando CG;
- iii) Cadeia principal fixa e cadeias laterais livres até o gradiente de $0,01 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}$ usando CG;
- iv) Todo o complexo livre até o gradiente $0,1 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}$ usando CG;

O campo de força AMBER foi utilizado nesta etapa.

As estruturas 3D dos potenciais inibidores foram construídas no software Accelrys Discovery Studio 2.1. e suas cargas parciais calculadas através do método *ab initio* teoria do funcional da densidade pelo Software Gaussian 09. Utilizando o método wb97xd/6-31g.

Após a construção dos ligantes foi preparado o *workspace* no programa Molegro Virtual Docking (MVD), onde a proteína foi inserida e preparada, para a detecção de cavidades. Os resíduos de aminoácidos em um raio de 6 \AA da cavidade foram considerados flexíveis, pois contempla os aminoácidos do sítio ativo e fixado o número de 40 poses para cada composto,

O ancoramento dos inibidores foi realizado para determinar as conformações energeticamente mais favoráveis entre proteína e ligante. A estrutura do MTX será utilizada como modelo (*template*) para a proteína MtbDHFR e 51P para a proteína HuDHFR durante a realização dos cálculos de ancoramento.

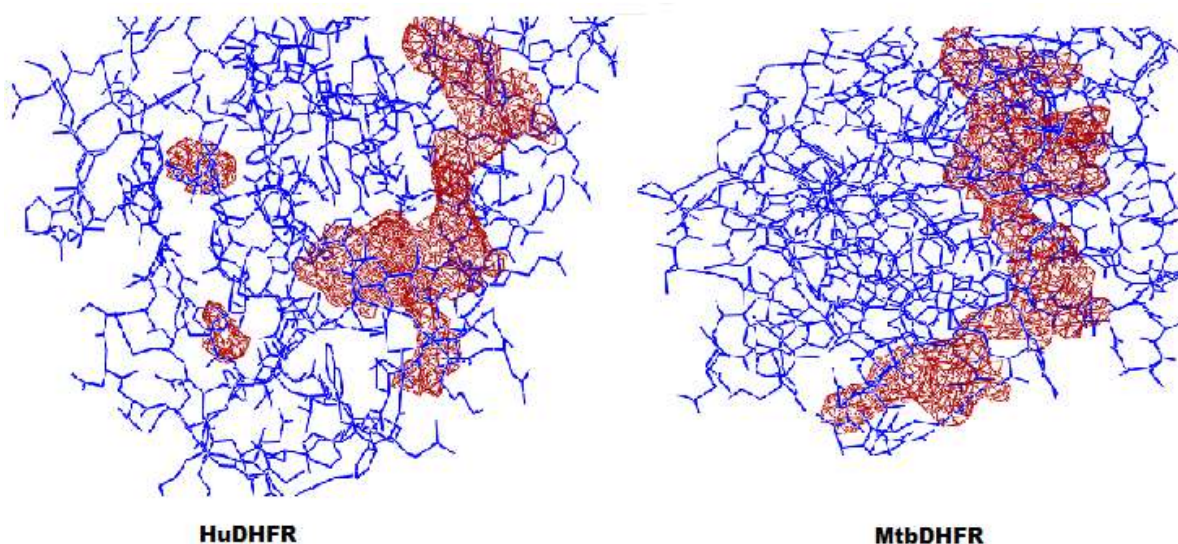
Uma enzima mutante (Y100F) foi criada, onde trocou-se um resíduo de tirosina por fenilalanina no sítio ativo da proteína MtbDHFR do patógeno. Os inibidores foram ancorados no sítio ativo da mutante seguindo o mesmo procedimento da nativa. Isto foi feito para melhor compreensão de possíveis efeitos estéricos presentes no sítio ativo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Estudos do ancoramento molecular

Neste estudo, encontrou-se apenas uma cavidade na proteína MtbDHFR com um volume de $354,304\text{\AA}^3$. Para a proteína HuDHFR foram encontradas 3 cavidades com o volume de 12,288, 14,848 e $322,048\text{\AA}^3$, permanecendo apenas a de maior volume. As duas proteínas apresentam sítios de ligação com volumes bem similares, porém formatos superficiais diferentes. Os volumes das cavidades das proteínas são mostrados na figura 14.

Figura 14 - Cavidades obtidas das proteínas HuDHFR e MtbDHFR.



Fonte: Do autor (2018).

A melhor conformação de cada composto foi selecionada, utilizando os inibidores já conhecidos como modelos: MTX para MtbDHFR e 51P para HuDHFR. Os parâmetros MolDock Score, energia intermolecular e de ligação de hidrogênio foram calculados e apresentados na tabela 4, 5 e 6 para os compostos desenvolvidos por SHELKE et al. (2016) e os compostos desenvolvidos por HAIJAN et al. (2016) estão apresentados nas Tabelas 7, 8 e 9. Onde foi feita uma relação entre MtbDHFR/HuDHFR em cada parâmetro calculado para visualizar melhor a seletividade pela MtbDHFR.

Tabela 4 - Valores de MolDock Score (kcal mol^{-1}), para os compostos, desenvolvidos por SHELKE e colaboradores, ancorados nas proteínas MtbDHFR e HuDHFR.

Compostos	MolDock Score		
	MtbDHFR	HuDHFR	MtbDHFR/HuDHFR
MTX	-166,10	-184,24	0,902
51P	-148,49	-149,41	0,994
2b	-112,99	-118,49	0,954
2c	-100,51	-105,73	0,951
2d	-117,65	-106,15	1,108
2e	-102,96	-107,20	0,960
2f	-120,82	-120,51	1,003
2g	-120,85	-107,87	1,120
2h	-109,49	-131,47	0,833
2i	-91,436	-109,93	0,832
2j	-108,97	-113,42	0,961
2k	-97,248	-118,86	0,818
2l	-103,37	-120,64	0,857
2m	-92,679	-108,83	0,852
3a	-75,682	-77,080	0,982
3b	-78,157	-88,182	0,886
3c	-85,322	-98,742	0,864
3d	-94,030	-99,740	0,943
3e	-81,968	-95,327	0,860
4	-71,782	-67,008	1,071

Fonte: Do autor (2018).

Tabela 5 - Valores de energia intermolecular (kcal mol^{-1}) para os compostos, desenvolvidos por SHELKE e colaborados, ancorados nas proteínas MtbDHFR e HuDHFR.

Compostos	Energia intermolecular		
	MtbDHFR	HuDhFR	MtbDHFR/HuDhFR
MTX	-183,53	-201,44	0,911
51P	-150,28	-151,21	0,994
2b	-117,97	-124,69	0,946
2c	-105,59	-111,17	0,950
2d	-126,49	-113,22	1,117
2e	-109,37	-115,09	0,950
2f	-128,35	-128,20	1,001
2g	-129,01	-115,35	1,118
2h	-117,42	-140,46	0,836
2i	-106,88	-123,45	0,866
2j	-119,66	-127,95	0,935
2k	-108,16	-129,65	0,834
2l	-112,43	-132,84	0,846
2m	-106,31	-119,68	0,888
3a	-87,065	-88,463	0,984
3b	-90,236	-102,12	0,884
3c	-97,891	-111,31	0,879
3d	-111,71	-114,41	0,976
3e	-97,281	-111,15	0,875
4	-83,660	-78,886	1,061

Fonte: Do autor (2018)

Tabela 6 - Valores de ligação de hidrogênio (kcal mol⁻¹), para os compostos, desenvolvidos por SHELKE e colaboradores, ancorados nas proteínas MtbDHFR e HuDHFR.

Ligação de hidrogênio			
Compostos	MtbDHFR	HuDHFR	MtbDHFR/HuDHFR
MTX	-9,675	-4,233	2,286
51P	-3,568	-7,207	0,495
2b	-4,245	-2,500	1,698
2c	-3,579	-2,102	1,703
2d	-4,774	-2,887	1,654
2e	-2,247	-1,622	1,385
2f	-4,776	-2,500	1,910
2g	-4,731	-2,981	1,587
2h	-2,635	-2,500	1,054
2i	-1,994	0	-
2j	0	-1,252	-
2k	-2,581	0	-
2l	-1,998	-1,485	1,345
2m	-2,500	-0,118	21,19
3a	-2,500	-1,930	1,295
3b	-3,585	-3,018	1,188
3c	-1,622	0	-
3d	-1,643	-1,055	1,557
3e	-3,519	-0,152	23,15
4	-4,763	-2,500	1,905

Fonte: Do autor (2018).

Tabela 7 - Valores de MolDock Score (kcal mol^{-1}), para os compostos, desenvolvidos por HAJIAN e colaboradores, ancorados nas proteínas MtbDHFR e HuDHFR.

MolDock Score			
Compostos	MtbDHFR	HuDHFR	MtbDHFR/HuDHFR
MTX	-166,10	-184,24	0,902
51P	-148,49	-149,41	0,994
UCP1102	-175,04	-174,57	1,003
UCP1106	-137,73	-108,64	1,268
UCP1098	-166,80	-155,32	1,074
UCP1084	-168,87	-161,15	1,048
UCP1063	-152,22	-165,88	0,918
UCP1172	-158,95	-167,01	0,952
UCP1175	-156,14	-141,20	1,106
UCP1164	-145,76	-146,34	0,996

Fonte: Do autor (2018).

Tabela 8 - Valores de energia intermolecular (kcal mol^{-1}) para os compostos, desenvolvidos por HAJIAN et al., ancorados nas proteínas MtbDHFR e HuDHFR.

Energia Intermolecular			
Compostos	MtbDHFR	HuDHFR	MtbDHFR/HuDHFR
MTX	-183,53	-201,44	0,911
51P	-150,28	-151,21	0,994
UCP1102	-165,46	-166,07	0,996
UCP1106	-139,99	-114,55	1,222
UCP1098	-170,17	-155,48	1,094
UCP1084	-160,60	-159,38	1,008
UCP1063	-151,05	-168,52	0,896
UCP1172	-158,53	-166,91	0,950
UCP1175	-158,34	-143,90	1,100
UCP1164	-141,98	-146,49	0,969

Fonte: Do autor (2018).

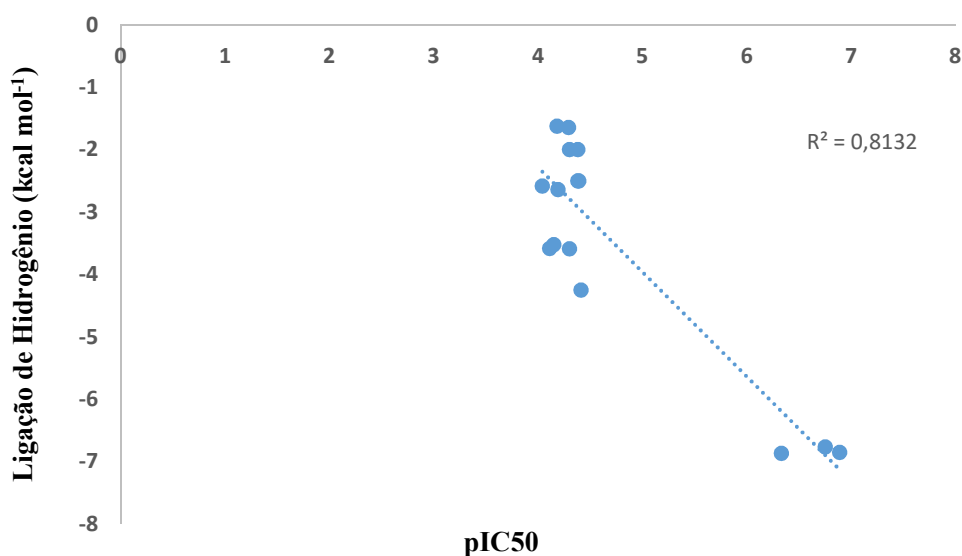
Tabela 9 - Valores de ligação de hidrogênio (kcal mol^{-1}), para os compostos, desenvolvidos por HAJIAN e colaboradores, ancorados nas proteínas MtbDHFR e HuDHFR.

Ligação de Hidrogênio			
Compostos	MtbDHFR	HuDHFR	MtbDHFR/HuDHFR
MTX	-9,675	-4,233	2,286
51P	-3,568	-7,207	0,495
UCP1102	-3,520	-4,742	0,742
UCP1106	-2,030	-3,735	0,544
UCP1098	-3,653	-2,500	1,461
UCP1084	-6,848	-2,413	2,837
UCP1063	-5,104	-4,940	1,033
UCP1172	-6,758	-5,924	1,141
UCP1175	-6,861	-4,293	1,598
UCP1164	-3,784	-5,000	0,765

Fonte: Do autor (2018).

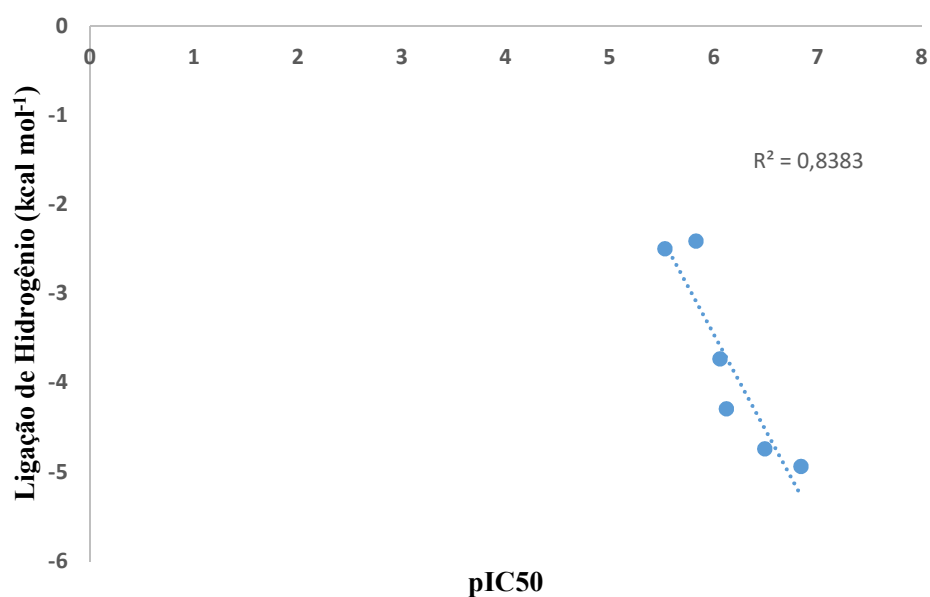
A calibração de predição do modelo de interação dos compostos com o sitio ativo da proteína, foi feita selecionando compostos com atividade (pIC_{50}) de valores baixos, médios e altos e comparando (figura 15 e 16) com os dados cálculos de ligação de hidrogênio.

Figura 15 - Distribuição de valores de pIC_{50} experimental versus Ligação de Hidrogênio (kcal mol^{-1}), dos compostos desenvolvidos por HAJIAN et al (2016) e SHELKE et al (2016). Quando ancorados a proteína MtbDHFR.



Fonte: Do autor (2018).

Figura 16 - Distribuição de valores de pIC50 experimental *versus* Ligação de Hidrogênio (kcal mol⁻¹), dos compostos desenvolvidos por HAJIAN et al (2016). Quando ancorados a proteína HuDHFR.



Fonte: Do autor (2018).

Analisando os gráficos é possível observar uma tendência entre a atividade dos compostos com as ligações de hidrogênio. Onde compostos com maior atividade, tem maior capacidade de inibição da proteína, sendo a inibição causado por interações entre os compostos e o sitio ativo das proteínas.

Analisando os resultados obtidos através dos estudos de ancoramento molecular, foi possível constatar que, houveram variações significativas em relação a MoldockScore e energia intermolecular, para uma melhor compreensão sobre as estruturas, será analisado a as maiores variações de MoldockScore e energia intermolecular. O composto **UCP1106** apresentou valores mais negativos quando ancorado a proteína MtbDHFR do que a HuDHFR, já o composto **2k** apresentou valores mais negativos quando ancorado ao HuDHFR do que na MtbDHFR (Tabela 10).

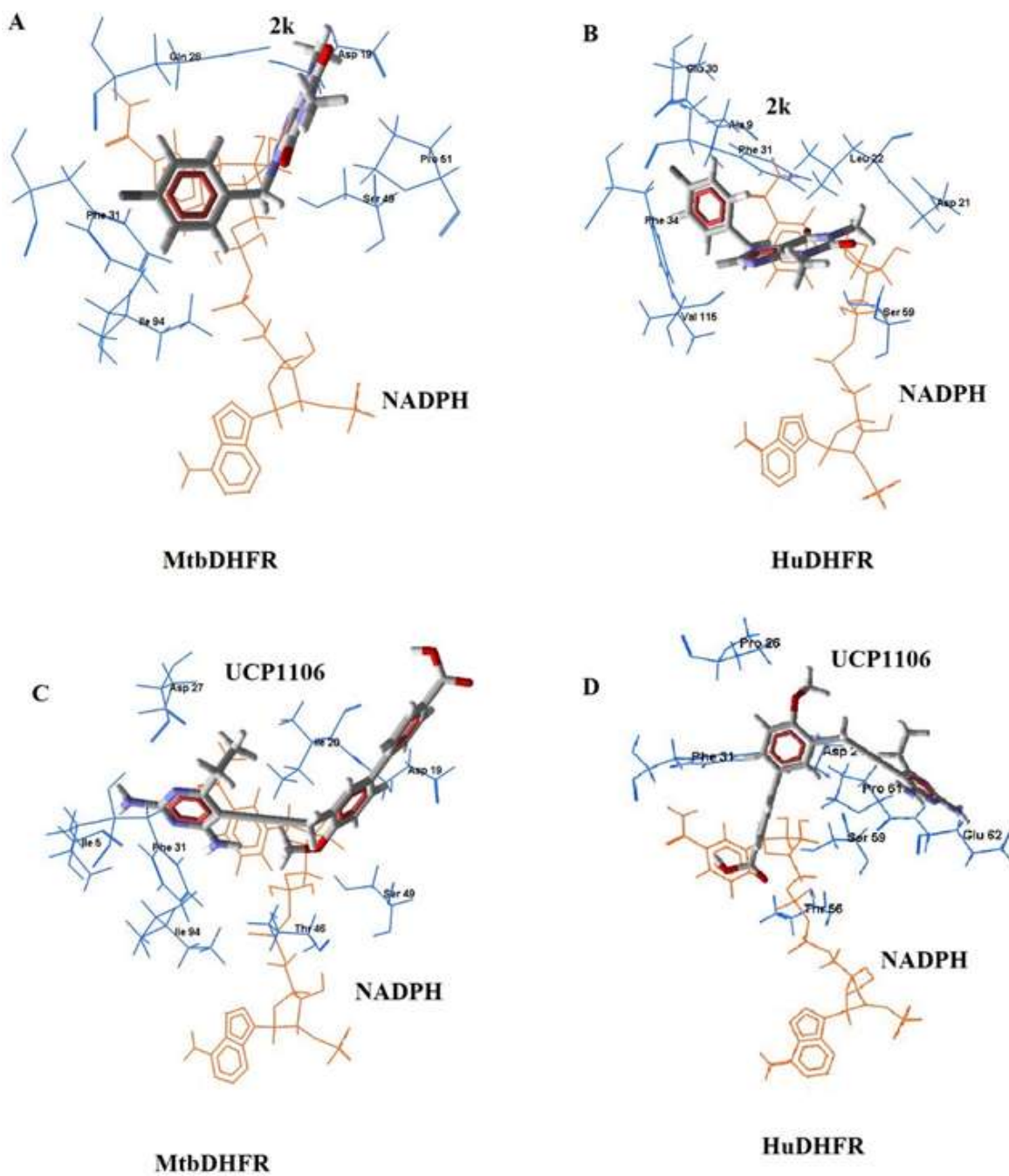
Tabela 10 - Valores de Moldock Score (kcal mol^{-1}) e Energia Intermolecular (kcal mol^{-1}) para os compostos **2k** e **UCP1106**

MoldockScore			
COMPOSTO	MtbDHFR	HuDHFR	MtbDHFR/HuDHFR
2k	-97,248	-118,86	0,818
UCP1106	-137,73	-108,64	1,268
Energia Intermolecular			
COMPOSTO	MtbDHFR	HuDHFR	MtbDHFR/HuDHFR
2k	-108,16	-129,65	0,834
UCP1106	-139,99	-114,55	1,222

Fonte: Do autor (2018).

Pode-se observar como os compostos (Figura 17) **2k** e **UCP1106** se comportaram no sítio ativo das proteínas MtbDHFR e HuDHFR, como as proteínas não apresentam os mesmos resíduos no sítio ativo, as interações entre os resíduos e os compostos, ou até mesmo com o cofator NADPH podem ocorrer de maneira diferente e influenciar na estabilidade do composto.

Figura 17 - Ancoramento das conformações dos compostos no sítio das proteínas MtbDHFR e HuDHFR. (A)2k:MtbDHFR, (B)2k:HuDHFR, (C)UCP1106:MtbDHFR e (D)3UCP1106:HuDHFR.



Fonte: Do autor (2018).

Analisando as variações com relação a ligação de hidrogênio, onde é mostrado interações entre a conformação e resíduos presentes no sítio ativo da proteína, alguns

compostos mostraram maior interação com a MtbDHFR quando comparada a HuDHFR. São os compostos **2i**, **2k**, **2m**, **3e** e **UCP1084** (Tabela 11).

Tabela 11 - Valores de Ligação de hidrogênio (kcal mol⁻¹) para os compostos **2i**, **2k**, **3e** e **UCP1084**.

COMPOSTOS	Ligação de Hidrogênio		
	MtbDHFR	HuDHFR	MtbDHFR/HuDHFR
2i	-1,994	0	-
2k	-2,581	0	-
2m	-2,500	-0,118	21,19
3e	-3,519	-0,152	23,15
UCP1084	-6,848	-2,413	2,837

Fonte: Do autor (2018).

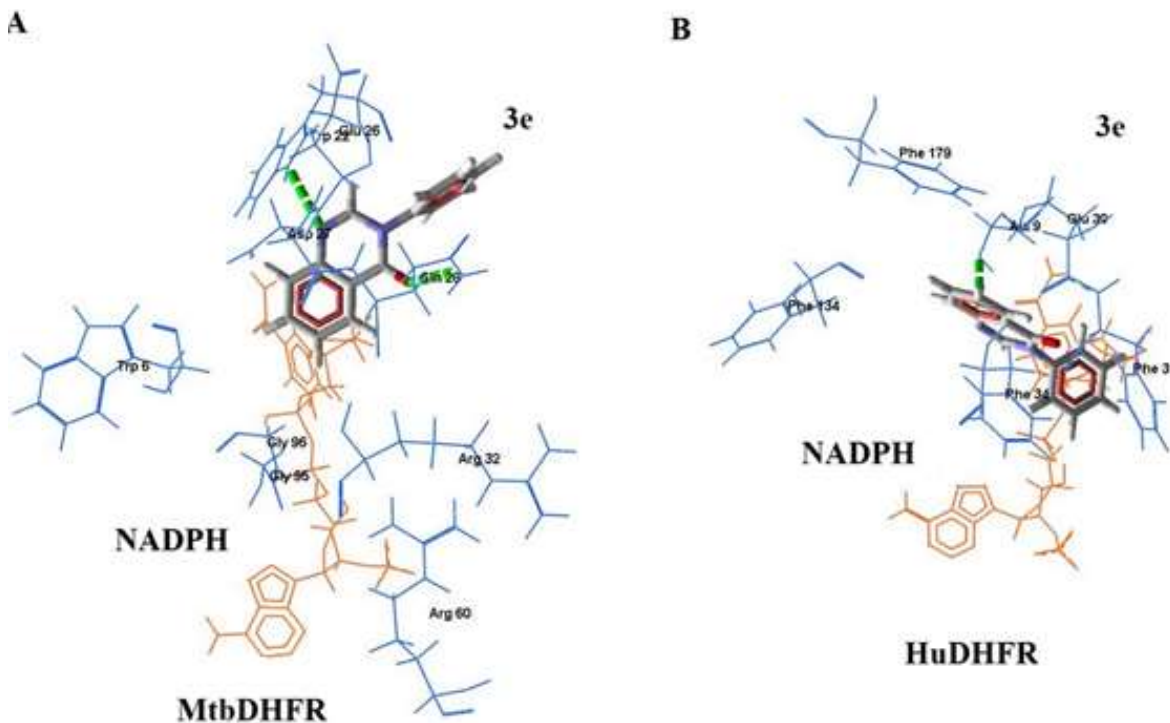
Posteriormente foi analisado as estruturas ancoradas no sitio ativos das proteínas MtbDHFR e HuDHFR, para uma melhor compreensão de como as estruturas dos compostos modificam as interações.

As poses foram divididas em três grupos: o Grupo 1 são os compostos que apresentaram ligações fortes com a proteína MtbDHFR e fracas ou inexistentes com a HuDHFR e não apresentaram ligações com o cofator NADPH; o Grupo 2 foi dos compostos que apresentaram ligações fortes com a MtbDHFR, mas tendo uma interação forte ou moderada com a HuDHFR, mesmo que quando comparado uma ligação com a outra seja uma diferença considerável; e o Grupo 3 foram compostos que apresentaram interações fracas ou inexistentes com a HuDHFR e quando ancorada com a MtbDHFR apresentam interações tanto com os resíduos da proteína quanto com o cofator NADPH.

Analisou-se o grupo 1 (Figura 18) e o composto analisado foi o **3e**, o qual apresenta uma interação muito fraca quando ancorado a proteína HuDHFR, que ocorre entre um nitrogênio da purina do composto com um átomo de nitrogênio do resíduo Ala9 (-0,152 kcal mol⁻¹).

Quando ancorado a proteína MtbDHFR observou-se duas interações, a primeira entre um átomo de nitrogênio da purina com um átomo de nitrogênio do resíduo Trp22 (-1,28 kcal mol⁻¹) e a segunda ligação acontece entre um átomo de oxigênio ligado a purina com um átomo de nitrogênio do resíduo Gln28 (-1,95 kcal mol⁻¹).

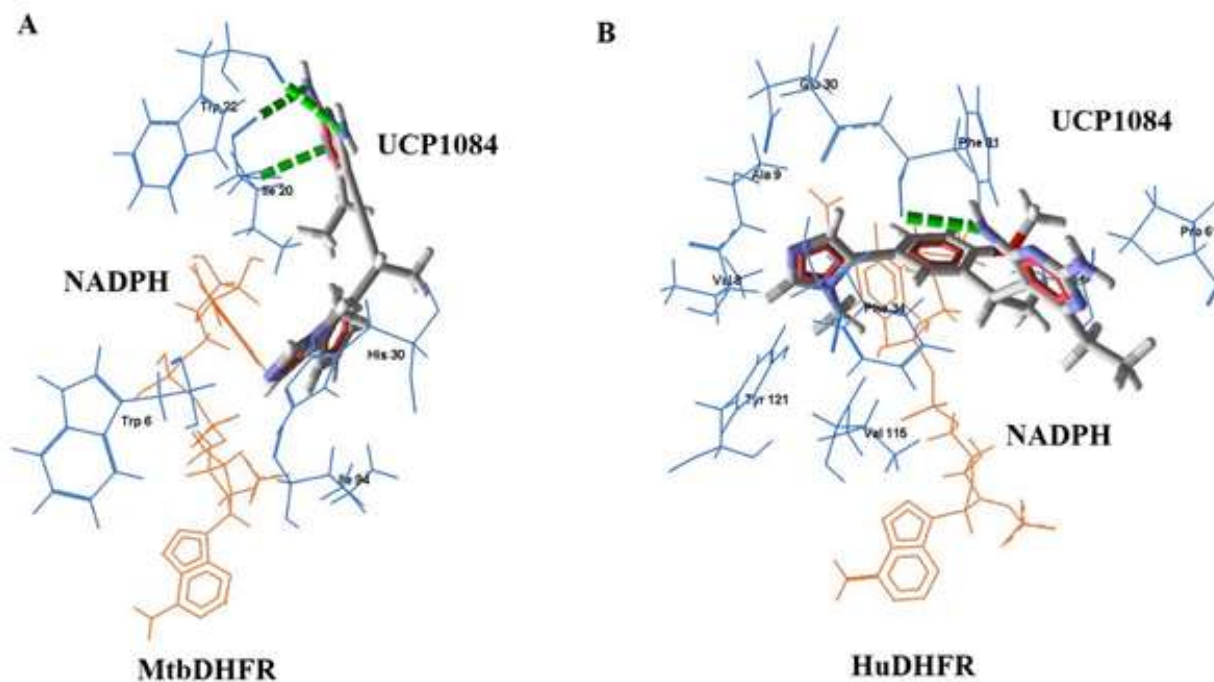
Figura 18 - Ancoramento das conformações dos compostos no sítio das proteínas MtbDHFR e HuDHFR. O tracejado verde corresponde à ligação de hidrogênio. (A) **3e**:MtbDHFR e (B) **3e**:HuDHFR.



Fonte: Do autor (2018).

O próximo grupo analisado foi o grupo 2 (Figura 19), o composto desse grupo foi o **UCP1084**, quando ancorado a HuDHFR apresentou apenas uma interação, entre um átomo de nitrogênio da amina ligado a pirimidina com um átomo de oxigênio do resíduo Phe31 (-2,41 kcal mol⁻¹).

Figura 19 - Ancoramento das conformações do composto no sítio das proteínas MtbDHFR e HuDHFR. O tracejado verde corresponde à ligação de hidrogênio. (A)UCP1084:HuDHFR e (B)UCP1084:MtbDHFR,.



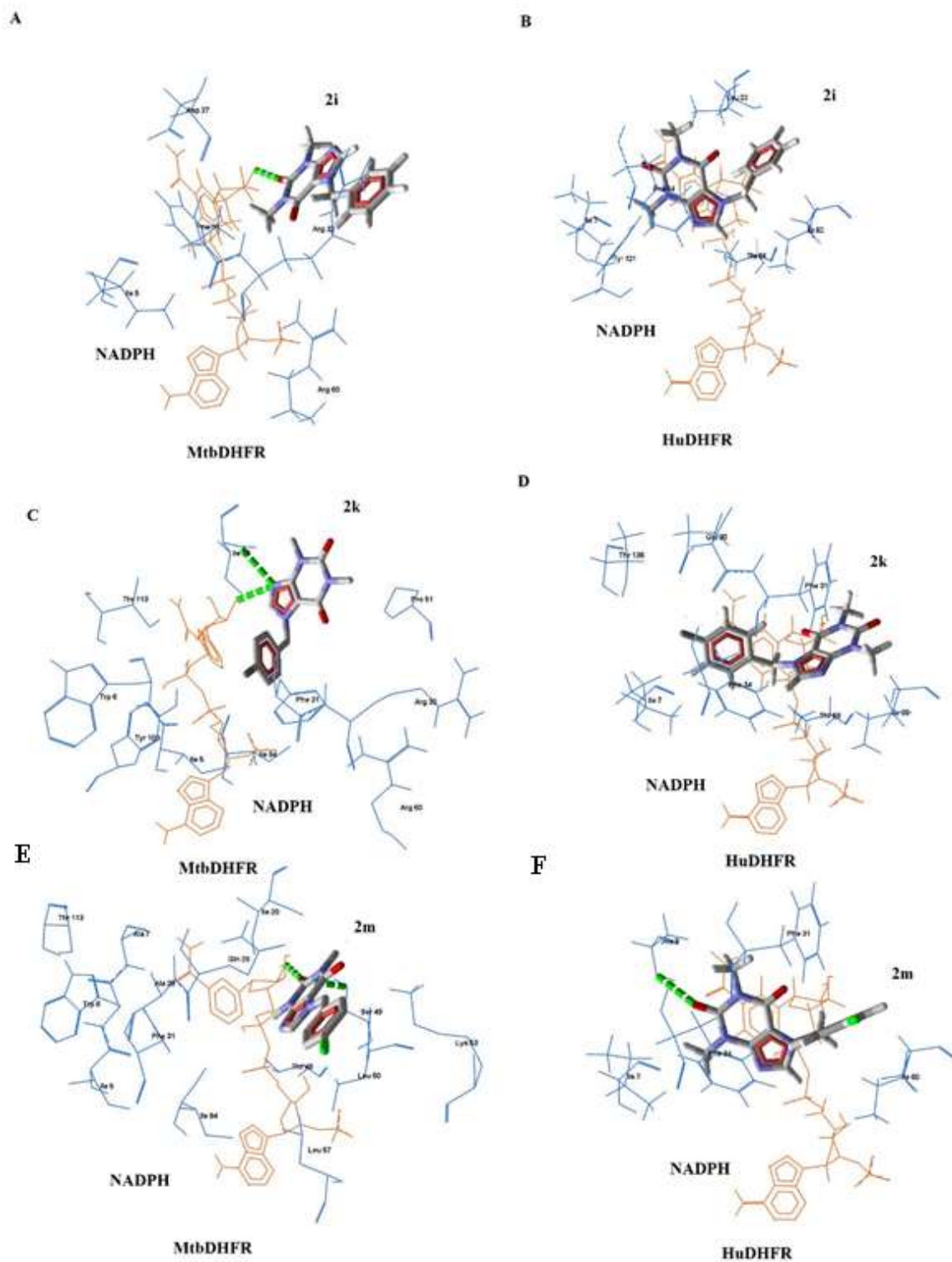
Fonte: Do autor (2018)

Em relação a proteína MtbDHFR o composto apresentou três ligações, duas entre nitrogênio de aminas diferentes da pirimidina com um átomo de oxigênio do resíduo Trp22 ($-2,5 \text{ kcal mol}^{-1}$), e uma entre um átomo de oxigênio do resíduo Ile20 ($-2,5 \text{ kcal mol}^{-1}$). A última interação ocorre entre um átomo de nitrogênio da pirimidina do composto com outro átomo de nitrogênio do resíduo Ile20 ($-1,8 \text{ kcal mol}^{-1}$).

Um fator importante é que mesmo tendo maior seletividade pela proteína MtbDHFR o composto **UCP1084** ainda apresenta interações fortes com a HuDHFR, não sendo algo interessante, já que buscamos compostos seletivos.

O último grupo analisado foi o Grupo 3 (Figura 20), analisando o composto **2i**. Quando ancorado a proteína HuDHFR não apresentou nenhuma interação de hidrogênio, mas quando ancorado a MtbDHFR ocorreu uma interação entre um átomo de oxigênio ligado a purina com um átomo outro átomo de oxigênio o cofator NADPH ($-2,15 \text{ kcal mol}^{-1}$).

Figura 20 - Ancoramento das conformações dos compostos no sítio das proteínas MtbDHFR e HuDHFR. O tracejado verde corresponde à ligação de hidrogênio. (A) **2i**:HuDHFR, (B) **2i**:MtbDHFR, (C) **2k**:HuDHFR, (D) **2k**:MtbDHFR, (E) **2m**:HuDHFR e (F) **2m**:DHFR.



Fonte: Do autor (2018).

Modificando a estrutura do composto **2i**, adicionando um flúor, aumentou o número de interações, podendo ser decorrido do aumento da eletronegatividade, esse composto foi o **2k**, quando ancorado a HuDHFR não apresenta nenhuma interação seja com a proteína ou com o cofator.

Ancorando o composto com a MtbDHFR obteve duas interações sendo elas com um único átomo de nitrogênio da purina do composto com o um átomo de oxigênio do cofator NADPH ($-2,49 \text{ kcal mol}^{-1}$) e um átomo de nitrogênio do resíduo Ile20 ($-1,03 \text{ kcal mol}^{-1}$).

Quando modificado mais uma vez, a estrutura do composto de um átomo de flúor (**2k**) para um de cloro (**2m**), apresenta uma interação com a proteína HuDHFR e diminui a força das interações com a MtbDHFR, não sendo muito interessante, o que pode ser causado pelo cloro ter um maior volume que o flúor.

O composto **2m**, ancorado a HuDHFR, apresentou uma ligação entre um átomo de oxigênio ligado a purina com um átomo de nitrogênio do resíduo Ala9 ($-0,119 \text{ kcal mol}^{-1}$). Quando o composto é ancorado a MtbDHFR ele apresenta duas ligações sendo ambas com átomos ligados a purina, a primeira ocorre entre um átomo de nitrogênio com um átomo de oxigênio do resíduo Ser49 ($-0,449 \text{ kcal mol}^{-1}$). A segunda ligação ocorre entre um oxigênio do composto com um átomo de oxigênio do cofator NADPH ($-2,34 \text{ kcal mol}^{-1}$).

Após analisar os compostos, observou-se que compostos com volumes próximos aos compostos **3e**, **2i**, **2k** e **2m**, apresentaram interações significantes quando ancorados aos compostos no sitio ativo da proteína MtbDHFR, e quando os compostos são ancorados a proteína HuDHFR, não ocorreram interações significantes.

Quando adicionado um átomo mais eletronegativo como o flúor e o cloro, como nos compostos **2k** e **2m**, e ancorados a proteína MtbDHFR, obteve-se interações entre o composto e o cofator NADPH, podendo levar o impedimento de que o cofator participe da reação que é dependente dele e assim levar a inibição da proteína.

Os últimos quatro compostos citados anteriormente, mostraram uma boa seletividade para proteína MtbDHFR, podendo ser seguidos como guias de modelos para futuras estruturas de compostos com o intuito de inibir a proteína.

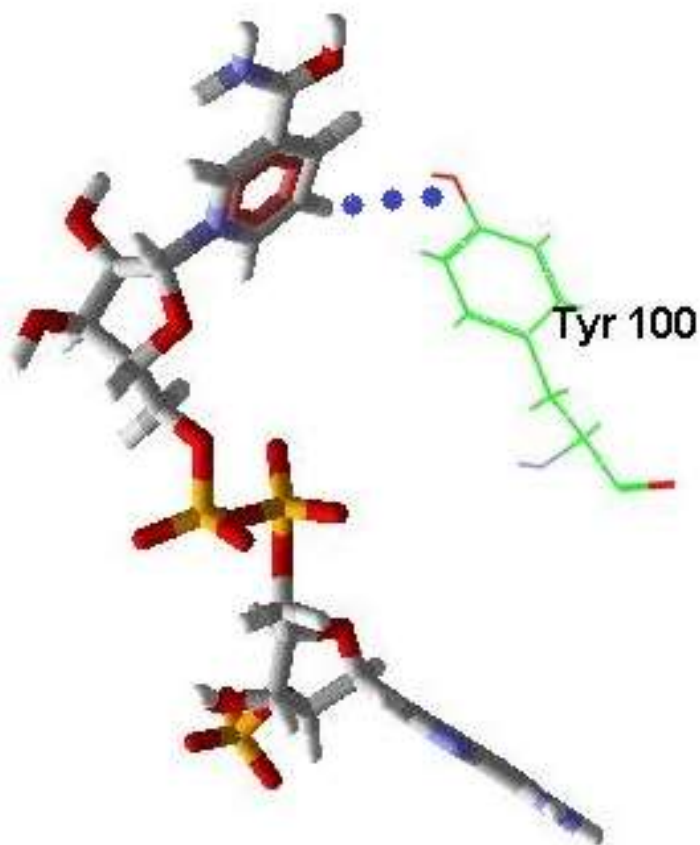
Outros pontos importantes, são que o composto **UCP1084**, quando ancorado na proteína MtbDHFR apresentara interações mais energéticas com os resíduos do sitio ativo, por outro lado também apresentaram interações mais energéticas com os resíduos do sitio ativo da proteína HuDHFR. Mesmo apresentando um número maior de interações de hidrogênio com a MtbDHFR, as interações que ocorrem com a HuDHFR são significativas,

podendo levar a inibição da proteína, e como dito por KUMA et al (2010), essa inibição acarreta a morte celular.

Mas permanece sem resposta nos estudos mostrados até esse momento, o motivo de certos compostos terem apresentado uma interação muito baixa com a proteína MtbDHFR e se há alguma relação com volumes moleculares ou cargas dos átomos.

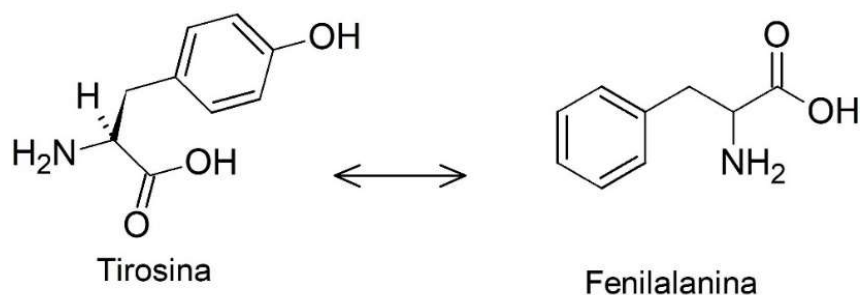
Uma hipótese foi apresentada por Dias, et al. (2014), segundo a qual o resíduo Tyr100 apresentaria uma interação com o grupo nicotinamida do NADPH causando um efeito estérico na área e podendo contribuir com interações fracas ou mesmo nenhuma entre os compostos com a proteína (figura 21), para tanto criou-se uma enzima mutante a partir da proteína MtbDHFR denominado Y100F onde é trocado o aminoácido Tirosina por uma Fenilalanina (figura 22) para testar essa hipótese.

Figura 21 - Estruturas do cofator NADPH e do resíduo Tyr100 e possível efeito estérico.



Fonte: Do autor (2018).

Figura 22 - Estrutura dos aminoácidos Tirosina e Fenilalanina.



Fonte: Do autor (2018).

Para melhor entendimento desse efeito estérico e como ele atua nas interações do composto com a proteína, foram feitos todos os estudos de ancoramento molecular entre os compostos e a mutante e comparados com os da proteína MtbDHFR.

Foi encontrada a melhor conformação de cada composto, utilizando o inibidor já conhecido MTX como templates de modelo. Os parâmetros MolDock Score, energia intermolecular e de ligação de hidrogênio foram calculados e apresentados na tabela 12, 13 e 14 para os compostos desenvolvidos por SHELKE et al. (2016) e compostos desenvolvido por HAIJAN et al. (2016) estão apresentados nas Tabelas 15, 16 e 17.

Tabela 12 - Valores de energia MolDock Score (kcal mol⁻¹) para os compostos, desenvolvidos por SHELKE e colaborados, ancorados na proteína MtbDHFR e mutante Y100F.

Compostos	MolDock Score		
	MtbDHFR	Y100F	Y100F/MtbDHFR
MTX	-166,10	-148,19	0,892
51P	-148,49	-108,22	0,729
2b	-112,99	-91,034	0,806
2c	-100,51	-93,747	0,933
2d	-117,65	-88,194	0,750
2e	-102,96	-78,720	0,765
2f	-120,82	-94,153	0,779
2g	-120,85	-75,978	0,628
2h	-109,49	-105,69	0,965
2i	-91,436	-56,779	0,621
2j	-108,97	-86,557	0,794
2k	-97,248	-70,552	0,725
2l	-103,37	-89,088	0,862
2m	-92,679	-90,952	0,981
3a	-75,682	-65,819	0,870
3b	-78,157	-73,228	0,937
3c	-85,322	-64,477	0,756
3d	-94,030	-66,150	0,703
3e	-81,968	-46,565	0,568
4	-71,782	-50,874	0,709

Fonte: Do autor (2018).

Tabela 13 - Valores de energia intermolecular (kcal mol^{-1}) para os compostos, desenvolvidos por SHELKE e colaborados, ancorados na proteína MtbDHFR e mutante Y100F.

Compostos	Energia intermolecular		
	MtbDHFR	Y100F	Y100F/MtbDHFR
MTX	-183,53	-167,67	0,914
51P	-150,28	-105,85	0,704
2b	-117,97	-98,432	0,834
2c	-105,59	-98,141	0,929
2d	-126,49	-99,888	0,790
2e	-109,37	-91,246	0,834
2f	-128,35	-100,93	0,786
2g	-129,01	-82,426	0,639
2h	-117,42	-112,31	0,956
2i	-106,88	-83,212	0,779
2j	-119,66	-99,930	0,835
2k	-108,16	-81,645	0,755
2l	-112,43	-99,174	0,882
2m	-106,31	-102,72	0,966
3a	-87,065	-77,202	0,887
3b	-90,236	-85,843	0,951
3c	-97,891	-80,348	0,821
3d	-111,71	-82,677	0,740
3e	-97,281	-68,637	0,706
4	-83,660	-62,751	0,750

Fonte: Do autor (2018).

Tabela 14 - Valores de ligação de hidrogênio (kcal.mol⁻¹), para os compostos, desenvolvidos por SHELKE e colaboradores, ancorados na proteína MtbDHFR e mutante Y100F.

Compostos	Ligação de hidrogênio		
	MtbDHFR	Y100F	Y100F/MtbDHFR
MTX	-9,675	-8,725	0,902
51P	-3,568	-1,440	0,404
2b	-4,245	-2,410	0,568
2c	-3,579	-2,396	0,669
2d	-4,774	-2,237	0,469
2e	-2,247	-2,611	1,162
2f	-4,776	-2,046	0,428
2g	-4,731	-4,235	0,895
2h	-2,635	-4,401	1,670
2i	-1,994	-2,006	1,006
2j	0,000	-2,767	-
2k	-2,581	-1,371	0,531
2l	-1,998	-4,477	2,241
2m	-2,500	-2,417	0,967
3a	-2,500	-1,726	0,690
3b	-3,585	-1,723	0,481
3c	-1,622	-4,371	2,695
3d	-1,643	-2,079	1,265
3e	-3,519	-1,346	0,382
4	-4,763	-2,148	0,451

Fonte: Do autor (2018).

Tabela 15- Valores de MolDock Score (kcal mol^{-1}), para os compostos, desenvolvidos por HAJIAN e colaboradores, ancorados na proteína MtbDHFR e mutante Y100F.

Compostos	MolDock Score		
	MtbDHFR	Y100F	Y100F/MtbDHFR
MTX	-183,53	-167,67	0,914
51P	-150,28	-105,85	0,704
UCP1102	-165,46	-144,85	0,875
UCP1106	-139,99	-123,3	0,881
UCP1098	-170,17	-137,92	0,810
UCP1084	-160,60	-146,3	0,911
UCP1063	-151,05	-133,77	0,886
UCP1172	-158,53	-113,65	0,717
UCP1175	-158,34	-132,31	0,836
UCP1164	-141,98	-130,29	0,918

Fonte: Do autor (2018).

Tabela 16 - Valores de energia intermolecular (kcal mol^{-1}), para os compostos, desenvolvidos por HAJIAN e colaboradores, ancorados na proteína MtbDHFR e mutante Y100F.

Compostos	Energia Intermolecular		
	MtbDHFR	Y100F	Y100F/MtbDHFR
MTX	-183,53	-167,67	0,914
51P	-150,28	-105,85	0,704
UCP1102	-165,46	-133,28	0,806
UCP1106	-139,99	-121,95	0,871
UCP1098	-170,17	-139,02	0,817
UCP1084	-160,60	-137,38	0,855
UCP1063	-151,05	-136,43	0,903
UCP1172	-158,53	-117,39	0,740
UCP1175	-158,34	-136,00	0,859
UCP1164	-141,98	-129,52	0,912

Fonte: Do autor (2018).

Tabela 17 - Valores de ligação de hidrogênio (kcal.mol⁻¹), para os compostos, desenvolvidos por HAJIAN e colaboradores, ancorados na proteína MtbDHFR e mutante Y100F.

Compostos	Ligação de Hidrogênio		
	MtbDHFR	Y100F	Y100F/MtbDHFR
MTX	-9,675	-8,725	0,902
51P	-3,568	-1,440	0,404
UCP1102	-3,520	-5,081	1,443
UCP1106	-2,030	-5,507	2,713
UCP1098	-3,653	-7,231	1,979
UCP1084	-6,848	-6,507	0,950
UCP1063	-5,104	-7,285	1,427
UCP1172	-6,758	-5,379	0,796
UCP1175	-6,861	-4,310	0,628
UCP1164	-3,758	-9,551	2,522

Fonte: Do autor (2018).

Analisando os resultados obtidos através dos estudos de ancoramento molecular, foi possível constatar que, houveram variações significativas em relação a MoldockScore e energia intermolecular. Para uma melhor compreensão sobre as estruturas, serão analisadas as maiores variações de MoldockScore e energia intermolecular. O composto **2g** apresentou valores mais negativos de Moldock Score e Energia Intermolecular quando ancorado a proteína MtbDHFR do que o mutante Y100F, já o composto **2m** apresentou valores mais negativos quando ancorado ao mutante Y100F do que na MtbDHFR (tabela 18).

Tabela 18 - Valores de Moldock Score (kcal mol⁻¹) e Energia Intermolecular (kcal mol⁻¹) para os compostos **2g** e **2m**.

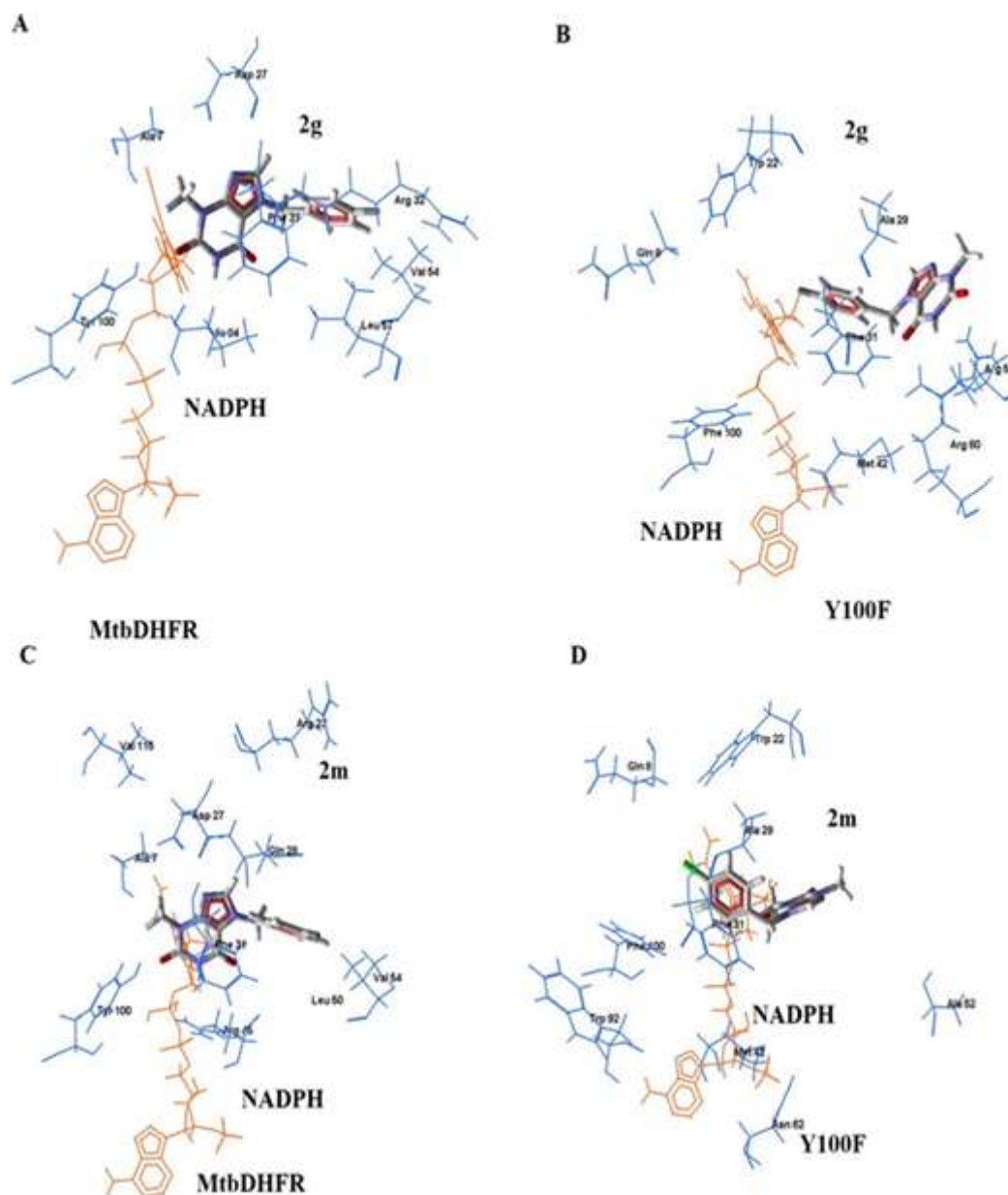
MoldockScore			
COMPOSTO	MtbDHFR	Y100F	Y100F /MtbDHFR
2g	-120,85	-75,978	0,628
2m	-92,679	-90,952	0,981

Energia Intermolecular			
COMPOSTO	MtbDHFR	Y100F	Y100F/MtbDHFR
2g	-129,01	-82,426	0,639
2m	-106,31	-102,72	0,966

Fonte: Do autor (2018).

Pode-se observar como os compostos (Figura 23) **2g** e **2m** se comportaram no sitio ativo das proteínas MtbDHFR e no Mutante Y100F, como as proteínas apresentam os mesmos resíduos no sitio ativo, menos um resíduo que na proteína MtbDHFR é Tyr100 e no mutante sendo um Phe 100. As interações entre os resíduos e os compostos, ou até mesmo com o cofator NADPH podem ocorrer de maneira diferente e influenciar na estabilidade do composto devido essa troca de resíduo.

Figura 23 - Ancoramento das conformações dos compostos no sítio das proteínas MtbDHFR e Y100F. (A) **2g**:MtbDHFR, (B) **2g**:Y100F, (C) **2m**:MtbDHFR e (D) **2m**:Y100F.



Fonte: Do autor (2018).

Analisando as variações com relação a ligação de hidrogênio, onde é mostrado interações entre a conformação e resíduos presentes no sítio ativo da proteína, alguns compostos mostraram maior interação entre o Y100F quando comparada com a MtbDHFR. São estes, os compostos **2j**, **2l**, **3c**, **UCP1106**, **UCP1098** e **UCP1164** (Tabela 19).

As análises foram divididas em dois grandes grupos: sendo o Grupo 1 onde ocorreram mudanças moderadas, mas significativas; e o Grupo 2, apresentando mudanças muito significativas.

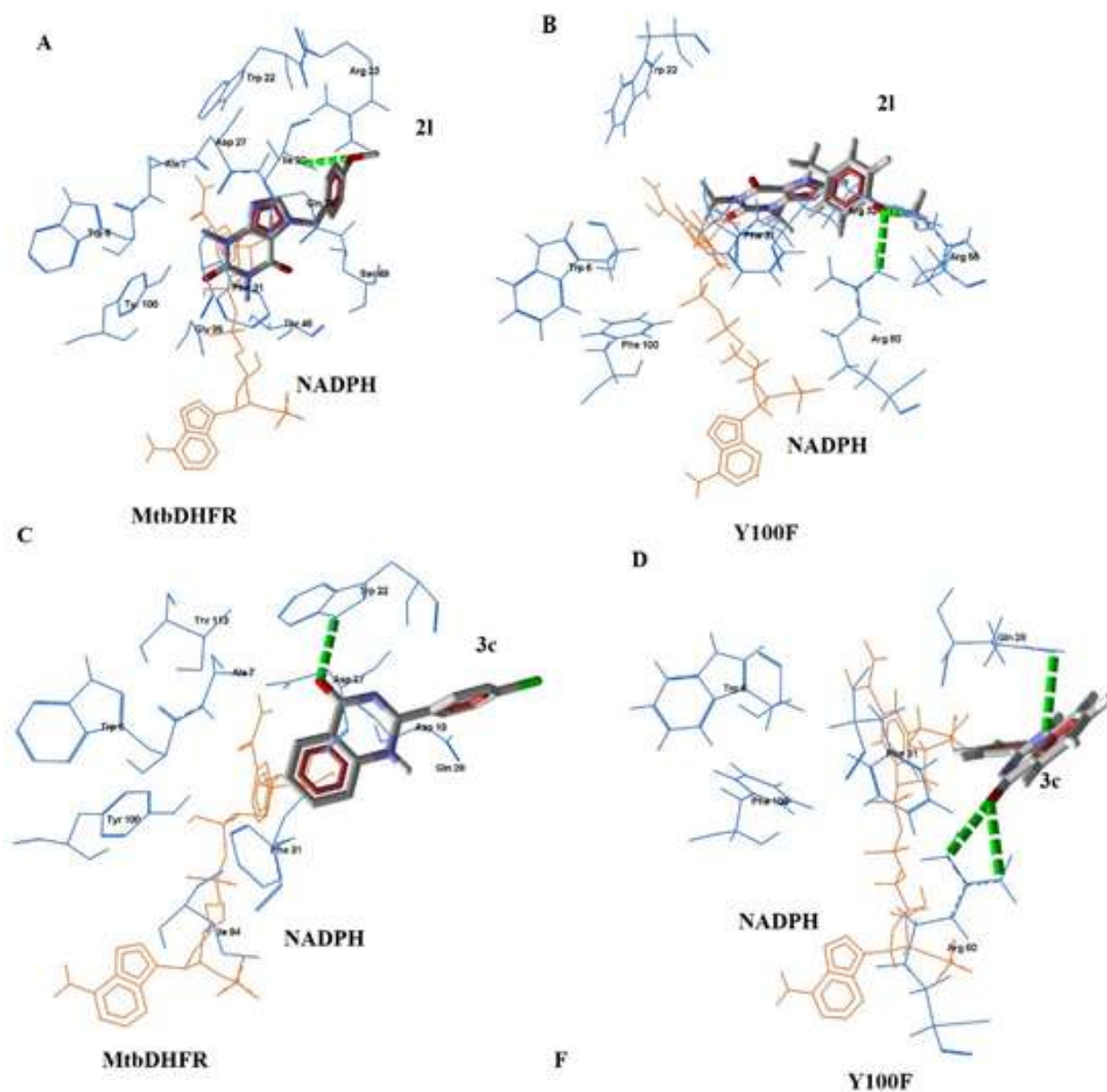
Tabela 19 - Valores de Ligação de hidrogênio (kcal mol⁻¹) para os compostos **2j**, **2l**, **3c**, **UCP1106**, **UCP1098** e **UCP1164**.

Ligação de Hidrogênio			
COMPOSTOS	MtbDHFR	Y100F	Y100F/MtbDHFR
2j	0,000	-2,767	-
2l	-1,998	-4,477	2,241
3c	-1,622	-4,371	2,695
UCP1106	-2,030	-5,507	2,713
UCP1098	-3,653	-7,231	1,979
UCP1164	-3,758	-9,551	2,522

Fonte: Do autor (2018).

No Grupo 1 (Figura 24), o primeiro composto foi o **2l**, ancorando-o a proteína MtbDHFR ocorreu apenas uma ligação entre um átomo de oxigênio do grupo éter do composto com um átomo de nitrogênio do resíduo Ile 20 (-1,998 kcal mol⁻¹). Quando ancorando no mutante, apresentou duas interações sendo a primeira entre um mesmo átomo de oxigênio do éter com dois átomos de nitrogênio distintos do resíduo Arg32 (-1,978 kcal mol⁻¹) e Arg60 (-2,500 kcal mol⁻¹).

Figura 24 - Ancoramento das conformações dos compostos no sítio das proteínas MtbDHFR e Y100F. O tracejado verde corresponde à ligação de hidrogênio. (A) **2l**:MtbDHFR, (B)**2l**:Y100F, (C)**3c**:MtbDHFR, (D)**3c**:Y100F.



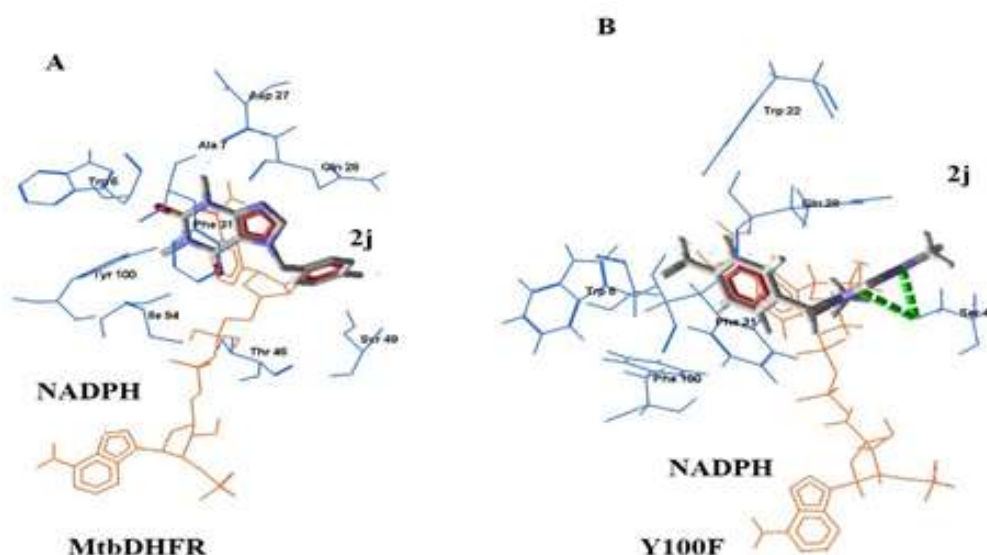
Fonte: Do autor (2018).

Modificando o grupo suporte da purina para um derivado quinazolinico de uma purina para uma quinazolina e usando um átomo mais eletronegativo como o cloro obteve um aumento nas interações podendo ser decorrido do aumento da eletronegatividade, sendo esse o composto **3c**. Quando ancorado o composto a proteína MtbDHFR houve apenas uma interação entre um átomo de oxigênio ligado a quinazolina do composto e um átomo de nitrogênio do resíduo Trp22 ($-1,512 \text{ kcal mol}^{-1}$).

Ancorando o composto a mutante observou-se três interações, sendo as duas primeiras entre um único átomo de oxigênio da quinazolina do composto com dois átomos de nitrogênio distintos do resíduo Arg60 (-2,500 e 1,324 kcal mol⁻¹). A última ligação ocorreu entre um átomo de nitrogênio da quinazolina com um átomo de oxigênio do resíduo Gln 28 (-0,541 kcal mol⁻¹).

Foi analisado Grupo 2 (figura 25), sendo o primeiro composto o **2j**. Quando ancorado a proteína MtbDHFR ela não apresentou interações. Ancorando ao mutante Y100F observou-se duas interações, sendo ambas entre o átomo de oxigênio do resíduo Ser 49 com um átomo de nitrogênio (-0,665 kcal mol⁻¹) e um oxigênio (-2,09 kcal mol⁻¹) do grupo purina do composto.

Figura 25 - Ancoramento das conformações do composto no sítio das proteínas MtbDHFR e Y100F. O tracejado verde corresponde à ligação de hidrogênio. (A) **2j**:MtbDHFR, (B) **2j**:Y100F.



Fonte: Do autor (2018).

Esse composto apresentou um aspecto interessante, pois ele possui uma estrutura quase idêntica a de compostos que apresentaram uma ótima interação e seletividade com a proteína MtbDHFR, como os compostos **2i**, **2k** e **2m**. A única variação foi a troca de um grupo metil por um átomo de flúor e cloro nos compostos **2k** e **2m**, e a retirada do grupo metil no composto **2i**, mostrando que um composto com maior eletronegatividade ou menor volume, pode contornar esse efeito estérico causado pelo resíduo Tyr 100.

Quando utilizado uma estrutura diferente como o composto **UCP1098** é possível observar uma grande variação nas interações. Quando ancorado a proteína MtbDHFR ocorreram duas ligações, entre o nitrogênio da amina ligado a pirimidina do composto com os resíduos Ile20 ($-2,499 \text{ mol}^{-1}$) e Trp22 ($-1,034 \text{ kcal mol}^{-1}$).

Ancorando o composto a mutante observou-se cinco ligações, sendo as duas primeiras entre o átomo de nitrogênio da amina ligada a pirimidina do composto com dois átomos distintos de oxigênio dos resíduos Ile5 ($-2,5 \text{ kcal mol}^{-1}$) e Ile 94 ($-2,234 \text{ kcal mol}^{-1}$). As próximas duas interações ocorrem entre o átomo de nitrogênio de uma outra amina ligada a pirimidina com dois átomos de oxigênio dos resíduos Thr113 ($-0,830 \text{ kcal mol}^{-1}$) e Asp27 ($-1,269 \text{ kcal mol}^{-1}$). A última ligação ocorre entre um átomo de oxigênio do grupo 1,3-benzodioxole com um átomo de nitrogênio do resíduo Gln28 ($-0,426 \text{ kcal mol}^{-1}$).

Sendo um composto com volume maior que os anteriores, observa-se um possível efeito estérico causado pelo resíduo Tyr100, já quando ancorado ao mutante o número de interações aumentaram significativamente.

Alterando a estrutura do composto como o **UCP1106**, quando foi ancorado a proteína MtbDHFR apresentou apenas uma interação sendo ela com um átomo de nitrogênio da amina ligada a pirimidina do composto com um átomo de oxigênio do resíduo Ile 94 (-2,031 kcal mol⁻¹). Mas ancorando o composto no mutante Y100F ocorreu cinco interações.

A primeira interação ocorreu entre um átomo de oxigênio o grupo ácido carboxílico do composto com um átomo de oxigênio do resíduo Asp 19 (-2,26 kcal mol⁻¹). As próximas duas interações ocorrem entre dois átomos de nitrogênio de aminas distintas ligadas a pirimidina com dois átomos de oxigênio dos resíduos Asp 27 (-0,723 kcal mol⁻¹) e Ile 94 (-2,5 kcal mol⁻¹). As últimas duas ligações que aconteceram foram entre dois átomos de nitrogênio de um grupo amina (-0,452 kcal mol⁻¹) ligados a pirimidina e a outra entre um átomo de nitrogênio da pirimidina (-0,984 kcal mol⁻¹) com o mesmo átomo de oxigênio do cofator NADPH.

Modificando a estrutura como o composto **UCP1164**, houve um aumento significativo na força das interações quando ancorado a proteína MtbDHFR apresentou duas interações, sendo as duas entre átomos de nitrogênio de aminas distintas com dois átomos de oxigênio dos resíduos Asp27 (-2,500 kcal mol⁻¹) e Ile5 (-1,253 kcal mol⁻¹).

Ancorando o composto **UCP1164** a mutante Y100F observou-se cinco interações, sendo a primeira entre um átomo de oxigênio do grupo ácido carboxílico com um átomo de oxigênio do resíduo Asp27 (-2,500 kcal mol⁻¹). A segunda interação ocorreu entre um átomo de nitrogênio do grupo amina ligado a pirimidina do composto com um átomo de oxigênio do resíduo Asp19 (-2,056 kcal mol⁻¹). A terceira ligação ocorre entre um átomo de oxigênio do grupo ácido carboxílico com um átomo de nitrogênio do resíduo Trp6 (-0,259 kcal mol⁻¹). As últimas duas interações foram entre um único átomo de nitrogênio da amina ligada a pirimidina com um átomo de oxigênio do resíduo Gly18 (-2,500 kcal mol⁻¹) e outro átomo de oxigênio do cofator NADPH (-2,5 kcal mol⁻¹).

Esse último composto ainda mostra que grupos retiradores de elétrons tem melhores interações e quando ancorado ao mutante ocorreu uma forte interação com o cofator NADPH, mostrando que esse efeito estérico que acontece entre o cofator e o resíduo Tyr100 afeta as interações entre os compostos e a proteína.

Com os estudos apresentados até o momento foi possível fazer algumas observações interessantes, como compostos muito volumosos apresentam uma maior seletividade pela HuDHFR, já que sofrem com um possível efeito estérico que ocorre entre o resíduo Tyr100 e o cofator NADPH, esse fenômeno pode ser levemente contornado por grupos retiradores

de elétrons, mas ainda apresenta interação com a proteína humana, não sendo um ponto interessante, pois a inibição da mesma leva a morte celular.

Compostos com volume moderado, mas com grupos retirados de elétrons apresentam maior seletividade pela proteína MtbDHFR, mas ainda apresentam interações moderadas quando ancorada a proteína humana. Agora quando apresentam grupos retiradores de elétrons e volumes próximos ao dos compostos **2k** e **2m**, a seletividade aumenta muito pela MtbDHFR, quase não ocorrendo interações com a proteína HuDHFR. Apresentando até interações importantes com o cofator NADPH que é essencial para que a reação que a proteína MtbDHFR participa ocorra, podendo levar a morte celular da Mtb.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através de estudos de ancoramento molecular foi avaliado o modo de interação dos potenciais inibidores no sítio ativo das proteínas MtbDHFR e HuDHFR, foi possível observar que estruturas com volumes moleculares próximas a dos compostos **UCP1084**, **UCP1098**, **UCP1106** e **UCP1164** apresentaram interações fortes ou moderadas pela proteína HuDHFR, apresentando pouco ou nenhuma interação com o sítio ativo da proteína MtbDHFR.

Através dos estudos de ancoramento molecular feitos no mutante Y100F, foi constatado uma melhora significativa nas interações com compostos volumosos, mostrando um possível efeito estérico causado pelo resíduo Tyr 100, como demonstrado em estudos desenvolvidos por Dias, et al (2014). Uma vez que, quando trocado a tirosina por uma fenilalanina as interações entre os compostos e a proteína aumentaram.

Compostos com volumes medianos como o composto **3e** apresentou uma boa interação com a proteína MtbDHFR, e uma franca interação com a HuDHFR. Mas quando apresentam grupos retiradores de elétrons a seletividade pela MtbDHFR aumenta significativamente, tendo interações fracas ou inexistentes com a proteína HuDHFR como os compostos **2k** e **2m**, que podem ser usados como modelos para possíveis novos potenciais inibidores seletivos para proteína MtbDHFR em um futuro próximo.

7 PERSPECTIVAS

O trabalho desenvolvido é uma pequena parcela do que pode ser feito para o estudo de compostos antibacteriano que tenham como alvo a proteína MtbDHFR. Existe ainda a necessidade do estudo de novos potenciais inibidores com diferentes substituintes. Será feita proposta de estruturas de inibidores inéditas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARBEX, M. A.; et al. Antituberculosis drugs: drug interactions, adverse effects, and use in special situations-part 1: first-line drugs. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 36, n. 5, p. 626-640, 2010.
- BUSHBY, S. R. M.; HITCHINGS, G. H. Trimethoprim, a sulphonamide potentiator. **British journal of pharmacology**, v. 33, n. 1, p. 72-90, 1968.
- CAMPOS, H. S. et al. Etiopatogenia da tuberculose e formas clínicas. **Pulmão RJ**, v. 15, n. 1, p. 29-35, 2006.
- CARRINGTON, H.C.; CROWTHER, A.F.; DAVEY, D.G.; LEVI, A.A.; ROSE, F.L. A metabolite of paludrine with high antimalarial activity. *Nat. (London, United Kingdom)*, **1951**, 168, 1080.
- CARVALHO, I. et al. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. **Química Nova**, v.26, n. 3,p. 428-438, 2003.
- CHANDRASHEKHAR L. A., et al. Repositioning of DHFR inhibitors. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 16, n. 19, p. 2125-2143, 2016.
- COISH, P.D.G.; WICKENS, P.; DIXON, B.; OSTERMAN, D.; KHIRE, U.R.; NAVIA, M.; BERMAN, J.; KAUR, H.; WILSON, J.; UNDERWOOD, D. Antimicrobial diaminopteridine derivatives. WO2010110907A1, September 30, **2010**.
- CHEN, Z et al. Dihydrofolate reductase inhibitors, WO 2011153310, August 12, **2011**
- DE OLIVEIRA, R. G.; ALENCAR-FILHO, E. B.; & VASCONCELLOS, M. L. A influência da piperina na disponibilidade de fármacos: uma abordagem molecular. **Química Nova**, Vol. 37, No. 1, p.69-73, 2014.
- DE SOUZA, M. V. N.; VASCONCELOS, T. R. A. Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 678, 2005.
- DIAS, Marcio Vinicius Bertacine et al. Mycobacterium tuberculosis dihydrofolate reductase reveals two conformational states and a possible low affinity mechanism to antifolate drugs. *Structure*, v. 22, n. 1, p. 94-103, 2014.
- DILLON, M.P.; JAHANGIR, A.; MOORE, A.G.; WAGNER, P.J. Preparation of diaminopyrimidines as P2X3 and P2X2/3 modulators. US20070049758A1, March 01, **2007**.
- DO AMARAL, A. T., & MONTANARI, C. A., Química medicinal: 25 anos de planejamento racional de fármacos. **Química Nova**,v.25,Supl 1, p;39-44, 2002.
- EL-HAMAMSY, M. H et al. Structure-based design, synthesis and preliminary evaluation of selective inhibitors of dihydrofolate reductase from Mycobacterium tuberculosis. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 15, n. 13, p. 4552-4576, 2007.

HAIJIAN, B. et al. Propargyl-Linked Antifolates Are Potent Inhibitors of Drug-Sensitive and Drug-Resistant Mycobacterium tuberculosis. **PloS one**, v. 11, n. 8, p. e0161740, 2016.

HORSBURGH JR.; C. R.; B. III, CLIFTON E.; LANGE, C Treatment of tuberculosis. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 22, p. 2149-2160, 2015.

Kozakevich, G. V., da Silva, R. M. (2016). Tuberculose: revisão de literatura. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, 44(4), 34-47.

KUMAR, M.; VIJAYAKRISHNAN, R.; RAO, G. S. In silico structure-based design of a novel class of potent and selective small peptide inhibitor of Mycobacterium tuberculosis Dihydrofolate reductase, a potential target for anti-TB drug discovery. **Molecular diversity**, v. 14, n. 3, p. 595-604, 2010.

LI, R. et al. Three-dimensional structure of M. tuberculosis dihydrofolate reductase reveals opportunities for the design of novel tuberculosis drugs. **Journal of molecular biology**, v. 295, n. 2, p. 307-323, 2000.

LIU, X. et al. Exploring anti-TB leads from natural products library originated from marine microbes and medicinal plants. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 102, n. 3, p. 447-461, 2012.

LIU, C. Tony et al. Escherichia coli dihydrofolate reductase catalyzed proton and hydride transfers: Temporal order and the roles of Asp27 and Tyr100. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 51, p. 18231-18236, 2014.

MA, X.; TAN, S.; KHOO, C.; SIM, H.; CHAN, L.; CHUI, W. Synthesis and antimicrobial activity of N1-benzyl or N1-benzyloxy-1,6- dihydro-1,3,5-triazine-2,4-diamines. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 2011, 21, 5428–5431.

MIZUTANI, M. Y.; TOMIOKA, N.; ITAI, A. Rational automatic search method for stable docking models of protein and ligand. **Journal of molecular biology**, v.243, n.2, p. 310-326, 1994.

PADMAPRIYADARSINI, C.; NARENDRAN, G.; SWAMINATHAN, Soumya. Diagnosis & treatment of tuberculosis in HIV co-infected patients. **The Indian journal of medical research**, v. 134, n. 6, p. 850, 2011.

PIPER, J. R. et al. Analogues of methotrexate in rheumatoid arthritis. 2. Effects of 5-deazaaminopterin, 5, 10-dideazaaminopterin, and analogues on type II collagen-induced arthritis in mice. **Journal of medicinal chemistry**, v. 40, n. 3, p. 377-384, 1997.

RAO, A. S.; TAPALE, S. R. A study on dihydrofolate reductase and its inhibitors: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 4, n. 7, p. 2535, 2013.

RAMALHO, T. C. et al. Construction and assessment of reaction models of class I EPSP synthase: Molecular docking and density functional theoretical calculations. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v.27, n.2, p. 195-207, 2009.

RIBEIRO, M. S. et al. Tests performed for pulmonary tuberculosis diagnosis in Ribeirao Preto city, Brazil. **Ciência, Cuidado e Saúde**, v. 15, n. 2, p. 250-258, 2016.

ROSOWSKY, A; MOTA, C. E.; QUEENER, S. F. Synthesis and antifolate activity of 2, 4-diamino-5, 6, 7, 8-tetrahydropyrido [4, 3-d] pyrimidine analogues of trimetrexate and piritrexim. *Journal of heterocyclic chemistry*, v. 32, n. 1, p. 335-340, 1995.

SHELKE, R. U. et al. Fragment Discovery for the Design of Nitrogen Heterocycles as Mycobacterium tuberculosis Dihydrofolate Reductase Inhibitors. *Archiv der Pharmazie*, v. 349, n. 8, p. 602-613, 2016.

SINGH, A. et al. Mechanistic principles behind molecular mechanism of Rifampicin resistance in mutant RNA polymerase beta subunit of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of cellular biochemistry*, v. 118, n. 12, p. 4594-4606, 2017.

THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. *Journal of medicinal chemistry*, v.49, n.11, p. 3315-3321. 2006.

UNISSA, A. N.; et al. Overview on mechanisms of isoniazid action and resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 45, p. 474-492, 2016.

UNISSA, A. N.;; HANNA, Luke Elizabeth. Molecular mechanisms of action, resistance, detection to the first-line anti tuberculosis drugs: Rifampicin and pyrazinamide in the post whole genome sequencing era. *Tuberculosis*, v. 105, p. 96-107, 2017.

WAN, Qun et al. Toward resolving the catalytic mechanism of dihydrofolate reductase using neutron and ultrahigh-resolution X-ray crystallography. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 111, n. 51, p. 18225-18230, 2014.