



Universidade de Brasília  
Instituto de Química

**A ESTRUTURA DO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*  
CATALASE-PEROXIDASE E OS MECANISMOS DE AÇÃO DA  
ISONIAZIDA: UM ESTUDO PARA NOVOS LIGANTES.**

**Daniel Bastos**

**Brasília - 2006**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Daniel Bastos**

**A ESTRUTURA DO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*  
CATALASE-PEROXIDASE E OS MECANISMOS DE AÇÃO DA  
ISONIAZIDA: UM ESTUDO PARA NOVOS LIGANTES.**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre. Programa de Pós-Graduação em Química, área de Físico-Química, Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Elaine Rose Maia

Brasília  
2006

**Daniel Bastos**

**A ESTRUTURA DO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*  
CATALASE-PEROXIDASE E OS MECANISMOS DE AÇÃO DA  
ISONIAZIDA: UM ESTUDO PARA NOVOS LIGANTES.**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, área de Físico-Química, Universidade de Brasília, pela comissão formada pelos professores

Prof. Dra. Elaine Rose Maia  
Orientadora

Prof. Dr. André Luis Gemal  
UFRJ

Prof. Dr. Kleber Carlos Mundim  
UnB

Brasília - 2006

Esta tese foi desenvolvida sob a orientação da professora Elaine Rose Maia....

Ficha Catalográfica

Bastos, Daniel

A estrutura do *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase e os mecanismos de ação da isoniazida: um estudo para novos ligantes.

Brasília, UnB, Instituto de Química, 2006, 147

Tese: Mestre em Química (Físico-Química)

---

## Resumo

A tuberculose é um mal que aflige a humanidade há séculos, e durante certo tempo pareceu ser uma doença controlável. No entanto, nos últimos anos houve uma recrudescência assustadora da tuberculose, principalmente em países em desenvolvimento e que apresentam deficiências sanitárias. Para combatê-la são usados antimicrobianos efetivos contra seu causador, o *Mycobacterium tuberculosis*, tais como a isoniazida, o etambutol, a rifampicina e a pirazinamida. Este medicamento, um pró-fármaco, necessita ser oxidado para se transformar em recurso metabólico. Esta oxidação pode ser proveniente da ação de enzimas catalíticas como as Catalase-Peroxidases (CP's). Baseando-se na estrutura cristalina da proteína *Mycobacterium Tuberculosis* Catalase-Peroxidase, *mtCP*, elucidada por Bertrand et al.,<sup>(16)</sup> cálculos computacionais foram efetuados para se verificar as interações entre a isoniazida e um potencial sítio ativo da proteína, com o intuito de se obter resultados que contribuam para a compreensão do mecanismo de ação deste ligante com seu receptor. Os métodos matemáticos utilizados foram principalmente a mecânica molecular, a dinâmica molecular, o *docking* (ou acoplamento, ou ancoramento) rígido e o *docking* flexível. Estes cálculos estão inclusos no que se conhece genericamente por modelagem molecular. O acoplamento teórico da isoniazida pode fornecer indícios da posição que este composto assume na cavidade receptora da proteína. Quando flexível este tem a característica de indicar possíveis modelos quanto à orientação do ligante no sítio ativo. Este trabalho é facilitado pela existência da protoporfirina (grupo heme) na cavidade receptora do *mtCP* e a prévia determinação de sua posição por difração de raios-X. Há várias propostas quanto aos aminoácidos que compõem o sítio ativo do *mtCP*, mas, de fato, este ainda não está bem determinado. Pretendemos, através deste trabalho, propor um sítio ativo baseado nos resultados teóricos obtidos, e compará-los àqueles da literatura. As comparações entre os modelos teóricos por nós obtidos conduziram a duas posições preferenciais da isoniazida na cavidade receptora do *mtCP* e, portanto, a dois diferentes modos de interações com aminoácidos localizados em torno da cavidade receptora e com o cofator heme. Além disto, um terceiro modo de interação foi analisado, através da introdução de um segundo composto, o óxido

---

nítrico (NO), para verificar novas propostas que foram recentemente publicadas, quanto à contribuição dada por peróxidos para a estabilização da isoniazida e subsequente ativação da proteína. Os resultados iniciais obtidos parecem indicar que o óxido nítrico é um agente promissor e essencial à estabilização da isoniazida com o ferro da protoporfirina e os aminoácidos do sítio ativo.

---

## Abstract

The tuberculosis is one of the diseases afflicting the humanity during centuries. For certain moment it seemed to be controllable. However, during the last years it had a frightful of the tuberculosis, mainly in countries in development and presenting sanitary deficiencies. To fight it, effective antibiotics against its causer, the *Mycobacterium tuberculosis*, are being used, such as isoniazid, ethambutol, rifampicin and pyrazinamide. This compound, a pro-drug, needs to be oxidized to change itself into a metabolic resource. This oxidation can be proceeding from the catalytic enzyme action as the Catalase-Peroxidases (CP's). Based on the crystalline structure of the protein *Mycobacterium Tuberculosis* Catalase-Peroxidase, *mCP*, elucidated by Bertrand et al.,<sup>(16)</sup> computational calculations had been carried out to verify the interactions between isoniazid and the active site of the protein, in the aim to get results contributing for the understanding of the mechanism of action of this ligand with its receptor. The used mathematical methods had been mainly the molecular mechanics, the molecular dynamics, the rigid docking and flexible docking. These calculations are among the ones generically known as molecular modeling. The theoretical coupling between isoniazid and the active site could give important indications about the amino acids composing the active site. Moreover, they could indicate how they are interacting together. When flexible, the docking has the characteristics to indicate all possible orientations that the ligand can assume to activate the enzyme. This work is facilitated by the existence of the protoporphyrin (heme group) in the reception pocket of *mCP* and the previous determination of its position by X-Ray diffraction. It has some proposals about the amino acids composing the *mCP* active site, but, in fact, this is still not well defined. We intend, through our theoretical results, to also propose an active site, and to compare them with those found in the scientific literature. Our models had lead to two preferential ways for those interactions. The first model is constituted by the isoniazid it self, analyzed in relation to the active pocket and the protoporphyrin cofator (heme). In the second model, another cofactor, a NO molecule, was added to this complex and it seems to be essential for the isoniazid stabilization with the iron of the protoporphyrin. The comparisons among the gotten theoretical models had lead to two preferential positions of the isoniazid in the receiving pocket of *mCP* and, therefore, two

---

different interaction ways of the amino acids located around the pocket and its heme cofactor. Moreover, one third way of interaction was analyzed, through the introduction of a compound, the nitric oxide, to verify new proposals that are been published, about the contribution given by peroxides to the isoniazid stabilization and the subsequent protein activation. The gotten initial results seem to indicate that the nitric oxide is a promising and essential agent to induce that stabilization.

---

 Índice

<b>RESUMO</b> .....	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VIII</b>
<b>ÍNDICE</b> .....	<b>X</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>XVI</b>
<b>CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 ASPECTOS HISTÓRICOS INTERNOS AO LEEM SOBRE ESTUDOS TEÓRICOS   RELATIVOS À TUBERCULOSE</b> .....	<b>1</b>
1.2 - TUBERCULOSE .....	1
1.3 – EPIDEMIOLOGIA DA TUBERCULOSE.....	3
1.4 – TRATAMENTO DA TUBERCULOSE.....	5
1.4.1 <i>Isoniazida</i> .....	6
1.4.2 <i>A resistência ao INH</i> .....	7
1.5 MECANISMOS DE AÇÃO .....	8
1.6 CATALASES PEROXIDASES .....	11
1.7 OBJETIVOS PARA O ESTUDO PROPOSTO .....	16
1.8 CONDIÇÕES DO ESTUDO PROPOSTO .....	18
<b>CAPÍTULO 2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS</b> .....	<b>19</b>
2.1 MÉTODOS MATEMÁTICOS .....	20
2.2 - A APROXIMAÇÃO SEMI-EMPÍRICA: PRINCÍPIOS DA MECÂNICA MOLECULAR..	20
2.3 - ALGORITMOS MATEMÁTICOS SISTEMATICAMENTE USADOS NA APROXIMAÇÃO ESCOLHIDA PARA ESTE ESTUDO.....	22
2.4 - OS CAMPOS DE FORÇAS ( <i>FORCE FIELDS</i> ).....	24
2.4.1 - <i>O campo de forças CVFF</i> .....	25
2.4.2 - <i>O campo de forças ESFF</i> .....	27
2.4.3 - <i>Considerações sobre a distribuição de cargas atômicas parciais</i> .....	30
2.5 A DINÂMICA MOLECULAR NEWTONIANA.....	31
2.6 O ANCORAMENTO OU DOCKING .....	33
2.7 ANCORAMENTO FLEXÍVEL ESTUDADO ATRAVÉS DO PROGRAMA AFFINITY .	35
2.7.1 <i>Termos para energia e pênaltis</i> .....	36
2.7.2 <i>Procedimentos para o docking</i> .....	43
2.8.1 <i>O solvente e a constante dielétrica</i> .....	45

<b>CAPÍTULO 3 METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
3.1 <i>METODOLOGIA PARA O RELAXAMENTO ESTRUTURAL DA PROTEÍNA mtCP</i>	
CRISTALINA.....	54
3.1.1 <i>O arquivo original de coordenadas atômicas proveniente do PDB: 1SJ2.....</i>	54
3.1.2 <i>As modificações efetuadas a partir do arquivo original de coordenadas atômicas do</i>	
<i>1SJ2.....</i>	54
3.2 <i>PROCESSO DE RELAXAMENTO DO COMPLEXO ENZIMA: COFATOR HEME: ÁGUAS CRISTALINAS E</i>	
ADICIONADAS .....	56
3.2.1 <i>O que significa “Processo de relaxamento”?.....</i>	56
3.2.2 <i>A estratégia definida para o Processo de Relaxamento. ....</i>	57
3.3  PROCESSO DE RELAXAMENTO DO EDIFÍCIO PROTÉICO POR MECÂNICA MOLECULAR, COM	
MOLÉCULAS DE SOLVENTE EXPLÍCITAS E CONSTANTE DIELÉTRICA ( $\epsilon$ ) IGUAL A 1,0.....	58
<b>3.4  COMPARAÇÕES ENTRE AS ESTRUTURAS CRISTALINA E OTIMIZADA DA PROTEÍNA <i>mtCP</i>. .....</b>	<b>60</b>
3.4.1 <i>Análise pelo alinhamento da seqüência total de aminoácidos.....</i>	60
3.4.2 <i>Análise pelo alinhamento de pequenas seqüências de aminoácidos. ....</i>	61
3.4.3 <i>Algumas considerações intermediárias. ....</i>	63
3.4.4 <i>Análise através da formação de ligações hidrogênio.....</i>	64
3.5  PROCESSO DE RELAXAMENTO COM VARIAÇÕES NAS CONSTANTES DIELÉTRICAS.....	69
3.6  PROCESSO DE RELAXAMENTO DO COMPLEXO ENZIMA: COFATOR HEME: SOLVENTE, COM	
CONSTANTE DIELÉTRICA = $\epsilon$ = 4,0. ....	70
3.7  FORMAÇÃO DE LIGAÇÕES HIDROGÊNIO SOB CONSTANTE DIELÉTRICA 4,0.....	72
3.8  COMPARAÇÃO POR ALINHAMENTO DE SEQÜÊNCIAS ENTRE AS OTIMIZAÇÕES ENERGÉTICAS, SOB	
CONSTANTES DIELÉTRICAS 1,0 E 4,0. ....	74
3.9  A CONSTANTE DIELÉTRICA DE 80 - COMENTÁRIOS .....	78
3.10  FORMAÇÃO DE LIGAÇÕES HIDROGÊNIO SOB CONSTANTE DIELÉTRICA 80,0.....	80
<b>CAPÍTULO 4 ANCORAMENTO RÍGIDO .....</b>	<b>83</b>
4.1.  INTRODUÇÃO.....	84
4.2.  SISTEMA INICIAL.....	84
4.3.  MÉTODO.....	84
4.4.  RESULTADOS.....	86
4.4.1. <i>Processo de otimização de energia.....</i>	86
4.4.2. <i>Interações.....</i>	88
4.5  COMPARAÇÃO ENTRE A PROTEÍNA CRISTALINA E A OTIMIZADA. ....	94
<b>CAPÍTULO 5 O ANCORAMENTO FLEXÍVEL .....</b>	<b>99</b>
5.1.  ESTUDO DA ISONIAZIDA DENTRO DA CAVIDADE DE RECEPÇÃO DO <i>mtCP</i> , POR ANCORAMENTO	
FLEXÍVEL .....	100
5.2.  METODOLOGIA .....	100
5.3.  OS MODELOS OBTIDOS PARA A ORIENTAÇÃO DA ISONIAZIDA NA CAVIDADE DE RECEPÇÃO DO	
<i>mtCP</i> , EM RELAÇÃO À PROTOPORFIRINA .....	100

---

5.2.1	<i>Detalhamento dos modelos quanto às interações efetuadas</i> .....	106
5.4.	RESUMO .....	122
<b>CAPÍTULO 6 O ACOPLAMENTO ENTRE <i>mtCP</i>, HEME, INH E NO.</b> .....		<b>124</b>
6.1.	O ÓXIDO NÍTRICO.....	125
6.2.	METODOLOGIA .....	126
6.2.1.	<i>Etapas de otimização energética do ancoramento do NO.</i> .....	127
6.3.	RESULTADOS .....	127
6.4.	COMPARAÇÃO ESTRUTURAL .....	133
<b>CONCLUSÕES</b> .....		<b>137</b>
7.1.	CONCLUSÕES .....	138
<b>CAPÍTULO 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....		<b>146</b>
8.1.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	147

## Lista de tabelas

---

<i>Tabela 1-1: Estimativa de casos de tuberculose pela Organização Mundial da Saúde em relatório de 2005, referente ao ano de 2003. <sup>(5)</sup></i>	4
<i>Tabela 1-2 : Exemplos de fármacos utilizados no tratamento da tuberculose.</i>	5
<i>Tabela 3-1: Protocolo usado para o relaxamento do sistema estrutural do mtCP sob análise, formado por proteína:cofator heme:solvente.</i>	59
<i>Tabela 3-2: Diferentes contribuições energéticas provenientes da segmentação da equação matemática que compõe o campo de força ESFF.</i>	59
<i>Tabela 3-3: Valores de rmsd resultantes do alinhamento entre as coordenadas atômicas das estruturas cristalina e aquelas correspondentes às sucessivas etapas de minimização durante o processo de relaxamento da mtCP.</i>	60
<i>Tabela 3-4: Comparação por superposição entre as sucessivas etapas de minimização durante o relaxamento da mtCP.</i>	61
<i>Tabela 3-5: Ligações hidrogênio formadas entre a proteína em sua forma cristalina e o cofator heme.</i>	66
<i>Tabela 3-6: Ligações hidrogênio progressivamente formadas entre a protoporfirina e aminoácidos do sitio ativo da mtCP, durante as 2ª e 3ª etapas de otimização energética.</i>	67
<i>Tabela 3-7: Ligações hidrogênio formadas entre a proteína relaxada, a protoporfirina e uma molécula de solvente após a 4ª etapa de minimização.</i>	69
<i>Tabela 3-8- Diferentes contribuições energéticas provenientes da segmentação da equação matemática que compõe o campo de forças ESFF, em tabela comparativa entre os resultados provenientes das constantes dielétricas 1,0 e 4,0.</i>	71
<i>Tabela 3-9: Ligações hidrogênio entre a protoporfirina e proteína mtCP durante a quarta etapa de otimização de energia sob constante dielétrica 4,0.</i>	72
<i>Tabela 3-10 Comparação por rmsd das hélices-alfa presentes na proteína mtCP.</i>	74
<i>Tabela 3-11- Diferentes contribuições energéticas provenientes da segmentação da equação matemática que compõe o campo de forças ESFF.</i>	78
<i>Tabela 3-12: Comparação por superposição entre a estrutura cristalina e as etapas de minimização durante o relaxamento da mtCP sob constante dielétrica 80,0.</i>	79
<i>Tabela 3-13: Ligação hidrogênio entre a protoporfirina e os aminoácidos do sítio ativo formadas durante a segunda e terceira etapas do processo de relaxamento <math>\epsilon = 80,0</math></i>	80
<i>Tabela 4-1: Protocolo de minimização de energia envolvendo os subsets definidos.</i>	85

---

<i>Tabela 4-2: Sumário das contribuições energéticas de cada termo da equação matemática do campo de força usado no processo de minimização de energia durante as etapas 1 e 2 do docking. ....</i>	<i>87</i>
<i>Tabela 4-3: Sumário das contribuições energéticas de cada termo da equação matemática do campo de força usado no processo de minimização de energia durante as etapas 3 e 4 do docking. ....</i>	<i>87</i>
<i>Tabela 4-4: Ligações hidrogênio entre a protoporfirina, a isoniazida e aminoácidos da proteína mtCP, durante as etapas de otimização energética para o docking da isoniazida. ....</i>	<i>93</i>
<i>Tabela 4-5: Comparação por rmsd entre a proteína na forma cristalina e aquela obtida após o docking. ....</i>	<i>94</i>
<i>Tabela 4-6: Comparação do rmsd entre as várias etapas de otimização energética após o docking da isoniazida. ....</i>	<i>94</i>
<i>Tabela 4-7- Comparações por rmsd entre seqüências de 20 aminoácidos da proteína cristalina e a otimizada após o docking do INH. ....</i>	<i>96</i>
<i>Tabela 5-1: Sumário das contribuições energéticas de cada termo da equação matemática do campo de força ESFF usado no processo de otimização de energia após ancoramento do INH, resultando nos modelos 1, 2 e 3. ....</i>	<i>106</i>
<i>Tabela 5-2: Sumário das contribuições energéticas de cada termo da equação matemática do campo de força ESFF usado no processo de otimização de energia após ancoramento do INH, resultando nos modelos 4, 5 e 6. ....</i>	<i>107</i>
<i>Tabela 5-3: Ligações hidrogênio entre a protoporfirina, a isoniazida e aminoácidos da proteína mtCP, após a otimização de energia dos modelos 1, 2 e 3, obtidos por ancoramento flexível. ....</i>	<i>112</i>
<i>Tabela 5-4: Ligações hidrogênio formadas entre a protoporfirina, isoniazida e a cadeia de aminoácidos da proteína mtCP, após a otimização de energia dos modelos 4, 5 e 6 obtidos por ancoramento flexível. ....</i>	<i>117</i>
<i>Tabela 5-5: Comparações por superposição entre seqüências de 20 aminoácidos da proteína cristalina e a otimizada após o docking. ....</i>	<i>120</i>
<i>Tabela 5-6: Distâncias entre o ferro da protoporfirina e átomos específicos da isoniazida em cada modelo orientacional. ....</i>	<i>122</i>
<i>Tabela 6-1: Sumário das contribuições energéticas de cada termo da equação matemática do campo de força ESFF usado no processo de otimização de energia após o ancoramento do NO no modelo 1. ....</i>	<i>128</i>

---

<i>Tabela 6-2: As interações entre a protoporfirina e aminoácidos da proteína mtCP- última etapa de minimização após ancoramento do NO.....</i>	<i>132</i>
<i>Tabela 6-3: Comparações por superposição entre seqüências de 20 aminoácidos da proteína cristalina e a otimizada, após docking do NO.....</i>	<i>134</i>

## Lista de figuras

<i>Figura 1-1: Estrutura da isoniazida.....</i>	<i>7</i>
<i>Figura 1-2: Mecanismo de ação da isoniazida (INH): aquisição de resistência e combate ao stress oxidativo. <sup>(15)</sup> .....</i>	<i>10</i>
<i>Figura 1-5: Os resíduos N-terminais de cada unidade monomérica formam ligações via interações hidrofóbicas que incluem os resíduos (Tyr-28 e Tyr-197) e (Trp-38 e Trp-204).<sup>(16)</sup> .....</i>	<i>12</i>
<i>Figura 1-6 Vizinhança do grupo heme no mtCP.....</i>	<i>13</i>
<i>Figura 2-1: Representação esquemática de um sistema tipo ligante/receptor. <sup>(45)</sup> .....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 2-2 Fluxograma para o docking de Affinity .....</i>	<i>44</i>
<i>Figura 3-1: Estrutura cristalina do Mycobacterium tuberculosis catalase-peroxidase.....</i>	<i>55</i>
<i>Figura 3-2: Regiões carboxi-terminal e amino-terminal, respectivamente, mostrando as interações com as moléculas de água que se situam nas proximidades e contribuem para a manutenção do edifício estrutural. ....</i>	<i>61</i>
<i>Figura 3-3: Alinhamento estrutural indicando os bons resultados obtidos após o processo de relaxamento <sup>(7)</sup>. A) A porção amino-terminal relaxada, com inclusão de solvente. B) A porção carboxi-terminal coesa com a estrutura cristalina. C) Coesão das estruturações mais externas.....</i>	<i>62</i>
<i>Figura 3-4: Conformações da protoporfirina: a) em sua forma cristalina; b) após ação do campo de força ESFF, no processo de relaxamento.....</i>	<i>63</i>
<i>Figura 3-5 – Interações fortes entre o grupo heme e os resíduos His-270, Lys-274, His-276 e Ser-315 que ocorrem no cristal.....</i>	<i>65</i>
<i>Figura 3-6: Ocorrência de interações entre o grupo heme e aminoácidos do sítio ativo durante a segunda, terceira e quarta etapa do processo de relaxamento, respectivamente.....</i>	<i>68</i>
<i>Figura 3-7 Alinhamento estrutural das seqüências [Gly-24-Ser-446] da estrutura cristalina da proteína mtCP e das duas estruturas relaxadas, sob constantes dielétricas 1,0 e 4,0. ....</i>	<i>70</i>
<i>Figura 3-8: Interações fortes entre o grupo heme e os aminoácidos Arg-104, Lys274, His-276 e Ser-315 que ocorreram durante a quarta etapa de minimização energética (e = 4,0). ....</i>	<i>73</i>
<i>Figura 3-9 Comparação por alinhamento entre as hélices-alfa da proteína cristalina e da relaxada, com constante dielétrica 1,0. ....</i>	<i>75</i>
<i>Figura 3-10: Comparação por alinhamento das hélices-alfa da proteína cristalina e da relaxada, com constante dielétrica 4,0. ....</i>	<i>76</i>

---

<i>Figura 3-11: Comparação por superposição entre as coordenadas atômicas das estruturas cristalina e relaxada do mtCP, durante as sucessivas etapas de minimização.</i>	77
<i>Figura 3-12- Alinhamento estrutural das seqüências [Gly24-Ser446] da estrutura cristalina da proteína mtCP e de sua estrutura relaxada, sob constante dielétrica 80,0.</i>	79
<i>Figura 3-13: Ligações hidrogênio formadas entre o grupo heme e a His-276 durante o processo de relaxamento, sob constante dielétrica 80,0.</i>	80
<i>Figura 3-14 Contornos de potenciais eletrostáticos a + e - 0.2 kcal/mol/e calculados para o sistema mtCP, com coordenadas cristalinas; e após processo de relaxamento, sob constantes dielétricas 1 e 4, em água. As nuvens positivas encontram-se em azul e as negativas, em vermelho.<sup>(*)</sup></i>	81
<i>Figura 41 : Ligações feitas entre os aminoácidos Tyr-229 e Met-255 e entre os aminoácidos Tyr-229 e o Trp-107 na estrutura cristalina do mtCP.</i>	88
<i>Figura 42 - Ligações feitas entre os aminoácidos Tyr-229 e Met-255 e entre os aminoácidos Tyr-229 e o Trp-107 na estrutura minimizada do mtCP após o docking da isoniazida.</i>	89
<i>Figura 4-3: (A) Etapa 1 do docking da isoniazida com a proteína mtCP. (B) Etapa 2.</i>	92
<i>Figura 4-4: Superposição de seqüências do mtCP cristalino, em laranja, e da estrutura otimizada, em verde, após docking do INH. A) Região amino-terminal, compreendendo a seqüência [Gly-24-Ala-65]. B) [GLN190-Asp-215]. C) [Gly-297-ILE317]. D) [Gly-360-Thr-380]. E) Região carboxi-terminal, que compreende a seqüência [Val-423-Ser-446].</i>	97
<i>Figura 5-1- Principais orientações da isoniazida em relação à protoporfirina provenientes dos cálculos efetuados por ancoramento flexível (Modelos 1 a 4 e 6 e, por complementação manual, o modelo 5: A) Modelo 1; B) Modelo 2; C) Modelo 3; D) Modelo 4; E) Modelo 5; F) Modelo 6.</i>	104
<i>Figura 5-2 Superfície de Connolly (em amarelo) para os aminoácidos que definem a cavidade receptora, calculada a 12Å a partir do átomo de ferro.</i>	105
<i>Figura 5-3 Ligações hidrogênio formadas entre o mtCP, a isoniazida e a protoporfirina no modelo orientacional 1.</i>	109
<i>Figura 5-4 Ligações hidrogênio formadas entre o mtCP, a isoniazida e a protoporfirina no modelo orientacional 2.</i>	110
<i>Figura 5-5: Ligações hidrogênio formadas entre o mtCP, a isoniazida e a protoporfirina no modelo 3.</i>	111

---

<i>Figura 5-6 Ligações hidrogênio formadas entre o mtCP, a isoniazida e a protoporfirina no modelo orientacional 4.</i>	113
<i>Figura 5-7 Ligações hidrogênio ocorridas entre o mtCP, a isoniazida e a protoporfirina no modelo orientacional 5.</i>	114
<i>Figura 5-8: Ligações hidrogênio formadas entre o mtCP, a isoniazida e a protoporfirina no modelo orientacional 6.</i>	115
<i>Figura 5-9: Interações entre a isoniazida e o ferro da protoporfirina.</i>	119
<i>Figura 5-10: Distâncias entre o ferro da protoporfirina e a isoniazida. A) Modelo 1. b) Modelo 3. C) Modelo 5.</i>	121
<i>Figura 5-11: Interações no modelo 6</i>	123
<i>Figura 6-1: Ligações covalentes entre os aminoácidos Trp-107, Tyr-229 e Met-255 formando um aduto: A) na forma cristalina da proteína mtCP. B) na forma otimizada após docking da isoniazida e do NO.</i>	129
<i>Figura 6-2: Interações entre o ferro da protoporfirina, o NO e a isoniazida.</i>	130
<i>Figura 6-3: Ligações hidrogênio no sítio ativo do mtCP após inserção do NO.</i>	131
<i>Figura 7-1: Mecanismo de oxidação da isoniazida(Piarattelli)<sup>52</sup></i>	142
<i>Figura 7-2: Mecanismo de reação da oxidação da isoniazida.</i>	143
<i>Figura 7-3: Mecanismo de oxidação da isoniazida em um potencial sítio ativo da proteína mtCP</i>	144

## Lista de Abreviaturas

ACP –	Acyl Carrier Protein
CFF91 –	Consistent Force Field 91
CVFF –	Consistent Valence Force Field
CP –	Catalase Peroxidase
ESFF –	Extended Systematic Force Field
HIV –	Human Immunodeficiency Virus
inhA –	Enoil-ACP reductase
INH -	Isoniazida
LEEM -	Laboratório de Estudos Estruturais Moleculares
<i>mt</i> –	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>mt</i> CP –	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Catalase Peroxidase
RIF –	Rifampicina
<i>Rmsd</i> –	<i>root means square deviation</i>
TB –	Tuberculose

# Capítulo 1 Introdução e objetivos

## 1.1 ASPECTOS HISTÓRICOS INTERNOS AO LEEM SOBRE ESTUDOS TEÓRICOS RELATIVOS À TUBERCULOSE

Estudos teóricos relativos a agentes tuberculostáticos desenvolvidos no Laboratório de Estudos Estruturais Moleculares - LEEM, coordenado pela Profa. Elaine Maia, tiveram início em torno de 1997, em colaboração científica com a equipe do Prof. André Luís Gemal, da UFRJ e da FioCruz/RJ. Em seguida, dentro de um projeto maior, com diversas instituições integrantes, foi aprovado o projeto NÚCLEO DE PESQUISA EM CONTROLE DE TUBERCULOSE (NUCONT), junto ao Pronex/CNPq, processo nº 661028/1998-4, sob a coordenação geral do Profº. André Gemal. Os ex-alunos de iniciação científica da Prof. Elaine Maia, Elaine F.F. Cunha e Teodorico Ramalho, que já haviam tido a introdução científica neste tema no LEEM, ganharam bolsa de mestrado para o Rio de Janeiro e deram continuidade ao trabalho, completa (Elaine Cunha) ou parcialmente (Teodorico), junto ao Prof. Ricardo Bicca de Alencastro, da UFRJ. Diversos trabalhos e comunicações em congresso comprovam a produtividade desta colaboração,<sup>(1-3)</sup> que continuou evoluindo, com novos colaboradores e alunos de pós-graduação da UnB e, também, através do presente trabalho, desenvolvido tendo em vista a obtenção do título de Mestre em Química.

## 1.2 - Tuberculose

A **tuberculose (TB)** é uma infecção bacteriana causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*. Esta bactéria pode atuar em vários órgãos do corpo humano, como ossos, cérebro e, principalmente, pulmão.

A tuberculose pulmonar pode ser caracterizada como primária ou secundária. A primária resulta da infecção inicial com bacilos da tuberculose,

---

1 – CUNHA, E.F.F., et al. **Expert Opin. Ther. Patents**, 15(2005)

2 – CUNHA, E.F.F., RAMALHO, et al. **Journal BioMol. Struct. Dyn.**, 22:2, 2004

3 - CUNHA, Elaine Ferreira Fontes. Dissertação( Mestrado em Química, 2002.

sendo mais freqüente nas zonas média e baixa dos pulmões, principalmente em crianças.

As lesões formadas após a infecção são usualmente periféricas e acompanhadas pela linfadenopatia paratraqueal ou hilar, que pode não ser detectada por radiografia. A maioria destas lesões se cura espontaneamente podendo, posteriormente, se transformar em nódulos calcificados (lesão de Ghon).<sup>(4)</sup>

Em crianças e pessoas com baixa imunidade, a tuberculose primária pode progredir rapidamente para enfermidade clínica, quando as lesões iniciais crescem em tamanho e podem envolver diferentes vias. A efusão pleural, bastante freqüente, resulta da penetração do bacilo no espaço pleural através do foco subpleural adjacente. Em casos severos, o sítio primário rapidamente se amplia. Estas porções centrais submetem-se a necrose, e cavitações finas são desenvolvidas (tuberculose primária progressiva). Em crianças, a tuberculose causa invariavelmente obstrução e subsequente segmentação ou colapso lombar, podendo ser causa de enfisemas e bronquiestasias. Os bacilos podem entrar na corrente sanguínea através de lesões pulmonares ou de linfonodos e se disseminar em vários órgãos podendo produzir lesões granulomatosas. Em pessoas imunossuprimidas pode se desenvolver tuberculose *miliari* e/ou tuberculose meningítica.<sup>(4)</sup>

A tuberculose secundária ou reativada, também chamada de tipo adulto, resulta de reativação endógena de infecção latente e é usualmente localizada nos segmentos apicais e posteriores dos lobos pulmonares, onde a alta concentração de oxigênio favorece o crescimento do *Mycobacterium*. A formação de cavidades contendo necrose está associada às vias aéreas, resultando em lesões satélites com a possibilidade de voltar a formar cavidades. O envolvimento maciço dos segmentos pulmonares e lobos, com a coalescência das lesões forma a pneumonia tuberculosa que, em poucas semanas ou meses após o seu aparecimento, causa morte de 1 em 3 casos não tratados. São possíveis outros processos de remissão espontâneos, ou processos de cronicidade, via debilitação progressiva. Nestas circunstâncias, muitas lesões pulmonares se tornam

fibróticas e podem posteriormente se calcificar, mas as cavidades persistem em outras partes do pulmão.<sup>(4)</sup>

### 1.3 – Epidemiologia da Tuberculose

Estima-se que um terço da população do planeta esteja atingida por tuberculose. Esta população encontra-se essencialmente localizada na África subSaariana, na Ásia e na América do Sul, mas, devido à incidência do HIV, houve recrudescência de TB em países desenvolvidos. Em estatísticas de 1995, quinze milhões de indivíduos estavam infectados pelo HIV e, um terço destes estavam, igualmente, infectados pelo *Mycobacterium*. Destes, 70% localizavam-se na África sub-Saariana, 20% na Ásia e 8% na América Latina e no Caribe. Do total mundial, nove milhões foram identificados como novos casos de tuberculose. Houve três milhões de mortos, dos quais 25% foram considerados como “mortes evitáveis” por terem ocorrido em países em desenvolvimento. Dentre as mortes, 75% vinham de grupos em idade produtiva (15-50 anos).<sup>(5)</sup>

Desde aquela época, dez anos já passaram, a Organização Mundial de Saúde (OMS), através de programas para o controle da tuberculose, tem lutado incessantemente para a redução de sua morbidade, da taxa de mortalidade e sua transmissão. Em seu relatório de 2005<sup>(5)</sup>, onde as estatísticas relativas a 2003 foram publicadas, a OMS identificou 8,8 milhões de novos casos de TB (140 casos /população de 100 000), dos quais 674 000 (11/100 000) estavam infectados pelo vírus do HIV. Houve 15,4 milhões de casos prevalentes (245/100 000) e uma população estimada em 1.7 milhões de pessoas (28/100 000) morreu de TB em 2003, incluindo aqueles co-infectados pelo HIV (229 000).

Os gastos atuais com as tentativas de controle da tuberculose no mundo são imensos, e causam ainda maior impacto em países não desenvolvidos ou em desenvolvimento, onde a renda *per capita* é muito baixa ou mal distribuída. Faz-se necessário a continuidade da ação dos governos com medidas preventivas para o combate à tuberculose, como tem sido feito, mas também, que se pesquisem intensamente novos inibidores e novas terapias de menor duração.

A Tabela 1-1 mostra os casos estimados de tuberculose, segundo a OMS, em relatório de 2005, referindo-se ao ano de 2003. O Brasil aparece com uma estimativa de casos de aproximadamente 110 mil, dos quais 0,9% apresentariam

resistência múltipla a antimicrobianos. Este percentual de resistência é similar àquele apresentado pela Inglaterra e Irlanda do Norte, para os quais, dentre os 7000 casos repertoriados, 0,8% apresentam resistência a antimicrobianos. As populações da Inglaterra e Irlanda do Norte (7,5 e 1,7 milhões de habitantes, respectivamente, teriam, juntas, cerca de 7,7% de tuberculosos). Estes dados são números absolutos dos países relacionados, e não indicam as diferenças entre as várias regiões dentro do mesmo país. As estimativas indicadas na Tabela 1-1 representam cerca de 6% da população brasileira, considerando-se uma população de 187.800.000 de habitantes, enquanto que a Índia, com população de 1,029 bilhão de habitantes (em 2001), e a China, com 1,265 bilhão de habitantes (em 2000), teriam cerca de 17% e 10% de pessoas contaminadas pela tuberculose, respectivamente.

**Tabela 1-1:** Estimativa de casos de tuberculose pela Organização Mundial da Saúde em relatório de 2005, referente ao ano de 2003. <sup>(5)</sup>

País	Casos totais	Casos - HIV -EV	Casos de resistência a multifármacos (%) total
Argentina	17.024	16.630	4,6
Austrália	1.128	1.107	1,0
Bolívia	19.849	19.769	1,2
<b>Brasil</b>	<b>110.319</b>	<b>107.758</b>	<b>0,9</b>
Chile	2.492	2.361	0,4
China	1.334.066	1.328.354	7,7
Colômbia	23.126	22.493	0,5
Cuba	1.216	1.214	0,0
Dinamarca	429	418	0,5
Equador	17.995	17.801	4,0
França	7.257	6.881	0,0
Índia	1.788.043	1.725.230	3,4
Japão	39.927	39.816	0,8
Paraguai	4.115	4.041	3,2
Peru	50.957	49.936	3,1
Inglaterra e Irlanda do Norte	7.056	6.952	0,8
EUA	13.409	12.403	1,2
Uruguai	940	928	0,0
Venezuela	10.711	10.442	0,0
Zâmbia	70.975	42.890	1,8
Zimbábue	85.015	43.705	1,9

## 1.4 – Tratamento da Tuberculose

O tratamento farmacológico de portadores de TB é restrito a poucos fármacos que têm função bacteriostática ou bactericida, conforma o quadro abaixo<sup>(6)</sup>. A ação bacteriostática inibe o crescimento da bactéria, enquanto a ação bactericida causa a morte do microorganismo.

**Tabela 1-2 :** Exemplos de fármacos utilizados no tratamento da tuberculose

Fármacos de 1º linha	Forma de ação <sup>(6,7)</sup>
Rifampicina	Bacteriostático e bactericida
Etambutol	Bacteriostático
Isoniazida	Bacteriostático e bactericida
Pirazinamida	Bactericida
Estreptomicina	Ação supressiva. Não erradica o <i>Mycobacterium</i>

Os fármacos usados no tratamento da tuberculose podem ser divididos em dois grandes grupos.

Os agentes de primeira linha com alto nível de eficácia e aceitáveis graus de toxicidade são: isoniazida, rifampicina, etambutol, estreptomicina e pirazinamida. A maioria dos pacientes de tuberculose pode ser tratada eficazmente com estes fármacos. Bons resultados parecem ser conseguidos com tratamento de 6 meses de duração, sob prescrição de isoniazida, rifampicina e pirazinamida durante os dois primeiros meses e, em seguida, apenas isoniazida e rifampicina. A administração de isoniazida e rifampicina por 9 meses constitui, também, uma terapia efetiva quando o *M. tuberculosis* é susceptível a estes fármacos.<sup>(8)</sup>

Ocorrendo resistência adiciona-se ao tratamento fármacos de segunda linha como (ofloxacina, ciprofloxacina, etionamida, ácido aminosalicílico, cicloserina, amicacina, canamicina) entre outros.<sup>(9)</sup>

9 – BASS, J.B., et al. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 1994

10 – ISEMAN, M.D. **N. Engl. J. Med.**, 1993

11 – FOX, H.H. **Trans. N.Y. Acad. Sci.**, 1953

A duração do tratamento é muito longa, variando de 6 meses a 2 anos. Quando a infecção é reincidente, o tempo de tratamento pode ser ainda maior fazendo com que os pacientes o interrompam, o que vem causando nos últimos anos um aumento progressivo de bacilos resistentes aos antimicrobianos disponíveis.<sup>(7)</sup>

O tratamento falho é definido por culturas continuadas ou recorrentes em pacientes que recebem quimioterapia. Estudos feitos demonstram que 90-95% dos pacientes com TB pulmonar, susceptíveis aos fármacos contra tuberculose tiveram cultura negativa após 3 meses de tratamento com isoniazida e rifampicina.<sup>(10)</sup> A caracterização do tratamento como falho é feita após 4 meses de tratamento, se a cultura ainda for positiva. No entanto, a falha pode ocorrer após os 4 meses iniciais. As principais razões a esta ocorrência são: a não adesão ao regime de tratamento pelo paciente; a má absorção dos fármacos; a resistência adquirida aos fármacos; a re-infecção e, finalmente, a um regime de tratamento inadequado.

### 1.4.1 Isoniazida

Após 1945, exames de compostos relacionados à nicotinamida revelaram que muitos derivados piridínicos possuíam atividade tuberculostática, junto com congêneres do ácido isonicotínico.<sup>(11)</sup> Descoberta em 1952, a Isoniazida é, ainda hoje, considerada um fármaco primário na quimioterapia da tuberculose. Tem por sigla mais corrente o INH, sua fórmula química é  $C_6H_7N_3O$  e seu peso molecular é de  $137,14g.mol^{-1}$ . Na nomenclatura química é o hidrazida ácido 4-piridinocarboxílico, ou, hidrazina do ácido isonicotínico. O composto é conhecido, ainda, sob diversos nomes genéricos, em inglês: dinacrin; ditubin, isolyn; niconyl; nydrazid; rimifon; tyvid, ... Sua estrutura é mostrada na Figura 1-1. Exerce uma ação bacteriostática, nos bacilos em repouso, e bactericida, para microorganismos em rápida divisão, como nos bacilos intracelulares.

---

7 – CURRY, Francis J.. **Drug Resistant Tuberculosis 2004**

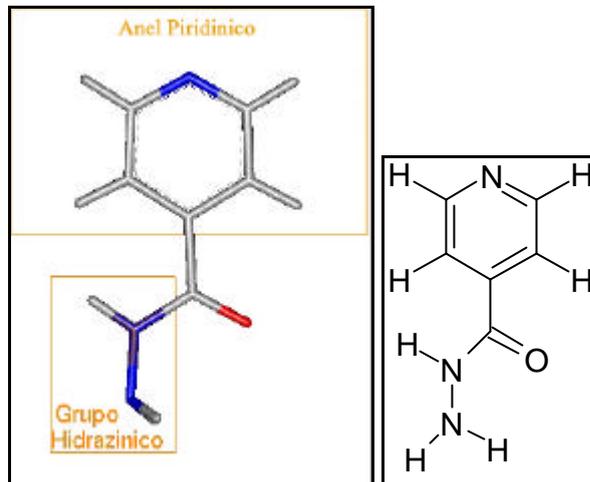
10 – **Harrison's Online**. 2005

11 – FOX, H.H. **Trans. N.Y. Acad. Sci.**, 1953

12 – BLANCHARD, J.S. **Annu. Rev. Biochem.**, 65(1996)

Sua ação é altamente efetiva para o tratamento experimental de tuberculose induzida em animais e é significativamente superior àquela da estreptomicina.<sup>(12)</sup>

Figura 1-1: Estrutura da isoniazida



Em azul são mostrados os átomos de nitrogênios e, em vermelho, o oxigênio. Tanto os carbonos, quanto os hidrogênios da molécula foram colocados em cinza.

Patente registrada sob o número US 56.88.639, de 1997.

Número CAS: 54-85-3.

#### 1.4.2 A resistência ao INH

Mutantes com resistência ao INH são facilmente selecionados quando bacilos de tuberculose são cultivados *in vitro* sob crescentes concentrações de isoniazida. Mutações detectadas sobre as catalases-peroxidases resultam nos mecanismos mais comuns que resultam em resistência à ação da isoniazida, pois diminuem sua atividade, prevenindo a conversão do pró-fármaco INH em seu metabólito ativo.<sup>(13)</sup> Isto foi confirmado pela descoberta que o gene simples *katG* codifica uma Catalase-peroxidase ativa (CP), aumentando a sensibilidade do *Mycobacterium tuberculosis* ao INH. A proteína processada a partir deste gene é chamada *mtKatG*.<sup>(14)</sup>

13 – BANERJEE A., et al. **Science**, 263(1994)

14 – KAPETANAKI, Sofia M., et al. **Biochemistry**, 44 (2005)

A resistência à isoniazida já foi mapeada por mutações em cinco diferentes genes do *Mycobacterium tuberculosis*:<sup>(8,15)</sup>

katG	catalase peroxidase;
inhA	Enoil-ACP reductase;
<i>oxyR-ahpC</i>	Alquil hidro-reductase ;
kasA	β-Cetoacil acil carrier da proteína sintetase;
ndh	NADH dehidrogenase.

E, em relação a outros fármacos, os genes que conferem resistência frente ao *Mycobacterium tuberculosis* são:<sup>(15)</sup>

Rifampicina	<i>rpoB</i>	subunidade β do RNA polymerase;
INH-Etionamida	<i>inhA</i>	Enoil-ACP reductase;
Estreptomicina	<i>rpsL</i>	Proteína Ribosomica S12;
	<i>Rrs</i>	16s rRNA;
Fluoroquinolona	<i>gyrA</i>	DNA girase;
Pirazinamida	<i>pncA</i>	Amidase;
Etambutol	<i>embCAB</i>	EmbCAB.

## 1.5 MECANISMOS DE AÇÃO

O mecanismo de ação da isoniazida ainda é mal conhecido mas pensa-se que a catalase-peroxidase do *mycobacterium* a transforma num composto biologicamente ativo, que tem capacidade de inibir a síntese dos ácidos micólicos que fazem parte da parede da micobacteria. O seu alto grau de selectividade

15 –ASHOK R. et al. **Emerging Infectious Disease**, 1998

16 – BERTRAND, Thomas et al. **J. Biol. Chem.**, 279(2004)

17 – GANDE, Roland, et al. **J. Biol. Chem.**, 279(2004)

pode ser explicado pelo fato de se existir unicamente ácidos micólicos nas micobacterias.

A isoniazida necessita ser ativada por uma enzima presente no *Mycobacterium tuberculosis* (*mt*), a catalase peroxidase (CP). As Catalase-Peroxidases (CPs) são enzimas bifuncionais, heme-dependentes, que exibem uma forte atividade catalítica comparável com uma catalase monofuncional e um amplo espectro de atividade peroxidativa. O propósito desta enzima é proteger a bactéria de moléculas tóxicas incluindo hidroperóxidos e radicais hidroxílicos que estão presentes em meio aeróbico.<sup>(16)</sup>

A ação da isoniazida na forma ativa parece estar ligada, como já mencionado, à inibição da síntese do ácido micólico. Há evidências preponderantes que o alvo primário do fármaco seja o *inhA*. O gene *inhA* codifica a enoil-ACP redutase da sintetase II do ácido graxo, o qual converte ácidos graxos  $\Delta$ -insaturados em saturados por via biossintética do ácido micólico.<sup>(17)</sup> Como o ácido micólico é único para bactérias, isto explicaria a degradação da seletividade da atividade antimicrobiana da isoniazida.

Ácidos micólicos são longas cadeias de ácidos graxos com substituintes alquila no carbono  $\alpha$  e uma hidroxila na posição  $\beta$  ( $\alpha$ - alquil- $\beta$ -hidroxilatos), ou são  $\beta$ -hidroxi-ácidos de cadeia longa, com um substituinte alquila ( $R'$ ) no carbono  $\alpha$ ; ( $R$ -CH(OH)-CH( $R'$ )-COOH), onde o  $R$  representa a cadeia mesomicolato. No caso do *M. tuberculosis* consiste em uma estrutura com mais de 56 carbonos.  $R'$  representa uma cadeia alifática mais curta, possuindo 22 a 26 carbonos. Estas duas cadeias são condensadas *via* condensação de Claisen enzimática especializada, justificada pela redução da quantidade de ácidos micólicos maturados. Ocasionalmente, os ácidos micólicos podem ser encontrados na parede lipídica celular bacteriana, livres, ou ligados à glucose ou à trealose. Acredita-se que os ácidos micólicos e seus derivados são cruciais para o desenvolvimento da arquitetura do envelope celular de bactérias.<sup>(18,19)</sup>

---

15 – ASHOK R. et al. **Emerging Infectious Disease**, 1998

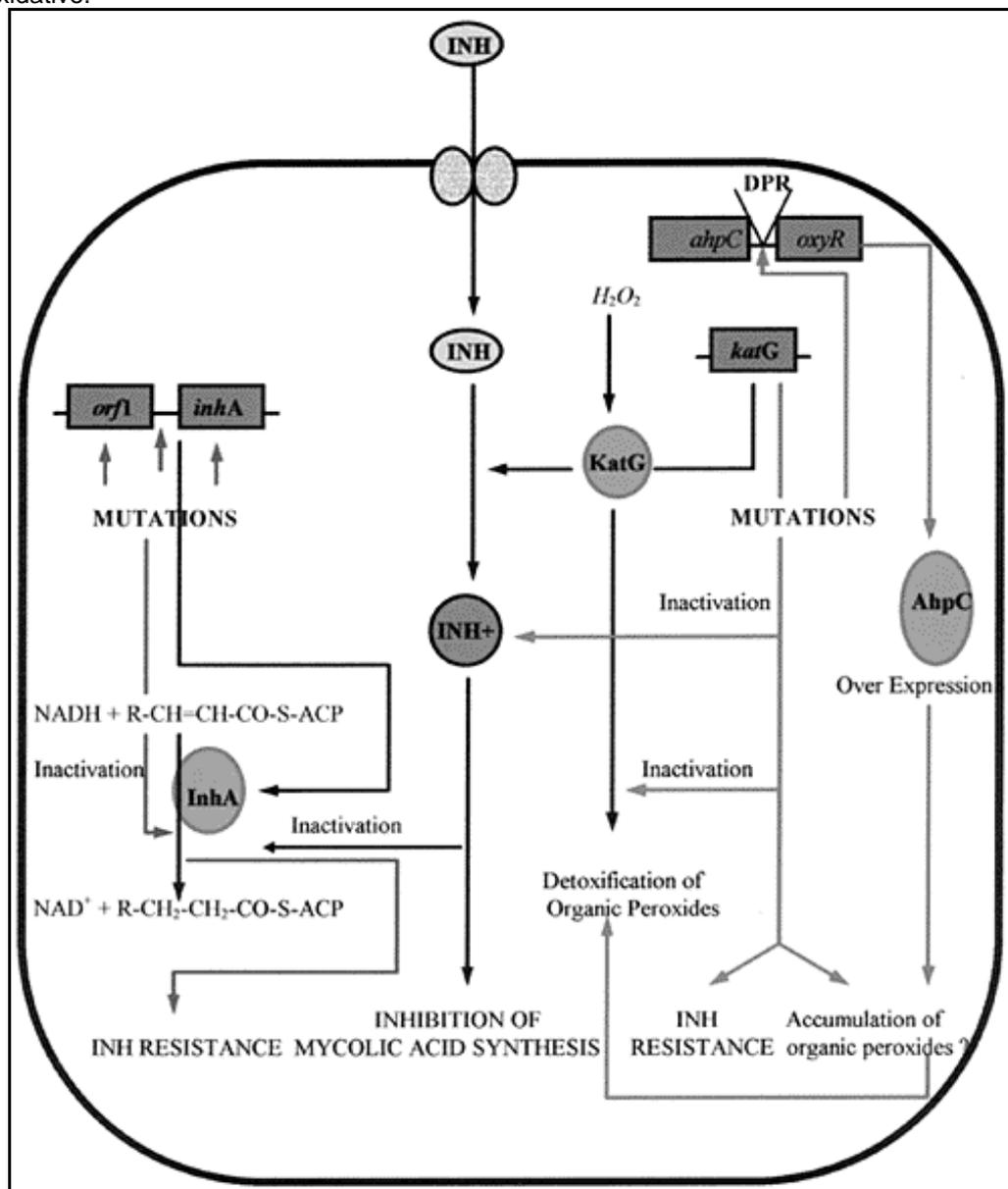
18 – VILCHEZE, C., et al. **Journal of Bacteriology**.182( 2000)

19– FLOSS, Heinz G.; YU, Tin-Wein. **Chem. Rev.** 105 ( 2005)

20 – SHINGADIA, Delane; NOVELLI, Vas. **Infectious Diseases** 2003

O *M. tuberculosis* é caracterizado por um número excepcionalmente alto de lipídios e glicolipídios, os quais estão ligados à sobrevida do *Mycobacterium* no meio ambiente. Tais lipídios podem vir a ser alvos potenciais para novos fármacos no combate à tuberculose. A rica diversidade dos lipídios presentes no *M. tuberculosis* é refletido pelo alto número de genes de seu genoma envolvido na biossíntese de lipídios.<sup>(20)</sup> A Figura 1-2 reproduz um mecanismo de ação proposto para explicar a resistência à ação deste fármaco.

**Figura 1-2:** Mecanismo de ação da isoniazida (INH): aquisição de resistência e combate ao *stress* oxidativo.<sup>(15)</sup>



15 – ASHOK R. et al. **Emerging Infectious Disease**, 1998

18 – VILCHEZE, C., et al. **Journal of Bacteriology**.182( 2000)

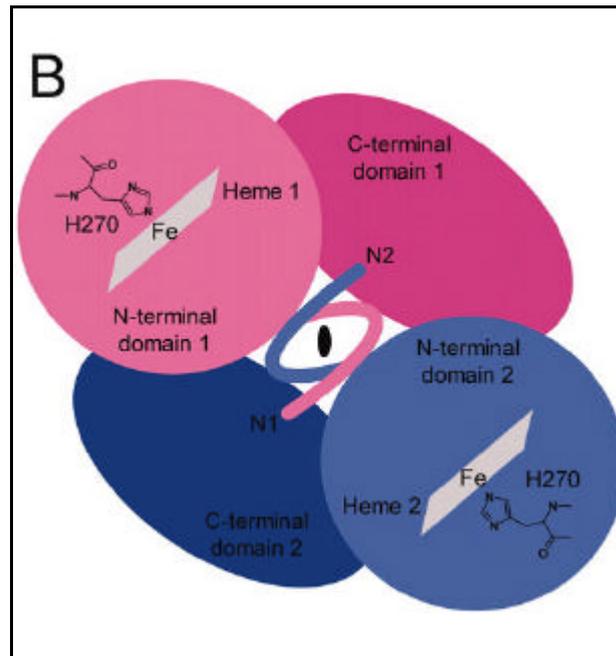
19– FLOSS, Heinz G.; YU, Tin-Wein. **Chem. Rev.** 105 ( 2005)

20 – SHINGADIA, Delane; NOVELLI, Vas. **Infectious Diseases** 2003

## 1.6 Catalases peroxidases

Catalases peroxidases (CP's) são geralmente homodímeros ou homotetrâmeros com subunidades em torno de 80kDa (Figura 1-3).

**Figura 1-3** Representação esquemática do homodímero<sup>(16)</sup>



Nos homotetrâmeros há dois ligantes heme localizados nos domínios N terminais e a ativação está associada à molécula heme. A cadeia polipeptídica simples contém dois domínios, cada um com aproximadamente 40kDa. Análise de seqüência mostra que o domínio N-terminal contém um motivo *heme ligante*, enquanto o domínio C-terminal perde esta característica. Apesar da forte atividade catalítica mostrada pelas CP's, as seqüências de aminoácidos já analisadas não apresentam homologia com catalases. Todavia, alguns domínios nas CP's mostram alta homologia seqüencial com o citocromo-C peroxidase e a peroxidase de ascorbato de fungos. As CP's são, por isso, classificadas inicialmente na superfamília de peroxidases de classe I de plantas, fungos e bactérias. <sup>(21)</sup>

15 – ASHOK R. et al. **Emerging Infectious Disease**, 1998

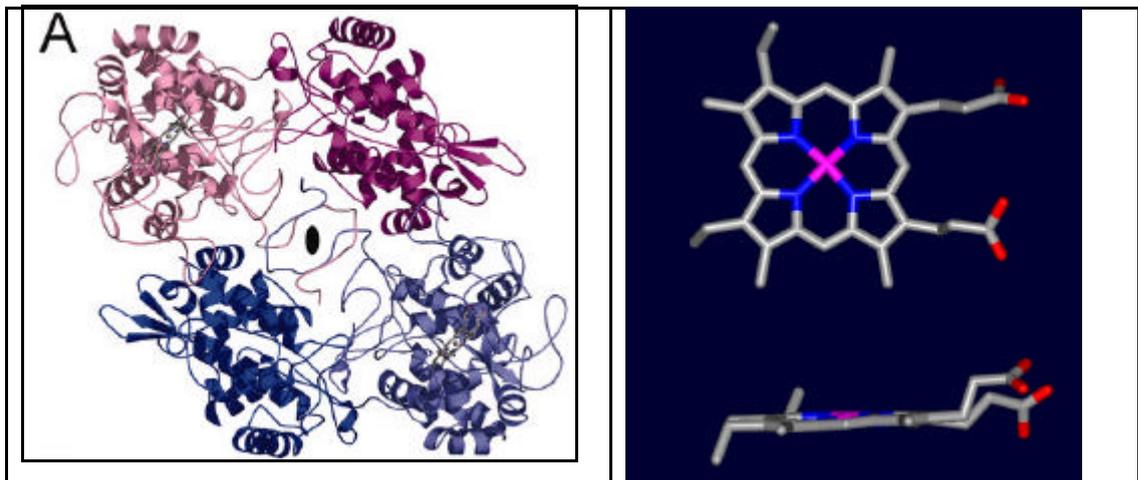
18 – VILCHEZE, C., et al. **Journal of Bacteriology**.182( 2000)

19– FLOSS, Heinz G.; YU, Tin-Wein. **Chem. Rev.** 105 ( 2005)

20 – SHINGADIA, Delane; NOVELLI, Vas. **Infectious Diseases** 2003

Thomas Bertrand et al.,<sup>(16)</sup> em 2004, publicaram a estrutura do *Mycobacterium tuberculosis* Catalase-Peroxidase, determinada por difração de raios-X. Nas Figuras 1-4 e 1-5 encontram-se a disposição relativa das cadeias do mtCP no cristal, e seus domínios C e N-terminais, assim como o grupo heme.

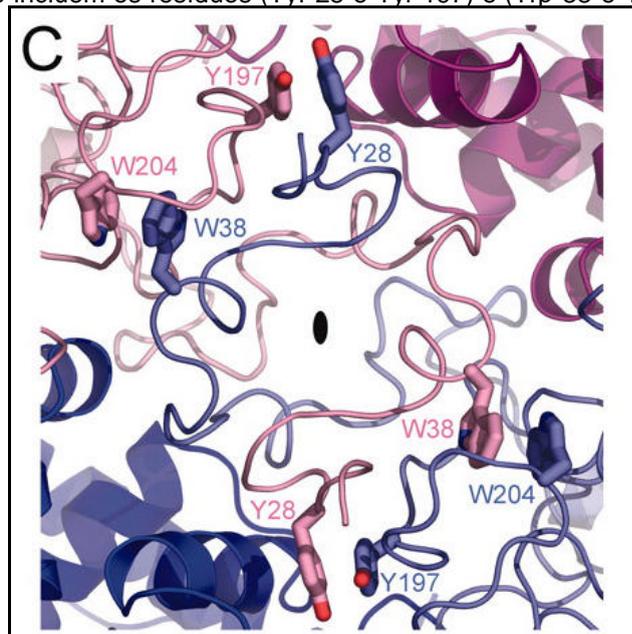
**Figura 1-4:** Estrutura global do homodímero do mtCP e a estrutura do grupo heme.



À esquerda: A sub-unidade 1 está representada em rosa. O domínio N-terminal encontra-se em rosa claro e o C-terminal, em rosa escuro. A sub-unidade 2 está em azul. O domínio N-terminal encontra-se em azul claro e o C-terminal, em azul escuro. Os dois grupos heme nos domínios N-terminal estão representados pela cor cinza.

À direita: Estrutura da protoporfirina. Em rosa encontra-se o átomo de ferro. Em azul, os átomos de nitrogênio, em vermelho, os átomos de oxigênio e, em cinza, os átomos de carbono.

**Figura 1-5:** Os resíduos N-terminais de cada unidade monomérica formam ligações via interações hidrofóbicas que incluem os resíduos (Tyr-28 e Tyr-197) e (Trp-38 e Trp-204).<sup>(16)</sup>



16 – BERTRAND, Thomas et al. *J. Biol. Chem.*, 279(2004)

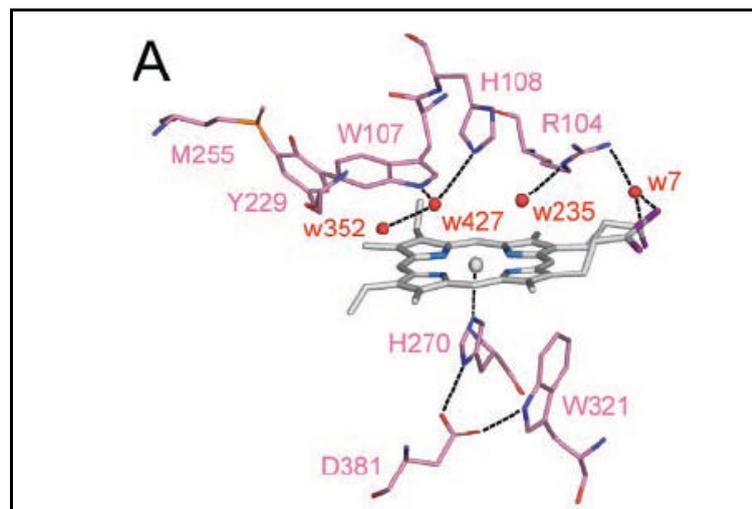
21 – BHAKTA, Sanjib, et al, *JEM*.2004

22 – Yamada, Y., et al. *Nat. Struct. Biol.*,4(2002)

A estrutura terciária do *mtCP* indica uma semelhança com outras proteínas como *Haloarcula Marismortui* Catalase Peroxidase (*hmCP*)<sup>(22)</sup> e *Burkholderia pseudomallei* Catalase-Peroxidase (*bpCP*). Os resíduos do sítio ativo são conservados e bem alinhados nas três estruturas, e há poucas diferenças nos arranjos tridimensionais da cadeia polipeptídica. Há uma região no *mtCP*, formada pela seqüência [278-312], cuja estrutura secundária tem a forma de laço (*loop*), que encontra seu similar em outras CP's. No *bpCP*, este laço parece fazer parte de um sítio ligante, onde o INH poderia interagir com a enzima. Outras pesquisas, no entanto, sugerem que este laço, no *mtCP*, não faça parte do principal sítio ligante para o INH.

Em torno da protoporfirina complexada ao *mtCP* há alguns elementos estruturais que tipificam as enzimas CP da família de peroxidase de classe I. Há aminoácidos que são conservados nas estruturas de várias CP's. São eles: na porção distal, Arg-104, Trp-107 e His-108 e na porção proximal a His-270, o Trp-312 e o Asp-381 (Figura 1-6). Nesta publicação que usamos por referência,<sup>(16)</sup> o sítio ativo proposto e sua vizinhança foram bem detalhados.

**Figura 1-6** Vizinhança do grupo heme no *mtCP*.



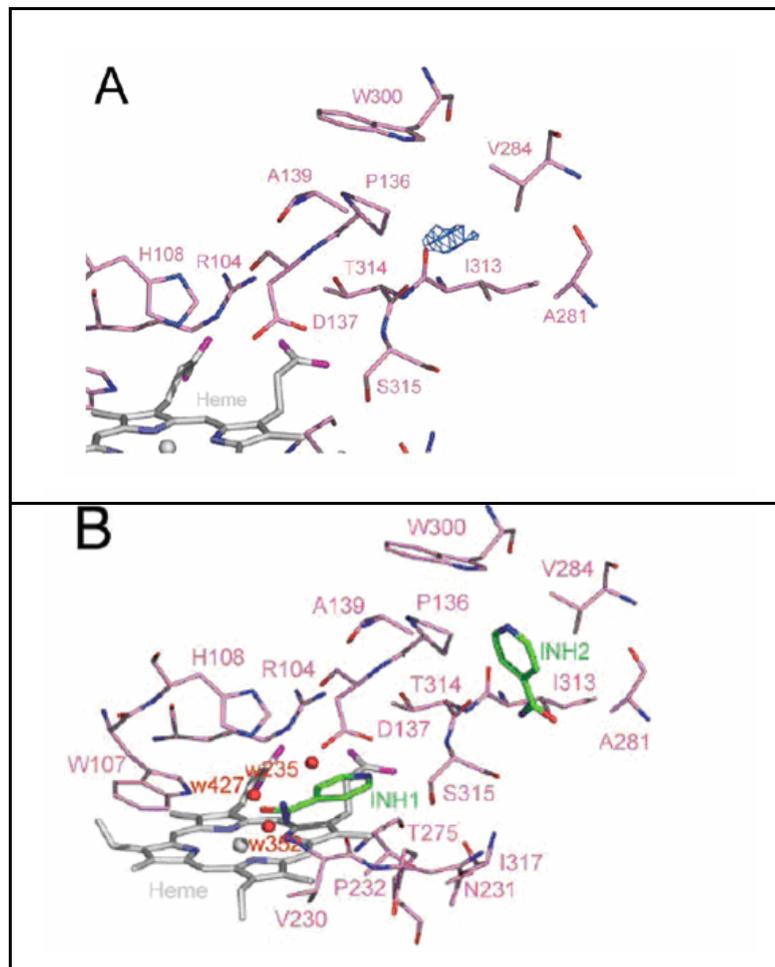
Note-se as quatro águas cristalinas (w7, w235, w427 e w352) que se encontram estabilizadas na cavidade receptora do *mtCP*. Elas constituem importantes indicações sobre as interações que serão efetuadas com os

aminoácidos, quando do ancoramento de um ligante, como a isoniazida. Na Figura 1-6, as águas estão interagindo com os resíduos Arg-104, Trp-107 e His-108.

Certos resíduos no sítio ativo parecem estar envolvidos na ativação da INH. No entanto somente mutações da His-108 vêm conferindo aumento de resistência ao INH. Estes resíduos devem estar relacionados com a ligação do INH e ativação da enzima, a partir de interações com o grupo hidrazínico do fármaco.<sup>(16)</sup> O Asp-137 foi identificado como tendo uma função-chave na ligação e ativação do INH, por ser um doador de próton específico às CP's no percurso da ativação da enzima-catalisada. Nenhuma mutação envolvendo o Asp-137 foi descrita como associada à resistência do INH.<sup>(16)</sup>

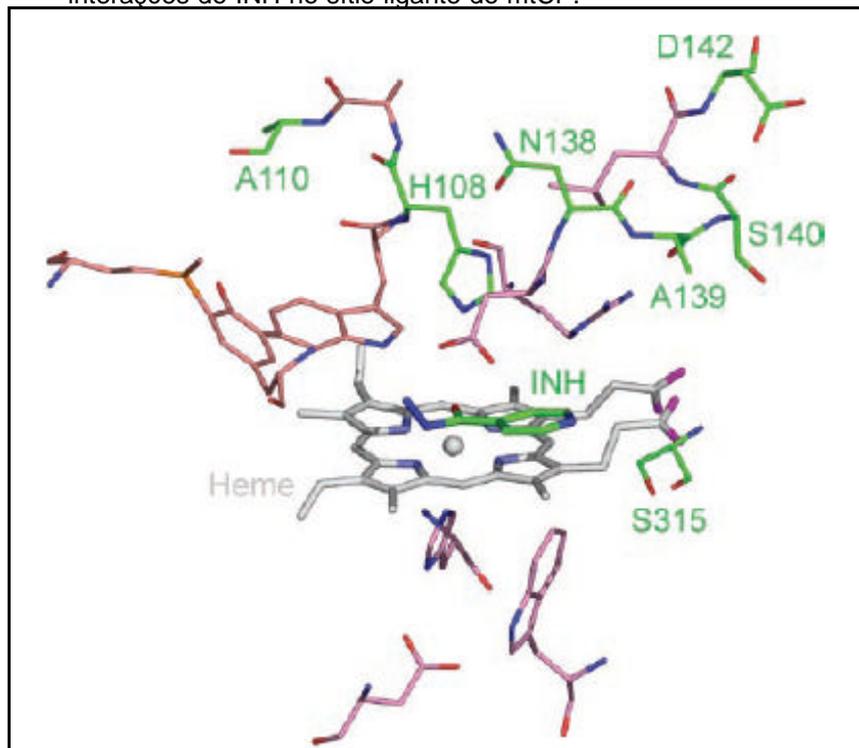
A Figura 1-7 mostra dois sítios potenciais propostos para o INH (em verde), e foram baseados nas propostas de ligação para o *Horseradish* Peroxidase-Catalase (HRPC) (INH1) e *bpCP* (INH2).

**Figura 1-7** - Dois sítios ativos potenciais propostos para o INH



Mutações afetando a Ser-315 são freqüentes, resultando em aumento da concentração do mínimo inibitório da isoniazida. A mutação mais freqüente encontrada para este aminoácido é sua substituição pela treonina.<sup>(14, 16)</sup> Recentes estudos postulam que a mutação da Ser-315 causa a mudança de ligações hidrogênio do grupo propionato da protoporfirina levando a modificações na conformação da protoporfirina e, conseqüentemente, alterando a ligação da INH.<sup>(14, 23)</sup> Outros trabalhos vêm demonstrando que a mutação em outros pontos da proteína *mtCP* não reduz a afinidade de ligação com a isoniazida, impossibilitando, no entanto, a formação de um intermediário oxiferroso que seja capaz de oxidar a INH.<sup>(24)</sup> A Figura 1-8 indica possíveis interações do INH no sítio ligante do *mtCP*, em modelo baseado em estudos sobre mutações.<sup>(16)</sup>

**Figura 1-8** - Posições baseadas em mutações clínicas para as interações do INH no sítio ligante do *mtCP*.



Os resíduos Arg-104, Trp-107, Asp-137, Tyr-229, Met-255, His-270, Trp-321 e Asp-381, em rosa, delineiam o sítio ativo. Os resíduos Ala-109 e Leu-141, também indicados em rosa, somente estão presentes para facilitar a compreensão da vizinhança do grupo heme, na estrutura.

14 – KAPETANAKI, Sofia M., *Biochemistry*. 2005

16 – BERTRAND, Thomas et al. *J. Biol. Chem.*, **279**(2004)

23 – Ghiladi, R. A., et al. *J. Am. Chem. Soc.* (2004)

24 – Sharp, K. H., et al. *Dalton Trans.* **22**(2003)

## 1.7 OBJETIVOS PARA O ESTUDO PROPOSTO

Hoje é amplamente aceito que a modelagem molecular tem contribuído, em muito, para o desenvolvimento de novos fármacos, ou da melhoria daqueles já existentes. A análise dos mecanismos de ação dos fármacos existentes pode resultar na proposta de novos compostos que possam ser mais efetivos no combate à tuberculose do que os atuais antimicrobianos. Uma maior atividade, com maior especificidade poderia, talvez, resultar em um maior controle da resistência bacteriana e/ou em tempo menores do que aquele necessário ao tratamento hoje aplicado aos pacientes tuberculosos. Nossa intenção é a de chegar o mais próximo possível deste objetivo maior.

Já o objetivo deste trabalho será a análise do mecanismo de ação da isoniazida, fármaco de reconhecida ação tuberculostática, em nível molecular e estudar as melhores posições que a isoniazida poderá assumir dentro da cavidade de recepção do *mtCP*.

Para isto, vamos primeiro estudar a estrutura cristalina de nossa proteína-alvo, e aprender a trabalhar com os métodos de simulação escolhidos. Esta etapa nos permitirá fazer a necessária transição da estrutura em fase sólida, para a fase gasosa, na qual os parâmetros de campos de força são calculados e, desta, para a fase líquida, simulando o sistema molecular em meio solvente. Esta etapa será provavelmente a mais delicada, e que garantirá a qualidade dos resultados do acoplamento do ligante isoniazida no sítio ativo da proteína.

Para melhor determinar alguns parâmetros dos cálculos a serem efetuados, testaremos diversos campos de força, para verificar qual deles melhor se adapta ao estudo de heme proteínas. A estrutura heme (protoporfirina) contém um ferro coordenado e carga formal podendo ser 1+, 2+ ou 3+. Testaremos, também, diferentes valores de constante dielétrica sobre nosso sistema protéico. Pretendemos, também, efetuar cálculos de potenciais eletrostáticos, pelo método de Poisson- Boltzmann, para verificar a influência de constantes dielétricas para o soluto e para o solvente, sobre as nuvens eletrostáticas.

Uma técnica importante na modelagem estrutural é ancoramento ou acoplamento de moléculas (em inglês, *docking*), ou seja, moléculas são posicionadas umas, em relação às outras. Para estudarmos as interações intermoleculares passíveis de nos conduzir à compreensão do modo de ação da isoniazida sobre o *mtCP*, vamos fazer um estudo preliminar através do ancoramento rígido. Isto nos permitirá dominar a manipulação computacional de moléculas em três dimensões, através de óculos para visão estereoscópica e conhecer os programas existentes para o *docking* rígido.

Esta fase sendo vencida pretendemos passar para um método mais aprimorado, o do ancoramento flexível. Usaremos o programa *Affinity*. Como o método é reconhecido como bastante complexo devemos definir uma estratégia de cálculos que viabilize este estudo. Em seguida, devemos comparar os resultados desta etapa com aqueles obtidos pelo *docking* rígido.

E, finalmente, estudaremos a adição de um cofator, o óxido nítrico, à cavidade receptora, de modo a compreender se esta molécula poderia contribuir para a estabilização da isoniazida sobre a protoporfirina, grupo este que integra a cavidade receptora do *mtCP*.

Esperamos que estas múltiplas etapas de cálculos possam contribuir, mesmo parcialmente, ao esclarecimento das interações da isoniazida com seu receptor.

## 1.8 CONDIÇÕES DO ESTUDO PROPOSTO

Todos os cálculos foram efetuados em estações de trabalho Silicon Graphics, modelo Indigo II usando sistema operacional Unix, e placas gráficas tridimensionais de alta performance. A construção das moléculas, a visualização, a manipulação e a análise de resultados foram efetuadas através da cadeia de programas InsightII 2000,<sup>(25)</sup> usando os programas Builder/ Sketcher/ Search\_Compare/ Discover/ Analysis/ DelPhi/ Docking e Affinity. Os cálculos envolvendo Mecânica Molecular e Dinâmica Molecular foram efetuados através dos programas Discover 3.0<sup>(26, 27, 28)</sup> usando o campo de forças ESFF.<sup>(29, 30)</sup>

---

25 – **Insight II 2000 package**; Accelrys

26– HAGLER, A. T.; MOULT, J. **Nature**, 272 (1978)

27 – MACKAY, D.H.J. et al. **Plenum Press**: 1990

28 – LUTY, B.A. et al. **J. Comp. Chem.**, 16(1995)

29 – User guide. **Forcefield Simulations**. 1995

30 – SHI , S. et al. **J Comput Chem.**, 24(2003)

## Capítulo 2 Fundamentos teóricos

## 2.1 - MÉTODOS MATEMÁTICOS

Neste trabalho foram conduzidos cálculos por mecânica molecular e por dinâmica molecular. A estes métodos matemáticos principais, internacionalmente usados para simular o comportamento de sistemas moleculares, estarão vinculados outros métodos ou algoritmos importantes, e que complementarão os estudos e informações obtidas a partir dos primeiros. Estes serão, principalmente, os algoritmos para os cálculos de *docking* rígido e flexível e as superfícies de Connolly.

## 2.2 - A APROXIMAÇÃO SEMI-EMPÍRICA: PRINCÍPIOS DA MECÂNICA MOLECULAR

A utilização de métodos computacionais para a solução de alguns problemas de forma qualitativa e quantitativa em química vem ao longo dos anos tomando grandes proporções, desde o surgimento dos primeiros conceitos de campos de força mecânico moleculares, na década de 70.<sup>(\*)</sup> Estes vêm representar uma interface entre os conhecimentos científicos desenvolvidos pelas áreas da matemática, física, química e biologia molecular gerando, assim, uma nova área de atuação na investigação da ciência e tecnologia nos dias de hoje.

A Simulação Computacional é uma subárea da química computacional, onde se procura resolver determinados problemas científicos através de métodos computacionais. Esta subárea pode ser usada para descrever ou mesmo prever a estrutura e estabilidade de um sistema molecular discriminando os estados de menor energia; a energia (livre) de diferentes estados do sistema; e os processos de reação, ou processos dinâmicos, nas mudanças de estados dentro do sistema, ao nível de interações atômicas. Nestes, haverá formação de uma população de configurações representativas de um sistema. A formação de uma população de estados em equilíbrio é suficiente para estudar propriedades do equilíbrio estático independentes do tempo. Entretanto, para se obter a dinâmica de estados e propriedades no não-equilíbrio, métodos de ***simulação por dinâmica molecular*** são utilizados para se produzir trajetórias do sistema.

---

(\*)cf. *ibid.* ref. 26

As simulações por dinâmica molecular, que envolvem tempo e temperatura, podem usar a mecânica molecular e muitos de seus métodos correlatos (como o SEARCH, para a pesquisa conformacional sistemática) para varrer a hipersuperfície de energia potencial em busca conformações de pequenas moléculas, ou para minimizar a energia de configurações provenientes do estudo de trajetórias dinâmicas.<sup>(\*)31)</sup>

As simulações por mecânica molecular utilizam as leis da mecânica clássica para prever as estruturas e propriedades das moléculas. O fundamento do método consiste em se considerar a molécula como um conjunto de átomos mantido por forças elásticas ou harmônicas. Estas forças elásticas podem ser definidas em termos de funções de energias potenciais, relacionadas com as coordenadas internas das moléculas. A forma funcional da expressão de energia e os parâmetros necessários ao ajuste às superfícies de energia potencial constituem o campo de força da molécula.<sup>(25)</sup>

Quando a energia potencial de uma molécula em repouso é descrita através de um campo de força, esta tenderá a atingir a conformação de menor energia possível, a partir de uma geometria inicial proposta. A energia de qualquer conformação de uma molécula pode, então, ser calculada a partir do conhecimento do seu campo de força e das coordenadas dos seus átomos constituintes. A energia potencial assim obtida denomina-se 'energia potencial total' e pode ser considerada como a somatória das contribuições mecânicas e das interações não-ligantes.

Assim, a energia potencial total pode ser calculada pela fórmula geral:

$$E_{\text{potencial total}} = E_l + E_{\theta} + E_{\omega} + E_{nl}$$

Onde,

$E_l$  = deformação dos comprimentos de ligação

$E_{\theta}$  = deformação dos ângulos de valência

$E_{\omega}$  = deformação dos ângulos diedros

$E_{nl}$  = contribuições das interações entre átomos não-ligados

---

(\*) cf. *ibid* ref. 27 a 32

Os termos “otimização energética” ou “minimização de energia” correspondem, do ponto de vista prático, à utilização de uma equação matemática, ligada a um campo de forças, os quais, através de algoritmos matemáticos (*Steepest Descent*, *Conjugate Gradient*, Newton-Raphson, ...) irão progressivamente conduzir um conjunto de coordenadas atômicas a posições estáveis. Estas posições correspondem, então, a mínimos energéticos ou “poços de potencial” do sistema de interesse. O procedimento básico dos algoritmos de minimização de energia consiste em caminhar sobre a superfície de potencial, em direções que tendem a um decréscimo de energia, de maneira a que o sistema seja levado a um mínimo de energia local próximo.

### 2.3 - ALGORITMOS MATEMÁTICOS SISTEMATICAMENTE USADOS NA APROXIMAÇÃO ESCOLHIDA PARA ESTE ESTUDO.

O método da “Inclinação Máxima” ou “Método de Cauchy” (*Steepest-Descent*<sup>(\*)</sup>) converge vagarosamente nas proximidades do mínimo, mas é poderoso para configurações distantes de um mínimo em energia. De um modo geral, com esse algoritmo é possível melhorar estruturas cristalográficas pouco refinadas, otimizar as construídas graficamente ou construir um modelo estrutural, a partir de informações de RMN, ou provenientes de outros métodos espectroscópicos, ou, ainda, por similaridade com seqüências de estruturas conhecidas.

Um método mais sofisticado de busca de um mínimo da função energia, além de utilizar a informação sobre a primeira derivada (gradiente), leva em conta o caminho já percorrido na busca do mínimo. Este método, denominado Gradientes Conjugados (*Conjugate Gradient*), permite, em geral, uma convergência mais rápida do que o método *Steepest-Descent*, o qual utiliza somente a informação do gradiente na coordenada utilizada. Esse algoritmo utiliza para a determinação do passo seguinte, além do valor do gradiente no ponto atual, o valor do gradiente obtido no passo anterior. Isso garante que a

---

(\*) cf. *ibid ref. 27 a 32*

direção do gradiente no novo ponto será sempre ortogonal ao gradiente do ponto anterior e, conseqüentemente, a todos os anteriores.

Na prática, para os sistemas macromoleculares, o algoritmo *Steepest-Descent* se mostra mais efetivo e rápido nos passos iniciais quando se está longe do mínimo. Entretanto, quando se está perto de atingir o mínimo, o método do gradiente é muito mais rápido e preciso. Desta forma, pode-se utilizar os dois métodos, procedendo-se inicialmente com o *Steepest-Descent* com um critério de convergência relativamente fraco e, após, o método dos gradientes conjugados para o afinamento final da estrutura.

O método de *Newton-Raphson*, ou método das secantes, é um caso particular do Método das Aproximações Sucessivas, entretanto, ao invés de calcular pontos fixos, calcula-se raízes de uma dada função. Portanto, este método requer tanto a avaliação da função  $V(r)$ , quanto a de sua derivada  $V'(r)$ , em pontos  $r$  arbitrários. Se a derivada da função não se anular nas proximidades da raiz desejada, então este método pode ser aplicado. Algebricamente, deriva-se da expansão de  $V(r)$  em série de Taylor na vizinhança de um ponto, isto é:

$$V(r + \mathbf{d}) \cong V(r) + V'(r)\mathbf{d} + \frac{V''(r)}{2}\mathbf{d}^2\Lambda$$

Para pequenos valores de  $\mathbf{d}$  e, em uma função simplificada, tem-se que  $V(r + \delta) = 0$ , o que implica em:

$$\mathbf{d} = \frac{V(r)}{V'(r)}$$

Outra maneira de se analisar o algoritmo de *Newton-Raphson* é que, em adição ao uso de gradiente para identificar uma direção procurada, a curvatura da função (segunda derivada) é usada para predizer onde a função passa através de um mínimo em uma direção.

Este método não está restrito a uma só dimensão, ele pode ser estendido para várias dimensões. No entanto, pontos muito afastados dos termos de ordem superior na série são também de suma importância, o que faz com que o

método seja de pouca acurácia e, portanto, necessita de certas correções. Para aspectos práticos, vamos dizer que o método de *Newton-Raphson* estende a idéia do método *Conjugate Gradient* aproveitando aproximações quadráticas a  $V(r)$ , melhores do que as aproximações lineares, e que ganham importância à medida que se aproximam do ponto ótimo do problema.

O método *Quasi-Newton-Raphson* baseia-se no método *Conjugate Gradient* pelo uso de gradientes das interações prévias, através da minimização direta em uma rota eficiente. Todavia, o uso do gradiente é com o referencial *Newton-Raphson*. Deste são exemplos os algoritmos BFGS (Broyden, Fletcher, Goldfarb e Shanno) e o DFP (Davidson, Fletcher e Powell.).

É fundamental que a função energia potencial de interações entre os diversos átomos do sistema seja descrita de forma a que se estabeleça um compromisso entre a viabilidade computacional, a precisão e a exatidão, na descrição das propriedades que se quer analisar, sejam elas isômeros conformacionais, propriedades eletrostáticas, freqüências vibracionais, flexibilidade, dentre outras.

## 2.4 - OS CAMPOS DE FORÇAS (*Force Fields*)

Com o objetivo de escolher o melhor campo de força para nossos estudos sobre minimizações energéticas dos complexos moleculares sob análise, através de técnicas de *docking*, consideramos quatro dentre os campos de força implementados nos programas InsightII/Discover. Estes programas vêm da empresa Accelrys Inc.<sup>[\*]</sup> Os campos analisados foram: CFF91, Amber, CVFF e ESFF. O primeiro, *Consistent Force Field*, ou CFF91, e o segundo, Amber, foram excluídos por não terem os parâmetros necessários para o Fe, nas versões disponíveis. Em seguida, foram realizados testes com o *Consistent Valence Force Field*, CVFF, por ser um campo de força tradicionalmente usado para macromoléculas biológicas, dentre os usuários do programa Discover. CVFF possui também bons parâmetros para pequenas moléculas orgânicas, o que nos seria conveniente. No entanto, este foi excluído devido à má parametrização para

---

(\*) cf. *ibid.* ref. 25 e 29

coordenações entre o Fe, os átomos de nitrogênio e os carbonos conjugados. Fortes distorções ao plano foram verificadas durante a fase de testes.

CVFF possui somente parâmetros para:

Potencial: Fe2c; carga: 2 ; coordenação: íon Fe(II) octaédrico  
Fe; 0,0; ferro metálico.

Esta parametrização limitada implicaria na efetivação dos cálculos das coordenadas atômicas do grupo hemeporfirina sob fortes restrições, de modo a reduzir as distorções geométricas. Isto reduziria a precisão dos estudos dos complexos proteína:cofator:ligante:solvente a serem estudados.

O CVFF<sup>(33)</sup> foi utilizado para se realizar a etapa de ancoramento flexível, tal procedimento não aceita o campo de força ESFF<sup>(\*)</sup>. Devido a isto os modelos orientacionais obtidos foram feitos sob o campo de força CVFF, após a obtenção destes modelos, se realizou a otimização energética dos citados modelos sob o campo de força ESFF.

#### 2.4.1 - O campo de forças CVFF

O CVFF<sup>(\*)</sup> foi ajustado através de milhares de parâmetros provenientes de estruturas cristalinas, de fluorescência, de cálculos quânticos *ab-initio* e semi-empíricos para grupos químicos pequenos. Este campo de força foi fundamentalmente concebido para reproduzir o comportamento de pequenas moléculas orgânicas (com todas as funções orgânicas, como amidas, ácidos carboxílicos, estruturas em ressonância, etc.), de grupos de repetição, como os aminoácidos, ácidos nucleicos e carboidratos; reproduzir e simular cristais e estruturas em fase gasosa. Este campo de forças vem sendo usado extensivamente, por serem citados em inúmeras publicações, e implementado durante muitos anos. No entanto, seu desenvolvimento foi interrompido em 2002, em favor de CFF, também conhecido por Compass. Foi planejado, principalmente, para estudos de estruturas biomoleculares e cálculos de energias

---

(\*) cf. *ibid.* ref. 30 e 33

que tendem a se ligar, embora prediga, razoavelmente bem, frequências vibracionais e energias livres de Gibbs.

A expressão matemática geral para descrever um sistema molecular pelo CVFF é representada pelos seguintes termos:

**Equação 2-1: Campo de força CVFF<sup>(29)</sup>**

$$\begin{aligned}
 E_{\text{Pot}} = & \sum_b \frac{1}{2} D_b [b - b_0]^2 + \sum_\theta \frac{1}{2} H_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_\phi H_\phi [1 + s \cos(n\phi)] + \sum_\chi H_\chi \chi^2 + \\
 & \sum \sum F_{bb'} (b - b_0)(b' - b'_0) + \sum \sum F_{\theta\theta'} (\theta - \theta_0)(\theta' - \theta'_0) + \sum \sum F_{\phi\phi'} (b - b_0)(\theta - \theta_0) + \\
 & \sum F_{\phi\phi\phi} \cos\phi(\theta - \theta_0)(\theta' - \theta'_0) + \sum \sum F_{\chi\chi} \chi\chi + \sum \varepsilon [(r^*/r)^{12} - 2(r^*/r)^6] + \sum q_i q_j / \sigma_{ij}
 \end{aligned}$$

onde:

- $D_b$  é a constante harmônica de energia associada à ligação química entre dois átomos;
- $H_\theta$  é a constante harmônica de energia associada ao ângulo entre duas ligações químicas e  $\theta_0$  é o ângulo de equilíbrio entre duas ligações;
- $H_\phi$  é a constante harmônica que define a barreira de rotação,  $n$  é o número de mínimos para a torção de uma ligação específica,  $\phi$  é o ângulo diedral para a ligação central em uma seqüência de quatro átomos;
- $H_\chi$  é a constante que define as interações fora do plano.

Os outros símbolos encontrados na equação significam:

- $b_0$  é a distância de equilíbrio da ligação química;
- $\theta_0$  é o ângulo de equilíbrio entre duas ligações;
- $n$  é o número de mínimos para a torção de uma ligação específica,
- $\phi$  é o ângulo diedro para a ligação central em uma seqüência de quatro átomos;
- $\varepsilon$  é a polarizabilidade dos átomos.

-  $q_i$  é a carga do átomo  $i$ .

Os primeiros quatro termos desta equação são somas que refletem a energia necessária para mudanças nas distâncias de ligação ( $b$ ), mudanças dos ângulos de ligação ( $\theta$ ) através de valores de referência, rotações e torções de ângulos ( $\phi$ ) e distorções à planaridade entre átomos e seus ligantes ( $\chi$ )

Os termos de 5 a 9 representam as interações cruzadas. São necessários para reproduzir frequências vibracionais e, deste modo, as propriedades dinâmicas das moléculas. Estes termos podem se tornar instáveis quando o sistema está longe do mínimo.

Os dois termos do item 10 que, combinados, formam o potencial de Lennard-Jones, estão associados a dois tipos de interações distintas. O termo repulsivo com dependência em  $r^{-12}$  está relacionado com forças de curtíssimo alcance, quando dois átomos estão suficientemente próximos, de tal modo que haja um certo grau de superposição de suas nuvens eletrônicas, cuja origem está na repulsão entre núcleos atômicos e no princípio de expulsão de Pauli. O termo atrativo com dependência em  $r^{-6}$  está relacionado com as forças de dispersão, cuja origem está associada às flutuações da nuvem eletrônica de um dado átomo, causadas pela presença de outro átomo, resultando em uma interação atrativa tipo dipolo-induzido / dipolo-induzido.

As interações entre átomos e suas cargas eletrônicas parciais podem ser representadas em potenciais baseados na lei de Coulomb. O último termo (11) está relacionado com as interações eletrostáticas intra e intermoleculares, as quais são consideradas de longo alcance devido ao fato de exibirem uma dependência com o inverso da distância ( $r^{-1}$ ) entre as cargas parciais atômicas.

#### 2.4.2 - O campo de forças ESFF

O campo de forças *Extended Systematic Force Field* (ESFF)<sup>(\*)</sup> possui uma parametrização para o ferro bem mais específica, o que o torna adequado ao nosso estudo.

O ferro contém os parâmetros necessários para a coordenação com vizinhança de nitrogênios e carbonos de sistemas aromáticos, planares. A

---

(\*) cf. *ibid.* ref. 29 e 30

denominação interna para este potencial e suas combinações interatômicas e angulares, é o Fe024s, indicando ter coordenação 4 e simetria D4h. Há outros 37 diferentes tipos de potenciais para o Fe, neste campo de força (*vide* Anexo I).

O ESFF utiliza parâmetros atômicos e possibilita condições para a geração de parâmetros explícitos. As condições simulam uma realidade física e depois tendem à supressão de redundâncias. Isto é possível, pois os parâmetros atômicos são determinados a partir de experimentos ou calculados por funções *ab-initio* a partir de pequenos grupos químicos e de estruturas mais complexas. Inicialmente parametrizado para composto organometálicos, ESFF desenvolveu-se e foi amplamente testado para polímeros sintéticos, biomacromoléculas (Wieslaw NOWAK, Andrzej WOJTCZAK & Vivian CODY. Computer modeling with the ESFF forcefield of human dihydrofolate reductase ternary complex with NADPH and piritrexim (PTX) inhibitor. Ver o artigo em anexo e procurar complemento da referência na Internet) e pequenas moléculas das mais diversas classes.

A energia de ligação é representada por uma funcional de Morse, onde a energia de dissociação  $D$ , o tamanho da ligação  $r_0$  e os parâmetros não harmônicos são necessários. Na construção destes parâmetros a partir de dados atômicos, o campo de força utiliza não somente o tipo de átomo e ordem de ligação, mas também considera ligações abertas do tipo *endo* ou *exo* para anéis de 3, 4 ou 5 átomos. As auto-regras dependem da eletronegatividade, dureza e ionização dos átomos, bem como das não-harmonicidades atômicas e do raio covalente. As quantidades posteriores são parâmetros estruturais.

O campo de força ESFF pode ser usado para modelagem molecular de sistemas orgânicos, inorgânicos e organometálicos em fase gasosa ou condensada. Ele mimetiza todos os elementos da tabela periódica acima do Rn. Todavia sistemas ligantes infinitos não podem ser tratados com ESFF, o número máximo de átomos está em volta de 10.000 por cela unitária.

A expressão analítica energética para ESFF é obtida pela equação 2.2, na qual os termos representam:

- a) A soma das energias de ligações interatômicas;

- b) A contribuição das variações dos ângulos de ligação entre três átomos (ângulos de valência);
- c) A contribuição energética para variações nos ângulos diedrais entre quatro átomos consecutivos (ângulos de torção);
- d) A contribuição das variações das torções angulares fora do plano (*out-of-plane*);
- e) A contribuição das interações de van der Waals usando o potencial 6-9 de Lennard-Jones;
- f) As contribuições das relações eletrostáticas entre dois átomos.

**Equação 2-2: Campo de força ESFF<sup>(29)</sup>**

$$\begin{array}{l}
 \mathbf{a} \quad E_{pot} = \sum_b D_b \left( 1 - e^{(-\alpha(r_b - r_b^0))} \right)^2 + \\
 \mathbf{b} \quad \left\{ \begin{array}{l} \sum_a \frac{2K_a}{\sin 2\theta_a^0} (\cos \theta_a - \cos \theta_a^0)^2 \quad (\text{normal}) \\ \sum_a 2K_a (\cos \theta_a + 1) \quad (\text{linear}) \\ \sum_a K_a^{\text{eq}} \cos^2 \theta_a \quad (\text{perpendicular}) \\ \sum_a \frac{2K_a}{n^2} (1 - \cos(n\theta_a)) + 2K_a^{(-\beta(r_b - r_b^0))} \quad (\text{equatorial}) \end{array} \right\} \\
 \mathbf{c} \quad + \sum_{\tau} D_{\tau} \left( \frac{\sin^2 \theta_1 \sin^2 \theta_2}{\sin^2 \theta_1^0 \sin^2 \theta_2^0} + \text{sign} \frac{\sin^n \theta_1 \sin^2 \theta_2}{\sin^n \theta_1^0 \sin^n \theta_2^0} \cos[n\tau] \right) \\
 \mathbf{d} \quad + \sum_o D_o \phi^2 \quad \mathbf{e} \quad + \sum_{nb} a \left( \frac{A_i B_j + A_j B_i}{r_{nb}^9} - 3 \frac{B_i B_j}{r_{nb}^6} \right) \quad \mathbf{f} \quad + \sum_{nb} \frac{q_i q_j}{r_{nb}}
 \end{array}$$

Os termos angulares para o ESFF são calculados segundo seus tipos, mas também, segundo o tamanho de anéis, a simetria e ligação  $\pi$  de cinco classes:

1) A classe normal inclui ângulos não fixos e outros associados a anéis de 3, 4 e 5 membros;

2) a classe linear inclui ângulos com átomos centrais contendo hibridizações sp, e ângulos entre dois ligantes axiais, em caso de complexos metálicos;

3) a classe perpendicular é restrita a centros metálicos e incluem ângulos entre ligantes axiais e equatoriais em torno de centros metálicos;

4) a classe equatorial inclui ângulos entre ligantes equatoriais e sistemas quadrados planares, bipiramidais trigonais, octaédricos, bipiramidais pentagonais e bipiramidais hexagonais;

5) a classe do sistema  $\pi$  inclui ângulos entre pseudo-átomos.

### 2.4.3 - Considerações sobre a distribuição de cargas atômicas parciais.

A grande importância que as interações eletrostáticas assumem, tanto com relação a aspectos funcionais, quanto a aspectos relacionados à estrutura e à estabilidade de moléculas, tornam evidentes algumas limitações implícitas ao tratamento utilizado pela maioria dos campos de forças, quando da descrição destes parâmetros. Como cargas parciais atômicas não são quantidades físicas (por não poderem ser associadas a uma observável quântica e, portanto, não podem ser determinadas experimentalmente), isto comumente implica na ausência de uma definição rigorosa e numa certa arbitrariedade na determinação de seus valores. Estas cargas são geradas pelo campo de forças, e atribuídas a grupos moleculares ou átomos individuais, independentemente da conformação em que a molécula esteja. O ideal seria que, para cada conformação, a distribuição de cargas parciais fosse recalculada. Isto, no entanto, só é feito para conformeros já provenientes de triagem e não para todas as conformações e configurações calculadas. Esta é uma limitação conhecida e os especialistas sabem como tratá-la. Normalmente utilizam-se cálculos quânticos *ab initio* ou semi-empíricos para determiná-las (programas quânticos semi-empíricos como AM1 e PM3, ou pela teoria de Hückel ou da Funcional Densidade, DFT (programa DMol<sup>3</sup>). Os sistemas de coordenação e as cargas atômicas parciais que são atribuídos por ESFF foram determinados por DFT).

No entanto, as cargas formais são inicialmente escolhidas e introduzidas manualmente pelo usuário. Caso haja erros de atribuição, o programa envia mensagem de erros, logo no início de um cálculo, e pára, pedindo para que estas

cargas sejam corrigidas. Caso a coordenação inicial esteja errada, o programa também avisa ao usuário que há erros de atribuição. Até que estes erros sejam corrigidos, nenhum cálculo poderá ter início.

## 2.5 A DINÂMICA MOLECULAR NEWTONIANA

A dinâmica molecular (DM) atua nos graus de liberdade intramoleculares de um sistema de uma maneira análoga à minimização de energia. Os ingredientes básicos da dinâmica molecular são os cálculos das forças em cada átomo, e a partir delas, as posições de cada átomo em um período de tempo específico (da ordem do femtosegundo =  $10^{-15}$  segundos).<sup>(\*)</sup>

O algoritmo de um programa de Dinâmica Molecular consiste da solução numérica da equação de movimento de Newton, fornecendo uma trajetória (coordenadas e momentos conjugados em função do tempo) do sistema sob estudo. Escolhendo o passo de integração, a resolução temporal e a extensão da trajetória podem ser adaptadas aos eixos de relaxação temporal para os processos dinâmicos. A partir da trajetória, propriedades de equilíbrio e grandezas dinâmicas podem ser calculadas.

Na Dinâmica Molecular, uma trajetória (configurações em função do tempo) é gerada pela integração simultânea das equações do movimento (Eq. 2.3 e Eq. 2.4), para todos os átomos do sistema molecular.

$$\frac{d^2 r_i(t)}{dt^2} = m_i^{-1} F_i \quad \text{Eq. 2.3}$$

$$F_i = -\frac{\partial V(r_1, \dots, r_N)}{\partial r_i} \quad \text{Eq. 2.4}$$

A força no átomo  $i$  é notada por  $F_i$  e o tempo, como  $t$ .

Uma simulação por dinâmica molecular requer cálculos do gradiente da energia potencial  $V(r)$ , o qual deve ser uma função diferencial de coordenadas

---

(\*) cf. *ibid* ref. 26 e 27

atômicas  $r_i$ . A integração da equação é efetuada em pequenos intervalos de tempo,  $\Delta t$ , tipicamente de 1 – 10fs para sistemas moleculares. Quantidades estatísticas de equilíbrio podem ser obtidas através da média sobre a trajetória. Esta deve ser suficiente longa para formar um conjunto representativo do estado de equilíbrio do sistema. Esta técnica possibilita ainda o estudo do sistema no estado de não-equilíbrio. A Dinâmica Molecular é usada eficientemente para visitar o espaço configuracional porque a energia cinética presente no sistema, permite que barreiras de energia da ordem de kT por grau de liberdade sejam ultrapassadas. A transposição de barreiras de potencial é obtida pelo aumento da temperatura, o que é acompanhado de uma redução considerável no tempo de cálculo e ainda permite que uma série de diferentes conformações seja gerada. (34)

O resultado de uma simulação deve ser independente das posições atômicas e velocidades iniciais do sistema em estudo. A configuração inicial de um sistema molecular pode provir de diversas fontes, tais como estruturas de raios x, cálculos de distância geométrica, construção de modelos, método de Monte Carlo etc. As velocidades iniciais são escolhidas como zero ou obtidas através de uma distribuição de Maxwell.<sup>(26, 27, 35)</sup>

As simulações dinâmicas efetuadas através do programa Discover são conduzidas em duas etapas: o equilíbrio e a coleção de dados. Para a etapa de equilíbrio, velocidades aleatórias são atribuídas aos átomos de acordo com a distribuição de Maxwell-Boltzmann, em torno da temperatura desejada. O período de equilíbrio térmico (termalização) requerido dependerá do tempo de relaxação das propriedades de interesse. A simulação é monitorada de forma a obter resultados no equilíbrio.

A principal utilidade da simulação por dinâmica molecular é analisar os o movimento molecular e as interações que ocorrem em um nível atômico. Os resultados são geralmente analisados tomando a média sobre o tempo, ou média sobre a simulação com diferentes condições iniciais das propriedades de interesse.

---

35 – GOULD, H., 1996.

36 - ROCHA, Adalberto Vieira da, Dissertação de Mestrado, 2004.

## 2.6 O ANCORAMENTO OU DOCKING

Uma técnica importante na modelagem estrutural é designada por “*docking*”, ou seja, “acoplamento” ou “ancoramento”. O objetivo do cálculo do tipo ancoramento molecular consiste na avaliação das interações energéticas de algumas orientações de uma molécula em relação a outra (s), em busca de interações que resultem em baixa energia.<sup>(36)</sup>

Em alguns casos, o sistema de interesse consiste em complexos moleculares. A obtenção de um modelo estrutural requer necessariamente um estudo preliminar das interações intermoleculares envolvidas. O *docking* consiste em otimizar tais interações segundo vários critérios. Para isto, as moléculas envolvidas são como corpos rígidos em uma primeira aproximação. Neste sentido, o *docking* pode ser entendido como um problema de otimização de encaixe de formas moleculares. Em uma abordagem mais elaborada, cálculos de energia potencial são associados à natureza das interações intermoleculares, fazendo com que a compatibilidade físico-química das interações na interface do complexo seja considerada. Este é o caso do *docking* rígido. No entanto, tal aproximação não é suficiente para a determinação de uma configuração inicial satisfatória, especialmente para sistemas envolvendo interações de pequenas moléculas no sítio catalítico de enzimas. Pode-se, então, escolher aproximações para um *docking* flexível, quando as moléculas sofrerão transições conformacionais de maneira a alcançar um melhor ajuste para as interações moleculares.<sup>(37,38)</sup>

Nesta técnica, as interações energéticas são computadas pela soma das contribuições de van der Waals e eletrostáticas entre todos os átomos de duas moléculas, mas sem utilizar todos os termos da equação do campo de força, ou seja, trabalha-se com as equações em sua forma mais simplificadas não a equação completa. Os termos eletrostáticos podem ser computados através das interações 6-12 de Lennard-Jones e pelo potencial de Coulomb.<sup>(\*)</sup>

---

37 – BLANEY, J. **Perspectives in Drug Discovery and Design** (1993)

38 – STOUTEN, P. at al. **Molecular Simulation** (1993)

39 – LANGRIDGE, R, et al, **Journal of Molecular Biology**

(\*) cf. *ibid* ref. 22 e 23.

$$E_{\text{interação}} = \sum_i \sum_j \left( \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}} \right) \quad \text{Eq. 2.5}$$

Estas interações são computadas dentro de uma grade que envolverá parte do sistema molecular estudado, por exemplo, aminoácidos que contêm o sítio catalítico e o ligante de interesse. A construção da grade de energia depende do campo de força usado. Como proposto por Langridge,<sup>(39)</sup> uma grade de energia deve ser pré-definida entre duas moléculas. As interações energéticas produzidas podem ser aproximadas pelos cálculos de energia entre os átomos da molécula em movimento e o ponto da grade apropriado, sendo os cálculos são iterativos.

Idealmente, o movimento das orientações espaciais intermoleculares resultaria em interações energéticas em tempo real. Todavia a expressão energética é calculada iterativamente no computador, sendo o tempo de computação proporcional ao quadrado do número de interações dos átomos, tornando os cálculos relativamente lentos.

## 2.7 Ancoramento flexível estudado através do programa Affinity.

O programa Affinity<sup>(40)</sup>, ou Afinidade, aplica a mecânica molecular na busca e na avaliação de estruturas acopladas. Para se efetuar busca conformacional rápida o bastante para aplicações práticas, o sistema ligante/receptor é dividido em átomos de "maior volume" e em átomos "móveis" ou "livres". Os átomos de maior volume são definidos como aqueles do receptor que não se encontram no sítio de recepção que foi definido. Estes átomos são mantidos rígidos durante a pesquisa para se encontrar o ancoramento desejado. Os átomos móveis são aqueles que se encontram no sítio receptor, em adição aos átomos ligantes. Estes podem mover-se livremente, à exceção daqueles que se encontram no sítio de recepção, em posição muito fechada com os mais volumosos. Estes sofrerão restrições através da Grade de Acoplamento (*GridDocking*). O principal programa empregado por Affinity é Discover (no módulo Discover\_3), junto com os campos de força implementados naquele programa.

Para se complementar funcionalidades propostas pelo programa Discover, termos adicionais foram desenvolvidos para Affinity, sob forma de termos de pênaltis/energia específicos aos problemas de *docking*, que foram inclusos como termos complementares à equação completa da mecânica molecular para cálculos de minimização energética ou trajetórias dinâmicas. Estes termos são compostos por: um termo para interações não-ligadas (*MM/Grid*), um segundo termo para a grade de solvatação, um terceiro termo geométrico para as ligações hidrogênio, um quarto termo contendo as restrições do tipo "*tethering*" e um quinto termo confinando o ligante. Estas características adicionais possibilitam a flexibilidade e o foro necessários para se tratar diferentes problemas de *docking*.

## 2.7.1 Termos para energia e pênaltis.

### 2.7.1.1 - Métodos baseados em grade para interações não-ligadas e efeitos de solvatação.

A forma funcional para CVFF (Dauber-Osguthorpe, 1988)<sup>(\*)</sup> está reproduzida na equação 2.1, ítem 2.4.1.

O termo para desolvatação, em GridDocking, baseia-se no método MM/Grid.<sup>(41)</sup>

$$E_{DES} = -S_i f_j \exp\left(\frac{-r_{ij}^2}{2s^2}\right) \quad \text{Eq. 2.6}$$

Este termo representa a energia livre de interação de um átomo com o solvente implícito. Foi derivado da transferência de um átomo de um ambiente completamente envolvido pelo solvente a um ambiente no qual os vizinhos atômicos são explícitos<sup>(42)</sup>. Ao ocorrer a transferência, um átomo vizinho *j* é pressuposto deslocar o volume do solvente envolvendo o átomo *i*, proporcional ao fragmento de volume de *j*, *f<sub>j</sub>*. A constante de proporcionalidade, *S<sub>i</sub>*, é denominada parâmetro de solvatação.

### 2.7.1.2 - Grade para átomos mais volumosos.

A representação de grade para átomos de maior volume em mecânica molecular, representa o cálculo que mais tempo consome dentre as interações não-ligadas. Se *cut-offs* não são usados, o tempo computacional cresce de forma quadrática, segundo o número de átomos no sistema. Para um sistema típico, como uma proteína com alguns milhares dos átomos, isto não é prático para o docking por requerer um número enorme de avaliações de energia e de gradiente. Esta é a razão provável pela qual a maioria dos métodos de *docking*, descritos na literatura, emprega regras empíricas simples.<sup>(43)</sup> Entretanto, se a maior parte de um sistema protéico (se o maior volume puder ser pressuposto como rígido, pode-

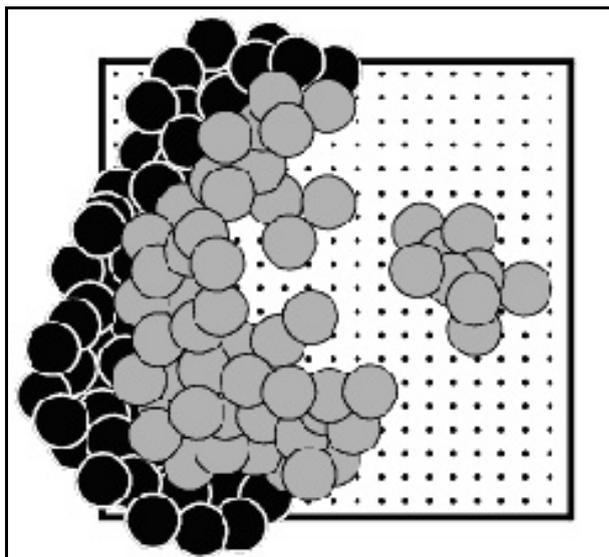
41 – Luty, B.A. , et al. **J. Comp. Chem.**, 1995.

42 – Stouten, P.F.W., et al . C. **Molecular Simulation**, 1993.

43 – Kuntz, I.D.; et al. **Acc. Chem. Res.**, 1994.

se usar grades para se representar este volume, enquanto o ligante e o sítio de recepção são simulados explicitamente (Figura 2.1). Por exemplo, para um sistema típico de ligante/proteína com 4.000 átomos, o sítio de recepção e o ligante devem ter poucas centenas de átomos. Esta redução drástica no tamanho do sistema pode conduzir a uma significativa redução no tempo computacional.

**Figura 2-1:** Representação esquemática de um sistema tipo ligante/receptor.<sup>(45)</sup>



Os pontos representam o traçado dos potenciais proveniente deste maior volume do receptor (não mostrado) em uma grade 3D, a qual envolve os átomos móveis, representados por esferas claras. As esferas escuras representam átomos em um referencial restrito, o qual separa os átomos livres dos átomos rígidos.

Uma grade 3D envolvendo os átomos livres pode ser construída como se segue. O potencial devido aos átomos rígidos em um ponto  $p$  da grade é calculado. Para os termos 6-12 de van der Waals, em CVFF, os potenciais são:

$$f^A(p) = \sum_{j \in \text{rigid terms}} \frac{(A_{jj})^2}{r_{jp}^{12}} \quad \text{Eq. 2.7}$$

$$f^B(p) = \sum_{j \in \text{rigid terms}} \frac{(B_{jj})^2}{r_{jp}^6} \quad \text{Eq. 2.8}$$

onde A e B são os parâmetros repulsivos e atrativos, respectivamente, e  $r_{jp}$  é a distância do átomo j ao ponto p no espaço.

O potencial eletrostático em um ponto p no espaço pode ser obtido similarmente:

$$\mathbf{f}^{ES}(p) = \sum_{j \in \text{rigid termos}} \frac{q_j}{\mathbf{e}r_{jp}} \quad \text{Eq. 2.9}$$

onde  $q_j$  é a carga atômica do átomo j.

Para o termo do dessolvatação, duas grades são requeridas:

$$\mathbf{f}^{DES,ESPL}(p) = \sum_{j \in \text{termos rigidos}} f_j \exp\left(\frac{-r_{jp}^2}{2\mathbf{s}^2}\right) \quad \text{Eq. 2.10}$$

$$\mathbf{f}^{DES,BULK}(p) = \sum_{j \in \text{termos rigidos}} S_j \exp\left(\frac{-r_{jp}^2}{2\mathbf{s}^2}\right) \quad \text{Eq. 2.11}$$

Conseqüentemente, se um átomo livre i com parâmetro de solvatação  $S_i$  e fragmento de volume  $f_i$ , está situado no ponto p da grade, a dessolvatação do átomo móvel i, através de átomos rígidos, será igual ao  $S_i$  vezes  $\phi^{DES, EXPL}(\pi)$  e a dessolvatação dos átomos em maior volume, rígidos, através do átomo i será igual ao  $f_i$  vezes  $\phi^{DES, BULK}(p)$ .

Para calcular o potencial em algum ponto na grade, um esquema de interpolação tri-linear a partir dos oito pontos de grade mais próximos<sup>(45)</sup> é usado. A energia total de interações não ligadas entre os átomos movendo-se livremente e os fixos será obtida por:

$$\sum_{i \in \text{mobile átomos}} \left[ A_{ii}^2 \mathbf{f}^A(x_i) + D_{ii}^2 \mathbf{f}^B(x_i) + q_i \mathbf{f}_i(x_i) + S_i \mathbf{f}^{Des,EXPL}(x_i) + f_i \mathbf{f}^{DES,BULK}(x_i) \right]$$

Eq. 2.12

onde  $x_i$  denota as coordenadas do átomo móvel  $i$ .

Para calcular a força em um átomo que se move livremente devido aos átomos rígidos, uma grade de força envolvendo o átomo móvel é construída, quando necessário. É considerada como o negativo do gradiente da grade potencial. A seguir, a força sobre o átomo móvel é calculada através do mesmo esquema de interpolação tri-linear, mas usando a grade de força.

Se o ligante tiver se movido para as bordas das grades, ou além das grades, durante o processo do acoplamento, (por exemplo, através de uma importante translação), suas interações com átomos rígidos não poderão mais ser computadas usando grades. Neste caso, uma força restauradora será aplicada para trazer o ligante de volta à grade. Embora isto possa causar descontinuidade nas forças do ligante, isto não será significativo, desde que a região além da grade seja considerada sem importância.

Este método da grade trabalha somente se os átomos definidos por um conjunto como um maior volume (e representados por grades) e os átomos móveis forem razoavelmente separados. Se não, a interpolação tri-linear será uma aproximação grosseira à solução exata, analítica. Conseqüentemente, uma região intermediária que funcionará como um amortecedor, será introduzida para separar os átomos livres dos outros. Em outras palavras, os móveis serão subdivididos em livres e restritos, dependendo das distâncias àqueles no volume maior. Se a distância entre eles for menor do que a soma de seus raios de van der Waals, mais aqueles restritos (definidos pelo usuário), o átomo móvel estará restrito à sua posição original que usa uma força harmônica de  $100 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{kcal} \cdot \text{Å}^{-1}$ . Suas interações com os átomos de maior volume não serão computadas usando grades. A presença deste “amortecedor” vai assegurar que os átomos livres (cujas energias e forças devido aos átomos de maior volume são avaliadas usando grades) estarão, ao menos, além de seu contato de van der Waals, ajustado a  $0.5 \text{ Å}$ .

Entretanto, notemos que se este método é aplicado ao acoplamento, todos os átomos do ligante devem ser móveis, mesmo se alguns deles estiverem próximos aos átomos rígidos. Isto significa que todos os átomos próximos ao

ligante devem pertencer ao subconjunto do sítio de recepção. Por exemplo, em nosso caso, define-se um conjunto (*subset*) onde todos os átomos do receptor estarão dentro de 12Å do átomo de Fe da hemeoporfirina.

### 2.7.1.3 Restrições geométricas

Termos externos ao programa Affinity, relativos às restrições geométricas podem ser adicionados ao estudo de interações, por considerarem algumas das características necessárias para boas interações no sítio ativo (como descrevemos para o processo de relaxamento estrutural de um sistema molecular). Estes termos, no entanto, não são necessários para Grid/Docking.

#### 2.7.1.4 - Interações *via* ligações hidrogênio

Freqüentemente durante os primeiros passos da pesquisa conformacional, o uso de campos de forças da mecânica molecular não é suficiente para garantir convergência. Para o exemplo, quando há possibilidades óbvias de ligações hidrogênio entre o ligante e o receptor, poder-se-ia aumentar a possibilidade de se encontrar uma conformação de interesse (o bióforo) por maximização dos contatos *via* ligação hidrogênio. Desta forma, Affinity conta com um termo geométrico de restrição que maximiza os contatos entre os átomos doadores de hidrogênio e os átomos aceptores:

$$E_{\text{Hbond}} = k \sum_b A_1 [e^{-\alpha(r-r_0)^2}] + A_2 [e^{-\beta(r-r_0)^2}] \quad \text{Eq. 2.13}$$

onde  $A_1 = A_2 = -10.0$ ,  $\alpha = 2.0$ ,  $\beta = 1.0$ , e  $r_0 = 1.8 \text{ \AA}$ .

$k$  é um parâmetro ajustável que especifica a escala total deste termo.

A soma é conduzida sobre todos os pares dos átomos doadores de hidrogênio e os aceptores. Esta forma particular de restrição geométrica foi projetada para efetuar um intervalo de força médio com um mínimo muito próximo à distância ideal de interação de 1.8 Å. As constantes da força foram parametrizadas para serem proporcionais aos outros termos do campo de forças.

Deve-se ter em mente que este termo está previsto para ser usado na fase inicial do acoplamento para guiar o ligante em direção às interações ligantes favoráveis. Como se refina as conformações de *docking* com o campo de força completo, é aconselhável remover lentamente este termo pela redução do valor de  $k$ .

#### 2.7.1.5 Confinamento do ligante.

Em especial para o estudo de docking a vácuo, o ligante pode, às vezes, ser afastado da cavidade de recepção. Este comportamento pode ser restrito por introdução de forças que contenham razoavelmente as interações àquelas dentro na cavidade. Um termo de confinamento do ligante foi introduzido:

$$E_{\text{ligandConfine}} = k(\max(d - d_0, 0.0))^2 \quad \text{Eq. 2.14}$$

onde

$d$  é a distância, em ângstrons, entre os centros da massa do sítio de recepção e do ligante;

$d_0$  é um parâmetro de *input* ajustável que especifica a extensão da cavidade de recepção; e

$k$  é ajustado para ser 100.0 *by default*.

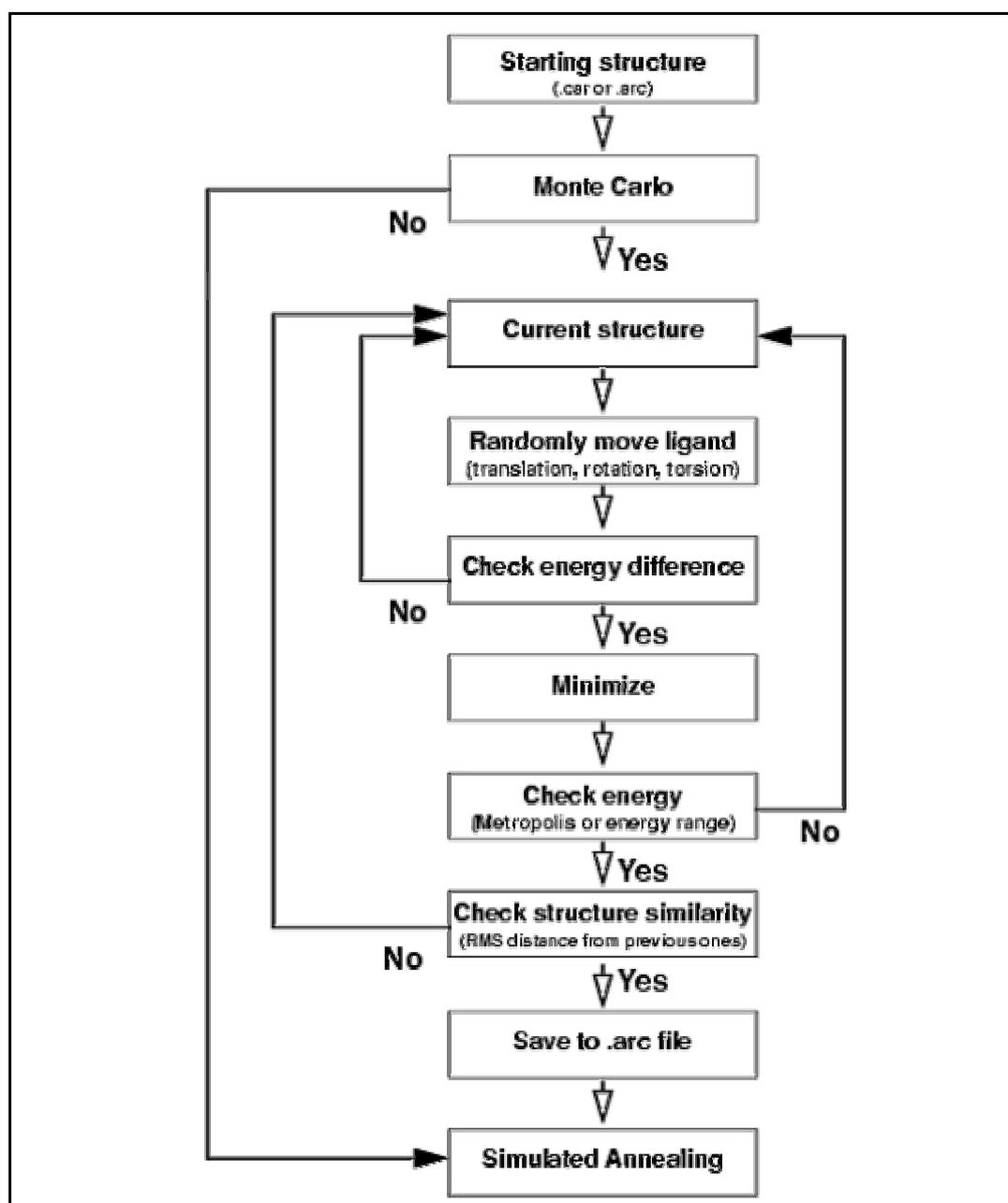
Pode-se compreender que o termo de confinamento do ligante é correto, enquanto o centro de massa do ligante estiver  $d_0$  dentro do centro de massa da cavidade de recepção. Neste caso, o termo não fornecerá nenhuma força ao sistema e não terá nenhuma interferência nos detalhes dos modos de interação.

### 2.7.2 Procedimentos para o *docking*

O docking de Affinity propõe protocolos flexíveis que compreendem Monte Carlo, *Simulated Annealing* e minimização. O fluxograma abaixo representa o funcionamento típico do procedimento para os cálculos de ancoramento. O

processo tem início por um posicionamento manual das moléculas envolvidas no *docking*, de forma razoável. Uma minimização de energia é efetuada para se corrigir os erros mais grosseiros. O ligante se move, então, por uma combinação aleatória de translação, rotação e torções. O movimento randômico visita o espaço conformacional do ligante e sua orientação com respeito ao receptor. Isto tem a vantagem de superar todas as barreiras de energia na hipersuperfície potencial de energia. Nesta fase do cálculo escolhem-se cuidadosamente os termos não ligados.

Figura 2-2 Fluxograma para o docking de Affinity



### 2.8.1 O solvente e a constante dielétrica

Para se modelar um sistema protéico é bastante conhecido que o solvente deve ser incluído na simulação, caso o resultado dependa de interações fortes ou de efeitos hidrofóbicos. Uma simulação rigorosa de proteína deverá incluir moléculas de água explícitas, ao menos duas ou três camadas em torno da superfície da proteína. Tal rigor pode ser computacionalmente proibitivo para grandes sistemas. Caso os resultados não dependam do solvente, talvez as águas não precisem ser explícitas. Frequentemente, para que o efeito do solvente possa ser modelado implicitamente, usa-se o ajuste do comportamento através da constante dielétrica.

O tratamento quantitativo de efeitos dielétricos no interior da proteína é um dos principais problemas que hoje limitam a exatidão, confiabilidade, e a utilidade de cálculos de estrutura, baseados em energias eletrostáticas no *continuum*. A superfície de uma proteína representa uma relação entre substâncias de propriedades dielétricas muito diferentes. Nos cálculos com métodos do *continuum* as propriedades dielétricas no interior da proteína e na fase solvente são representadas em termos de constantes dielétricas.

Esta pode ser ajustada a um valor único, ou ser substituída por uma função, usualmente a distância à primeira potência, também chamada “dielétrica dependente da distância”. Estes valores todos são questionados, pois não podem considerar a contribuição estrutural do solvente introduzida através das ligações hidrogênio.

Uma constante dielétrica igual a 4 é usada geralmente em métodos do *continuum* para modelar as propriedades dielétricas do interior da proteína (John J. Dwyer,<sup>\*</sup> Apostolos G. Gittis,<sup>\*</sup> Daniel A. Karp,<sup>\*</sup> Eaton E. Lattman,<sup>\*</sup> Daniel S. Spencer,<sup>□</sup> Wesley E. Stites,<sup>□</sup> & Bertrand García-Moreno E.<sup>\*</sup>; *High Apparent Dielectric Constants in the Interior of a Protein Reflect Water Penetration*. Biophys J, September 2000, p. 1610-1620, Vol. 79, No. 3). Constantes dielétricas similares

são preditas para proteínas por uma variedade dos cálculos teóricos baseados na análise da modalidade normal e em simulações molecular da dinâmica (Gilson, M. K., and B. H. Hönl. 1986. *The dielectric constant of a folded protein*. Biopolymers. 25:2097-2119 [[Medline](#)]; Simonson, T., and D. Perahia. 1995. *Internal and interfacial dielectric properties of cytochrome c from molecular dynamics in aqueous solution*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92:1082-1086 [[Abstract](#)]).

Há três modelos diferentes que incorporam a constante dielétrica: o modelo dielétrico uniforme; o modelo dielétrico dependente da distância e o modelo dielétrico da cavidade (Rogers, N. K, In: Ed. Fasman, G.D., "Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation"; **Plenum Press**:New York & London, 1990, Ch.8, 359-389). O primeiro assume que há um valor de  $\epsilon$  que pode ser usado a nível molecular. Dentro da proteína, este valor é considerado entre 2 e 5. Há também trabalhos que indicam altos valores para  $\epsilon$ , entre 44 e 128. Estes valores menores parecem bem estimar o interior da proteína, mas ignoram que ela se encontra envolta em água, que possui alto valor de  $\epsilon$ . Ignoram também que o solvente produz forte efeito na proteína. O segundo modelo é pragmático nas descrições físicas das interações eletrostáticas. Assume que, para as separações da ordem das dimensões atômicas, o  $\epsilon$  entre dois pontos será aquele do espaço livre e, para maiores distâncias, o maior valor de  $\epsilon$  para a água será usado. Para distâncias intermediárias, assumirá que o dielétrico varia com a distância de uma forma apropriada. O terceiro modelo é macroscópico e considera a proteína como um meio de baixa polarizabilidade com uma dielétrica inferior a 5, imersa em um solvente com alta dielétrica (80 para água). A forma da cavidade é modelada como uma esfera, um elipsóide, ou uma forma não analítica e os potenciais eletrostáticos são calculados através da solução para a equação de Poisson- Boltzmann.

Uma constante dielétrica de 4 é muito mais baixa do que a constante dielétrica da água (78.5 em 25°C), mas representa uma polarizabilidade relativa substancial no vácuo. Não obstante, quando uma constante dielétrica baixa é usada com estruturas estáticas, os valores de energias eletrostáticas nas proteínas são exagerados em cálculos do *continuum*. Este problema é mais acentuado em cálculos que envolvem os grupos imersos no interior da proteína. (García-Moreno, E. B., J. J. Dwyer, A. G. Gittis, E. E. Lattman, D. S. Spencer, and

W. E. Stites. 1997). Paradoxalmente, a polarizabilidade experimental para estes grupos é consideravelmente maior do que a polarizabilidade correspondente à constante dielétrica 4. Mecanismos físicos podem ser utilizados para a contribuição da polarizabilidade no interior de proteínas. Mecanismos moleculares gerais podem ser propostos previamente para racionalização de um aparente aumento da polarizabilidade dentro das proteínas, cujas conjecturas não possam ser comprovadas experimentalmente.

Há métodos de cálculos que permitem simular solventes para a avaliação de energias eletrostáticas em proteínas, incluindo dois valores para duas constantes dielétricas. Um deles simula o soluto e o outro o solvente, representando o efeito do meio sobre a proteína. Este é o método de Poisson-Boltzmann. Para nossos estudos, utilizamos o programa DelPhi, desenvolvido pelo Prof. Barry Hönig, da Universidade de Columbia, USA (M. Gilson and B. Hönig. *Proteins: Struc., Func. and Genet.* 4(1), 7-18 (1988).

B. Hönig, and A. Nicholls. *Science* 268(5214), 1144-1149 (1995).

K. Sharp and B. Hönig. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 19, 301-332 (1990).).

Os contornos eletrostáticos foram obtidos pela interface gráfica de InsightII.

### 2.8.1 O programa Delphi

Na teoria eletrostática clássica os materiais são considerados meios dielétricos homogêneos que podem ser cargas elétricas<sup>(23)</sup>. Uma constante dielétrica pode ser considerada como uma medida de volume da polarização deste meio. Assim sendo este passa a ser um modelo contínuo porque a polarização de cada átomo não é considerada. A Lei de Coulomb, Eq. 2.15 descreve a energia eletrostática ( $E_{ij}$ ), em termos de duas cargas  $q_i$  e  $q_j$ , à distância entre os átomos,  $r_{ij}$ , a constante dielétrica  $\xi$ .

O potencial  $j_i$  para o átomo  $i$  é dado por:

$$j_i = \frac{q_i}{\epsilon r_{ij}} \quad \text{Eq.2.15}$$

Por exemplo, duas cargas de +1, separadas por 1Å no vácuo ( $\epsilon$ , constante dielétrica igual a 1) têm uma energia de  $560.9 \kappa T$  (onde  $\kappa$  é constante de Boltzmann e T é a temperatura em Kelvin) ou 331 Kcal/mol. É importante notar que o modelo só é válido para um infinito médio num dielétrico uniforme, o qual com certeza não é o caso de soluções complexas de macromoléculas nem fármacos, ligantes e solventes polares (como a água). E naturalmente esses são os problemas típicos de interesse.

As macromoléculas como as proteínas têm constantes dielétricas muito baixas (normalmente 1-5) porque seus grupos polares de suas cadeias laterais estão mais ou menos congelados no mesmo lugar e não podem realmente se reorientar em resposta a um campo dielétrico externo aplicado e, também, grande parte das macromoléculas são apolares. Assim um sistema macromolecular em soluções aquosas tem externamente duas propriedades dielétricas para os dois componentes, macromolécula-água. A equação de Poisson-Boltzmann é capaz de modelar este tipo de situação.

O campo eletrostático F, e deslocamento eletrostático D como função de r podem ser escritos como:

$$F = -\nabla \cdot \mathbf{j}(r) \quad D = \epsilon(r) \cdot F(r) \quad \text{Assim. } D = -\epsilon(r) \cdot \nabla \cdot \mathbf{j}(r) \quad \text{Eq. 2.16}$$

Note que  $\epsilon$  é rigorosamente um tensor, isto é, a polarização pode, em teoria, estar em uma direção diferente do campo. Na prática isto é ignorado e este tensor é tratado como uma quantidade escalar. Em meios dielétricos não-homogêneos de cargas, a equação de Poisson relata o deslocamento da densidade de cargas  $\rho(r)$ :

$$\nabla \cdot D(r) = 4\pi \rho(r) \quad \text{Eq. 2.17}$$

$$\text{Substituindo } D(r) \text{ na Eq. 2.16} \quad : \nabla \cdot [\epsilon(r) \cdot \nabla \cdot \mathbf{j}(r)] + 4\pi \rho = 0 \quad \text{Eq. 2.18}$$

A equação da densidade de cargas é separada, normalmente, em duas partes:

$$\mathbf{r} = \mathbf{r}_{\text{interna}} + \mathbf{r}_{\text{externa}}$$

onde  $\rho_{\text{interna}}$  corresponde à distribuição de cargas de todas as cargas fixadas dentro da molécula, e  $\rho_{\text{externa}}$  é a distribuição de cargas fora da molécula, isto é, um solvente, o qual informa a reorientação e redistribuição de íons na solução.

A densidade de carga  $\rho_{\text{externa}}$  pode ser modelada pela distribuição de Boltzmann. Se densidade de carga for baixa, então:

$$4\pi\rho_{\text{externa}} = -k^2\mathbf{j}(r) \quad \text{Eq. 2.19}$$

$$k^2 = \frac{ek^2 = 8pe^2N_A I}{1000kT} \quad \text{Eq. 2.20}$$

onde  $\epsilon$  é a constante dielétrica do solvente,  $\phi$  é o potencial eletrostático em unidades de  $\kappa T/e$ ,  $e$  é a carga do elétron,  $N_A$  é o número de Avogadro,  $I$  é força iônica em moles/litro,  $\kappa$  é constante de Boltzmann,  $T$  é a temperatura em Kelvin, e  $\kappa$  é o inverso do comprimento Debye-Hückel. Note que  $\kappa$  aparece com cargas acumuladas de sinal negativo oposto ao sinal do potencial induzido.

A substituição da Eq. 2.20 na da equação de Poisson, Eq. 2.18, conduz à forma linear da equação de Poisson-Boltzmann:

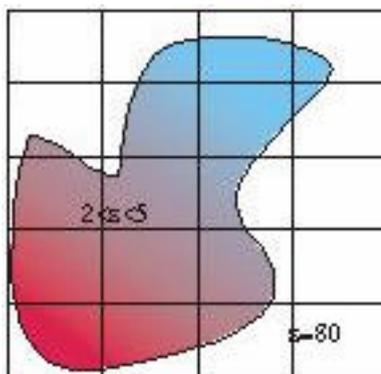
$$\nabla \cdot [\epsilon(r) \nabla \phi(r)] - k^2\mathbf{j}(r) + 4\pi\rho_{\text{interno}}(r) = 0 \quad \text{Eq. 2.21}$$

onde  $\kappa_0$  é 0 dentro da molécula e  $\kappa$  fora da molécula (isto é, no solvente).

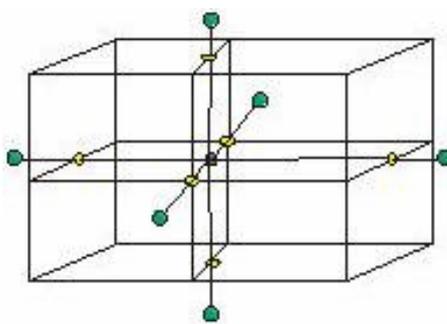
A equação de Poisson-Boltzmann é um bom modelo para a propriedade eletrostática de sistemas biológicos (orgânicos) complexos porque inclui os efeitos dielétricos de solvente/molécula bem como a força iônica, exceto para alguns sistemas que não podem ser resolvidos analiticamente. Aproximações numéricas tais como o algoritmo de diferencial finita são necessárias para se resolver a

equação de Poisson-Boltzmann para complexos e estruturas de moléculas orgânicas em solução.

A solução numérica normalmente escolhida para resolver a equação de Poisson-Boltzmann é traçar a molécula sobre uma superfície tridimensional e aplicar a aproximação diferencial finita. A representação bidimensional é mostrada abaixo. Nota que o espaçamento da grade é mostrado como  $d$ , e que o interior da molécula é chamado um dielétrico  $\epsilon_{\text{interno}}$  a partir do exterior da molécula que é denominado  $\epsilon_{\text{externo}}$ .



A equação de Poisson-Boltzmann deve ser satisfeita em qualquer lugar no sistema, mais importante para cada ponto da grade. Se uma das dimensões  $d \times d \times d$  for considerada em volta de cada ponto na grade, as derivadas da Eq. 2.21 podem ser trocadas por diferenciais finitas, medidas no cubo. Assim, as funções  $\phi(r)$ ,  $\epsilon(r)$ ,  $\rho(r)$  podem ser representadas por seus valores na grade de pontos.



Na figura acima, a esfera preta representa os pontos de grade de interesse ( $i=0$ ), as esferas verdes são os seis pontos de grade vizinhos ( $i=1-6$ ). Para cada um destes sete pontos no espaço estão associados valores de  $q_i$ ,  $\phi$ ,  $k_0$ . Os pontos amarelos estão na superfície do cubo em volta do ponto de grade 0, identificando o dielétrico que está sendo calculado na metade do caminho do ponto de grade 0 e cada um dos seis vizinhos.

O potencial para qualquer ponto da grade 0 depende de  $q_0$ ,  $k_0$  e  $\phi_0$  com um espaçamento de grade  $d$ , do potencial  $\phi_i$  e da constante dielétrica  $\epsilon$  de seus pontos de grade vizinhos.

$$j_0 = \frac{\sum e_j \phi_i + 4p \frac{q_0}{d}}{\sum e_i + k^2 d^2 N} \quad \text{Eq. 2.22}$$

onde,

$N = 1$  para o caso linear (Eq. 2.21);

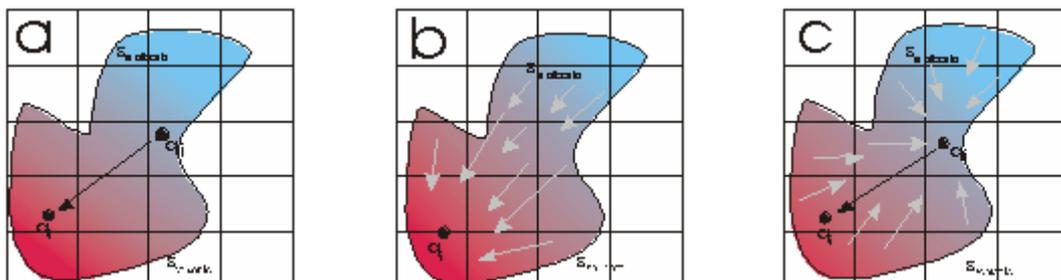
$N = (1 + \phi_0^2/3! + \phi_0^2/5! + \dots)$  para o caso não-linear se a densidade de carga da molécula e a força iônica da solução não forem baixas.

O potencial para cada ponto de grade pode ser calculado. É importante notar que este potencial se ajustará como uma função de potencial dos pontos de grade vizinhos. Assim, este cálculo será repetido aumentando a precisão e a exatidão do potencial. Alguns critérios fixos de convergência devem ser estabelecidos para cada iteração.

A melhor quantidade para o potencial eletrostático é o próprio potencial eletrostático. O potencial  $\mathbf{a}$  de uma carga pode ser incluído de três maneiras: o potencial de Coulomb de todas as cargas (figura a), a reação do solvente para uma carga (figura b), a reação da solvatação para outras cargas (figura c).

$$\mathbf{j}_{\text{outros}}(i) = \mathbf{j}_{\text{coulomb}}(i) + \mathbf{j}_{\text{energia}}(i) + \mathbf{j}_{\text{escondido}}(i) \quad \text{Eq. 2.23}$$

A utilidade desta decomposição é que a mesma representa: o campo de força no vácuo (a), a energia da carga no contexto do dielétrico da molécula (b) e a interação do solvente com carga dentro da molécula (c).



Isto, quando acrescentou ao potencial a uma dívida de carga é o próprio campo  $\phi_i(i)$ , o potencial total de campo.

$$\mathbf{j}_{total}(i) = \mathbf{j}_{outros}(i) + \mathbf{j}_i(i) \text{ Eq. 2.24}$$

Todos estes métodos rapidamente descritos, e as estratégias escolhidas para o desenvolvimento do estudo proposto, foram utilizados para os cálculos efetuados e analisados nos capítulos posteriores deste manuscrito.

## Capítulo 3 Metodologia, resultados e discussão

### 3.1 METODOLOGIA PARA O RELAXAMENTO ESTRUTURAL DA PROTEÍNA *mtCP* CRISTALINA.

#### 3.1.1 O arquivo original de coordenadas atômicas proveniente do PDB: 1SJ2

O arquivo contendo coordenadas cristalinas da proteína *mtCP*, do cofator protoporfirina (ou grupo heme, em designação corrente) a ela complexo e das águas cristalinas provieram do Brookhaven Protein Data Bank (código PDB: 1SJ2)<sup>(46)</sup>. A estrutura foi publicada por Thomas BERTRAND et al., em 2004.<sup>(16)</sup> O sistema molecular cristaliza no grupo de espaço  $P4_22_12$ , com parâmetros de unidade assimétrica  $a=b=150.3 \text{ \AA}$ ,  $c=154.3 \text{ \AA}$ ;  $\alpha=90^\circ$ ,  $\beta \neq 90^\circ$  e  $\gamma=90^\circ$  (Figura 3-1). A resolução estrutural foi de  $2.41 \text{ \AA}$  e cela unitária cristalina contém um conjunto formado por duas cadeias idênticas perfazendo um total de 11058 átomos, excluídos os átomos de hidrogênio (resíduos de A24 a A740 e B24 a B740 e duas estruturas heme), 6 moléculas de glicerol (3 átomos de carbono e 3 átomos de oxigênio, cada) e 703 moléculas de água.

Estes dois monômeros idênticos do *mtCP* contêm, cada um, dois domínios distintos: o Nterminal onde se encontra o motivo heme ligante, enquanto o C-terminal não o contém. Geralmente cada domínio das CP's tem cerca de 40kDa<sup>(14)</sup>. A *mtCP* é um homodímero, composta por seus dois monômeros A (em laranja e azul) e B (em verde), Figura 3-1. Em laranja aparece a seqüência de aminoácidos de [A24-A446] e, em azul, de [A447-A740].

#### 3.1.2 As modificações efetuadas a partir do arquivo original de coordenadas atômicas do 1SJ2

A razão da separação de cores para o monômero A, na Figura 3-2, deve-se ao fato de que nossos estudos sobre a proteína *mtCP* foram feitos sobre parte do monômero A. Primeiro: considerando a simetria estrutural na cela cristalina, o dímero não seria essencial. Usamos, portanto, somente uma das duas cadeias de aminoácidos. Segundo: devido à limitada potência dos computadores disponíveis,

14 – KAPETANAKI, Sofia M., et al. *Biochemistry*, 44 (1), 2005

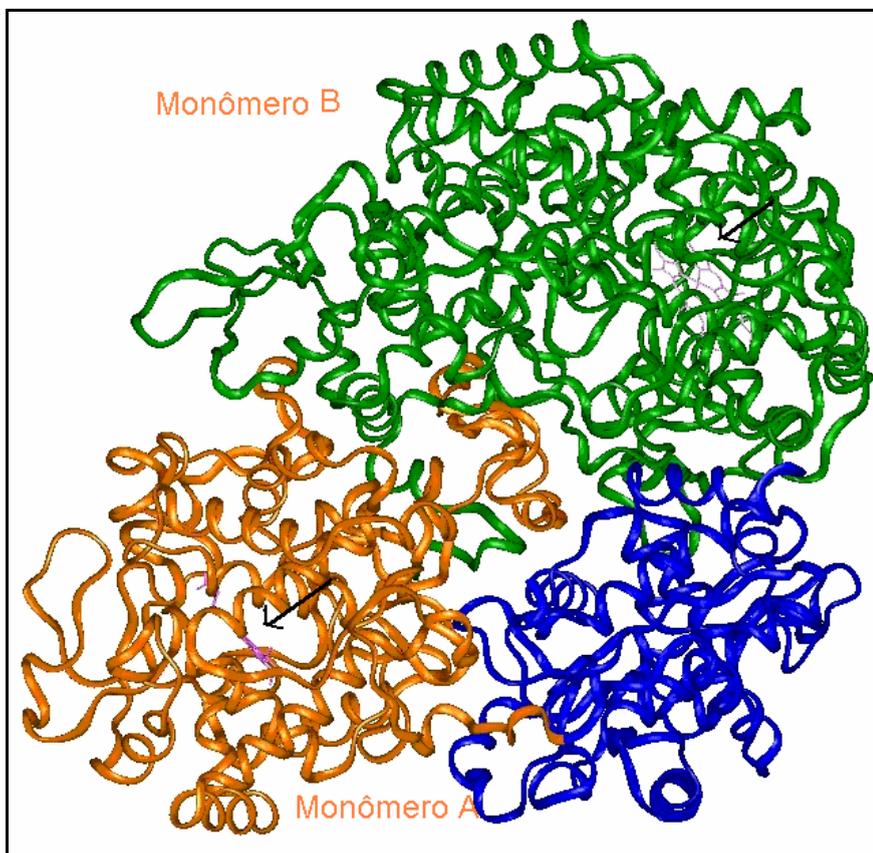
16 – BERTRAND, Thomas et al. *J. Biol. Chem.*, 279, (2004)

46 – <http://www.pdb.org/>. acessado em 10 de agosto de 2005

não seria possível efetuar os cálculos das trajetórias dinâmicas necessárias para o *docking*, dentro do tempo de preparo de uma dissertação de mestrado. Terceiro: estudos anteriores efetuados em nosso laboratório demonstram também que, devido à forma natural da estrutura protéica, os cálculos teóricos conduziam a resultados similares, quando efetuados sobre os 446 aminoácidos iniciais da cadeia monomérica.

Esta estruturação característica pode ser facilmente observada na Figura 3-1, onde os domínios C e N - terminais apresentam uma nítida separação no centro entre as seqüências de aminoácidos de [A24 a A446] e de [A447 a A740].

**Figura 3-1:** Estrutura cristalina do *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase.



O domínio Nterminal da cadeia A está identificado pela cor laranja e o Gterminal, em azul; a cadeia B está identificada pela cor verde. As protoporfirinas dos monômeros A e B estão indicadas em rosa (setas). As moléculas de água foram excluídas da imagem.

Tomando por base estes estudos precedentes, a cadeia A foi, então, dividida em duas: a primeira seqüência, [A24-A446], contém a protoporfirina e, conseqüentemente, o hipotético sítio ativo da proteína. Ao aminoácido Gly-A24 foi atribuída a porção amino-terminal e à His-A446, a porção carboxi-terminal. A

seqüência restante do monômero A, de [A447-A740], foi excluída. Desta forma preservou-se a vizinhança passível de interagir a curtas e médias distâncias. As águas cristalinas em torno da seqüência [A24-A446] foram também preservadas e as outras determinadas por raios-X, dentro da cela unitária, também foram excluídas.

Portanto, todos os cálculos foram feitos sobre a seqüência [A24-A446]. Os aminoácidos desta primeira seqüência [Gly24-His446] foram confinados em uma cela de dimensões  $a = b = c = 80 \text{ \AA}$ ;  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ . A cela unitária simulada contém, agora, um conjunto formado por uma cadeia de 717 aminoácidos, perfazendo um total de 6523 átomos, incluindo-se os átomos de hidrogênio. A este número adiciona-se uma molécula da protoporfirina, com 79 átomos, 3 moléculas de glicerol (14 átomos, cada) e 361 moléculas cristalinas de solvente. Para reduzir a mobilidade do complexo, e minimizar o efeito de bordas, três camadas de água suplementares a ele foram adicionadas. Dentre elas, as que haviam se posicionado dentro da cavidade de recepção foram excluídas. O número total de moléculas de água adicionadas foi de 642. Observe-se, no entanto, que as águas cristalinas w235, w352, w427 e w7 (*vide* Figura 1-6, capítulo 1) foram mantidas em todos os cálculos, até que a isoniazida fosse inserida no sítio ativo. Contando todas as águas cristalinas e as adicionadas, o sistema contém 1003 moléculas de solvente. Este número foi considerado suficiente por envolver completamente o complexo. Caso fossem adicionadas somente duas camadas de água, vários aminoácidos mais externos não teriam sido completamente envolvidos como, por exemplo, a Lys-213.

### **3.2 *Processo de relaxamento do complexo enzima: cofator heme: águas cristalinas e adicionadas.***

#### **3.2.1 O que significa “Processo de relaxamento”?**

Resultados de refinamentos estruturais provenientes da difração de raios-X usualmente não determinam as posições dos átomos de hidrogênio. Por isto, todos eles devem ser posicionados teoricamente. Frisemos que centenas de átomos de hidrogênio são, assim, adicionados ao sistema molecular cristalino e

eles não fizeram parte do processo de refinamento, ao qual o sistema é submetido nos procedimentos cristalográficos. É imprescindível que o conjunto seja homogeneizado por cuidadoso protocolo dentro da mecânica molecular, para que não se deforme a conformação obtida no estado sólido. Além disto, o programa Discover não pode trabalhar sem o posicionamento destes átomos de hidrogênio.

Estas correções iniciais são comumente consideradas como correspondendo à transição da estrutura em fase sólida, cristalina, para a fase gasosa, na qual os parâmetros de campos de força são calculados e, desta, para a fase líquida, simulando o sistema molecular em meio solvente. É este processo de transição entre os dados experimentais e os cálculos teóricos que se entende por “processo de relaxamento”. Esta etapa deve ser feita de forma extremamente criteriosa garantindo, assim, que o edifício protéico não sofrerá deformações devido à interferência do usuário, em consequência de cálculos mal conduzidos, induzindo a erros todas as análises posteriores.

### 3.2.2 A estratégia definida para o Processo de Relaxamento.

Cumprindo rigorosamente a estratégia descrita no item referente à metodologia de trabalho, procedemos ao processo de relaxamento. A primeira etapa de cálculos, **etapa (1)**, para o sistema enzima-cofator heme-águas corresponde à minimização de energia através de 1000 iterações utilizando o algoritmo *steepest descent*. Este algoritmo é um robusto método de minimização, e através dele, ocorre um decréscimo significativo de energia no sistema. O objetivo nesta fase não é conduzir o sistema a um poço de potencial, mas à aceitação dos hidrogênios, sem deformar o sistema. Portanto, os átomos semi-pesados do sistema molecular, ou seja, todos os átomos, exceto os átomos de hidrogênio adicionados, tiveram suas coordenadas atômicas bloqueadas, ou seja, fixadas pela restrição *fix atoms*.<sup>(\*)</sup>

A estratégia de cálculo definida para a continuidade do processo de relaxamento deste sistema estrutural cristalino utilizou seqüencialmente restrições

---

28 – User guide. **Forcefield Simulations**. 1995

42 – **Insight II 2000 package**; Accelrys

mais (*constraints*) ou menos (*restraints*) intensas, de forma a reduzir possíveis variações, ou mesmo distorções, do sistema molecular.<sup>(\*)</sup>

Três outras etapas sucessivas de cálculo foram definidas:

**Etapa (2):** as coordenadas atômicas das cadeias laterais da proteína e as águas cristalinas tiveram sua liberdade restrita, por restrições denominadas “*tether restraints*”. Os átomos da cadeia principal da enzima (*backbone*) e o grupo heme foram mantidos fixos;

**Etapa (3):** a cadeia principal da enzima e o grupo heme tiveram suas liberdades restritas por *tether restraints*. Os grupos restantes foram liberados;

**Etapa (4):** nenhuma restrição foi imposta ao sistema molecular.

Estas três últimas etapas foram conduzidas através do algoritmo matemático *conjugate gradient* até que as derivadas atingissem convergência da ordem de 5,0, 3,0 and 0,1 kcal.mol<sup>-1</sup>.Å<sup>-1</sup>, respectivamente. Todos os cálculos foram efetuados sem condições periódicas (*Periodic Boundary Conditions – PBC*) devido ao número de átomos que compõe o sistema molecular, que ultrapassa a capacidade computacional instalada. O *cut-off* para o cálculo da contribuição energética das interações não-ligadas foi progressivamente reduzido de 15 para 9.5 Å. O método do somatório das contribuições de van der Waals teve por base os grupos químicos (*group based*).

### 3.3 Processo de relaxamento do edifício protéico por mecânica molecular, com moléculas de solvente explícitas e constante dielétrica ( $\epsilon$ ) igual a 1,0.

As minimizações energéticas foram conduzidas seguindo a seqüência de restrições às coordenadas atômicas, como detalhadas nas tabelas abaixo. Uma estrutura cristalina, determinada por difração de raios-X, contém uma conformação energética mínima. A aplicação de forças que reduzem a liberdade molecular, ou seja, a estratégia de bloqueio, e progressivo desbloqueio, de partes do sistema molecular visa manter a estrutura terciária original, sem alterações bruscas da organização protéica em fase sólida.

---

(\*) c.f. ibid ref. 25 e29

**Tabela 3-1:** Protocolo usado para o relaxamento do sistema estrutural do *mtCP* sob análise, formado por proteína:cofator heme:solvente.

Conjuntos atômicos pré-definidos	Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3	Etapa 4
Hidrogênios do sistema molecular	coordenadas	livres	livres	livres
Átomos semipesados do cofator Heme	atômicas livres fixadas	fixadas	fixadas	livres
Átomos semipesados da cadeia principal de aminoácidos ( <i>backbone</i> )	fixadas	fixadas	liberdade restrita ( <i>tether</i> )	livres
Átomos semipesados das cadeias laterais de aminoácidos ( <i>side-chains</i> )	fixadas	restrita	livres	livres
Moléculas de água	fixadas	livres	livres	livres

Após cada etapa, as convergências sobre o gradiente atingidos após as etapas **2, 3 e 4** foram de 1,6; 2,1 e 0,03 kcal.mol<sup>-1</sup>.Å<sup>-1</sup>, respectivamente.

Estes cálculos conduziram a um valor de energia final de -20237,38 kcal.mol<sup>-1</sup>, conforme Tabela 3-2.

**Tabela 3-2:** Diferentes contribuições energéticas provenientes da segmentação da equação matemática que compõe o campo de força ESFF

Contribuições energéticas	Etapa 2		Etapa 3		Etapa 4	
	Inicial (kcal.mol <sup>-1</sup> )	Final (kcal.mol <sup>-1</sup> )	Inicial (kcal.mol <sup>-1</sup> )	Final (kcal.mol <sup>-1</sup> )	Inicial (kcal.mol <sup>-1</sup> )	Final (kcal.mol <sup>-1</sup> )
Energia potencial total	-10120	-10322	-17359	-18423	-18744.18	<b>-20237,38</b>
Energia interna	4556	4516	4521	3820	3791.26	3038.09
Deformações de ligações	1358	1323	1344	916	889.69	393.84
Deformações angulares	2062	2057	2050	1864	1857.71	1593.92
Deformações torsionais	1092	1092	1085	1010	1013.43	1025.91
Distorções ao plano	43	43	42	30	30.44	24.42
Interações não-ligadas	-14677	-14837	-21880	-22408	-22535.44	-23275.57
vdW	1787	1820	1087	1417	1425.34	1907.93
vdW repulsivas	13797	13912	19990	20879	20981.99	23050.84
vdW dispersivas	-12010	-12092	-18903	-19461	-19556.65	-21142.91
Eletrostáticas	-16463	-16657	-22967	-23825	-23960.79	-25183.50
<i>Tether-restraint</i>	0	164	0	156	0,00	0,00

### 3.4 Comparações entre as estruturas cristalina e otimizada da proteína mtCP.

#### 3.4.1 Análise pelo alinhamento da seqüência total de aminoácidos.

A comparação das variações estruturais entre a proteína cristalina e aquela que foi submetida ao processo de relaxamento foi feita através do método dos mínimos quadrados (*rmsd* = *root means square deviation*). Este método computa os desvios sobre as coordenadas atômicas dos sistemas a serem comparados, desvios estes dados em angstroms (Å).

O valor do *rmsd* resultante da superposição dos 6606 átomos semi-pesados (todos os átomos, exceto os de hidrogênio) de ambas as estruturas protéicas é de 1.45 Å (sendo 3303 átomos de cada estrutura protéica); aquele entre os átomos que compõem a cadeia principal da enzima é de 1.21 Å (sendo 3384 átomos superpostos); e, para os carbonos- $\alpha$  o *rmsd* = 1.19 Å (sendo 846 átomos superpostos) (Tabela 3-3).

**Tabela 3-3:** Valores de *rmsd* resultantes do alinhamento entre as coordenadas atômicas das estruturas cristalina e aquelas correspondentes às sucessivas etapas de minimização durante o processo de relaxamento da mtCP.

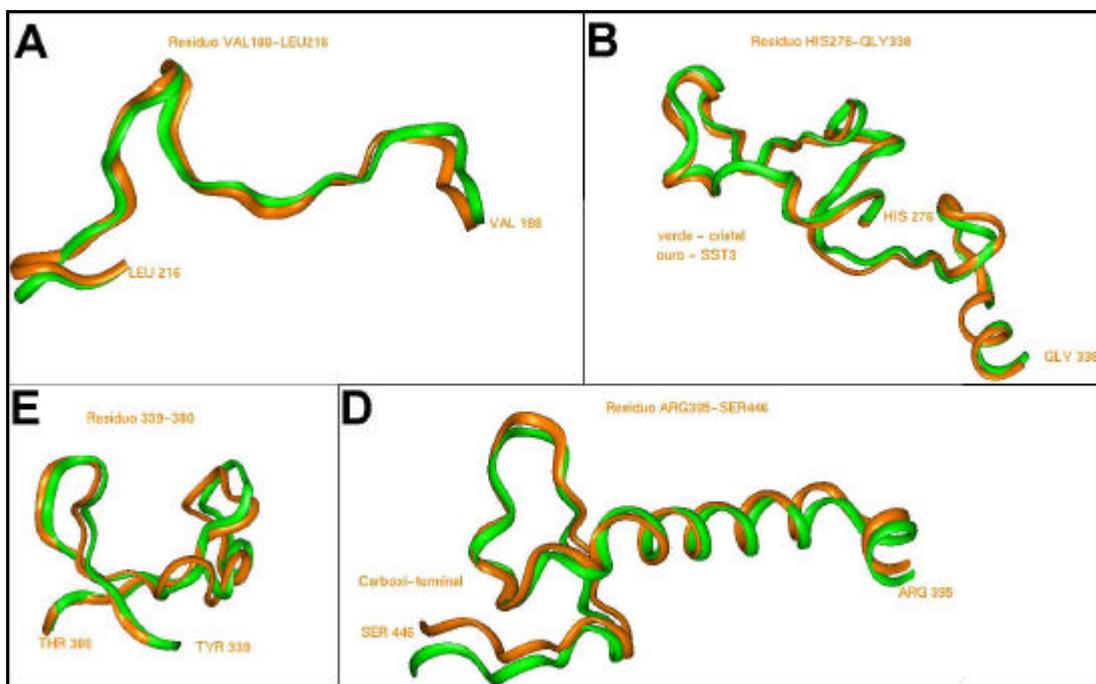
	<i>Rmsd</i> (Å)		
	Todos os átomos, exceto os de hidrogênio	Cadeia principal	Carbonos- $\alpha$
Etapa 1	1.23	1.02	0.99
Etapa 2	1.26	1.01	0.99
Etapa 3	1.45	1.21	1.19

Comparando-se somente as variações, em termos de *rmsd*, entre as quatro diferentes etapas de relaxamento (Tabela 3-4), pode-se destacar o resultado obtido na última etapa, com o sistema totalmente livre (*rmsd*= 0,91Å) e todos os átomos semi-pesados superpostos. O desvio obtido entre o relaxamento exclusivo dos átomos de hidrogênio e aquele onde as cadeias laterais foram ligeiramente liberadas conduziu ao pequeno valor de 0,37Å. O resultado global do processo foi considerado bastante razoável tendo em vista que o maior desvio foi de 1,01 Å.



As seqüências formadas por [CysH-171-Trp-191], [Gly-234-Arg-254], [His-276-Met-296] e [Glu-402-Pro-422] resultaram em valores de *rmsd* relativamente altos (1,16 Å, 1,08 Å, 1,02 Å e 1,08 Å, respectivamente), quando comparados à estrutura cristalina (Figura 3-3). Estes resultados se devem, a princípio, à posição externa destas seqüências na estrutura.

**Figura 3-3:** Alinhamento estrutural indicando os bons resultados obtidos após o processo de relaxamento<sup>(\*)</sup>. A) A porção amino-terminal relaxada, com inclusão de solvente. B) A porção carboxi-terminal coesa com a estrutura cristalina. C) Coesão das estruturas mais externas.



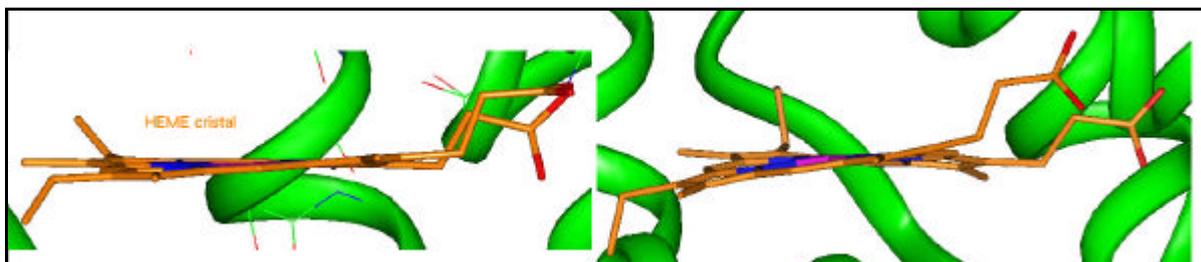
(\*) Em verde estão detalhados segmentos da proteína cristalizada e, em laranja, da estrutura otimizada energeticamente.

O importante decréscimo da energia potencial total da etapa 2 em direção à etapa 4, cujos valores são de  $-10120 \text{ kcal.mol}^{-1}$  a  $-20237,38 \text{ kcal.mol}^{-1}$ , é justificado pelas restrições impostas ao sistema molecular, em suas etapas iniciais. O decréscimo da energia potencial total da segunda etapa ( $-18.423 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ) foi bastante importante, indicando que é durante a liberação das cadeias laterais e da movimentação restrita da cadeia carbônica principal (*tether*) que ocorre a mais forte redução energética.

Além de verificarmos cuidadosamente a conservação da estrutura protéica, o mesmo foi feito em relação à estrutura do cofator, a protoporfirina. Neste

processo, este grupo não conservou uma planaridade igual àquela presente na estrutura de raios-X, provavelmente por deficiência dos parâmetros de campo de força (Figura 3-4).

**Figura 3-4:** Conformações da protoporfirina: a) em sua forma cristalina; b) após ação do campo de força ESFF, no processo de relaxamento.



Como há flutuações conformacionais da proteína, as interações entre a protoporfirina e a proteína também vão se alterar. Estas pequenas alterações entre as estruturas cristalina e minimizada são perfeitamente normais e validam os resultados obtidos, principalmente sabendo-se que a estrutura de uma proteína não é rígida. Mesmo as interações intramoleculares são dinâmicas, pois dependem do meio e de condições, como a temperatura e o pH. Por enquanto, fizemos somente uma transição entre a estrutura obtida no estado sólido, para a mesma estrutura no estado líquido. Nesta fase, quando somente a energia potencial foi considerada (e ainda não a energia cinética), nossos resultados apresentam-se bastante satisfatórios e podemos prosseguir com os estudos sobre as interações entre os diferentes componentes do complexo.

### 3.4.3 Algumas considerações intermediárias.

O processo dinâmico deverá, posteriormente, ser estudado. Conformações são responsáveis por parte da atividade da proteína. A estrutura cristalina da proteína obtida por difração raios-X não é necessariamente a forma ativa da proteína, pois as proteínas sofrem dobramentos e desdobramentos referentes à sua atividade ou ausência dela. Por isso, mudanças na estrutura protéica podem ser naturais e, talvez, necessárias para sua ativação.

Estes cálculos deverão ser efetuados, principalmente porque se sabe que a atividade da isoniazida é tanto bactericida, quanto bacteriostática. Pressupõe-se que a isoniazida atue no *m*tCP tanto na sua forma ativada, quanto na inativada. Por isso, talvez, pequenas variações conformacionais no sítio ativo do *m*tCP não modifiquem, significativamente, as interações da isoniazida com aminoácidos que participem do mecanismo de ação ligante-enzima.

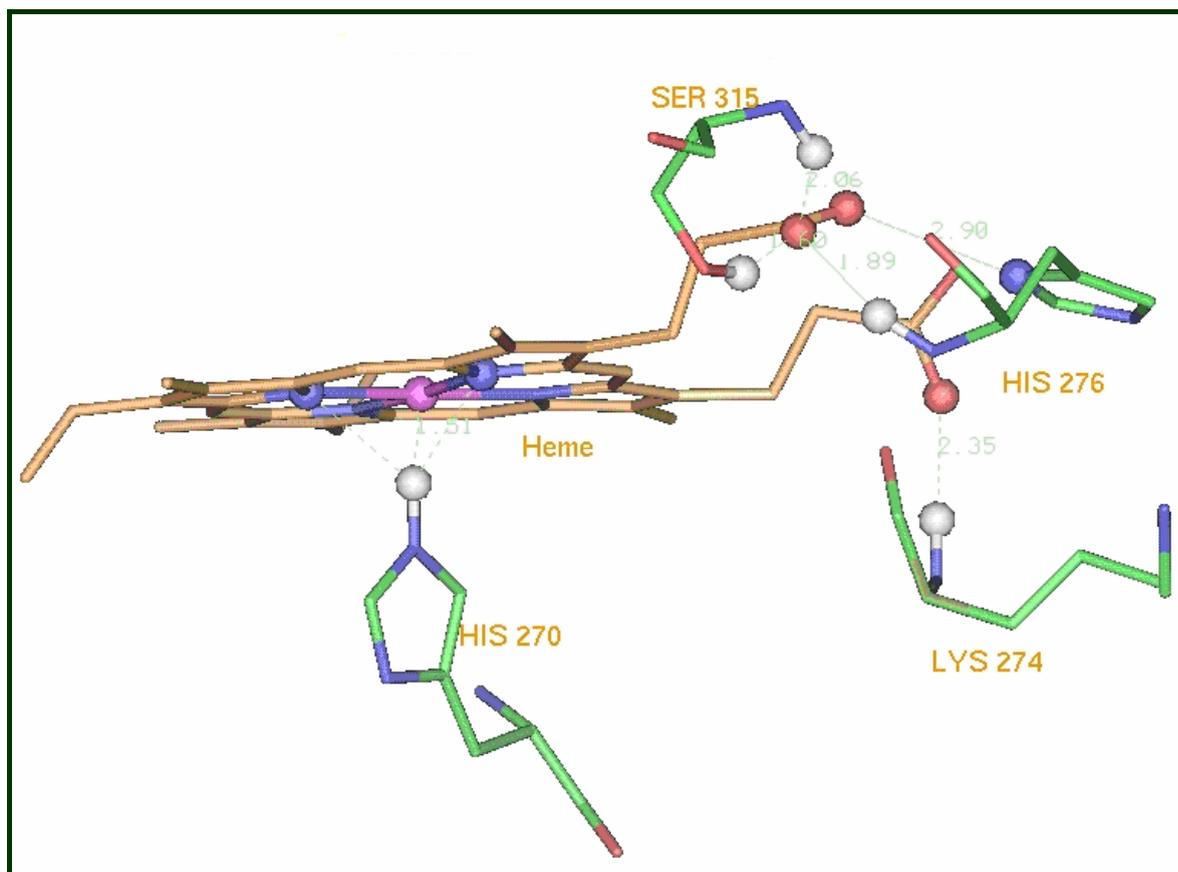
#### 3.4.4 Análise através da formação de ligações hidrogênio.

Um de nossos objetivos é verificar os aminoácidos que, interagindo com o cofator heme e, posteriormente, com a isoniazida, possam vir a constituir aqueles que compõem o sítio ativo do *m*tCP. Há vários modelos propostos na literatura e vamos compará-los aos resultados obtidos neste trabalho. Para isto, procedemos à análise da formação de ligações hidrogênio, a partir daquelas existentes na estrutura cristalina, que não contém a isoniazida.

Na estrutura cristalina, há 8 ligações hidrogênio formadas entre a protoporfirina e os aminoácidos His270, Lys274, His276 e Ser315 da proteína (Figura 3-5):

- o hidrogênio ( $H_{E2}$ ) do grupo NH da His-270 se liga fortemente, ao ferro da protoporfirina, a uma distância de 1,50Å;
- o mesmo átomo de nitrogênio da His-270 interage, através de seu hidrogênio, com dois dos nitrogênios ( $N_A$  e  $N_B$ ) do heme, a uma distância de 2,42Å e 2,29Å, respectivamente;
- através do átomo de hidrogênio do grupo NH, a Lys-274 interage com o oxigênio ( $O_{2D}$ ) de um dos grupos carboxílicos do heme, a uma distância de 2,35Å;
- o hidrogênio do NH da His-276 interage com o oxigênio  $O_{1A}$  do segundo grupo carboxílico do heme, a uma distância de 1,89Å;
- o nitrogênio ( $N_{D1}$ ) da His-276 que se liga ao oxigênio ( $O_{2A}$ ) do primeiro grupo carboxílico do heme, aqui mencionado, a uma distância de 2,90Å,
- e, finalmente, os hidrogênios  $H_N$  do NH e  $H_G$  do OH da Ser-315 se ligam ao oxigênio  $O_{1A}$  do heme, a uma distância de 1,60Å e 2,06 Å, respectivamente.

**Figura 3-5** – Interações fortes entre o grupo heme e os resíduos His-270, Lys-274, His-276 e Ser-315 que ocorrem no cristal.



Para facilitar a visualização dos resultados, a seguinte codificação de cores foi usada:

Átomo	Cor
Hidrogênio	
Carbono da protoporfirina	
Carbono da proteína	
Ferro	
Oxigênio	
Nitrogênio	

Nas Tabelas 3-5 e 3-6 estão reproduzidas as ligações hidrogênio formadas na cavidade de recepção da enzima cristalina e após relaxamento dos átomos de hidrogênio a ela adicionados (primeira etapa do relaxamento).

**Tabela 3-5:** Ligações hidrogênio formadas entre a proteína em sua forma cristalina e o cofator heme.

<b>Doador</b>	<b>Aceptor</b>	<b>Distância (?)</b>	<b>Ângulo (°)</b>
<i>mtCP_Cryst</i> : His-270: HE2	HEME:NA	2,42	138,31
<i>mtCP_Cryst</i> : His -276: HN	HEME:O1A	1,89	109,33
<i>mtCP_Cryst</i> : Ser -315: HG	HEME:O1A	1,60	131,57
<i>mtCP_Cryst</i> : Ser -315: HN	HEME:O1A	2,06	138,58
<i>mtCP_Cryst</i> : His -276: ND1	HEME:O2A	2,90	125,94
<i>mtCP_Cryst</i> : His -270: HE2	HEME:NB	2,29	139,90
<i>mtCP_Cryst</i> : LYS-274: HN	HEME:O2D	2,35	123,36
HEME:Fe	<i>mtCP_Cryst</i> : His -270: HE2	1,50	102,76

A Tabela 3-6 mostra as ligações hidrogênio que se formam durante as etapas 2 e 3 do processo de otimização de energia com moléculas de solvente explícitas. Estes resultados são importantes, pois mostram que estas interações podem se modificar durante o processo de otimização computacional.

Nestas duas etapas nota-se que algumas ligações hidrogênio se mantiveram, com ajuste dos valores de distância e ângulos e uma nova interação com uma molécula de água. Mas, as interações se modificaram em seguida.

Enquanto o sistema estava sob restrições, havia ligações hidrogênio entre a protoporfirina (O1A,O1A,O2D) e os aminoácidos Lis-274 (HN), His-276 (HN) e Ser-315 (HG), respectivamente. Estas ligações estavam presentes na proteína cristalina. Mas a interação com His- 270 foi perdida (Tabela 3-6).

**Tabela 3-6:** Ligações hidrogênio progressivamente formadas entre a protoporfirina e aminoácidos do sítio ativo da *mtCP*, durante as 2ª e 3ª etapas de otimização energética.

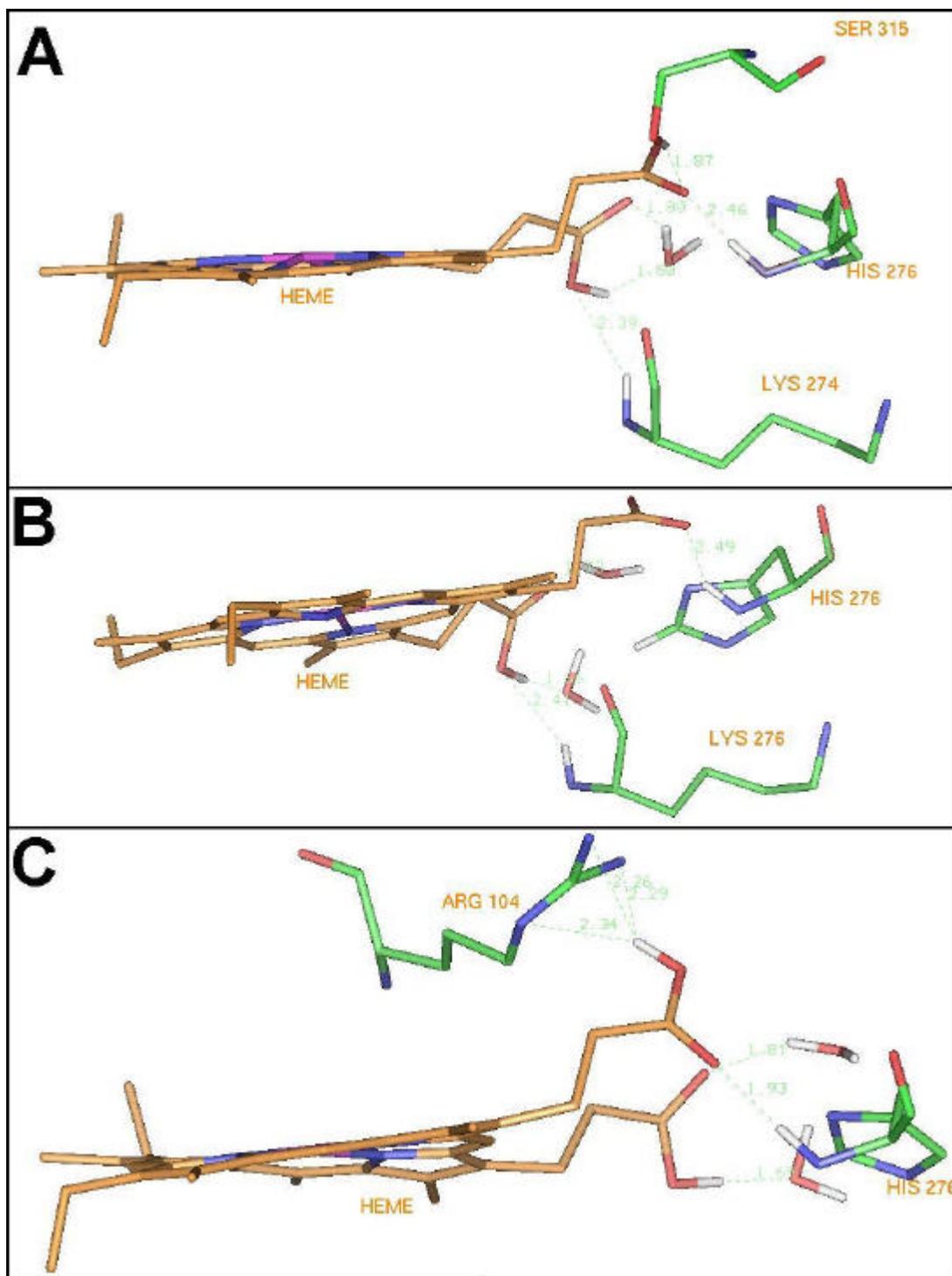
Etapa	Doador	Aceptor	Distância (Å)	Ângulo (°)
Etapa 2	<i>mtCP</i> :LYS274:HN	HEME:O2D	2,39	121,49
	<i>mtCP</i> :His276:HN	HEME: O1A	2,46	85,42
	<i>mtCP</i> :Ser315:HG	HEME: O1A	1,87	99,72
	HEME:H2D	O (H <sub>2</sub> O_1)	1,80	1,80
	H(H <sub>2</sub> O_2)	HEME: O1D	1,80	145,83
	HEME:Fe	<i>mtCP</i> :His270:NE2	3,43	105,99
Etapa 3	<i>mtCP</i> :LYS274:HN	HEME:O2D	2,41	121,67
	<i>mtCP</i> :His276:HN	HEME: O1A	2,49	85,05
	<i>mtCP</i> :Ser315:HG	HEME: O1A	1,78	107,96
	HEME:H2D	O(H <sub>2</sub> O_1)	1,66	174,52
	H(H <sub>2</sub> O_2)	HEME: O1D	1,73	141,33
	HEME:Fe	<i>mtCP</i> :His270:HN	3,53	113,25

Após processo completo de relaxamento (Etapa 4), houve formação de sete ligações hidrogênio.

- o hidrogênio do NH da His-276 interage com o oxigênio O<sub>1A</sub> de um dos ácidos carboxílicos do heme, a uma distância de 1,93 Å;
- o hidrogênio H<sub>G</sub> do OH da Ser-315 se liga ao oxigênio O<sub>1A</sub> do heme, a uma distância 2,03 Å;
- o átomo de hidrogênio (H<sub>2A</sub>) da hidroxila de um dos ácidos carboxílicos do heme interage com os nitrogênios (NH1, NH2 e NE) da Arg-104, a 2,29 Å, 2,26 Å e 2,34 Å, respectivamente;
- a protoporfirina ainda interage com duas moléculas de água não cristalinas ( $d_{H_2O_1...O1D} = 1,81 \text{ \AA}$ ;  $d_{H_2D...O(H_2O_2)} = 1,69 \text{ \AA}$ ).

Após completo relaxamento do sistema, quando as restrições à liberdade molecular foram excluídas, as interações que ocorriam entre a His-270 e a Lys-274 foram perdidas e substituídas por interações entre o grupo heme e a Arg-104 (Figura 3-6).

**Figura 3-6:** Ocorrência de interações entre o grupo heme e aminoácidos do sítio ativo durante a segunda, terceira e quarta etapa do processo de relaxamento, respectivamente.



(a) Etapa 2 da minimização de energia – Ligações hidrogênio formadas entre a protoporfirina e os resíduos Ser 315, His 276, Lys274 e uma molécula de água. Estas ligações se formam com os ácidos carboxílicos da protoporfirina. (b) Etapa 3 da minimização de energia - a ligação hidrogênio entre a protoporfirina e a Ser 315 foi rompida. Houve interação entre uma molécula de água e uma das hidroxilas do ácido carboxílico da protoporfirina. (c) Etapa 4 da minimização de energia – Houve formação de ligações hidrogênio entre a Arg104 e a protoporfirina. A ligação com o resíduo Lys276 foi desfeita.

**Tabela 3-7:** Ligações hidrogênio formadas entre a proteína relaxada, a protoporfirina e uma molécula de solvente após a 4ª etapa de minimização.

<b>Doador</b>	<b>Aceptor</b>	<b>Distância (?)</b>	<b>Ângulo(°)</b>
<i>mtCP</i> :Arg104:NE	HEME:H2A	2,34	157,63
<i>mtCP</i> :Arg104:NH1	HEME:H2A	2,29	128,31
<i>mtCP</i> :Arg104:NH2	HEME:H2A	2,26	138,96
<i>mtCP</i> :His276:HN	HEME:O1A	1,93	138,74
<i>mtCP</i> :Ser315:HG	HEME:O1A	2,03	113,82
HEME:H2D	O(H2O_1)	1,69	175,25
H(H2O_2)	HEME:O1D	1,81	152,13
HEME:Fe	<i>mtCP</i> :His270:HN	3,68	117,52

### 3.5 Processo de relaxamento com variações nas constantes dielétricas

Neste capítulo procuramos, também, melhor compreender o efeito da constante dielétrica sobre nosso sistema protêico. Os resultados da mecânica molecular parecem ser sensíveis aos valores usados para as constantes dielétricas. No entanto, os fatores que determinam a adequação destes valores não são óbvios. E, segundo consta na literatura científica, os modelos propostos para as constantes dielétricas são somente aceitáveis. Calculamos a energia potencial do sistema sob análise usando as constantes dielétricas com valores de 1,0 e 4,0. Para verificar o efeito, sobre a estrutura molecular, de um alto valor de dielétrico, usamos também um  $\epsilon$  de 80.

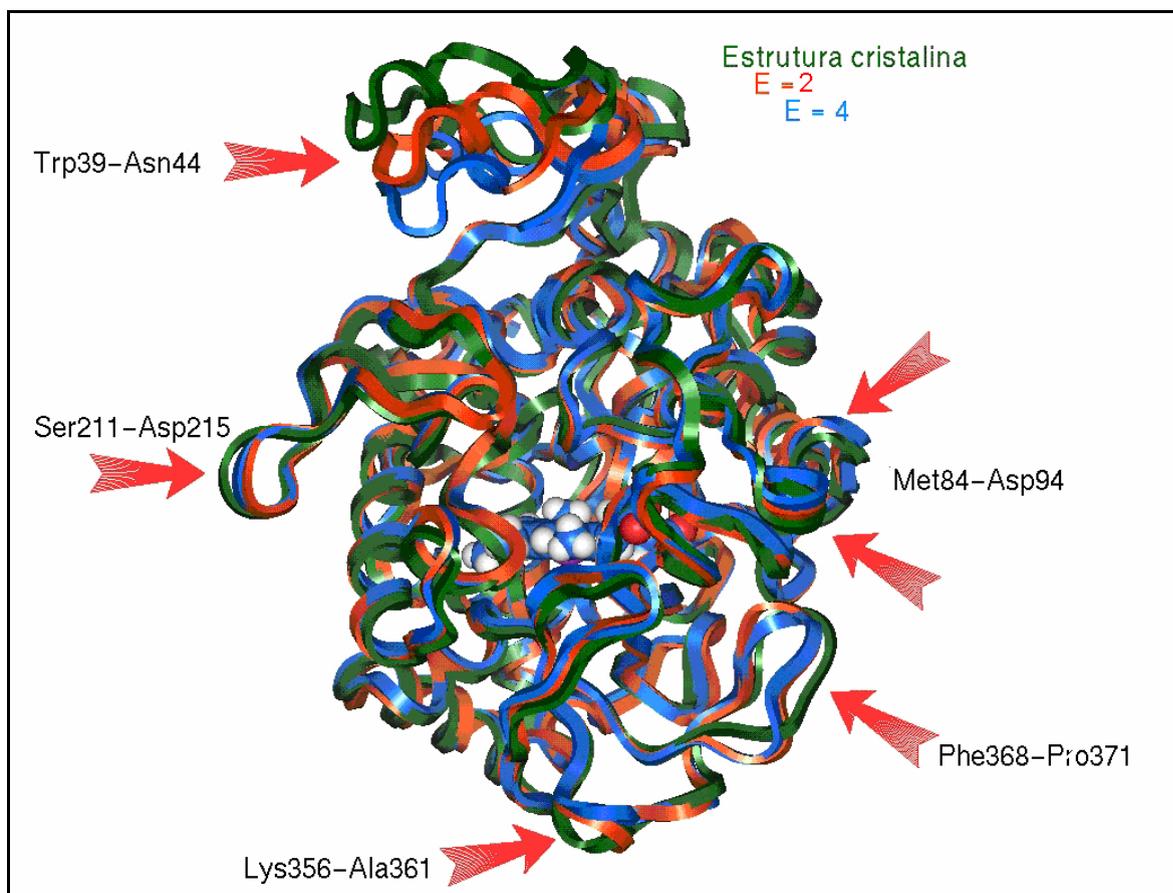
Em seguida, a partir dos melhores resultados obtidos através dos cálculos para o relaxamento do sistema cristalino sob constantes dielétricas 1 e 4, efetuamos cálculos de potenciais eletrostáticos, pelo método de Poisson-Boltzmann, para verificar a influência da constante dielétrica sobre as nuvens eletrostáticas. Para estes cálculos usamos a constante dielétrica para o solvente (implícito) de 80, e de 1 e 4 para o soluto.

### 3.6 Processo de relaxamento do complexo enzima: cofator heme: solvente, com constante dielétrica = $\epsilon = 4,0$ .

O procedimento de relaxamento do sistema molecular foi similar àquele efetuado sob constante dielétrica 1,0. No entanto, os valores para a energia total do sistema e as diversas contribuições energéticas variam de um fator de quase 5 vezes, em relação ao processo anterior, para exatamente o mesmo sistema molecular.

As etapas de cálculos conduziram a um valor de energia total de  $-4293.43 \text{ kcal.mol}^{-1}$ . As etapas de otimização energética do sistema cristalino resultaram em uma estruturação bem próxima à original, devido às precauções tomadas durante os cálculos (Figura 3-7).

**Figura 3-7** Alinhamento estrutural das seqüências [Gly-24-Ser-446] da estrutura cristalina da proteína *mtCP* e das duas estruturas relaxadas, sob constantes dielétricas 1,0 e 4,0.



A avaliação destes resultados é feita através dos cálculos correspondentes à superposição rígida de partes da enzima. A figura 3-7 mostra a superposição do *mtCP*, em sua forma cristalina (verde), na forma otimizada sob  $\epsilon = 1,0$  (laranja) e em sua forma otimizada sob  $\epsilon = 4,0$  (azul). Pode-se verificar que a otimização de energia não alterou em muito a conformação da proteína, salvo em suas regiões externas. As principais alterações conformacionais localizaram-se nas cinco seqüências [Trp39-Asn44]; [Met84-Asp94]; [Ser211-Asp215]; [Lys356-Ala361]; e [Phe368-Pro37].

No entanto, observe-se, também, que estas modificações estruturais foram mais significativas do que sob  $\epsilon = 1,0$ , sobretudo em relação à seqüência [Trp39-Asn44], que se encontra menos deslocada em comparação à posição cristalina.

**Tabela 3-8-** Diferentes contribuições energéticas provenientes da segmentação da equação matemática que compõe o campo de forças ESFF, em tabela comparativa entre os resultados provenientes das constantes dielétricas 1,0 e 4,0.

Etapa 4		
Contribuições energéticas	$\epsilon = 1,0$ (kcal.mol <sup>-1</sup> )	$\epsilon = 4,0$ (kcal.mol <sup>-1</sup> )
Energia potencial total	<b>- 20237,38</b>	<b>- 4293.4</b>
Energia interna	3038.09	1944.4
Deformações de ligações	393.84	138.3
Deformações angulares	1593.92	921.1
Deformações torsionais	1025.91	872.9
Distorções ao plano	24.42	12.8
Interações não-ligadas	-23275.57	-6237.9
vdw	1907.93	-1812.8
vdw repulsivas	23050.84	16573.8
vdw dispersivas	-21142.91	-18386.6
Eletrostáticas	-25183.50	-4425.1
Restrições ( <i>Tether</i> )	0,0	0,0

### 3.7 Formação de ligações hidrogênio sob constante dielétrica 4,0

Durante a segunda etapa do processo formaram-se três ligações hidrogênio, que se mantiveram durante a terceira etapa:

- a protoporfirina e a Lys-274, através do oxigênio O<sub>2D</sub> de um dos grupos carboxílicos do heme; entre a His-276 e o oxigênio O<sub>1A</sub> do segundo grupo carboxílico do heme; e entre a Ser-315 e este mesmo oxigênio O<sub>1A</sub> do heme. As distâncias foram de 1,88Å, 2,4Å e 2,47Å, respectivamente.

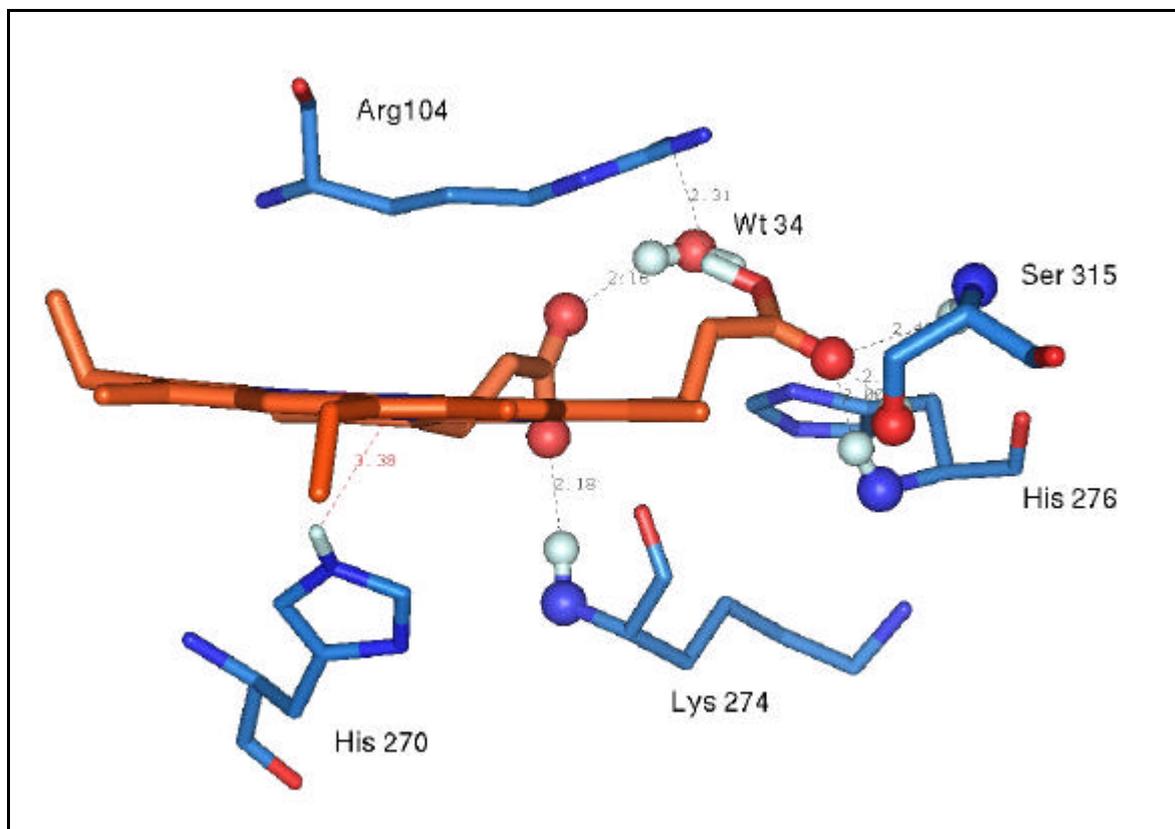
Na quarta etapa mantiveram-se as ligações entre a protoporfirina e a His-276 e a Ser-335, e formaram-se outras ligações hidrogênio. A rede de ligações hidrogênio foi estabilizada através dos aminoácidos Arg104, Lys274, His276 e Ser315. Uma molécula de água interferiu no sítio ativo ligando-se ao heme pelo segundo grupo carboxílico.

**Tabela 3-9:** Ligações hidrogênio entre a protoporfirina e proteína *mtCP* durante a quarta etapa de otimização de energia sob constante dielétrica 4,0.

<b>Doador</b>	<b>Aceptor</b>	<b>Distância (?)</b>	<b>Ângulo (°)</b>
<i>mtCP</i> : heme: H2A	Heme: Arg104: NH1	2,31	132,7
<i>mtCP</i> : Lys274: HN	Heme: O2D	2,18	169,1
<i>mtCP</i> : His276: HN	Heme:O1A	2,00	166,7
<i>mtCP</i> : Ser 315: HN	Heme:O1A	2,49	137,6
<i>mtCP</i> : Ser 315: HG	Heme:O1A	2,10	141,3
Wt34:H12	Heme:O1D	2,16	154,3

Após completo relaxamento houve, portanto, no sítio ativo, formação de seis interações por ligação hidrogênio, o que indica correções que são efetuadas durante as minimizações energéticas, com a liberação progressiva do sistema.

**Figura 3-8:** Interações fortes entre o grupo heme e os aminoácidos Arg-104, Lys274, His-276 e Ser-315 que ocorreram durante a quarta etapa de minimização energética ( $\epsilon = 4,0$ ).



A protoporfirina manteve-se neste cálculo com uma planaridade bastante razoável. Os resultados da conformação da protoporfirina são muito semelhantes àqueles obtidos com constante dielétrica 1,0, conforme pode ser visto na Figura 3-8.

Comparando-se os dois resultados, sete ligações hidrogênio contribuíram para a estabilização do sistema, sob constante dielétrica 1,0, através dos aminoácidos Arg104, His276, Ser315 e duas águas cristalinas, enquanto que, sob constante dielétrica 4,0, somente uma molécula de água interagiu dentro da cavidade de recepção e um aminoácido, a Lys274, veio participar da rede de estabilização via interações fortes.

A Tabela 3-10 indica, através do alinhamento das seqüências cristalina e otimizada, que o valor 4,0 para a constante dielétrica não altera as estruturas secundárias essenciais.

**Tabela 3-10** Comparação por *rmsd* das hélices-alfa presentes na proteína *mtCP*.

Seqüência de AA de hélices alfa da estrutura cristalina e a otimizada.	<i>rmsd</i>		
		Sob constante dielétrica 4,0	Sob constante dielétrica 1,0
	Número de átomos comparados	Todos os átomos, exceto os de H	Todos os átomos, exceto os de H
ASN44-ASN51	134	1,337	0,807
ASP63-THR70	116	0,601	0,777
Val73-THR85	204	0,656	0,547
Gly99-Gly111	200	0,680	0,742
Ser140-Gly156	570	0,680	0,824
ASP163-Ser175	186	0,748	0,585
ASP240-Arg253	220	0,878	0,743
Met257-THR271	210	0,640	0,785
Ser331-Tyr337	124	0,391	0,484
ASP381-ASP387	112	0,530	0,621
Pro388-Arg395	146	1,022	1,069
Pro401-Met420	346	0,768	1,019

### 3.8 Comparação por alinhamento de seqüências entre as otimizações energéticas, sob constantes dielétricas 1,0 e 4,0.

As energias de otimização da proteína *mtCP* sob constantes dielétricas 1,0 e 4,0 apresentaram grande diferença na ordem de grandeza. A energia potencial total obtida com constante dielétrica 1,0 foi de  $-20237,38 \text{ kcal.mol}^{-1}$ , enquanto que, sob constante dielétrica 4,0, foi de  $-4293.4 \text{ kcal.mol}^{-1}$ .

Houve, também, algumas diferenças no desvio de posição em relação a algumas seqüências de aminoácidos. Nas Figuras 3-9 e 3-10 são mostrados alinhamentos entre as hélices-alfa da proteína *mtCP* cristalina e as estruturas relaxadas, com constantes dielétricas 1,0 e 4,0.

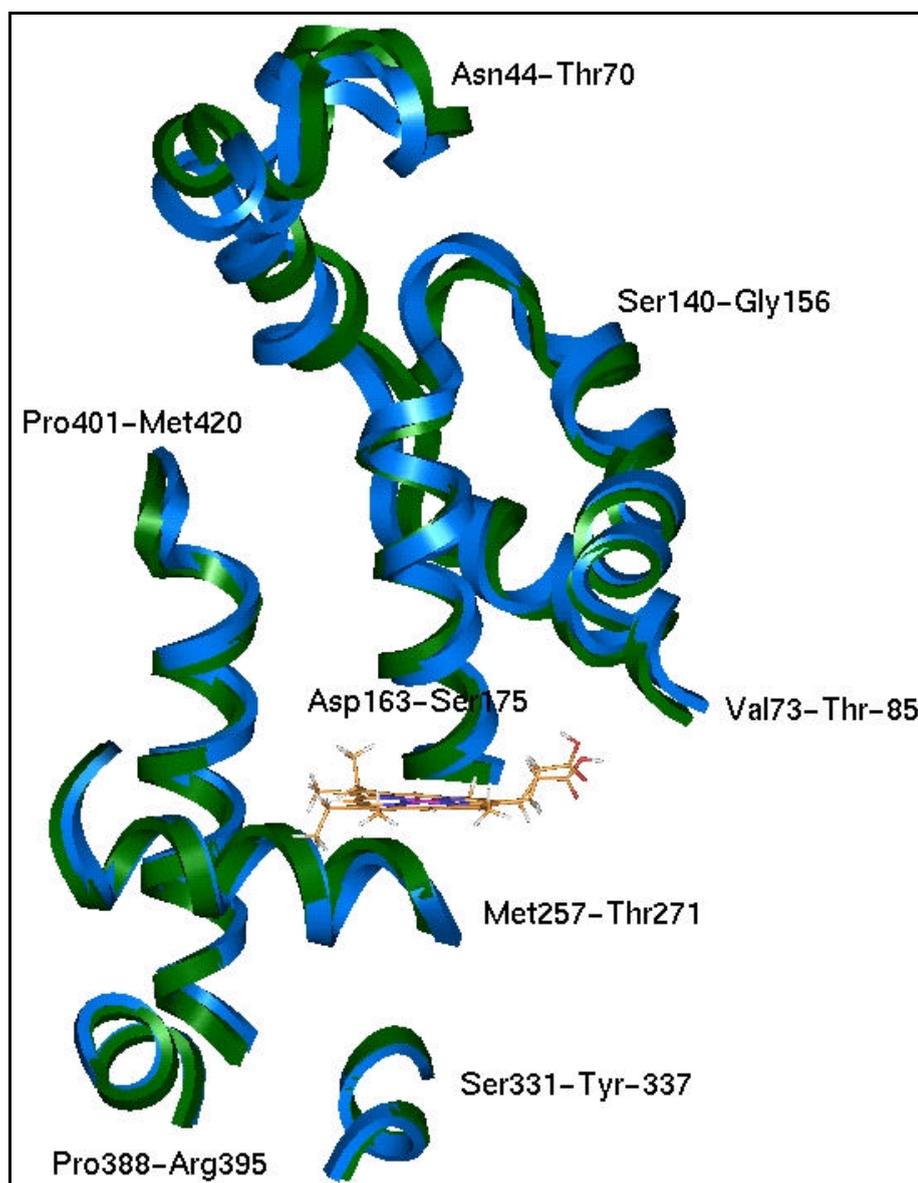
**Figura 3-9** Comparação por alinhamento entre as hélices-alfa da proteína cristalina e da relaxada, com constante dielétrica 1,0.



As hélices-alfa nesta seqüência da proteína *mtCP* em que estamos trabalhando são constituídas pelos aminoácidos, [Asn44-Asn51], [Asp63-Thr70], [Val73-Thr85], [Ser140-Gly156], [Asp163-Ser175], [Asp240-Arg253], [Met257-Thr271], [Ser331-Tyr337], [Asp381-Asp387], [Pro388-Arg395] e [Pro401-Met420].

Nas superposições entre os modelos, os desvios de *rmsd* superiores a 0,8 foram obtidos para as seqüências [Asn44-Asn51], [Asp63-Thr70], [Asp240-Arg253], [Pro388-Arg395] e [Pro401-Met420].

**Figura 3-10:** Comparação por alinhamento das hélices-alfa da proteína cristalina e da relaxada, com constante dielétrica 4,0.



Na Tabela 3-11 encontram-se os valores de *rmsd* das comparações de segmentos de 20 aminoácidos. Seqüencialmente foram superpostos os átomos da cadeia principal, dos carbonos- $\alpha$  e de todos os átomos, exceto aqueles de hidrogênios, respectivamente, entre as estruturas minimizadas e a proteína cristalina. Há somente uma exceção, em relação ao tamanho, onde foram

comparados os resultados de uma seqüência de 23 aminoácidos. Os resultados anteriores foram confirmados, os aminoácidos e as estruturas secundárias internas permaneceram em orientações quase idênticas. As divergências correspondem a determinadas seqüências constituindo as estruturas externas da proteína, portanto mais expostas a flutuações, justificando o aumento dos valores de *rmsd*. A comparação entre 5560 átomos semi-pesados conduziu a um desvio de 1,19Å (constante dielétrica 1,0) e 1,33Å (constante dielétrica 4,0), acreditamos que bastante aceitável para este número de átomos.

**Figura 3-11:** Comparação por superposição entre as coordenadas atômicas das estruturas cristalina e relaxada do *mtCP*, durante as sucessivas etapas de minimização.

Seqüência de AA comparados entre a estrutura cristalina e a minimizada	<i>rmsd</i> (número de átomos comparados)					
	Sob constante dielétrica 4,0			Sob constante dielétrica 1,0		
	Cadeia principal	Carbonos - $\alpha$	Todos os átomos, exceto os de H	Cadeia principal	Carbonos- $\alpha$	Todos os átomos, exceto os de H
Gly24-ASN44	<b>2,21</b> <sub>(168)</sub>	<b>2,36</b> <sub>(42)</sub>	<b>3,03</b> <sub>(346)</sub>	<b>1,31</b> <sub>(168)</sub>	<b>1,33</b> <sub>(42)</sub>	<b>2,14</b> <sub>(346)</sub>
LEU45-Ala65	<b>1,91</b> <sub>(168)</sub>	<b>1,98</b> <sub>(42)</sub>	<b>2,09</b> <sub>(312)</sub>	<b>1,03</b> <sub>(168)</sub>	<b>1,06</b> <sub>(42)</sub>	<b>1,23</b> <sub>(312)</sub>
Ala66-THR86	<b>0,69</b> <sub>(168)</sub>	<b>0,69</b> <sub>(42)</sub>	<b>0,86</b> <sub>(316)</sub>	<b>0,60</b> <sub>(168)</sub>	<b>0,62</b> <sub>(42)</sub>	<b>0,79</b> <sub>(316)</sub>
Ser87-Trp107	<b>0,57</b> <sub>(168)</sub>	<b>0,56</b> <sub>(42)</sub>	<b>0,87</b> <sub>(368)</sub>	<b>0,62</b> <sub>(168)</sub>	<b>0,63</b> <sub>(42)</sub>	<b>0,91</b> <sub>(368)</sub>
His108-Arg128	<b>0,93</b> <sub>(168)</sub>	<b>0,87</b> <sub>(42)</sub>	<b>1,17</b> <sub>(296)</sub>	<b>0,65</b> <sub>(168)</sub>	<b>0,59</b> <sub>(42)</sub>	<b>0,82</b> <sub>(296)</sub>
PHE129-Trp149	<b>0,77</b> <sub>(168)</sub>	<b>0,79</b> <sub>(42)</sub>	<b>1,04</b> <sub>(350)</sub>	<b>0,34</b> <sub>(168)</sub>	<b>0,31</b> <sub>(42)</sub>	<b>0,72</b> <sub>(350)</sub>
Pro150-ASN170	<b>0,55</b> <sub>(168)</sub>	<b>0,57</b> <sub>(42)</sub>	<b>0,90</b> <sub>(334)</sub>	<b>0,60</b> <sub>(168)</sub>	<b>0,60</b> <sub>(42)</sub>	<b>0,97</b> <sub>(334)</sub>
CYSH171-Trp191	<b>0,84</b> <sub>(168)</sub>	<b>0,79</b> <sub>(42)</sub>	<b>1,34</b> <sub>(334)</sub>	<b>0,77</b> <sub>(168)</sub>	<b>0,69</b> <sub>(42)</sub>	<b>1,16</b> <sub>(334)</sub>
Glu192-Gly212	<b>0,82</b> <sub>(168)</sub>	<b>0,83</b> <sub>(42)</sub>	<b>0,94</b> <sub>(352)</sub>	<b>1,00</b> <sub>(168)</sub>	<b>0,97</b> <sub>(42)</sub>	<b>1,05</b> <sub>(352)</sub>
LYS213-Glu233	<b>0,82</b> <sub>(168)</sub>	<b>0,79</b> <sub>(42)</sub>	<b>1,10</b> <sub>(330)</sub>	<b>0,73</b> <sub>(168)</sub>	<b>0,66</b> <sub>(42)</sub>	<b>0,96</b> <sub>(330)</sub>
Gly234-Arg254	<b>0,58</b> <sub>(168)</sub>	<b>0,49</b> <sub>(42)</sub>	<b>1,15</b> <sub>(318)</sub>	<b>0,61</b> <sub>(168)</sub>	<b>0,58</b> <sub>(42)</sub>	<b>1,08</b> <sub>(318)</sub>
Met255-THR275	<b>0,54</b> <sub>(168)</sub>	<b>0,47</b> <sub>(42)</sub>	<b>0,66</b> <sub>(298)</sub>	<b>0,59</b> <sub>(168)</sub>	<b>0,51</b> <sub>(42)</sub>	<b>0,82</b> <sub>(298)</sub>
His276-Met296	<b>0,95</b> <sub>(168)</sub>	<b>1,00</b> <sub>(42)</sub>	<b>1,06</b> <sub>(290)</sub>	<b>0,75</b> <sub>(168)</sub>	<b>0,63</b> <sub>(42)</sub>	<b>1,02</b> <sub>(290)</sub>
Gly297-ILE317	<b>1,08</b> <sub>(168)</sub>	<b>1,02</b> <sub>(42)</sub>	<b>1,27</b> <sub>(288)</sub>	<b>0,96</b> <sub>(168)</sub>	<b>0,81</b> <sub>(42)</sub>	<b>0,93</b> <sub>(288)</sub>
Glu318-Gly338	<b>0,57</b> <sub>(168)</sub>	<b>0,47</b> <sub>(42)</sub>	<b>0,67</b> <sub>(356)</sub>	<b>0,65</b> <sub>(168)</sub>	<b>0,62</b> <sub>(42)</sub>	<b>0,87</b> <sub>(356)</sub>
Tyr339-Ala359	<b>0,80</b> <sub>(168)</sub>	<b>0,78</b> <sub>(42)</sub>	<b>1,16</b> <sub>(336)</sub>	<b>0,78</b> <sub>(168)</sub>	<b>0,83</b> <sub>(42)</sub>	<b>1,16</b> <sub>(336)</sub>
Gly360-THR380	<b>1,03</b> <sub>(168)</sub>	<b>0,98</b> <sub>(42)</sub>	<b>1,48</b> <sub>(278)</sub>	<b>1,00</b> <sub>(168)</sub>	<b>0,90</b> <sub>(42)</sub>	<b>1,29</b> <sub>(278)</sub>
ASP381-Pro401	<b>0,51</b> <sub>(168)</sub>	<b>0,46</b> <sub>(42)</sub>	<b>0,96</b> <sub>(376)</sub>	<b>0,59</b> <sub>(168)</sub>	<b>0,52</b> <sub>(42)</sub>	<b>1,00</b> <sub>(376)</sub>
Glu402-Pro422	<b>0,64</b> <sub>(168)</sub>	<b>0,69</b> <sub>(42)</sub>	<b>0,82</b> <sub>(359)</sub>	<b>0,75</b> <sub>(168)</sub>	<b>0,70</b> <sub>(42)</sub>	<b>1,08</b> <sub>(359)</sub>
Val423-Ser446	<b>1,50</b> <sub>(200)</sub>	<b>1,46</b> <sub>(50)</sub>	<b>1,81</b> <sub>(374)</sub>	<b>1,32</b> <sub>(192)</sub>	<b>1,25</b> <sub>(48)</sub>	<b>1,67</b> <sub>(374)</sub>
Ala-66 – Gly-421	<b>1,09</b> <sub>(2848)</sub>	<b>1,08</b> <sub>(712)</sub>	<b>1,33</b> <sub>(5560)</sub>	<b>0,99</b> <sub>(2848)</sub>	<b>0,95</b> <sub>(712)</sub>	<b>1,19</b> <sub>(5560)</sub>
Gly-24-Ala-65	<b>2,56</b> <sub>(336)</sub>	<b>2,67</b> <sub>(84)</sub>	<b>3,00</b> <sub>(658)</sub>	<b>1,46</b> <sub>(336)</sub>	<b>1,49</b> <sub>(84)</sub>	<b>2,00</b> <sub>(658)</sub>

### 3.9 A constante dielétrica de 80 - comentários

O sistema molecular, neste caso, foi composto por 6602 átomos, correspondendo à soma dos átomos da seqüência protéica e do grupo heme. As águas foram retiradas, já que a constante dielétrica com este valor pressupõe o solvente água. O valor de energia total do sistema, após minimização energética progressiva, foi de 565,2 kcal.mol<sup>-1</sup>, após 45 H, em tempo CPU.

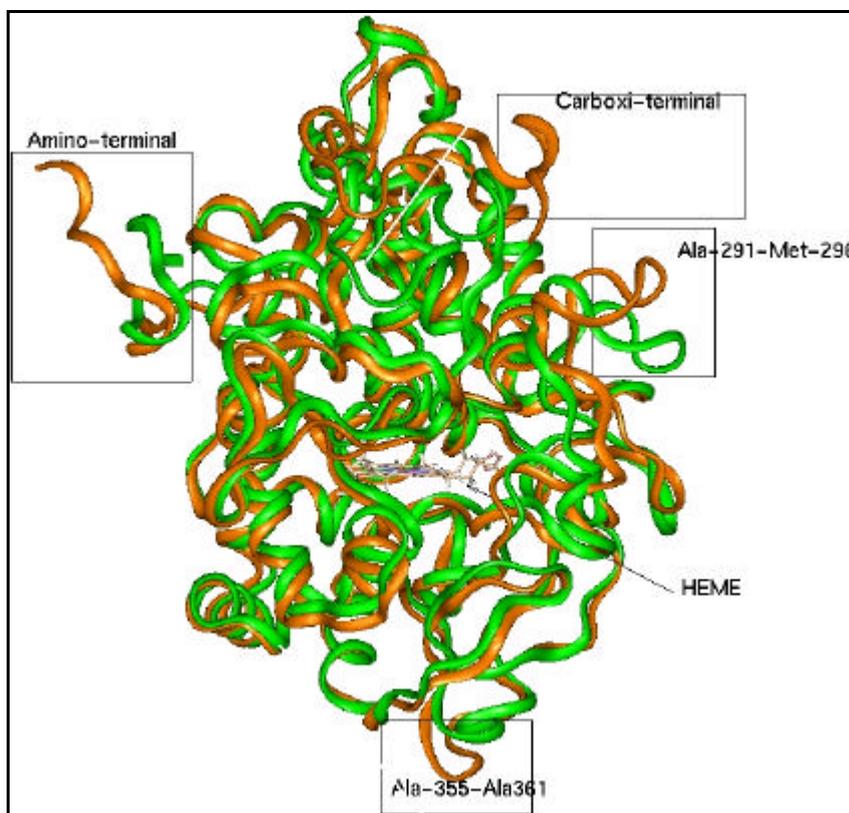
Através dos valores transpostos para a Tabela 3.12 vê-se, claramente que, sob constante dielétrica 80, as contribuições eletrostáticas foram mal dimensionadas na estrutura protéica.

**Tabela 3-11-** Diferentes contribuições energéticas provenientes da segmentação da equação matemática que compõe o campo de forças ESFF

Contribuições energéticas	Inicial (kcal.mol <sup>-1</sup> )	Final (kcal.mol <sup>-1</sup> )
Energia potencial total	5235.74	565.82
Energia interna	5577.36	1872.30
Deformações de ligações	2112.72	118.72
Deformações angulares	2240.35	894.79
Deformações torsionais	1166.07	847.80
Distorções ao plano	58.20	10.98
Interações não-ligadas	-341.62	-1306.48
vdw	-319.91	-1230.42
vdw repulsivas	5964.08	12881.39
vdw dispersivas	-6283.99	-14111.81
Eletrostáticas	-21.71	-76.07

A Figura 3.11 mostra a superposição do *mtCP*, em sua forma otimizada (verde) e na forma cristalina (laranja). Pode-se verificar que a otimização de energia alterou significativamente a estrutura como um todo.

**Figura 3-12-** Alinhamento estrutural das seqüências [Gly24-Ser446] da estrutura cristalina da proteína *mtCP* e de sua estrutura relaxada, sob constante dielétrica 80,0.



O desvio conformacional sobre todos os átomos semi-pesados foi de 3,42, muito maior que o resultado obtido sob as constantes dielétricas anteriores (Tabela 3.13).

Tabela 3-12: Comparação por superposição entre a estrutura cristalina e as etapas de minimização durante o relaxamento da *mtCP* sob constante dielétrica 80,0.

	<i>Rmsd</i> (Å) para o alinhamento com a estrutura cristalina		
	Todos os átomos exceto hidrogênio	Cadeia principal	Carbono $\alpha$
Etapa 4	3,42	3,18	3,16

Quando o processo de relaxamento foi executado sob esta constante, os resultados foram muito ruins. Mesmo isto sendo esperado, estes resultados serviram de base para se ter parâmetros do que é um processo de cálculo mal conduzido, devido a erros de escolha no valor de  $\epsilon$ . A energia potencial total obtida foi positiva, para um sistema protéico. Este valor, por si só, já indica erros

de processo. Estes resultados confirmam que a constante dielétrica 80 deixa de considerar interações eletrostáticas fundamentais entre os aminoácidos. Como na equação do campo de força ESFF, a constante dielétrica é um divisor do produto das cargas entre os átomos, a constante dielétrica 80 reduz em 20 vezes as interações eletrostáticas no sistema protéico e o deforma consideravelmente.

### 3.10 Formação de ligações hidrogênio sob constante dielétrica 80,0

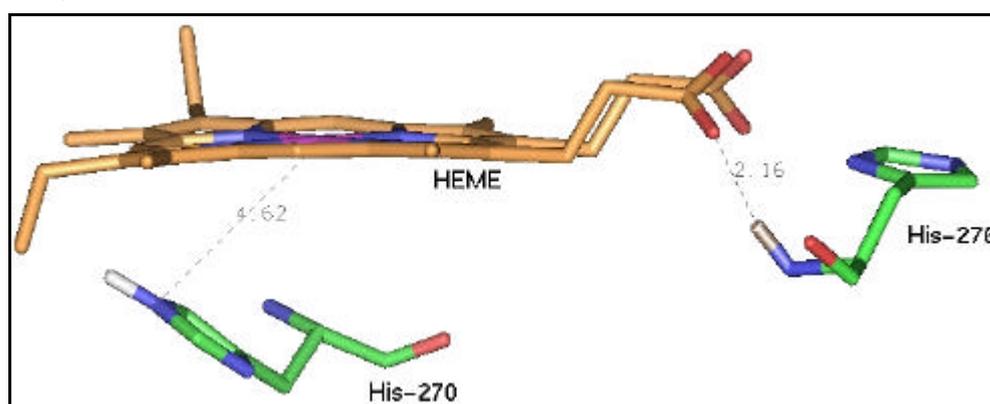
Após completo relaxamento, as interações *via* ligação hidrogênio feitas no sítio ativo foram reduzidas a apenas uma ocorrência, onde o aminoácido His-276 interage com o oxigênio de um dos grupos carboxílicos da protoporfirina.

**Tabela 3-13:** Ligação hidrogênio entre a protoporfirina e os aminoácidos do sítio ativo formadas durante a segunda e terceira etapas do processo de relaxamento  $\epsilon = 80,0$ )

Etapa	Doador	Aceptor	Distância (?)	Angulo (°)
	<i>mtCP</i> _His276:HN	HEME: O1A	2,16	111,9

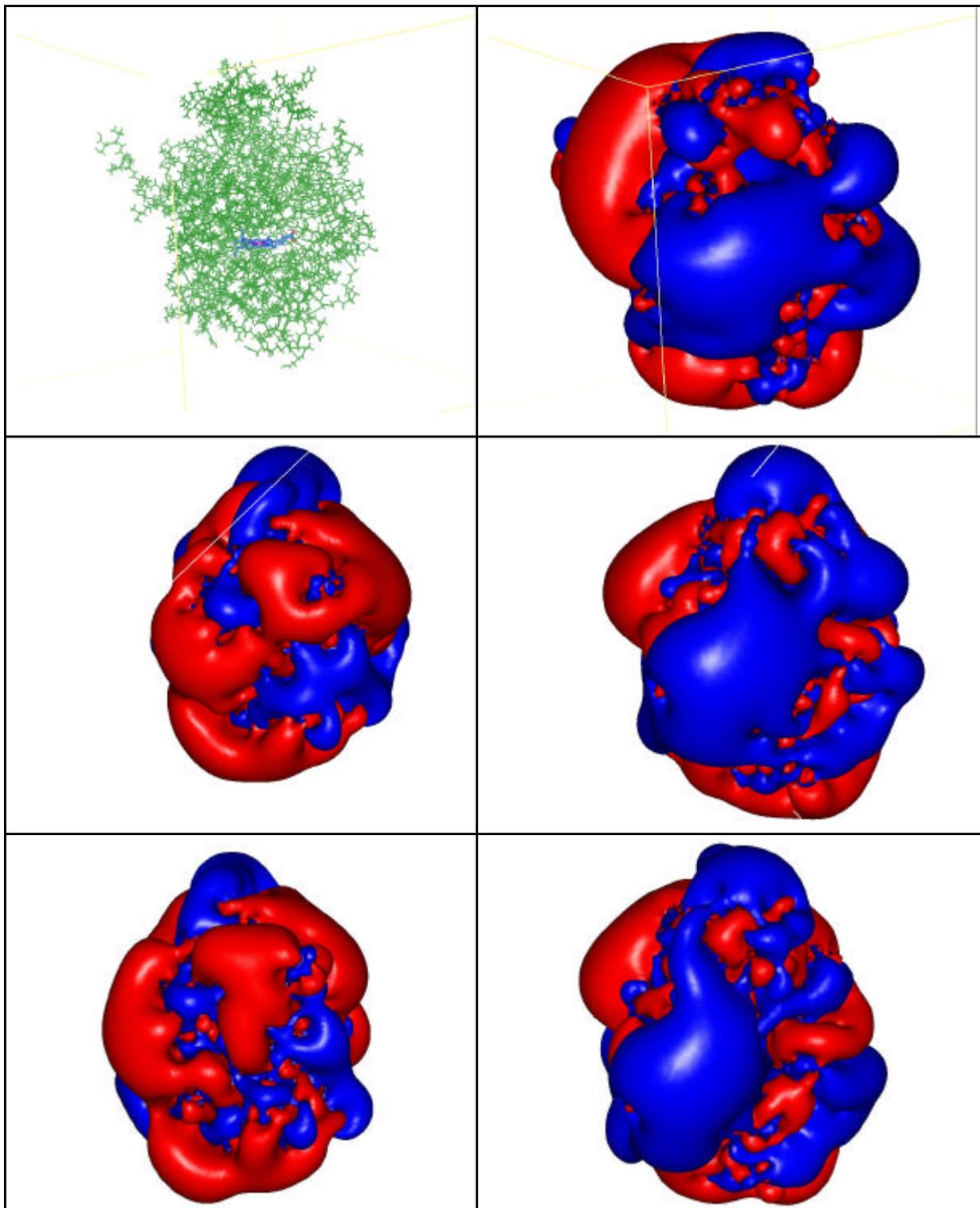
A His-270 perde a perpendicularidade característica em relação ao plano do grupo heme, distando de 4,62Å do átomo de Fe. A protoporfirina manteve-se quase planar (Figura 3.12).

**Figura 3-13:** Ligações hidrogênio formadas entre o grupo heme e a His-276 durante o processo de relaxamento, sob constante dielétrica 80,0.



Em seguida, efetuamos cálculos de potenciais eletrostáticos, pelo método de Poisson-Boltzmann, para verificar a influência da constante dielétrica sobre as nuvens eletrostáticas. Para estes cálculos, a constante dielétrica do solvente (implícito) foi de 80, e os valores atribuídos ao soluto foram 1 e 4.

**Figura 3-14** Contornos de potenciais eletrostáticos a + e - 0.2 kcal/mol/e calculados para o sistema mtCP, com coordenadas cristalinas; e após processo de relaxamento, sob constantes dielétricas 1 e 4, em água. As nuvens positivas encontram-se em azul e as negativas, em vermelho.<sup>(\*)</sup>



(\*) Na primeira linha da figura encontra-se a estrutura do *mtCP* na orientação que corresponde aos potenciais eletrostáticos que se encontram à direita. Na segunda linha e na terceira linhas encontram-se os resultados com constante dielétrica 1,0 e, 4,0, respectivamente. Nas figuras à esquerda, a perspectiva corresponde aos grupos carboxílicos do heme orientados também para a esquerda. Nas figuras à direita, a perspectiva corresponde

aos grupos carboxílicos do heme orientados também para a direita. Esta disposição permite visualizar os contornos eletrostáticos em duas perspectivas diferentes.

Estes contornos provieram dos resultados descritos como processo de relaxamento. A cuidadosa observação destes contornos eletrostáticos permite visualizar que houve modificação de posição de diversos aminoácidos que estava em posição mais externa na proteína. Observa-se que, apesar de modificações localizadas, as nuvens eletrostáticas se mantiveram similares. Na primeira linha da Figura 3.13 a nuvem eletrostática negativa, correspondendo à estrutura cristalina, é mais densa do que após relaxamento. Ver a parte superior, à esquerda, dos contornos negativos, em vermelho. Isto se deve ao fato de que houve reposicionamento da seqüência inicial da proteína, [A24-A44]. Quando a minimização do sistema foi feita, esta seqüência se aproximou do esqueleto principal da proteína. Isto também pode ser visto na Figura 3.7.

Portanto, concluímos que não houve caracterização suficiente para dar preferência a um valor ou outro, entre as constantes dielétricas 1 e 4, exceto pelo fato de que a primeira conduz a valores de energia de grandeza absoluta maiores do que a segunda. Como estes valores de energia são relativos, estas pequenas variações nas constantes dielétricas não parecem interferir de maneira exclusiva, para a análise global. Os contornos de potenciais eletrostáticos sob constante dielétrica 1 são mais próximos daqueles da estrutura cristalina. Por estas razões preferimos continuar o trabalho usando a constante dielétrica igual a 1,0.

No entanto, seria essencial que uma análise mais profunda fosse efetuada. Como este estudo não é o objetivo principal deste trabalho de dissertação, consideramos que seria conveniente usarmos sempre o solvente explícito e, também, verificar para cada sistema molecular que for analisado no futuro, se haverá variações importantes de resultados devido a valores da constante dielétrica. O uso de um alto valor, como 80, foi definitivamente excluído, salvo para os cálculos de potenciais eletrostáticos, que fazem uso claro de duas constantes, uma para o soluto, e outra para o solvente.

## Capítulo 4 Ancoramento rígido

## ***Introdução***

Um dos métodos possíveis para se ancorar a molécula de isoniazida dentro da cavidade do sítio ativo da proteína *mtCP* é aquele do *docking* manual. Isto permite um melhor aprendizado desta técnica e uma avaliação cuidadosa das interações através de ligações hidrogênio, das interações hidrofóbicas e lipofílicas, via cálculos de energia de van der Waals e eletrostáticas, além da grande contribuição da análise visual, por óculos de visão estereoscópica (3D), ou seja, correção dos impedimentos estéricos de forma interativa. O complexo estudado teve seu foco de interesse nos fragmentos moleculares compostos pelos aminoácidos localizados em torno do pressuposto sítio ativo, no cofator protoporfirina e em grupos hipoteticamente farmacofóricos do inibidor, em nosso caso, a isoniazida.

### **4.1. Sistema inicial**

O sistema molecular foi constituído pela seqüência de aminoácidos [Gly-24 a Ser-446] do monômero A da proteína *mtCP*, pela protoporfirina, por três moléculas de glicerol, presentes no arquivo de coordenadas original e que se encontram na vizinhança da seqüência de nosso interesse, e pelas moléculas de água cristalinas e aquelas que foram adicionadas para dar maior coesão ao sistema (*vide* item 3.1, último parágrafo).

### **4.2. Método**

Para sua orientação inicial, a isoniazida foi introduzida com seu anel piridínico voltado para os grupos carboxílicos da protoporfirina e o oxigênio da carbonila voltado para o centro deste grupo.

Procedeu-se, então, à minimização de energia do sistema, através de Discover / ESFF. As coordenadas de partes da enzima foram bloqueadas, progressivamente através da imposição de restrições fortes (*constraints*), e depois, fracas (*tether*). Estas imposições obedecem a uma estratégia pré-

determinada, para a qual foram definidos conjuntos atômicos, sobre os quais aplicam-se, ou não, restrições à liberdade das coordenadas atômicas. Ou seja, a tática é similar àquela usada para o processo de relaxamento. As partes do sistema molecular pré-definidos em conjuntos, que podem ter movimento (*subset* dinâmico) ou devem permanecer estáticos (*static subset*).

Estes conjuntos compreenderam as seguintes partes:

- *SubsetProtoporfirina* – protoporfirina
- *Subset12A* – envolvendo os aminoácidos localizados a 12 Å do átomo de Fe do grupo protoporfirina
- *SubsetSolvent* – são as águas adicionadas ao sistema para reduzir sua liberdade
- *SubsetIso*, para a isoniazida.

Estas etapas progressivas são necessárias para que os impedimentos estéricos induzidos devido a um possível mau posicionamento inicial da isoniazida não alterem bruscamente a organização protéica. Primeiro corrige-se o posicionamento da isoniazida, a partir da orientação manual. Em seguida, o sistema é lentamente liberado, até adquirir liberdade total.

**Tabela 4-1:** Protocolo de minimização de energia envolvendo os subsets definidos.

<b>Subsets</b>	<b>Etapa 1</b>	<b>Etapa 2</b>	<b>Etapa 3</b>	<b>Etapa 4</b>
<i>SubsetProtoporfirina</i>	fixado	fixado	restrained (tether)	livre
<i>Subset12A</i>	fixado	restrained (tether)	dinâmico	dinâmico
<i>SubsetSolvent</i>	livre	livre	livre	livre
<i>SubsetIso</i>	livre	livre	livre	livre

### **4.3. Resultados**

#### **4.4.1. Processo de otimização de energia**

Nas Tabelas 4-2 e 4-3 estão transcritas as contribuições energéticas provenientes de cada fase da otimização. Estes resultados são importantes para que se possa acompanhar quais contribuições são mais importantes decorrer do processo e como estas variam em cada fase.

Nota-se, por exemplo, que a energia potencial total inicial correspondente à primeira etapa era muito alta. Após a primeira etapa, a energia total do sistema decresceu rapidamente para  $-11\,877,1 \text{ kcal.mol}^{-1}$ , até alcançar os  $-20\,087,4 \text{ kcal.mol}^{-1}$  resultantes da etapa final (Etapa 4).

No decorrer do processo não houve significativas alterações das contribuições de deformações angulares, torsionais e das distorções no plano.

No entanto, as interações não ligadas tiveram enorme variação decrescente. Como a contribuição dispersiva de vdW era muito alta negativamente ( $-62\,244,2 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ), retornou a valores razoáveis, negativos ( $-13\,405,6 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ), logo após a primeira etapa de minimização energética, estabilizando-se a  $-21\,218,58 \text{ kcal.mol}^{-1}$ . Na etapa final as contribuições eletrostáticas também apresentaram forte variações (de  $-17\,710,2 \text{ kcal.mol}^{-1}$ , para a etapa 1, até  $-25\,093,40 \text{ kcal.mol}^{-1}$ , para a etapa 4), mas bem menores do que as forças dispersivas, durante as etapas em curso.

**Tabela 4-2:** Sumário das contribuições energéticas de cada termo da equação matemática do campo de força usado no processo de minimização de energia durante as etapas 1 e 2 do *docking*.

Contribuições energéticas	Etapa 1		Etapa 2	
	Inicial (kcal.mol <sup>-1</sup> )	Final (kcal.mol <sup>-1</sup> )	Inicial (kcal.mol <sup>-1</sup> )	Final (kcal.mol <sup>-1</sup> )
Energia potencial total	15273101.1	-11877.1	-19483.8	-19517.9
Energia interna	3220.3	3260.4	3210.8	3259.2
Deformações de ligações	563.6	600.2	562.2	600.8
Deformações angulares	1609.1	1610.1	1597.7	1608.4
Deformações torsionais	1023.8	1025.6	1026.2	1025.5
Distorções ao plano	23.8	24.5	24.7	24.6
Interações não-ligadas	15269881.4	-15137.5	-22694.6	-22783.3
vdw	15287591.1	2575.0	1950.4	1933.4
vdw repulsivas	15349835.3	15980.6	22954.8	22940.5
vdw dispersivas	-62244.2	-13405.6	-21004.3	-21007.1
Eletrostáticas	-17710.2	-17712.6	-24645.1	-24716.6
Tether-restraints	-	-	0.00	6.1

**Tabela 4-3:** Sumário das contribuições energéticas de cada termo da equação matemática do campo de força usado no processo de minimização de energia durante as etapas 3 e 4 do *docking*.

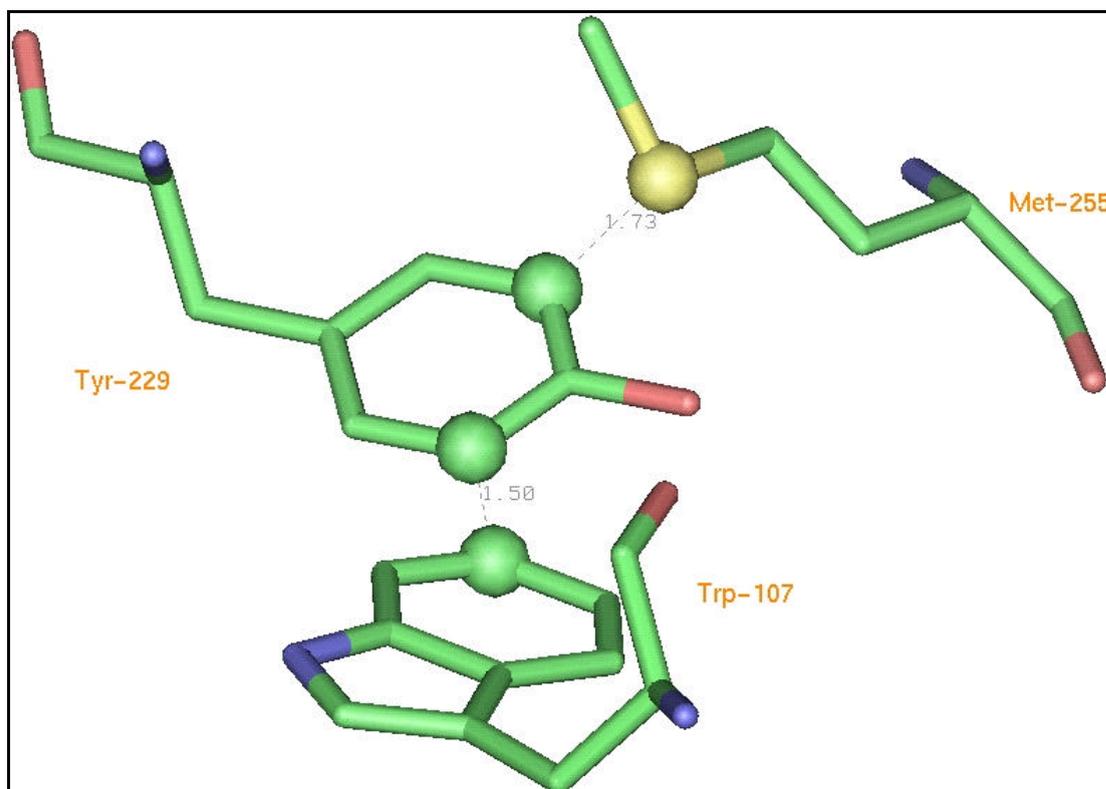
Contribuições energéticas	Etapa 3		Etapa 4	
	Inicial (kcal.mol <sup>-1</sup> )	Final (kcal.mol <sup>-1</sup> )	Inicial (kcal.mol <sup>-1</sup> )	Final (kcal.mol <sup>-1</sup> )
Energia potencial total	-19297.3	-20031.9	-20055.9	-20087.42
Energia interna	3222.7	3072.7	3085.0	3066.13
Deformações de ligações	564.2	412.5	424.83	403.25
Deformações angulares	1608.4	1607.4	1607.4	1610.11
Deformações torsionais	1025.5	1028.0	1028.0	1027.77
Distorções ao plano	24.6	24.8	24.8	25.00
Interações não-ligadas	-22520.1	-23140.8	-23140.8	-23158.19
vdw	2393.9	1929.9	1929.9	1935.21
vdw repulsivas	23539.3	23136.0	23135.9	23153.79
vdw dispersivas	-21145.4	-21206.1	-21206.1	-21218.58
Eletrostáticas	-24914.0	-25070.7	-25070.7	-25093.40
Tether-restraints	0.00	36.3	0.00	4.67

#### 4.4.2. Interações

Segundo Bertrand et al<sup>(16)</sup> existe um aduto formado pelos aminoácidos Met-255, Tyr-229 e Trp-107, que pode ser importante para a funcionalidade da proteína *mtCP*, já que este aduto é conservado em várias outras proteínas da mesma família da *mtCP*. Verificamos o posicionamento destes aminoácidos e as interações que ocorrem em suas vizinhanças imediatas.

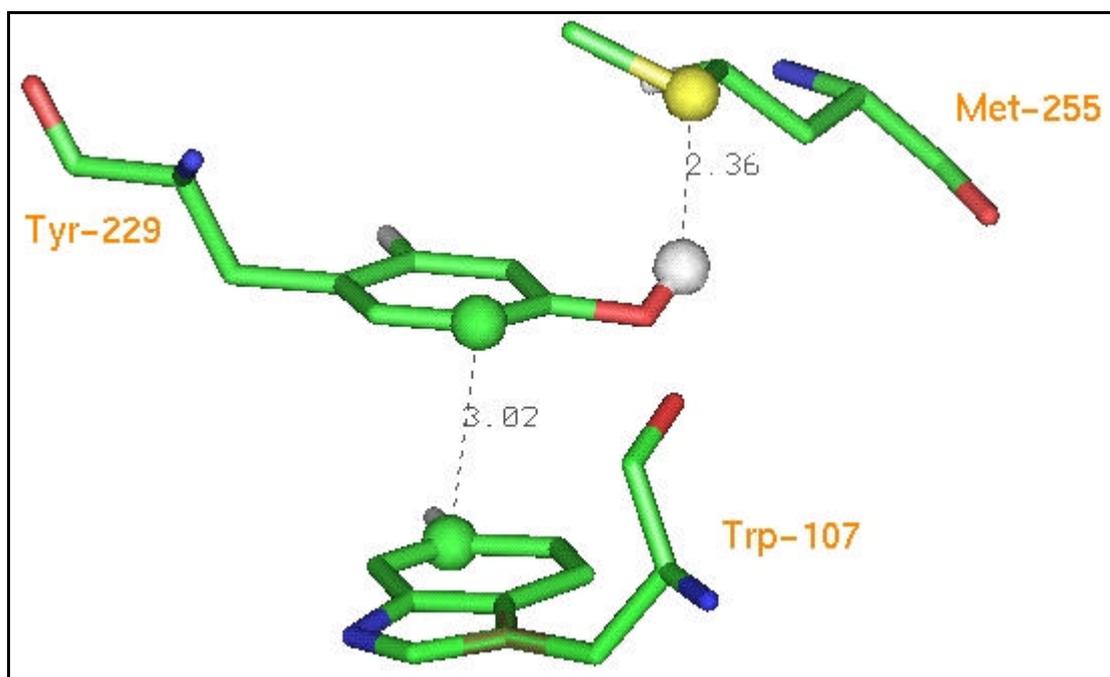
A Figura 4-1 mostra as ligações hidrogênio efetuadas entre os aminoácidos Met-255 e Tyr-229, na estrutura cristalina após o *docking* da isoniazida. a ligação do enxofre da Met-255 com o carbono C2 da Tyr-229 com uma distância de 1,73Å. Enquanto o carbono CE1 da Tyr-229 se liga com o carbono C2 do Trp-107 a uma distância de 1,5Å.

**Figura 4-1 :** Ligações feitas entre os aminoácidos Tyr-229 e Met-255 e entre os aminoácidos Tyr-229 e o Trp-107 na estrutura cristalina do *mtCP*.



Na Figura 4-2 estão detalhadas as ligações feitas entre o aminoácido Trp-107 com a Tyr-229 e com a Met-255 obtidas após a otimização de energia do docking da isoniazida. Onde o enxofre da Met-255 interage com o hidrogênio da hidroxila do aminoácido Tyr-229 a uma distância de 2,36Å e o carbono CE1 da Tyr-229 se liga com o carbono C2 do Trp-107 a uma distância de 3,02Å.

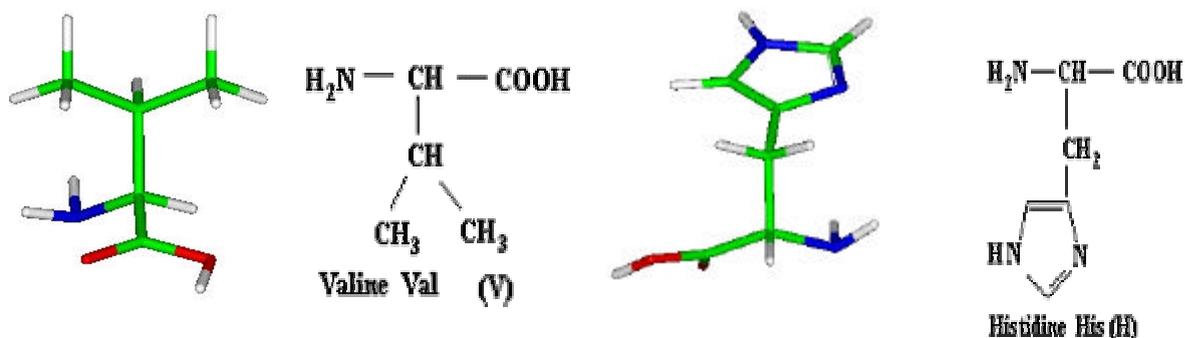
**Figura 4-2** - Ligações feitas entre os aminoácidos Tyr-229 e Met-255 e entre os aminoácidos Tyr-229 e o Trp-107 na estrutura minimizada do *mtCP* após o docking da isoniazida.



Estas ligações feitas entre os aminoácidos do aduto se mantiveram praticamente constantes desde o início do processo de relaxamento da proteína *mtCP*. A inserção da isoniazida não as alterou significativamente, nem as distâncias de interação entre elas.

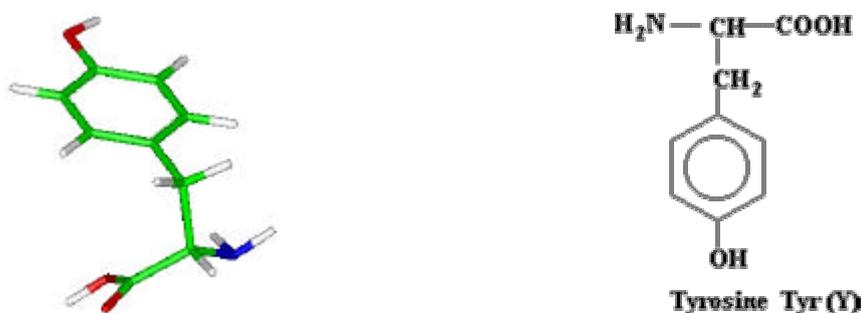
A figura 4.3 mostra a evolução das interações através de ligações hidrogênio. Na primeira etapa, a isoniazida se move e se adapta à cavidade de interação da enzima. As interações que ocorrem entre os componentes no sítio de interação (isoniazida: protoporfirina: proteína: moléculas de solvente) são pormenorizadas na Tabela 4-1. Notemos, principalmente, as ligações feitas entre o átomo de hidrogênio H92 da amina do INH e os átomos de nitrogênio e oxigênio

da **Val-230**, assim como a ligação entre os átomos O1D da protoporfirina e o hidrogênio da amina (HN) da **His-276**.



Quatro moléculas de água cristalinas interagem: duas delas com um dos grupos carboxílicos da protoporfirina e duas outras com o INH. Todas estas interações estão relacionadas na Tabela 4-4.

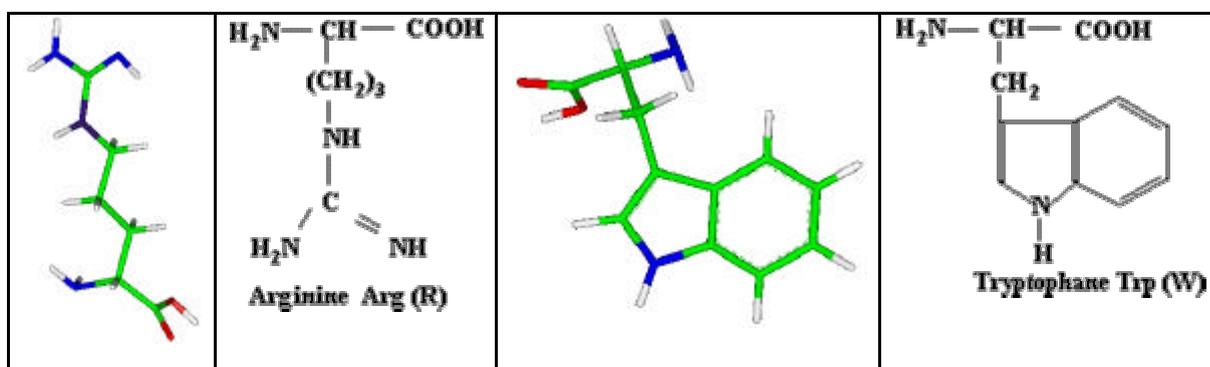
Durante a etapa 2 (Figura 4-3B) houve perda de uma ligação com uma molécula de água e formação de uma ligação hidrogênio, através do hidrogênio da amina, do resíduo **Tyr-229** e a amina do INH. Esta mantém as interações anteriores com a Val-230. Não houve nenhuma formação de ligação entre a isoniazida e a protoporfirina, que permanecem estabilizadas por interações eletrostáticas. A ligação entre uma carbonila do COOH da protoporfirina e a His-276 permanece.



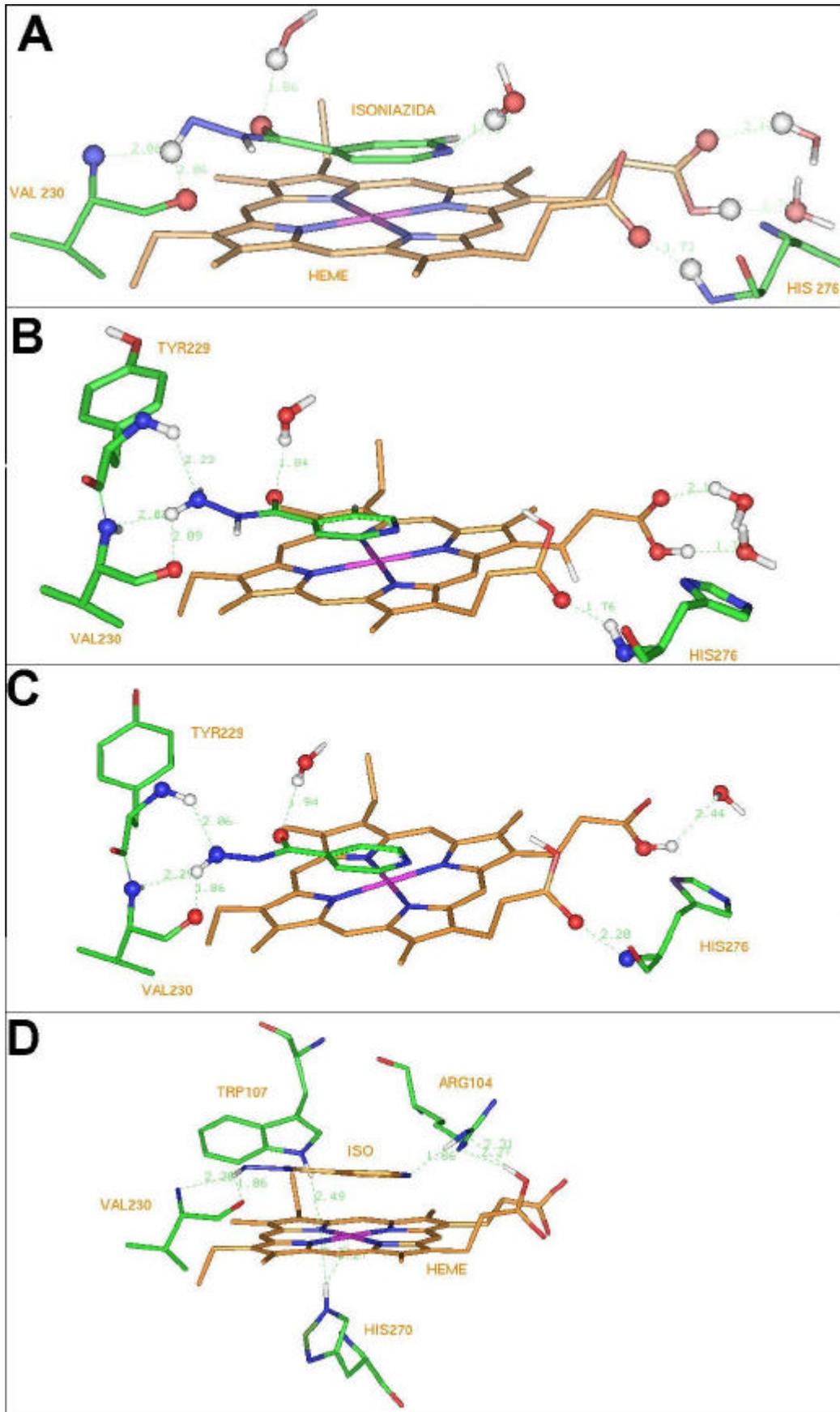
Na 3ª etapa (Figura 4-3C), houve uma quebra de ligação hidrogênio entre a protoporfirina (heme:O1A) e uma das moléculas de água, em comparação com

a etapa anterior. Os valores de distâncias e os ângulos de ligação se alteraram:  $d(O_{1A(\text{heme})}\dots N_{\text{His-276}}) = 1,76$  para  $2,20 \text{ \AA}$ ;  $d(H_{92(\text{INH})}\dots N_{\text{Val-230}}) = 2,03$  para  $2,29 \text{ \AA}$ .

Durante a 4ª etapa houve uma quebra de ligação entre o heme e o resíduo His-276. No entanto, houve formação de outras ligações hidrogênio. Os aminoácidos **Arg-104** e His-270 formaram, cada um, duas ligações hidrogênio com a protoporfirina; os aminoácidos **Trp-107** e His-270 formaram uma ligação hidrogênio cada um com um átomo de nitrogênio (NC) da protoporfirina. Ao todo, uma rede de oito ligações hidrogênio contribuiu para a estabilização do sistema no sítio ativo. Estas interações encontram-se detalhadas na Figura 4-3D.



**Figura 4-3:** (A) Etapa 1 do docking da isoniazida com a proteína *mtCP*. (B) Etapa 2. (C) Etapa 3. (D) Etapa 4.



**Tabela 4-4:** Ligações hidrogênio entre a protoporfirina, a isoniazida e aminoácidos da proteína *mtCP*, durante as etapas de otimização energética para o *docking* da isoniazida.

Etapa	Doador	Aceptor	Distância (?)	Ângulo(°)
Etapa 1	<i>mtCP</i> :His-276:HN	heme: O1D	2,51	152,29
	INH:H92	<i>mtCP</i> :Val-230:N	2,06	128,01
	INH:H92	<i>mtCP</i> :Val-230:O	2,06	127,30
	heme:H2D	O(H2O)	1,76	156,23
	H(H2O)	heme:O1A	2,12	156,33
	H(H2O)	INH:N3	1,75	136,58
	H(H2O)	INH:N3	2,73	139,22
	H(H2O)	INH:O10	1,86	112,28
Etapa 2	<i>mtCP</i> :Tyr-229:HN	INH:N9	2,23	125,45
	<i>mtCP</i> :His-276:HN	heme: O1D	1,76	145,97
	heme:H2D	O(H2O)	1,76	156,95
	INH:H92	<i>mtCP</i> :Val-230:N	2,03	145,38
	INH:H92	<i>mtCP</i> :Val-230:O	2,09	122,86
	H(H2O)	heme:O1A	2,12	152,67
	H(H2O)	INH:O10	1,84	119,23
Etapa 3	<i>mtCP</i> :Tyr-229:HN	INH:N9	2,06	117,34
	<i>mtCP</i> :His-276:HN	heme: O1D	2,20	158,52
	heme:H2D	O(H2O)	2,44	138,26
	INH:H92	<i>mtCP</i> :Val-230:N	2,29	129,58
	INH:H92	<i>mtCP</i> :Val-230:O	1,86	140,92
	H(H2O)	INH:O10	1,94	107,92
Etapa4	<i>mtCP</i> :Arg-104:H22	INH:N3	1,86	130,46
	<i>mtCP</i> :Trp-107:HE	heme:NC	2,49	78,79
	<i>mtCP</i> :Tyr-229:HN	INH:N9	2,07	116,44
	<i>mtCP</i> :His-270:HE2	heme:Fe	2,27	65,71
	<i>mtCP</i> :His-270:HE2	heme:NC	2,31	93,78
	heme:H2A	<i>mtCP</i> :Arg-104:NH2	2,31	152,54
	heme:H2A	<i>mtCP</i> :Arg-104:NE	2,27	145,40
	heme:H2D	O(H2O)	2,38	138,88
	INH:H92	<i>mtCP</i> :Val-230:O	1,86	140,42
	INH:H92	<i>mtCP</i> :Val-230:N	2,26	130,59
	H(H2O)	INH:O10	1,93	107,47

#### 4.5 Comparação entre a proteína cristalina e a otimizada.

Os valores de comparação em relação ao alinhamento das duas estruturas, inicial e modificada devido à inserção do INH, comprovam que as estruturas são similares. Esta qualidade no resultado final dos cálculos se deve fundamentalmente à liberação progressiva do complexo sob estudo.

**Tabela 4-5:** Comparação por *rmsd* entre a proteína na forma cristalina e aquela obtida após o *docking*.

	Todos os átomos (exceto os de hidrogênio)	Cadeia principal	Carbonos- $\alpha$
Etapa 1	1.4502	1.2071	1.1862
Etapa 2	1.4502	1.2071	1.1862
Etapa 3	1.5301	1.2965	1.2724
Etapa 4	1.5363	1.3033	1.2793

Na primeira etapa quase toda a estrutura da proteína estava fixa, houve somente correção do posicionamento dos átomos de hidrogênio, portanto, não houve diferenciação em relação à estrutura cristalina, conforme explicado anteriormente. Com a liberação total do sistema houve uma leve elevação do valor do *rmsd* (0.05Å), correspondente à diferença estrutural entre a etapa 4 e a forma cristalina da proteína. De qualquer forma, este valor é bem inferior a 1 Å.

Na Tabela 4-6 são transcritos os valores obtidos dos *rmsd* entre a proteína cristalina e aqueles de todas as etapas do procedimento de minimização.

**Tabela 4-6:** Comparação do *rmsd* entre as várias etapas de otimização energética após o *docking* da isoniazida.

	Comparações( <i>rmsd</i> )			
	Todos os átomos	Todos os átomos (exceto os de hidrogênio)	Cadeia principal	Carbonos $\alpha$
Etapa 1 x Etapa 2	0,0039	0,0038	0,0036	0,0028
Etapa 1 x Etapa 3	0,3559	0,4046	0,3709	0,4332
Etapa 1 x Etapa 4	0,4246	0,4149	0,3807	0,3658
Etapa 2 x Etapa 3	0,4327	0,4041	0,3702	0,3556
Etapa 2 x Etapa 4	0,4421	0,4144	0,3801	0,3655
Etapa 3 x Etapa 4	0,0589	0,0532	0,0463	0,0459

Analisando-se as etapas 2 e 3, quando os valores de *rmsd* foram os mais altos, pode-se deduzir que houve uma forte interferência da isoniazida sobre as cadeias laterais de resíduos do *mtCP*. Caso o *backbone* estivesse livre, teria havido compensação de forças entre todos os átomos e a estrutura da proteína teria se modificado. Como este estava com liberação restrita, o INH se reposicionou no interior da cavidade, tomando uma orientação mais correta. Isto feito, o conjunto atômico pode ser completamente liberado.

Para obtenção dos dados da tabela 4.7, a proteína *mtCP* foi subdividida em seqüências de 20 aminoácidos, exceto uma última, para a qual foram incluídos 23 aminoácidos. Estas superposições foram feitas com os átomos da cadeia principal, com os carbonos- $\alpha$  e todos os átomos semi-pesados (ou seja, todos, exceto os átomos de hidrogênio). Os átomos de hidrogênio não podem ser comparados, pois uma estrutura cristalina, obtida por difração de raios-x, não possui esta informação.

Foram feitas comparações adicionais, quando as seqüências resultavam em um valor *rmsd* semelhante. Comparou-se, também, a seqüência completa do *mtCP* excluindo-se as extremidades (Tabela 4-7). Estas seqüências são, obviamente, as que possuem o maior desvio estrutural com relação à proteína cristalina. As seqüências com maiores desvios estão reproduzidas na Figura 4-4.

Na Fig.4-4A encontra-se a seqüência [Gly-24-Ala-65], parte amino-terminal, portanto, flexível por estar no início da seqüência protéica. Há um forte desvio proveniente das semi-hélices dos monômeros iniciais e do monômero Ala-65. Não houve, no entanto, perda da estruturação secundária, somente reposicionamento em translação, pois não há estruturas moleculares densas que impeçam a movimentação desta seqüência. Resultado, portanto, perfeitamente natural e esperado, justificável pela maior mobilidade que as partes terminais da proteína podem ter, apesar de estarem circundadas por solvente.

Na Figura 4-4B encontra-se o alinhamento da seqüência [Gln-190-Asp-215] que resultou em *rmsd* de 1,044, com relação a todos os átomos semi-pesados. Este valor é superior àqueles obtidos para as outras comparações. Como indicado na figura, os *backbones* estão quase perfeitamente superpostos. Isto indica que houve reposicionamento das cadeias laterais dos amino-ácidos

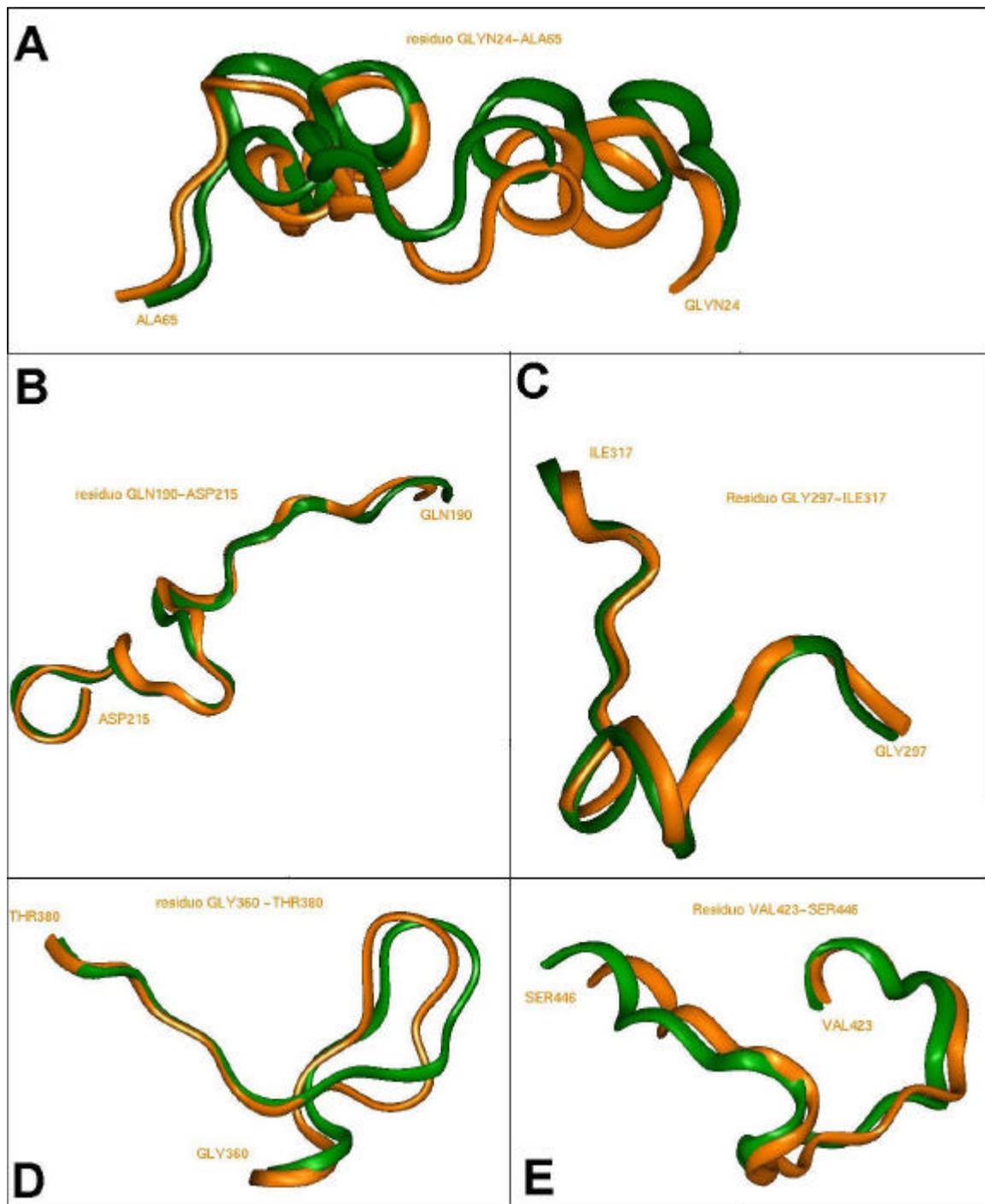
desta seqüência. A Figura 4-4C apresenta a comparação entre os resíduos [Gly-297–Ile-317], onde o valor do *rmsd* é de 0,919, também quando todos os átomos semi-pesados foram superpostos. Houve ligeiro reposicionamento da Gly-297 e da Ile-317, o que possibilita o *turn* indicado na figura. Estas pequenas variações causam um reflexo mais forte nas cadeias laterais.

**Tabela 4-7-** Comparações por *rmsd* entre seqüências de 20 aminoácidos da proteína cristalina e a otimizada após o *docking* do INH.

Seqüência de AA usada na comparação entre as estruturas cristalina e relaxada	<i>Rmsd</i> (Número de átomos)		
	<b>Docking</b>		
	Todos os átomos exceto hidrogênio	Cadeia principal	Carbonos $\alpha$
Gly-24-Asn-44	2,052 <sub>(346)</sub>	1,265 <sub>(168)</sub>	1,28 <sub>(42)</sub>
Leu-45-Ala-65	1,211 <sub>(312)</sub>	1,031 <sub>(168)</sub>	1,060 <sub>(42)</sub>
Ala-66-Thr-86	0,784 <sub>(316)</sub>	0,584 <sub>(168)</sub>	0,586 <sub>(42)</sub>
Ser-87-Trp-107	0,910 <sub>(368)</sub>	0,595 <sub>(168)</sub>	0,612 <sub>(42)</sub>
His-108-Arg-128	0,824 <sub>(296)</sub>	0,626 <sub>(168)</sub>	0,568 <sub>(42)</sub>
Phe-129-Trp-149	0,821 <sub>(350)</sub>	0,494 <sub>(168)</sub>	0,354 <sub>(42)</sub>
Pro-150-Asn-170	0,946 <sub>(334)</sub>	0,554 <sub>(168)</sub>	0,557 <sub>(42)</sub>
Cysh-171-Trp-191	1,080 <sub>(334)</sub>	0,730 <sub>(168)</sub>	0,666 <sub>(42)</sub>
Glu-192-Gly-212	1,044 <sub>(352)</sub>	0,974 <sub>(168)</sub>	0,944 <sub>(42)</sub>
Lys-213-Glu-233	0,937 <sub>(330)</sub>	0,680 <sub>(168)</sub>	0,633 <sub>(42)</sub>
Gly-234-Arg-254	1,071 <sub>(318)</sub>	0,599 <sub>(168)</sub>	0,565 <sub>(42)</sub>
Met-255-Thr-275	0,756 <sub>(298)</sub>	0,529 <sub>(168)</sub>	0,429 <sub>(42)</sub>
His-276-Met-296	1,060 <sub>(290)</sub>	0,747 <sub>(168)</sub>	0,673 <sub>(42)</sub>
Gly-297-Ile-317	0,919 <sub>(288)</sub>	0,926 <sub>(168)</sub>	0,802 <sub>(42)</sub>
Glu-318-Gly-338	0,955 <sub>(356)</sub>	0,718 <sub>(168)</sub>	0,887 <sub>(42)</sub>
Tyr-339-Ala-359	1,150 <sub>(336)</sub>	0,759 <sub>(168)</sub>	0,801 <sub>(42)</sub>
Gly-360-Thr-380	1,317 <sub>(278)</sub>	1,015 <sub>(168)</sub>	0,930 <sub>(42)</sub>
Asp-381-Pro-401	0,975 <sub>(376)</sub>	0,577 <sub>(168)</sub>	0,491 <sub>(42)</sub>
Glu-402-Pro-422	1,026 <sub>(354)</sub>	0,707 <sub>(168)</sub>	0,670 <sub>(42)</sub>
Val-423-Ser-446	1,475 <sub>(374)</sub>	1,121 <sub>(168)</sub>	1,059 <sub>(42)</sub>
Ala-66 - Gly-421	1,195 <sub>(5560)</sub>	0,976 <sub>(2848)</sub>	0,945 <sub>(712)</sub>
Gly-24-Ala-65	1,958 <sub>(658)</sub>	1,429 <sub>(336)</sub>	1,457 <sub>(84)</sub>
Ala-66-Trp-149	1,028 <sub>(1330)</sub>	0,822 <sub>(672)</sub>	0,801 <sub>(168)</sub>
Pro-150-Trp-191	1,064 <sub>(668)</sub>	0,714 <sub>(42)</sub>	0,677 <sub>(84)</sub>
Glu-192-Arg-254	1,145 <sub>(1000)</sub>	0,922 <sub>(504)</sub>	0,903 <sub>(126)</sub>

Na Figura 4-4D é mostrada a superposição das fitas da seqüência [Gly-360-Thr-380], cujo *rmsd* é de 1,35, para a superposição dos átomos semi-pesados. Este valor, relativamente alto, pode ser justificado pela orientação do *loop*, que está na face externa da cadeia protéica. Isto faz com que este laço tenha uma mobilidade maior, em relação a outras estruturas da proteína.

**Figura 4-4:** Superposição de seqüências do *mtCP* cristalino, em laranja, e da estrutura otimizada, em verde, após *docking* do INH. A) Região amino-terminal, compreendendo a seqüência [Gly-24-Ala-65]. B) [GLN190-Asp-215]. C) [Gly-297-ILE317]. D) [Gly-360-Thr-380]. E) Região carboxi-terminal, que compreende a seqüência [Val-423-Ser-446].



Portanto, o processo de acoplamento do INH ao mtCP indica interações entre os resíduos Arg-104, Trp-107, Tyr-229, Val-230, His-270 e His-276, que fariam parte do sítio ativo. Destes, as ligações formadas com os resíduos Arg-104, Trp-107, Val-230 e His-270 se mostraram muito estáveis e oito ligações hidrogênio contribuem fortemente para a estabilização do sistema.

## Capítulo 5 ancoramento flexível

### 5.1. Estudo da isoniazida dentro da cavidade de recepção do *mtCP*, por ancoramento flexível

Um dos métodos para se analisar as interações entre um ligante e um receptor é o do ancoramento flexível. Há diversos programas que se propõem a conduzir a bons resultados. Um deles é o programa *Affinity (flexible docking)*. Uma estratégia de cálculos foi pré-definida e o estudo realizado, de forma a podermos comparar estes resultados com aqueles obtidos pela metodologia precedente.

### 5.2. Metodologia

Para a estratégia de cálculos, várias etapas são necessárias e serão resultados conseqüentes das seguintes definições:

1. - do sítio ativo.
2. - do tamanho do sítio ativo.
3. - do ligante
4. - de quais orientações estruturais o ligante poderia ter.
5. - dos átomos do ligante que seriam doadores de prótons.
6. - daqueles que seriam receptores de prótons.
7. - dos átomos do sítio ativo que seriam doadores de prótons
8. - dos átomos do sítio ativo que seriam receptores de prótons.
9. - do número de conformações desejado e do valor limite estimado para o *rmsd*.

### 5.3. Os modelos obtidos para a orientação da isoniazida na cavidade de recepção do *mtCP*, em relação à protoporfirina

Após definição inicial da estratégia de cálculos, que se fundamenta na boa definição dos subconjuntos acima, o procedimento de dinâmica molecular foi escolhido para a busca conformacional e orientacional da isoniazida, no sítio de

recepção. É fundamental que seja observado que vários cálculos foram efetuados, até que os parâmetros necessários para que Affinity estivessem corretos e conduzissem a resultados lógicos. De qualquer forma, enquanto estes parâmetros não forem otimizados, o programa envia quantidades de mensagens de erro. Este aprendizado foi lento, várias semanas foram necessárias para que o domínio da utilização do programa pudesse ser alcançado. Um dos pontos importantes é que a busca conformacional teve que ser limitada a 20 diferentes posições espaciais, devido a nossas limitações computacionais. O número de conformações aconselhado para este tipo de cálculo seria de 200 conformações. De um lado, como a molécula de isoniazida é pequena e aromática, este número de conformações não seria necessário. Por outro lado, a cavidade acima da estrutura do cofator heme é muito pequena, e a isoniazida não tem espaço suficiente para girar em todas as direções.

Devido a todos estes fatos, nossa busca conformacional gerou vinte resultados, ou seja, vinte possíveis posições para a isoniazida no sítio ativo. Dentre estas, algumas conformações apresentaram variações conformacionais e/ou orientacionais insignificantes entre si. Dez posições foram descartadas e as dez restantes foram submetidas a processo de otimização energética. Após minimização, os dez diferentes resultados convergiram para apenas quatro possibilidades. Estes corresponderão a nossos quatro modelos de interação para o complexo INH-heme-*m*CP em meio líquido, ou seja, o sistema isoniazida:heme:proteína:solvente.

Estes modelos, no entanto, estavam visivelmente incompletos. O tamanho da cavidade, ou o antivolúme do sítio ativo, é bastante restrito. A cavidade tem uma forma alongada e larga sobre o grupo heme, e é por este limitada. Não há espaço suficiente para a movimentação completa da isoniazida, no sentido vertical, em relação ao plano do grupo heme. O INH pode se movimentar no sentido horizontal. Para cobrir esta limitação, duas novas orientações da isoniazida vieram se adicionar às quatro precedentes, e provieram da análise visual estereoscópica da entrada da cavidade. Para estes dois modelos, o posicionamento do INH na cavidade foi manual e, em seguida, corrigido computacionalmente.

Na Figura 5.1A, há duas perspectivas diferentes para cada modelo estudado. Para o primeiro modelo, a isoniazida está posicionada com o nitrogênio do ciclo piridínico voltado para um dos grupos carboxílicos. Esta posição corresponde a uma vista acima do plano do grupo heme. A carbonila do INH está voltada para o centro do heme, onde se localiza o átomo de ferro. Esta posição corresponde àquela estudada através do método de acoplamento rígido, descrito no capítulo anterior. A vista ortogonal, à direita da figura, mostra que o macrociclo da protoporfirina manteve-se planar, os dois grupos carboxílicos se voltam para o espaço superior em relação ao plano do macrociclo, assim como um dos grupos  $C_{sp^2}H_2$  do grupo  $CH_3CH_2$  tem seu metila orientado para baixo, em relação a este plano de referência. Observe-se que a isoniazida não se encontra no centro do macrociclo, mas bem deslocada.

Na figura 5.1B encontra-se o segundo modelo, no qual o anel piridínico do INH situa-se quase a  $90^\circ$  dos ácidos carboxílicos da protoporfirina. A estrutura do INH foi girada de  $180^\circ$  sobre seu próprio plano de simetria. Em consequência houve, nesta orientação, inversão de posição entre o NH da amida e o  $NH_2$  terminal, em relação à orientação do modelo precedente. Esta rotação só foi possível porque o volume da cavidade de recepção é mais largo em sua abertura, que consideramos a “porta de entrada” para a cavidade (*vide* Figura 5.2). O oxigênio da carbonila se direciona para um nitrogênio do macrociclo, mas não o mesmo do modelo anterior. A cadeia lateral do ciclo piridínico está, portanto, com seus nitrogênios próximos a outros dois nitrogênios do macrociclo e próximos ao átomo de ferro. Houve, nesta orientação global, uma distorção à planaridade do macrociclo do grupo heme. Os ácidos carboxílicos voltam-se, ambos, para o espaço superior do macrociclo, em direção à isoniazida. Isto representa uma considerável variação de conformação destas duas cadeias laterais do grupo heme.

O modelo identificado pela Figura 5.1C é bastante similar ao modelo precedente, em relação à disposição relativa do INH para o heme. Houve uma translação do INH de cerca de  $60^\circ$ , em relação ao plano do heme. Devido a esta movimentação, a cadeia lateral do INH se afasta bastante dos ácidos carboxílicos

do heme, se volta para o grupo eteno. A carbonila se aproxima fortemente deste substituinte lateral do macrociclo porforínico. O anel piridínico permanece voltado para os ácidos carboxílicos da protoporfirina. Apesar deste anel não estar localizado no centro do heme, sua posição é bem mais próxima do ferro do que aquelas dos dois modelos precedentes. Parece haver uma forte interação do tipo  $\pi$ - $\pi$  que estabiliza estes grupos juntos.

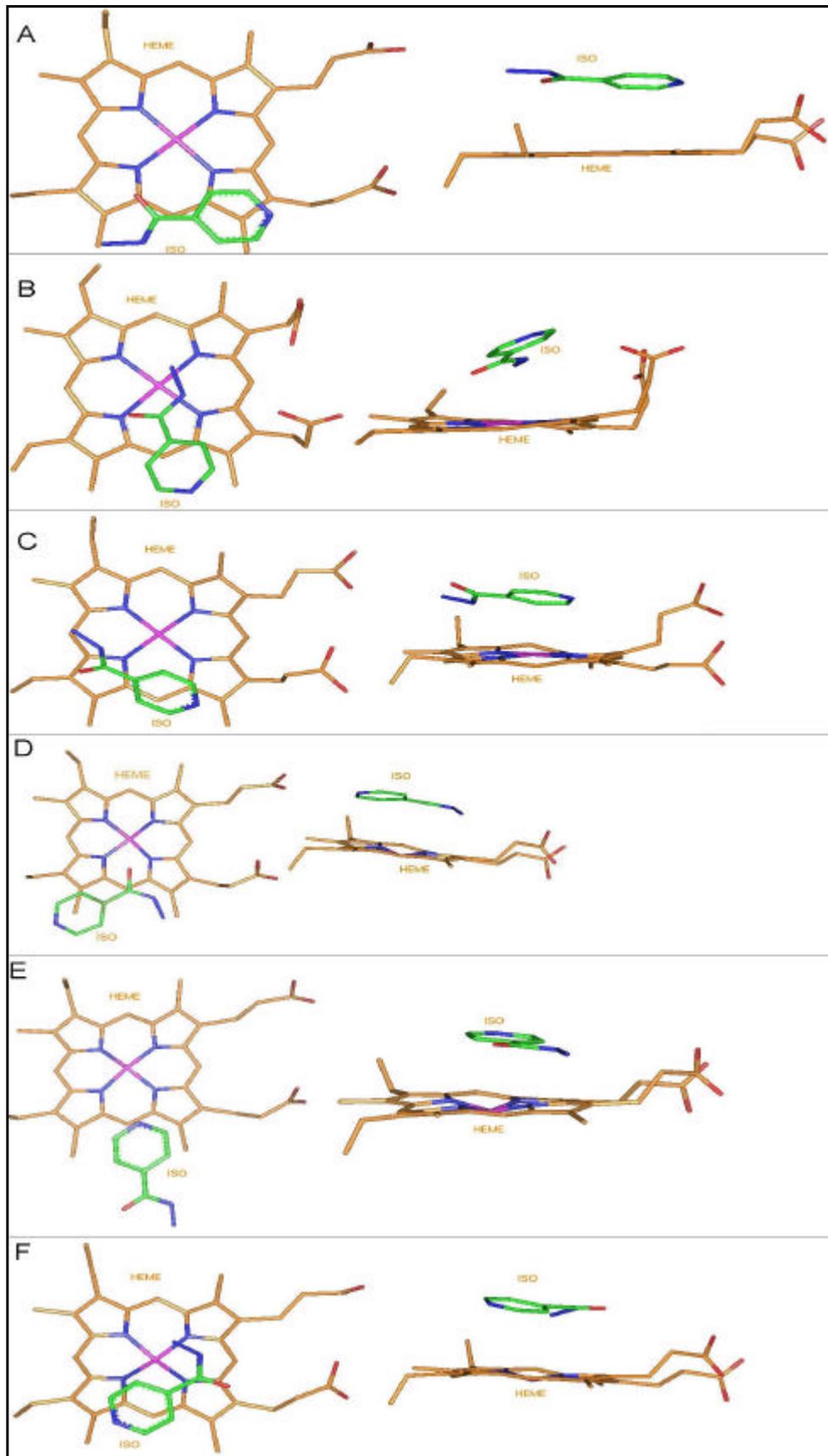
A Figura 5.1D demonstra o quarto modelo, no qual o anel piridínico se deslocou em translação sobre o plano do heme e efetuou uma rotação de cerca de  $160^\circ$  sobre seu próprio eixo, em relação ao precedente modelo. O anel piridínico encontra-se em posição oposta aos ácidos carboxílicos da protoporfirina, e o oxigênio da carbonila está novamente voltado para o centro do cofator. Aqui a isoniazida está tão deslocada do centro do grupo heme como no primeiro modelo.

A Figura 5.1E representa o quinto modelo, onde a isoniazida foi introduzida manualmente. Este posicionamento foi devido ao fato que, em nenhum modelo obtido pelo acoplamento automático, tal situação poderia ter sido obtida, já que o INH se encontra justo após a entrada da cavidade, fortemente deslocada do centro de massa da protoporfirina. O INH estaria entrando na cavidade a partir de seu ciclo piridínico. Aparentemente, esta disposição espacial de entrada não pode ser obtida por Affinity, com certeza devido ao volume livre na cavidade. Estas posições são encontradas quando a busca conformacional é feita excluindo-se o grupo heme (Prof. Elaine, informações pessoais).

A carbonila do INH está em direção contrária aos grupos carboxílicos da protoporfirina. Nesta orientação “metaestável”, o correto seria complementar a análise através de cálculos por dinâmica molecular, para verificação quanto à possibilidade da isoniazida penetrar no sítio ativo e se estabilizar próxima à protoporfirina.

Neste modelo, nosso interesse era sobretudo o de verificar as interações que a isoniazida poderia fazer na entrada da cavidade de recepção, antes de se estabilizar sobre a protoporfirina e com os aminoácidos do sítio ativo.

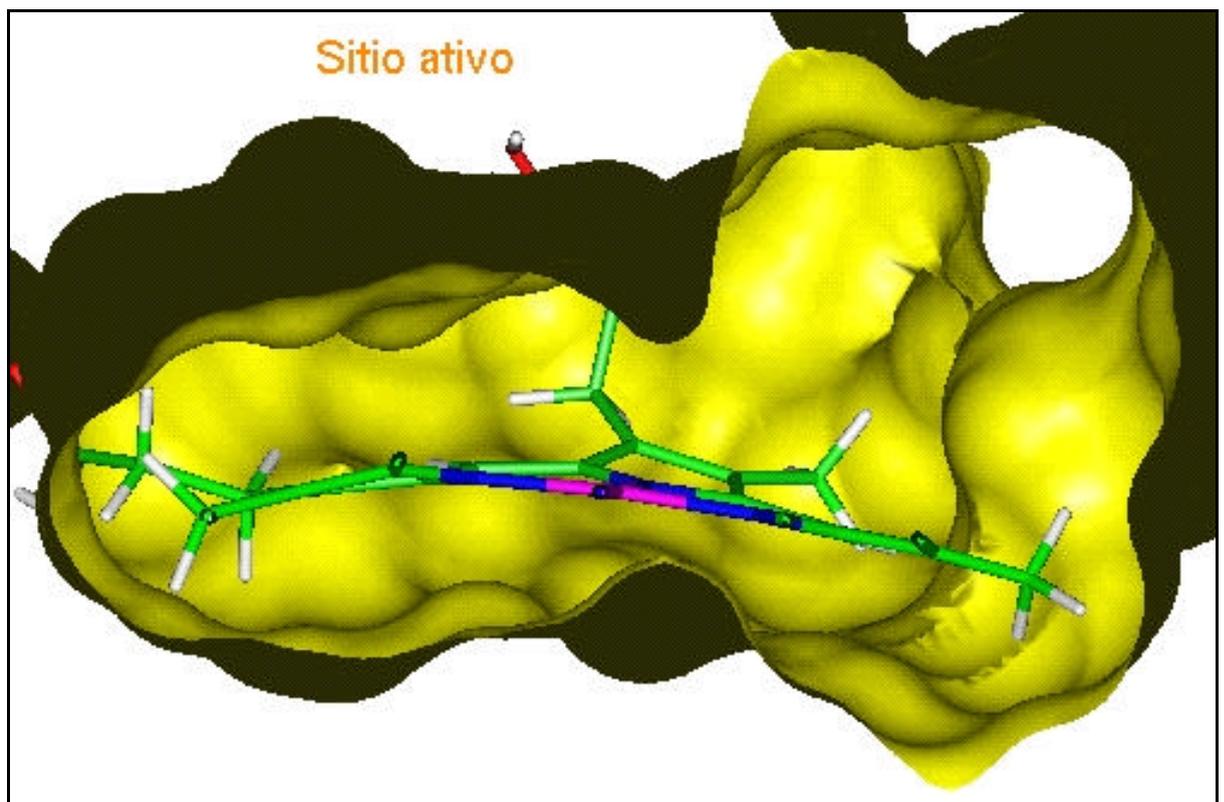
**Figura 5-1**– Principais orientações da isoniazida em relação à protoporfirina provenientes dos cálculos efetuados por ancoramento flexível (Modelos 1 a 4 e 6 e, por complementação manual, o modelo 5: A) Modelo 1; B) Modelo 2; C) Modelo 3; D) Modelo 4; E) Modelo 5; F) Modelo 6.



Na Figura 5.1F, o sexto modelo posiciona a isoniazida a quase  $120^\circ$  daquela obtida na Figura 5.1A. O oxigênio da carbonila está voltado para os grupos carboxílicos da protoporfirina. A isoniazida se estabiliza em posição mais central à protoporfirina, seus grupos NH e NH<sub>2</sub>, estão voltados para o átomo de ferro central.

A Figura 5.2 mostra a cavidade receptora em corte longitudinal, calculada a 12Å, a partir do átomo de ferro. Esta cavidade define o espaço – tamanho e forma – no qual a isoniazida, (ou outro ligante), deverá se adaptar para inibir a enzima. Esta superfície é conhecida como superfície de Connolly, ou superfície acessível ao solvente.<sup>(47,48)</sup>

**Figura 5-2** Superfície de Connolly (em amarelo) para os aminoácidos que definem a cavidade receptora, calculada a 12Å a partir do átomo de ferro.



Note-se a entrada da cavidade, o espaço aberto bem definido do lado direito da superfície.

47 – Connolly, M. L., **Biopolymers**, 25, 1229 (1985)

48 – Connolly, M. L., **Biopolymers**, 32, 1215, (1992)

Esta superfície é essencial para se conhecer a forma e o espaço disponível no sítio ativo e, assim, compreender as possíveis interações que ocorrem nos complexos. Igualmente, ela é essencial para que se possa propor novas moléculas as quais, dentro da aproximação chave-fechadura, possam se adaptar perfeitamente neste sítio ativo.

A isoniazida apesar de ser uma molécula relativamente pequena, tem seus movimentos restritos e tende, segundo nossos cálculos, a se posicionar tangencialmente à protoporfirina, conforme os modelos de orientação acima comentados.

### 5.2.1 Detalhamento dos modelos quanto às interações efetuadas

As Tabelas 5.1 e 5.2 mostram os valores das contribuições energéticas antes e após minimização dos sistemas provenientes do ancoramento flexível, assim como as energias totais do complexo sob análise.

**Tabela 5-1:** Sumário das contribuições energéticas de cada termo da equação matemática do campo de força ESFF usado no processo de otimização de energia após ancoramento do INH, resultando nos modelos 1, 2 e 3.

Contribuições energéticas	Modelo 1		Modelo 2		Modelo 3	
	Inicial (kcal.mol <sup>-1</sup> )	Final (kcal.mol <sup>-1</sup> )	Inicial (kcal.mol <sup>-1</sup> )	Final (kcal.mol <sup>-1</sup> )	Inicial (kcal.mol <sup>-1</sup> )	Final (kcal.mol <sup>-1</sup> )
Energia potencial total	-20055.9	-20087.4	-19803.3	<b>-20232.1</b>	-20111.7	-20195.3
Energia interna	3085.0	3066.1	3091.0	3082.9	3072.4	3059.1
Deformações de ligações	424.83	403.2	410.7	396.7	415.2	395.2
Deformações angulares	1607.4	1610.1	1612.6	1615.8	1609.2	1604.7
Deformações torsionais	1028.0	1027.7	1042.3	1044.0	1023.8	1034.1
Distorções ao plano	24.8	25.0	25.2	26.2	24.2	25.0
Interações não-ligadas	-23140.8	-23158.1	-22894.4	-23315.0	-23184.1	-23254.4
vdw	1929.9	1935.2	2274.9	1930.0	1945.9	1934.4
vdw repulsivas	23135.9	23153.7	23532.3	23144.9	23141.9	23212.8
vdw dispersivas	-21206.1	-21218.5	-21257.4	-21214.8	-21196.0	-21278.4
Eletrostáticas	-25070.7	-25093.4	-25169.4	-25245.1	-25130.1	-25188.8

As energias totais correspondendo às diferentes orientações da isoniazida no sítio ativo mantiveram-se próximas ( $-20.232 \text{ kcal.mol}^{-1}$  a  $-19.910 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ), com uma diferença máxima de  $322 \text{ kcal.mol}^{-1}$ . As interações não ligadas do sistema variaram de  $-25 193 \text{ kcal.mol}^{-1}$  (para o modelo 5) a  $-23 158 \text{ kcal.mol}^{-1}$ . A maior contribuição energética corresponde às interações eletrostáticas  $-29 616 \text{ kcal.mol}^{-1}$  (para o modelo 5) a  $-25 093 \text{ kcal.mol}^{-1}$ . Observe-se que o modelo 5 apresenta valores divergentes em comparação aos outros do conjunto de modelos. Considerando-se o critério energético como um dos referenciais para análise dos resultados, os melhores modelos estariam classificados na seguinte ordem, de maior para menor estabilidade (ou, de menor energia, para maior energia):

Modelo 2 = modelo 6 > modelo 4 > modelo 3 > modelo 1 > modelo 5.

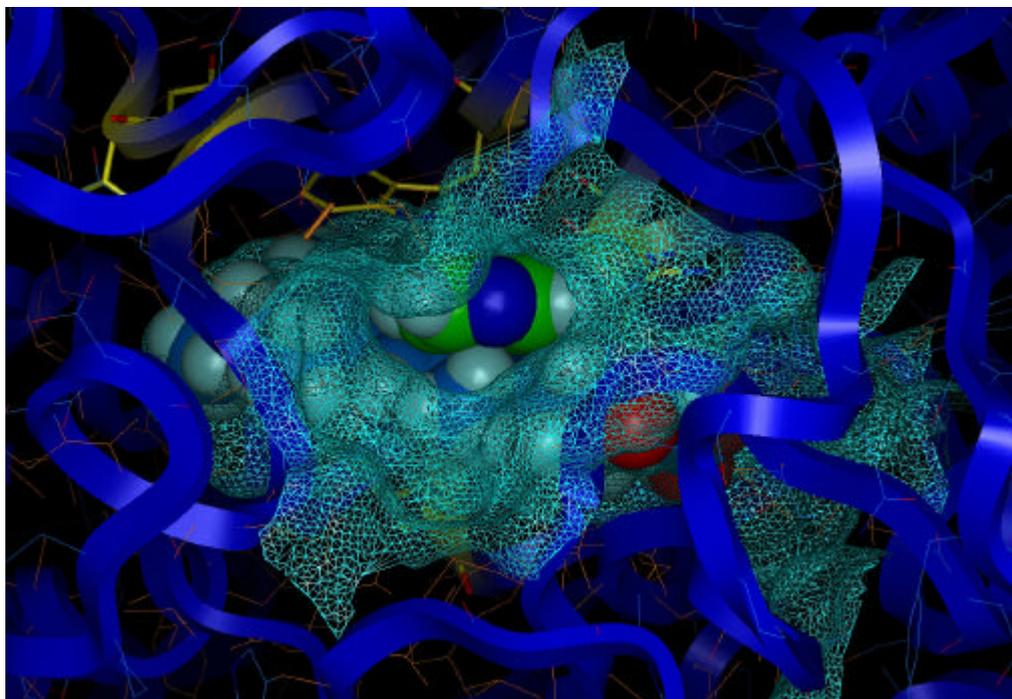
**Tabela 5-2:** Sumário das contribuições energéticas de cada termo da equação matemática do campo de força ESFF usado no processo de otimização de energia após ancoramento do INH, resultando nos modelos 4, 5 e 6.

Contribuições energéticas	Modelo 4		Modelo 5		Modelo 6	
	Inicial (kcal.mol <sup>-1</sup> )	Final (kcal.mol <sup>-1</sup> )	Inicial (kcal.mol <sup>-1</sup> )	Final (kcal.mol <sup>-1</sup> )	Inicial (kcal.mol <sup>-1</sup> )	Final (kcal.mol <sup>-1</sup> )
Energia potencial total	-20136,1	-20214,0	-18170.11	-19909.93	86526.4	<b>-20228.5</b>
Energia interna	3091,0	3082,8	5179.46	5283.31	3091.0	3084.8
Deformações de ligações	412,2	396,2	1857.88	1883.71	410.7	396.7
Deformações angulares	1615,8	1611,0	2901.78	2937.35	1612.6	1615.6
Deformações torsionais	1037,4	1048,5	405.72	446.37	1042.3	1046.1
Distorções ao plano	25,6	27,0	14.07	15.87	25.2	26.3
Interações não-ligadas	-23227,1	-23296,8	-23349.57	<b>-25193.23</b>	83435.3	-23313.4
vdw	1925,7	1919,2	4404.26	4422.50	108600.0	1940.2
vdw repulsivas	23106,1	23130,0	26885.52	28798.73	130792.7	23164.1
vdw dispersivas	-21180,4	-21210,8	-22481.26	-24376.23	-22192.4	-21223.9
Eletrostáticas	-25152,8	-25216,1	-27753.83	<b>-29615.74</b>	-25164.9	-25253.6

Portanto, por critério de menor energia, os melhores modelos seriam os de número 2 (Figura 5-1B) e de número 6 (Figura 5-1F), que se estabilizaram a valores de energia praticamente idênticos.

O modelo 2 é aquele em que a carbonila do INH estaria com a cadeia substituinte voltada para o centro do grupo heme. A carbonila está orientada para um dos átomos de nitrogênio do heme e a amina direcionada ao Fe. Este modelo parece coerente porque poderíamos esperar que o nitrogênio da amina interagisse preferencialmente com o átomo de ferro central, pois ele deveria ser mais ácido.

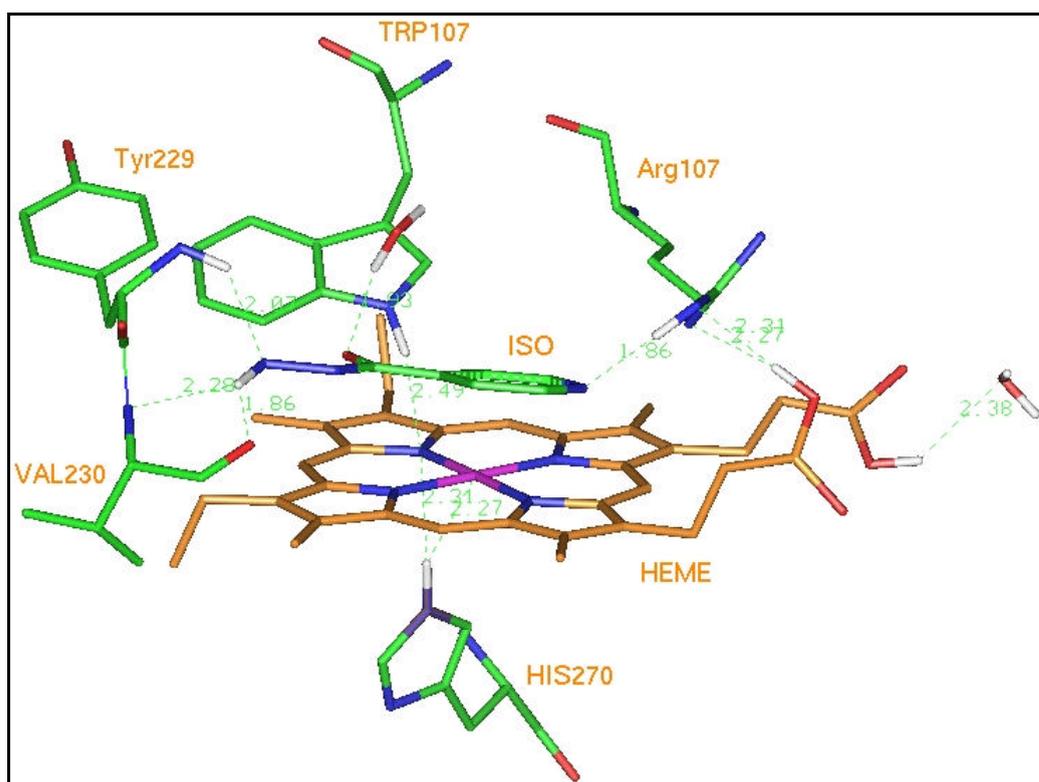
O modelo 6 posiciona a isoniazida com o ciclo piridínico voltado para a entrada da cavidade, a quase  $90^\circ$  das cadeias laterais carboxílicas do grupo heme. O oxigênio da carbonila está voltado para estas cadeias. A isoniazida se estabiliza em posição mais central à protoporfirina, e a amina  $\text{NH}_2$  está voltada para o átomo de ferro central (*vide figura abaixo, não numerada na seqüência desta dissertação, mostrando a entrada da cavidade de recepção e a isoniazida na posição do modelo6*).



Analisemos, detalhadamente, as ligações hidrogênio que estabilizam o complexo, nos diversos modelos apresentados.

No modelo 1, Figura 5.3, a estabilização se dá após formação de um conjunto de onze (11) interações fortes. Cinco aminoácidos interagem fortemente: Arg-104, Trp-107, Tyr-229, Val-230 e His-270. A isoniazida se estabiliza através de cinco ligações hidrogênio. Houve formação de uma ligação hidrogênio entre o aminoácido Arg-104 e seu nitrogênio piridínico N3, a uma distância de 1,86Å. Uma segunda ligação ocorreu entre o aminoácido Tyr-229 e o N9, a uma distância de 2,07Å, e duas outras ligações entre o aminoácido Val-230 e os átomos de hidrogênio do grupo amina da isoniazida, com distâncias de 1,86Å e 2,26Å, respectivamente. A carbonila do INH interage fortemente com uma molécula de água ( $d = 1.93 \text{ \AA}$ ). Estas interações e aquelas correspondentes aos modelos 2 e 3 estão detalhadas na Tabela 5.3.

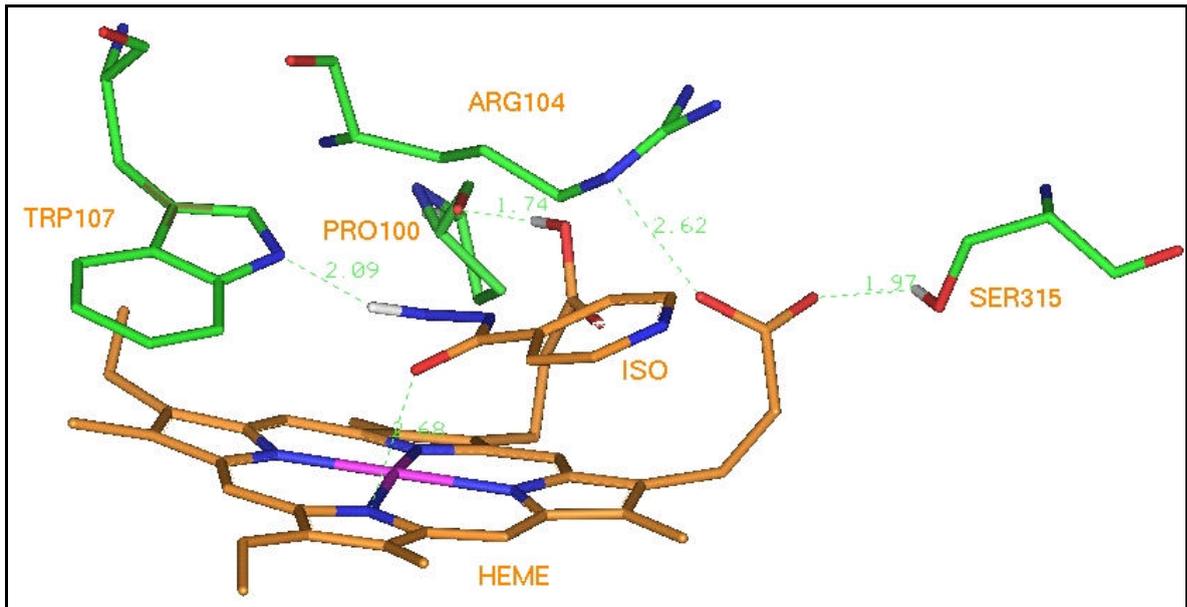
**Figura 5-3** Ligações hidrogênio formadas entre o *mtCP*, a isoniazida e a protoporfirina no modelo orientacional 1.



Houve, também, formação de quatro ligações hidrogênio entre a protoporfirina e a cadeia protéica da proteína *mtCP*, com os aminoácidos Arg-104, Trp-107 e His-270, com distâncias de 2,27Å, 2,49Å, 2,27Å e 2,21Å, respectivamente. A protoporfirina se liga ainda a uma molécula de água. A His-270 é fortemente atraída por um dos nitrogênios aromáticos da protoporfirina e pelo átomo de ferro. Não houve distorção à planaridade devido a esta interação. O ferro continua no plano do grupo heme.

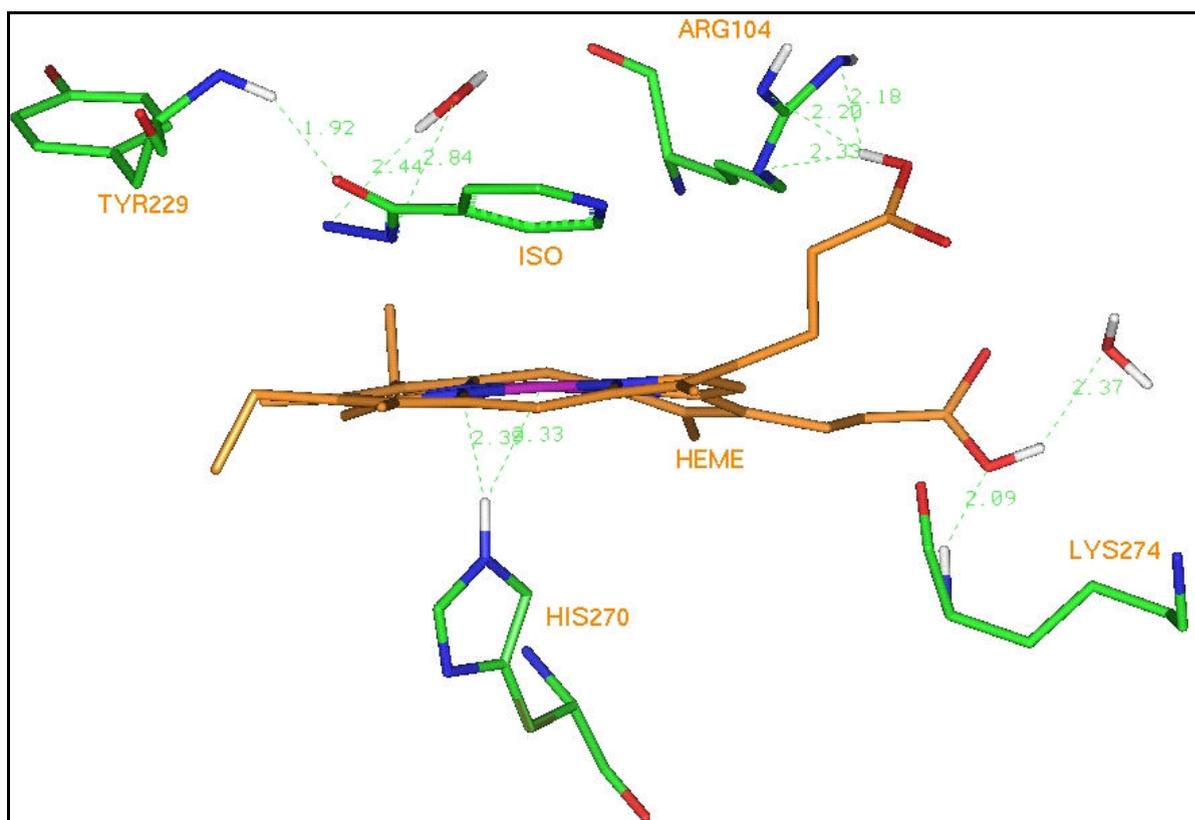
No modelo 2, Figura 5.4, a estabilização ocorre após formação de um conjunto de cinco (5) interações fortes. Quatro aminoácidos interagem fortemente: Pro-100, Arg-104, Trp-107, Tyr-229 e Ser-315.

**Figura 5-4** Ligações hidrogênio formadas entre o *mtCP*, a isoniazida e a protoporfirina no modelo orientacional 2.



Houve uma ligação hidrogênio entre o aminoácido Ser-315 e um dos oxigênios carboxílicos do grupo heme, a uma distância de 1,97Å. O segundo oxigênio do mesmo grupo interage com um nitrogênio da Arg-104, a uma distância de 2,62Å. A isoniazida participa de duas interações, uma através do hidrogênio H9 da amina, com o nitrogênio intracíclico do Trp-107, a uma distância de 2,09Å; e outra através do oxigênio O10 da carbonila com o N3 da protoporfirina, a uma distância de 2,68Å. Ocorrem, ainda, ligações hidrogênio entre a protoporfirina, com seu segundo grupo carboxílico e com a Pro-100, a uma distância de 1,74Å.

No modelo 3, Figura 5.5, a estabilização ocorre após formação de um conjunto de onze (11) interações fortes. Quatro aminoácidos interagem fortemente: Arg-104, Tyr-229, His-270 e Lys-274.

**Figura 5-5:** Ligações hidrogênio formadas entre o *mtCP*, a isoniazida e a protoporfirina no modelo 3.

Houve ligação da isoniazida com a Tyr-229, a uma distância de 1,92Å. Uma molécula de solvente interage com o INH, através de duas ligações hidrogênio. Uma segunda molécula de água interage com um grupo carbonílico do heme ( $d= 2,84\text{Å}$  e  $2,44\text{Å}$ ;  $2,37\text{Å}$ , respectivamente). O grupo heme forma ligações com a Lys-274, a uma distância de  $2,09\text{Å}$ ; com a His-270, a  $d= 2,39\text{Å}$  e  $2,33\text{Å}$ , respectivamente; três ligações hidrogênio com a Arg-104,  $d= 2,33\text{Å}$ ,  $2,18\text{Å}$  e  $2,20\text{Å}$ , respectivamente; além de uma ligação hidrogênio com o solvente, já descrita. A molécula de água deve ter impedido a isoniazida de interagir com outros aminoácidos e com o heme, exceto por forças eletrostáticas.

Os dados sobre estas ligações formadas, os átomos envolvidos, os valores de distância de ligação e ângulos estão transcritos na Tabela 5-3.

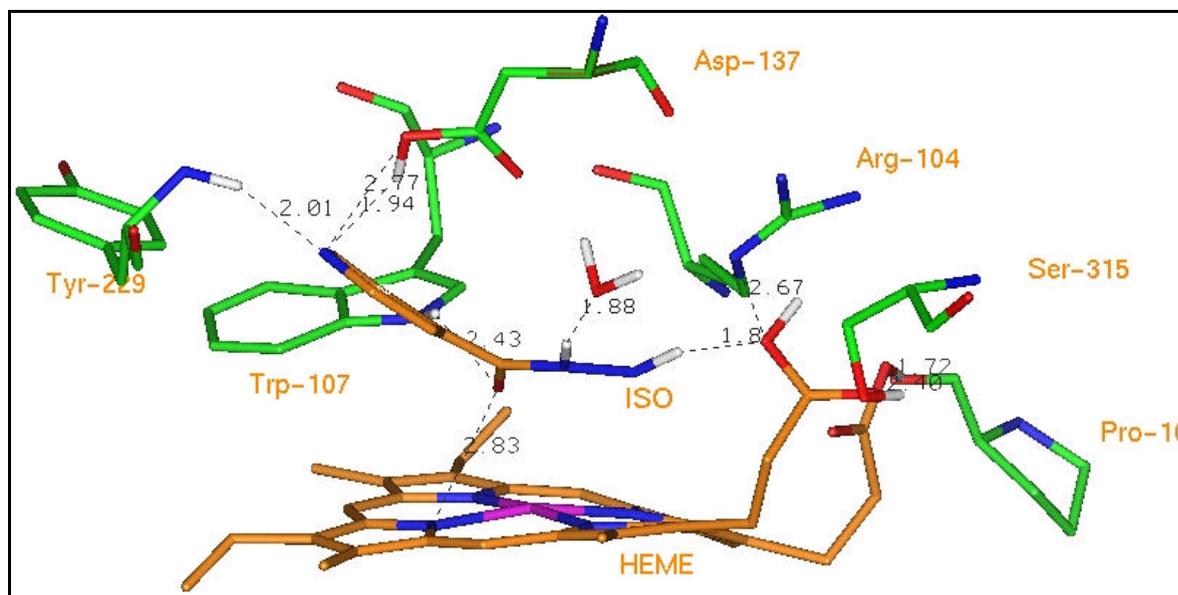
**Tabela 5-3:** Ligações hidrogênio entre a protoporfirina, a isoniazida e aminoácidos da proteína *mtCP*, após a otimização de energia dos modelos 1, 2 e 3, obtidos por ancoramento flexível.

<b>Modelos</b>	<b>Doador</b>	<b>Aceptor</b>	<b>Distância (?)</b>	<b>Ângulo(°)</b>
Modelo1	<i>mtCP</i> :Arg104:H22	INH:N3	1,86	130,46
	<i>mtCP</i> :Trp107:HE	Heme:NC	2,49	78,79
	<i>mtCP</i> :Tyr229:HN	INH:N9	2,07	116,44
	<i>mtCP</i> :His270:HE2	Heme:Fe	2,27	65,71
	<i>mtCP</i> :His270:HE2	Heme:NC	2,31	
	Heme:H2A	<i>mtCP</i> :Arg104:NH2	2,31	152,54
	Heme:H2A	<i>mtCP</i> :Arg104:NE	2,27	145,40
	Heme:H2D	O(H2O)	2,38	138,88
	INH:H92	<i>mtCP</i> :Val230:O	1,86	140,42
	INH:H92	<i>mtCP</i> :Val230:N	2,26	130,59
H(H2O)	INH:O10	1,93	107,47	
Modelo 2	<i>mtCP</i> :Arg104:NE	Heme:O2A	2,62	145,9
	<i>mtCP</i> :Ser315:HG	Heme:O1A	1,97	112,2
	Heme:H2D	<i>mtCP</i> :Pro100:O	1,74	160,3
	Heme:N3	INH:O10	2,68	84,1
	INH:H91	<i>mtCP</i> :Ser-315:HN	2,09	160,8
Modelo 3	<i>mtCP</i> :Trp-107:HE1	Heme:NC	2,32	101,15
	<i>mtCP</i> :Tyr-229:HN	INH:O10	1,92	144,84
	<i>mtCP</i> :His270:HE2	Heme:NB	2,39	63,79
	<i>mtCP</i> :His270:HE2	Heme:Fe	2,33	107,45
	<i>mtCP</i> :Lys-274:HN	Heme:O2D	2,09	121,22
	Heme:H2A	<i>mtCP</i> :Arg-104:NE	2,33	160,51
	Heme:H2A	<i>mtCP</i> :Arg-104:NH1	2,18	131,7
	Heme:H2A	<i>mtCP</i> :Arg-104:NH2	2,20	129,16
	INH:H92	<i>mtCP</i> :Trp-107:NE1	2,20	159,90
	INH:H8	Heme:NB	2,31	101,05
	H(H2O)	Heme:H2D	2,37	144,84
H(H2O)	INH:N9	2,44	69,57	

No modelo 4, Figura 5.6, são formadas dez ligações hidrogênio. Seis aminoácidos interagem fortemente: Pro-100, Arg-104, Trp-107, Asp-137, Tyr-229 e Ser-315. O átomo NE da Arg-104 forma ligação com o átomo O2A do heme, a uma distância de 2,67Å.

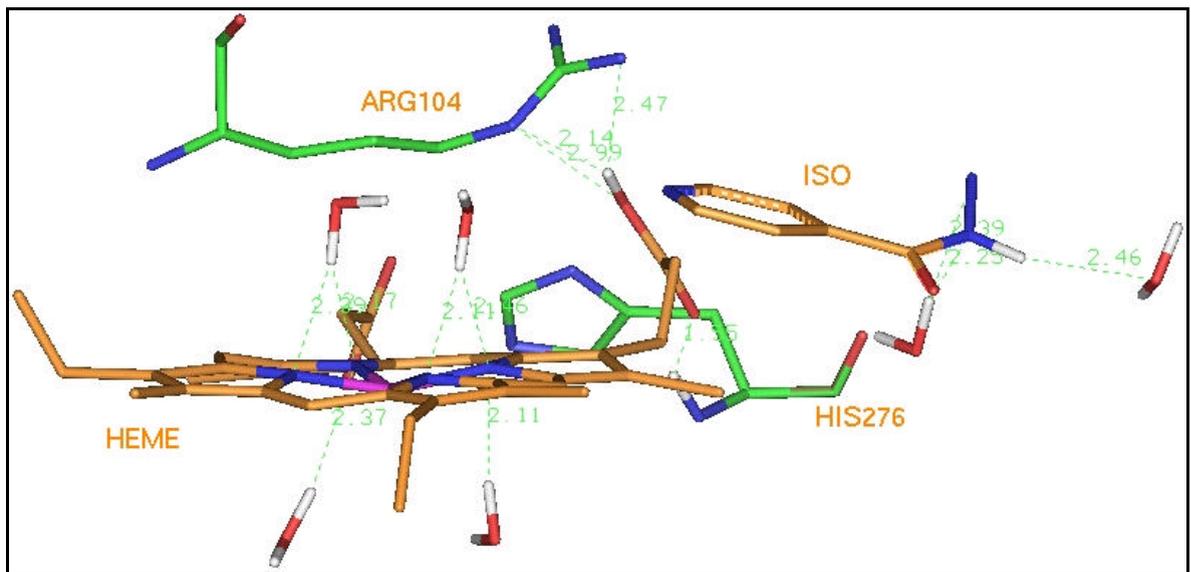
A hidroxila da Ser-315 se liga ao átomo O1A da protoporfirina (d=2,40Å) e ao átomo de oxigênio O da Pro-100. Houve formação de quatro ligações fortes com a isoniazida, através dos átomos HE1 do Trp-107, com o átomo O10 do INH (d= 2,43Å), do átomo HN da Tyr-229 (d= 2,01Å), com os átomos HD2 e ODD do Asp-137 (d= 1,94Å, 2,77Å). Houve ainda mais três ligações fortes, entre os átomos NB e O2A do heme, com os átomos O10 e H92 do INH (d= 2,83Å, 1,84Å e a última entre o átomo H8 do INH com uma molécula de água. Estas interações e aquelas correspondentes aos modelos 5 e 6 estão detalhadas na Tabela 5.4.

**Figura 5-6** Ligações hidrogênio formadas entre o *mtCP*, a isoniazida e a protoporfirina no modelo orientacional 4.



No modelo 5, Figura 5.7, a isoniazida encontra-se na posição de entrada na cavidade receptora. A intenção era a de se saber se haveria possibilidade da isoniazida, somente através de minimização energética, ser conduzida e estabilizada no interior da cavidade.

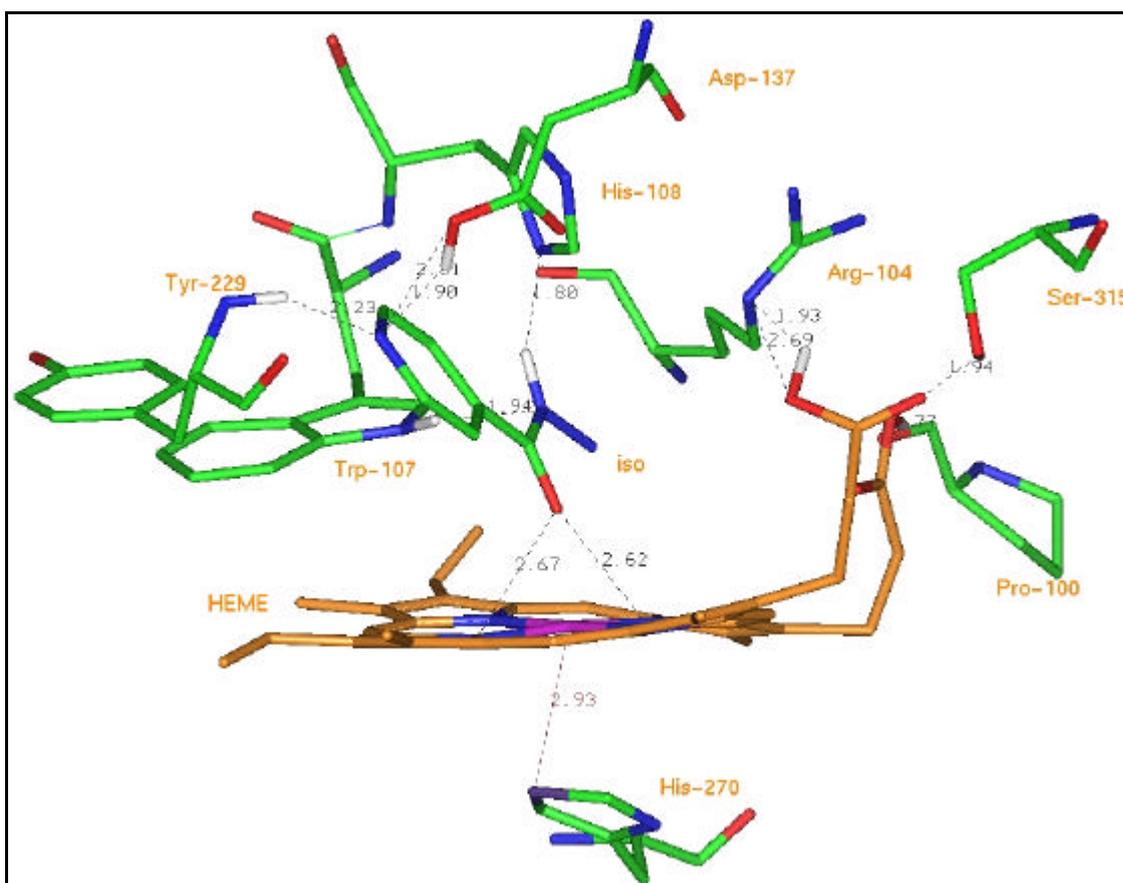
**Figura 5-7** Ligações hidrogênio ocorridas entre o *mtCP*, a isoniazida e a protoporfirina no modelo orientacional 5.



Na realidade, a tentativa foi sem sucesso. Houve formação de treze (13) ligações hidrogênio, das quais nove foram efetuadas através de seis moléculas de água. A isoniazida interage com duas moléculas de solvente. Por sua vez, o grupo heme interage com quatro outras moléculas de solvente. Todas estas águas impedem o posicionamento da isoniazida em relação à protoporfirina, que se liga somente a dois aminoácidos, a Arg-104 e a His-276.

No modelo 6, Figura 5.8, a estabilização ocorre após formação de um conjunto de onze (11) interações fortes. Oito aminoácidos interagem fortemente: Pro-100, Arg-104, Trp-107, His-108, Asp-137, Tyr-229, His-270 e Ser-315. As moléculas de água não mais interferiram na formação do complexo.

**Figura 5-8:** Ligações hidrogênio formadas entre o *mtCP*, a isoniazida e a protoporfirina no modelo orientacional 6.



Dentre estas onze ligações hidrogênio, sete delas contribuem para a estabilização da isoniazida. Houve cinco ligações hidrogênio entre este ligante e a cadeia protéica: com o Trp-107 ( $d=1,94\text{Å}$ ); com a His-108 ( $d=1,80\text{ Å}$ ), duas ligações com o aminoácido ASP-137 ( $d= 1,90\text{Å}$  e  $2,31\text{Å}$ , respectivamente), e uma última com a Tyr-229 ( $d=2,23\text{Å}$ ). Além destas, duas ligações hidrogênio foram formadas entre os átomos NA e NB da protoporfirina e o oxigênio O10 da isoniazida ( $d=2,62\text{Å}$  e  $2,67\text{Å}$ , respectivamente).

O heme volta a interagir com a Ser-315 ( $d=1,94\text{Å}$ ) e, também, com a Arg-104 ( $d=2,69\text{Å}$  e  $1,93\text{Å}$ ) e a Pro-100 ( $d=1,77\text{Å}$ ).

Houve um desvio à planaridade do grupo heme, o que talvez possa justificar a ausência de formação de ligação hidrogênio, apesar da forte interação entre o ferro e a His-270 ( $d = 2,93\text{\AA}$ ).

Este modelo nos parece o mais coerente. A diferença de energia do complexo é pequena (inferior a 1%) em relação ao modelo de número 4. Consideramos, portanto, que a correção da distorção da protoporfirina deve ser efetuada, para que se possa verificar se haverá ligação com a His-270 e, caso isto ocorra, se haverá queda de energia do sistema.

A relação de distribuição de cargas sobre o INH parece coerente para este modelo. Dentre os nitrogênios, o piridínico é o mais eletronegativo, seguido por aquele da amina. O da amida é bem menos eletronegativo (-0.48, -0.46 e -0.27, respectivamente). Os átomos de hidrogênio da amina têm carga parcial ligeiramente inferior ao do átomo de hidrogênio da amida (+0.25 e +0.27, respectivamente). O oxigênio carbonílico é o átomo que possui a maior carga parcial negativa (-0.54).

Efetuando-se a comparação (por *rmsd*) entre seqüências de aminoácidos de cada modelo orientacional em relação às mesmas seqüências provenientes da estrutura cristalina, verifica-se que estes desvios são mínimos, excetuando-se aqueles correspondentes aos aminoácidos terminais. Destacam-se, também, nesta análise, as comparações das seqüências (Met-255-Thr-275), (His-276-Met-296) e (Glu-318-Gly-338), cujos valores de *rmsd* apresentaram uma variação maior (0,75, 1,04, 0,83, 1,30, 0,81, 1,04), (1,06, 1,01, 0,93, 1,11, 1,06, 1,01) e (0,95, 1,05, 0,95, 0,99, 1,00, 1,08), por modelo, respectivamente.

**Tabela 5-4:** Ligações hidrogênio formadas entre a protoporfirina, isoniazida e a cadeia de aminoácidos da proteína *mtCP*, após a otimização de energia dos modelos 4, 5 e 6 obtidos por ancoramento flexível.

Modelos	Doador	Aceptor	Distância (?)	Ângulo(°)
Modelo 4	<i>mtCP</i> :Arg-104:NE	Heme:O2A	2,67	143,6
	<i>mtCP</i> :Trp-107:HE1	INH:O10	2,43	118,5
	<i>mtCP</i> :Asp-137:HD2	INH:N3	1,94	86,12
	<i>mtCP</i> :Tyr-229:HN	INH:N3	2,01	159,5
	<i>mtCP</i> :Ser-315:NG	Heme:O1A	2,40	96,7
	Heme:H2D	<i>mtCP</i> :Pro-100:O	1,72	160,5
	Heme:NB	INH:O10	2,83	63,23
	INH:N3	<i>mtCP</i> :Asp-137:ODD	2,77	98,6
	INH:H92	Heme:O2A	1,84	164,2
	INH:H8	H <sub>2</sub> O	1,88	162,8
Modelo 5	<i>mtCP</i> :Arg-104:NE	Heme:O2A	2,99	115,7
	<i>mtCP</i> :His-276:HN	Heme:O1A	1,55	141,6
	Heme:H2A	<i>mtCP</i> :Arg-104:NH2	2,47	151,1
	Heme:H2A	<i>mtCP</i> :Arg-104:NE	2,14	147,1
	INH:N8	H(H2O)	2,25	99,3
	INH:H8	H(H2O)	2,46	138,5
	INH:N9	H(H2O)	2,39	67,2
	H(H2O)	Heme:NA	2,11	82,6
	H(H2O)	Heme:ND	2,17	77,8
	H(H2O)	Heme:NA	2,46	76,1
	H(H2O)	Heme:NC	2,39	72,1
	H(H2O)	Heme:NB	2,11	85,8
	H(H2O)	Heme:ND	2,37	96,1
Modelo 6	<i>mtCP</i> :Arg-104:NE	Heme:O2A	2,69	135,7
	<i>mtCP</i> :Trp-107:HE1	INH:N8	1,94	94,0
	<i>mtCP</i> :Asp-137:HDD	INH:N3	1,90	101,6
	<i>mtCP</i> :Tyr-229:HN	INH:N3	2,23	119,7
	<i>mtCP</i> :Ser-315:HG	Heme:O1A	1,94	117,0
	Heme:H2D	<i>mtCP</i> :Pro100:O	1,77	156,6
	Heme:H2A	<i>mtCP</i> :Arg-104:NE	1,93	129,5
	Heme:NB	INH:O10	2,67	63,2
	Heme:NA	INH:O10	2,62	64,7
	INH:N3	<i>mtCP</i> :ASP-137:O2D	2,81	104,1
	INH:H8	<i>mtCP</i> :His108:ND1	1,80	155,4

Estes valores bastante baixos dos *rmsd* indicam que os cálculos foram conduzidos de forma coerente, pois as mudanças conformacionais que ocorrem na cadeia protéica, devido à inserção da isoniazida no sítio ativo, foram reduzidas devido ao longo processo de relaxamento efetuado para se corrigir as posições iniciais do ligante. Caso contrário, modelos iniciais provenientes do *docking* flexível teriam alterado em muito aqueles aminoácidos muito próximos ao sítio ativo, os quais, por compensação de forças, teriam alterado aqueles de suas vizinhanças imediatas e assim por diante. Note-se a alta energia inicial obtida para o modelo 6, na Tabela 5.2. Este valor inicial indica que havia fortes impedimentos estéricos devido a um mau posicionamento inicial da isoniazida.

A partir destes seis modelos orientacionais estudados podemos fazer algumas deduções e tirar algumas conseqüências:

- os modelos 2 e 6 têm os valores de distâncias mais homogêneos, indicando uma maior estabilização do INH sobre a protoporfirina.

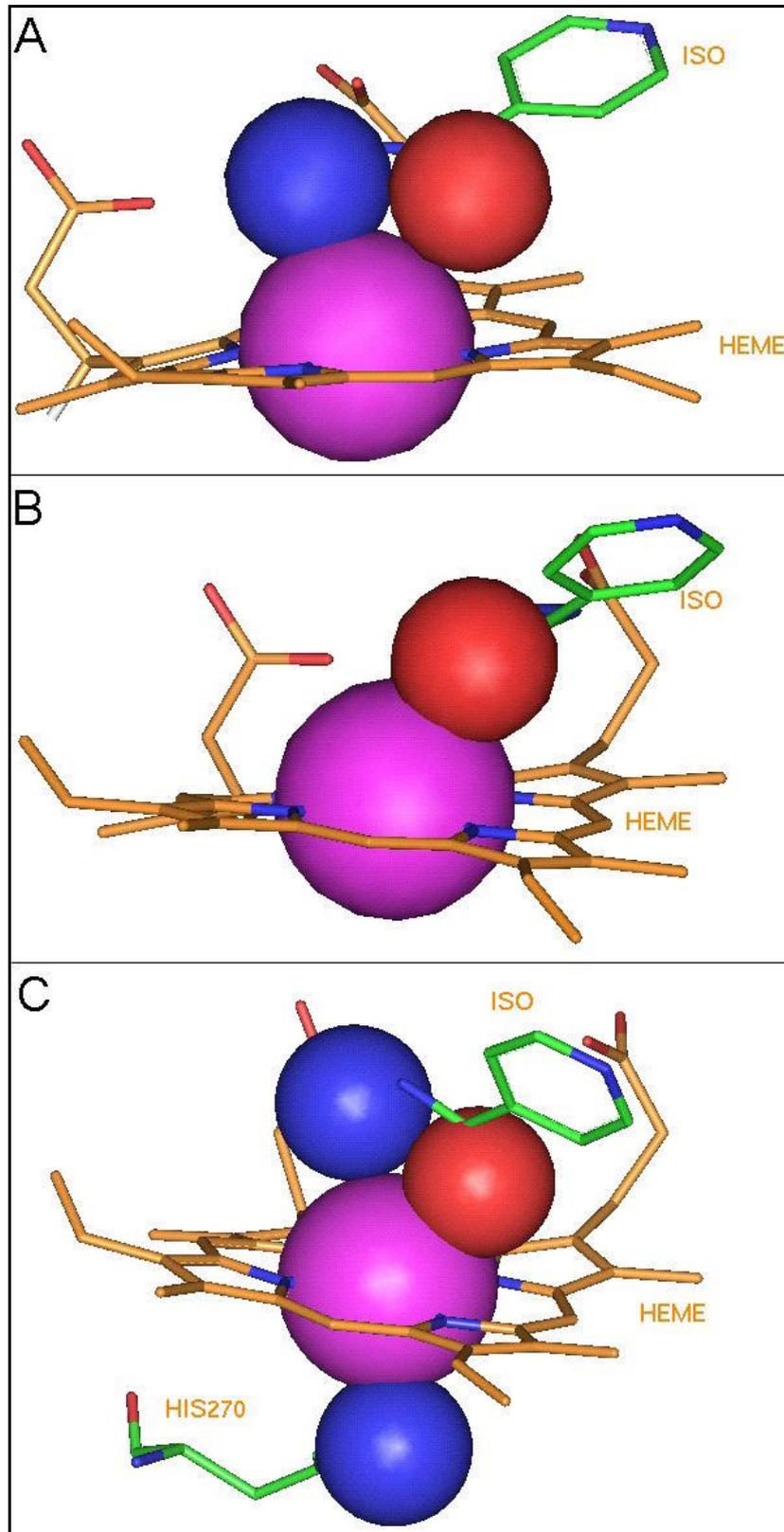
- No modelo 2, a interação formada entre o oxigênio da carbonila do INH e o ferro da protoporfirina parece indicar uma propensão a facilitar a oxidação da isoniazida pela protoporfirina (Figura 5.9a). O ferro possui carga formal de 2+ e carga parcial de +1.28. O oxigênio do INH possui a carga mais negativa dentre os grupos ligantes do INH (carga parcial = -0.54), valor este seguido por N<sub>piridínico</sub> (-0.48), N<sub>amina</sub> (-0.46) e N<sub>amida</sub> (-0.27). Uma distribuição similar destas cargas foi obtida para os modelos 4 e 6. Para os outros modelos, a carga parcial sobre o ferro decresceu para +0.20.

- No modelo 4, há uma interação entre o oxigênio da isoniazida e o ferro da protoporfirina, como no modelo anterior, este modelo posicional pode facilitar a interação da isoniazida no sítio ativo, de modo que possa haver a transformação da isoniazida na sua forma ativa.

- No modelo 6, há duas interações entre dois nitrogênios da protoporfirina e o oxigênio do INH. Como esta é uma pró-droga que sofre oxidação para se transformar na forma ativa, as interações deste modelo são interessantes e podem, também, significar uma facilidade para a oxidação da isoniazida pela protoporfirina;

**Figura 5-9:** Interações entre a isoniazida e o ferro da protoporfirina.

A) Modelo 2. B) Modelo 4. C) Modelo 6.



**Tabela 5-5:** Comparações por superposição entre seqüências de 20 aminoácidos da proteína cristalina e a otimizada após o docking.

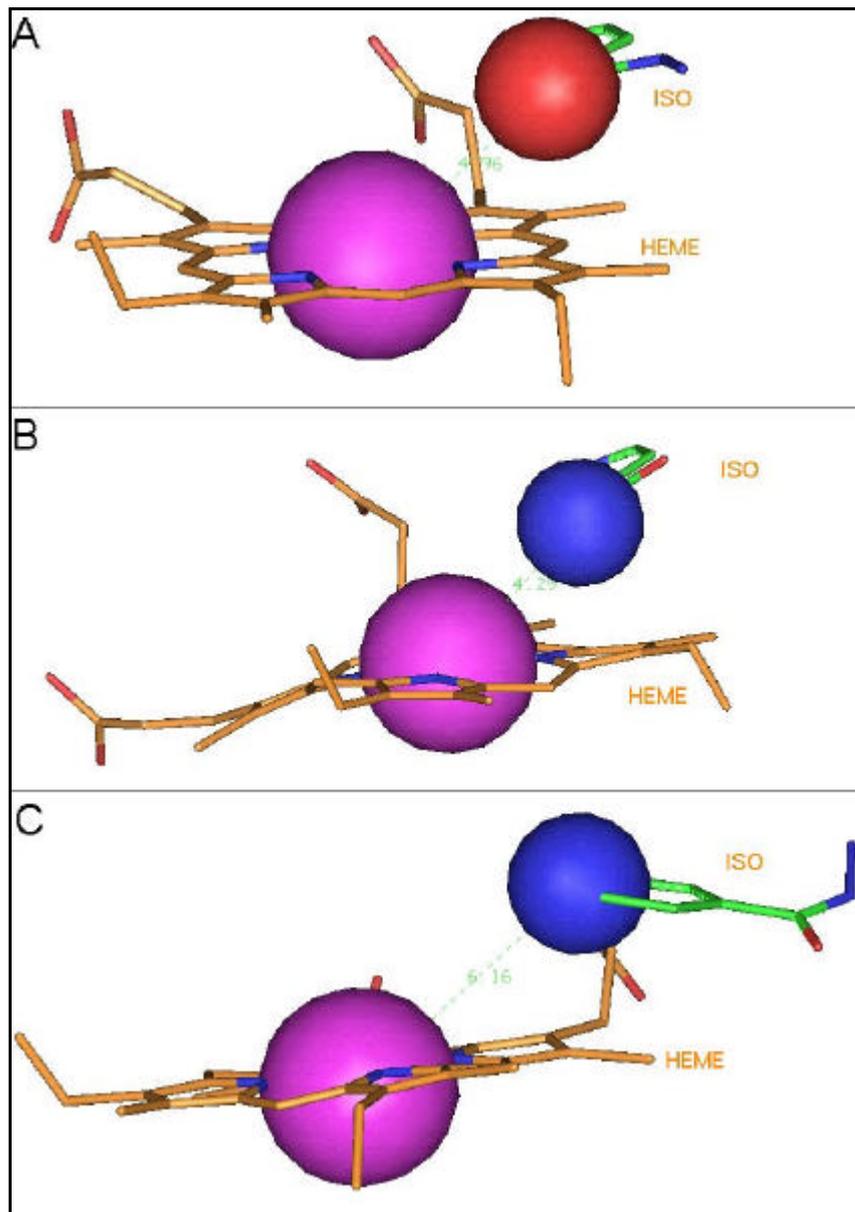
Seqüência de comparação entre a estrutura cristalina e a minimizada	Quantidade de átomos comparados	<i>Rmsd</i> (Todos os átomos, exceto os de hidrogênio)					
		<b>Ancoramento flexível</b>					
		<b>Modelos orientacionais</b>					
		1	2	3	4	5	6
Gly24-Asn44	346	2,05	2,13	2,63	2,31	2,63	2,13
Leu-45-Ala-65	312	1,21	1,21	1,33	1,39	1,35	1,21
Ala-66-Thr86	316	0,78	0,79	0,83	1,01	0,81	0,80
Ser87-Trp-107	368	0,91	0,93	1,16	0,92	1,18	0,96
His108-Arg128	296	0,82	0,84	0,93	1,34	1,01	0,88
Phe129-Trp149	350	0,82	0,84	1,23	1,46	1,23	0,79
Pro150-Asn170	334	0,94	0,95	0,84	0,64	0,84	0,96
CYSH171-Trp191	334	1,08	1,05	1,03	1,11	1,00	1,06
Glu192-Gly212	352	1,04	1,04	1,27	1,44	1,23	1,05
Lys213-GLU233	330	0,93	0,98	1,26	1,25	1,28	1,05
Gly234-Arg254	318	1,07	1,07	1,05	0,97	1,13	1,07
Met255-Thr275	298	0,75	1,04	0,81	1,30	0,81	1,04
His-276-Met296	290	1,06	1,01	1,05	1,11	1,06	1,01
Gly297-Ile317	288	0,91	0,92	1,41	1,64	1,42	0,91
Glu318-Gly338	356	0,95	1,05	1,05	0,99	1,00	1,08
Tyr339-Ala-359	336	1,15	1,13	1,14	1,30	1,13	1,13
Gly360-Thr380	278	1,31	1,37	1,70	1,43	1,68	1,35
Asp381-Pro401	376	0,97	1,01	0,96	1,07	0,96	0,99
Glu402-Pro422	354	1,02	1,03	1,04	0,93	0,97	1,04
Val423-Ser446	374	1,47	1,64	1,89	1,86	1,88	1,62
Gly24 -Ser446	5560	1,54	1,63	1,84	1,94	1,86	1,64

- nos modelos 1, 3 e 5, as distâncias de estabilização entre os átomos da isoniazida e o ferro da protoporfirina foram muito grandes, e estão listadas na tabela 5-6. Nestes casos, poderia haver necessidade de um outro ligante que pudesse estabilizar a interação entre o oxigênio da carbonila, ou o nitrogênio da amina, próxima ao átomo de Fe da protoporfirina, como, por exemplo, o ligante NO.

Na Figura 5-10 estão mostradas as interações entre a isoniazida e o ferro da protoporfirina dos modelos 1, 3, e 5. Os átomos de Fe da protoporfirina, N e O, da isoniazida, estão indicados em esferas plenas (CPK), onde o ferro aparece em

rosa, o oxigênio, em vermelho e o nitrogênio, em azul. As distâncias entre os átomos de ferro e nitrogênios, ou oxigênio, mais próximas da isoniazida variam entre 2,54 Å e 3,74 Å, respectivamente, e correspondem aos modelos 2, e 4. As distâncias do átomo de Fe para o átomo de nitrogênio intracíclico variam entre 5,21 e 7,09 Å (Tabela 5-6).

**Figura 5-10:** Distâncias entre o ferro da protoporfirina e a isoniazida. A) Modelo 1. b) Modelo 3. C) Modelo 5.



**Tabela 5-6:** Distâncias entre o ferro da protoporfirina e átomos específicos da isoniazida em cada modelo orientacional.

Modelo orientacional	Distância (Å)			
	Fe da protoporfirina para:			
	N (do NH <sub>2</sub> )	N (do NH)	O (do CO)	N (do ciclo piridina)
Modelo 1:	7,37	6,69	4,96	5,21
Modelo 2:	2,79	3,33	3,23	6,07
Modelo 3:	4,93	4,29	6,43	5,64
Modelo 4:	4,03	4,20	2,67	6,10
Modelo 5:	10,59	10,34	9,97	6,16
Modelo 6:	3,24	3,74	2,54	5,92

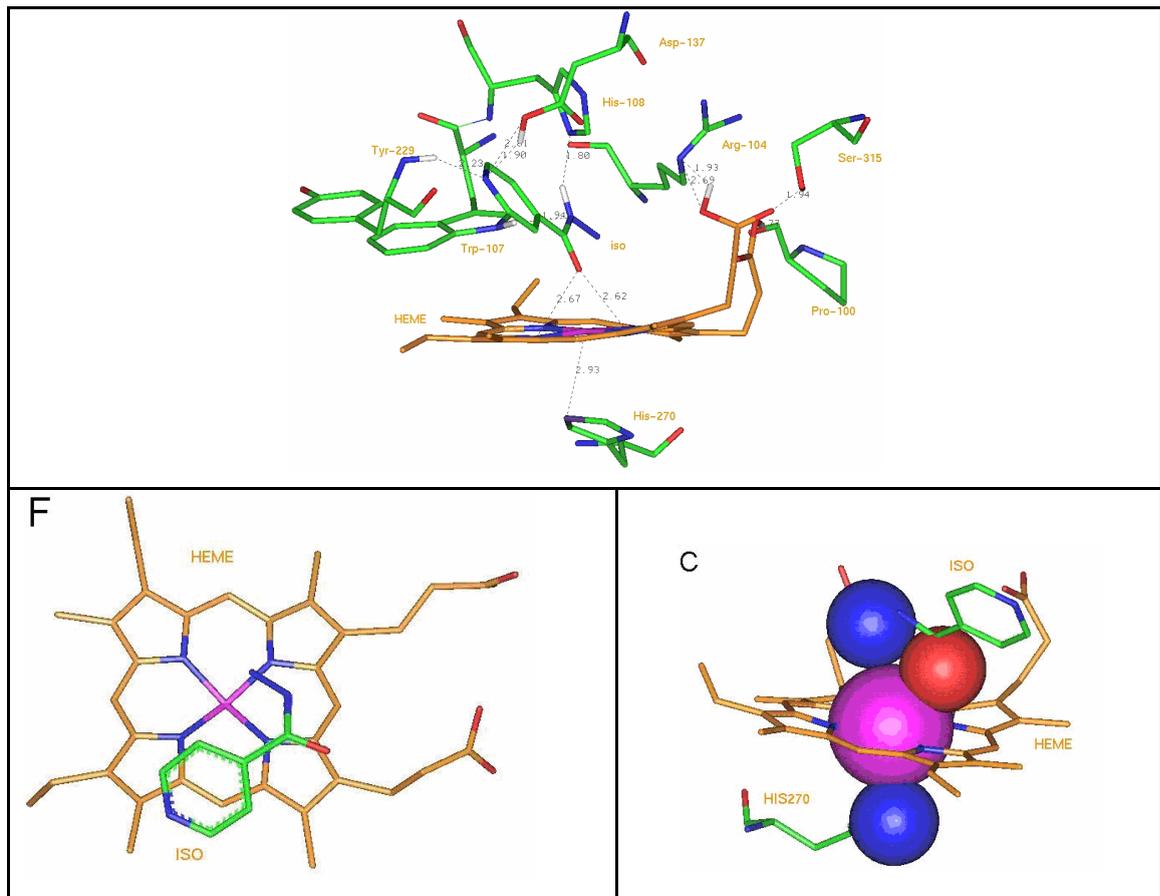
#### 5.4. Resumo

As energias totais correspondendo às diferentes orientações da isoniazida no sítio ativo apresentaram uma diferença máxima de 322 kcal.mol<sup>-1</sup>. Os menores valores de energia foram obtidos para os Modelos 2 e 6, sendo iguais a -20.232 e -20228 kcal.mol<sup>-1</sup>.

No modelo 2 a estabilização ocorre após formação de um conjunto de cinco (5) interações fortes. Quatro aminoácidos interagem fortemente: Pro-100, Arg-104, Trp-107, Tyr-229 e Ser-315.

O modelo 6 nos parece o mais coerente. A diferença de energia do complexo é negligenciável (3 kcal.mol<sup>-1</sup>) em relação ao modelo de número 2. No modelo 6 a estabilização ocorre após formação de um conjunto de onze (11) interações fortes. Oito aminoácidos interagem fortemente: Pro-100, Arg-104, Trp-107, His-108, Asp-137, Tyr-229, Ser-315 e His-270. As moléculas de água não interferiram na formação do complexo. Sete ligações hidrogênio contribuem para a estabilização da isoniazida. Há uma interação entre o ferro da protoporfirina e o nitrogênio da His-270.

Figura 5-11: Interações no modelo 6



Dois outros aminoácidos sempre mencionados em relação à porção proximal da proteína, o Trp-312 e o Asp-381, não nos parecem interferir no sítio ativo, a não ser para contribuir na estabilização do grupo heme. No entanto, as inferências da His-270 em relação de estabilização do sistema e formação de ligação com o Fe são bem evidentes. Em relação à porção distal, os aminoácidos Arg-104, Trp-107, His-108, Asp-137, Tyr-229 e Ser-315 estavam todos presentes neste modelo 6 e, em outros modelos, interagem através de ligações hidrogênio, ou não, dependendo das etapas de cálculo. No entanto, a importância destes aminoácidos não poderia passar despercebida, mesmo que não fossem freqüentemente citados em diversos trabalhos, publicados em periódicos científicos.

## Capítulo 6 O acoplamento entre *mtCP*, heme, INH e NO.

## 6.1. O óxido nítrico

Vamos agora introduzir, a nosso complexo formado por proteína, grupo heme, isoniazida e solvente, uma molécula de óxido nítrico (NO), pra verificar se há melhoria quanto à estabilização da isoniazida sobre a protoporfirina.

Oxigênio ou peróxidos nítricos ( $O_2$ , NO,  $NO_2$ , peróxinitritos =  $ONOO^-$ ) são adutos freqüentes para a estrutura heme. Através da inserção do óxido nítrico procura-se verificar se haverá aumento de estabilização da isoniazida sobre o ferro da protoporfirina e compreender se esta molécula é efetivamente um aduto que propicia a oxidação da isoniazida para o metabólico ativo.

Na literatura científica há várias propostas para as distâncias entre Fe e N e Fe-O. Em 2005, Silaghi-Dumitrescu<sup>(48)</sup> estudando a relação entre a protoporfirina, com FeII e FeIII e os compostos OH-O-N-O, O-O-N-O, N(O)-O-OH, N(O)-O-O e N(O)-O-OH, propôs, através de cálculos quânticos e quânticos semi-empíricos, as distâncias médias de:

$$\begin{array}{lll} 1.87 \text{ \AA, para Fe-O;} & & 1.84 \text{ \AA para Fe-N;} \\ 2.04 \text{ \AA para Fe-N}_{\text{His}} ; & 1.65 \text{ \AA para N-O;} & 1.20 \text{ \AA para N=O.} \end{array}$$

Seus cálculos em DFT permitiram verificar valores experimentais obtidos como produtos e/ou intermediários na decomposição de adutos heme-peróxinitritos. O trabalho foi efetuado tendo em vista as flavohemoglobinas, mas pode ser perfeitamente estendido para as *Mycobacteria tuberculosis*, no que se refere às interações His270, Heme e NO. Aparentemente, as flavohemoglobinas catalisam eficazmente a oxidação de NO através de  $O_2$ , para produzir nitrato.<sup>(49,50)</sup> Dumitrescu cita que o mais provável mecanismo para esta reação envolve ligação de NO e  $O_2$  no sítio ativo heme da flavohemoglobina, formalmente gerando o intermediário peroxinitrito.

---

48 – Silaghi-Dumitrescu, Radu. THEOCHEM, 722(2005)

49 – Mukai, et al. Journal of Biological Chemistry. 276(2001)

50 – Gardner, A.M., Gardner P.R.. Journal of Biological Chemistry. 277(2003)

## 6.2. Metodologia

O ancoramento da molécula de NO foi feito com o sistema *mtCP*:isoniazida já estabilizado, como relatado no capítulo 4. Naqueles modelos vimos que a isoniazida se distanciava do ferro da protoporfirina. Para os modelos 1, 3, 4 e 5 seria necessário que um outro ligante viesse a estabilizar a isoniazida próximo ao ferro e fizemos estudos parciais quanto às interações do óxido nítrico (NO): isoniazida: sítio ativo do *mtCP*.

Escolheu-se, para este cálculo, o modelo 1, também descrito por Bertrand, no qual o anel piridínico volta-se para os grupos carboxílicos da protoporfirina e o oxigênio da isoniazida volta-se para o ferro.

A molécula de NO foi introduzida manualmente e posicionada acima do átomo de ferro, minimizando-se os impedimentos estéricos dentro do sítio ativo através dos óculos para vista estereoscópica. Em seguida, o sistema foi submetido a otimização geométrica e energética, com o campo de forças ESFF.

Observamos, através dos cálculos feitos anteriormente, que a isoniazida parece ocupar uma posição relativamente deslocada do centro da protoporfirina. São os grupos carbonila, ou amina, que tendem a se aproximar do Fe e não o centro de massa do ciclo piridínico do INH. Deve haver motivos para justificar esta aproximação, e estes devem, a princípio, coincidir com a interpretação da literatura científica que pressupõe uma oxidação do INH para que este medicamento possa se transformar na molécula bioativa. Este processo poderia ocorrer através da contribuição de uma simples molécula de NO. Por esta razão, e devido aos resultados obtidos no capítulo anterior que foram nesta direção, procedemos a mais esta etapa de estudo.

O sistema molecular foi constituído por:

a) proteína

- Estrutura protéica
- protoporfirina
- três moléculas de glicol

b) isoniazida (já ancorada via docking);

- c) molécula de NO ancorada manualmente;
- d) solvente (H<sub>2</sub>O)

### 6.2.1. Etapas de otimização energética do ancoramento do NO.

Foram definidos conjuntos (*subsets*) do sistema acima:

- Heme – protoporfirina
- *backbone* – estrutura da proteína sem cadeias laterais
- *sidechains* – são as cadeias laterais da estrutura protéica
- isoniazida.
- solvente – são as moléculas de água envolvendo o complexo para reduzir sua flexibilidade, mantendo-o coeso.
- NO

Como a introdução do NO foi efetuada após estudo do ancoramento da isoniazida e todos os modelos estudados foram submetidos a processo de estabilização energética, as etapas iniciais de relaxamento foram descartadas. Por isso, a otimização energética com o NO foi feita em apenas duas fases, onde o sistema foi otimizado energeticamente para reposicionamento da molécula de NO com os *subsets* fixados, exceto aquele que constitui a molécula de NO. Em seguida, procedeu-se à otimização do sistema, sem nenhuma restrição à sua flexibilidade.

### 6.3. Resultados

Os valores das contribuições energéticas obtidos após a introdução da molécula NO ao sistema isoniazida-proteína continuam indicando que a principal força de interação é a eletrostática que, neste caso, foi de -25 218.3 kcal.mol<sup>-1</sup> (contra -25.093,4 kcal.mol<sup>-1</sup> para o modelo 1, capítulo 5), enquanto a energia potencial total atingiu o valor de -20 222.5 kcal.mol<sup>-1</sup> (contra os -20.087,4 kcal.mol<sup>-1</sup> do modelo1, capítulo 5) Em relação ao sistema sem a molécula de NO houve,

portanto, um decréscimo de energia, levando a uma maior estabilidade do sistema.

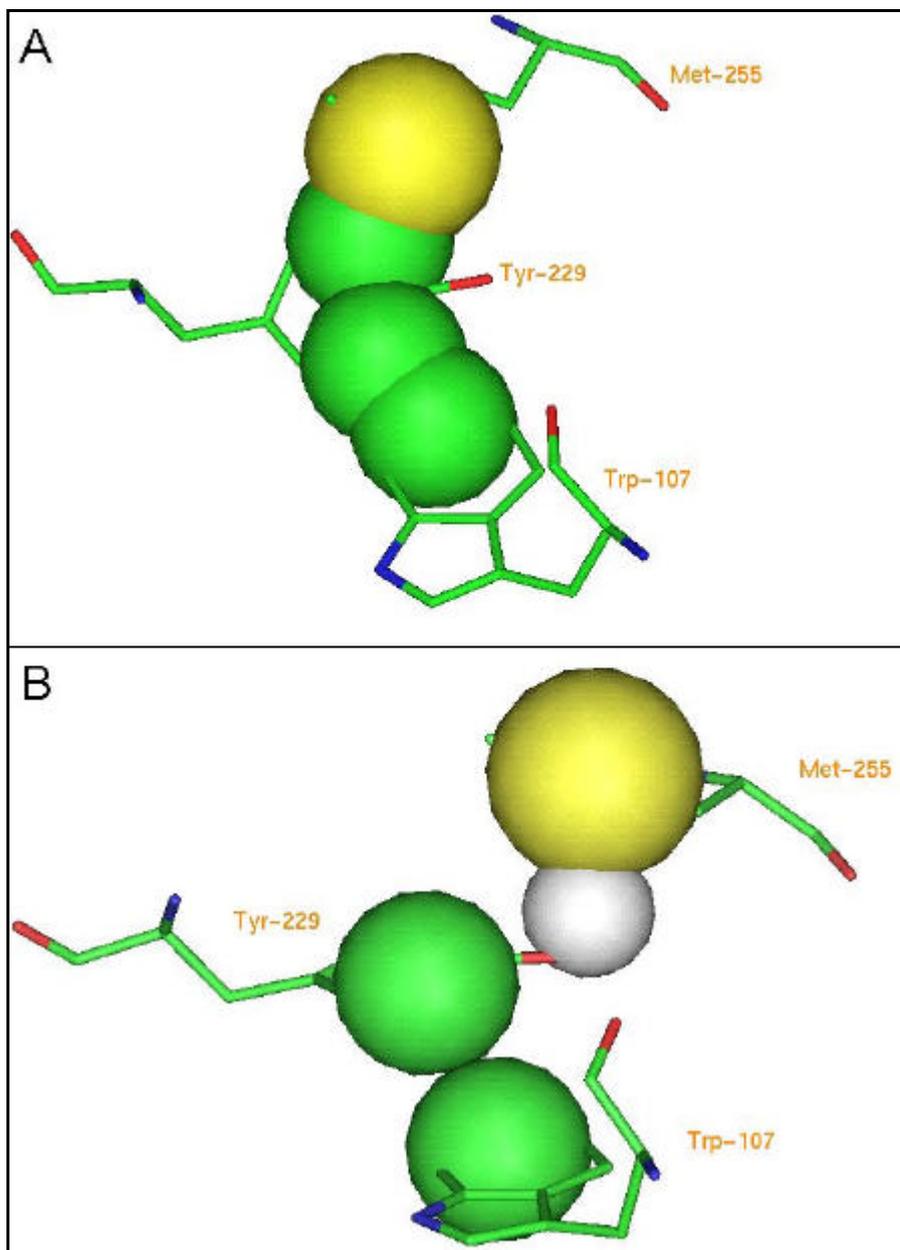
**Tabela 6-1:** Sumário das contribuições energéticas de cada termo da equação matemática do campo de força ESFF usado no processo de otimização de energia após o ancoramento do NO no modelo 1.

Etapa dois		
Contribuições energéticas	Inicial (kcal.mol <sup>-1</sup> )	Final (kcal.mol <sup>-1</sup> )
Energia potencial total	-20158.90	<b>-20222.54</b>
Energia interna	3081.69	3077.37
Deformações de ligações	410.02	397.07
Distorções ao plano	25.56	25.27
Interações não-ligadas	-23240.59	-23299.90
vdw	1913.63	1918.39
vdw repulsivas	23121.52	23139.81
vdw dispersivas	-21207.88	-21221.42
Eletrostáticas	-25154.23	<b>-25218.29</b>

A Figura 6.1A mostra a ligação feita entre os aminoácidos Tyr-229 e Trp-107, calculada após o docking do NO, onde o carbono (CE1) da tirosina faz ligação covalente com o carbono CH<sub>2</sub> do Trp-107.

A Figura 6.1B mostra as ligações formadas entre a Met-255 e a Tyr-229 onde o enxofre do primeiro faz ligação hidrogênio com o grupo HO do segundo aminoácido.

**Figura 6-1:** Ligações covalentes entre os aminoácidos Trp-107, Tyr-229 e Met-255 formando um aduto: A) na forma cristalina da proteína *mtCP*. B) na forma otimizada após *docking* da isoniazida e do NO.



O aduto na forma cristalina é apresentado nas figuras 6C e D. Há ligações covalentes formadas entre o (C2 do Trp-107 e o C1 da Tyr-229) e entre o (C2 da Tyr-229 e o enxofre da Met-255) resultando, assim, em um aduto não usual. No entanto, este aduto está presente em diversas CP's. Parece ser importante, pois a mutação destes aminoácidos resulta em uma forte diminuição da atividade catalítica do *mtCP*.

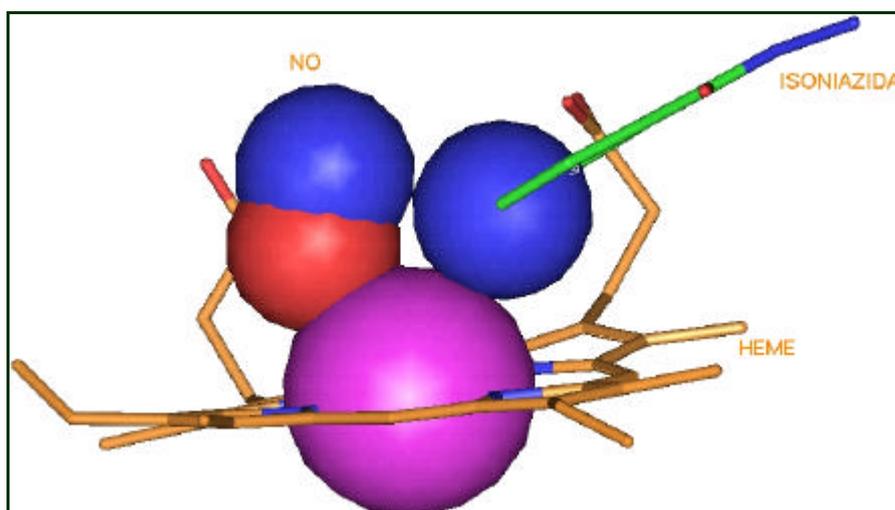
Cálculos foram efetuados em nosso laboratório para melhor compreender este aduto. Mas, como as ligações são covalentes, artifícios de cálculo foram necessários e os aminoácidos do aduto foram introduzidos no esqueleto protéico sob forma de aminoácidos especiais. <sup>(51)</sup>

Quando os cálculos foram efetuados sem as ligações covalentes, não houve alteração significativa nas suas disposições espaciais relativas destes três aminoácidos Trp-107, Tyr-229 e Met-255. A inserção da isoniazida não havia mudado significativamente as interações obtidas após processo de relaxamento.

Em seguida, já com o óxido nítrico complexado, houve, efetivamente, estabilização sobre o ferro da protoporfirina. Ao mesmo tempo, a isoniazida aproxima seu anel piridínico do  $Fe^{2+}$ . Sem a contribuição do NO, esta orientação não havia sido obtida nos modelos de *docking* analisados. Com a associação deste ligante, pequeno o suficiente para passar pela abertura da cavidade de recepção do *mtCP*, ou ter passado por possível canal constituído pela seqüência de aminoácidos [278-312] conforme indicado na literatura, parece que o NO efetivamente favorece a interação entre a isoniazida e  $Fe^{2+}$ .

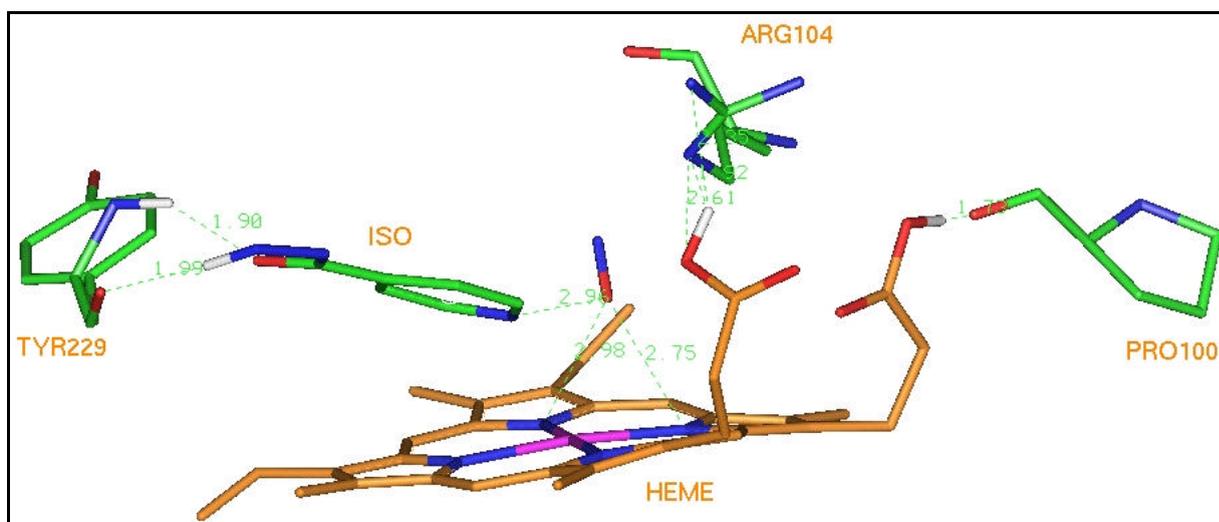
Na figura 6.3 são mostradas as ligações feitas entre o ferro e o oxigênio da molécula de NO e o N do anel piridínico da isoniazida. Os átomos de Ferro, de nitrogênio do anel piridínico do INH e aqueles do NO foram colocados em esferas plenas (CPK), para se visualizar as interações entre eles.

**Figura 6-2:** Interações entre o ferro da protoporfirina, o NO e a isoniazida.



Após otimização energética do complexo com NO verificou-se a existência de 9 interações fortes para a estabilização do sistema. Três aminoácidos participam das ligações hidrogênio: Pro-100, Arg-104 e Tyr-229. A isoniazida se estabiliza com 3 ligações hidrogênio: uma entre o átomo HN da Tyr-229 e a carbonila do INH ( $d_{\text{NH}\dots\text{O}} = 1,90\text{\AA}$ ), outra entre o HN do INH com o O da Tyr229 ( $d_{\text{NH}\dots\text{O}} = 1,99\text{\AA}$ ) e a terceira entre o N do anel piridínico do INH com o átomo O2 da molécula de NO ( $d_{\text{N}\dots\text{O}} = 2,96\text{\AA}$ ).

**Figura 6-3:** Ligações hidrogênio no sítio ativo do *mtCP* após inserção do NO.



O NO se estabiliza com a contribuição de três ligações hidrogênio, a primeira já citada acima, e duas outras com a protoporfirina, formadas entre o átomo O2 do NO e os átomos NC e ND deste grupo ( $d_{\text{O}\dots\text{N}} = 2,98\text{\AA}$  e  $2,75\text{\AA}$ ), respectivamente. Houve, ainda, quatro ligações hidrogênio entre a protoporfirina e os aminoácidos Arg-104 e Pro-100: entre o átomo NE da Arg-104 e o átomo O1A do grupo heme, e os átomos N1 e NH2 da Arg-104 com o átomo H2A do heme ( $d_{\text{N}\dots\text{O}} = 2,61\text{\AA}$ ,  $1,92\text{\AA}$  e  $2,35\text{\AA}$ ), respectivamente e, uma quarta ligação entre o átomo ND do heme e o átomo de O da Pro-100 ( $d_{\text{N}\dots\text{O}} = 1,73\text{\AA}$ ).

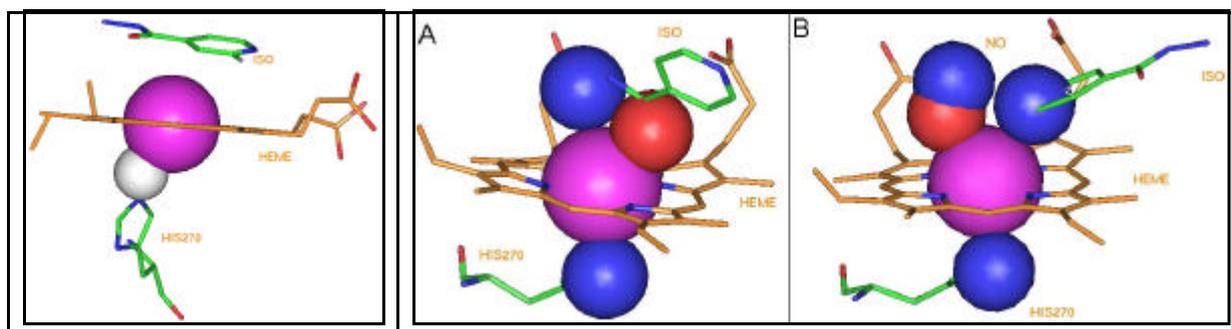
**Tabela 6-2:** As interações entre a protoporfirina e aminoácidos da proteína *mtCP*- última etapa de minimização após ancoramento do NO.

Etapa	Doador	Aceptor	Distância (?)	Ângulo(°)*
Etapa final	<i>mtCP</i> :Arg104:NE	Heme: O1A	2,61	110,76
	<i>mtCP</i> :Tyr229:HN	INH:O10	1,90	161,86
	INH:HN	<i>mtCP</i> :Tyr229:O	1,99	166,66
	INH:N3	NO:O2	2,96	59,82
	Heme: ND	<i>mtCP</i> :Pro100:O	1,73	157,34
	Heme: H2A	<i>mtCP</i> :Arg104:NH2	2,35	146,80
	Heme: H2A	<i>mtCP</i> :Arg104:N1	1,92	76,65
	Heme: NC	NO:O2	2,98	109,44
	Heme: ND	NO:O2	2,75	112,78

\* O ângulo de ligação foi medido entre os átomos da proteína e a seqüência de dois átomos da protoporfirina ou da isoniazida.

Quando há interação entre a molécula de NO, com o átomo de ferro do heme e o INH, ocorre alteração entre os átomos que participam da formação de ligações hidrogênio. A interação entre o hidrogênio do HN da His-270 com o Fe foi substituída pela interação com o próprio nitrogênio do HN (Figura 6-4). Quando não há interação do Fe<sup>2+</sup> com o INH, volta a se formar a ligação hidrogênio entre o Fe e o hidrogênio do HN da His-270.

**Figura 6-4:** Ligação hidrogênio entre o Fe da protoporfirina e o HN do aminoácido His-270. A) interação com o INH e o nitrogênio da His-270, no modelo 1 do capítulo 5. B) interação com o INH, NO e nitrogênio da His-270.



Estas considerações são pertinentes, pois a isoniazida, em sua forma ativa deve alterar a conformação da proteína *mtCP*, de modo a que esta proteína não mais desempenhe as suas funções normalmente, impedindo a produção ou

incorporação de ácido micólico quando a célula bacteriana está em fase de duplicação.

Houve uma mudança muito forte de posicionamento do INH. No modelo 1, a carbonila do INH se aproximava do Fe. Após introdução e estabilização do NO, a disposição espacial do INH foi totalmente alterada. O nitrogênio piridínico é aquele que interage com o Fe. A cadeia lateral do INH se direciona para o exterior do grupo heme. Como no modelo 5 do capítulo anterior.

#### 6.4. Comparação estrutural

Os valores transpostos para a Tabela 6.5 mostram os *rmsd* relativos à superposição entre a proteína cristalina e a estrutura obtida após o *docking* da molécula de NO. Observa-se que, em relação aos valores obtidos com o *docking* da isoniazida, os *rmsds* não mudaram significativamente.

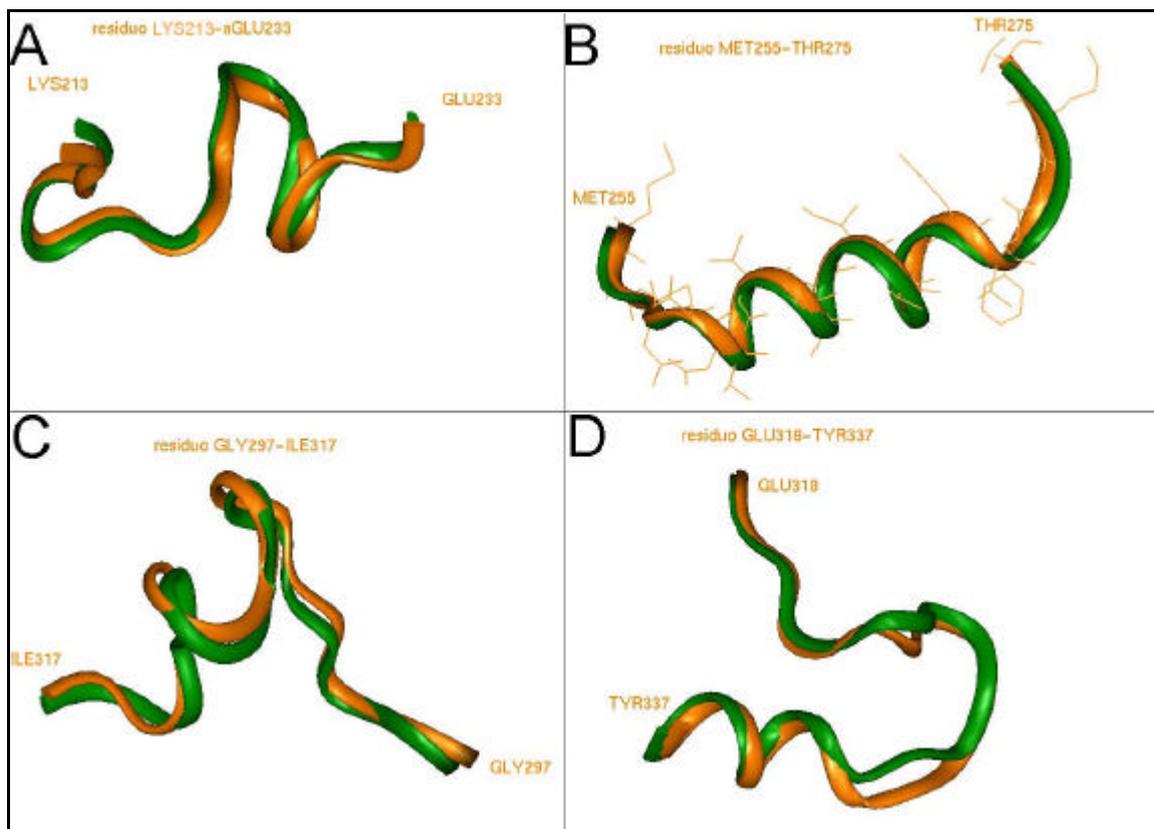
Comparando os *rmsds* de todos os átomos semi-pesados (*heavy atoms*), destacam-se as seqüências [Lys-213-Glu-233], com *rmsd* = 1,045Å, [Met-255-Thr-275], *rmsd* igual 0,982Å, [Gly-297-ILE-317], 0,917Å, [Glu-318-Tyr-337], 1,040Å e, ainda, [Phe-129-Trp-149], com *rmsd* igual a 0,796Å. A seqüência [Gly-297-ILE-317] foi a que mais alterou sua conformação, resultando em um alinhamento com mais alto valor de *rmsd*, quando os carbonos  $\alpha$  e aqueles da cadeia principal foram comparados (*rmsd* = 0,808; 0,917, respectivamente), enquanto a seqüência [Phe-129-Trp-149] (*rmsd* = 0,632; 0,796, respectivamente), apresentou a menor movimentação dentre todas as formas comparadas da proteína *mtCP*. Tais segmentos, independentemente do ligante colocado na cavidade do sítio ativo, são aqueles que possuem o menor e os maiores desvios.

**Tabela 6-3:** Comparações por superposição entre seqüências de 20 aminoácidos da proteína cristalina e a otimizada, após *docking* do NO.

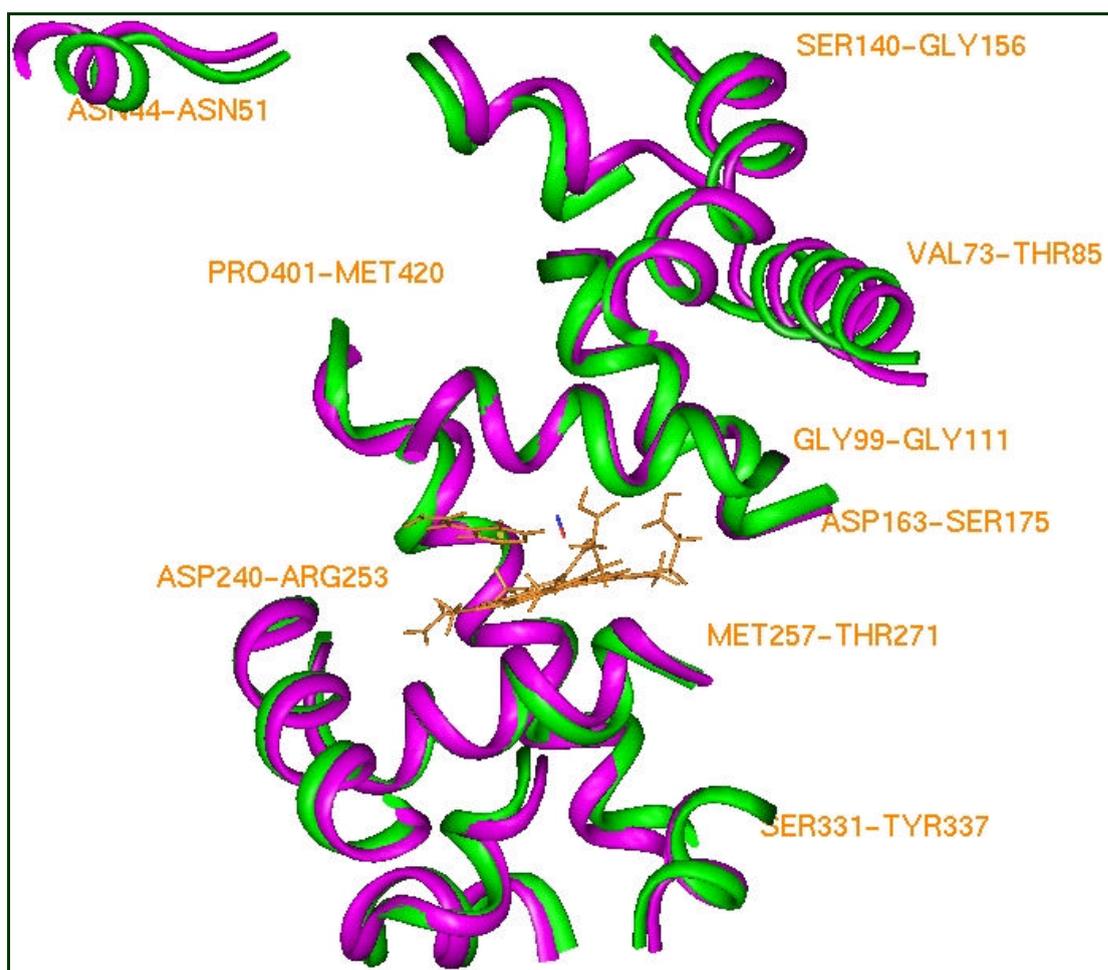
Porção de comparação entre a estrutura cristalina e a minimizada	<i>Rmsd</i> (Å) (quantidade de átomos)		
	Docking-NO		
	Cadeia principal	Carbonos $\alpha$	Todos os átomos, exceto os de hidrogênio
GLY24-ASN44	1,325(168)	1,350 (42)	2,129(346)
LEU45-ALA65	1,026(168)	1,060(42)	1,204(312)
ALA66-THR86	0,588(168)	0,602(42)	0,797(316)
SER87-TRP107	0,670(168)	0,654(42)	0,936(368)
HIS108-ARG128	0,680(168)	0,619(42)	0,863(296)
PHE129-TRP149	0,375(168)	0,332(42)	0,796(350)
Pro150-ASN170	0,550(168)	0,550(42)	0,961(334)
CYSH171-TRP191	0,707(168)	0,643(42)	1,047(334)
GLU192-GLY212	0,950(168)	0,930(42)	1,045(352)
LYS213-GLU233	0,787(168)	0,703(42)	1,045(330)
GLY234-ARG254	0,615(168)	0,596(42)	1,016(318)
Met255-THR275	0,874(168)	0,747(42)	0,982(298)
HIS276-Met296	0,694(168)	0,616(42)	1,001(290)
GLY297-ILE317	0,922(168)	0,808(42)	0,917(288)
GLU318-GLY338	0,761(168)	0,765(42)	1,040(356)
Tyr339-ALA359	0,743(168)	0,789(42)	1,135(336)
GLY360-THR380	1,092(168)	0,996(42)	1,354(278 )
ASP381-Pro401	0,583(168)	0,493(42)	1,000(376)
GLU402-Pro422	0,778(168)	0,722(42)	1,057(354)
Val423-SER446	1,243(168)	1,174(42)	1,579(374)
GLY24 -SER446	1,395( <b>5560</b> )	1,369	1,619

Tais resultados indicam as seqüências da proteína *mtCP* que estão mais propensas a sofrerem mudanças conformacionais. Isto significa que as estruturas secundárias foram mantidas após todas as minimizações energéticas às quais os complexos foram submetidos e se mantiveram semelhantes à forma cristalina. Algumas destas comparações estão reproduzidas na Figura 6.6.

**Figura 6-5:** Alinhamento de seqüências da proteína cristalina (verde) e otimizada após o docking do NO (laranja). A) [Lys-213-Glu-233]. B) [Met-255-Thr-275]. C) [Gly-297-Ile-317]. D) [Glu-318-Tyr-337].



A figura 6.7 mostra as hélices- $\alpha$  das seqüências [Asn-44-Asn-51], [Asp-63-Thr-70], [Val73-Thr-85], [Gly99-Gly111], [Ser-140-Gly-111], [Asp163-Ser175], [Asp240-Arg253], [Met-257-Thr-271], [Ser-331-Tyr-337], [Asp-381-Asp-387], [Pro-388-Arg-395], [Pro-401-Met-420] pertencentes à proteína *m*tCP. Em verde, na forma cristalina, e em rosa, após a otimização de energia com o NO. As hélices não se modificaram estruturalmente, o que comprova que a complexação não modifica significativamente o edifício protéico. As diferenças encontradas não comprometem a estrutura e, além disto, conduziram a uma redução de energia do sistema molecular.

**Figura 6-6:** -Hélices- $\alpha$  da proteína *mtCP* após acoplamento do NO.

O acoplamento com o ligante NO é promissor. Com toda certeza, muitos outros modelos deveriam ser estudados para que se pudesse chegar a uma conclusão mais consistente sobre o problema colocado. Todos os modelos descritos no capítulo anterior deveriam ser cuidadosamente analisados. Principalmente se considerarmos que nosso melhor modelo, o de número 6, continha quase todos os aminoácidos mencionados na literatura como podendo pertencer ao sítio ativo do *mtCP*. Seria essencial introduzir o NO, e outros ligantes, no complexo obtido para o modelo 6 e compará-lo com o que já temos. Estas etapas deverão ficar para um futuro próximo.

## Capítulo 7 Conclusões

## 7.1. Conclusões

Esta tese foi desenvolvida com o intuito de se tentar obter informações precisas sobre os modos de interação da isoniazida na cavidade receptora do *mCP*, o *Mycobacterium tuberculosis*, Catalase-Peroxidase, agente causador da tuberculose humana, cuja estrutura cristalina havia sido determinada pouco antes do início deste trabalho.

Nosso estudo computacional teve início pela definição da estratégia de cálculo a se seguir e pelos testes que foram necessários para se definir o melhor campo de forças para tratar da questão relativa ao Fe da protoporfirina, cofator cristalizado junto com a proteína *mCP*.

A utilização do campo de força ESFF mostrou-se o melhor adaptado, pois outros campos de força, como o CVFF, Amber e CFF91, nas versões existentes em nosso laboratório, demonstraram não ser capazes de manter uma estrutura razoável para a protoporfirina. Este fato inviabilizaria qualquer cálculo subsequente, em tudo o que se refere ao posicionamento de um ligante sobre o grupo heme, onde se situa a cavidade de recepção da proteína em questão. O campo de força ESFF tem bons parâmetros para estruturas envolvendo Fe, em suas mais diversas coordenações, assim como para o  $\text{Fe}^{1+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ .e  $\text{Fe}^{3+}$ . O grupo heme pode ser, por isto, incluso livremente nos cálculos, sem apresentar fortes distorções à sua planaridade. Sua carga formal determinada por diversos cálculos quânticos (que não fizeram objeto desta dissertação) mostrou ser 2+.

Em seguida, efetuamos os testes para definir o caminho através do qual a proteína, em sua forma cristalina, deveria ser tratada por mecânica molecular, de forma a que sua conformação inicial sofresse o menor desvio possível, quando submetida a cálculos sob ausência total de restrições à sua flexibilidade conformacional. Esta estratégia foi definida, os cálculos são bastante longos e foram feitos de forma criteriosa. Esta etapa de cálculos foi relatada nesta dissertação como “Processo de Relaxamento”.

A otimização energética foi feita por dois processos diferentes para que fosse possível entender, com embasamento prático, a interferência da constante dielétrica ( $\epsilon$ ) nas simulações por mecânica molecular. Estes processos de otimização energética foram estudados sob constante dielétrica 1,0 e 4,0, com a presença explícita das moléculas do solvente água. O conjunto de resultados não nos permitiu determinar exatamente qual seria o melhor valor, pois foram bastante similares. Nos dois casos houve praticamente as mesmas interações entre a hemeporfirina e os aminoácidos que compõem o hipotético sítio ativo da proteína *mtCP*. A protoporfirina teve as mesmas distorções em ambos os casos. Não houve grandes variações conformacionais provenientes do uso de constantes dielétricas 1,0 e 4,0 após as minimizações energéticas.

No entanto, quando as moléculas de água foram retiradas e um alto valor de dielétrico, o de 80, pretendeu substituir o efeito solvente, os resultados foram definitivamente ruins. Os cálculos de potenciais eletrostáticos pelo método de Poisson-Boltzmann (o qual permite a atribuição de uma constante dielétrica para o soluto (1,0 e 4,0) e outra para o solvente (80) nos ajudaram a definir que continuaríamos a efetuar os cálculos de acoplamento, a partir dos resultados provenientes do processo de relaxamento obtidos com o valor da constante dielétrica como 1,0. Definimos, também claramente, que as moléculas de solvente deveriam continuar a fazer parte dos sistemas moleculares sob análise.

O protocolo definido para o relaxamento de coordenadas cristalinas mostrou-se coerente e suficiente. O edifício estrutural de origem foi mantido, após estabilização e convergência dos sistemas estudados. Apesar do tempo inicial necessário para o estudo do relaxamento, pensemos que, uma vez realizado o processo, a estrutura servirá para todos os estudos subseqüentes. Caso este processo seja mal conduzido, nada fará com que os estudos de docking conduzam a resultados confiáveis.

Quando a molécula de isoniazida foi introduzida na cavidade de recepção do *mtCP*, através do processo de acoplamento rígido, fortes ligações hidrogênio foram formadas entre os resíduos Arg-104, Trp-107, Tyr-229, Val-230, His-270 e His-276. Isto indica que estes aminoácidos fariam parte do sítio ativo. Oito

ligações hidrogênio contribuíram fortemente para a estabilização do sistema. Dentre estes seis aminoácidos que participaram das interações, as ligações formadas entre a isoniazida, o grupo heme e os resíduos Arg-104, Trp-107, Val-230 e His-270 se mostraram muito estáveis.

Os cálculos para o acoplamento flexível da isoniazida no sítio ativo da proteína *mtCP* foram realizados, através do programa Affinity. Vinte (20) modelos correspondendo às orientações permitidas para o INH foram cuidadosamente analisados. Destes, cinco modelos promissores resultaram. A estes agregamos um modelo obtido manualmente, representando o momento da entrada da isoniazida no sítio ativo. Trabalhamos, portanto, com seis modelos de orientação, com energias potenciais totais diferindo de um máximo de 322 kcal.mol<sup>-1</sup>, sobre mais de 9000 átomos. Através de vários critérios de análise eliminamos quatro deles. Os melhores, modelos 2 e 6, resultaram em estabilizações de sistemas com interações bastante coerentes. Os valores de energia, ao se atingir a convergência sob gradiente, foram -20 232 e -20 228 kcal.mol<sup>-1</sup>, respectivamente. A diferença de energia entre eles é, portanto, negligenciável (3 kcal.mol<sup>-1</sup>).

No modelo 2 a estabilização ocorreu após formação de um conjunto de cinco (5) interações fortes. Quatro aminoácidos interagiram fortemente: Pro-100, Arg-104, Trp-107, Tyr-229 e Ser-315.

O modelo 6 nos pareceu o mais coerente e um excelente modelo orientativo. Houve forte estabilização do complexo devido à contribuição de oito aminoácidos que interagem via ligações hidrogênio: Pro-100, Arg-104, Trp-107, His-108, Asp-137, Tyr-229, His-270 e Ser-315. Estes aminoácidos devem, portanto, compor o sítio ativo que deveria ser proposto através deste nosso estudo. Das onze ligações hidrogênio formadas, sete contribuíram para a estabilização da isoniazida no complexo. A His-270 e a Ser-315, peças-chave em qualquer tentativa de se interpretar o modo de ação de fármacos frente às *mycobacteria tuberculosis*, participaram da estabilização do modelo. A His-270 interage fortemente com o Fe do grupo heme, como esperado. As moléculas de água que, evidentemente, puderam interferir em vários dos modelos estudados,

não interferiram nas ligações principais, no Modelo 6. Além destas, duas ligações hidrogênio foram formadas entre os átomos NA e NB da protoporfirina e o oxigênio O10 da isoniazida.

Dois outros aminoácidos sempre mencionados em relação à porção proximal da proteína, o Trp-312 e o Asp-381, não nos parecem interferir no sítio ativo, a não ser para contribuir na estabilização do grupo heme.

Em relação à porção distal, os aminoácidos Arg-104, Trp-107, His-108, Asp-137, Tyr-229 e Ser-315 estavam todos presentes neste modelo 6 e, em outros modelos, interagem através de ligações hidrogênio, ou não, dependendo das etapas de cálculo.

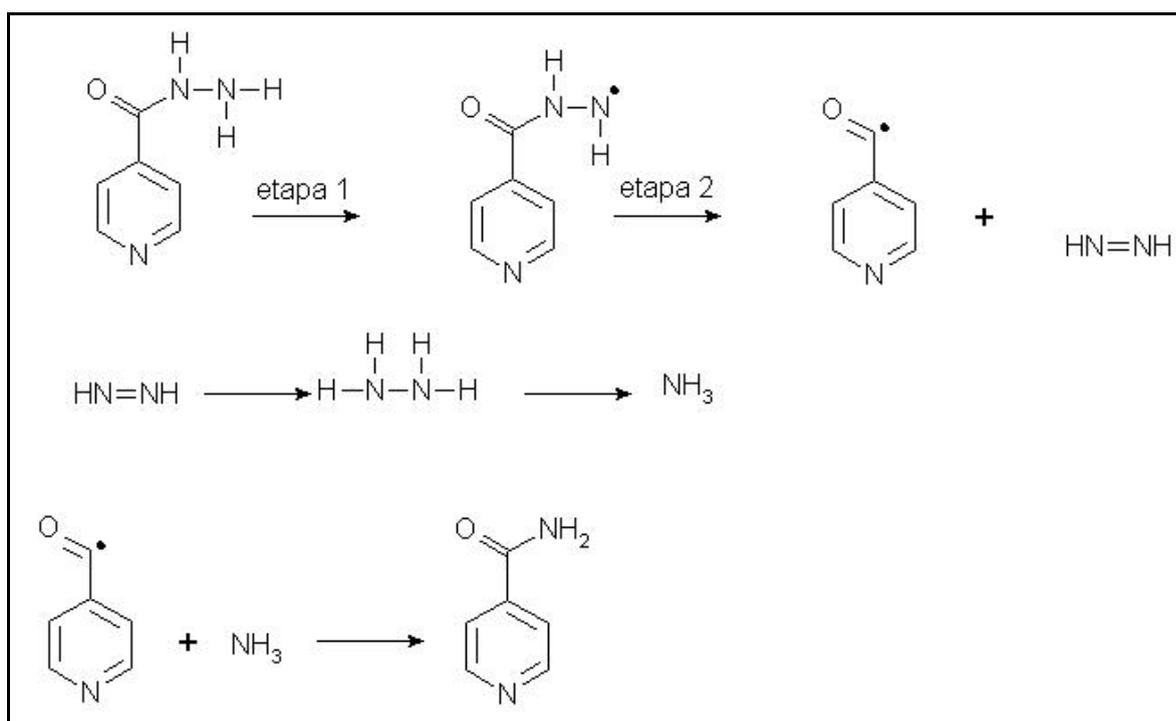
A publicação de Bertrand, na qual a estrutura do *mtCP* foi descrita, sugere um posicionamento da isoniazida com o anel piridínico voltado para o grupo carboxila da hemeoporfirina e o oxigênio da carbonila do INH voltado em direção ao ferro da hemeoporfirina.

No entanto, otimizações energéticas deste modelo indicaram que a isoniazida se distancia demasiadamente do ferro da hemeoporfirina para haver uma interação entre esta e a hemeoporfirina que levasse a uma oxidação da isoniazida. Este resultado nos levou a querer verificar que, ou o modelo orientacional poderia ser outro, ou que co-fatores, como o óxido nítrico poderia, efetivamente, contribuir para a estabilização da isoniazida próximo ao ferro da hemeoporfirina. Há vários trabalhos publicados sobre pequenos cofatores, NO, NO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, etc, mas não há, ao nosso conhecimento, cálculos teóricos publicados com a isoniazida, o NO, e o *mtCP*.

Há na literatura resultados mostrando que o ferro de hemoglobina interage com moléculas do tipo do NO. O ferro da hemoglobina sofre uma oxidação passando de Fe<sup>2+</sup> para Fe<sup>3+</sup>. Pode-se supor que esta oxidação inicial do ferro seja o início, também, do processo de oxidação da isoniazida. Resultados<sup>(53)</sup> mostram

que a oxidação da isoniazida pode ser feita em duas etapas. A primeira formando uma radical acila com a saída do grupo hidrazínico. Este, por sua vez, irá formar o  $\text{NH}_3$  que reage novamente com o radical acila e forma a isonicotinamida ( $\text{C}_5\text{H}_8\text{N}_2$ ) (metabólito ativo da isoniazida). Nesta transformação os intermediários são estabilizados por interações com o grupo oxiferril, e com os aminoácidos Trp-107, Asp-137(Piarattelli).<sup>(52)</sup>

**Figura 7-1: Mecanismo de oxidação da isoniazida(Piarattelli)<sup>52</sup>**



Nos indagamos, baseados no mecanismo acima, quanto à possibilidade de haver uma interação entre o ferro da hemeporfirina e o grupo hidrazínico da isoniazida, sem a necessidade de outros cofatores, excetuando-se o co-fator heme. Esta hipótese foi levantada devido à obtenção do modelo orientativo 6, onde a isoniazida se posiciona de forma que o grupo hidrazínico e o oxigênio da carbonila da isoniazida interagiram com o ferro da hemeporfirina, sem a presença de um cofator como uma molécula de NO. A metabolização da isoniazida poderia não precisar de um cofator para a produção do oxiferril. Haveria, então, a possibilidade do oxigênio da isoniazida formar o grupo oxiferril com o ferro da hemeporfirina, formando um aduto entre ele. Após formação deste aduto haveria uma transferência de elétrons para o ferro da hemeporfirina, seguida de perda de um próton do grupo hidrazínico para a His-108. A perda deste próton causaria a

separação do grupo hidrazínico da isoniazida formando um radical acila, e o diazeno. A transformação do diazeno em hidrazina e amônia poderia se dar pela desprotonação das cadeias laterais da His-108 e Asp-137. A amônia formada poderia, então, ser reorientada e reagir com o grupo acila formando a isonicotinamida.

**Figura 7-2: Mecanismo de reação da oxidação da isoniazida.**

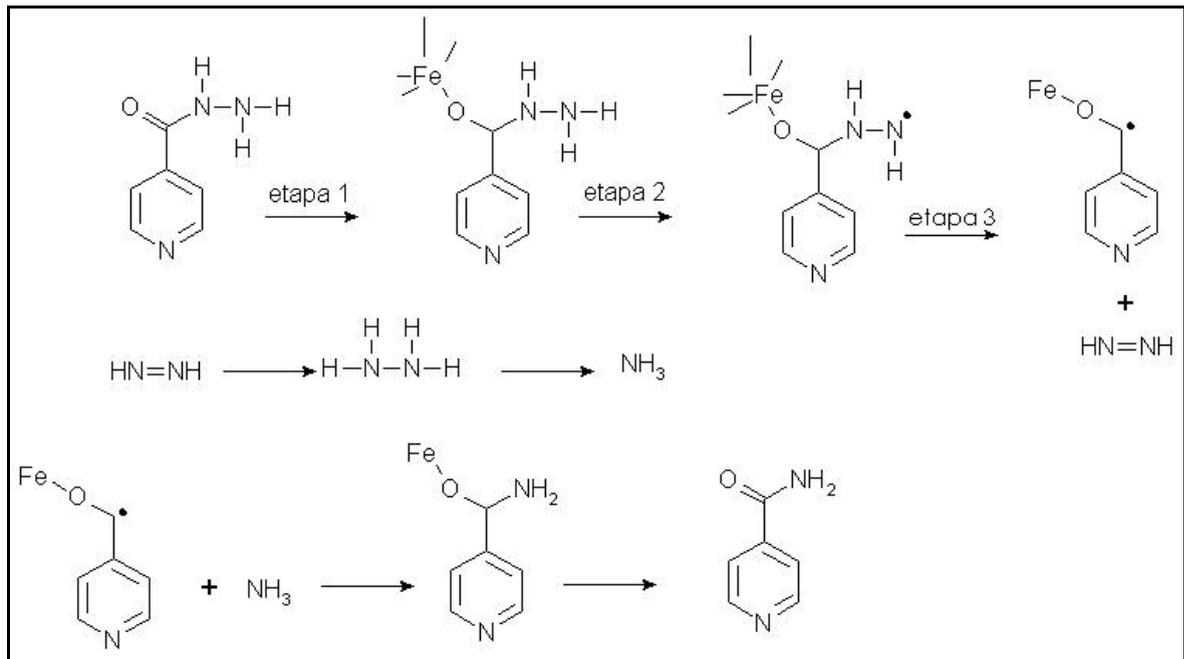
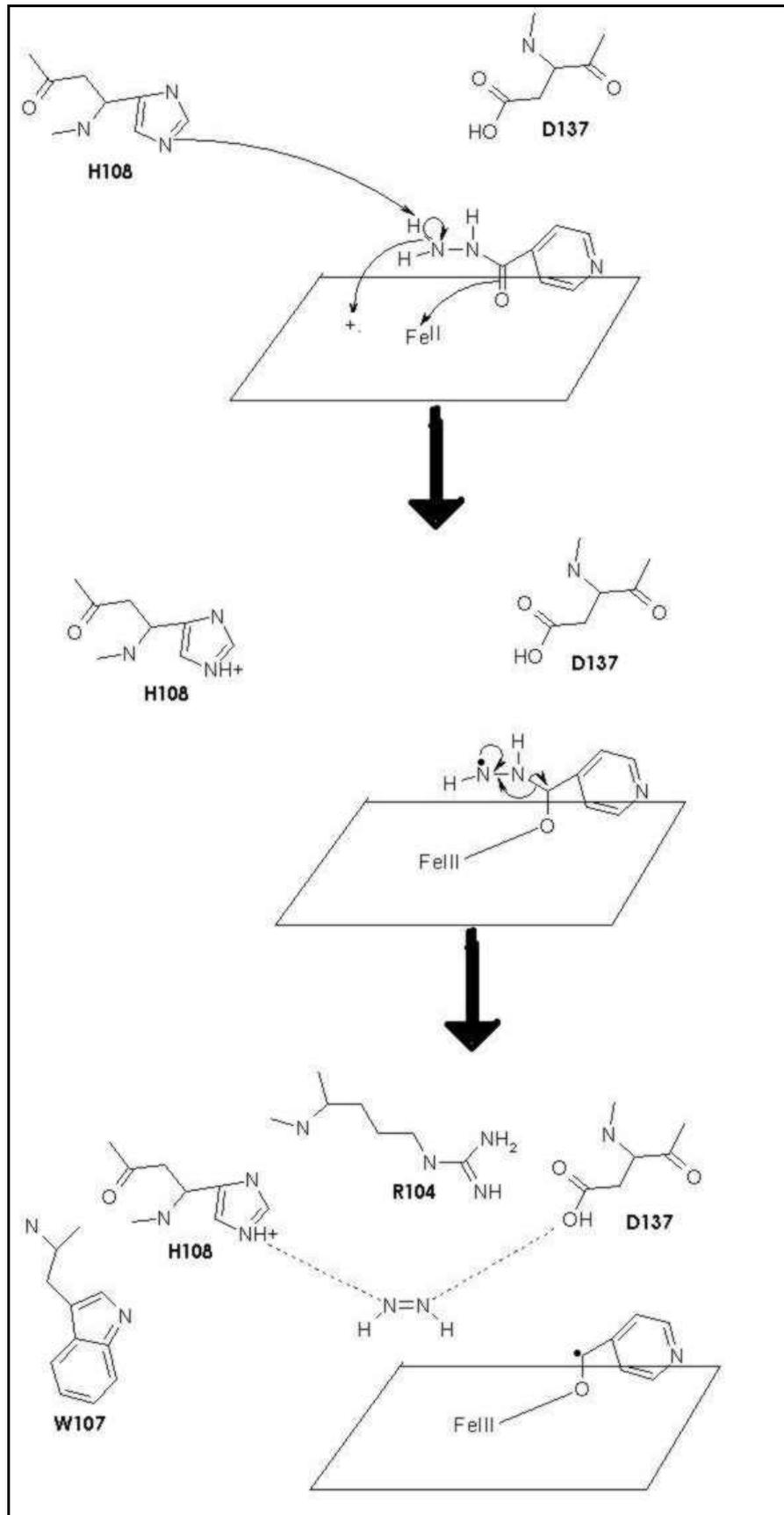


Figura 7-3: Mecanismo de oxidação da isoniazida em um potencial sítio ativo da proteína *mtCP*



Quando se inseriu a molécula de NO no sítio ativo da proteína, verificou-se que o NO estabilizava a isoniazida próxima ao ferro da protoporfirina. O nitrogênio piridínico da isoniazida, o NO e o ferro da hemeoporfirina formariam um aduto. Esta possibilidade já é descrita na literatura, como uma forma de haver uma alteração na carga do ferro da hemeoporfirina, passando de  $\text{Fe}^{2+}$  para  $\text{Fe}^{3+}$ . O ferro III pode fazer com que a isoniazida sofra uma oxidação e se transforme em um metabólito ativo. Um mecanismo similar usando radical já foi proposto.<sup>(53)</sup> Nele, a interação da isoniazida com o heme faz com que se forme um radical acila. Este radical interagiria com o  $\text{NH}_3$  formando a nicotinamida, com um cofator associado a tal transformação. Alguns aminoácidos, como o Trp-107 e a His-108, funcionariam como receptor e doador de prótons.

O acoplamento efetuado com a inclusão do ligante NO mostrou-se promissor. Muitos outros modelos deveriam ser estudados para que se pudesse chegar a uma conclusão mais consistente sobre o problema colocado. Seria necessário introduzir o ligante NO em nosso melhor modelo, o de número 6. Seria, também, essencial introduzir outros ligantes passíveis de oxidarem o  $\text{Fe}^{2+}$  para  $\text{Fe}^{3+}$ , como  $\text{O}_2$ , nos melhores modelos e comparar todos os resultados. Estas etapas deverão ficar para um futuro próximo.

## Capítulo 8 Referências bibliográficas

## 8.1. Referências bibliográficas

1. CUNHA, E.F.F., RAMALHO, T. C., MAIA, E.R., DE ALENCASTRO, R.B.. The search for new DHFR inhibitors: a review of patents - January 2001-February 2005. **Expert Opin.Ther. Patents**, 15(8), xxx, 2005.
2. CUNHA, E.F.F., RAMALHO, T. C., MAIA, E.R., DE ALENCASTRO, R.B. **Journal BioMol. Struct. Dyn.**, 22:2, 2004
3. FONTES, Elaine Ferreira Cunha. **Interações entre Derivados de Diazopteridinas, Dihidrofolate Reductase Humana e *Mycobacterium Tuberculosis*: Desenhando Novos Fármacos**. 2002. Dissertação( Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Orientação Ricardo Bicca de Alencastro e co-orientação Elaine Rose Maia, 2002.
4. DYE, Christopher , Dye, Christopher, Espinal, Marcos A., Watt, Catherine J., Mbiaga, Cyrille and Williams, Brian G.. Worldwide Incidence of Multidrug-Resistant Tuberculosis. **The Journal of Infectious Diseases**. USA, 185, 1197-1202. 2002.
5. *Tuberculosis*. [www.who.int/tb/wtbd2005](http://www.who.int/tb/wtbd2005), acessado em 18 de maio de 2005.
6. Gilman, Alfred, Gilman, Alfred Goodman; Goodman, Louis S. **Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 10<sup>a</sup> ed., Editora McGraW Hill, USA, 2002, Chapter 48. Disponível em: [www.accessmedicine.com](http://www.accessmedicine.com). Acessado em 20 de junho de 2005.
7. CURRY, Francis J.. **Drug Resistant Tuberculosis**. A survival guide for Clinicians, National Tuberculosis Center, **2004**.
8. BASS, J.B., et all. Treatment of tuberculosis and tuberculosis infections in adults and children., **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, American Thoracic Society and The Centers for Disease Control and Prevention, 149:1359–1374,1994.
9. ISEMAN, M.D. Treatment of multidrug-resistant tuberculosis. **N. Engl. J. Med.**, 329:784–791 and 1435, 1993.

10. Kasper, Dennis L.; Fauci, Anthony S.; Braunwald, Eugene; Isselbacher, Kurt J.; Wilson, Jean D.; Martin, Joseph B. **Harrison's Online**: Featuring the complete contents of Harrison's Principles of Internal Medicine, 16th Edition. McGraw-Hill Companies. USA, 2004-2005, Chapter 150. tuberculosis Disponível em: [www.accessmedicine.com](http://www.accessmedicine.com). Acessado em 20 de junho de 2005.
11. FOX, H.H. The chemical attack on tuberculosis. **Trans. N.Y. Acad. Sci.**, , 15:234–242. **1953**
12. BLANCHARD, J.S. Molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Annu. Rev. Biochem.**, 65:215–239, **1996**.
13. BANERJEE A., Quemard, V Balasubramanian, KS Um, T Wilson, D Collins, G de Lisle, and WR Jacobs Jr. InhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, , 263:227–230, 1994.
14. KAPETANAKI, Sofia M., CHOUCANE, Salem, SHENGWEI, YU, XIANGBO, ZHAO, MAGLIOZZO, Richard S., SCHELVIS, Johannes P. M.. *Mycobacterium tuberculosis* KatG (S315T) Catalase-Peroxidase Retains All Active Site Properties for Proper Catalytic Function. **Biochemistry**, 44 (1), 243 -252, 2005.
15. ASHOK R.; AWDHESH, K.; NISHAT, A.. Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Molecular Perspectives. **Emerging Infectious Disease**, 1998, 4:2
16. BERTRAND, Thomas, Eady, Nigel A. J., Jones, Jamie N., Nagy, Judit M., Jamart-Gregoire, Brigitte, Raven, Emma Lloyd and Brown, Katherine. A Crystal Structure of *Mycobacterium tuberculosis* Catalase-Peroxidase, **J. Biol. Chem.**, **279**: 37, 38991-38999, 2004. ([www.jbc.org](http://www.jbc.org) , acessado em 15 de julho de 2005).
17. GANDE, Roland, Gibson, Kevin J. C. Brown, Alistair, K. Krumbach, Karin, Dover, Lynn G. Sahm, Hermann, Shioyama, Susumu, Oikawa, Tadao Besra, Gurdyal S., and Eggeling, Lothar AcylCoA Carboxylases (accD2 and accD3), Together with a Unique Polyketide Synthase (Cg-pks), Are Key to Mycolic Acid Biosynthesis in *Corynebacteriaceae* Such as

- Corynebacterium glutamicum* and *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Biol. Chem.**, 279: 43, 44847-44857, 22, 2004.
18. VILCHEZE, C., Morbidoni, Hector R., Weisbrod, Torin R., Iwamoto, Hiroyuki, Kuo, Mack, Sacchettini, James C. and Jacobs, William R. Jr. Inactivation of the inhA-encoded fatty acid synthase II (FASII) enoyl-acyl carrier protein reductase induces accumulation of the FASII end products and cell lysis of *Mycobacterium smegmatis*. **Journal of Bacteriology**.182, 4059-4067,julho 2000.
  19. FLOSS, Heinz G.; YU, Tin-Wein. Rifamycin-Mode of Action, Resistance, and Biosynthesis. **Chem. Rev.**, 105 (2), 621 -632, 2005.
  20. SHINGADIA, Delane; NOVELLI, Vas. Diagnosis and treatment of tuberculosis in children the lancet. **Infectious Diseases**, 2003, 3:10, 624-632.
  21. BHAKTA, Sanjib, et al, Arylamine N-Acetyltransferase is Required for Synthesis of Mycolic Acids and Complex Lipids in *Mycobacterium bovis* BCG and Represents a Novel Drug Target. **JEM**, 199:9, 1191-1199,2004.
  22. Yamada, Y., Fujiwara, T., Sato, T., Igarashi, N. e Tamaka, N. **Nat. Struct. Biol.**, 4, 1032-1038(2002).
  23. Ghiladi, R. A., Cabelli, D. E., and Ortiz De Montellano, P. R. **J. Am. Chem. Soc.** 126, 4772-4773. (2004) .
  24. Sharp, K. H., Moody, P. C., and Raven, E. L. A new framework for understanding substrate binding and functional diversity in haem peroxidases. **Dalton Trans.** 22, 4208-4215(2003).
  25. **Insight II 2000 package**; Accelrys, 9685 Scranton Road, San Diego, CA 92121-3752.
  26. HAGLER, A. T.; MOULT, J. "Computer simulation of the solvent structure around biological macromolecules", **Nature**, 272, 222-226 (1978);
  27. MACKAY, D.H.J.; CROSS, A.J.; HAGLER, A.T. In: Ed. Fasman, G.D., "Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation"; **Plenum Press**:New York & London, 1990, Ch.7, 317-358;

28. LUTY, B.A.; Wasserman, Z.R.; Stouten, P.F.W.; Hodge, C.N.; Zacharias, M.; McCammon, J.A. "A Molecular Mechanics/Grid Method for Evaluation of Ligand-Receptor Interactions", **J. Comp. Chem.**, 16, 454 (1995).
29. User guide. **Forcefield Simulations**. 1995
30. SHI, S. Yan, L. Yang, Y. Fisher-Shaulsky, J., and Tacher, T... An extensible and systematic force field, ESFF, for molecular modeling of organic, inorganic, and organometallic systems. **J Comput Chem.**, 24:9,1059-1076, 2003.
31. VERLET, L. Computer experiments on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. **Phys. Rev.**, 159, 98-103, (1967);
32. PRADO, Maria Aparecida. **Dinâmica de Cadeias Poliméricas**, 1999. Dissertação (mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade de Brasília.
33. DAUBER-ORGUTHORPE, P., Roberts, V.A., Osguthorpe, D.J., Wolff, J., Genest, M., and Hagler, A.T. (1988) Structure and energetic of ligand binding to proteins: E. *Coli* dihydrofolate reductase-trimethoprim, a drug-receptor system. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, 4,31-47.
34. WERNECK, A.S. M. Oliveira Neto & E. R. Maia. The Hyper modified Y Base Electrostatic Contribution to the Energetic of the Codon-Anticodon Pairing in tRNAPhe: A Molecular Dynamics and ab-initio Study, **Journal of Molecular Structure (Theochem)**, 427, 15-23, 1998.
35. GOULD, H.; Tobochnik, J. **An Introduction to Computer Simulation Methods: Applications to Physical Systems**, 2<sup>nd</sup> Edition, Massachusetts: Addison-Wesley, 1996.
36. ROCHA, Adalberto Vieira da. **Estudos Estereoquímicos e Estruturais para um Mapeamento Farmacofórico de Antagonistas do PAF-Acéter**. 2004. **Dissertação**( Mestrado em Química)- Instituto de Química, Universidade de Brasília.
37. BLANEY, J.; DIXON, S.. A good ligand is hard to find: Automated docking methods. **Perspectives in Drug Discovery and Design**, 1:301--319, 1993.

- 
38. STOUTEN, P. C. Frömmel, H. Nakamura & C. Sander. An Effective Solvation Term Based on Atomic Occupancies for Use in Protein Simulations, **Molecular Simulation**, 10, 97-120. 1993.
  39. LANGRIDGE, R.; Marvin, D.A.; Seeds, W.E.; Wilson, H.R.; Hooper, C.W.; Wilkins, M.H.F.; Hamilton, L.D.: 1960, 'The Molecular Configuration of Deoxyribonucleic Acid II. Molecular Models and their Fourier Transforms', **Journal of Molecular Biology**, 2, 38-64.
  40. HAMZA, A., and Zhan, C.-G., "How Can (-)-Epigallocatechin Gallate from Green Tea Prevent HIV-1 Infection? Mechanistic Insights from Computational Modeling and the Implication for Rational Design of Anti-HIV-1 Entry Inhibitors," **J. Phys. Chem. B**, 2006, 110, 2910-2917.
  41. Stouten, P.F.W.; Frommel, C.; Nakamura, H.; Sander, C. **Molecular Simulation**, 10, 97 (1993).
  42. Kuntz, I.D.; Meng, E.C.; Shoichet, B.K. **Acc. Chem. Res.**, 27, 117 (1994).
  43. <http://www.accelrys.com>
  44. Press, W.H.; Flannery, B.P.; Teukolsky, S.A.; Vetterling, W.T. **Numerical Recipes: The Art of Scientific Computing**", Cambridge University Press, Cambridge. U.K., 1986 .
  45. <http://www.pdb.org/> .
  46. Connolly, M. L., **Biopolymers**, 25, 1229 (1985) .
  47. Connolly, M. L., **Biopolymers**, 32, 1215, (1992) .
  48. Silaghi-Dumitrescu, Radu. A density functional study of heme-peroxynitrite adducts. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, 722, 2005.
  49. Mukai, M., Mill, C.E., Poole, R.K., Yeh, S.R.. Flavohemoglobin, a Globin with a Peroxidase-like Catalytic Site .**Journal of Biological Chemistry**. 276, 2001.
  50. Gardner, A.M., Gardner P.R.. Flavohemoglobin Detoxifies Nitric Oxide in Aerobic, but Not Anaerobic, *Escherichia coli*. EVIDENCE FOR A NOVEL INDUCIBLE ANAEROBIC NITRIC OXIDE-SCAVENGING ACTIVITY. **Journal of Biological Chemistry**. 277, 2003.

- 
51. Pasiani J. O., Bastos, D., Maia, E. R., Cunha, E. F. F., Ramalho, T. C. & Alencastro, R. B., **Interações da Isoniazida com um Mycobacterium Tuberculosis mutante**. 3<sup>o</sup> Congresso de Iniciação Científica do DF, set 2006, Brasília, DF, Brasil.
  52. Pierattelli, Roberta, Banci, Lucia, Eady, Nigel A. J., Bodiguel, Jacques, Jones, Jamie N., Moody, Peter C. E., Raven, Emma Lloyd, Jamart-Grégoire, Brigitte and Brown Katherine A.. Enzyme-catalyzed Mechanism of Isoniazid Activation in Class I and Class III Peroxidases. **J. Biol. Chem.**, Vol. 279,2004.
  53. Carpena, X., Loprasert, S., Mongkolsuk, S., Switala, J., Loewen, P. C., and Fita, I. **J. Mol. Biol.** 327, 475-489(2003) .
  54. <http://www.lce.hut.fi/teaching/S-114.500/k2002/Protdock.pdf>. (acessado em 17 de julho de 2005, via Google).
  55. T. Bertrand, N. A. J. Eady, J. N. Jones, Jesmin, J. M. Nagy, B. Jamart-Gregoire, E. L. Raven and K. A. Brown, **J. Biolog. Chem.**, 279(37), 38991-38999 (2004).
  56. Yamada, Y., Fujiwara, T., Sato, T., Igarashi, N., and Tanaka, N. **Nat. Struct. Biol.** 9, 691-695 ,(2002).

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)