



**ESTUDO DA COMPUTACIONAL DA INTERAÇÃO DE SUBSTRATOS E
INIBIDORES COM A ENZIMA ARILAMINA N-ACETILTRANSFERASE DE
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS**

Lucas S. Obach¹
Hermes L.N. de Amorim²

Resumo

Atualmente cerca de 9 milhões de pessoas são infectadas e 1,4 milhões morrem de tuberculose no mundo. No Brasil, 71 mil novos casos de tuberculose são registrados a cada ano. Como agravante, há o surgimento de cepas resistentes ou imunes tanto aos tratamentos de primeira linha (isoniazida e rifampicina) quanto aos mais avançados (combinação de fármacos). Um novo alvo que tem sido considerado contra a tuberculose é a arilamina N-acetiltransferase do *M. tuberculosis* (TBNAT). Essa enzima está envolvida na síntese de ácidos micólicos, componentes essenciais da parede celular bacteriana, entretanto, sua alta semelhança com as NATs humanas torna difícil o planejamento de novos fármacos. Assim, para atingir-se um nível de seletividade adequado é necessário caracterizar os resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da desta enzima que estão envolvidos no processo de reconhecimento e ligação. Este trabalho teve como objetivo usar ferramentas de bioinformática estrutural para avaliar a interação de substratos e inibidores conhecidos da TBNAT visando caracterizar os resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo desta enzima.

Palavras-chave: tuberculose, resistência, fármacos, bioinformática estrutural

INTRODUÇÃO

Atualmente a tuberculose ainda é responsável por mortes e infecções no mundo. Cerca de 9 milhões de pessoas são infectadas e 1,4 milhões morrem de tuberculose no mundo devido a doença (WHO, 2012). No Brasil 71 mil novos casos de tuberculose são registrados a cada ano (BRASIL, 2012). Nos últimos anos, como agravante, há o surgimento novas cepas resistentes ou imunes tanto aos tratamentos comuns de primeira linha (isoniazida e rifampicina) quanto

¹Aluno do curso de Ciência da Computação – ULBRA; Bolsista de Iniciação Tecnológica FAPERGS – lucasobach@hotmail.com

²Professor do Programa de Mestrado Profissional em Genética e Toxicologia Aplicada – ULBRA – hermes.amorim@ulbra.br

aos mais avançados (combinação de fármacos). Além disso, alguns fármacos para combater a tuberculose não podem ser coadministrados com fármacos usados por diabéticos e para o tratamento de HIV. Um novo alvo que tem sido considerado importante contra a tuberculose é a arilamina N-acetiltransferase do *M. tuberculosis* (TBNAT) (FULLAN ET AL, 2013; ABUHAMMAD ET AL, 2012). Essa enzima está envolvida na síntese de ácidos micólicos, componentes essenciais da parede celular bacteriana, responsável pelo crescimento e desenvolvimento do bacilo. Porém, devida sua alta semelhança as NATs humanas torna difícil o planejamento de fármacos no sentido de que um inibidor projetado para as NATs bacterianas poderá facilmente inibir as NATs humanas. Para atingir-se um nível de seletividade adequado é necessário estudar no nível atômico a forma como os possíveis ligantes interagem com a molécula alvo. Devido a limitações econômicas e técnicas a determinação experimental da estrutura tridimensional de macromoléculas biológicas é limitada aos recursos disponíveis e características intrínsecas da proteína. Assim, métodos computacionais se apresentam como uma alternativa altamente útil na obtenção de dados estruturais e conformacionais envolvidos na formação de complexos ligante-receptor.

METODOLOGIA

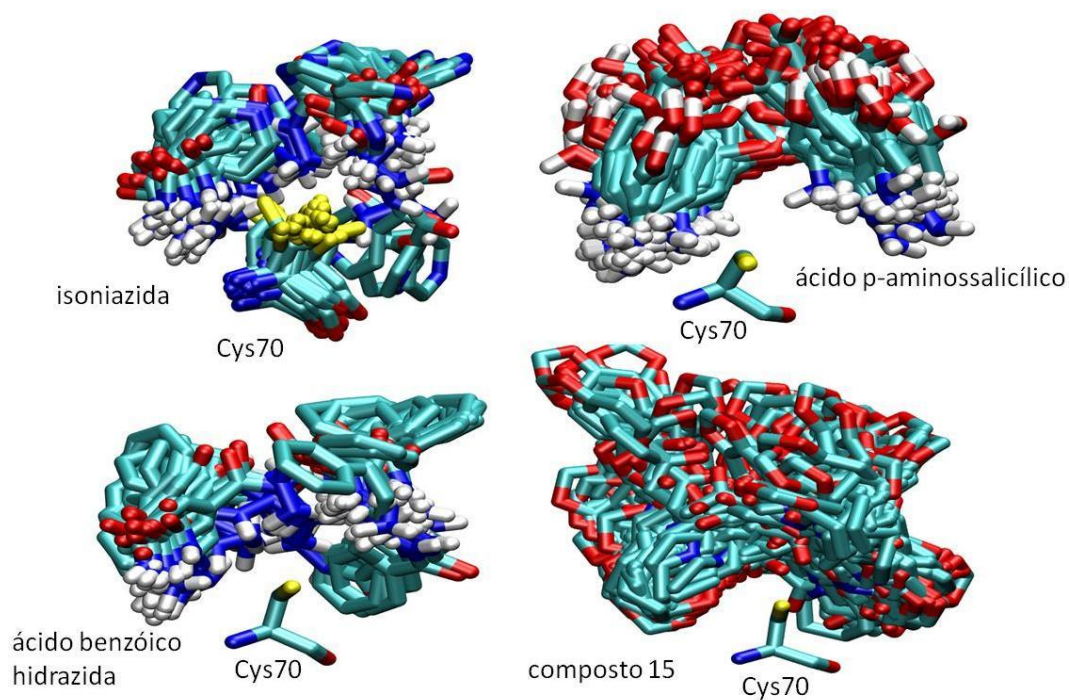
Nesse trabalho foram usadas técnicas computacionais para avaliar a interação de substratos e inibidores conhecidos da TBNAT no sentido de caracterizar os resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da enzima que estão envolvidos no processo de reconhecimento e ligação. O protocolo estabelecido envolveu técnicas de simulação por dinâmica molecular (DM), de docagem molecular e, simulação de dinâmica molecular, ensemble docking e mapa de contatos. As simulações de DM foram realizadas com campo de força GROMOS 53A6 (OOSTENBRINK ET AL, 2004) implementado no pacote de programas GROMACS versão 4.5 (LINDAHL ET AL, 2001; VAN DER SPOEL ET AL, 2005). Para a docagem molecular usou-se o programa AutoDock 4.2 através da interface gráfica AutoDockTools (MORRIS E LIM-WILBY, 2008). A técnica de *ensemble docking* foi implementada internamente com o uso de filtros, servindo para selecionar somente as configurações espaciais dos ligantes que estavam de acordo com o mecanismo de ação enzimática. Como ligantes foram selecionados moléculas com dados experimentais conhecidos: isoniazida, composto 15 (inibidor recentemente descoberto através de triagem virtual), ácido para-aminossacílico e o ácido benzoico hidrazida. Cada ligante foi submetido a dez docagens independentes sobre 400 conformações da TBNAT extraídas da etapa de produção das simulações por DM. Um mapa

dose contatos mais frequentes foi gerado com o emprego do programa LIGPLOT. para calcular a energia das ligações de todas as conformações selecionadas. Essas técnicas são aplicadas para 401 frames de uma trajetória que explora as movimentações da TBNAT. Como ligantes foram selecionados a isoniazida, composto 15, ácido para-aminossalicílico e o ácido benzoico hidrazida. Duas trajetórias independentes de dinâmica molecular foram geradas para a TBNAT livre, e subsequentemente rodados os processos descritos acima para cada ligante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No *ensemble docking* são extraídas conformações do receptor durante a simulação por dinâmica molecular, sendo cada uma dessas conformações transientes submetidas a um cálculo de docagem molecular. A aplicação do filtro elimina os resultados do *ensemble docking* que não fazem sentido do ponto de vista do mecanismo proposto para a enzima. Como pode ser observado na figura 1, somente parte dos 4.000 resultados de docagem para cada ligante gera configurações espaciais onde o ligante está posicionado para interagir com resíduos do sítio de ligação.

Figura 1: Poses selecionadas pelo filtro após o *ensemble docking*



A tabela 1 traz os resultados para a energia média de ligação e o número médio de poses selecionadas por conformação da enzima livre na docagem de cada uma dos ligantes. Pode-se observar que os resultados de energia estão de acordo com a série de afinidade experimental, sendo o composto 15 o que apresenta maior afinidade, seguido do ácido para-aminossalicílico, ácido benzoico hidrazida e isoniazida, o substrato com menor afinidade.

Tabela 1: resultado do *ensemble docking* para cada réplica da simulação da TBNAT

Ligante	Trajétória (réplica)	Energia Média dos Selecionados (kcal/mol)	Número médio de selecionados por frame
Isoniazida	Tbnatwt1	-4.9 ±0.3	0.4 ±1.1
	Tbnatwt2	-4.7 ±0.3	0.8 ±1.7
Composto 15	Tbnatwt1	-7.2 ±0.5	1.8 ±2.3
	Tbnatwt2	-7.3 ±0.9	2.6 ±3.0
Ácido para-aminossalicílico	Tbnatwt1	-5.3 ±0.5	1.1 ±2.3
	Tbnatwt2	-5.1 ±0.4	1.2 ±2.5
Ácido benzoico hidrazida	Tbnatwt1	-5.1 ±0.2	0.3 ±1.1
	Tbnatwt2	-5.2 ±0.3	0.7 ±1.6

CONCLUSÕES FINAIS

Cada simulação independente apresentou um perfil distinto de interação com os ligantes, indicando que o grau de amostragem do sistema deve ser ampliado ou o número de conformações utilizadas no *ensemble docking* deve ser aumentado

Embora a ordem de afinidade relativa observada esteja parcialmente de acordo com os dados experimentais, a diferença encontrada em termos de ΔG_{bind} está dentro do limite de erro do programa de docagem, que é de $\pm 2,6$ kcal/mol, indicando que o método deve ser aprimorado quanto a este parâmetro.

REFERÊNCIAS

- ABUHAMMAD, A., LOWE, E.D., MCDONOUGH, M.A., SHAW STEWART, P.D., KOLEK, S.A., SIM, E., GARMAN, E.F. Structure of arylamine N-acetyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* determined by cross-seeding with the homologous protein from *M. marinum*: triumph over adversity. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 69, p. 1433-1446, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Programa Nacional de Controle da Tuberculose**. Brasília, 2012.
- FULLAM, E., KAWAMURA, A., WILKINSON, H., ABUHAMMAD, A., WESTWOOD, I., SIM, E. Comparison of the Arylamine N-Acetyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal Protein**, v. 28, p. 281-293, 2009.
- LINDAHL, E.; HESS, B.; van der SPOEL, D. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. **Journal of Molecular Modeling**, v. 7, p. 306-317, 2001.
- MORRIS, G.M., HUEY, R., LINDSTROM, W., SANNER, M.F., BELEW, R.K., GOODSSELL, D.S. AND OLSON, A.J. Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. **J Comput Chem**, v. 16, p. 2785-2791, 2009.
- MORRIS, G.M.; LIM-WILBY, M. Molecular docking. **Methods Mol Biol**. p.365-382. 2008.
- OOSTENBRINK, C.; VILLA, A.; MARK, A.E.; VAN GUNSTEREN, W.F. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. **J Comput Chem**, v. 25, n.13, p. 1656-1976, 2004.
- van der SPOEL, D.; LINDAHL E.; HESS B.; GROENHOF G.; MARK A.E.; BERENDSEN H. J.C. GROMACS: fast, flexible, and free. **Journal of Computational Chemistry**. v. 26, p. 1701-1718, 2005.
- WHO.WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis report**, 2012.