

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Biociências  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Elisângela Machado Leal Cohen

Estudos da Interação da Enzima InhA (EC 1.3.1.9) de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv com Análogos do Inibidor IQG607

Porto Alegre, outubro de 2013

Elisângela Machado Leal Cohen

Estudos da Interação da Enzima InhA (EC 1.3.1.9) de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv com Análogos do Inibidor IQG607

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito para a obtenção do grau de Doutor.

Orientador  
Prof. Dr. Osmar Norberto de Souza

Porto Alegre, outubro de 2013

Para Marcelo e Júlia,  
meus companheiros de todas as horas.

## **Agradecimentos**

Não há dúvida que fazer os agradecimentos ao final de uma Tese não é uma tarefa fácil. Durante o Doutorado foram tantas pessoas que, de uma forma ou de outra, colaboraram para que hoje eu pudesse escrever essas linhas... São tantos os nomes que vem à cabeça, e a certeza de estar esquecendo alguns...

Como sempre, começo pelos meus avós, Júlio e Dita, exemplos de honestidade e luta. Por todo o amor e cuidado comigo. Por me ensinarem a amar e respeitar ao próximo.

Aos meus sogros, Saul e Esther, por me acompanhar nesta caminhada sempre demonstrando muito apoio e carinho. Por dividir comigo os momentos de alegria, de conquista e também os de expectativa e tristeza.

Ao professor Pablo Machado, por cruzar meu caminho de forma tão positiva. Pela atenção e dedicação ao meu trabalho. Por me ajudar a enxergar uma Tese onde eu só via desespero. Por estar sempre disposto a discutir comigo minhas dúvidas, me ajudar a entender meus resultados e me ensinar a olhar para meu trabalho com mais confiança.

À professora Nadja Schröder, coordenadora do programa de Biologia Celular e Molecular da PUCRS, pelo apoio. As palavras parecem pequenas demais para dimensionar minha gratidão.

Aos professores Hermes Luis Neubauer de Amorim e Cristiano Valim Bizarro, minha banca avaliadora, pelos comentários feitos ao meu trabalho. Por analisarem minha Tese de forma justa e honesta, e apontar os caminhos para a melhoria do texto final.

À professora Maria Lúcia, do Centro de Atenção Psicossocial (CAP) da PUCRS, por nossas conversas, por seus conselhos e seu carinho ao escutar meus desabafos. Nossos encontros foram muito importantes para me manter de pé, e com coragem de enfrentar os obstáculos que surgiram.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de doutorado.

À minha querida amiga Karina, companheira desde o mestrado. Por ler os meus textos e fazer comentários que sempre ajudavam a melhorar a forma de apresentar minhas idéias. Pela cervejinha no Shamrock, por todos os desabafos, pelo carinho e incentivo.

Aos queridos amigos Márcio, Isabel, Sílvia, Edna e Rodrigo, Rodrigo e Anete, Júlio, Agustini e Giraffa, por escutarem meus lamentos e ter sempre uma ou duas palavras de coragem e motivação. A todos vocês, sem distinção, meu muito obrigado.

Aos queridos amigos Simone e Carlos por cuidarem da Júlia para mim em muitos momentos, e por todas as caronas nos dias de chuva...

À minha filha Júlia, a criança mais feliz e carinhosa que eu conheço. Por todo o teu sorriso, teus beijinhos e abraços. Por colocar tuas mãozinhas macias em meu rosto e me dizer os mais sinceros e doces “Eu te amo, mamãe!” que colocam cor em minha vida e aquecem meu coração. Por garantir que, ao final de cada dia, nunca volto pra casa para me entregar ao silêncio e à solidão.

Ao meu marido Marcelo, meu eterno cúmplice e companheiro. Por estes 20 anos de amor e carinho. Por rir e chorar comigo. Por toda a tua preocupação e cuidado, pela tua força. Por dividir comigo a crença de que devemos ser honestos e responsáveis por aquilo que acreditamos ser o correto a fazer. Por me ajudar a passar esses valores tão importantes para nossa filha.

"Os melhores indicadores do caráter de uma pessoa são como ela trata as pessoas que não podem lhe trazer benefício algum; e como ela trata as pessoas que não podem revidar."

Abigail van Buren

# Sumário

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>IX</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>XIV</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>XV</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XVI</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>1.1 Alvos Farmacológicos para o Tratamento da Tuberculose</b> .....	<b>17</b>
<b>1.2 Biossíntese de Ácidos Graxos</b> .....	<b>19</b>
<b>1.3 Caracterização da Enzima InhA de Mycobacterium tuberculosis</b> .....	<b>22</b>
1.3.1 Características da Proteína InhA .....	22
1.3.2 Visão Geral das 39 Estruturas da InhA depositadas no Banco de Dados PBD .....	24
1.3.3 Análise do Volume das Cavidades das Estruturas Depositadas no Banco de Dados PBD .....	26
<b>1.4 Fármaco Isoniazida (INH)</b> .....	<b>29</b>
1.4.1 Mecanismo de Ação da INH .....	30
<b>1.5 Composto IQG607</b> .....	<b>30</b>
1.5.1 Construção do Ligante .....	34
1.5.1.1 Atribuição de Cargas do Ligante .....	35
<b>1.6 Simulações de Docagem Molecular</b> .....	<b>35</b>
1.6.1 O software AutoDock .....	35
1.6.1.1 Tratamento do Ligante .....	36
1.6.1.2 Tratamento do Receptor .....	37
<b>1.7 Análise da Interação Receptor-Ligante</b> .....	<b>37</b>
<b>1.8 Síntese dos Análogos do IQG607</b> .....	<b>40</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>41</b>
<b>3 MOTIVAÇÃO SOCIAL</b> .....	<b>43</b>
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	<b>45</b>

<b>4.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>45</b>
<b>4.2</b>	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>45</b>
<b>5</b>	<b>ARTIGO .....</b>	<b>46</b>
<b>6</b>	<b>MODELOS DERIVADOS DO IQG607 .....</b>	<b>65</b>
<b>6.1</b>	<b>Resultados Parciais não Apresentados no Artigo .....</b>	<b>65</b>
6.1.1	Modelos IQG607_004 ao IQG607_018.....	66
6.1.2	Modelos IQG607_019 ao IQG607_027.....	67
6.1.2.1	Modelo IQG607_019.....	68
6.1.2.2	Modelo IQG607_020.....	69
6.1.2.3	Modelo IQG607_021.....	70
6.1.2.4	Modelo IQG607_022.....	71
6.1.2.5	Modelo IQG607_022 com 03 ligações fixas.....	72
6.1.2.6	Modelo IQG607_023.....	73
6.1.2.7	Modelo IQG607_023 com 03 ligações fixas.....	74
6.1.2.8	Modelo IQG607_024.....	75
6.1.2.9	Modelo IQG607_024 com 03 ligações fixas.....	76
6.1.2.10	Modelo IQG607_025.....	77
6.1.2.11	Modelo IQG607_025 com 03 ligações fixas.....	78
6.1.2.12	Modelo IQG607_026.....	79
6.1.2.13	Modelo IQG607_027.....	80
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>82</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>84</b>
<b>9</b>	<b>TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>85</b>
	<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>86</b>
<b>A.1</b>	<b>Simulações de docagem molecular dos compostos desenhados pelo Prof. Pablo Machado .....</b>	<b>86</b>
A.1.1	Composto 01 ( <i>cluster</i> 04).....	89
A.1.2	Composto 02 ( <i>cluster</i> 01 e <i>cluster</i> 03).....	90
A.1.3	Composto 03 ( <i>cluster</i> 01 e 04).....	92
A.1.4	Composto 04 ( <i>cluster</i> 01 e 04).....	94
A.1.5	Composto 05 ( <i>cluster</i> 01 e 02).....	96
	<b>APÊNDICE B.....</b>	<b>98</b>
<b>B.1</b>	<b>Software Utilizado para o Desenho e Manipulação das Estruturas.....</b>	<b>98</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>100</b>



## Lista de Figuras

- Figura 1: Representação esquemática da parede celular de *Mycobacterium tuberculosis* (Schroeder, 2004). ..... 20
- Figura 2: Biossíntese dos ácidos micólicos das micobactérias. Figura extraída de Schroeder, E. (2004). ..... 22
- Figura 3: Representação em *ribbons* da estrutura 3D da proteína InhA de *M. tuberculosis* (código PDB: 1ENY). (A) Representação da enzima de acordo com a analogia feita em comparação a uma cadeira (Dessen *et al.*, 1995), onde em azul claro vemos as 8 hélices  $\alpha$ , em (B) temos a alça de ligação do substrato na cor magenta, seguida das alças A e B coloridas em verde e azul escuro, respectivamente. Um destaque é dado a estas alças por representar uma região de grande flexibilidade da proteína - um aspecto importante na interação da enzima com moléculas ligantes. Em amarelo (C) estão as 7 fitas  $\beta$  paralelas; caracterizando a topologia do tipo *Rossmann* (*Rossmann fold*), principal característica desta família de proteínas. Em vermelho o NADH acoplado ao sítio de ligação. Figura da Autora. .... 24
- Figura 4: Área de trabalho do sistema *CASTp*. A figura mostra em branco a proteína de interesse e em verde o volume da cavidade calculada. A esquerda da imagem pode ser observada uma lista de todas as cavidades e os respectivos volumes que foram encontrados ao completar a análise. Figura da Autora. .... 27
- Figura 5: Representação do volume da cavidade de ligação do substrato. (A) Em branco, representado por *ribbons* e superfície molecular, está a proteína InhA de *M. tuberculosis*, e em esferas na cor laranja, uma comparação da cavidade do substrato identificada pelo sistema *CASTp* (Dundas *et al.*, 2006). Em (B) a cavidade da estrutura 1BVR (735 Å<sup>3</sup>), em (C) a cavidade da estrutura 1ENY (598.2 Å<sup>3</sup>), em (D) a cavidade da estrutura 1P44 (1691.9 Å<sup>3</sup>) e em (E) a cavidade da estrutura 1P45 (970.4 Å<sup>3</sup>). Figura da Autora. .... 28
- Figura 6: Fórmula estrutural da Isoniazida (INH). Figura da Autora. .... 29
- Figura 7: Fórmula estrutural plana do composto IQG607. Figura da Autora. .... 31
- Figura 8: Representação do ligante IQG607 docado no sítio ativo da enzima InhA. A figura mostra uma das possíveis posições de ligação do IQG607: em amarelo o NADH posicionado no sítio ativo da proteína InhA; em azul o ligante; e ao fundo a molécula receptora representada em *newcartoon*. Figura da Autora. .... 32
- Figura 9: Exemplo de arquivo de saída do programa *LigPlot*. Representação 2D gerada automaticamente pelo programa, mostrando o tipo de interação realizada entre o complexo proteína-ligante. Figura da Autora. .... 39
- Figura 10: Fórmula estrutural plana dos compostos IQG607\_019 ao IQG607\_027. Figura da Autora. .... 67
- Figura 11: Melhor encaixe receptor-ligante durante a simulação de docagem molecular. Em (A) pode-se observar a melhor pose docada do composto IQG607\_019 no sítio ativo do

receptor, baseado nos critérios citados no texto. Em (B) o diagrama 2D gerado pelo programa *LigPlot* após a análise das interações receptor-ligante. Figura da Autora. .... 68

Figura 12: Melhor encaixe receptor-ligante durante a simulação de docagem molecular. Em (A) pode-se observar a melhor pose docada do composto IQG607\_020 no sítio ativo do receptor, baseado nos critérios citados no texto. Em (B) o diagrama 2D gerado pelo programa *LigPlot* após a análise das interações receptor-ligante. Figura da Autora. .... 69

Figura 13: Melhor encaixe receptor-ligante durante a simulação de docagem molecular. Em (A) pode-se observar a melhor pose docada do composto IQG607\_021 no sítio ativo do receptor, baseado nos critérios citados no texto. Em (B) o diagrama 2D gerado pelo programa *LigPlot* após a análise das interações receptor-ligante. Figura da Autora. .... 70

Figura 14: Melhor encaixe receptor-ligante durante a simulação de docagem molecular. Em (A) pode-se observar a melhor pose docada do composto IQG607\_022 no sítio ativo do receptor, baseado nos critérios citados no texto. Em (B) o diagrama 2D gerado pelo programa *LigPlot* após a análise das interações receptor-ligante. Figura da Autora. .... 71

Figura 15: Melhor encaixe receptor-ligante durante a simulação de docagem molecular. Em (A) pode-se observar a melhor pose docada do composto IQG607\_022 no sítio ativo do receptor, baseado nos critérios citados no texto. Em (B) o diagrama 2D gerado pelo programa *LigPlot* após a análise das interações receptor-ligante. Figura da Autora. .... 72

Figura 16: Melhor encaixe receptor-ligante durante a simulação de docagem molecular. Em (A) pode-se observar a melhor pose docada do composto IQG607\_023 no sítio ativo do receptor, baseado nos critérios citados no texto. Em (B) o diagrama 2D gerado pelo programa *LigPlot* após a análise das interações receptor-ligante. Figura da Autora. .... 73

Figura 17: Melhor encaixe receptor-ligante durante a simulação de docagem molecular. Em (A) pode-se observar a melhor pose docada do composto IQG607\_023 no sítio ativo do receptor, baseado nos critérios citados no texto. Em (B) o diagrama 2D gerado pelo programa *LigPlot* após a análise das interações receptor-ligante. Figura da Autora. .... 74

Figura 18: Melhor encaixe receptor-ligante durante a simulação de docagem molecular. Em (A) pode-se observar a melhor pose docada do composto IQG607\_024 no sítio ativo do receptor, baseado nos critérios citados no texto. Em (B) o diagrama 2D gerado pelo programa *LigPlot* após a análise das interações receptor-ligante. Figura da Autora. .... 75

Figura 19: Melhor encaixe receptor-ligante durante a simulação de docagem molecular. Em (A) pode-se observar a melhor pose docada do composto IQG607\_024 no sítio ativo do receptor, baseado nos critérios citados no texto. Em (B) o diagrama 2D gerado pelo programa *LigPlot* após a análise das interações receptor-ligante. Figura da Autora. .... 76

Figura 20: Melhor encaixe receptor-ligante durante a simulação de docagem molecular. Em (A) pode-se observar a melhor pose docada do composto IQG607\_025 no sítio ativo do receptor, baseado nos critérios citados no texto. Em (B) o diagrama 2D gerado pelo programa *LigPlot* após a análise das interações receptor-ligante. Figura da Autora. .... 77

Figura 21: Melhor encaixe receptor-ligante durante a simulação de docagem molecular. Em (A) pode-se observar a melhor pose docada do composto IQG607\_025 no sítio ativo do

receptor, baseado nos critérios citados no texto. Em (B) o diagrama 2D gerado pelo programa *LigPlot* após a análise das interações receptor-ligante. Figura da Autora. .... 78

Figura 22: Melhor encaixe receptor-ligante durante a simulação de docagem molecular. Em (A) pode-se observar a melhor pose docada do composto IQG607\_026 no sítio ativo do receptor, baseado nos critérios citados no texto. Em (B) o diagrama 2D gerado pelo programa *LigPlot* após a análise das interações receptor-ligante. Figura da Autora. .... 79

Figura 23: Melhor encaixe receptor-ligante durante a simulação de docagem molecular. Em (A) pode-se observar a melhor pose docada (no *cluster* 01) do composto IQG607\_027 no sítio ativo do receptor, baseado nos critérios citados no texto. Em (B) o diagrama 2D gerado pelo programa *LigPlot* após a análise das interações receptor-ligante. Em (C) pode-se visualizar a melhor pose docada (no *cluster* 03), e em (D), o diagrama 2D correspondente no sítio ativo do receptor. Figura da Autora. .... 80

Figura 24: Provável mecanismo de interrupção da transferência de elétrons. O composto IQG607, em sua forma original, permite que a reação intramolecular de oxidação ocorra de forma natural. Porém, com a quebra da ressonância (complexo 1) impede a oxidação intramolecular, e assim a possível formação do radical acil correspondente. Figura cedida pelo Prof. Pablo Machado. .... 83

Figura 25: Representação das principais etapas do desenvolvimento do projeto de pesquisa. Modificações no composto IQG607 original foram introduzidas (esquerda). A interação dos compostos derivados foi simulada e avaliada (centro). Após o processo de síntese e testes de bancada, foi formulada a hipótese da inativação do composto derivado (direita). Figura da Autora. .... 84

Figura 26: Representação do tipo “palitos e esferas” dos compostos derivados da INH empregados nas simulações de docagem molecular utilizando o receptor código PDB 1P44 da enzima InhA de *Mycobacterium tuberculosis*. A coloração dos átomos segue o modelo CPK onde em branco vemos os hidrogênios, em cinza os carbonos, em azul os nitrogênios e em vermelho os oxigênios. Figura da Autora. .... 87

Figura 27: Melhor encaixe receptor-ligante durante a simulação de docagem molecular do composto 01. Em (A) pode-se observar a melhor pose docada do composto 01 no sítio ativo do receptor, baseado nos critérios citados no texto. Em (B) o diagrama 2D gerado pelo programa *LigPlot* após a análise das interações receptor-ligante. Figura da Autora... 89

Figura 28: Melhor encaixe receptor-ligante durante a simulação de docagem molecular do composto 02. Em (A) pode-se observar a melhor pose docada do composto 02 (no *cluster* 01) no sítio ativo do receptor, baseado nos critérios citados no texto. Em (B) o diagrama 2D correspondente, gerado pelo programa *LigPlot* após a análise das interações receptor-ligante. Em (C) pode-se observar a melhor pose docada (no *cluster* 03), e em (D) no sítio ativo do receptor o diagrama 2D correspondente. Figura da Autora. .... 90

Figura 29: Melhor encaixe receptor-ligante durante a simulação de docagem molecular do composto 03. Em (A) pode-se observar a melhor pose docada do composto 03 (no *cluster* 01) no sítio ativo do receptor, baseado nos critérios citados no texto. Em (B) o diagrama 2D correspondente, gerado pelo programa *LigPlot* após a análise das interações receptor-

ligante. Em (C) pode-se observar a melhor pose docada (no *cluster* 04), e em (D) no sítio ativo do receptor o diagrama 2D correspondente. Figura da Autora..... 92

Figura 30: Melhor encaixe receptor-ligante durante a simulação de docagem molecular do composto 04. Em (A) pode-se observar a melhor pose docada do composto 04 (no *cluster* 01) no sítio ativo do receptor, baseado nos critérios citados no texto. Em (B) o diagrama 2D correspondente, gerado pelo programa *LigPlot* após a análise das interações receptor-ligante. Em (C) pode-se observar a melhor pose docada (no *cluster* 04), e em (D) no sítio ativo do receptor o diagrama 2D correspondente. Figura da Autora..... 94

Figura 31: Melhor encaixe receptor-ligante durante a simulação de docagem molecular do composto 05. Em (A) pode-se observar a melhor pose docada do composto 05 (no *cluster* 01) no sítio ativo do receptor, baseado nos critérios citados no texto. Em (B) o diagrama 2D correspondente, gerado pelo programa *LigPlot* após a análise das interações receptor-ligante. Em (C) pode-se observar a melhor pose docada (no *cluster* 02), e em (D) no sítio ativo do receptor o diagrama 2D correspondente. Figura da Autora..... 96

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Fármacos comumente utilizados para o tratamento da tuberculose.....	18
Tabela 2: Estruturas da enzima InhA depositadas no banco de dados de estruturas 3D - <i>Protein Data Bank</i> – até o momento. ....	25
Tabela 3: Nomenclatura dos ligantes complexados com as estruturas da InhA segundo IUPAC .....	26
Tabela 4: Sumário das simulações de docagem molecular e interações receptor-ligante realizados entre a InhA e os compostos desenhados. ....	65
Tabela 5: Sumário das simulações de docagem molecular e interações receptor-ligante realizados entre a InhA e os compostos desenhados pelo prof. Pablo Machado.....	87

## Lista de Abreviaturas

<b>TB</b>	Tuberculose	1
<b>Mtb</b>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana	1
<b>MIC</b>	Concentração Mínima Inibitória	2
<b>InhA</b>	Proteína 2- <i>trans</i> -enoiil-ACP(COA) redutase	3
<b>FAS</b>	Sintase de Ácido Graxo	4
<b>NADH</b>	$\beta$ -nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida	5
<b>wt</b>	Espécie Selvagem - <i>Wild Type</i>	6
<b>kDa</b>	Unidade de Medida kiloDaltons	7
<b>SDR</b>	Desidrogenase de cadeia curta - <i>short chain dehydrogenase/reductase</i>	7
<b>PDB</b>	Banco de Dados de Proteínas - <i>Protein Data Bank</i>	8
<b>PAS</b>	Ácido p-aminosalicílico	12
<b>INH</b>	Hidrazida do Ácido Isonicotínico	12
<b>Mn</b>	Manganês (elemento da tabela periódica)	13
<b>IQG607</b>	Composto Inorgânico Pentaciano(isoniazida)ferrato (II)	13
<b>LABIO</b>	Laboratório de Bioinformática, Modelagem e Simulação de Biosistemas	14
<b>ETH</b>	Etionamida - fármaco de segunda linha utilizado no tratamento da tuberculose	15
<b>DM</b>	Dinâmica Molecular	16
<b>modelo FFR</b>	Modelo Receptor Totalmente Flexível - <i>Fully Flexible Receptor Model</i>	16
<b>FEB</b>	Energia Livre de Ligação - <i>Free Energy of Binding</i>	16
<b>ORF</b>	Fase Aberta de Leitura - <i>Open reading frame</i>	22
<b>BCG</b>	Vacina anti-TB - Bacilo de Calmette-Guérin	24
<b>WHO</b>	Organização Mundial da Saúde - <i>World Health Organization</i>	24
<b>KatG</b>	Enzima catalase-peroxidase de Mtb responsável pela ativação da pró-droga Isoniazida	
<b>Fe</b>	Ferro (elemento da tabela periódica)	28

## Resumo

Desde a sua descoberta, a Isoniazida continua sendo o principal fármaco empregado no tratamento da tuberculose, tendo como alvo farmacológico a enzima 2-*trans*-enoil-ACP(CoA) redutase ou InhA de *Mycobacterium tuberculosis*. Porém, o aumento dos casos de tuberculose resistente à Isoniazida motivaram a indústria farmacêutica e pesquisadores a investigar possíveis inibidores da InhA, seja buscando novos compostos que apresentem a característica inibitória, ou como na proposta deste trabalho, modificando compostos já existentes. Desta forma, acreditamos que o composto inorgânico IQG607, também conhecido como pentaciano(isoniazida)ferrato (II), desenvolvido na tentativa de encontrar novos inibidores mais potentes e seletivos para a enzima InhA, é um candidato promissor ao desenvolvimento de novas drogas anti-tuberculose. Este trabalho iniciou com uma pesquisa na literatura científica buscando compreender o papel da enzima InhA no processo de síntese de ácidos graxos e o que estes representam no processo de formação do envelope celular das micobactérias. Além disso, foi realizado um levantamento a respeito dos estudos já publicados sobre o IQG607, que relatam os esforços empenhados na pesquisa e obtenção do composto. Com base nestes estudos, foi proposto o desenho de novos compostos introduzindo modificações estruturais na molécula do IQG607 original, com o auxílio de *software* específico.

As interações intermoleculares desses compostos com a proteína alvo foram simuladas e avaliadas, com o uso dos programas *AutoDock* e *LigPlot*. Vinte e sete modelos foram desenhados, e para todos eles foram realizadas as simulações *in silico*. Três desses compostos foram selecionados e, deles, um foi sintetizado com sucesso. Após a síntese, ensaios enzimáticos avaliaram se o novo composto mantinha a função inibitória comprovadamente encontrada no IQG607 original, caracterizando a etapa *in vitro* deste trabalho. Infelizmente, embora as simulações *in silico* tenham nos levado a crer que os modelos desenhados poderiam gerar bons compostos, já no início da etapa *in vitro* se descobriu que não havia variação na atividade da enzima, o que indica que o composto não apresentou o efeito inibitório esperado. Em nossa tentativa de alongar o composto IQG607, permitindo assim um número maior de ângulos de torção para a molécula, e com isso, promover um melhor encaixe do ligante na cavidade de ligação do substrato, descobrimos que dois grupamentos importantes da INH foram separados, o que provocou a perda de atividade do fármaco. Supõe-se que as modificações introduzidas no composto IQG607 impediram a formação do radical acil e, portanto, o aduto com o NADH não pôde ser formado.

Palavras-chave: IQG607. InhA. *Mycobacterium tuberculosis*. Desenho de Compostos. Docagem Molecular. Síntese. Formação de Radical Acilado.



## Abstract

Since its discovery, Isoniazid remains the main drug used to treat tuberculosis, which has the 2-*trans*-enoyl-ACP(CoA) reductase or InhA enzyme of *Mycobacterium tuberculosis* as pharmacological target. However, the increase in cases of tuberculosis resistant to Isoniazid motivated the pharmaceutical industry and research groups to investigate possible inhibitors to InhA, whether seeking for new compounds that display the inhibitory function, or as proposed in this work, modifying existing compounds. Thus, we believe that the IQG607 inorganic compound, also known as pentacyano(Isoniazid)ferrate (II) - developed in an attempt to find new, more potent and selective inhibitors of the InhA enzyme - is a promising candidate for the development of new anti-tuberculosis drugs. This work began with a literature review in order to understand the role of InhA enzyme in the process of fatty acid synthesis and what they represent in the process of formation of the cell envelope of mycobacteria. In addition, a survey was conducted regarding the published studies on the IQG607, which reported efforts engaged in researching and obtaining the compound. Based on these studies, it was proposed the design of new compounds by introducing structural modifications in the IQG607 molecule, with the aid of specific software.

Intermolecular interactions of these compounds with the target protein were simulated and evaluated with the use of *AutoDock* and *LigPlot*. Twenty-seven models were designed, and for all of them, simulations were performed *in silico*. Three of these compounds were selected, and from those one was successfully synthesized. After synthesis, enzymatic assays were carried out to assess whether the new compound had demonstrated inhibitory function as found in the original IQG607. Unfortunately, although the *in silico* simulations have led us to believe that the models designed could generate good compounds, early in the *in vitro* experiments we found that there was no variation in the enzyme's activity, indicating that the compound showed no inhibitor effect. In our attempt to lengthen the IQG607 compound - thus allowing a greater number of torsion angles for the molecule, and thereby promote a better fit of the ligand binding cavity in the substrate - we discovered that two important pieces of INH were separated, which caused the loss of activity of the compound. It appears that the changes which were introduced in the IQG607 compound have hindered the acyl radical formation and therefore the adduct ligand-NADH could not be formed.

Key words: IQG607. InhA. *Mycobacterium tuberculosis*. Design of Compounds. Molecular Docking. Inorganic Synthesis. Acyl Radical Formation.



# 1 Introdução

## 1.1 Alvos Farmacológicos para o Tratamento da Tuberculose

Embora todos os esforços feitos por pesquisadores e seus grupos de colaboradores nas últimas décadas, a tuberculose (TB) é uma doença que nunca foi totalmente erradicada, e portanto, continua sendo considerada um sério problema de saúde pública. A TB é causada por micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, sendo este formado pelas espécies *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* e *M. tuberculosis*. A forma clínica da doença é caracterizada principalmente pelo comprometimento dos pulmões, podendo também se manifestar de forma extrapulmonar. A transmissão se dá pela interação de pessoa para pessoa, por via aérea, através de partículas aerossóis produzidas pelo indivíduo portador da doença, quando este tosse, espirra ou fala (Pandolfi *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2012).

O Mtb é naturalmente resistente a vários antibióticos, tornando o tratamento da tuberculose uma tarefa muito difícil. Esta resistência está diretamente relacionada à constituição da parede celular das micobactérias, uma vez que o envelope celular do organismo é considerado altamente hidrofóbico, agindo assim como uma barreira impermeável. Além disso, muitos determinantes de resistência em potencial são também codificados no próprio genoma (Cole *et al.*, 1998; Andrade *et al.*, 2008).

Existe atualmente um consenso na literatura científica a respeito da ideia de que o surgimento de várias cepas de Mtb resistentes às drogas hoje conhecidas no mercado, e à sinergia entre a infecção pelo HIV e o Mtb, tornam a TB um sério problema de saúde pública, que assume proporções mundiais (Cole *et al.*, 1998; Mdluli *et al.*, 2006; Raman *et al.*, 2008).

A sequência completa do genoma do Mtb foi publicada em 1998 (Cole *et al.*, 1998). A análise do genoma facilitou o processo de busca por alvos promissores para o tratamento da TB. Como a maioria dos antibacterianos são essencialmente inibidores de enzimas específicas de bactérias, estas podem ser consideradas como alvos potenciais de novas drogas (Galperin *et al.*, 1999). Neste contexto, as enzimas que compõem o sistema de síntese de ácidos graxos do tipo FAS-II podem ser consideradas candidatas ideais para a descoberta de novas drogas, uma vez que o sistema FAS-II está ausente em seres humanos, sendo substituído por um sistema FAS-I que é insensível a muitos inibidores FAS-II. Em outras palavras, as enzimas que pertencem às vias do Mtb, e que não apresentam similaridade com qualquer proteína do hospedeiro, representam um forte atrativo para o

desenvolvimento de novas drogas.

Desde o início da década de 40, com o surgimento do primeiro fármaco para o tratamento da TB, pesquisadores e a indústria farmacêutica vem somando esforços para tornar o regime anti-TB mais efetivo. A Tabela 1, adaptada de (Zhang, 2005) resume as principais informações acerca dos fármacos mais comuns prescritos aos pacientes diagnosticados com TB.

Tabela 1: Fármacos comumente utilizados para o tratamento da tuberculose

Fármaco/ano de descoberta	Alvo	Mecanismo de ação	Genes x Resistência	MIC <sup>a</sup> (g/ml)
Estreptomicina <sup>b</sup> (1944)	Proteína ribossomal S12 e rRNA 16S	Inibição de síntese de proteínas	<i>rpsL</i> e <i>rrs</i>	2-8
Ácido Para-amino-salicílico (PAS) (1948)	Desconhecido	Provável inibição de ác. fólico e metabolismo do Fe	Desconhecido	1-8
Isoniazida <sup>b</sup> (1952)	InhA	Inibição da síntese de ác. micólicos, e múltiplos efeitos no metabolismo de lipídeos, carboidratos e NAD	<i>inhA</i> , <i>ndh</i> e <i>katG</i>	0.01-0.2
Pirazinamida <sup>b</sup> (1952)	Metabolismo energético de membrana	Interrupção no transporte de membrana e diminuição de energia	<i>pncA</i>	20-100 (pH 5.5 ou 6)
Cicloserina (1952)	D-alanina racemase <sup>c</sup>	Inibição da síntese de peptidoglicanos	<i>alrA</i> , <i>Ddl</i>	5-20
Etionamida <sup>d</sup> (1956)	InhA	Inibição da síntese de ác. micólicos	<i>inhA</i> , <i>etaA/ethA</i>	0.6-2.5
Canamicina (ref 1957)	rRNA 16S	Inibição de síntese de proteínas	<i>rrs</i>	1-8
Etambutol <sup>d</sup> (1961)	Arabinosil transferase	Inibição da síntese de arabinogalactanos da parede celular	<i>embCAB</i>	1-5
Quinolonas <sup>d</sup> (1963)	DNA girase	Inibição da síntese de DNA	<i>gyrA</i> e <i>gyrB</i>	0.2-4
Rifampicina <sup>b</sup> (1965)	RNA polimerase subunidade $\beta$	Inibição da síntese de RNA	<i>rpoB</i>	0.05-0.5

<sup>a</sup>MIC baseado em Inderlied and Salfinger (1995)

<sup>b</sup>Fármaco de primeira linha.

<sup>c</sup>D-alanina Racemases ocorrem na parede celular bacteriana e tem a função de catalisar a inversão estereoquímica em moléculas biológicas.

<sup>d</sup>Fármaco de segunda linha.

Como pode ser observado na tabela, o último fármaco verdadeiramente antituberculose descoberto e sintetizado data do ano de 1965, ou seja, ao que parece, há mais de 40 anos não é lançado um novo medicamento no mercado. Ao longo desses anos surgiram novos medicamentos para o tratamento da tuberculose, mas que não foram investigados como verdadeiros fármacos antituberculose. Portanto, diante dessa realidade, e considerando todo o complexo mecanismo de resistência aos fármacos atuais, existe uma crescente necessidade para que haja uma colaboração por parte não só do setor privado, mas também de instituições públicas ou acadêmicas, na forma de novas ideias, pesquisas e desenvolvimento, que possam efetivamente melhorar essa situação.

Tendo em mente as questões levantadas, a enzima InhA ou 2-*trans*-enoil-ACP(COA) redutase (EC number 1.3.1.9) de *Mycobacterium tuberculosis*, reconhecida na literatura científica como um importante alvo farmacológico no tratamento da TB (Vilchèze *et al.*, 2007; Andrade *et al.*, 2008), foi escolhida neste projeto de pesquisa como modelo receptor devido ao seu importante papel na biossíntese de ácidos graxos formadores da parede celular do Mtb, sendo este melhor detalhado na seção 1.2.

## 1.2 Biossíntese de Ácidos Graxos

Os ácidos micólicos são ácidos graxos de cadeia longa encontrados na parede celular de micobactérias. Estes ácidos foram isolados e identificados pela primeira vez por Stodola *et al.* (1938) a partir de um extrato de Mtb. Sua estrutura foi elucidada por Asselineau (1950), e demonstrou ser formada por uma cadeia  $\beta$ -hidroxi- $\alpha$ -alquil ramificada, onde cada molécula é composta por 60 a 90 átomos de carbono. Sendo o número exato de carbonos variável entre as espécies.

A parede celular do Mtb é predominantemente formada por três macromoléculas covalentemente ligadas: peptideoglicano, arabinogalactano e ácidos micólicos, formando o chamado complexo micolil-arabinogalactano-peptideoglicano (mAGP) como mostra a Figura 1, extraída de (Schroeder, 2004).

O envelope celular do Mtb é bastante diferenciado e está associado à patogenicidade do organismo. A presença dos ácidos micólicos na parede celular confere ao Mtb características que desafiam o tratamento médico. Eles permitem ao bacilo uma maior resistência a danos químicos e desidratação, e impedem a atividade de fármacos hidrofóbicos. Uma característica marcante do envelope celular é a presença de micolato arabinogalactano covalentemente ligado à parede celular do peptideoglicano através de uma ligação fosfodiéster situada no folheto interno da membrana exterior e de um glicolípido livre, chamado dimicolato de trealose (TDM), o qual se acumula de forma semelhante na superfície das células. Isso permite a formação de uma espessa camada de lípidos na parte exterior da célula que confere

proteção ao bacilo a produtos químicos nocivos e ao sistema imune do hospedeiro. Os ácidos micólicos são os principais constituintes desta camada protetora. Também desempenham outras funções importantes, como componentes estruturais da parede celular e do envelope. Mais especificamente, os anéis de ciclopropano dos ácidos micólicos do Mtb contribuem para manter a integridade estrutural do complexo da parede celular e proteger o bacilo de estresse oxidativo (Takayama *et al.*, 2005). Além disso, os ácidos micólicos permitem que o bacilo cresça rapidamente no interior dos macrófagos, escondendo-se de forma eficaz, sendo assim, mascarado pelo sistema imune do hospedeiro. Tal fato faz da biossíntese de micolatos uma via crucial para a sobrevivência e patogenicidade do Mtb (Bhatt *et al.*, 2007).

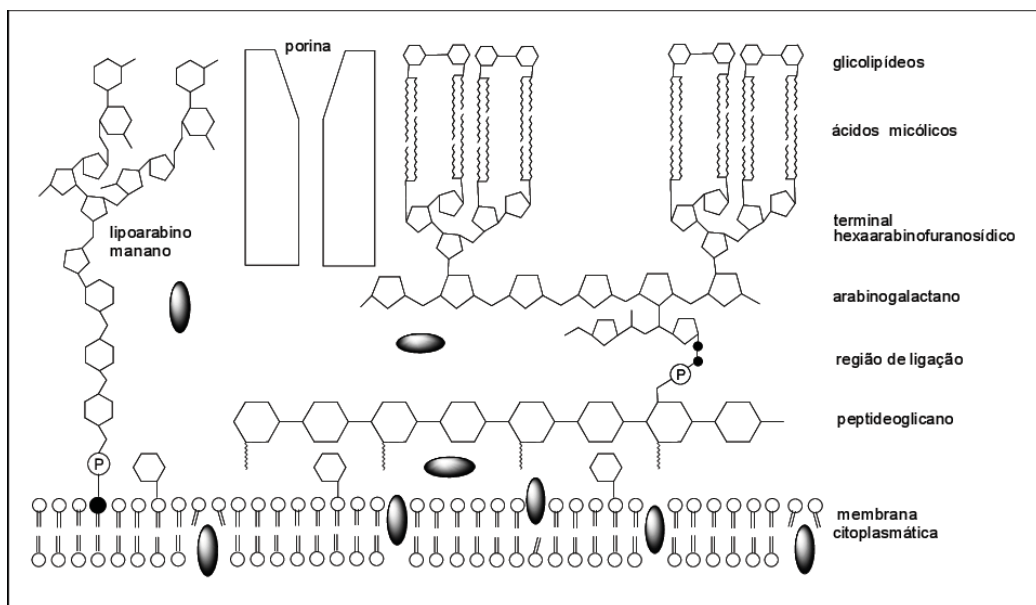


Figura 1: Representação esquemática da parede celular de *Mycobacterium tuberculosis* (Schroeder, 2004).

Com os avanços nos estudos genômicos, sabe-se hoje que mais de 250 genes em Mtb codificam enzimas envolvidas no metabolismo de lipídeos e que estes desempenham funções importantes no envelope celular (Anishetty *et al.*, 2005). Dentre estas enzimas, algumas estão diretamente relacionadas ao sistema de síntese de ácidos graxos conhecido como sistema FAS (*Fatty Acid Synthase*). Este mecanismo é composto por repetidos ciclos de condensação, ceto-redução, desidratação e enoil-redução.

No sistema FAS I ocorre a síntese *de novo* de ácidos graxos. Eucariotos, em geral, realizam a síntese de ácidos graxos através deste sistema, onde toda a atividade enzimática envolvida no processo é catalisada por uma única cadeia polipeptídica. Em contrapartida, organismos como bactérias e plantas apresentam um sistema onde cada reação de formação dos ácidos graxos é catalisada por uma enzima diferente - este é o segundo tipo de sistema de formação de ácidos graxos, denominado sistema FAS II.

O interessante é que, diferentemente desses organismos citados e assim como o *Plasmodium falciparum* (um dos agentes causadores da malária), o Mtb possui ambos os sistemas FAS I e FAS II.

Em Mtb, o sistema FAS I sintetiza os ácidos graxos por reações sucessivas de condensação de resíduos malonato ao acetil-CoA, apresentando uma distribuição bimodal ( $C_{16-18}$  e  $C_{24-28}$ ). Quando a cadeia atinge o tamanho adequado, estes resíduos são removidos do complexo pela enzima transacilase, na forma de acil-CoA de cadeia longa. A enzima mtFabH catalisa a condensação destes precursores acil-CoA com malonil-AcpM (um tioéster de ácido malônico ligado ao ACP característico de Mtb, o AcpM). O produto formado continua sendo alongado pelo sistema FAS II, resultando em cadeias carbônicas de 50 a 60 carbonos, que servirão de precursores da cadeia meromíclica. Os produtos mais longos do sistema FAS I ( $C_{24-26}$ ) ligados à CoA, também são retirados do ciclo de alongamento, e são usados como substrato na formação da cadeia  $\alpha$  dos ácidos micólicos.

O sistema FAS II estende esses ácidos graxos para formar cadeias mais longas ( $C_{56}$ ) necessárias para a síntese de ácidos micólicos formadores da parede celular do Mtb. O alongamento de cadeia é feito por quatro enzimas. O ciclo de reações que compõe o sistema FAS II começa com a condensação de uma unidade de malonil-AcpM à cadeia de ácido graxo, na forma de acil-AcpM, sendo esta etapa catalizada por duas  $\beta$ -cetoacil-ACP sintases (KasA e KasB), liberando AcpM e  $CO_2$ . O grupo ceto do  $\beta$ -cetoéster resultante é então reduzido pela enzima  $\beta$ -cetoacil-ACP redutase (MabA) dependente de NADH. A eliminação do grupo  $\beta$ -OH por uma  $\beta$ -hidroxiacil-ACP desidratase forma um derivado 2-*trans*-enoil-AcpM. A etapa final do ciclo culmina com a redução da ligação dupla do enoil-AcpM pela enzima InhA, uma 2-*trans*-enoil-ACP redutase NADH-dependente, ou seja, ela necessita do NADH ( $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida) para levar o acil-AcpM correspondente à condensação do malonil-AcpM, como é mostrado na Figura 2, extraída de Schroeder (2004).

Como pode ser observado, a InhA é uma das quatro enzimas responsáveis pelo alongamento das cadeias de ácidos graxos que leva a formação de meromicolatos ( $C_{56}$ ). Desta forma, pode-se notar que a enzima desempenha um papel de grande importância no processo de formação desses ácidos e, sendo assim, estratégias terapêuticas fundamentadas no “desligamento” ou inibição desta enzima provoca a interrupção da síntese de componentes importantes para o processo de formação da parede celular da micobactéria, o que torna a sobrevivência do organismo inviável.

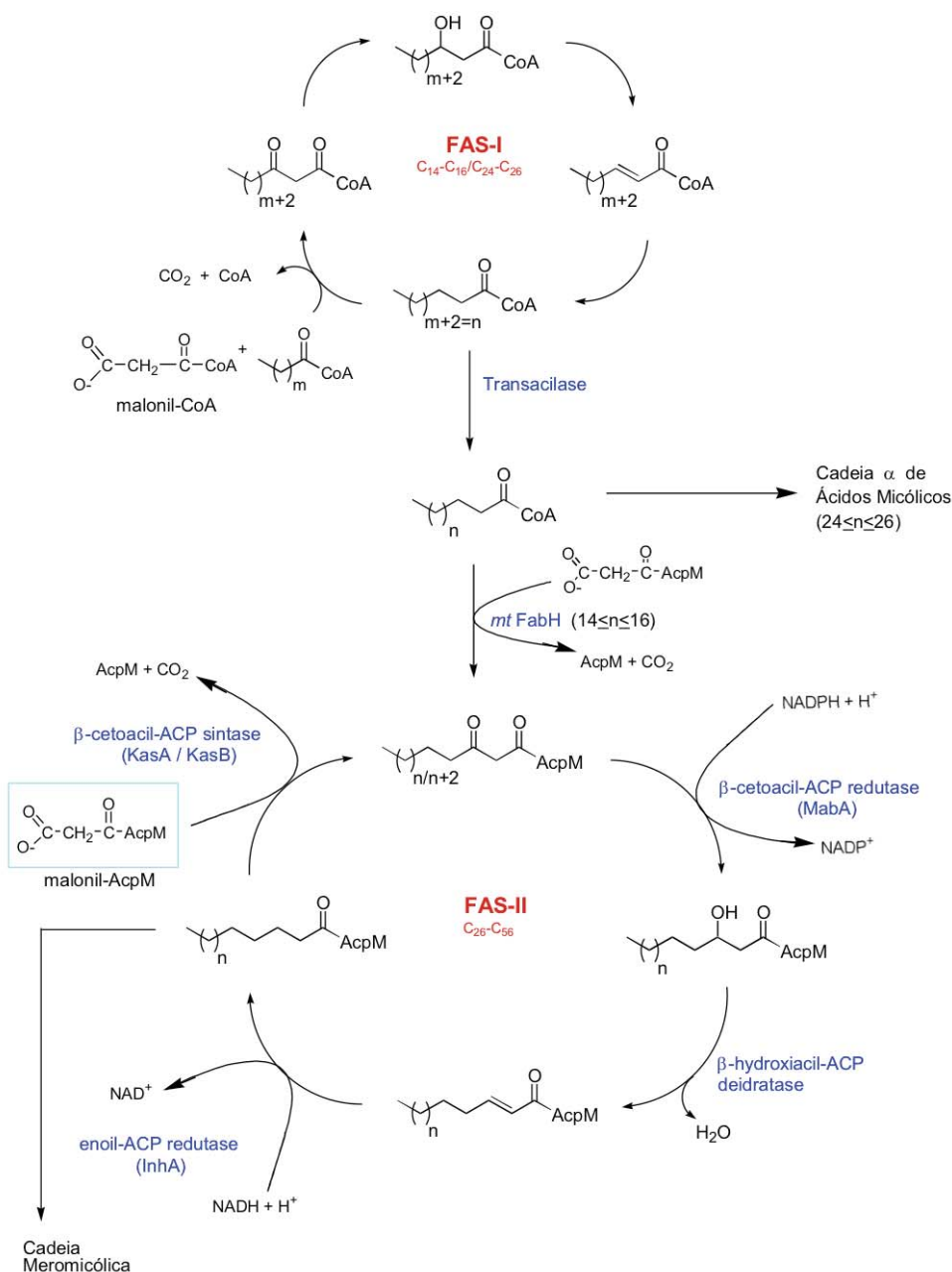


Figura 2: Biossíntese dos ácidos micólicos das micobactérias. Figura extraída de Schroeder, E. (2004).

### 1.3 Caracterização da Enzima InhA de *Mycobacterium tuberculosis*

#### 1.3.1 Características da Proteína InhA

A proteína InhA foi escolhida para ser o modelo receptor empregado neste trabalho devido a sua importância no mecanismo de ação da tuberculose. Ela catalisa a última reação da sequência de alongamento da cadeia de ácidos graxos do sistema FAS II do



Mtb, sendo responsável pela redução NADH-dependente de derivados 2-*trans*-enoil-ACP de ácidos graxos de cadeias longas em seu correspondente saturado, tendo esta, preferência por substratos de cadeia carbônica longa (12-24 carbonos). Tal reação é considerada a principal reação do processo bioquímico de síntese de ácidos graxos e regula o ciclo de alongamento destes ácidos. Neste processo de redução, a InhA catalisa a transferência de hidrogênio, na forma de hidreto ( $H^-$ ) do NADH para o substrato, resultando na redução da ligação dupla ( $\alpha$ -tioéster) entre os carbonos C2 e C3, da porção lipídica do substrato.

Em 1995, Dessen *et al.*, obtiveram por meio de difração de raios-X, a primeira estrutura 3D da InhA - espécie selvagem (wt) - e sua coenzima NADH (PDB ID: 1ENY - Dessen *et al.*, 1995). Isto permitiu um estudo mais aprofundado do mecanismo de ação e inibição da proteína. A enzima é codificada pelo gene *inhA*, e apresenta 268 resíduos de aminoácidos somando uma massa molecular de aproximadamente 29 kDa. A enzima pertence à família das SDR (*short chain dehydrogenase/reductase*), que utilizam o NADH como coenzima.

A principal característica desta família é a topologia do esqueleto polipeptídico, onde cada subunidade da proteína é formada por um único domínio com o núcleo central do tipo *Rossmann fold* (Dessen *et al.*, 1995; Schroeder, 2004). Este caracteriza-se por uma folha de 7 fitas beta ( $\beta$ ) paralelas, contornadas por 8 hélices alfa ( $\alpha$ ), conectadas por alças e voltas, formando o sítio de ligação do NADH e a cavidade de ligação do substrato, como mostra a Figura 3. Para facilitar a visualização da estrutura da proteína, os autores a descreveram como tendo uma aparência de “cadeira” (Dessen *et al.*, 1995) onde, as “pernas” e o “encosto” são topologicamente semelhantes a outras desidrogenases. O sítio de ligação da proteína pode ser descrito como uma forma de “bolso” que se encontra entre o “encosto e o assento” na estrutura. O NADH se posiciona em uma conformação estendida (como se estivesse sentado neste bolso) ao longo do topo do C terminal. O anel de adenina do NADH encontra-se paralelo ao assento da estrutura da InhA, enquanto que a porção nicotinamida fica voltada para trás, apontando para a cavidade formada pelas fitas  $\beta 4$ ,  $\beta 5$  e  $\beta 6$ , e pelas hélices  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  e  $\alpha 7$  (Dessen *et al.*, 1995). A "alça de ligação do substrato" é formada pelas hélices  $\alpha 6$  e  $\alpha 7$  (Schroeder, 2004).

A enzima InhA é um homotetrâmero, formado por 4 subunidades iguais, que apresentam seus sítios de ligação voltados para fora sendo totalmente independentes um do outro. Tal fato justifica o uso de apenas uma subunidade da enzima para o estudo proposto nesta tese de doutorado.

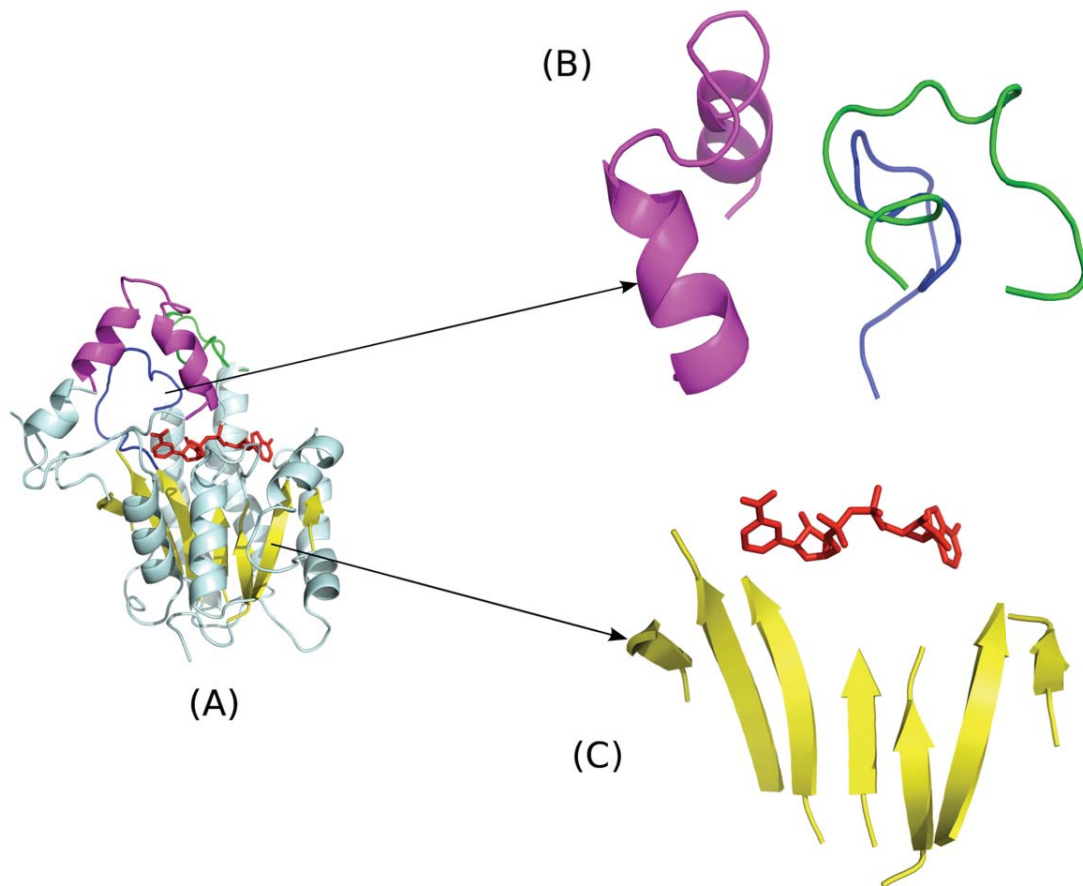


Figura 3: Representação em *ribbons* da estrutura 3D da proteína InhA de *M. tuberculosis* (código PDB: 1ENY). (A) Representação da enzima de acordo com a analogia feita em comparação a uma cadeira (Dessen *et al.*, 1995), onde em azul claro vemos as 8 hélices  $\alpha$ , em (B) temos a alça de ligação do substrato na cor magenta, seguida das alças A e B coloridas em verde e azul escuro, respectivamente. Um destaque é dado a estas alças por representar uma região de grande flexibilidade da proteína - um aspecto importante na interação da enzima com moléculas ligantes. Em amarelo (C) estão as 7 fitas  $\beta$  paralelas; caracterizando a topologia do tipo *Rossmann* (*Rossmann fold*), principal característica desta família de proteínas. Em vermelho o NADH acoplado ao sítio de ligação. Figura da Autora.

### 1.3.2 Visão Geral das 39 Estruturas da InhA depositadas no Banco de Dados PDB

Atualmente existem 39 depósitos de estruturas 3D da enzima InhA de Mtb no Banco de Dados de Proteínas PDB (Berman *et al.*, 2000) (última data de acesso ao Banco de Dados: Novembro de 2012), que compreendem desde a estrutura estrutural livre da coenzima (mutante PDB ID: S94A), a estruturas complexadas com a coenzima NADH e diferentes ligantes. A Tabela 2 sumariza as principais características desses depósitos, e a Tabela 3 descreve cada um dos ligantes. A ordem na tabela segue a data de liberação dos depósitos das estruturas no banco de dados.



Tabela 2: Estruturas da enzima InhA depositadas no banco de dados de estruturas 3D - *Protein Data Bank* – até o momento.

Código PDB	Cadeia(s)	Vol./cavidade (Å)	Ligante	Resol. (Å)	Referência
1ENY	A	598.2	NADH	2.20	Dessen et al. (1995)
1ENZ <sub>(S94A)</sub>	A	1011.6	NADH	2.70	Dessen et al. (1995)
1ZID <sub>(T2A)</sub>	A	1071	NAD+INH	2.70	Rozwarski et al. (1998)
1BVR	A - F	735	NAD+C16 (THT)	2.80	Rozwarski et al. (1998)
1P44	A - F	1691.9	NAD+GEQ	2.70	Kuo et al. (2003)
1P45	A, B	970.4	NAD+TCL	2.60	Kuo et al. (2003)
2B35	A - F	1080.4	NAD+TCL	2.30	Sullivan et al. (2006)
2B36	A - F	949.5	NAD+5PP	2.80	Sullivan et al. (2006)
2B37	A - F	445.1	NAD+8PS	2.60	Sullivan et al. (2006)
2AQ8	A	1425.6	NAD+Lys	1.92	Oliveira et al. (2006)
2AQH <sub>(I21V)</sub>	A	556.9	NADH	2.01	Oliveira et al. (2006)
2AQI <sub>(I47T)</sub>	A	662.9	NADH	2.20	Oliveira et al. (2006)
2AQK <sub>(S94A)</sub>	A	1329.3	NADH	2.30	Oliveira et al. (2006)
2H7I	A	1451	NAD+566	1.62	He et al. (2006)
2H7L	A	1674.4	NAD+665	1.73	He et al. (2006)
2H7M	A	1482.1	NAD+641	1.62	He et al. (2006)
2H7N	A	781.2	NAD+744	1.90	He et al. (2006)
2H7P	A	850.9	NAD+468	1.86	He et al. (2006)
2NV6 <sub>(D2A, S94A)</sub>	A	1016.1	NAD+INH	1.90	Vilchèze et al. (2006)
2H9I	A	1036.2	NAD+ETH	2.20	Vilchèze et al. (2006)
2NTJ	A, B	1210	NAD+PTH	2.50	Vilchèze et al. (2006)
2IDZ	A	501.2	NAD+INH	2.00	Dias et al. (2007)
2IEO	A	289.2	NAD+INH	2.20	Dias et al. (2007)
2IEB	A	369.5	NAD+INH	2.20	Dias et al. (2007)
2IED <sub>(S94A)</sub>	A - D	1596.7	...	2.14	Dias et al. (2007)
2NSD	A, B	1434.3	NAD+4PI	1.90	He et al. (2007)
2PR2	A	341.8	NADP+INH (DG1)	2.50	Argyrou et al. (2007)
3FNE	A - D	1503	NAD+TCL (8PC)	1.98	Freundlich et al. (2009)
3FNF	A - D	756.5	NAD+TCL (JPM)	2.30	Freundlich et al. (2009)
3FNG	A	1144.7	NAD+TCL (JPL)	1.97	Freundlich et al. (2009)
3FNH	A	693.8	NAD+TCL (JPJ)	2.80	Freundlich et al. (2009)
2X22	A, B	1225.1	NAD+DMS+TCU	2.10	Luckner et al. (2010)
2X23	A,B,E,G	601.6	NAD + DMS + TCU	2.10	Luckner et al. (2010)
3OEW	A	1516.4	MPD + NAD	2.20	Molle et al. (2010)
3OEY <sub>(T266E)</sub>	A	1439.2	MPD + NAD	2.00	Molle et al. (2010)
3OF2 <sub>(T266D)</sub>	A	1377	MPD + NAD	2.00	Molle et al. (2010)
4DQU <sub>(D148G)</sub>	A	1147.1	NAD	2.45	Hartkoorn et al. (2012)
4DRE	A	596.5	NAD	2.40	Hartkoorn et al. (2012)
4DTI <sub>(S94A)</sub>	A	827.5	NAD	1.90	Hartkoorn et al. (2012)

Tabela 3: Nomenclatura dos ligantes complexados com as estruturas da InhA segundo IUPAC

Ligante	Nomenclatura
468	(3S)-N-(3-cloro-2-metilfenil)-1-cicloexil-5-oxopirrolidina-3-carboxamida
4PI	N-(4-metilbenzoil)-4-benzilpiperidina
566	(3S)-1-cicloexil-5-oxo-N-fenilpirrolidina-3-carboxamida
5PP	5-pentil-2-fenoxifenol
641	(3S)-1-cicloexil-N-(3,5-diclorofenil)-5-oxopirrolidina-3-carboxamida
665	(3S)-N-(3-bromofenil)-1-cicloexil-5-oxopirrolidina-3-carboxamida
744	(3S)-N-(5-cloro-2-metilfenil)-1-cicloexil-5-oxopirrolidina-3-carboxamida
8PC	2-(2,4-diclorofenoxi)-5-(piridina-2-ilmetil)fenol
8PS	5-octil-2-fenoxifenol
DG1	(4S)-isonicotinico-acetil-nicotinamida-adenina-dinucleotideo
DMS	dimetil sulfóxido
ETH	etionamida
GEQ	5-[[4-(9H-fluoren-9-il)piperazina-1-il]carbonil]-1H-indol
JPJ	2-(2,4-diclorofenoxi)-5-(2-feniletil)fenol
JPL	5-(cicloexa-1,5-dien-1-ilmetil)-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol
JPM	5-benzil-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol
LYS	lisina
MPD	(4S)-2-metil-2,4-pentanodiol
NAD	nicotinamida-adenina-dinucleotideo
PTH	protionamida
TCL	triclosan
TCU	5-hexil-2-(2-metilfenoxi)fenol
THT	trans-2-hexadecenoil-(N-acetil-cisteamina)-tioéster
ZID	isonicotinico-acetil-nicotinamida-adenina-dinucleotideo

### 1.3.3 Análise do Volume das Cavidades das Estruturas Depositadas no Banco de Dados PDB

A escolha do modelo receptor utilizado para as simulações de docagem molecular foi baseada em uma análise prévia do volume da cavidade de ligação do substrato das estruturas da proteína InhA depositadas no Banco de Dados de Proteínas PDB.

O *software CASTp* (Dundas *et al.*, 2006) foi empregado para esta análise. Trata-se de um sistema *online* que identifica cavidades em estruturas tridimensionais de macromoléculas como proteínas e DNA. O arquivo em formato PDB da estrutura de interesse é submetido ao sistema, que faz as medições e mostra na tela o resultado esperado por meio de um visualizador JMOL, como pode ser visto na Figura 4.

O sistema identifica “bolsos” na superfície de proteínas e outras moléculas, acessíveis ao solvente, assim como as cavidades interiores de difícil acesso. Frequentemente, alguns bolsos ou cavidades estruturais podem estar associados aos sítios de ligação e sítios ativos da proteína. Uma vez identificados, o programa mede

analiticamente a área e o volume de cada bolso e da cavidade, tanto na superfície acessível ao solvente (SA, superfície de Richards) quanto da superfície molecular (MS, superfície de Connolly). O programa também mede o número de aberturas, a área destas aberturas e a circunferência, tanto na SA quanto na MS de cada bolso.

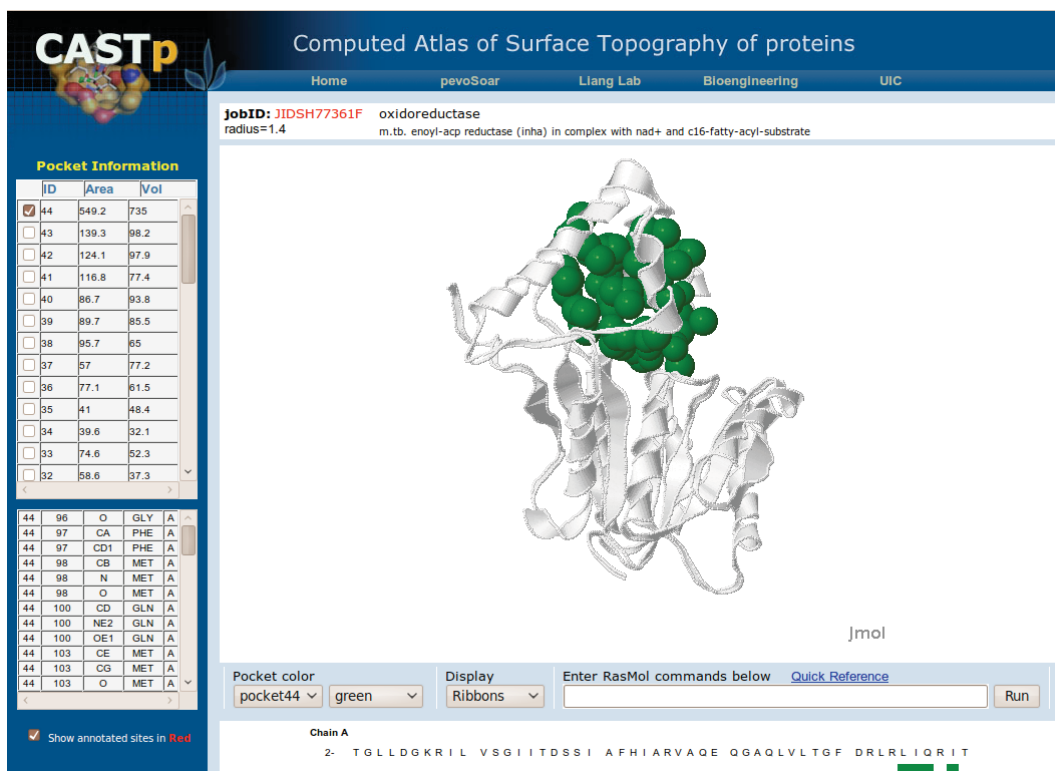


Figura 4: Área de trabalho do sistema *CASTp*. A figura mostra em branco a proteína de interesse e em verde o volume da cavidade calculada. A esquerda da imagem pode ser observada uma lista de todas as cavidades e os respectivos volumes que foram encontrados ao completar a análise. Figura da Autora.

As 39 estruturas depositadas no banco de dados foram submetidas ao sistema. O tamanho da cavidade foi então comparado e após esta análise optou-se por realizar simulações de docagem molecular nas estruturas 1ENY, 1BVR, 1P44 e 1P45 para, com base na modificação proposta para a molécula do ligante<sup>1</sup>, tentar fazer com que este ocupe o lugar do substrato no sitio de ligação da enzima InhA. Segundo Freundlich *et*

<sup>1</sup> Em Bioquímica e Farmacologia, um ligante (do Latim ligare = ligar) é qualquer molécula que é capaz de ligar e formar um complexo com outra biomolécula para servir a um propósito. Em um sentido mais restrito, é uma molécula sinalizadora, que se liga ao sítio de uma proteína-alvo e geralmente desencadeia uma resposta biológica. Ligantes incluem substratos, inibidores, ativadores, e neurotransmissores. A ligação ocorre devido a forças intermoleculares, tais como pontes salinas, ligações de hidrogênio e forças de van der Waals, e geralmente tem caráter reversível em sistemas biológicos. Para esta Tese de Doutorado, a palavra ligante se refere ao composto IQG607, inibidor da InhA, bem como todos modelos derivados desenhados pela autora.

*al.* (2009), todos os inibidores da InhA relatados até o momento, ocupam a cavidade de ligação do substrato, com exceção dos adutos INH\_NADH e ETH\_NADH que ocupam uma cavidade formada pela movimentação da cadeia lateral do resíduo Phe149. Esta porção da proteína é constituída por resíduos de aminoácidos altamente hidrofóbicos o que favorece a ligação da molécula inibidora, além disto, a cavidade oferece também espaço suficiente para que o ligante possa se movimentar e conseqüentemente procurar o melhor encaixe, sem que esta se choque com átomos pertencentes às cadeias laterais do receptor. Como pode ser observado na Tabela 2, os volumes das quatro estruturas previamente selecionadas são de  $598.2 \text{ \AA}^3$ ,  $735 \text{ \AA}^3$ ,  $1691.9 \text{ \AA}^3$  e  $970.4 \text{ \AA}^3$  respectivamente. A Figura 5 mostra uma comparação desses volumes, calculado com o sistema *CASTp*.

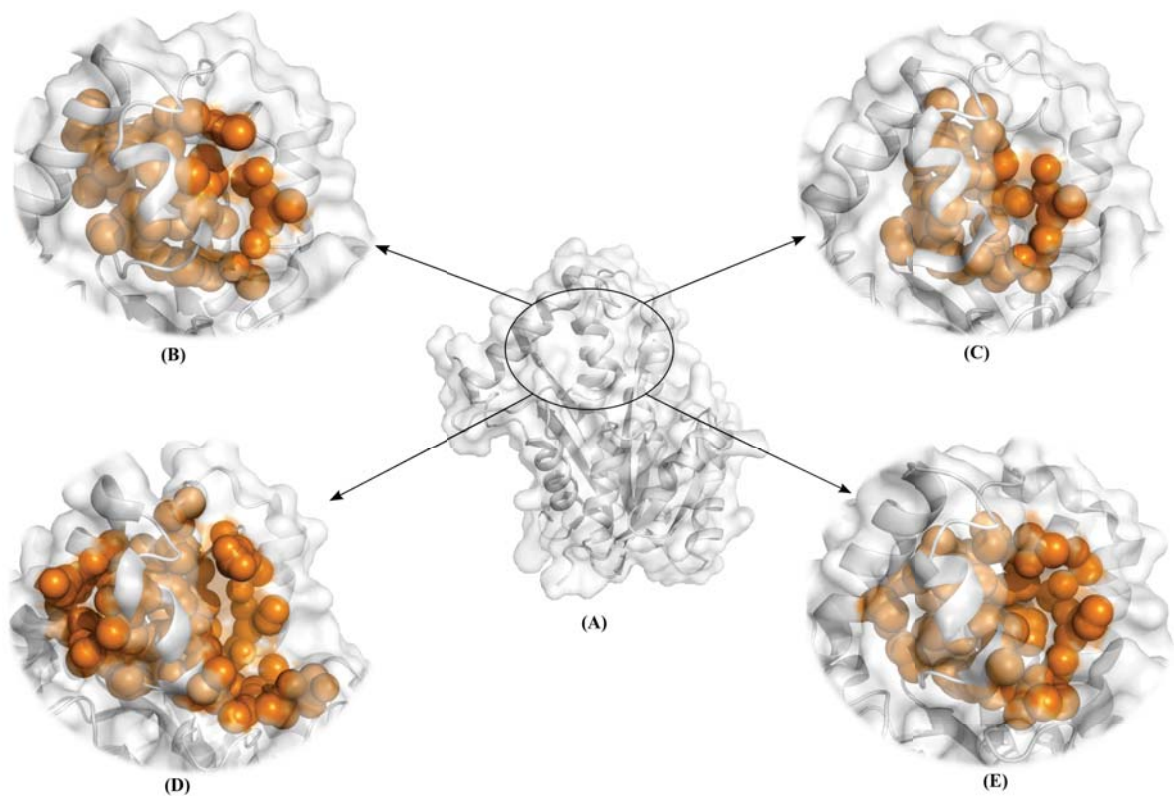


Figura 5: Representação do volume da cavidade de ligação do substrato. (A) Em branco, representado por *ribbons* e superfície molecular, está a proteína InhA de *M. tuberculosis*, e em esferas na cor laranja, uma comparação da cavidade do substrato identificada pelo sistema *CASTp* (Dundas *et al.*, 2006). Em (B) a cavidade da estrutura 1BVR ( $735 \text{ \AA}^3$ ), em (C) a cavidade da estrutura 1ENY ( $598.2 \text{ \AA}^3$ ), em (D) a cavidade da estrutura 1P44 ( $1691.9 \text{ \AA}^3$ ) e em (E) a cavidade da estrutura 1P45 ( $970.4 \text{ \AA}^3$ ). Figura da Autora.

### 1.4 *Fármaco Isoniazida (INH)*

Na década de 40, a estreptomicina era a alternativa mais eficiente no tratamento da TB (Vilchère *et al.*, 2007; Waksman *et al.*, 1953), porém com uma grande desvantagem de apresentar alto teor de toxicidade ao paciente. Em contrapartida, o ácido p-aminosalicílico (PAS) era considerado um composto de baixa toxicidade, mas também com baixa atividade contra a TB. Mais tarde, pesquisadores europeus descobriram que a vitamina nicotinamida apresentava atividade contra a TB, e novas moléculas sintéticas à base de nicotinamida foram criadas. Com isto nasceu a pirazinamida. E com ela, outros compostos com a finalidade de aumentar a atividade da nicotinamida. A chegada da Isoniazida (hidrazida do ácido isonicotínico - INH) uma década mais tarde certamente foi muito bem recebida por médicos e pacientes daquela época (Figura 6).

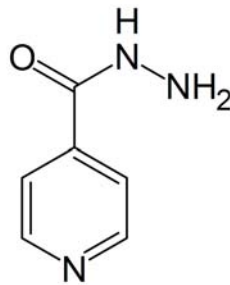


Figura 6: Fórmula estrutural da Isoniazida (INH). Figura da Autora.

A INH é um dos principais fármacos utilizados no tratamento da tuberculose desde 1952 - ano de sua descoberta - e tem como alvo a enzima InhA (Rozwarski *et al.*, 1998; Schroeder *et al.*, 2002) do sistema de biossíntese de ácidos graxos da parede celular do Mtb - sendo esta uma via essencial para a sobrevivência da micobactéria. É um consenso na literatura a afirmação de que a INH representa um dos mais eficientes fármacos usados para o tratamento da TB (Vilchère *et al.*, 2007). Apesar de sua estrutura química ser considerada relativamente simples, o mesmo não pode ser dito de seu mecanismo de ação, o que será discutido na seção 1.4.1.



### 1.4.1 Mecanismo de Ação da INH

Por ser um pró-fármaco (bioprecursor)<sup>2</sup>, o mecanismo de ação da INH não é direto, havendo a necessidade de ser convertida em sua forma ativa (ânion ou radical) pela enzima catalase/peroxidase presente no Mtb, codificada pelo gene *katG* na presença de íons manganês ( $Mn^{+2}$ ) (Johnsson *et al.*, 1994; Quemard *et al.*, 1996).

Uma vez ativada pela *katG*, a INH forma compostos intermediários dando origem a um radical isonicotinoil que por sua vez, irá se ligar covalentemente ao quarto carbono do anel nicotinamida do NADH acoplado ao sítio ativo da enzima InhA. Tal evento, por consequência, provoca a formação de um aduto (INH\_NADH) que desestabiliza as ligações covalentes que mantêm a coenzima em sua conformação estendida no sítio ativo da proteína.

Esta instabilidade provoca a inibição da InhA, o que leva ao acúmulo de ácidos graxos de cadeia longa, interrompendo a biossíntese dos ácidos micólicos que são os principais constituintes da parede celular micobacteriana, e levando à morte celular (Rozwarski *et al.*, 1998; Vilchère *et al.*, 2007).

### 1.5 Composto IQG607

O composto inorgânico IQG607, também conhecido como pentaciano(isoniazida)ferrato (II), é o resultado de um esforço de planejamento e desenho de novos medicamentos antimicobacterianos, desenvolvido por Oliveira e colaboradores (Oliveira *et al.*, 2004), na tentativa de encontrar novos inibidores mais potentes e seletivos para a enzima InhA. O composto IQG607 é um análogo da INH. A molécula contém um grupamento cianometálico ligado à INH (Figura 7).

---

<sup>2</sup> A pró-droga é um pró-fármaco bioprecursor, que não implica na ligação de um grupo de suporte, mas resulta de uma modificação molecular do princípio ativo propriamente dito. Esta modificação gera um novo composto, capaz de ser transformado metabolicamente ou quimicamente, onde o composto resultante será o princípio ativo (Kokil *et al.*, 2010).

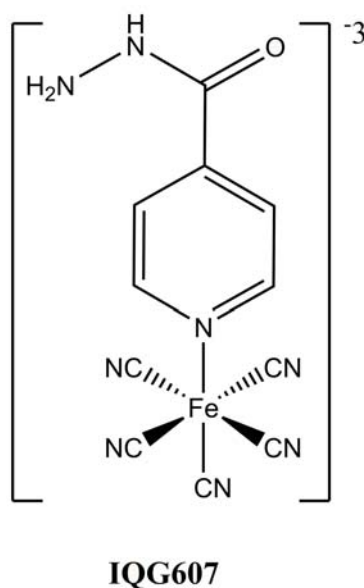


Figura 7: Fórmula estrutural plana do composto IQG607. Figura da Autora.

Até o presente momento, a principal via para superar o mecanismo de resistência à INH depende da ativação prévia do mesmo pela enzima *KatG*.

Contrário ao modo de ação da INH, estudos comprovam que o composto IQG607 não necessita de um mecanismo prévio de ativação para inibir a enzima InhA (Oliveira *et al.*, 2004, 2006a).

Um estudo com isolados clínicos de *M. tuberculosis* mostraram que não só o IQG607 foi capaz de inibir ambas as enzimas InhA<sub>wt</sub> (do tipo selvagem) e seu mutante InhA<sub>I21V</sub>, mas mais importante, sem a necessidade de qualquer mecanismo de ativação pela enzima catalase/peroxidase *KatG*. No mesmo estudo, os autores demonstraram que não existe qualquer necessidade da presença do NADH (Oliveira *et al.*, 2004) (coenzima natural da InhA), e o seu mecanismo de ação provavelmente envolve a interação com o sítio de ligação do NADH, uma vez que foi estabelecido que a inativação da enzima pelo composto IQG607 é tempo dependente (Oliveira *et al.*, 2004). Os experimentos realizados nesse estudo demonstraram que a presença do NADH em solução aumentou o tempo de inativação da enzima, o que sugere uma competição entre a coenzima e o composto IQG607 pelo sítio de ligação da mesma, na cavidade de ligação da InhA (Oliveira *et al.*, 2004; Sousa *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2006a).

Em ensaio cinético realizado com um análogo do substrato da enzima InhA - o C16 - foi observado que o composto IQG607 compete com o substrato pelo sítio de ligação (Oliveira *et al.*, 2004, 2006a; Sousa *et al.*, 2005).

Estudos prévios de simulação de docagem molecular realizados no Laboratório de Bioinformática, Modelagem e Simulação de Biosistemas (LABIO-PUCRS) com o composto IQG607 interagindo com a enzima InhA sugerem que o composto inibidor

IQG607 ocupa, preferencialmente, o sítio de ligação em que a porção pirofosfato do anel nicotinamida do NADH se encontra na cavidade de ligação do receptor (Oliveira *et al.*, 2006a). Isto é de certa forma o esperado, uma vez que o volume molecular do IQG607 (254,847 Å<sup>3</sup>), em comparação com outros inibidores menores tais como a etionamida (ETH , volume molecular de 152,4 Å<sup>3</sup>), é muito maior. Portanto, uma molécula como o IQG607 precisa de espaço suficiente na cavidade para melhor se acomodar. No entanto, considerando-se a flexibilidade de ambos receptor e ligante, somados as diferenças nas conformações estruturais que a InhA pode assumir em um determinado intervalo de tempo, podemos ver que o IQG607 é capaz de se acomodar em diferentes cavidades do receptor, como, por exemplo, a cavidade de ligação do substrato.

Apesar dos esforços realizados até o momento, ainda não foi possível se obter o complexo InhA\_IQG607 cristalizado, e portanto, não se pode afirmar com certeza que há um modo único de associação do ligante. No entanto, no presente estudo, nossos resultados foram focados naqueles resultados de simulação de docagem molecular onde o modo de ligação do IQG607 foi semelhante ao modo de ligação da INH, o que significa que procuramos em nossas simulações de docagem molecular por poses onde o grupamento hidrazida do IQG607 interagiu com o grupamento nicotinamida do NADH, ou com o grupamento fosfato do mesmo, como pode ser visto na Figura 8.

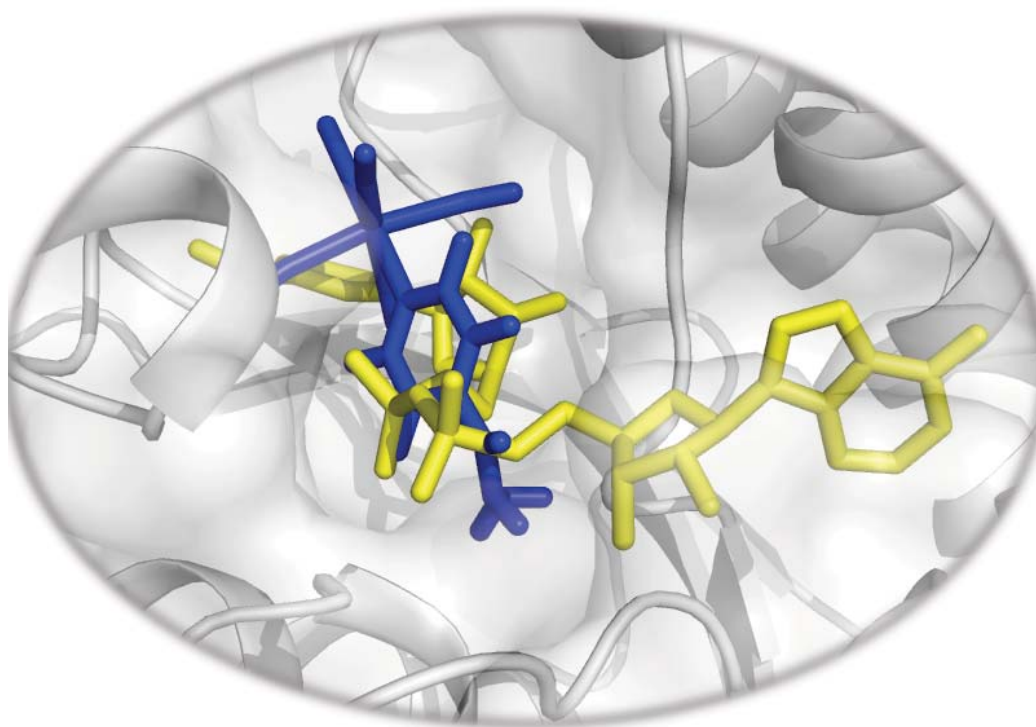


Figura 8: Representação do ligante IQG607 docado no sítio ativo da enzima InhA. A figura mostra uma das possíveis posições de ligação do IQG607: em amarelo o NADH posicionado no sítio ativo da proteína InhA; em azul o ligante; e ao fundo a molécula receptora representada em *newcartoon*. Figura da Autora.



No estudo desenvolvido por da Costa *et al.* (2012), foi realizada uma simulação de dinâmica molecular (DM) do complexo InhA-IQG607, utilizando-se a InhA\_wt como modelo receptor, a fim de investigar os eventos relacionados com o modo de interação molecular fármaco-alvo e suas afinidades. No estudo dos modelos dinâmicos desta interação também foram apresentados os resíduos de aminoácidos importantes que foram observados neste processo. O estudo mostrou que o composto IQG607 interagiu com a InhA, provocando mudanças conformacionais significativas, sendo a mais proeminente localizada na cavidade de ligação do substrato, em particular a desnaturação parcial das hélices  $\alpha 6$   $\alpha 7$  (da Costa *et al.*, 2012). Além disso, o trabalho aponta os resíduos de aminoácidos Gly14, Ile15, Ser20, Ile16, Gly40, Phe41, Ile47, Ser94 e Thr196 como sendo responsáveis pela mediação da interação que ocorre no complexo (da Costa *et al.*, 2012). O estudo concluiu que o composto IQG607 interage fortemente com a InhA, e que estas interações promovem instabilidades na enzima, fazendo com que o ligante concorra diretamente com o NADH e indiretamente com o substrato por seus respectivos sítios de ligação.

Cohen *et al.* (2011) demonstraram em seu estudo como três diferentes ligantes, sendo um deles o composto IQG607, interagiram com um conjunto de conformações da InhA, denominados *snapshots*, e receberam o nome de Modelo Receptor Totalmente Flexível ou modelo FFR (*Fully Flexible Receptor model*).

As trajetórias foram obtidas a partir de três diferentes simulações de dinâmica molecular (DM) da enzima InhA de Mtb, sendo elas o modelo receptor InhA\_wt, e os mutantes InhA\_I16T e InhA\_I21V, a fim de modelar a sua flexibilidade explícita (Schroeder *et al.*, 2005). A média de energia livre de ligação (FEB ou *Free Energy of Binding*) para a posição inicial do ligante comparada com a posição de referência representou uma diferença que variou de 2,5 a 7,0 kcal/mol entre o modelo rígido (usado para comparação) e os modelos flexíveis FFR. Além disso, estes valores são maiores do que o erro intrínseco (2,2 kcal/mol) atribuído pelo software de docagem molecular utilizado no estudo (*Autodock*), levando os autores a acreditar que a flexibilidade explícita do receptor InhA teve impacto na forma como o composto IQG607 interagiu com os modelos. Os autores também destacaram os resíduos de aminoácidos que mais fizeram contato com o composto IQG607 durante as três simulações usadas no estudo, sendo eles dois polares (Ser94, Thr196), um ácido e um básico (Asp42, Lys165), e 15 resíduos apolares (Gly14, Ile16, Thr16, Ile21, Val21, Phe93, Ile95, Gly96, Phe97, Phe149, Met161, Gly192, Ile194, Leu197 e Ala198).

Rodrigues-Junior *et al.* (2012) relataram recentemente um estudo realizado com um derivado do composto IQG607, chamado pentaciano(2-metil-5-(piridina-4-il)-1,3,4-oxadiazol)ferrato(II), denotado IQG639, que segundo o estudo, é capaz de inibir a atividade *in vitro* de ambos os modelos receptores InhA\_wt e o mutante S94A. No estudo, a atividade do composto IQG639 foi avaliada usando um modelo murino de

tuberculose. Dois grupos de camundongos da linhagem *Swiss* foram infectados com cepas H37Rv de *Mtb* e, em seguida, tratados com o composto IQG607 ou seu derivado IQG639 (250 mg/kg) durante um período de 28 dias ou 56 dias. Um terceiro grupo foi tratado com INH, servindo como controle positivo. O estudo aponta para a melhoria das lesões pulmonares dos camundongos infectados e tratados com INH e com o composto IQG607. Por outro lado, o composto derivado IQG639 (na dose mencionada) não foi capaz de apresentar remissão da infecção, mesmo após 56 dias de tratamento. Para explicar o fenômeno observado, os autores sugerem que o composto IQG639 possivelmente não atingiu compartimentos intracelulares de macrófagos ou não foi absorvido por via oral. Um estudo de inibição pelo IQG607 em cepas sensíveis e ou resistentes ao *Mtb*, a sua toxicidade por via oral, e também os esforços para sintetizar o composto em larga escala têm sido relatados no trabalho de Basso *et al.* (2010) e seu grupo de pesquisa. A reatividade de complexos metálicos associados à INH tem sido investigada, em busca de uma metalodroga capaz de realizar auto-ativação e que seja eficaz contra a tuberculose (Sousa *et al.*, 2012). Uma variedade de compostos foram testados, bem como o IQG607, com ou sem a INH, o que resultou em derivados da INH oxidados de forma semelhante ao observado quando a enzima KatG foi empregada.

Os dados coletados por meio dos estudos já desenvolvidos com o composto IQG607 contribuíram, para aprimorar o entendimento a respeito deste composto e serviram de fundamentação teórica para a presente Tese, onde, o foco do trabalho está baseado em modificações estruturais do composto e a investigação das consequências que estas podem ter causado na função inibitória do mesmo.

### 1.5.1 Construção do Ligante

Devido a facilidade de uso, o *software* escolhido para o desenho dos modelos derivados do IQG607 foi o *ArgusLab*. Este é um *software* bastante robusto que permite não só a construção de moléculas átomo por átomo, mas também a otimização da mesma e a adição de cargas para cada átomo. Esta etapa se torna um pouco mais facilitada devido ao fato do programa apresentar modelos prontos dos principais grupamentos químicos, tais como anéis aromáticos, grupamentos amidas, aminas entre outros.

Inicialmente foram desenhadas 4 moléculas: (1) **IQG607\_000** onde a molécula foi desenhada como ela originalmente é (somente para testes comparativos), (2) **IQG607\_001** onde um  $\text{CH}_2$  foi adicionado, (3) **IQG607\_002** onde  $\text{C}_2\text{H}_4$  foi adicionado, e por fim (4) **IQG607\_003** onde  $\text{C}_3\text{H}_6$  foi adicionado. Posteriormente, para a redação do artigo científico, os compostos análogos do IQG607 foram chamados de complexo 1, complexo 2 e complexo 3.

Após o desenho da molécula, é preciso fazer a otimização da mesma e calcular as cargas de cada átomo. Devido à natureza do composto IQG607, as cargas não puderam ser atribuídas com este *software* por causa do átomo de ferro (Fe). O programa utiliza várias metodologias para a atribuição de cargas e o método *ZINDO Charges* é a única forma de reconhecer o Fe, atribuindo carga efetiva +2 ao composto. Entretanto a carga efetiva da molécula é -3, o que significa que esta etapa precisou ser realizada com o auxílio de outro *software*.

#### 1.5.1.1 Atribuição de Cargas do Ligante

Como não foi viável a atribuição de cargas das moléculas com o mesmo *software* utilizado para o desenho das mesmas, a alternativa foi realizar esta etapa com o uso do *software VegaZZ* (Pedretti *et al.*, 2004). Este foi o melhor *software* encontrado para atribuir carga negativa para o Fe. O *software* usa um campo de força do tipo *AMIBC*, esta foi a única forma de atribuir carga negativa -3 da molécula.

### 1.6 Simulações de Docagem Molecular

Uma das principais etapas do processo de RDD (*Rational Drug Design*) é a docagem molecular. Este é um método que prevê a melhor orientação ao qual uma molécula vai se ligar a outra de modo a formar um complexo estável (Lengauer *et al.*, 1996).

O conhecimento da orientação adequada pode ser utilizado para prever a força de associação ou afinidade de ligação entre duas moléculas.

Este é um processo virtual de colocar ou acoplar computacionalmente uma estrutura molecular em sítios de ligação de uma macromolécula biológica (Sotriffer *et al.*, 2000) e, flexivelmente ou rigidamente, relaxar as respectivas estruturas para então pontuar (considerando diferentes funções de *scoring*) a complementariedade do encaixe. (Bleicher *et al.*, 2003).

#### 1.6.1 O software AutoDock

Os experimentos de docagem molecular podem ser realizados utilizando-se uma ampla variedade de *software* como *DOCK*, *GOLD*, *FlexE* entre outros. Para este trabalho optou-se por usar o *software AutoDock*. Este é um conjunto de programas (*AutoTors*, *AutoGrid* e *AutoDock*) desenvolvidos por Olson e colaboradores (Goodsell *et al.*, 1996) para a predição da interação ligante-receptor.

O *AutoDock* tem distribuição gratuita e já foi amplamente testado, mostrando-se bem sucedido em uma variedade de experimentos de docagem (Amaro *et al.*, 2008). Ele pode utilizar várias técnicas para a exploração conformacional do ligante (com uma

rápida avaliação de energia utilizando potenciais de afinidade molecular), combinando as vantagens de uma busca espacial completa e uma avaliação energética precisa (Morris *et al.*, 1998).

Uma das maiores vantagens do *AutoDock* é o uso de um algoritmo genético (GA). O método foi introduzido na química computacional no início da década de 70 por John Holland (Holland, 1975). O algoritmo de busca é baseado em princípios de genética, seleção natural e evolução.

Durante a docagem molecular, o receptor é mantido rígido e a translação, orientação e conformação do ligante são explorados. Cada “cromossomo” representa uma conformação do ligante, o que determina o seu “genótipo”. As coordenadas atômicas do ligante representam o “fenótipo”. Os cromossomos então passam por processos de seleção, mutação e crossover. Cada modo de ligação do ligante representa uma população onde os indivíduos em melhores condições se reproduzem e persistem dando origem a novas gerações.

Para as simulações de docagem molecular foi utilizada a versão 4 do *AutoDock*. Esta versão do *software* apresenta uma interface gráfica (*AutoDock Tools*) que não obriga o usuário a trabalhar em linhas de comando (como é o caso da versão 3.05).

Tanto os ligantes quanto o receptor foram preparados (arquivos .pdbqt) com o *software*. O algoritmo de busca usado foi o *Lamarckian Genetic Algorithm* (LGA), onde a maioria dos parâmetros foram mantidos padrão, com exceção do número de execuções (*runs*) que passou a ser 25, o número de avaliações passou para 500.000 e o tamanho da população inicial passou a ser 50. Estes dados foram modificados com a finalidade de obter ganho no tempo computacional gasto para realizar as simulações, uma vez que foram realizados experimentos com 25, 100 e 150 execuções e ao comparar os resultados, concluiu-se que as diferenças não eram representativas ou quase inexistentes.

#### 1.6.1.1 Tratamento do Ligante

Para que o *software* de simulação de docagem molecular *AutoDock4* pudesse reconhecer o ligante, alguns ajustes nos arquivos do mesmo precisaram ser feitos antes de iniciar a simulação:

- O posicionamento do ligante foi realizado com o *software VMD* (Humphrey *et al.*, 1996) de forma a ocupar o sítio de ligação do substrato.
- O átomo de ferro deve ser chamado FE ou Fe e deslocado um caractere para a esquerda (ajustando as colunas), caso contrário, o arquivo não é reconhecido pelo programa.
- O ligante foi mantido flexível em todas as simulações.

- Para cada molécula desenhada foram realizadas simulações de docagem com o grid<sup>3</sup> simulando uma caixa padrão, formada por uma malha de pontos (60x60x60) e uma caixa maior (100x100x120).

Posteriormente, optamos por manter a caixa em seu tamanho padrão, pois como já era esperado, em uma caixa maior e com mais espaço, o ligante tende a se acomodar na superfície do receptor e não no interior da mesma.

### 1.6.1.2 Tratamento do Receptor

Para decidir qual seria o melhor modelo de receptor a ser usado, foram realizadas simulações de docagem com as estruturas 1BVR, 1ENY, 1P44, e 1P45, e em cada uma destas estruturas do receptor, foi adicionado o NADH no final do arquivo da proteína, para que o mesmo fizesse parte do sítio ativo do receptor. Com isso o ligante não pôde ocupar a cavidade de ligação onde o NADH se encontrava, forçando o ligante a procurar espaço na cavidade de ligação do substrato localizada um pouco mais acima.

Foram empregadas as cargas da coenzima originais, fornecidas pelo professor orientador deste trabalho. Devido a isso, foi necessário um ajuste da molécula, pois a nomenclatura dos átomos e a ordem dos mesmos mudou com relação aos arquivos gerados atualmente pelos programas usados neste estudo. Isto foi corrigido, linha por linha, antes de adicionar as cargas correspondentes a cada átomo.

Para o modelo receptor, optamos pela estrutura 1P44 com o NADH fazendo parte da proteína, devido ao volume da cavidade de ligação do substrato. Nos testes comparativos (com as demais estruturas), a 1P44 foi a que apresentou melhores resultados, oferecendo mais espaço para o ligante explorar.

## 1.7 *Análise da Interação Receptor-Ligante*

Após a realização das simulações de docagem molecular, as interações entre a enzima InhA e os compostos derivados do IQG607 desenhados para este trabalho foram avaliadas com o auxílio do software *LigPlot 4.4.2* (Wallace *et al.*, 1995).

Trata-se de um software que avalia o comportamento entre o receptor e o ligante, identifica as interações intermoleculares que ocorreram na formação do complexo, e gera automaticamente representações 2D mostrando o tipo de interação que foi realizada entre o complexo proteína-ligante, também destacando os átomos (de ambas as moléculas) envolvidos nesta interação, e a distância em ângstrons (Å) entre eles.

---

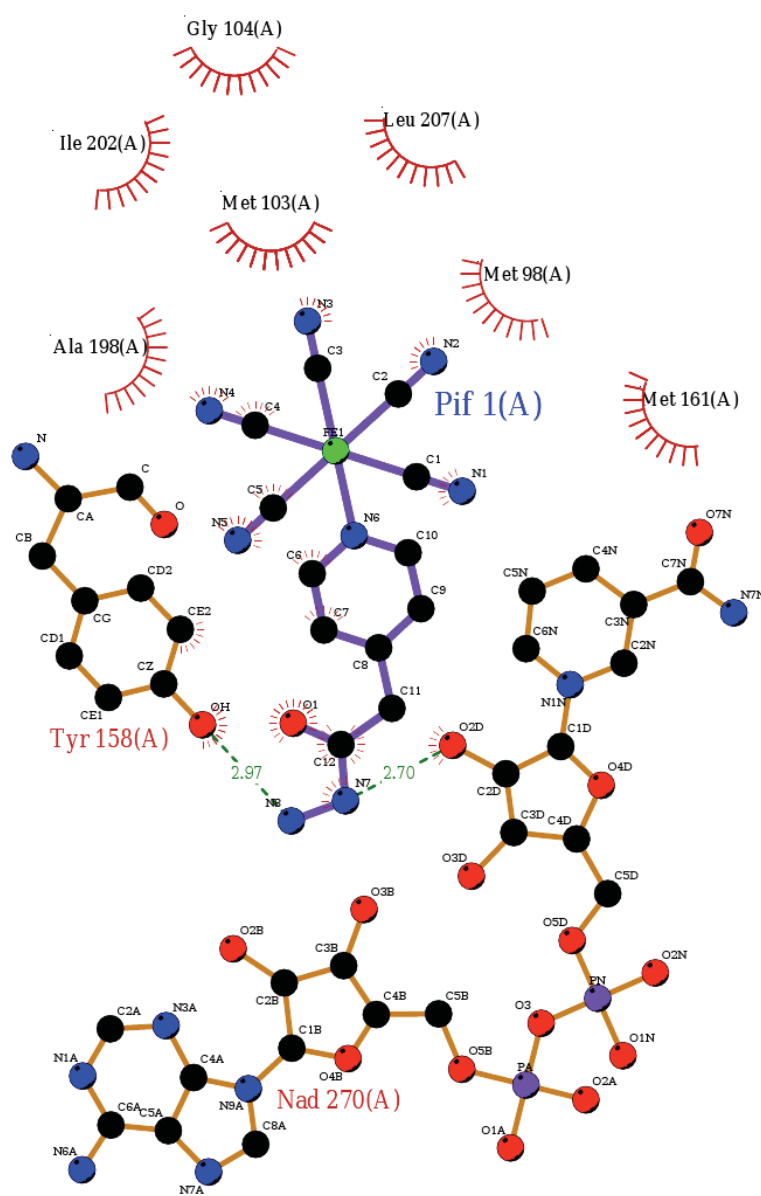
<sup>3</sup> O grid representa uma região cúbica que delimita o espaço conformacional que pode ser explorado pelo ligante em sua tentativa de interagir com a molécula receptora. O programa permite que o usuário escolha se esta caixa será centrada no receptor, ou ainda, no átomo central do ligante, o que foi a opção escolhida para as simulações realizadas neste estudo.

Um exemplo dessas representações 2D pode ser observado na Figura 9.

Esta avaliação pode ser feita em todos os resultados gerados pela simulação de docagem (entende-se neste caso como “resultados” as diferentes posições que o ligante pode assumir durante a simulação), ou ainda, após uma inspeção visual dessas simulações, pode-se escolher somente as poses de interesse para submeter ao programa. Nesta análise foram observadas as ligações de hidrogênio e os contatos hidrofóbicos realizados entre os átomos tanto do ligante quanto do receptor.

Alguns dos parâmetros originais do *LigPlot* foram modificados com a intenção de estabelecer que um resíduo de aminoácido do receptor estaria fazendo contatos do tipo hidrofóbico (NNB) com o ligante, se pelo menos um (1) átomo pesado do resíduo estivesse distante até 3.5 Å de algum átomo do ligante. Já para as ligações de hidrogênio (HHB) o critério empregado foi mais restrito: a distância máxima entre os átomos aceitadores e doadores de hidrogênio dos resíduos de aminoácidos do receptor e do ligante não deveria ultrapassar 3.39 Å para então ser considerado.





### Key

- Ligand bond
- Non-ligand bond
- Hydrogen bond and its length
- His 53 Non-ligand residues involved in hydrophobic contact(s)
- Corresponding atoms involved in hydrophobic contact(s)

## 1P44+nadh\_cluster04\_run03

Figura 9: Exemplo de arquivo de saída do programa *LigPlot*. Representação 2D gerada automaticamente pelo programa, mostrando o tipo de interação realizada entre o complexo proteína-ligante. Figura da Autora.

## 1.8 Síntese dos Análogos do IQG607

As simulações de docagem dos compostos IQG607\_001, IQG607\_002 e IQG607\_003 se mostraram promissoras, uma vez que todos os compostos desenhados conseguiram assumir posições conformacionais semelhantes ao modo de ligação da INH. Por este motivo, foi recomendada a síntese dos mesmos. Esta etapa foi desenvolvida pela técnica de laboratório Thais Bruno, funcionária do Laboratório de Química do INCT-TB, no Tecnopuc, sob a supervisão do Prof. Pablo Machado e acompanhada pela autora deste estudo, em todas as etapas do procedimento.

Para a síntese da molécula foi seguido o protocolo padrão, já desenvolvido pelo laboratório citado e, publicado em trabalhos anteriores (Oliveira *et al.*, 2004; Basso *et al.*, 2010; Sousa *et al.*, 2012). Uma síntese deste protocolo pode ser encontrada no capítulo 5 deste volume, contendo o artigo produzido.

Como pode ser observado no artigo, o composto **1** foi sintetizado com sucesso. Esforços foram feitos para sintetizar o composto **2**, porém não obtivemos sucesso. Já o composto **3** se mostrou inviável.



## 2 Justificativa

Atualmente o regime padrão de tratamento da TB envolve pelo menos quatro drogas encontradas no mercado: isoniazida, rifanpicina, etambutol e pirazinamida, que devem ser administradas ao paciente pelo período de seis a nove meses (Vilchère *et al.*, 2007). Este é um regime de tratamento considerado de alta toxicidade e agressivo ao paciente, comprometendo a adesão do indivíduo.

A INH apresenta uma poderosa atividade antibactericida inibindo a biossíntese de ácidos micólicos (Schroeder *et al.*, 2005) que compõem a parede celular das micobactérias. Porém, fatores como a longa duração do tratamento, monoterapia, prescrição imprópria do tratamento, e muitas vezes falta de colaboração do paciente, contribuíram para o surgimento de cepas de Mtb resistentes a um ou mais fármacos hoje existentes no mercado (Rossetti *et al.*, 2002).

Estudos relatam que quase ao mesmo tempo em que a INH foi lançada no mercado, surgiram também mutações que levaram a um mecanismo de resistência ao medicamento. A literatura reporta hoje a existência de cepas de Mtb multi-resistentes (MDR) e cepas extensivamente resistentes (XDR)<sup>4</sup> às drogas disponíveis atualmente no mercado (Migliori *et al.*, 2007; Sotgiu *et al.*, 2009; WHO, 2012), o que torna o tratamento da doença cada vez mais complexo e de difícil administração (Vilchère *et al.*, 2007).

Estudos genéticos realizados por Jacobs e colaboradores (Banerjee *et al.*, 1994) identificaram uma ORF (*open reading frame*), chamada *inhA*, onde um único evento mutagênico era suficiente para conferir resistência à INH, incluindo deleções e ou substituições de um único aminoácido por outro, como no caso do mutante S94A (o primeiro a ser descrito), onde o aminoácido serina é substituído por uma alanina (Rozwarski *et al.*, 1998).

Análises cinéticas também sugerem que a resistência à isoniazida ocorre devido à diminuição da afinidade da proteína mutante pela sua coenzima NADH (Dessen *et al.*, 1995). A ligação da INH ativada ao complexo enzima-NADH é particularmente relevante ao entendimento do mecanismo de resistência ao medicamento, uma vez que a mutação S94A no gene *InhA* é localizado na região de ligação do nucleotídeo (Quemard *et al.*, 1996). A estrutura 3D da *InhA* (wt) e mutante S94A, refinadas à 2,20 (código PDB: 1ENY) e 2,70 Å (código PDB: 1ENZ), respectivamente, revelam que a resistência à droga está diretamente relacionada à perturbação em suas ligações de hidrogênio que desestabilizam a ligação com o NADH (Quemard *et al.*, 1995).

---

<sup>4</sup> De acordo com o relatório de 2012 da Organização Mundial de Saúde, cepas MDR são aquelas resistentes à isoniazida e rifampicina, e cepas XDR são definidas como MDR e também resistentes a fluoroquinolonas e pelo menos uma das três drogas de segunda linha amicacina, canamicina ou capreomicina (WHO, 2012).

O aumento dos casos de TB resistente à INH motivam a investigação de possíveis alternativas para inibidores da InhA, buscando compostos que não necessitem de ativação prévia, como a INH. Com a necessidade do planejamento e descoberta de novos fármacos mais eficazes para o tratamento da TB, é preciso também o desenvolvimento e a utilização de novas técnicas que agilizem este processo.

Desta forma, acreditamos que o composto IQG607 é um candidato promissor ao desenvolvimento de novas drogas anti-tuberculose, representando uma classe distinta de substâncias para esse desenvolvimento (Oliveira *et al.*, 2004; Sousa *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2006a; da Costa, 2008).

### 3 Motivação Social

A tuberculose é uma doença infecciosa que, embora curável, representa um importante problema de saúde pública de proporção global (Dias *et al.*, 2007). Como medida preventiva dispõe-se atualmente da vacina BCG (Bacilo de Calmete-Guérin - 1921 ano de descoberta) que é administrada gratuitamente em postos de saúde do governo para crianças desde o primeiro mês de seu nascimento. A vacinação é feita ainda nos primeiros anos de vida, mas sua função preventiva contra a forma de TB pulmonar em adultos não é efetiva (Nayyar *et al.*, 2005).

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization - WHO*), publicados no Relatório Global Anual da Tuberculose, no ano de 2012, a taxa de novos casos de tuberculose têm diminuído já há vários anos, representando uma queda de 2,2% entre os anos de 2010 e 2011 (WHO, 2012).

A taxa de mortalidade por TB diminuiu 41% desde 1990 e, graças a todos os esforços empregados nas pesquisas e aplicação de metas efetivas contra a tuberculose, estamos a caminho de atingir o percentual global de 50% de redução até 2015. No entanto, esta taxa global da TB continua sendo considerada enorme. Em 2011, havia uma estimativa de 8,7 milhões de novos casos de tuberculose (13% de co-infectados com HIV) e as estatísticas mostram que 1,4 milhão de pessoas morreram de tuberculose, incluindo quase um milhão de mortes entre os indivíduos HIV-negativos e 430.000 entre as pessoas que eram HIV-positivos. A tuberculose é uma das principais causas de morte de mulheres, com 300.000 mortes entre mulheres HIV-negativas e 200.000 óbitos de mulheres HIV-positivas em 2011. Além disso, ainda no relatório de 2012, o WHO afirma que o progresso na resposta à tuberculose do tipo MDR-TB continua lento e que o número de novos casos de MDR-TB continua a aumentar e atingiu quase 60.000 em todo o mundo no ano de 2011.

Estes dados são alarmantes, pois demonstram a redução da eficiência dos atuais medicamentos disponíveis para o tratamento de pacientes que apresentam este quadro de multi-resistência.

Hoje, o tratamento padrão para pacientes com tuberculose dura pelo menos seis a nove meses, e o regime para a maioria dos pacientes com tuberculose resistente a medicamentos é de até 20 meses. O tratamento para a MDR-TB além de ter custo elevado, apresenta desagradáveis e até graves efeitos colaterais (WHO, 2012). Estes números justificam a importância em investirmos em mais pesquisas na busca de soluções para reverter este quadro. O que leva cientistas e pesquisadores a concentrarem seus esforços na busca por medicamentos com o menor custo possível, e menor toxicidade para o paciente.

Dentro deste contexto, a motivação mais específica para desenvolver este trabalho

surgiu da necessidade de encontrar novos inibidores para a proteína InhA, onde não fosse preciso o mecanismo de ativação prévia do composto inibidor. Para tanto, buscamos desenhar e sintetizar, de forma racional, moléculas candidatas a fármacos, derivadas do composto inibidor da InhA de Mtb, o IQG607. E com isso, dentro de um escopo maior, contribuir para o surgimento de novos medicamentos com características distintas que possam burlar este mecanismo de resistência já estabelecido.

## 4 Objetivos

### 4.1 *Objetivo Geral*

O objetivo geral deste projeto é propor a derivação e síntese de análogos do composto inibidor IQG607, e contribuir para a descoberta de novos fármacos efetivos contra a doença tuberculose, utilizando a enzima *2-trans*-enoil-ACP (CoA) redutase (EC 1.3.1.9) de *Mycobacterium tuberculosis* como alvo farmacológico.

### 4.2 *Objetivos Específicos*

- Modificar estruturalmente a molécula inibidora com a finalidade de melhorar a sua eficiência.
- Realizar testes *in silico*, por meio de experimentos de docagem molecular do complexo receptor-ligante, a fim de verificar a eficácia das modificações que forem propostas.
- Com base nos resultados *in silico*, sintetizar o novo composto derivado do IQG607.
- Verificar a atividade do ligante sintetizado.

## 5 Artigo

Este capítulo apresenta o artigo científico que relata o trabalho realizado durante o desenvolvimento desta Tese de Doutorado. O texto contém os procedimentos detalhados do desenho computacional dos análogos do composto IQG607, das simulações e análise das docagens realizadas, bem como o procedimento de síntese do composto, e por esse motivo, estes não serão novamente apresentados no capítulo 6, onde serão discutidos os resultados obtidos e concluído o trabalho.

### **Molecular modeling, docking simulations, and experimental evaluation of a *Mycobacterium tuberculosis* InhA enzyme inhibitor analog: implication for the design of novel IQG607-based compounds**

Elisangela M. L. Cohen<sup>a,c</sup>, Thais Bruno<sup>f,g</sup>, Diana C. Rostirolla<sup>d,f,g</sup>, Anne D. Villela<sup>c,f,g</sup>, Pablo Machado<sup>c,g\*</sup>, Luis A. Basso<sup>c-g</sup>, Diógenes S. Santos<sup>c-g</sup>, Osmar Norberto de Souza<sup>a-c,e-g\*</sup>, André Arigony Souto<sup>c,h</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Bioinformática, Modelagem e Simulação de Biosistemas - LABIO - FACIN - PUCRS - Av. Ipiranga, 6681, Prédio 32 - Sala 602. CEP: 90619-900, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>b</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciência da Computação - PPGBCC - FACIN - PUCRS - Av. Ipiranga, 6681, Prédio 32. CEP: 90619-900, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>c</sup>Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular - PPGBCM - FABIO - PUCRS - Av. Ipiranga, 6681, Prédio 12. CEP: 90619-900, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>d</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PPMCS, Av. Ipiranga 6681, Porto Alegre, RS, Brazil. CEP: 90619-900, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>e</sup>Programa de Pós-Graduação Mestrado Profissional em Biotecnologia Farmacêutica - PPGMBF - FFARM - PUCRS - Av. Ipiranga, 6681, Prédio 12. CEP: 90619-900, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>f</sup>Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional – CPBMF and <sup>g</sup>INCT-TB - Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose-CNPq, PUCRS, Av. Ipiranga 6681, Tecnopuc, Prédio 92A, 90619-900, Porto Alegre, RS Brazil

<sup>h</sup>Laboratório de Polifenóis - Faculdade de Química - PUCRS - Av. Ipiranga, 6681, Prédio 12. CEP: 90619-900, Porto Alegre, RS, Brasil

\*Corresponding author's e-mail: [osmar.norberto@pucrs.br](mailto:osmar.norberto@pucrs.br)

\*Corresponding author's address:

Osmar Norberto de Souza

Laboratório de Bioinformática, Modelagem e Simulação de Biosistemas - LABIO

Faculdade de Informática - FACIN

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS

Avenida Ipiranga, 6681, Prédio 32 - Sala 608

90619-900, Porto Alegre, RS, Brasil

Tel: +5551 3320-3611 Ext. 8608

Fax: +5551 3320-3621

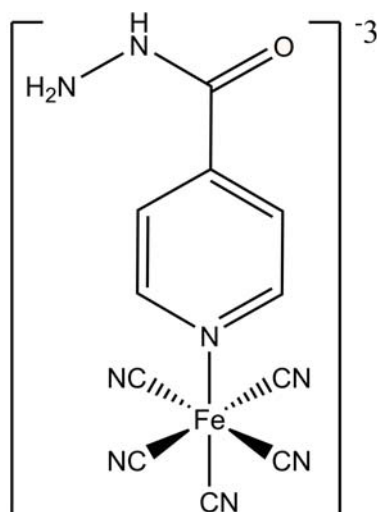
## **Abstract**

Tuberculosis (Tb) continues to be one the main threats to the world's health. One third of the world's population is infected with *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), the etiologic agent of Tb. Resistance to the major drugs used in the Tb treatment makes it paramount the sustained effort to develop novel drug candidates against this disease. The inorganic compound pentacyano(isoniazid)ferrate(II), also known as IQG607, is an analog of isoniazid (INH), one of the main drugs for treatment of Tb. It targets InhA, a key enzyme in the type II fatty acids biosynthesis of Mtb's cell wall. Contrary to the mode of action of INH, IQG607 is capable of inhibiting InhA without prior activation. In an attempt to improve compound activity, we designed and built models for three new IQG607. We evaluated their interactions with InhA through molecular docking simulations. One compound was successfully synthesized, and enzymatic assays evaluated its inhibitory activity. Although molecular docking simulations and InhA-ligands interactions indicated that the IQG607 analogs could lead to successful compounds, enzymatic and cell assays found that there was no variation in the enzyme's activity, showing that the compound has no inhibitory effect on InhA. This observation led us to propose that the pyridine ring of INH and its hydrazide portion must not be separated since isolating the electron transfer turns the compound inactive, hinting at molecular modifications that should not be used in the improvement of IQG607 inhibitory activity against Mtb's InhA enzyme.

**Key words:** *Mycobacterium tuberculosis*; InhA-ligand interactions; INH Analogs; IQG607; Molecular Docking Simulations; Inorganic Synthesis; Metallodrug.

## Introduction

The inorganic compound IQG607, also known as pentacyano(isoniazid)ferrate(II), is the result of a drug design effort (1) to find new inhibitors for the 2-*trans*-enoyl-ACP reductase enzyme (InhA, EC number: 1.3.1.9) from *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) (2). IQG607 is an analog of isoniazid (INH), one of the main drugs used in the treatment of tuberculosis (3) that targets InhA (4), a key enzyme in the type II fatty acids biosynthesis pathway of Mtb. The molecule contains a cyanoferrate moiety, a metal center, and the INH ligand (Figure 1).



**IQG607**

**Figure 1:** The IQG607 (pentacyano(isoniazid)ferrate(II)) compound. It contains a cyanoferrate moiety, a metal center, and the INH ligand. The proposed modifications in the compound were introduced between the pyridine ring and the hydrazide portion of the INH portion of IQG607.

Until now, the major route to overcome isoniazid resistance relied on KatG enzyme disruption (5). Contrary to the mode of action of INH, IQG607 does not require prior activation to inhibit InhA (1, 6). A study of clinical isolates of Mtb demonstrated that IQG607 inactivated both wild type InhA and the I21V mutant. More importantly, it did not require any mechanism of activation by the catalase/peroxidase KatG enzyme (1, 5, 6). There also is no need for the presence of the coenzyme NADH (1). IQG607 mechanism of action probably involves



interaction with the NADH binding site, given that the inactivation of InhA by IQG607 is time dependent (1). The experiments demonstrated that the presence of NADH in solution increased the time of inactivation of the enzyme, suggesting a competition between NADH and IQG607 for the NADH binding site in the InhA active site. A kinetic assay with the InhA substrate analogue, the C16, demonstrated that IQG607 competes with the substrate for its binding site (1, 6, 7). Vasconcelos et. al. (8) have verified the slow-onset way of binding of IQG607 to either InhA and mutants I21V, S94A and I47T, all resistant to INH. In their studies, they showed that IQG607 has a dissociation constant of  $70 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ , and by this mechanism of action an initial receptor-inhibitor complex is formed, followed by a slow isomerisation reaction, making the inhibitor tightly bound to the target.

Previous molecular docking simulation studies of IQG607 interacting with the InhA enzyme demonstrated that this inhibitor occupies, preferentially, the binding site of the nicotinamide pyrophosphate portion of NADH in the receptor's binding pocket (6). This is somehow expected since IQG607 is a large molecule ( $254.8 \text{ \AA}^3$ ) when compared to other smaller InhA inhibitors such as ETH ( $152.4 \text{ \AA}^3$ ), and so IQG607 needs a larger cavity to better accommodate itself. However, taking into account the flexibility of both receptor and ligands, and the differences in structural conformations of InhA, Cohen et al. (9) noticed that IQG607 could fit in to the substrate-binding cavity. As there is no crystal structure of the InhA-IQG607 complex, they could not suggest a unique binding mode for the ligand. However, in their study they focused on those binding poses in which the hydrazide portion of IQG607 was similar to the INH binding mode. da Costa et. al. (10) performed molecular dynamics simulations of the wild type InhA-IQG607 complex aiming at exploring the events related to the molecular mode of drug-target interactions. They reported dynamic models of these interactions, as well as the amino acid residues important to the process. IQG607 interacts with InhA causing significant conformational changes in the enzyme, the most prominent of which located in connection to the substrate-binding loop, particularly the partial denaturation of helices  $\alpha_6$  and  $\alpha_7$  (10). Moreover, the work pointed out the amino acid residues Gly14, Ile15, Ile16, Ser20, Gly40, Phe41, Ile47, Ser94 and Thr196 as being responsible for mediating the interactions in the complex. The study concluded that the compound IQG607 interacts strongly with InhA and that these interactions promote instabilities in the enzyme. The ligand competes directly with NADH and indirectly with the substrate by their respective binding sites (10).

Cohen et. al. (9) have also revealed how IQG607 interacted with an ensemble of snapshots, named as a Fully-Flexible Receptor (FFR) model, obtained from three different MD simulations of the InhA enzyme from Mtb, the wild-type, I16T, and I21V mutants. Their objective was to model their explicit flexibility of the InhA receptors in molecular docking simulations (9). The average best free energy of binding (FEB) for the initial IQG607 position compared to a reference pose showed a difference that varies from 2.5 to 7.0 kcal/mol between the rigid and FFR models of InhA. Also, they are greater than the intrinsic error (2.2 kcal/mol) attributed to the estimation of the FEB by the docking software used in the study, leading the authors to consider that the explicit flexibility of the InhA receptor clearly had an impact in the way IQG607 interacts with InhA. The authors were also able to single out 19 amino acid residues that made contact with IQG607 in the FFR models of InhA: two polar (SER94, THR196), one acidic and one basic (ASP42, LYS165), and 15 apolar residues (GLY14, ILE16, THR16, ILE21, VAL21, PHE93, ILE95, GLY96, PHE97, PHE149, MET161, GLY192, ILE194, LEU197 and ALA198) (9). Rodrigues-Junior et. al. (11) have recently reported a new IQG607 derivative, named pentacyano(2-methyl-5-(pyridin-4-yl)-1,3,4-oxadiazole)ferrate(II) and denoted IQG639, which is capable of inhibiting the *in vitro* activity of both wild type InhA and the S94A mutant. They assessed the activity of the IQG639 compound using an *in vivo* murine model of tuberculosis (11). An inhibitory study of IQG607 on isoniazid sensitive and resistant strains of Mtb, its oral toxicity, and also the efforts to synthesize the compound in large scale have been reported by Basso et. al. (12). The reactivity of isoniazid metal complexes has been investigated in search for a novel self-activating metallodrug effective against tuberculosis (13). A variety of compounds were tested, as well as IQG607, either with or without INH, and it resulted in similar oxidized isoniazid derivatives as observed when the KatG enzyme was used. The results suggested that the presence of Fe(II) in IQG607 significantly enhanced the isonicotinic acid formation, based on a carbonyl-centred radical that might be favoured by promoting a  $\pi$ -back-bonding effect by the metal centre. This, in turn, increases the formation of the acyl radical; therefore, the isoniazid metal complex could represent a potential metallodrug (13).

There is yet no crystal structure of the InhA-IQG607 complex and its derivatives. Hence, in this work we address this problem with computational modeling and docking simulations, combined with synthesis of compounds and *in vitro* and *in vivo* bioassays, to build on the knowledge about IQG607 and three derivatives (1, 6, 7, 10). Several studies successfully

employed modeling and docking simulations to the study of new molecules aimed at different protein targets in Mtb (14-16).

## Materials and Methods

### *IQG607 modelling*

Three new molecules were derived from the original IQG607 compound by adding a methanediyl (-CH<sub>2</sub>-), an ethanediyl (-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-), and a propanediyl (-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>-), group between INH's pyridine ring and the hydrazide portion. The IQG607 analogs were named as complex **1**, complex **2** and complex **3**, respectively. Models were built with ArgusLab 4.0.1 (17). AM1-BCC partial atomic charges were added to each atom in the models with Vega ZZ 2.4.0 (18).

### *The InhA receptor model*

Prior to the molecular docking simulations, and aiming to find the crystal structure with the largest continuous volume of the substrate-binding cavity, we calculated and compared their volumes in 39 InhA crystal structures deposited in the Protein Data Bank (PDB) with the program CASTp (19). The InhA crystal structures with PDB IDs 1ENY (2), 1BVR (20), 1P44 and 1P45 (21) were preselected as they present a volume of 598.2 Å<sup>3</sup>, 735.0 Å<sup>3</sup>, 1691.9 Å<sup>3</sup>, and 970.4 Å<sup>3</sup>, respectively. These structures were further evaluated with CASTp, and redocking analyzes indicated the best receptor model. We chose the InhA crystal structure 1P44 (21) as the receptor protein for this study due to the larger volume of its substrate-binding cavity.

### *The molecular docking simulations*

To prepare both, ligand and receptor structures, we used AutoDockTools 1.5.2. Docking simulations, allowing flexibility of the ligands, were performed with AutoDock 4.2 (22). We also evaluated the receptor's structure with and without its NADH coenzyme. For all conditions, we tested two different grid sizes, employing the Lamarckian Genetic Algorithm

(LGA) as the docking search algorithm, with 25 runs, and applied the default parameters (22), except for *ga\_num\_evals*, which was set to 500,000.

#### *The receptor-ligand interactions*

Hydrogen bonds and hydrophobic contacts between the ligands and the InhA receptor were calculated with LigPlot 4.4.2 (23). LigPlot parameters were modified from default settings in order to define a receptor's residue to be in a hydrophobic contact (NNB) with a ligand if there was at least one heavy atom of the residue within 3.50 Å of distance of some atom from the ligand. As for hydrogen bonds (HHB), the employed criterion was stricter than usual, with a donor-acceptor maximum distance of 3.39 Å. We wanted to assure that possible spurious HHB were not taken into account.

#### *The synthesis of pentacyano(2-(pyridin-4-yl)acetohydrazide)ferrate(II) or complex 1*

The complex **1** was prepared by the one-pot synthetic procedure with minor modifications from already reported two steps method described for isoniazid ligand (IQG607) (1,12,13). The compound was characterized by <sup>1</sup>H NMR and infrared spectroscopies, and cyclic voltammetry. The synthesis of pentacyano(2-(pyridin-4-yl)acetohydrazide)ferrate(II) complex **1** was carried out at controlled temperature and protected from light. In a 250 mL flask 0.298 g (1 mmol) of sodium nitroprussiate were dissolved in 10 mL of ammonium solution 25% at stirring. NH<sub>3</sub> gas was bubbled into the reaction mixture for 4 h on ice bath at temperatures ranging from -1 to -2 °C. After reaction was complete, a yellow solid was formed, characteristic of aminopentacyanoferrate (II) compound intermediate (1, 12). Then, the solution was stirred at room temperature for 1 h under argon flow. After that, 0.151 g (1 mmol) of 2-(pyridin-4-yl)acetohydrazide was added in 5 mL of ultrapure water and the resulting solution was allowed to react for 24 h. Later than, the reaction solution was added to another vessel and cold NaI solution in ethanol (1:10; w/v) was added until precipitation of product. Because of the efficiency of precipitation process the flask was stored at 4°C at least 24 h. Finally, the solid product was separated by centrifugation, washed with cold ethanol (2 x 25 mL) and dried under reduced pressure giving the compound pentacyano(2-(pyridin-4-yl)acetohydrazide)ferrate(II) or complex **1**. Yield: 81%; <sup>1</sup>H NMR (60 MHz, D<sub>2</sub>O): δ3.71 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.18 (d, 2H, H-3,3'), 8.95 (d, 2H, H-2,2'); FT-IR (UATR, cm<sup>-1</sup>): 2044, 1669, 1610, 1423, 816; E<sub>1/2</sub> = 264 mV.

### *Evaluation of the inhibitory potential of complex 1*

To evaluate the potential inhibitory activity of complex **1**, measurement of steady-state velocity was carried out using an UV-2550 UV/Visible spectrophotometer (Shimadzu<sup>®</sup>), monitoring the NADH oxidation at 340 nm ( $\epsilon_{\beta\text{-NADH}} = 6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) due to reduction of 2-trans-dodecenoyl-CoA substrate. Experiments were performed at 25 °C in buffer 100 mM PIPES pH 7.0, according to Basso et. al. (24), and measurement of enzyme-catalyzed chemical reaction started with the addition of InhA to the assay mixture, using quartz cuvettes (500  $\mu\text{L}$  final volume) with an optical path of 1 cm. The maximal velocity for the enzyme reaction (100% of InhA activity) was determined in the absence of inhibitor compound, and in the presence of fixed non-saturating concentrations of NADH (60  $\mu\text{M} \approx K_m$ ) and 2-trans-dodecenoyl-CoA (45  $\mu\text{M} \approx K_m$ ), with the addition of dimethylsulfoxide (DMSO) (final concentration 1%), since the inhibitor was dissolved in 100% DMSO and diluted to a final concentration of 1 % in the experimental reaction. The complex **1** was added to the reaction mixture (100  $\mu\text{M}$  final concentration), and the enzyme velocity was analyzed as the % of inhibition. The velocity was monitored and compared to the maximal rate recorded in the absence of inhibitor, indicating that the complex **1** had no inhibitory effect on the InhA enzymatic activity.

### *Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of IQG607 derivative, complex 1, against Mycobacterium tuberculosis H37Rv strain*

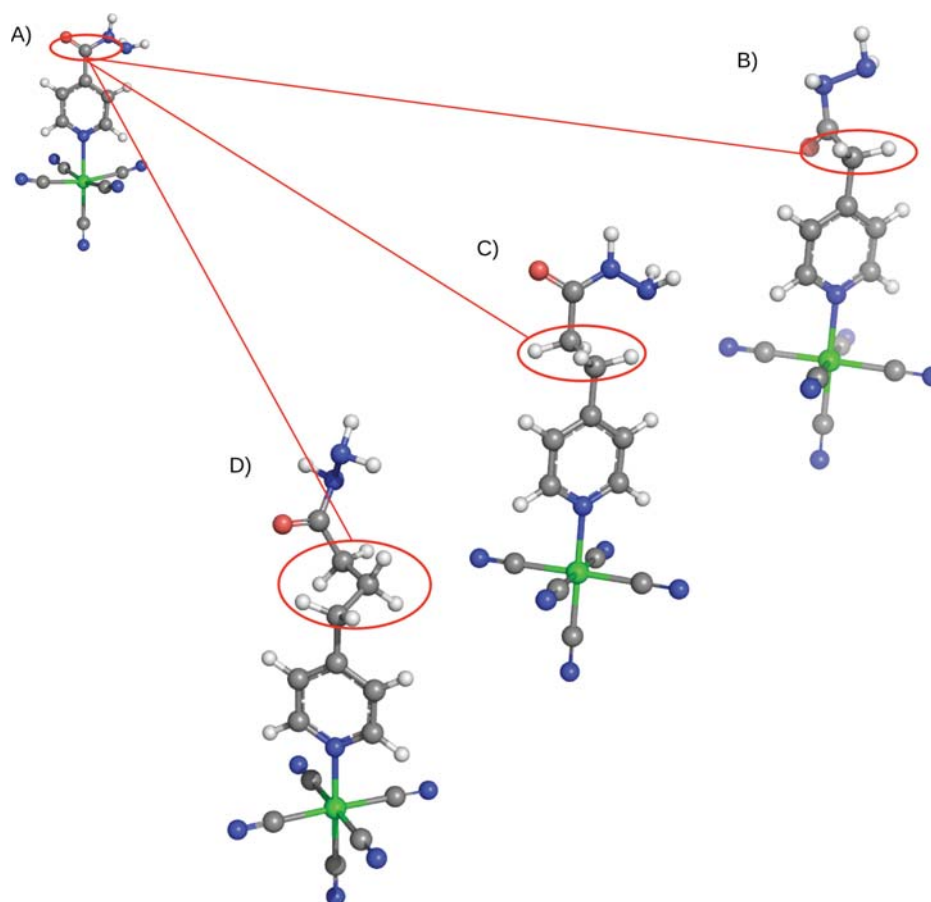
MIC values for INH, used as control drug, and complex **1** were determined by resazurin microtitre assay (REMA) (25). Both INH and complex **1** growth inhibition activity were tested against the Mtb H37Rv strain. The mycobacterial strain was cultivated in Middlebrook 7H9 (Difco) liquid medium supplemented with 10 % (v/v) OADC (oleic acid, albumin, dextrose, catalase; Becton Dickinson) and 0.05 % (m/v) Tween 80 (Sigma). Culture was initially grown at 37°C up to an optical density at 600 nm ( $\text{OD}_{600}$ ) between 0.6 and 0.8. It was then diluted in Middlebrook 7H9 to an  $\text{OD}_{600}$  of 0.006, and 100  $\mu\text{L}$  of M. tuberculosis inoculum was added to each well on the microplate containing 100  $\mu\text{L}$  of drug or Middlebrook 7H9 (control inoculum) to reach an  $\text{OD}_{600}$  of 0.003. Final drug concentration ranges were 0.0078 to 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for isoniazid and 0.195 to 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for complex **1**. Plates were incubated for 7-9 days at 37°C. Sixty microliters of 0.01% resazurin (Sigma Chem. Co.) solution was added to each well; plates were re-incubated for an additional 2 days. A change in color from blue to pink indicated the growth of bacteria, and the MIC was read as the minimum drug concentration that prevented

the color change in resazurin solution. MIC values reported here represent an average of three tests carried out independently. MIC values were  $0.06 \mu\text{g mL}^{-1}$  and higher than  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  for INH and complex **1**, respectively, against Mtb H37Rv strain.

## Results and Discussion

### *Molecular docking simulations*

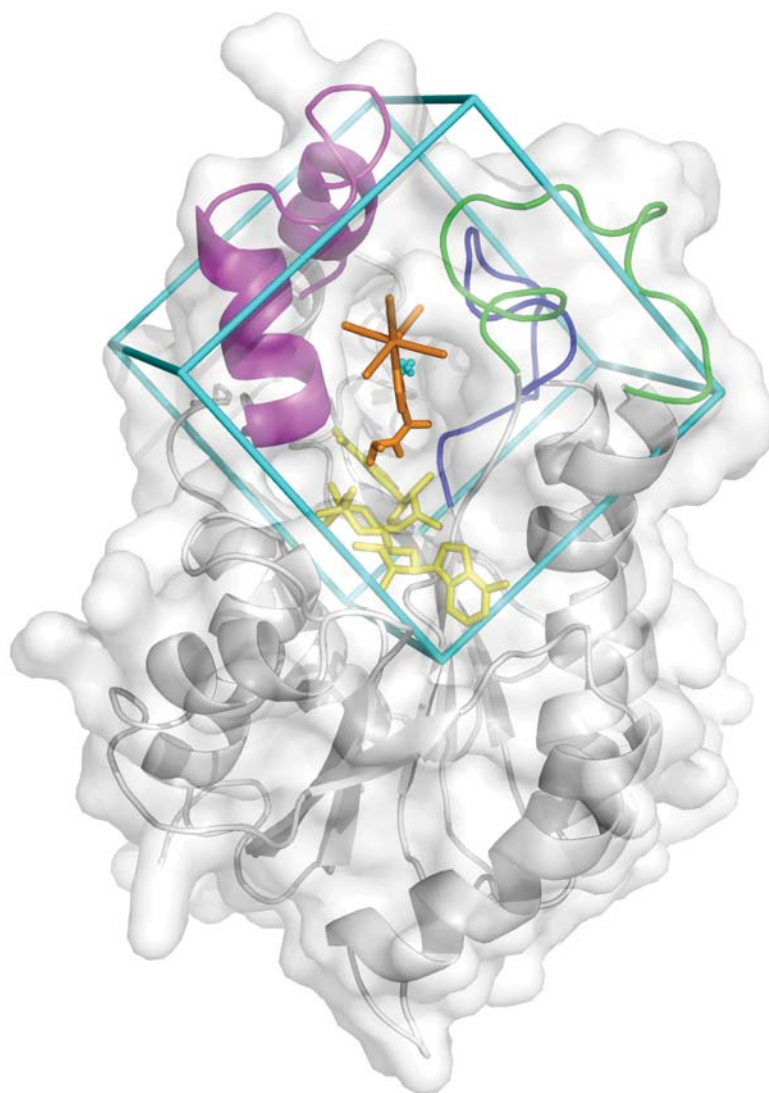
In an attempt to improve the IQG607 compound activity three new derivatives were proposed: pentacyano(2-(pyridine-4-yl)acetohydrazide)ferrate(II), pentacyano(3-(pyridine-4-yl)propanehydrazide)ferrate(II), and pentacyano(4-(pyridine-4-yl)butanehydrazide)ferrate(II), henceforth complexes **1**, **2** and **3**, respectively, by adding an (-CH<sub>2</sub>-) to complex **1**, an (-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-) to complex **2**, and a (-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>-) to complex **3**, between INH's pyridine ring and the hydrazide portion (Figure 2).



**Figure 2:** The IQG607 compound and its three derivatives. **A)** IQG607. **B)** Complex **1** with the addition of a (-CH<sub>2</sub>-), **C)** Complex **2** with the addition of a (-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-), and **D)** Complex **3** with the addition of a (-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>-) group between INH's pyridine ring and the hydrazide portion. All models are represented by balls and sticks and colored as follows: Carbons in dark gray, hydrogens in white, nitrogens in blue, oxygen in red and iron in green. Image created with PyMol (26).

From the docking simulations we observed that, when the grid box is the largest, IQG607 tends to dock on the surface of InhA, or close to NADH. With the assistance of Molinspiration (27) we calculated IQG607 molecular volume, which is 254.8 Å<sup>3</sup>. Considering that the sum of the substrate binding cavity and the NADH binding cavity of 1P44 structure (subunit A), offers a 2,678.1 Å<sup>3</sup> volume for the ligand to accommodate itself (cavity dimension calculated with CASTp (19)). On the other hand, by limiting the size of the box, the ligand-receptor interaction becomes more specific. Furthermore, allowing flexibility to IQG607, it can bind in the upper substrate binding cavity (Figure 3), that has a volume of 1,691.9 Å<sup>3</sup> when NADH is bound to the receptor's active site.



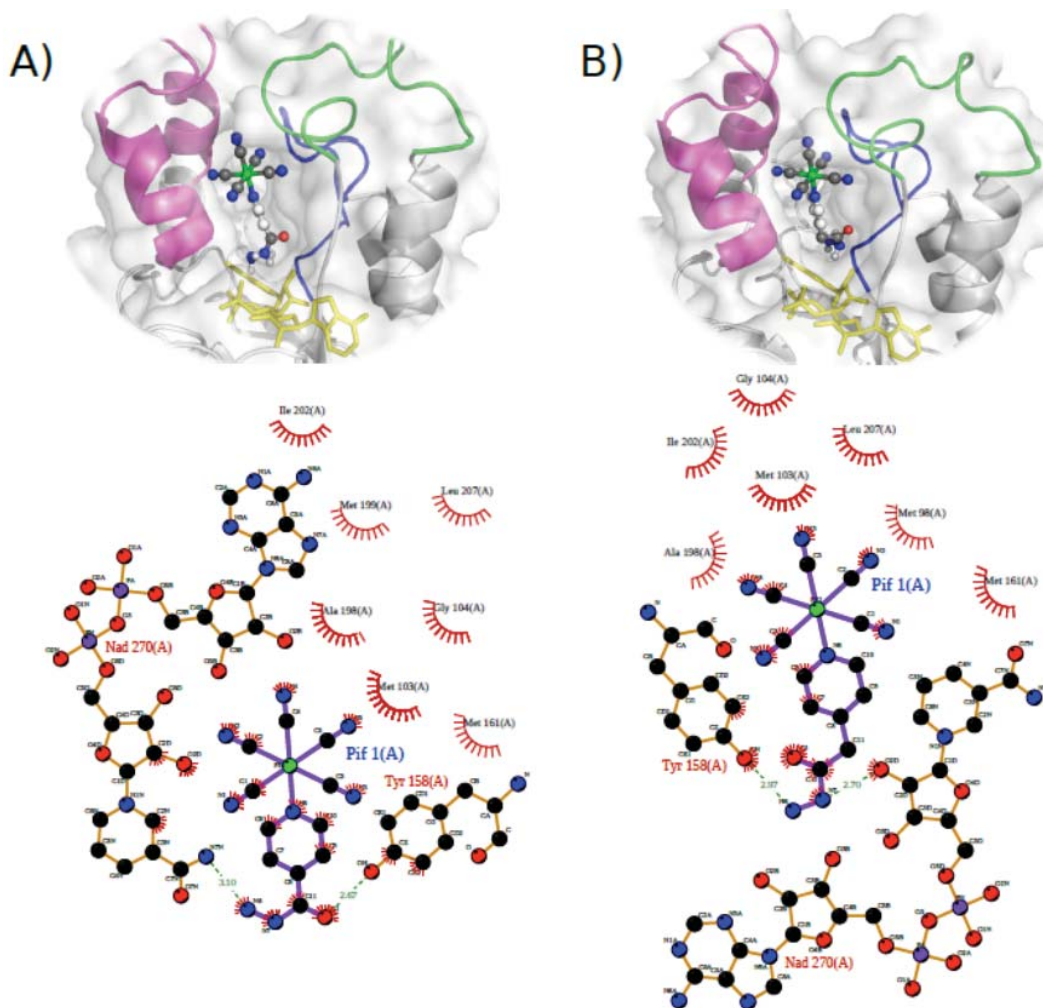


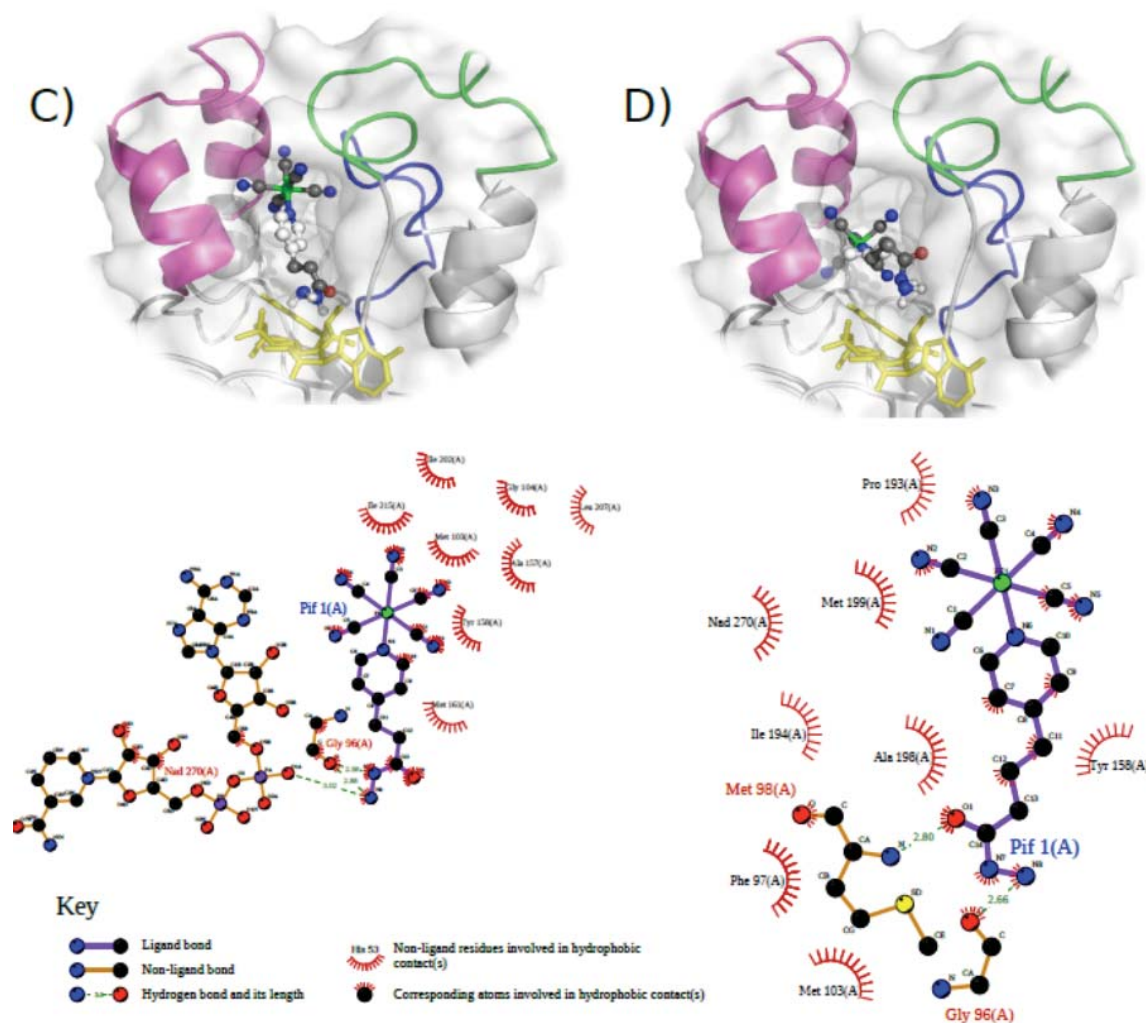
**Figure 3:** InhA-IQG607 complex model. The InhA receptor is represented in ribbons and embedded in a transparent molecular surface. The substrate binding loop is in magenta, the A loop is green and the B loop is dark blue. In yellow sticks we have the coenzyme NADH and IQG607 is in orange. The smaller grid box (in cyan) is shown limiting the space explored by the ligand during the molecular docking simulations. Images created with PyMol (26).

Based on the knowledge built about the compound so far, we decided to look for binding poses where the hydrazide portion of IQG607 was preferentially pointing towards the nicotinamide portion of NADH, somehow imitating the INH mode of binding (Figure 3).

### *InhA-ligand interactions*

For the binding poses selected after visual inspection of the docking simulations (Figure 4), InhA-ligand interactions were analysed with LigPlot (23) and showed that the IQG607 made hydrophobic contacts (NNB) with eight different residues in the receptor's substrate binding cavity.





**Figure 4:** InhA-ligands docked complexes and their respective LigPlot diagrams. **A)** IQG607 in its original form docked to InhA (PDB ID 1P44). **B)** Complex 1, **C)** Complex 2 and **D)** Complex 3. The LigPlot 2D diagram shows the hydrogen bonds (HHB) and hydrophobic contacts (NNB) that the ligands make with the receptors residues. Images created with PyMol (26).

As for the IQG607-derived complexes this number does not vary significantly. Complexes 1 and 3 make NNB contacts with 8 InhA residues each. Complex 2 makes NNB contacts with 9 InhA residues (Table 1).

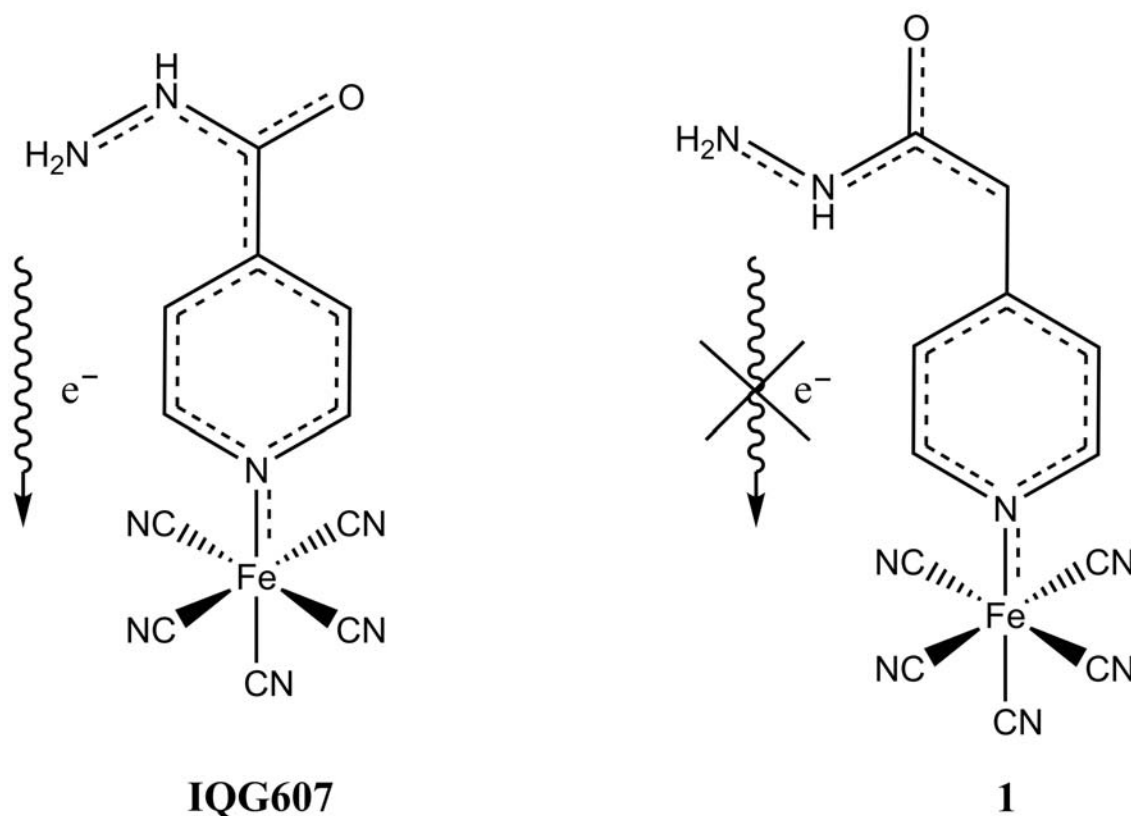
**Table 1.** Summary of hydrogen bonds (HHB) and hydrophobic contacts (NNB) made between InhA enzyme and IQG607 ligands. The hydrogen bond distances are shown in brackets in Å.

<b>Contacts</b>	<i>IQG607</i>	<i>Complex 1</i>	<i>Complex 2</i>	<i>Complex 3</i>
HHB	NAD (3.10)	NAD (2.70)	NAD (3.02)	GLY96 (2.66)
	TYR158 (2.67)	TYR158 (2.97)	GLY96 (2.88)	MET98 (2.80)
NNB	MET103	MET98	GLY96	GLY96
	GLY104	MET103	MET103	PHE97
	TYR158	GLY104	GLY104	MET98
	MET161	TYR158	ALA157	MET103
	ALA198	MET161	TYR158	TYR158
	MET199	ALA198	MET161	PRO193
	ILE202	ILE202	ILE202	ILE194
	LEU207	LEU207	LEU207	ALA198
			ILE215	MET199

These data suggest that the same receptors residues in the substrate-binding cavity made contacts with IQG607 and its derivatives. Several studies have attempted to elucidate the complex INH mechanism of action (6, 28-31). It is widely accepted that INH is a pro-drug and such it has the need of an oxidative reaction to form an adduct with either NADH or NAD<sup>+</sup> to become active. The INH-NAD adduct is formed when INH attaches itself to carbon 4 of the nicotinamide ring of NAD(H) by a covalent bond, inside the catalytic site of the InhA enzyme (8). It has been postulated that the formation of the adduct INH-NAD is preceded by the formation of reactive intermediates, and apparently an acyl radical is the key intermediate in the oxidation of INH (25, 30, 31). Experimental data (32) suggest that the inhibition of InhA occurs at a faster rate when in the presence of NADH than NAD<sup>+</sup>, implying the importance of this acylated radical. Braslau et. al. (33) have shown that the oxidation of hydrazides with transition metal oxidants involve the formation of an acyl radical intermediate. Having that in

mind, in the study proposed by Sousa et al. (13), the compound IQG607 was designed in an attempt to overcome INH need for activation, yet to form the acyl radical intermediate. The idea was to design a novel self-activating metallodrug, which could promote an intramolecular electron transfer reaction with no need of the oxidative catalase/oxidase KatG enzyme (5). It was verified that the cyanoferrate moiety of the compound has no ability to inhibit InhA enzyme either in the presence or absence of NAD(H), showing that the INH moiety is still the major pharmacophore (13) of the IQG607 compound. They suggest that the cyanoferrate moiety made an impact in the INH mechanism of activation. The metal atom of IQG607 triggers the oxidation of the INH allowing a faster intramolecular electron transfer reaction to take place (13).

The InhA-ligands interactions obtained from the docking simulations pointed out that the three IQG607 derivatives could be successful compounds. After the synthesis of complex **1**, enzymatic assays showed that there was no variation in the enzyme's activity, indicating that the compound has no inhibitory effect on the InhA enzyme. In an attempt to lengthen the IQG607 compound, allowing more torsion angles to the molecule, thus enabling it to improve binding in the substrate-binding pocket, we found that we separated two important parts of INH, and this caused the inactivation of the inhibitor. To the best of our knowledge, this has not been reported in the literature before. It seems that the modifications introduced in IQG607 have prevented the formation of the acyl radical; therefore, the adduct could not be formed. As reported previously (28), the formation of isonicotinamide results from the splitting of the C-N bond of isoniazid, but the modification we have introduced in the IQG607 derivatives was located between the pyridine ring of INH and the hydrazide group. Our hypothesis is that separation of the carbonyl group from the pyridine ring isolates the carbonyl, and this could be the reason why the electron transfer does not occur. The modifications introduced in the molecule have broken the resonance of the pyridine ring, relative to the carbonyl group, hampering the electron transfer (Figure 5).



**Figure 5:** The probable mechanism of interruption of the electron transfer reaction. The compound IQG607, in its original form, allows the intramolecular oxidation reaction to occur normally. However the breakage of the resonance (complex **1**) prevents the intramolecular oxidation and the possible formation of the corresponding acyl radical.

### Conclusions

In the present study, we combined molecular modelling and docking simulations with chemical synthesis, and *in vitro* and *in vivo* biochemical and cell experimental methods to obtain improved analogues of the IQG607 (pentacyano(isoniazid)ferrate(II)) compound, a novel drug candidate to inhibit the *Mycobacterium tuberculosis*' InhA enzyme. The results surprisingly revealed that the modifications introduced in the original IQG607 caused its inactivation, instead. To explain this, we believe that separating the pyridine ring and the C-N bond of the INH pharmacophore seems to prevent the expected electron transfer reaction to completing the INH oxidation, thus inactivating the complex. These data agree with the need for an activation mechanism of INH that is triggered by the oxidation of its hydrazine portion, thus corroborating the mechanism of action previously proposed for IQG607. Additionally, the *in silico*, *in vitro*,



and *in vivo* experiments revealed that once isolating the electron transfer (or making it difficult to happen) we no longer have an active compound, hinting at molecular modifications that should not be considered for the improvement of IQG607 inhibitory activity against Mtb's InhA enzyme.

### Acknowledgments

This work is supported all or in part by grants (305984/2012-8, 559917/2010-4, 551209/2010-0) from the Brazilian National Research and Development Council (CNPq) to ONS and INCT-TB/CNPq to Prof. Diógenes Santiago Santos and PRONEX 2009/FAPERGS to Prof. Luiz Augusto Basso. ONS, LAB, DSS, and AAS are CNPq Research Fellows.

### References

1. J. Oliveira, E. Sousa, L.A. Basso, M. Palaci, R. Dietze, D. Santos, I. Moreira. *Chem. Commun.* 3, 312-313 (2004).
2. A. Dessen, A. Quemard, J. S. Blanchard, W. R. Jacobs Jr, J. C. Sacchettini. *Science* 267, 1638-1641 (1995).
3. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2012. Geneva (2012).
4. D. Rozwarski, G. Grant, D. Barton, W. R. Jacobs Jr, J. Sacchettini. *Science* 279, 98-102 (1998).
5. L.V. Baker, T.J. Brown, O. Maxwell, A.L. Gibson, Z. Fang, M.D. Yates, and F.A. Drobniwski. *Antimicrob Agents Chemother.* 49, 1455-1464 (2005).
6. J. Oliveira, E. de Sousa, O. Norberto de Souza, S. Moreira, D. Santos, L. A. Basso. *Curr. Pharm. Design.* 12, 2409-2424 (2006).
7. E. Sousa, D. Pontes, I. Diógenes, L. Lopes, J. Oliveira, L. A. Basso, D. Santos, I. Moreira. *J Inorg Biochem.* 99, 368-375 (2005).
8. I. B. Vasconcelos, E. Meyer, F. A. M. Sales, I. S. Moreira, L. A. Basso, D. S. Santos. *Anti-infect Age Med Chem.* 7, 50-62 (2008) .
9. E. M. L. Cohen, K. S. Machado, M. Cohen, O. Norberto de Souza. *BMC Genomics* 12, S7 (2011).
10. A. L. P. da Costa, I. Pauli, M. Dorn, E. K. Schroeder, C. G. Zhan, O. Norberto de Souza. *J Mol Model.* 18, 1779-1790 (2011).



11. V. S. Rodrigues-Junior, A. S. Junior, A. J. Santos, C. Z. Schneider, J. B. Calixto, E. H. S. Sousa, L. G. F. Lopes, A. A. Souto, L. A. Basso, D. S. Santos, M. M. Campos. *J Antimicrob Age.* 40, 182-185 (2012).
12. L. A. Basso, C. Schneider, A. Santos, A. Santos Jr, M. Campos, A. Souto, D. Santos. *J Braz Chem Soc.* 21, 1384-1389 (2010).
13. E. H. S. Sousa, L. A. Basso, D. S. Santos, I. C. N. Diógenes, E. Longhinotti, L. G. F. Lopes, I. S. Moreira. *J Biol Inorg Chem.* 17, 275-83 (2011).
14. K. V. Ramesh, M. Purohit, K. Mekhala, M. Krishnan, K. Wagle, S. Deshmukh. *J Biomol Struct Dyn.* 25(5), 481-493 (2008).
15. S. Gahoi, R. S. Mandal, N. Ivanisenko, P. Shrivastava, S. Jain, A. K. Singh, M. V. Raghunandan, S. Kanchan, B. Taneja, C. Mandal, V. A. Ivanisenko, A. Kumar, R. Kumar, Open Source Drug Discovery Consortium, S. Ramachandran. *J Biomol Struct Dyn.* 31(1), 30-43 (2013).
16. T. C. Ramalho, M. S. Caetano, D. Josa, G. P. Luz, E. A. Freitas, E. F. da Cunha. *J Biomol Struct Dyn.* 28(6), 907-917 (2011).
17. M. Thompson, (2004). <http://www.arguslab.com> (Accessed September 22, 2012).
18. A. Pedretti, L. Villa, G. Vistoli. *J Comput Aid Mol Des.* 18, 167-173 (2004).
19. J. Dundas, Z. Ouyang, J. Tseng, A. Binkowski, Y. Turpaz, J. Liang. *Nucleic Acids Res.* 34, W116-W118 (2006).
20. D. A. Rozwarski, C. Vilcheze, M. Sugantino, R. Bittman, J. C. Sacchettini. *J Biol Chem.* 274, 15582-15589 (1999).
21. M. Kuo, H. Morbidoni, D. Alland, S. Sneddon, B. Gourlie, M. Staveski, M. Leonard, J. Gregory, A. Janjigian, C. Yee, J. M. Musser, B. Kreiswirth, H. Iwamoto, R. Pedrozzi, W. R. Jacobs, J. C. Sacchettini, D. A. Fidock. *J Biol Chem.* 278, 20851-20859 (2003).
22. G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell, A. J. Olson. *J. Comput Chem.* 30, 2785-2791 (2009).
23. A. C. Wallace, R. A. Laskowski, J. M. Thornton. *Protein Eng.* 8, 127-134 (1995).
24. L. A. Basso, R. Zheng, J. Musser, W. R. Jacobs Jr, J. Blanchard. *J. Infect Dis.* 178, 769-775 (1998).
25. J. C. Palomino, A. Martin, M. Camacho, H. Guerra, J. Swings, F. Portaels. *J Antimicrob Agents Chemother.* 46, 2720-2722 (2002).
26. L.L. C. Schrödinger, (2010). <http://pymol.org/> (Accessed September 22, 2012).
27. Molinspiration Property Calculation Service. <http://www.molinspiration.com> (Accessed September 22, 2012).
28. M. Wilming, K. Johnsson. *Angew Chem Int Ed.* 38, 2588-2590 (1998).
29. J. Bodiguel, J. M. Nagy, K. A. Brown, B. Jamart-Grégoire. *J Am Chem Soc.* 123, 3832-3833 (2001).

30. M. Nguyen, C. Claparols, J. Bernadou, B. Meunier. *Chembiochem* 2, 877-883 (2001).
31. R. I. J. Amos, B. S. Gourlay, H. Schiesser, J. A. Smith, B. F. Yates. *Chem Commun.* 14, 1695-1697 (2008).
32. K. Johnsson, P. G. Schultz. *J Am Chem Soc.* 116, 7425-7426 (1994).
33. R. Braslau, M. O. Anderson, F. Rivera, A. Jimenez, T. Haddad, J. R. Axon. *Tetrahedron* 58, 5513-5523 (2002).

## 6 Modelos Derivados do IQG607

### 6.1 Resultados Parciais não Apresentados no Artigo

Embora as simulações de docagem molecular tenham se mostrado promissoras, foi constatado por meio de ensaios enzimáticos que a separação do anel piridínico e da porção hidrazida do composto IQG607\_001 tornam a molécula inativa. Estes dados estão apresentados e discutidos no artigo científico que compõe o corpo da presente Tese (capítulo 5), bem como nas considerações finais deste volume. Por este motivo, os compostos IQG607\_002 e 003 não foram sintetizados. Além destes modelos outros compostos foram desenhados e tratados da mesma forma como foram os compostos citados no artigo.

Um resumo dos principais dados relacionados às simulações de docagem molecular destes compostos, bem como das análises da interação receptor-ligante que ocorreram durante estas simulações são apresentados na Tabela 4. Mais detalhes podem ser encontrados nas próximas seções deste apêndice que tratam de cada composto.

Tabela 4: Sumário das simulações de docagem molecular e interações receptor-ligante realizados entre a InhA e os compostos desenhados.

Composto	Dados da simulação de docagem molecular		Dados da Interação receptor-ligante	
	Variação de FEB (kcal/mol)	FEB da melhor pose (kcal/mol)	Formação de ligações de H (HHB) – distância em Å	Contatos hidrofóbicos (NNB)
019	-4.95 a -3.38	-4.30	NAD (3.14) Tyr158 (2.92)	Met103, Phe149, Tyr158, Ala198, Met199, Ile215
020	-4.74 a -1.98	-4.09	NAD (3.12 e 2.49) Tyr158 (2.61)	Met103, Gly104, Ala15, Tyr158, Ala198, Leu207, Glu219, NAD
021	-5.18 a -2.74	-4.63	NAD (3.35 e 3.01)	Met103, Gly104, Phe149, Ala157, Tyr158, Pro193, Ile194, Met199, Ile202, Leu207, Ile215, NAD
022	-4.57 a -2.68	-3.49	NAD (2.90) Tyr158 (2.84)	Gly96, Phe97, Met98, Met103, Gly104, Met161, Ala198, Met199, Ile202, Leu207, Ile215, NAD
022_03lig.	-4.10	-2.81	Gly104	Gln100, Met103, Gly104,

fixas	a		(2.93)	Tyr158, Pro193, Thr196, Met199, Ile202, Leu207, NAD
	-2.78			
023	-3.82	-3.36	Tyr158 (2.71)	Gly96, Met103, Gly104, Tyr158, Ala198, Met199, Ile202, Leu207, Ile215, NAD
	a			
	-2.22			
023_03lig. fixas	-3.56	-3.56	TYR158 (2.71)	Gly96, Met103, Gly104, Tyr158, Ala198, Met199, Ile202, Leu207, Ile215, NAD
	a			
	-2.17			
024	-5.06	-4.04	Gly104 (2.94) Met98 (3.04)	Gly96, Met98, Gln100, Met103, Gly104, Tyr158, Ala198, Met199
	a			
	-2.97			
024_03lig. fixas	-4.14	-3.68	Tyr158 (2.73)	Gly96, Phe97, Met103, Gly104, Ala198, Met199, Ile202, Leu207, Ile215, NAD
	a			
	-2.88			
025	-5.07	-4.01	Tyr158(2.84)	Gly96, Phe97, Met103, Gly104, Met161, Ala198, Met199, Ile202, Leu207, Ile215, NAD
	a			
	-3.52			
025_03lig. fixas	-3.93	-3.50	Não ocorreu	Phe97, Met98, Met103, Gly104, Tyr158, Pro193, Thr196, Met199, Ile215, NAD
	a			
	-3.31			
026	-4.59	-3.74	NAD (2.59 e 2.98) Tyr158 (2.99)	Met103, Phe149, Ala157, Tyr158, Pro193, Leu207, Ile215, Glu219, NAD
	a			
	-0.38			
027	-5.29 a	-5.29	Cluster 01: NAD (2.44) Tyr158 (2.65)	Cluster03: NAD (2.86 e 2.84) Cluster01: Met98, Met103, Glu104, Tyr158, Pro193, Ile194, Arg195, Ala198, Ile202, Leu207, Glu219, NAD Cluster 03: Met103, Phe149, Ala157, Tyr158, Pro193, Met199, Leu207, Ile215, Glu219, NAD
	-1.55	cluster 01		
		-4.96 cluster 03		

### 6.1.1 Modelos IQG607\_004 ao IQG607\_018

Os modelos 004 ao 018 foram projetados separando o anel piridínico da porção cianometálica. Foi constatado posteriormente, com a ajuda de um bioquímico especialista em síntese de compostos químicos (Prof. Pablo Machado), que tais modificações não poderiam ser sintetizadas, portanto estes modelos precisaram ser abandonados.

### 6.1.2 Modelos IQG607\_019 ao IQG607\_027

O desenho destes modelos iniciais proporcionou a oportunidade de um aprendizado mais detalhado de processos bioquímicos, não só a respeito do papel da enzima InhA na formação da parede celular das micobactérias, mas também da interação do composto IQG607 com o seu alvo farmacológico. Com base neste aprendizado, nos modelos 019 ao 027 optamos por desenhar novos compostos que mantivessem as características estruturais do composto IQG607, ou seja, sem quebras na molécula original, mas que mesmo assim permitissem o alongamento da molécula - Figura 10.

As próximas seções deste apêndice apresentam um compilado de informações sobre o melhor resultado de cada simulação realizada com os modelos desenhados. Vale lembrar que os critérios de docagem molecular bem como a análise dos resultados da interação proteína-ligante (como, por exemplo, a escolha da melhor pose docada) são os mesmos empregados no artigo científico, descrevendo o análogo sintetizado.

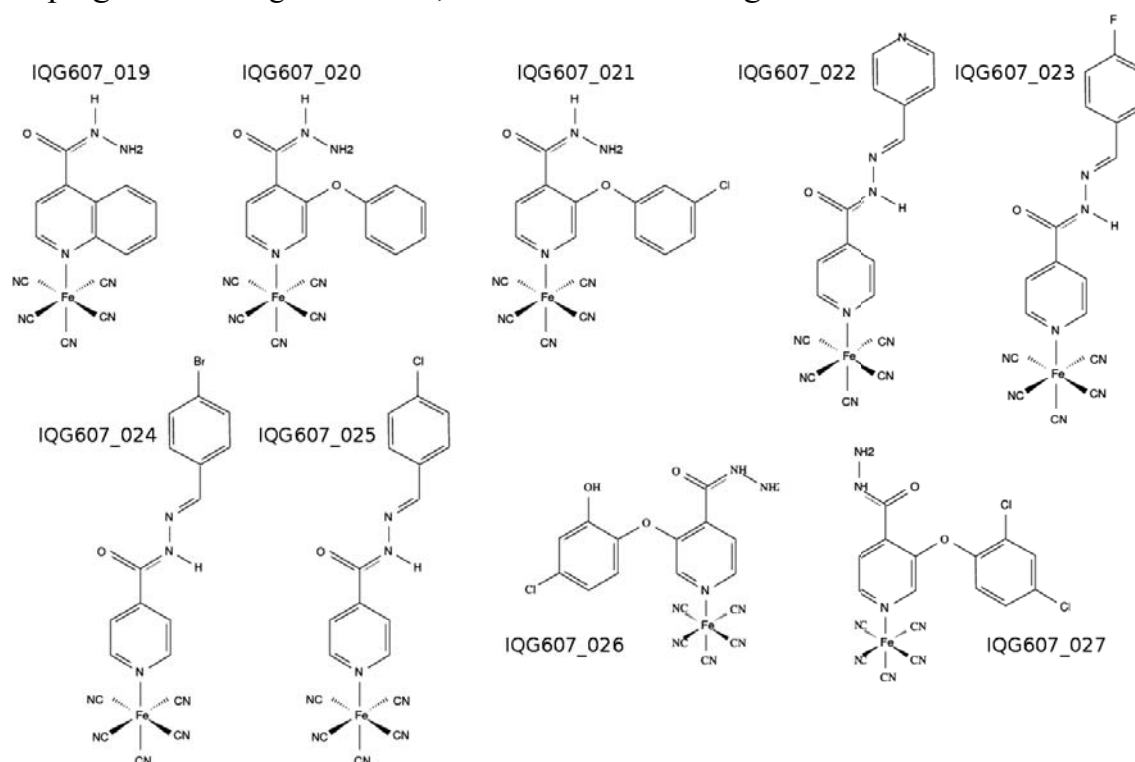


Figura 10: Fórmula estrutural plana dos compostos IQG607\_019 ao IQG607\_027. Figura da Autora.

### 6.1.2.1 Modelo IQG607\_019

Foi adicionado ao composto IQG607 mais um anel aromático para testar como a molécula com este tipo de volume poderia se acomodar no espaço disponível na cavidade de ligação do substrato. O ligante formou ângulo de 90° entre o N do anel e a porção cianometálica “dobrando” o composto ao otimizar a molécula (o mesmo não pôde ser evitado). Uma representação do melhor resultado obtido na simulação de docagem molecular e na análise da interação proteína-ligante pode ser observada na Figura 11. Para facilitar a leitura, os valores de energia livre de ligação (FEB) e os resíduos de aminoácidos do receptor que interagiram com cada modelo desenhado estão listados na Tabela 4.

- Dados da simulação de docagem:
  - Formação de 12 *clusters*.
  - Variação de FEB: -4.95 a -3.38 kcal/mol (*cluster* 01 a 12).
  - *Cluster* com a melhor pose: 02 (com 05 poses).
  - FEB do melhor *cluster*: -4.30 kcal/mol.

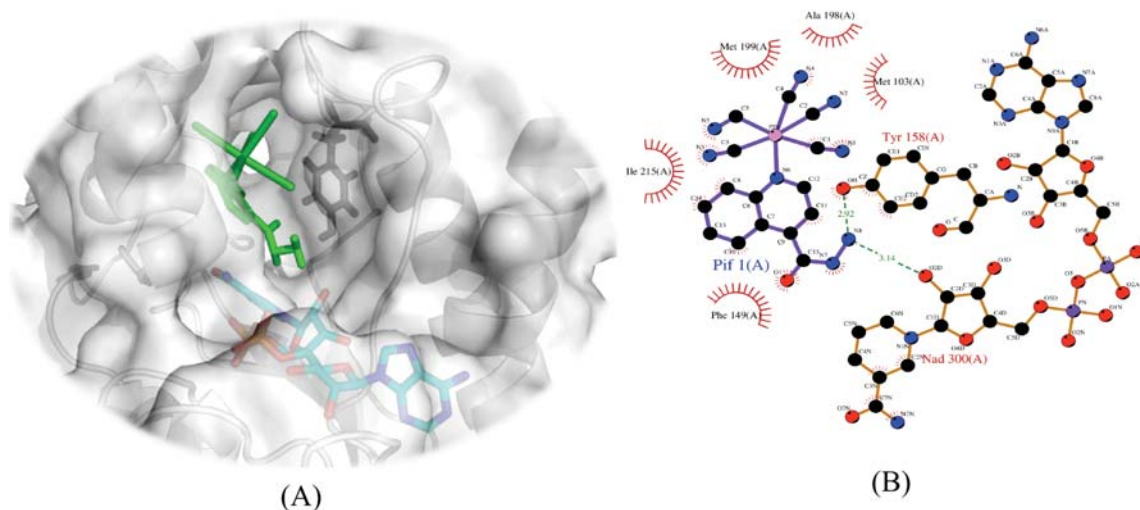


Figura 11: Melhor encaixe receptor-ligante durante a simulação de docagem molecular. Em (A) pode-se observar a melhor pose docada do composto IQG607\_019 no sítio ativo do receptor, baseado nos critérios citados no texto. Em (B) o diagrama 2D gerado pelo programa *LigPlot* após a análise das interações receptor-ligante. Figura da Autora.

- Dados da interação proteína-ligante:
  - HHB: NAD (3.14Å), e Tyr158 (2.92Å).
  - NNB: Met103, Phe149, Tyr158, Ala198, Met199 e Ile215.

### 6.1.2.2 Modelo IQG607\_020

Composto semelhante ao 019, porém desta vez com um átomo de oxigênio separando os dois anéis, dando assim mais mobilidade à molécula.

- Dados da simulação de docagem:
  - Formação de 14 *clusters*.
  - Variação de FEB: -4.74 a -1.98 kcal/mol (*clusters* 01 a 14).
  - *Cluster* com a melhor pose: 02 (com 04 poses).
  - FEB do melhor *cluster*: -4.09 kcal/mol.

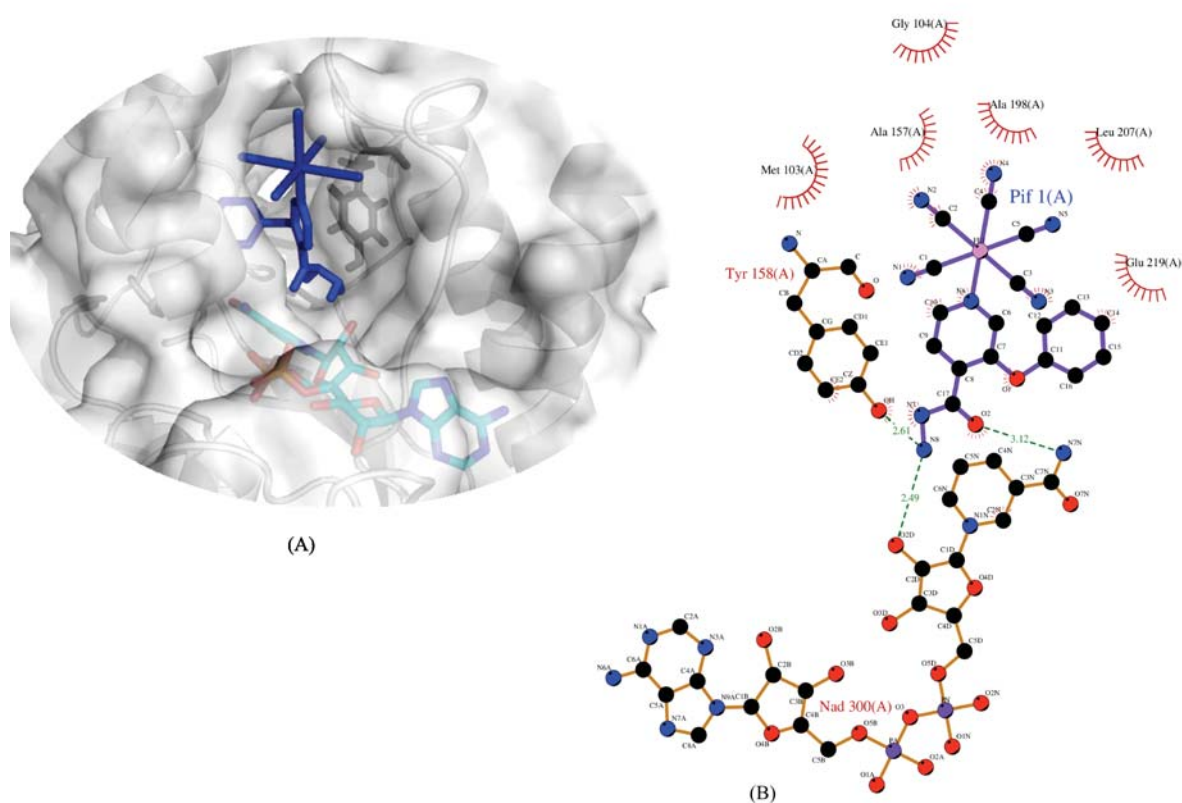


Figura 12: Melhor encaixe receptor-ligante durante a simulação de docagem molecular. Em (A) pode-se observar a melhor pose docada do composto IQG607\_020 no sítio ativo do receptor, baseado nos critérios citados no texto. Em (B) o diagrama 2D gerado pelo programa *LigPlot* após a análise das interações receptor-ligante. Figura da Autora.

- Dados da interação proteína-ligante:
  - HHB: NAD (3.12Å e 2.49Å), e Tyr158 (2.61Å).
  - NNB: Met103, Gly104, Ala157, Tyr158, Ala198, Leu207, Glu219 e NAD.



### 6.1.2.3 Modelo IQG607\_021

Composto semelhante ao 020, porém desta vez com um átomo de Cloro no segundo anel. Este modelo foi inspirado na ideia de combinar o IQG607 com o composto triclosano (TCL) que é reconhecidamente um inibidor da InhA (Kuo *et al.*, 2003; Freundlich *et al.*, 2009). A ideia aqui é a de favorecer um empilhamento de anéis, fazendo com que o novo composto ocupe a cavidade de ligação do substrato.

- Dados da simulação de docagem:
  - Formação de 12 *clusters*.
  - Variação de FEB: -5.18 a -2.74 kcal/mol (*cluster* 01 a 12).
  - *Cluster* com a melhor pose: 04 (com 05 poses).
  - FEB: do melhor *cluster*: -4.63 kcal/mol.

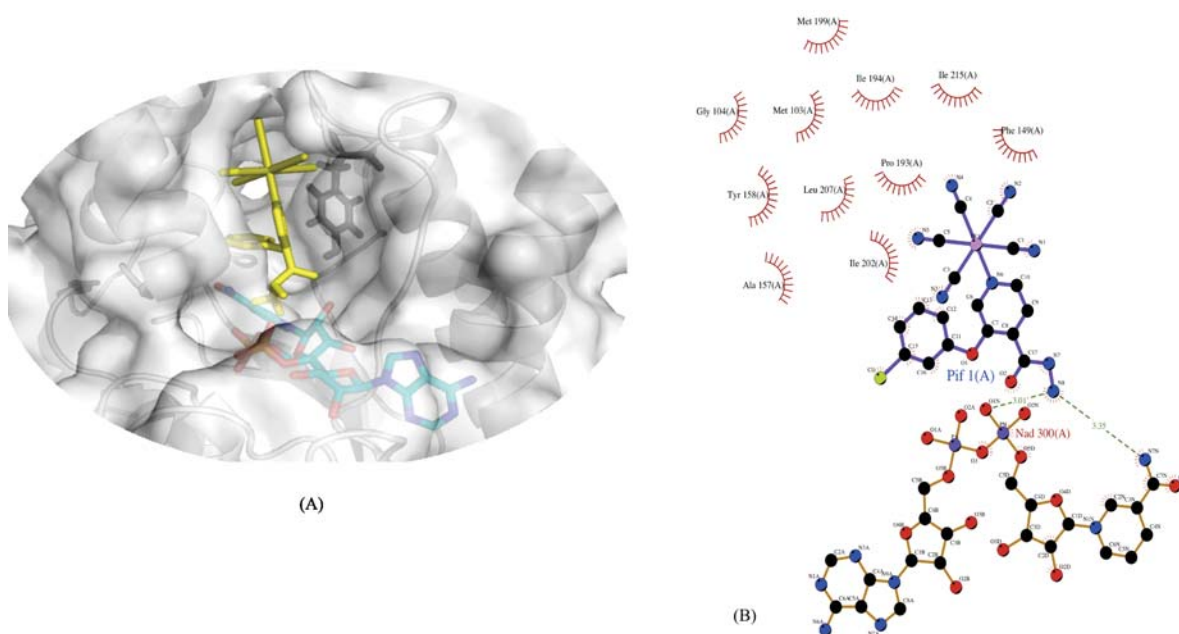


Figura 13: Melhor encaixe receptor-ligante durante a simulação de docagem molecular. Em (A) pode-se observar a melhor pose docada do composto IQG607\_021 no sítio ativo do receptor, baseado nos critérios citados no texto. Em (B) o diagrama 2D gerado pelo programa *LigPlot* após a análise das interações receptor-ligante. Figura da Autora.

- Dados da interação proteína-ligante:
  - HHB: NAD (3.35Å e 3.01Å).
  - NNB: Met103, Gly104, Phe149, Ala157, Tyr158, Pro193, Ile194, Met199, Ile202, Leu207, Ile215, NAD.

### 6.1.2.4 Modelo IQG607\_022

Composto onde a modificação é inserida no segundo N da molécula. Neste modelo foi permitida flexibilidade entre a ligação N-N.

- Dados da simulação de docagem:
  - Formação de 08 *clusters*.
  - Variação de FEB: -4.57 a -2.68 kcal/mol (*cluster* 01 a 08).
  - *Cluster* com a melhor pose: 04 (com 02 poses).
  - FEB: do melhor *cluster*: -3.49 kcal/mol.

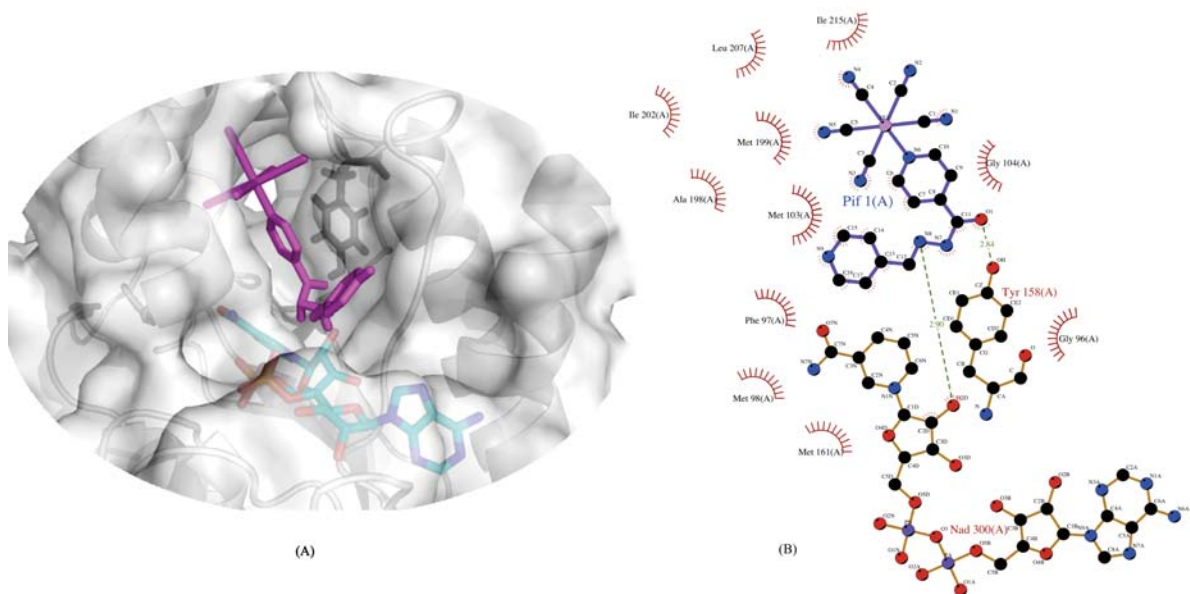


Figura 14: Melhor encaixe receptor-ligante durante a simulação de docagem molecular. Em (A) pode-se observar a melhor pose docada do composto IQG607\_022 no sítio ativo do receptor, baseado nos critérios citados no texto. Em (B) o diagrama 2D gerado pelo programa *LigPlot* após a análise das interações receptor-ligante. Figura da Autora.

- Dados da interação proteína-ligante:
  - HHB: NAD (2.90Å), Tyr158 (2.84Å).
  - NNB: Gly96, Phe97, Met98, Met103, Gly104, Met161, Ala198, Met199, Ile202, Leu207, Ile215 e NAD.

### 6.1.2.5 Modelo IQG607\_022 com 03 ligações fixas

Foi sugerido pelo Prof. Pablo Machado que a ligação entre os átomos N-N fosse mantida rígida. Portanto, dos modelos 022 ao 025 foram repetidas as simulações de docagem. Além da ligação N-N, outras 02 foram mantidas rígidas: C-N, por se tratar de uma ressonância; e N-C por indicação do próprio *AutoDock*.

- Dados da simulação de docagem:
  - Formação de 04 *clusters*.
  - Variação de FEB: -4.10 a -2.78 kcal/mol (*cluster* 01 a 04).
  - *Cluster* com a melhor pose: 03 (com 01 pose).
  - FEB: do melhor *cluster*: -2.81 kcal/mol.

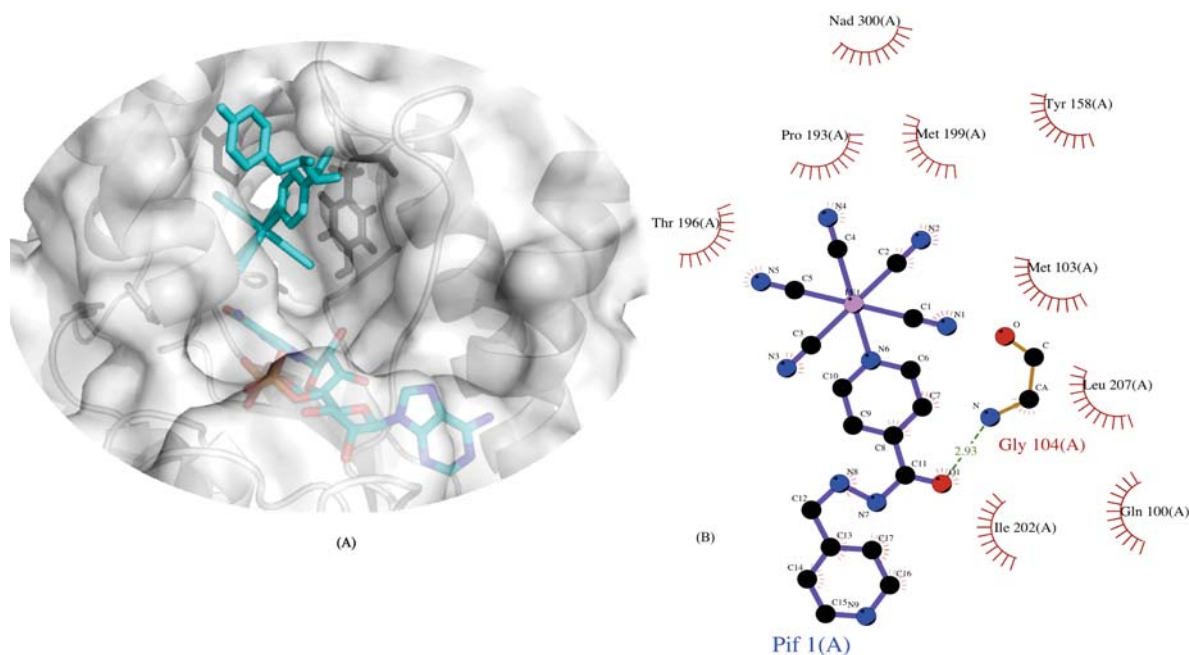


Figura 15: Melhor encaixe receptor-ligante durante a simulação de docagem molecular. Em (A) pode-se observar a melhor pose docada do composto IQG607\_022 no sítio ativo do receptor, baseado nos critérios citados no texto. Em (B) o diagrama 2D gerado pelo programa *LigPlot* após a análise das interações receptor-ligante. Figura da Autora.

- Dados da interação proteína-ligante:
  - HHB: Gly104 (2.93Å).
  - NNB: Gln100, Met103, Gly104, Tyr158, Pro193, Thr196, Met199, Ile202, Leu207 e NAD.

### 6.1.2.6 Modelo IQG607\_023

- Dados da simulação de docagem:
  - Formação de 11 *clusters*.
  - Variação de FEB: -3.82 a -2.22 kcal/mol (*cluster* 01 a 11).
  - *Cluster* com a melhor pose: 03 (com 02 poses).
  - FEB: do melhor *cluster*: -3.36 kcal/mol.

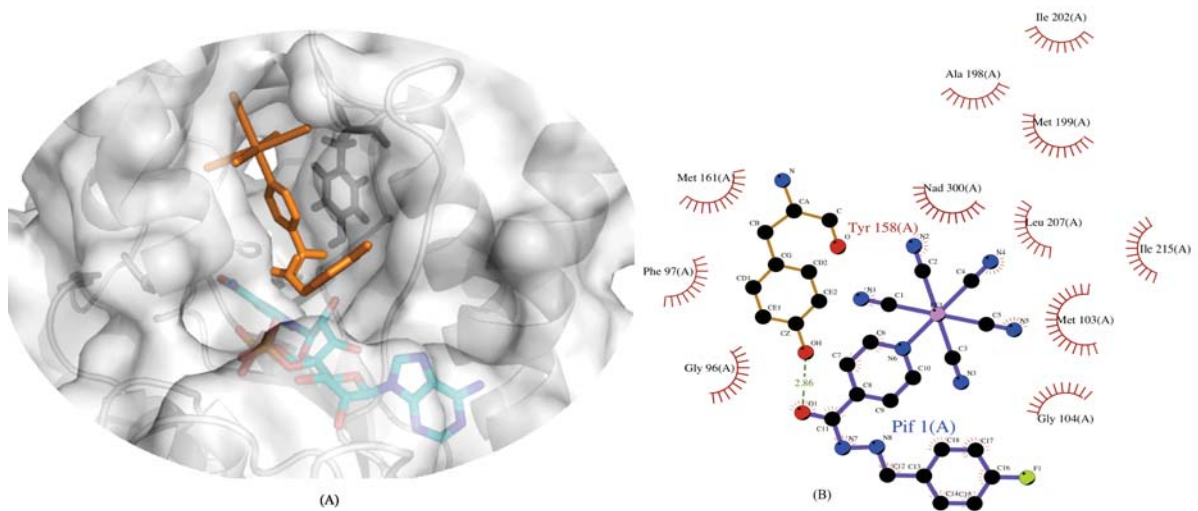


Figura 16: Melhor encaixe receptor-ligante durante a simulação de docagem molecular. Em (A) pode-se observar a melhor pose docada do composto IQG607\_023 no sítio ativo do receptor, baseado nos critérios citados no texto. Em (B) o diagrama 2D gerado pelo programa *LigPlot* após a análise das interações receptor-ligante. Figura da Autora.

- Dados da interação proteína-ligante:
  - HHB: Tyr158 (2.86Å).
  - NNB: Gly96, Phe97, Met103, Gly104, Met161, Ala198, Met199, Ile202, Leu207, Ile215 e NAD.

### 6.1.2.7 Modelo IQG607\_023 com 03 ligações fixas

- Dados da simulação de docagem:
  - Formação de 06 *clusters*.
  - Variação de FEB: -3.56 a -2.17 kcal/mol (*cluster* 01 ao 06).
  - *Cluster* com a melhor pose: 01 (com 08 poses).
  - FEB: do melhor *cluster*: -3.56 kcal/mol.

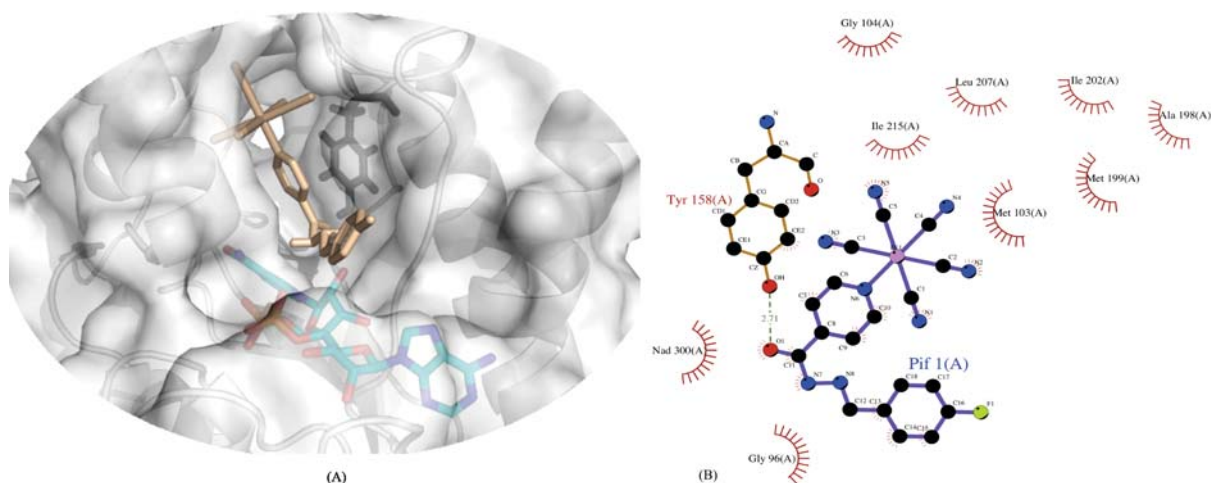


Figura 17: Melhor encaixe receptor-ligante durante a simulação de docagem molecular. Em (A) pode-se observar a melhor pose docada do composto IQG607\_023 no sítio ativo do receptor, baseado nos critérios citados no texto. Em (B) o diagrama 2D gerado pelo programa *LigPlot* após a análise das interações receptor-ligante. Figura da Autora.

- Dados da interação proteína-ligante:
  - HHB: Tyr158 (2.71Å).
  - NNB: Gly96, Met103, Gly104, Tyr158, Ala198, Met199, Ile202, Leu207, Ile215 e NAD.

### 6.1.2.8 Modelo IQG607\_024

- Dados da simulação de docagem:
  - Formação de 11 *clusters*.
  - Variação de FEB: -5.06 a -2.97 kcal/mol (*cluster* 01 a 11).
  - *Cluster* com a melhor pose: 04 (com 05 poses).
  - FEB: do melhor *cluster*: -4.04 kcal/mol.

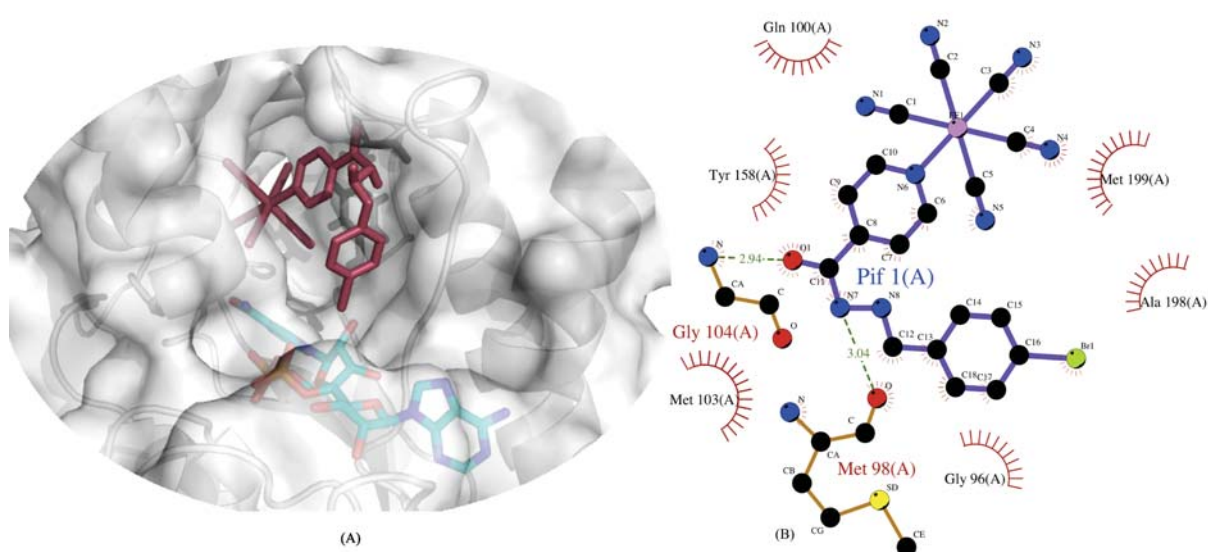


Figura 18: Melhor encaixe receptor-ligante durante a simulação de docagem molecular. Em (A) pode-se observar a melhor pose docada do composto IQG607\_024 no sítio ativo do receptor, baseado nos critérios citados no texto. Em (B) o diagrama 2D gerado pelo programa *LigPlot* após a análise das interações receptor-ligante. Figura da Autora.

- Dados da interação proteína-ligante:
  - HHB: Gly104 (2.94Å), Met98 (3.04Å).
  - NNB: Gly96, Met98, Gln100, Met103, Gly104, Tyr158, Ala198 e Met199.



### 6.1.2.9 Modelo IQG607\_024 com 03 ligações fixas

- Dados da simulação de docagem:
  - Formação de 06 *clusters*.
  - Variação de FEB: -4.14 a -2.88 kcal/mol (*cluster* 01 ao 06).
  - *Cluster* com a melhor pose: 03 (com 02 poses).
  - FEB: do melhor *cluster*: -3.68 kcal/mol.

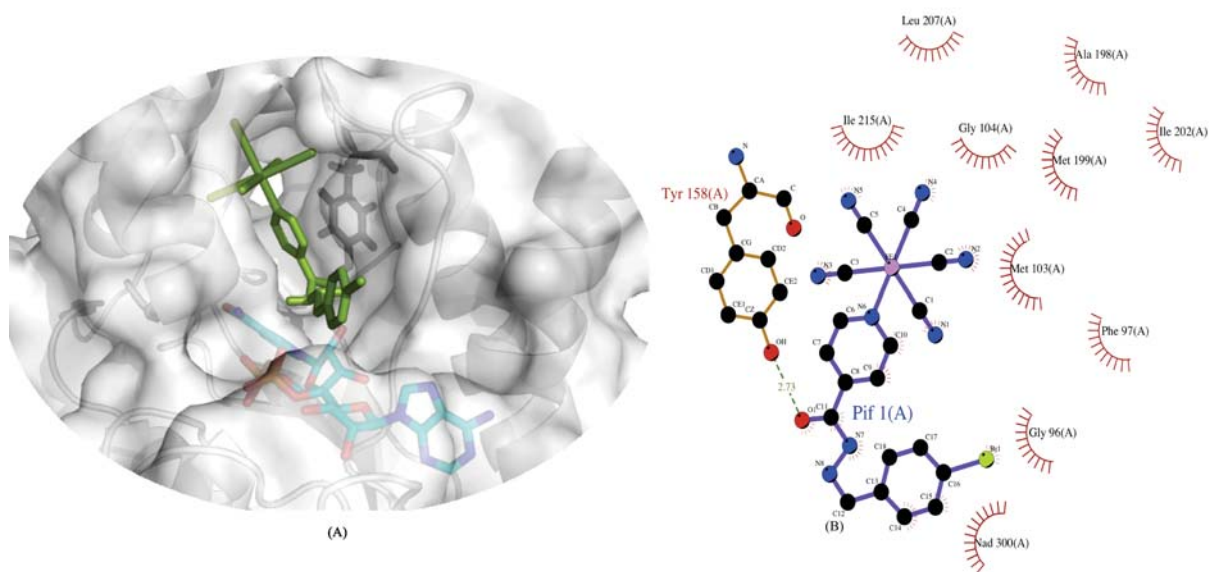


Figura 19: Melhor encaixe receptor-ligante durante a simulação de docagem molecular. Em (A) pode-se observar a melhor pose docada do composto IQG607\_024 no sítio ativo do receptor, baseado nos critérios citados no texto. Em (B) o diagrama 2D gerado pelo programa *LigPlot* após a análise das interações receptor-ligante. Figura da Autora.

- Dados da interação proteína-ligante:
  - HHB: Tyr158 (2.73Å).
  - NNB: Gly96, Phe97, Met103, Gly104, Ala198, Met199, Ile202, Leu207, Ile215 e NAD.



### 6.1.2.10 Modelo IQG607\_025

- Dados da simulação de docagem:
  - Formação de 08 *clusters*.
  - Variação de FEB: -5.07 a -3.52 kcal/mol (*cluster* 01 ao 08).
  - *Cluster* com a melhor pose: 06 (com 02 poses).
  - FEB: do melhor *cluster*: -4.01 kcal/mol.

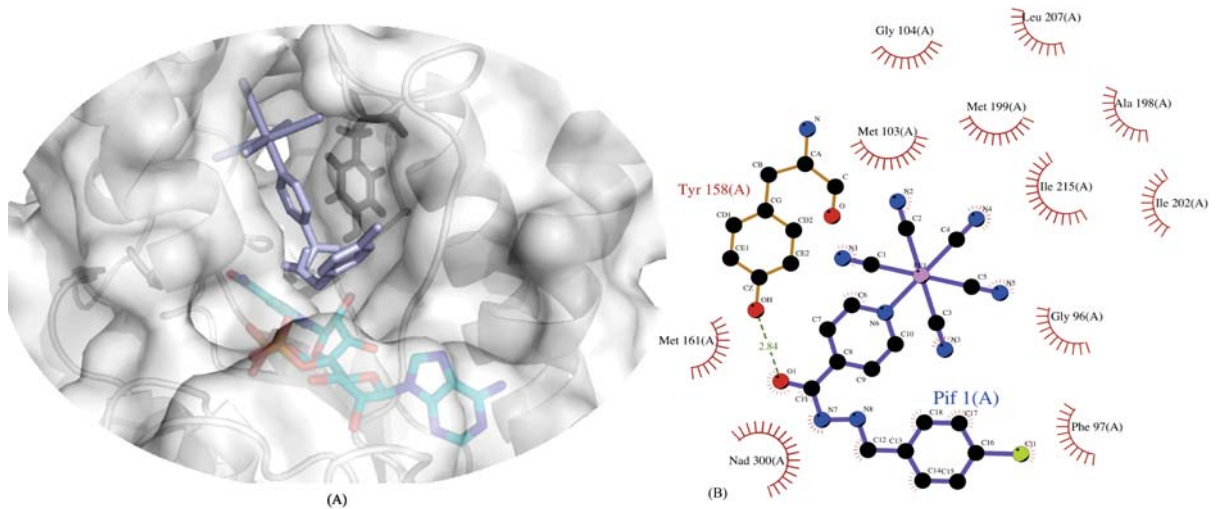


Figura 20: Melhor encaixe receptor-ligante durante a simulação de docagem molecular. Em (A) pode-se observar a melhor pose docada do composto IQG607\_025 no sítio ativo do receptor, baseado nos critérios citados no texto. Em (B) o diagrama 2D gerado pelo programa *LigPlot* após a análise das interações receptor-ligante. Figura da Autora.

- Dados da interação proteína-ligante:
  - HHB: Tyr158(2.84Å).
  - NNB: Gly96, Phe97, Met103, Gly104, Met161, Ala198, Met199, Ile202, Leu207, Ile215 e NAD.

### 6.1.2.11 Modelo IQG607\_025 com 03 ligações fixas

- Dados da simulação de docagem:
  - Formação de 07 *clusters*.
  - Variação de FEB: -3.93 a -3.31 kcal/mol (*cluster* 01 ao 07).
  - *Cluster* com a melhor pose: 04 (com 09 poses).
  - FEB: do melhor *cluster*: -3.50 kcal/mol.

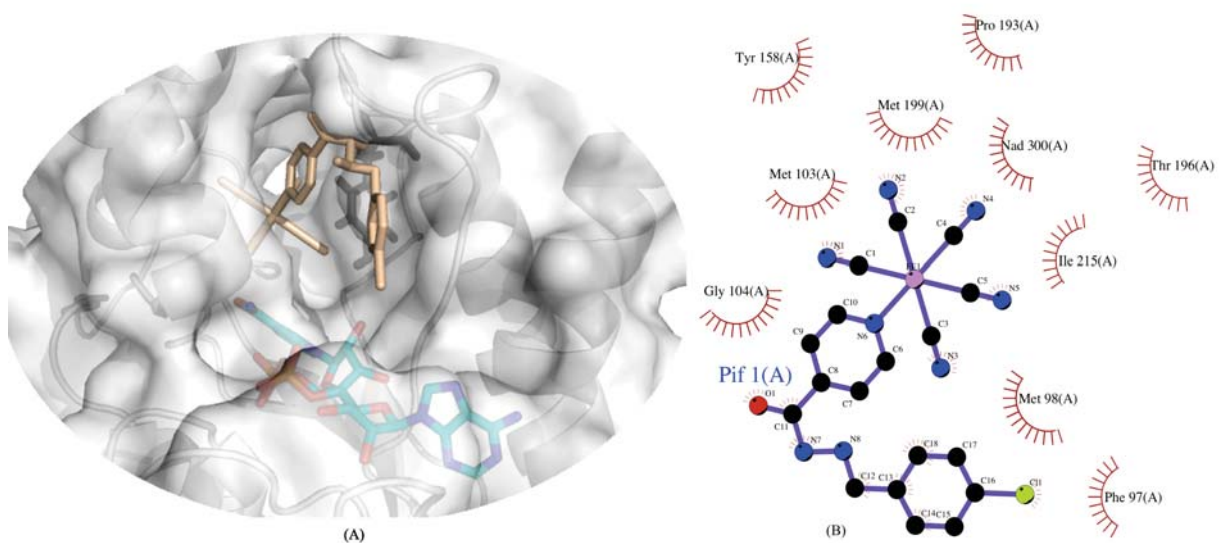


Figura 21: Melhor encaixe receptor-ligante durante a simulação de docagem molecular. Em (A) pode-se observar a melhor pose docada do composto IQG607\_025 no sítio ativo do receptor, baseado nos critérios citados no texto. Em (B) o diagrama 2D gerado pelo programa *LigPlot* após a análise das interações receptor-ligante. Figura da Autora.

- Dados da interação proteína-ligante:
  - HHB: Não houve formação de ligação.
  - NNB: Phe97, Met98, Met103, Gly104, Tyr158, Pro193, Thr196, Met199, Ile215 e NAD.

### 6.1.2.12 Modelo IQG607\_026

Neste modelo foi introduzido o anel A do TCL.

- Dados da simulação de docagem:
  - Formação de 10 *clusters*.
  - Variação de FEB: -4.59 a -0.38 kcal/mol (*cluster* 01 ao 10).
  - *Cluster* com a melhor pose: 02 (com 07 poses).
  - FEB: do melhor *cluster*: -3.74 kcal/mol.

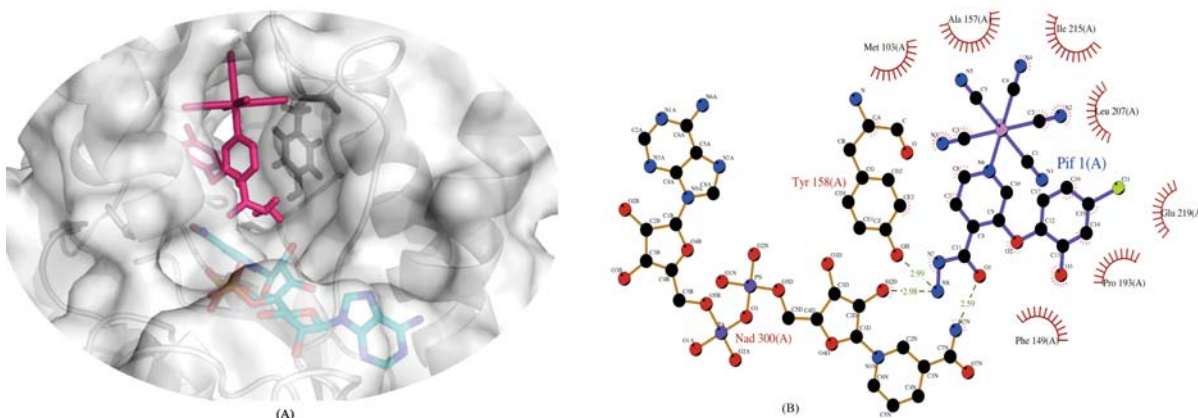


Figura 22: Melhor encaixe receptor-ligante durante a simulação de docagem molecular. Em (A) pode-se observar a melhor pose docada do composto IQG607\_026 no sítio ativo do receptor, baseado nos critérios citados no texto. Em (B) o diagrama 2D gerado pelo programa *LigPlot* após a análise das interações receptor-ligante. Figura da Autora.

- Dados da interação proteína-ligante:
  - HHB: NAD (2.59Å e 2.98Å), Tyr158 (2.99Å).
  - NNB: Met103, Phe149, Ala157, Tyr158, Pro193, Leu207, Ile215, Glu219 e NAD.

### 6.1.2.13 Modelo IQG607\_027

Neste modelo foi introduzido o anel B do TCL.

- Dados da simulação de docagem:
  - Formação de 12 *clusters*.
  - Variação de FEB: -5.29 a -1.55 kcal/mol (*cluster* 01 ao 12).
  - *Clusters* com as melhores poses: 01 (com 03 poses) e 03 (com 09 poses).
  - FEB dos melhores *clusters*: -5.29 e -4.96 kcal/mol.

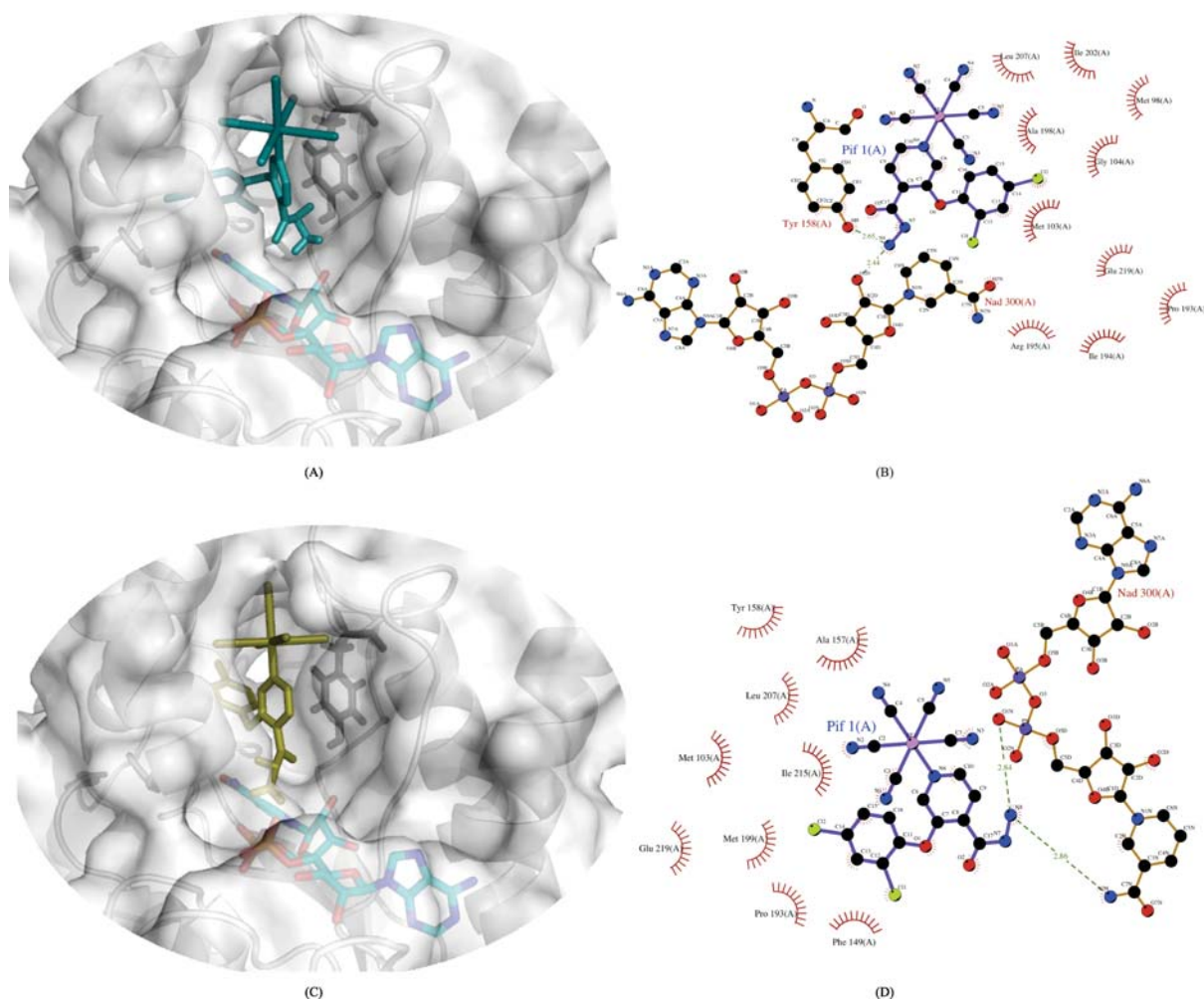


Figura 23: Melhor encaixe receptor-ligante durante a simulação de docagem molecular. Em (A) pode-se observar a melhor pose docada (no *cluster* 01) do composto IQG607\_027 no sítio ativo do receptor, baseado nos critérios citados no texto. Em (B) o diagrama 2D gerado pelo programa *LigPlot* após a análise das interações receptor-ligante. Em (C) pode-se visualizar a melhor pose docada (no *cluster* 03), e em (D), o diagrama 2D correspondente no sítio ativo do receptor. Figura da Autora.

- Dados da interação proteína-ligante (*cluster 01*):
  - HHB *cluster 01*: NAD (2.44Å) e Tyr158 (2.65Å).
  - NNB *cluster 01*: Met98, Met103, Glu104, Tyr158, Pro193, Ile194, Arg195, Ala198, Ile202, Leu207, Glu219 e NAD.
  
- Dados da interação proteína-ligante (*cluster 03*):
  - HHB *cluster 03*: NAD (2.86Å e 2.84Å)
  - NNB *cluster 03*: Met103, Phe149, Ala157, Tyr158, Pro193, Met199, Leu207, Ile215, Glu219, e NAD.

## 7 Considerações Finais

Esta Tese de Doutorado foi desenvolvida como parte do esforço que vem sendo aplicado no desenvolvimento racional de novos medicamentos para o tratamento da tuberculose.

Vários estudos tentaram elucidar o mecanismo de ação da INH que, desde o seu surgimento, ainda é considerado o principal fármaco utilizado para o tratamento da doença. É amplamente aceito que a INH é uma pró-droga e por isso precisa necessariamente passar por uma reação oxidativa para formar um aduto com NAD(H), e assim se tornar ativa, ou em outras palavras, a INH por si só não é capaz de inibir a enzima InhA do Mtb. A sua eficácia exige a formação do aduto.

O aduto INH-NAD(H) é formado quando a INH se liga ao quarto carbono (C4) do anel nicotinamida do NAD(H) através de uma ligação covalente, e este aduto se forma no interior do sítio catalítico da enzima InhA (Rozwarski *et al.*, 1998). Vários trabalhos corroboram para a ideia de que a formação deste aduto é precedida pela formação de intermediários reativos, e aparentemente, um radical acil é o intermediário-chave na oxidação de INH (Rozwarski *et al.*, 1998; Nguyen *et al.*, 2001; Amos *et al.*, 2008). Dados experimentais sugerem que a inibição da enzima InhA ocorre mais rapidamente quando na presença de NADH se comparado ao NAD<sup>+</sup>, o que demonstra a importância deste radical acilado (Johnsson *et al.*, 1994).

Braslau *et al.* (2002) demonstraram que a oxidação de hidrazidas mediadas por oxidantes metálicos de transição envolvem a formação de um radical acil intermediário. Tendo isso em mente, no estudo proposto por Sousa *et al.* (2012), o composto IQG607 foi criado numa tentativa de superar o mecanismo de ativação da INH, e ainda assim ser capaz de formar o radical acilado intermediário. A ideia era criar um composto capaz de auto-ativação que poderia promover uma reação de transferência de elétrons intramolecular sem a necessidade da ação oxidativa da enzima catalase/peroxidase KatG.

Foi verificado que a porção pentacianoferrato sozinha do composto IQG607 não tem a capacidade de inibir a enzima InhA, seja na presença ou na ausência de NAD(H), mostrando que a porção INH ainda é o farmacóforo principal (Sousa *et al.*, 2012) do composto IQG607. No entanto, o autor sugere que o grupamento pentacianoferrato provocou impacto no mecanismo de ativação da INH. O estudo mostra que o átomo de ferro (Fe) do IQG607 provoca a oxidação da INH permitindo que a reação intramolecular de transferência de elétrons aconteça de forma mais rápida (Sousa *et al.*, 2012).

Embora as simulações de docagem molecular do complexo Inha-ligantes tenham nos levado a crer que os três análogos do IQG607 desenhados para este trabalho



poderiam gerar bons compostos, após a síntese do complexo 1 foram realizados ensaios enzimáticos e se descobriu que não havia variação na atividade da enzima. Isso indica que o composto não apresentou o efeito inibidor sobre a enzima InhA, como era inicialmente esperado.

Em nossa tentativa de alongar o composto IQG607, permitindo assim um número maior de ângulos de torção para a molécula, e com isso, promover um melhor encaixe do ligante na cavidade de ligação do substrato, descobrimos que dois grupamentos importantes da INH foram separados, o que provocou a perda de atividade do fármaco. Fazendo um levantamento na literatura recente, este fenômeno observado, não foi relatado até o momento da redação desta Tese.

Nossa hipótese é que as modificações que foram introduzidas no composto IQG607 impediram a formação do radical acil e, portanto, o aduto não pôde ser formado. Como relatado por Wilming *et al.* (1999), a formação de produtos isonicotinamida ocorre a partir da quebra da Ligação C-N da isoniazida, mas as modificações que introduzimos nos derivados de IQG607 foram feitas entre o anel de piridina da INH e o grupo hidrazida. A nossa teoria é que a separação do grupo carbonil do anel piridínico proporciona o isolamento da carbonila, e esta pode ser a razão pela qual a transferência de elétrons não ocorre. As modificações introduzidas na molécula podem provavelmente ter quebrado a ressonância do anel piridínico, em relação ao grupo carbonil, impedindo a transferência de elétrons, como pode ser visto na Figura 24.

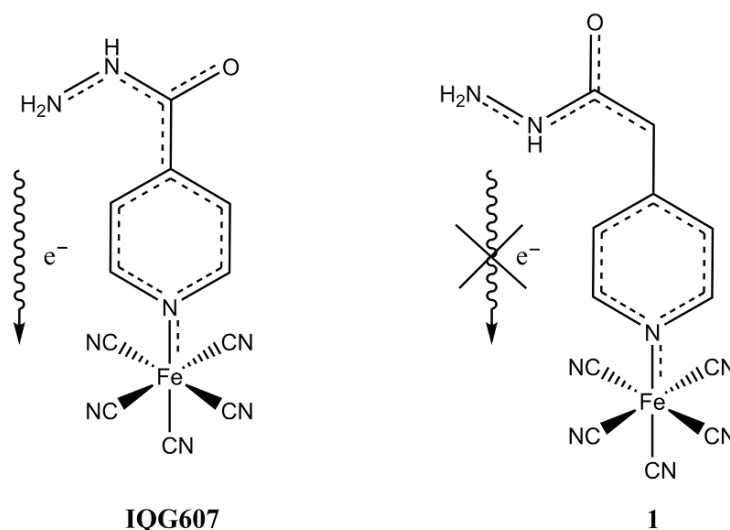


Figura 24: Provável mecanismo de interrupção da transferência de elétrons. O composto IQG607, em sua forma original, permite que a reação intramolecular de oxidação ocorra de forma natural. Porém, com a quebra da ressonância (complexo 1) impede a oxidação intramolecular, e assim a possível formação do radical acil correspondente. Figura cedida pelo Prof. Pablo Machado.



## 8 Conclusões

O presente trabalho relata os esforços realizados na tentativa de contribuir para a descoberta de novas moléculas candidatas a fármacos, baseadas no composto IQG607, inibidor da enzima InhA de *Mycobacterium tuberculosis*.

Durante este estudo projetamos moléculas análogas ao composto IQG607, um composto que acreditamos representar um novo e importante candidato a medicamento para o tratamento da tuberculose, agindo de forma a inibir a enzima InhA de Mtb. A Figura 25 ilustra de forma clara as principais etapas desenvolvidas durante a elaboração desta Tese de Doutorado.

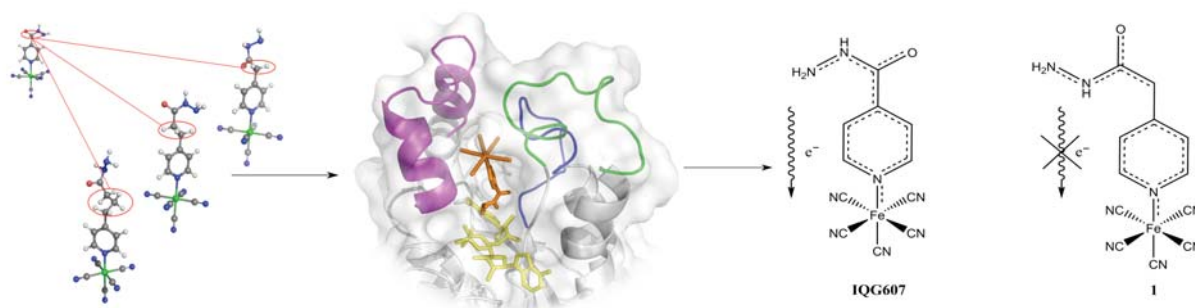


Figura 25: Representação das principais etapas do desenvolvimento do projeto de pesquisa. Modificações no composto IQG607 original foram introduzidas (esquerda). A interação dos compostos derivados foi simulada e avaliada (centro). Após o processo de síntese e testes de bancada, foi formulada a hipótese da inativação do composto derivado (direita). Figura da Autora.

Como nossos resultados revelaram as modificações que foram introduzidas no IQG607 original no exato ponto em que fizemos isso, causou a inativação do composto derivado. Para explicar este fenômeno, acreditamos que de alguma forma, a separação do anel de piridina e a ligação C-N parece impedir a reação de transferência de elétrons que é esperada para completar a oxidação da INH, assim inativando o complexo. Acreditamos que os nossos dados corroboram com a ideia de que existe a necessidade de um mecanismo de ativação para a INH, e que este é provocado pela oxidação da porção hidrazida do composto. Nossos dados reforçam também a ideia do mecanismo de ação proposto anteriormente para o composto IQG607. Analisando nossos resultados, podemos observar que uma vez que ocorre o isolamento da transferência de elétrons (ou tornando o mesmo difícil de acontecer) não se tem mais um composto ativo. Portanto, concluímos que novas modificações podem ser projetadas para o composto IQG607, desde que a ressonância da molécula não seja quebrada.

## 9 Trabalhos Futuros

Acreditamos que sem dúvida o composto IQG607 representa um interessante candidato ao desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento da tuberculose, uma doença que apresenta tanto apelo social e humanitário. Muito ainda pode ser investigado para contribuir na construção do conhecimento acerca deste composto.

Como sugestões para trabalhos futuros pode-se citar:

- O desenho de novos análogos do composto IQG607 e síntese dos mesmos.
- Testes *in vitro* e *in vivo* dos compostos sintetizados.
- A introdução de átomos de halogênios em pontos estratégicos do composto, provocando modificações conformacionais no sítio ativo da proteína de forma a impedir a função desempenhada pela InhA no processo de síntese de ácidos graxos.

## Apêndice A

### ***A.1 Simulações de docagem molecular dos compostos desenhados pelo Prof. Pablo Machado***

Em adição aos modelos desenhados durante o desenvolvimento desta Tese de Doutorado, foram realizadas simulações de docagem molecular com cinco compostos (Figura 26) desenhados pelo Prof. Pablo Machado, integrante do Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional – CPBMF e do INCT-TB - Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose.

Da mesma forma que os compostos anteriores, as cargas dos compostos foram adicionadas com o *software VegaZZ* e o posicionamento das moléculas foi realizado com o *software VMD*, obedecendo os mesmos critérios usados para o composto IQG607 e seus derivados.

Uma característica marcante nestes compostos é a união de dois anéis fenólicos por meio de uma ligação N-N. Esta ligação foi mantida fixa, ou seja, não foi permitido ângulo de giro entre estes dois átomos, mantendo esta parte da molécula rígida, e as demais ligações flexíveis (caso contrário a molécula fica muito rígida e acaba não saindo do lugar - isto foi testado para todos os compostos).

Foram construídos manualmente novos *conects*, que são arquivos de formato específico contendo as instruções de como cada átomo da molécula deve se ligar a outro e qual deve ser este átomo. Isto foi feito para cada um dos compostos testados, pois a numeração dos átomos muda depois da molécula preparada para docagem.

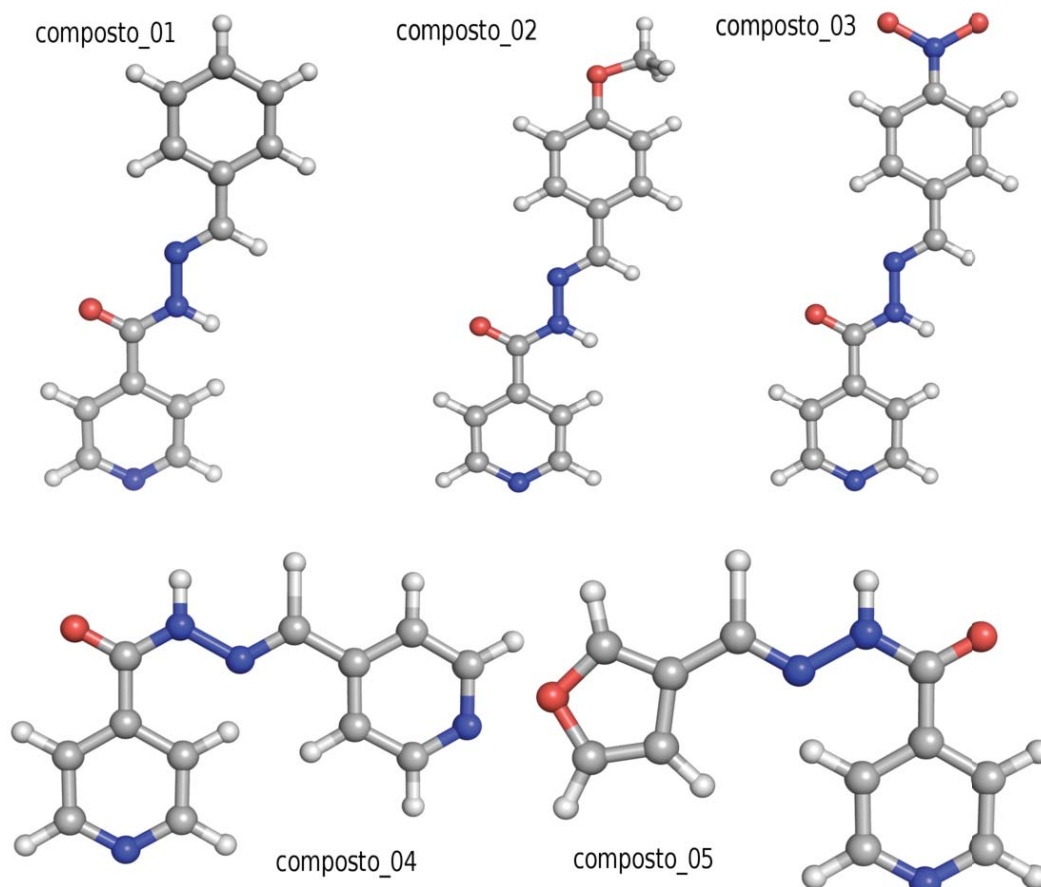


Figura 26: Representação do tipo “palitos e esferas” dos compostos derivados da INH empregados nas simulações de docagem molecular utilizando o receptor código PDB 1P44 da enzima InhA de *Mycobacterium tuberculosis*. A coloração dos átomos segue o modelo CPK onde em branco vemos os hidrogênios, em cinza os carbonos, em azul os nitrogênios e em vermelho os oxigênios. Figura da Autora.

Um resumo dos principais dados relacionados às simulações de docagem molecular destes compostos, bem como das análises da interação receptor-ligante que ocorreram durante estas simulações são apresentados na Tabela 5. Mais detalhes podem ser encontrados nas seções deste apêndice que tratam de cada composto.

Tabela 5: Sumário das simulações de docagem molecular e interações receptor-ligante realizados entre a InhA e os compostos desenhados pelo Prof. Pablo Machado.

Composto	Dados da simulação de docagem molecular		Dados da Interação receptor-ligante	
	Variação de FEB (kcal/mol)	FEB da melhor pose (kcal/mol)	Formação de ligações de H (HHB) – distância em Å	Contatos hidrofóbicos (NNB)
01	-6.17 a -5.35	-5.56	Não ocorreu	Phe149, Met155, Pro156, Tyr158, Leu218, NAD
02	-6.24 a	-6.24 (cluster)	Não ocorreu	Cluster 01: Cluster 03:

	-5.09	01)			Gly104,	Phe149
					Met155	Met155
		-5.09			Pro156	Pro156
		(cluster			Ala157	Tyr158
		03)			Tyr158	Pro193
					Pro193	Leu218
					Leu207	NAD.
					Ile215	
					Leu218	
					Glu219	
					Trp222	
03	-6.63	-6.63	<i>Cluster</i>	<i>Cluster</i>	<i>Cluster</i>	<i>Cluster</i>
	a	(cluster	01:	04:	01:	04:
	-5.39	01)	Ala157	NAD	Met103	Met155
			(3.26)	(3.04)	Gly104	Pro156
		-6.01	Gly104	Glu219	Phe149	Tyr158
		(cluster	(2.93)	(3.28)	Met155	Pro193
		03)			Pro156	Ile194
					Ala157	Met199
					Tyr158	Ile215
					Ile202	Leu218
					Leu207	Glu219
					Ile215	NAD
					Leu218	
					Trp222	
04	-5.62	-5.62	<i>Cluster</i>	<i>Cluster</i>	<i>Cluster</i>	<i>Cluster</i>
	a	(cluster	01:	04:	01:	04:
	-4.82	01)	Não	Não	Gly104	Phe149
			ocorreu	ocorreu	Pro156	Met155
		-5.32			Ala157	Pro156
		(cluster			Tyr158	Tyr158
		04)			Pro193	Pro193
					Ile215	Ile215
					Leu218	Leu218
					Glu219	NAD
					Trp222	
05	-5.87	-5.87	<i>Cluster</i>	<i>Cluster</i>	<i>Cluster</i>	<i>Cluster</i>
	a	(cluster	01:	02:	01:	02:
	-5.25	01)	Não	Não	Gly104	Phe149
			ocorreu	ocorreu	Met155	Met155
		-5.57			Pro156	Pro156
		(cluster			Ala157	Tyr158
		02)			Tyr158	Pro193
					Pro193	Leu218
					Ile215	NAD
					Leu218	
					Glu219	
					Trp222	

### A.1.1 Composto 01 (*cluster* 04)

- Dados da simulação de docagem:
  - Formação de 06 *clusters*.
  - Variação de FEB: -6.17 a -5.35 kcal/mol (*cluster* 01 ao 06).
  - *Cluster* com a melhor pose: 04 (com 02 poses).
  - FEB do melhor *cluster*: -5.56 kcal/mol.

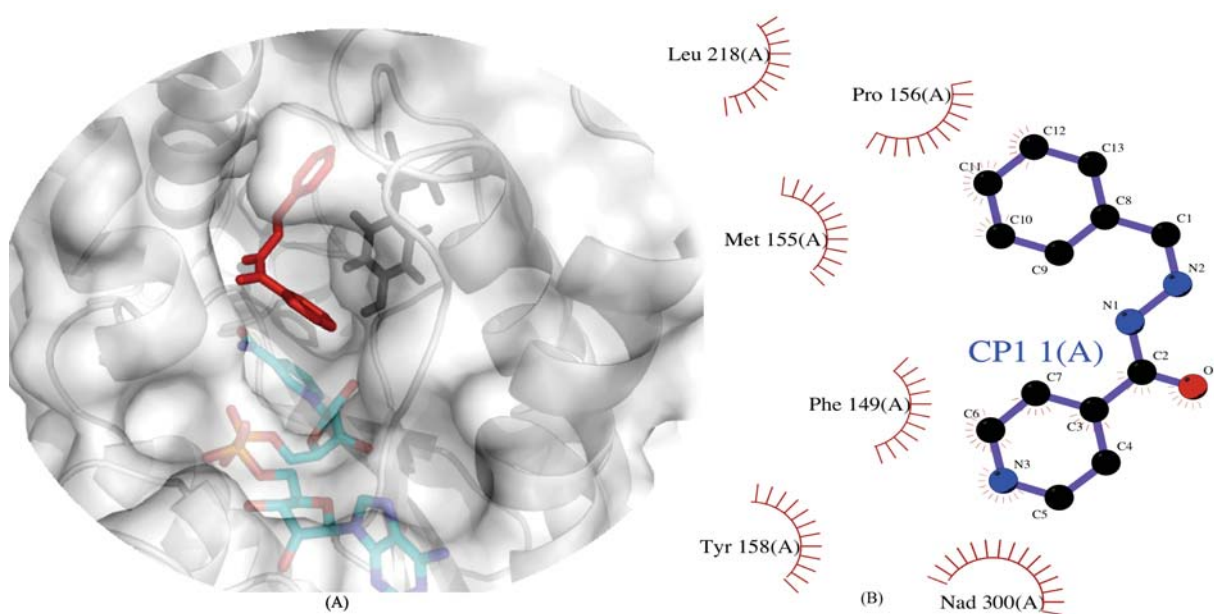


Figura 27: Melhor encaixe receptor-ligante durante a simulação de docagem molecular do composto 01. Em (A) pode-se observar a melhor pose docada do composto 01 no sítio ativo do receptor, baseado nos critérios citados no texto. Em (B) o diagrama 2D gerado pelo programa *LigPlot* após a análise das interações receptor-ligante. Figura da Autora.

- Dados da interação proteína-ligante (*cluster* 04):
  - HHB: Não houve formação de ligação de hidrogênio.
  - NNB: Phe149, Met155, Pro156, Tyr158, Leu218 e NAD.

### A.1.2 Composto 02 (*cluster 01* e *cluster 03*)

- Dados da simulação de docagem:
  - Formação de 03 *clusters*.
    - Variação de FEB: -6.24 a -5.09 kcal/mol (*cluster 01* ao 03).
    - *Clusters* com as melhores poses: 01 (com 13 poses) e 03 (com 01 pose).
    - FEB dos melhores *clusters*: -6.24 e -5.09 kcal/mol.

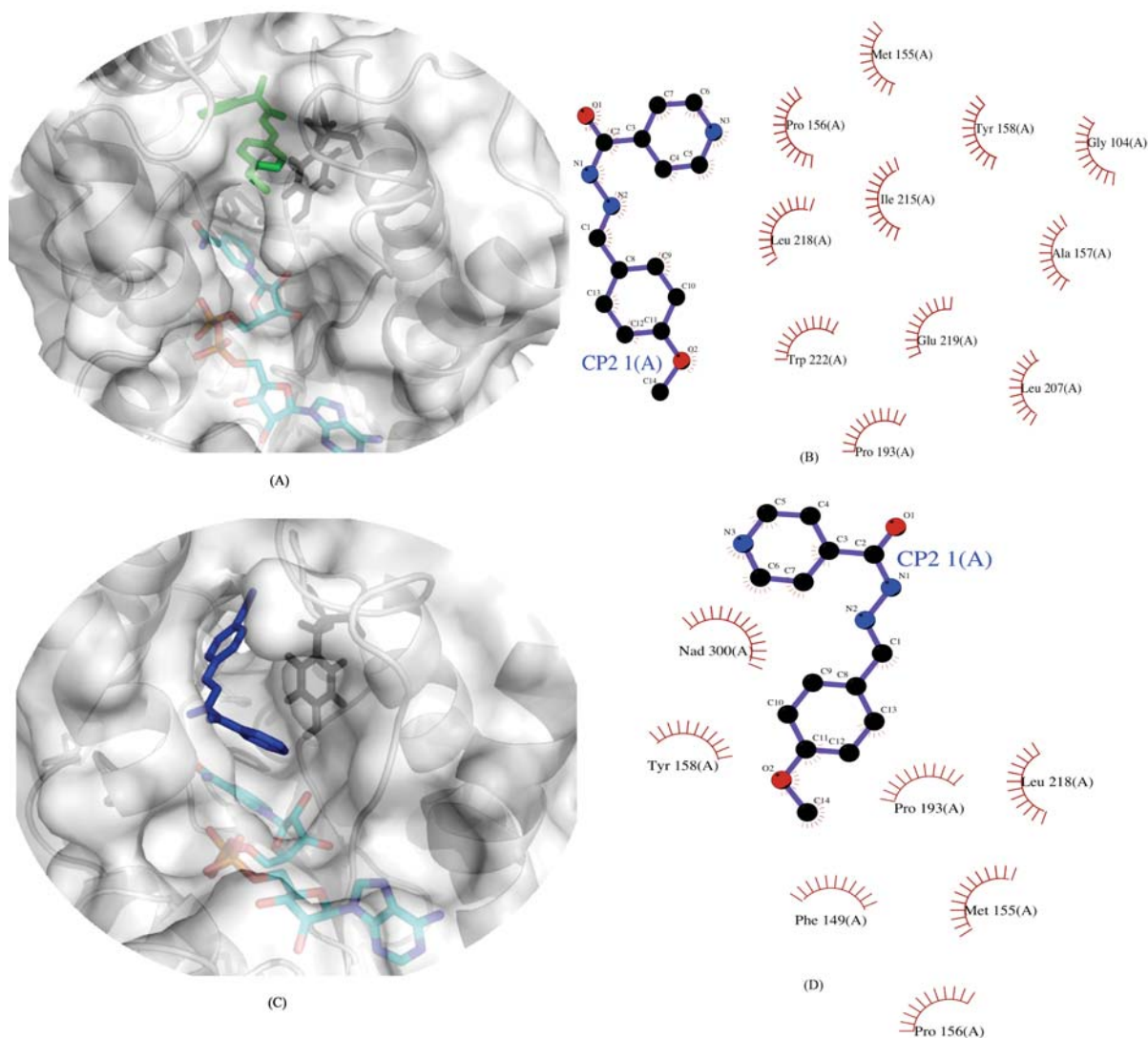


Figura 28: Melhor encaixe receptor-ligante durante a simulação de docagem molecular do composto 02. Em (A) pode-se observar a melhor pose docada do composto 02 (no *cluster 01*) no sítio ativo do receptor, baseado nos critérios citados no texto. Em (B) o diagrama 2D correspondente, gerado pelo programa *LigPlot* após a análise das interações receptor-ligante. Em (C) pode-se observar a melhor pose docada (no *cluster 03*), e em (D) no sítio ativo do receptor o diagrama 2D correspondente. Figura da Autora.



- Dados da interação proteína-ligante (*cluster* 01):
  - HHB *cluster*: Não houve formação de ligação de hidrogênio.
  - NNB *cluster*: Gly104, Met155, Pro156, Ala157, Tyr158, Pro193, Leu207, Ile215, Leu218, Glu219 e Trp222.
  
- Dados da interação proteína-ligante (*cluster* 03):
  - HHB *cluster*: Não houve formação de ligação de hidrogênio.
  - NNB *cluster*: Phe149, Met155, Pro156, Tyr158, Pro193, Leu218 e NAD.

### A.1.3 Composto 03 (*cluster* 01 e 04)

- Dados da simulação de docagem:
  - Variação de FEB: -6.63 a -5.39 kcal/mol (*cluster* 01 ao 07).
  - *Clusters* com as melhores poses: 01 (com 08 poses) e 04 (com 05 poses).
  - FEB dos melhores *clusters*: -6.63 e -6.01 kcal/mol.

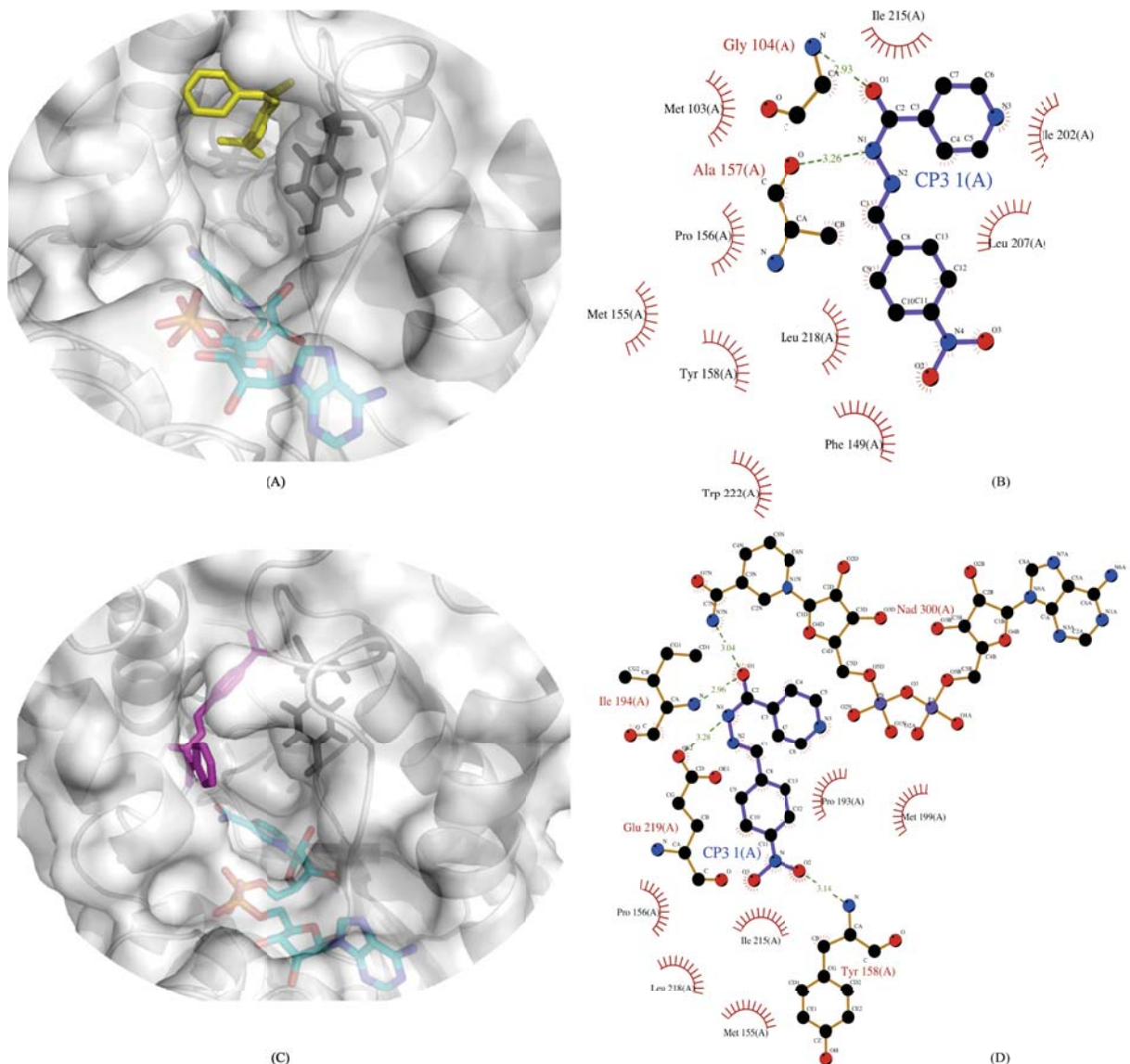


Figura 29: Melhor encaixe receptor-ligante durante a simulação de docagem molecular do composto 03. Em (A) pode-se observar a melhor pose docada do composto 03 (no *cluster* 01) no sítio ativo do receptor, baseado nos critérios citados no texto. Em (B) o diagrama 2D correspondente, gerado pelo programa *LigPlot* após a análise das interações receptor-ligante. Em (C) pode-se observar a melhor pose docada (no *cluster* 04), e em (D) no sítio ativo do receptor o diagrama 2D correspondente. Figura da Autora.

- Dados da interação proteína-ligante (*cluster01*):
  - HHB *cluster*: Ala157 (3.26Å) e Gly104 (2.93Å).
  - NNB *cluster*: Met103, Gly104, Phe149, Met155, Pro156, Ala157, Tyr158, Ile202, Leu207, Ile215, Leu218 e Trp222.
  
- Dados da interação proteína-ligante (*cluster 04*):
  - HHB *cluster*: NAD (3.04Å), Glu219 (3.28Å), Ile194 (2.96Å) e Tyr158 (3.14Å).
  - NNB *cluster*: Met155, Pro156, Tyr158, Pro193, Ile194, Met199, Ile215, Leu218, Glu219 e NAD.

### A.1.4 Composto 04 (*cluster* 01 e 04)

- Dados da simulação de docagem:
  - Formação de 05 *clusters*.
    - Variação de FEB: -5.62 a -4.82 kcal/mol (*cluster* 01 ao 05).
    - *Clusters* com as melhores poses: 01 (com 19 poses) e 04 (com 01 pose).
    - FEB dos melhores *clusters*: -5.62 e -5.32 kcal/mol.

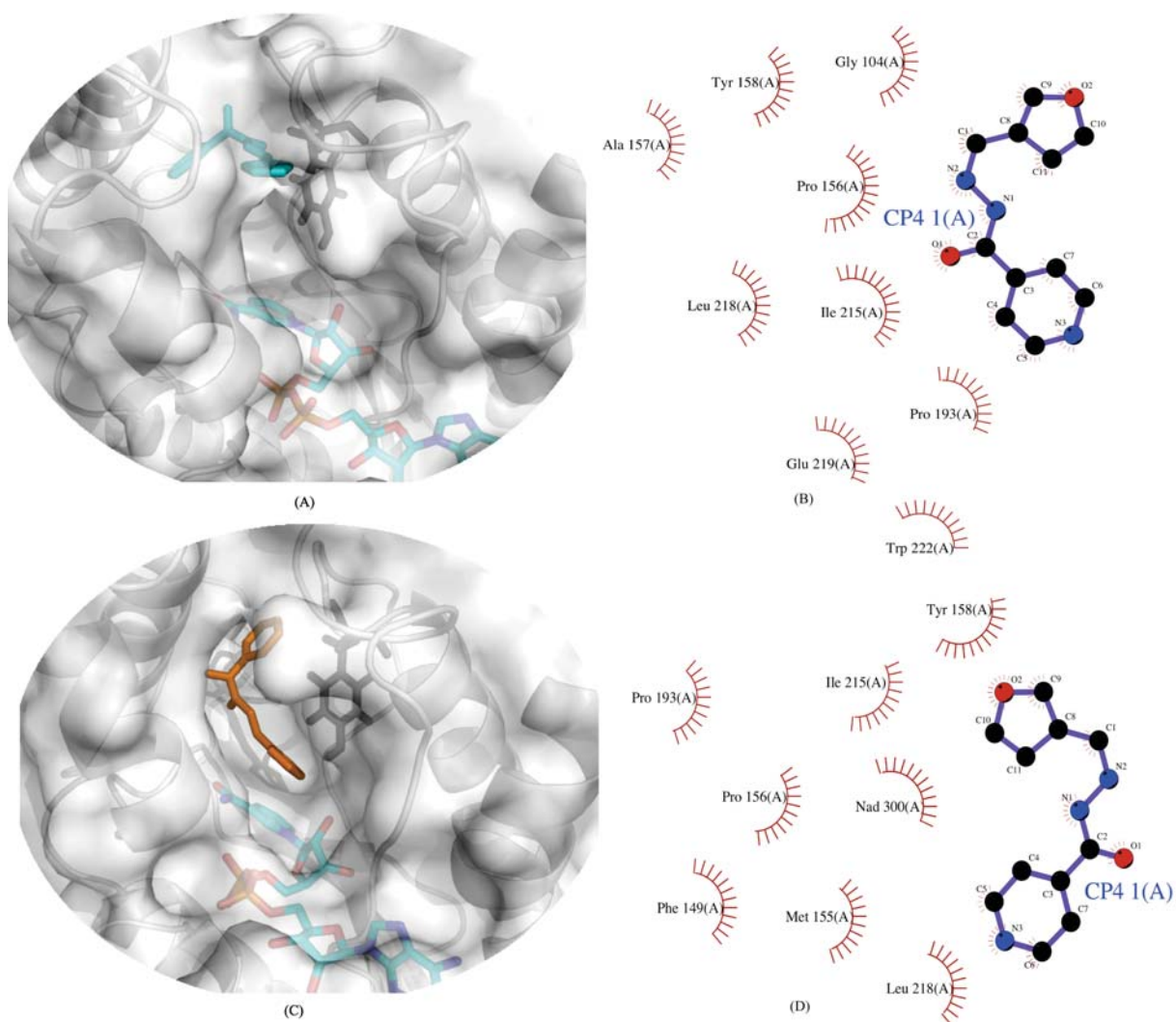


Figura 30: Melhor encaixe receptor-ligante durante a simulação de docagem molecular do composto 04. Em (A) pode-se observar a melhor pose docada do composto 04 (no *cluster* 01) no sítio ativo do receptor, baseado nos critérios citados no texto. Em (B) o diagrama 2D correspondente, gerado pelo programa *LigPlot* após a análise das interações receptor-ligante. Em (C) pode-se observar a melhor pose docada (no *cluster* 04), e em (D) no sítio ativo do receptor o diagrama 2D correspondente. Figura da Autora.

- Dados da interação proteína-ligante (*cluster* 01):
  - HHB *cluster*: Não houve formação de ligação de hidrogênio.
  - NNB *cluster*: Gly104, Pro156, Ala157, Tyr158, Pro193, Ile215, Leu218, Glu219 e Trp222.
  
- Dados da interação proteína-ligante (*cluster* 04):
  - HHB *cluster*: Não houve formação de ligação de hidrogênio.
  - NNB *cluster*: Phe149, Met155, Pro156, Tyr158, Pro193, Ile215, Leu218, e NAD.

### A.1.5 Composto 05 (*cluster* 01 e 02)

- Dados da simulação de docagem:
  - Variação de FEB: -5.87 a -5.25 kcal/mol (*cluster* 01 ao 04).
  - *Clusters* com as melhores poses: 01 (com 18 poses) e 02 (com 02 poses).
  - FEB dos melhores *clusters*: -5.87 e -5.57 kcal/mol.

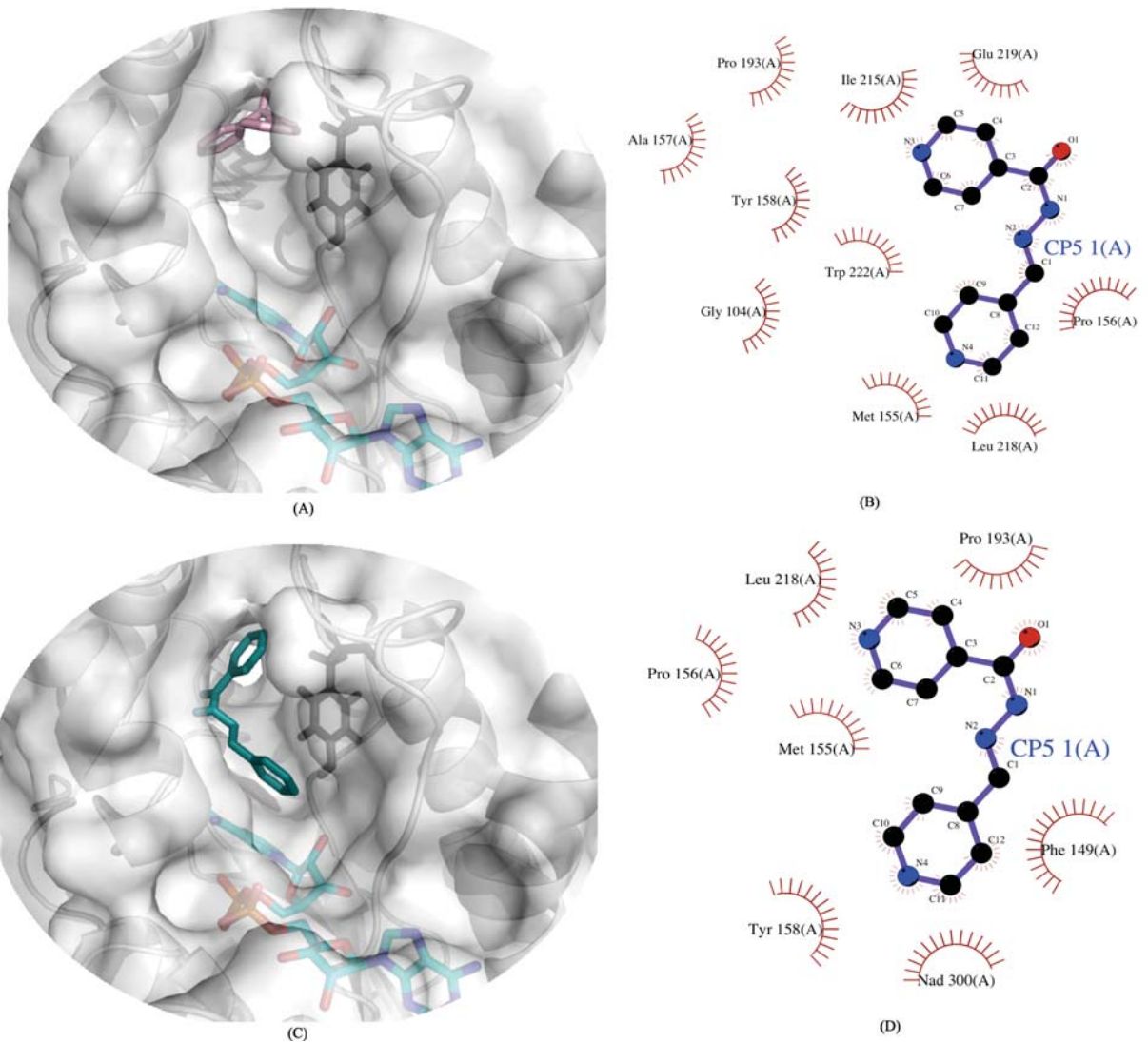


Figura 31: Melhor encaixe receptor-ligante durante a simulação de docagem molecular do composto 05. Em (A) pode-se observar a melhor pose docada do composto 05 (no *cluster* 01) no sítio ativo do receptor, baseado nos critérios citados no texto. Em (B) o diagrama 2D correspondente, gerado pelo programa *LigPlot* após a análise das interações receptor-ligante. Em (C) pode-se observar a melhor pose docada (no *cluster* 02), e em (D) no sítio ativo do receptor o diagrama 2D correspondente. Figura da Autora.

- Dados da interação proteína-ligante (*cluster* 01):
  - HHB *cluster*: Não houve formação de ligação de hidrogênio.
  - NNB *cluster*: Gly104, Met155, Pro156, Ala157, Tyr158, Pro193, Ile215, Leu218, Glu219 e Trp222.
  
- Dados da interação proteína-ligante (*cluster* 02):
  - HHB *cluster*: Não houve formação de ligação de hidrogênio.
  - NNB *cluster*: Phe149, Met155, Pro156, Tyr158, Pro193, Leu218 e NAD.



## Apêndice B

### *B.1 Software Utilizado para o Desenho e Manipulação das Estruturas*

A derivação de moléculas do composto IQG607 envolveu uma série de etapas bastante distintas, e estas foram relatadas ao longo do texto desta Tese. Porém, antes de iniciar as primeiras modificações do composto IQG607, foi necessário fazer uma pesquisa com o objetivo de encontrar os melhores programas disponíveis para desenho e manipulação de moléculas. Este período demandou tempo para pesquisa, leitura e aprendizagem de cada *software*, para poder assim avaliar o desempenho e a efetiva aplicação de cada um. Nesta busca foram avaliados programas tais como os listados a seguir:

- *ChemTool 1.6.12* (<http://ruby.chemie.uni-freiburg.de/~martin/chemtool/>): Este é um *software* relativamente simples, desenvolvido para sistemas Linux e Unix que permite o desenho 2D de moléculas orgânicas que podem ser salvas em vários formatos tais como *X bitmap*, *PostScript*, *SVG*, *XFig*, *MDL molfile*, *PNG*, entre outros.
- *EasyChem 0.6* (<http://easychem.sourceforge.net/>): Este programa é muito semelhante ao *ChemTool*, também desenvolvido para sistemas Linux e Unix, que permite exportar arquivos *EPS* usando fontes de texto do sistema  $\text{\LaTeX}$  (sistema de tipografia de alta qualidade, amplamente utilizado no meio científico).
- *ViewMol 2.4.1* (<http://viewmol.sourceforge.net/>): Com este *software* é possível construir e editar moléculas, visualizar a geometria destas moléculas em diferentes representações gráficas, desenhar funções básicas como orbitais moleculares e densidade elétrica, desenhar propriedades definidas em grid, mostrar forças agindo sobre um átomo em uma determinada configuração, entre outras funções. Este programa permite salvar novas moléculas em formatos *TIFF*, *PNG*, *HPGL*, e *PostScript*. Além disso, animações podem ser convertidas para vídeo (*MPEG*).
- *UCSF Chimera 1.5* (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>): Trata-se de um *software* mais robusto que permite ao usuário a visualização e a análise de estruturas moleculares a nível tridimensional, incluindo mapas de densidade, alinhamento de sequências, resultados de simulações de docagem molecular, trajetórias e ou conjuntos de conformações de uma determinada estrutura. Com este programa é possível também a geração de imagens e animações de alta qualidade.

- *OpenBabel 2.2.3* (<http://openbabel.org>): Este é um compilado de ferramentas projetadas para tratar dados de moléculas químicas em diversas linguagens de programação. Trata-se de um projeto aberto e colaborativo que permite ao usuário pesquisar, converter, analisar ou armazenar dados de modelagem molecular, química, materiais de estado sólido, bioquímica ou áreas afins.
- *ArgusLab* (<http://www.arguslab.com/>): Pacote de modelagem molecular de distribuição gratuita. É um programa que auxilia no processo de planejamento de fármacos, que permite a modelagem molecular, gráficos, tratamento de moléculas e desenho estrutural de compostos químicos.
- *VegaZZ* (<http://www.vegazz.net/>): Pacote de modelagem molecular de distribuição gratuita. Utilizando a biblioteca gráfica *OpenGL*, permite a geração de imagens de qualidade e em tempo real. Com este programa é possível construir e ou editar moléculas e tratar as mesmas de acordo com os critérios desejados. Permite cálculos moleculares, conformacionais, simulações de dinâmica molecular, análise de trajetórias moleculares, e entre outras qualidades, é preparado para trabalhar com arquivos tanto de entrada como de saída em diversos formatos.

Vale lembrar que estes são apenas alguns dos programas disponíveis para edição e manipulação de moléculas químicas. Cada *software* apresenta as suas peculiaridades e suas particularidades, e por esse motivo foi necessário o uso de mais de um para cada etapa de desenvolvimento deste estudo.

## Referências Bibliográficas

- Amaro, R. E., Baron, R., and McCammon, J. A. (2008). An Improved Relaxed Complex Scheme for Receptor Flexibility in Computer-Aided Drug Design. *Journal of Computer- Aided Molecular Design*, 22(9):693-705.
- Amos, R. I., Gourlay, B. S., Schiesser, C. H., Smith, J. A., and Yates, B. F. (2008). A Mechanistic Study on the Oxidation of Hydrazides: Application to the Tuberculosis Drug Isoniazid. *Chemical Communications*, (14):1695-1697.
- Andrade, C. H., Pasqualoto, K. F. M., Zaim, M. H., and Ferreira, E. I. (2008). Abordagem Racional no Planejamento de Novos Tuberculostáticos: Inibidores da InhA, e noil-Acp Redutase do *M. tuberculosis*. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 44(2):167-179.
- Anishetty, S., Pulimi, M., and Pennathur, G. (2005). Brief Communication: Potential Drug Targets in *Mycobacterium tuberculosis* Through Metabolic Pathway Analysis. *Computational Biology and Chemistry*, 29(5):368-378.
- Argyrou, A., Vetting, M., and Blanchard, J. (2007). New Insight into the Mechanism of Action and Resistance to Isoniazid: Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* enoyl-Acp Reductase with INH-NADP. *Journal of the American Chemistry Society*, 129(31):9582-9583.
- Asselineau, J. and Lederer, E. (1950). Structure of the Mycolic Acids of Mycobacteria. *Nature* 166:782-783.
- Banerjee, A., Dubnau, E., Quemard, A., Balasubramanian, V., Um, K., Wilson, T., Collins, D., De Lisle, G., and Jacobs, W. (1994). inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, 263(5144): 227-230.
- Basso, L. A., Schneider, C. Z., Dos Santos, A., dos Santos Jr, A. A., Campos, M. M., Souto, A. A., and Santos, D. S. (2010). An Inorganic Complex that Inhibits *Mycobacterium tuberculosis* Enoyl Reductase as a Prototype of a New Class of Chemotherapeutic Agents to Treat Tuberculosis. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21(7):1384-1389.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28: 235-242.  
<http://www.pdb.org>

- Bhatt, A., Molle, V., Besra, G., Jacobs Jr, W., and Kremer, L. (2007). The *Mycobacterium tuberculosis* FAS-II Condensing Enzymes: Their Role in Mycolic Acid Biosynthesis, Acid-fastness, Pathogenesis and in Future Drug Development. *Molecular Microbiology*, 64(6):1442-1454.
- Bleicher, K., Böhm, H., Müller, K., Alanine, A., et al. (2003). A Guide to Drug Discovery: Hit and Lead Generation: Beyond High-Throughput Screening. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2:369-378.
- Braslau, R., Anderson, M. O., Rivera, F., Jimenez, A., Haddad, T., and Axon, J. R. (2002). Acyl Hydrazines as Precursors to Acyl Radicals. *Tetrahedron*, 58(27):5513-5523.
- Cohen, E. M., Machado, K. S., Cohen, M., and de Souza, O. N. (2011). Effect of the Explicit Flexibility of the InhA Enzyme from *Mycobacterium tuberculosis* in Molecular Docking Simulations. *BMC Genomics*, 12(Suppl 4):S7.
- Cole, S., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C., et al. (1998). Deciphering the Biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the Complete Genome Sequence. *Nature*, 393(6685): 537-544.
- da Costa, A. L., Pauli, I., Dorn, M., Schroeder, E. K., Zhan, C.-G., and de Souza, O. N. (2012). Conformational Changes in 2-*trans*-enoyl-ACP (coa) Reductase (InhA) from *M. tuberculosis* Induced by an Inorganic Complex: A Molecular Dynamics Simulation Study. *Journal of Molecular Modeling*, 18(5):1779-1790.
- da Costa, A. L. P. (2008). Estudo da Interação da 2-*trans*-enoyl-ACP (coa) Redutase de *Mycobacterium tuberculosis* com o Complexo Inorgânico Isoniazida-pentacianoferrato por Simulação pela Dinâmica Molecular. Dissertação de mestrado, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
- Dessen, A., Quemard, A., Blanchard, J., Jacobs, W., and Sacchettini, J. (1995). Crystal Structure and Function of the Isoniazid Target of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, 267(5204):1638-1641.
- Dias, M., Vasconcelos, I., Prado, A., Fadel, V., Basso, L., de Azevedo, W., and Santos, D. (2007). Crystallographic Studies on the Binding of Isonicotinyl-nad Adduct to wild-type and Isoniazid Resistant 2-*trans*-enoyl-ACP(CoA) Reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Structural Biology*, 159(3):369-380.
- Dundas, J., Ouyang, Z., Tseng, J., Binkowski, A., Turpaz, Y., and Liang, J. (2006).

- CASTp: Computed Atlas of Surface Topography of Proteins with Structural and Topographical Mapping of Functionally Annotated Residues. *Nucleic Acids Research*, 34(suppl 2):W116.
- Dutta, S., Burkhardt, K., Young, J., Swaminathan, G. J., Matsuura, T., Henrick, K., Nakamura, H., and Berman, H. M. (2009). Data Deposition and Annotation at the Worldwide Protein Data Bank. *Molecular Biotechnology*, 42(1):1-13.
- Freundlich, J., Wang, F., Vilchèze, C., Gulten, G., Langley, R., Schiehser, G., Jacobus, D., Jacobs Jr, W., and Sacchettini, J. (2009). Triclosan Derivatives: Towards Potent Inhibitors of Drug-Sensitive and Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *ChemMedChem*, 4(2):241-248.
- Galperin, M. and Koonin, E. (1999). Searching for drug targets in microbial genomes. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(6):571-578.
- Goodsell, D., Morris, M., and Olson, J. (1996). Automated Docking of Flexible Ligands: Applications of Autodock. *Journal of Molecular Recognition*, 9:1-5.
- Hartkoorn, R. C., Sala, C., Neres, J., Pojer, F., Magnet, S., Mukherjee, R., Uplekar, S., Boy-Röttger, S., Altmann, K.-H., and Cole, S. T. (2012). Towards a New Tuberculosis Drug: Pyridomycin – Nature’s Isoniazid. *EMBO Molecular Medicine*, 4(10):1032-1042.
- He, X., Alian, A., and Ortiz de Montellano, P. (2007). Inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase InhA by Arylamides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(21):6649-6658.
- He, X., Alian, A., Stroud, R., and de Montellano, P. (2006). Pyrrolidine Carboxamides as a Novel Class of Inhibitors of Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(21):6308-6323.
- Holland, J. (1975). *Adaptation in Natural and Artificial System: an Introduction with Application to Biology, Control and Artificial Intelligence*. Ann Arbor, University of Michigan Press.
- Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996). VMD – Visual Molecular Dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14:33-38.
- Inderlied, C. and Salfinger, M. (1995). Antimicrobial Agents and Susceptibility Tests: Mycobacteria. *Manual of Clinical Microbiology*, 6th ed. ASM Press, Washington, DC, pages 1385-1404.
- Johnsson, K. and Schultz, P. (1994). Mechanistic Studies of the Oxidation of Isoniazid

- by the Catalase Peroxidase from *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of the American Chemical Society, 116(16):7425-7426.
- Kuo, M., Morbidoni, H., Alland, D., Sneddon, S., Gourlie, B., Staveski, M., Leonard, M., Gregory, J., Janjigian, A., Yee, C., et al. (2003). Targeting Tuberculosis and Malaria Through Inhibition of Enoyl Reductase Compound Activity and Structural Data. Journal of Biological Chemistry, 278(23):20851-20859.
- Lengauer, T. and Rarey, M. (1996). Computational Methods for Biomolecular Docking. Current Opinion in Structural Biology, 6(3):402-406.
- Luckner, S., Liu, N., am Ende, C., Tonge, P., and Kisker, C. (2010). A Slow, Tight Binding Inhibitor of InhA, the Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Biological Chemistry, 285(19):14330.
- Mdluli, K. and Spigelman, M. (2006). Novel Targets for Tuberculosis Drug Discovery. Current Opinion in Pharmacology, 6(5):459-467.
- Migliori, G., Loddenkemper, R., Blasi, F., and Raviglione, M. (2007). 125 Years After Robert Koch's Discovery of the Tubercle Bacillus: The New XDR-tb Threat. Is "Science" Enough to Tackle the Epidemic? European Respiratory Journal, 29(3):423-427.
- Molle, V., Gulten, G., Vilchèze, C., Veyron-Churlet, R., Zanella-Cléon, I., Sacchettini, J. C., Jacobs Jr, W. R., and Kremer, L. (2010). Phosphorylation of InhA Inhibits Mycolic Acid Biosynthesis and Growth of *Mycobacterium tuberculosis*. Molecular Microbiology, 78(6):1591-1605.
- Morris, G., Goodsell, D., Halliday, R., Huey, R., Hart, W., Belew, R., and Olson, A. (1998). Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function. Journal of Computational Chemistry, 19(14):1639-1662.
- Nayyar, A. and Jain, R. (2005). Recent Advances in New Structural Classes of Anti-tuberculosis Agents. Current Medicinal Chemistry, 12(16):1873-1886.
- Nguyen, M., Claparols, C., Bernadou, J., and Meunier, B. (2001). A Fast and Efficient Metal-mediated Oxidation of Isoniazid and Identification of Isoniazid-nad (h) Adducts. Chembiochem, 2(12):877-883.
- Oliveira, J., de Sousa, E., de Souza, O., Moreira, S., Santos, D., and Basso, L. (2006a). Slow-onset Inhibition of 2-trans-enoyl-ACP(CoA) Reductase from *Mycobacterium tuberculosis* by an Inorganic Complex. Current Pharmaceutical Design, 12(19):2409-



2424.

- Oliveira, J., Pereira, J., Canduri, F., Rodrigues, N., de Souza, O., de Azevedo Jr, W., Basso, L., and Santos, D. (2006b). Crystallographic and Pre-steady-state Kinetics Studies on Binding of NADH to wild-type and Isoniazid-resistant enoyl-ACP (CoA) Reductase Enzymes from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Molecular Biology*, 359(3):646-666.
- Oliveira, J., Sousa, E., Basso, L., Palaci, M., Dietze, R., Santos, D., and Moreira, Í. (2004). An Inorganic Iron Complex that Inhibits wild-type and an Isoniazid-resistant Mutant 2-*trans*-enoyl-ACP (CoA) Reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Chemical Communications*, 2004(3):312-313.
- Pandolfi, J., Malaspina, A., SANTOS, A., Suffys, P., Oellemann, M., Valentini, S., and LEITE, C. (2009). Tuberculose e o Estudo Molecular da sua Epidemiologia. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 28(3):251-257.
- Pedretti, A., Villa, L., and Vistoli, G. (2004). Vega - An Open Platform to Develop Chemobioinformatics Applications, Using plug-in Architecture and Script Programming. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 18(3):167-173.
- Quemard, A., Dessen, A., Sugantino, M., Jacobs Jr, W., Sacchettini, J., and Blanchard, J. (1996). Binding of Catalase-peroxidase Activated Isoniazid to wild-type and Mutant *Mycobacterium tuberculosis* enoyl-ACP Reductases. *Journal of the American Chemical Society*, 118(6):1561-1562.
- Quemard, A., Sacchettini, J., Dessen, A., Vilcheze, C., Bittman, R., Jacobs Jr, W., and Blanchard, J. (1995). Enzymic Characterization of the Target for Isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry*, 34(26):8235-8241.
- R Kokil, G. and V Rewatkar, P. (2010). Bioprecursor Prodrugs: Molecular Modification of the Active Principle. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 10(14):1316-1330.
- Raman, K., Yeturu, K., and Chandra, N. (2008). Target TB: A Target Identification Pipeline for *Mycobacterium tuberculosis* Through an Interactome, Reactome and Genome-scale Structural Analysis. *BMC Systems Biology*, 2(1):109.
- Rodrigues-Junior, V. S., dos Santos Junior, A., dos Santos, A. J., Schneider, C. Z., Calixto, J. B., Sousa, E. H. S., de França Lopes, L. G., Souto, A. A., Basso, L. A., Santos, D. S., et al. (2012). Activity of IQG-607, a New Orally Active Compound, in a Murine Model of *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *International Journal of Antimicrobial Agents*.



- Rossetti, M., Valim, A., Silva, M., and Rodrigues, V. (2002). Tuberculose Resistente: Revisão Molecular. *Revista de Saúde Pública*, 36(4):525-32.
- Rozwarski, D., Grant, G., Barton, D., Jacobs Jr, W., and Sacchettini, J. (1998). Modification of the NADH of the Isoniazid Target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, 279(5347):98.
- Santos, F. L. A. d., Lyra, M. A. M., Alves, L. D. S., Silva, K. E. R. d., Gomes, T. C. B. d. L., Rolim, L. A., Ferraz, L. R. M., Lima, Á. A. N. d., Soares-Sobrinho, J. L., and Rolim-Neto, P. J. (2012). Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação para o Controle das Doenças Negligenciadas. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 33(1): 37-47.
- Schroeder, E., Basso, L., Santos, D., and Norberto de Souza, O. (2005). Molecular Dynamics Simulation Studies of the wild-type, I21V, and I16T Mutants of Isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase (InhA) in Complex with NADH: Toward the Understanding of NADH-InhA Different Affinities. *Biophysical Journal*, 89(2): 876-884.
- Schroeder, E., de Souza, O., Santos, D., Blanchard, J., and Basso, L. (2002). Drugs that Inhibit Mycolic Acid Biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 3:197-225.
- Schroeder, E. K. (2004). Análise Computacional da Enzima 2-*trans*-Enoil-ACP(CoA) Redutase de *Mycobacterium tuberculosis*, Produto do Gene inhA, como Alvo para o Desenvolvimento de Drogas Anti-tuberculose. Tese de Doutorado, PPGBCM, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.
- Sotgiu, G., Ferrara, G., Matteelli, A., Richardson, M., Centis, R., Ruesch-Gerdes, S., Tounghousova, O., Zellweger, J.-P., Spanevello, A., Cirillo, D., et al. (2009). Epidemiology and Clinical Management of XDR-tb: A Systematic Review by Tbnet. *European Respiratory Journal*, 33(4):871-881.
- Sotriffer, C., Flader, W., Winger, R., Rode, B., Liedl, K., and Varga, J. (2000). Automated Docking of Ligands to Antibodies: Methods and Applications. *Methods*, 20(3):280-291.
- Sousa, E., Pontes, D., Diógenes, I., Lopes, L., Oliveira, J., Basso, L., Santos, D., and Moreira, Í. (2005). Electron Transfer Kinetics and Mechanistic Study of the Thionicotinamide Coordinated to the Pentacyanoferrate (III)/(II) Complexes: A Model System for the *in vitro* Activation of Thioamides Anti-tuberculosis Drugs. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99(2):368-375.

- Sousa, E. H. S., Basso, L. A., Santos, D. S., Diógenes, I. C. N., Longhinotti, E., de França Lopes, L. G., and de Sousa Moreira, Í. (2012). Isoniazid Metal Complex Reactivity and Insights for a Novel Anti-tuberculosis Drug Design. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 17(2):275-283.
- Stodola, F., Lesuk, A., and Anderson, R. (1938). The Chemistry of the Lipids of Tubercle Bacilli. *Journal of Biological Chemistry*, 126(2):505.
- Sullivan, T., Truglio, J., Boyne, M., Novichenok, P., Zhang, X., Stratton, C., Li, H., Kaur, T., Amin, A., Johnson, F., et al. (2006). High Affinity InhA Inhibitors with Activity Against Drug-resistant Strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *ACS Chemical Biology*, 1(1):43-53.
- Takayama, K., Wang, C., and Besra, G. (2005). Pathway to Synthesis and Processing of Mycolic Acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(1):81.
- Vilchèze, C. and Jacobs, Jr, W. R. (2007). The Mechanism of Isoniazid Killing: Clarity Through the Scope of Genetics. *Annual Review in Microbiology*, 61:35-50.
- Vilchèze, C., Wang, F., Arai, M., Hazbón, M., Colangeli, R., Kremer, L., Weisbrod, T., Alland, D., Sacchettini, J., and Jacobs, W. (2006). Transfer of a Point Mutation in *Mycobacterium tuberculosis* inhA Resolves the Target of Isoniazid. *Nature Medicine*, 12(9):1027-1029.
- Waksman, S. A. et al. (1953). Streptomycin: Background, Isolation, Properties, and Utilization. *Science*, 118(3062):259-266.
- Wallace, A. C., Laskowski, R. A., and Thornton, J. M. (1995). Ligplot: A Program to Generate Schematic Diagrams of Protein-ligand Interactions. *Protein Engineering*, 8(2):127-134.
- Wilming, M., Johnsson, K., et al. (1999). Spontaneous Formation of the Bioactive Form of the Tuberculosis Drug Isoniazid. *Angewandte Chemie International Edition*, 38(17):2588-2590.
- World Health Organization (2012). *Global Tuberculosis Report: Surveillance, Planning, Financing*. World Health Organization Geneva, Switzerland.
- Zhang, Y. (2005). The Magic Bullets and Tuberculosis Drug Targets. *Pharmacology and Toxicology*, 45(1):529.