



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

JOÃO AUGUSTO RIBEIRO

APLICAÇÃO DA TÉCNICA FBDD “*FRAGMENT BASED DRUG
DISCOVERY*” PARA A ENZIMA DHFR DA VIA DE
BIOSSÍNTESE DE FOLATOS EM *MYCOBACTERIUM
TUBERCULOSIS*

CAMPINAS

2018

JOÃO AUGUSTO RIBEIRO

**APLICAÇÃO DA TÉCNICA FBDD “*FRAGMENT BASED DRUG
DISCOVERY*” PARA A ENZIMA DHFR DA VIA DE BIOSÍNTESE DE
FOLATOS EM *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas
como parte dos requisitos exigidos para a
obtenção do título de Doutor em
CIÊNCIAS na Área de FÁRMACOS,
MEDICAMENTOS E INSUMOS PARA A
SAÚDE.*

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO
ALUNO JOÃO AUGUSTO RIBEIRO, E
ORIENTADA PELO PROF. DR. MARCIO VINÍCIUS
BERTACINE DIAS.

Orientador: PROF. DR. MARCIO VINÍCIUS BERTACINE DIAS

CAMPINAS

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2013/15906-5

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

R354a Ribeiro, João Augusto, 1985-
Aplicação da técnica FBDD *“fragment based drug discovery”* para a enzima DHFR da via de biossíntese de folatos em *Mycobacterium tuberculosis* / João Augusto Ribeiro. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Marcio Vinicius Bertacine Dias.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Descoberta de drogas. 2. Tuberculose. I. Dias, Marcio Vinicius Bertacine. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Application of the FBDD technique *“fragment based drug discovery”* to the DHFR enzyme of the folate biosynthesis pathway in *Mycobacterium tuberculosis*

Palavras-chave em inglês:

Drug discovery

Tuberculosis

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Marcio Vinicius Bertacine Dias [Orientador]

Ana Carolina de Mattos Zeri

Elizabeth Bilsland

João Renato Carvalho Muniz

Flávio da Silva Emery

Data de defesa: 15-08-2018

Programa de Pós-Graduação: Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

Campinas, 15 de Agosto de 2018.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcio Vinicius Bertacine Dias

Prof. Dra. Ana Carolina de Mattos Zeri

Prof. Dra. Elizabeth Bilsland

Prof. Dr. João Renato de Carvalho Muniz

Prof. Dr. Flávio da Silva Emery

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

AGRADECIMENTOS

Após esses quatro anos de Doutorado, termino o curso satisfeito com os resultados obtidos. Sendo assim, não poderia deixar de agradecer pessoas que influenciaram diretamente nesse processo de formação.

Começo agradecendo, como sempre, o apoio incondicional de meus pais João e Midori. Minha irmã Larissa e toda minha família. Em especial agradeço minha querida avó Fumi Osaki Inoue pelos ensinamentos.

Agradeço minha parceira Mariane, pela convivência, cumplicidade e o amor que nos mantém unidos frente aos desafios.

Agradeço meu orientador, o prof. Marcio Dias, pela paciência e pela confiança. Não posso deixar de agradecer pelas críticas e dicas que me fizeram evoluir nesse caminho.

Agradeço todos meus companheiros e ex-companheiros de laboratório, pela união e pelos momentos agradáveis. Começo agradecendo a Tábata, Priscila, Larissa e Carolina como integrantes de nosso primeiro grupo de pesquisa ainda no LNBio/CNPEM, onde essa história teve início. Já nas dependências do ICBII/USP, agradeço Gerardo, Sair, Fernanda, Catharina, Natalia, Jademilson e João Pimenta. São vários os momentos que dificilmente irei esquecer. Também gostaria de agradecer os alunos do grupo de pesquisa da profa. Andrea Balan, assim como os técnicos do laboratório, Tadeu e Renata, pela ajuda prestada.

Agradeço os diversos colaboradores que fizeram parte deste trabalho, pois sem o auxílio destes, o andamento do projeto não seria viável e são eles: Maurício Sforça e Silvana Rocco do LNBio/CNPEM, o prof. Flávio Emery da FCFRP/USP de Ribeirão Preto/SP, o prof. Roberto Parise e o prof. Gustavo Trossini com seus respectivos alunos, Alfredo e Vinícius da FCF/USP. Também sou muito grato à colaboração do prof. Tom Blundell e do prof. Chris Abell, da Universidade de Cambridge/Reino Unido, com os achados de Petros Tyrakis, Dr. Anthony Coyne e Alex Hammer que complementaram os resultados desse trabalho. Além destes, agradeço ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS/CNPEM) e ao Instituto de Física (IF/USP), onde foram desenvolvidas etapas importantes do projeto.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos (IB/UNICAMP), no qual este projeto é vinculado.

Por fim, agradeço a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por ser a agência de fomento responsável pelo projeto (processo n° 2013/15906-5), além de outros financiadores, sendo o CNPq e a "*Royal Society of Chemistry*".

RESUMO

A tuberculose ainda é classificada entre as três doenças infecciosas mais alarmantes, devido ao seu elevado índice de mortalidade, longo período de tratamento, prevalência de cepas resistentes aos medicamentos em uso e a associação com o HIV. Iniciativas integradas do setor privado e público são fundamentais para o desenvolvimento de novas terapias que amenizem os efeitos adversos relacionados com o tratamento atual da tuberculose. Para isso, uma estratégia é o desenvolvimento de inibidores contra enzimas do agente infeccioso que, mesmo conservadas em humanos, apresentam peculiaridades que possam ser exploradas na busca por especificidade. A via de síntese de folatos apresenta esses tipos de enzimas, e fármacos que inibem algumas delas são utilizados há décadas para o tratamento de infecções diversas, não havendo inibidores eficazes para esta via no tratamento da tuberculose. Neste trabalho, foi aplicada a técnica de desenho de fármacos baseado em fragmentos (FBDD) para a identificação de moléculas simples com possibilidade de serem modificadas quimicamente para a geração de inibidores contra a enzima diidrofolato redutase da via de folatos em *Mycobacterium tuberculosis* (MtDHFR). Assim, esses fragmentos foram submetidos a uma série de técnicas biofísicas e cristalográficas que foram capazes de caracterizar a interação destes com a enzima. Essa caracterização baseou-se na identificação de grupos químicos presente nos fragmentos relevantes para a interação, na quantificação de afinidades e no comportamento energético das interações, no modo de ligação com a identificação de regiões específicas do sítio ativo onde essas interações aconteciam e no planejamento racional baseado em estrutura das possibilidades de exploração química de novas regiões do sítio ativo. Com isso, foram atingidas as etapas características de FBDD, isto é, fase de triagem e identificação de *hits*, fase de caracterização das interações realizadas por essas moléculas e fase de otimização química, que visa à obtenção de compostos líderes, com potencial a se tornarem novos fármacos. Este trabalho também permitiu a realização da fase iterativa de otimização que, em ação conjunta com especialistas da área de Química Medicinal, possibilitou a identificação, por catálogo SAR, de novos compostos análogos aos fragmentos caracterizados inicialmente. Esses compostos tiveram um ganho considerável de afinidade com a enzima e foram considerados como pontos de partida para a obtenção de novos compostos líderes.

Palavras-chave: tuberculose, folatos, fragmentos, interações, fármacos

ABSTRACT

Tuberculosis is still ranked among the three most alarming infectious diseases due to its high mortality rate, long treatment period, the prevalence of drug-resistant strains and association with HIV. Integrated private and public sector initiatives are critical for the development of new therapies that attenuates adverse effects related to the current treatment of tuberculosis. For this, a strategy is the development of inhibitors against enzymes of the infectious agent that, even conserved in humans, have peculiarities that could be explored in the search for specificity. The folate biosynthesis pathway has such enzymes, and drugs that inhibit some of them have been used for decades in the treatment of various infections, although there are no effective inhibitors for this pathway in the treatment of tuberculosis. In this work, the technique of fragment-based drug design (FBDD) was applied for the identification of simple molecules with the possibility of being chemically modified to generate inhibitors against dihydrofolate reductase from the folate pathway in *Mycobacterium tuberculosis* (MtDHFR). Thus, these fragments were submitted to a series of biophysical and crystallographic techniques that allowed their interaction characterization with the target. This characterization was based on the identification of relevant chemical groups present in the fragments for the interaction; on the quantification of affinities; and on the energetic behavior of the interactions. This approach allowed the identification of specific regions of the active site where these interactions could occur and the rational planning of new compounds based on the structure exploring new regions for the gain of affinity. In this way, all initial steps of a typical FBDD campaign were achieved, including the screening and identification of hits, characterization of the interactions and chemical optimization of these initial hits, aiming to obtain leading compounds with the potential to generate new drugs. In addition, together with specialists from Medicinal Chemistry area, we have identified by SAR catalog new compounds analogous to the initially characterized fragments. These compounds had a considerable gain of affinity with the target and could be considered as starting points for obtaining novel lead compounds against *M. tuberculosis*.

Keywords: tuberculosis, folate, fragments, interactions, drug discovery

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo biológico do bacilo *M. tuberculosis* e principais sintomas da tuberculose.
- Figura 2.** O impacto relacionado à tuberculose no mundo.
- Figura 3.** Incidência e mortalidade de TB de 2000 a 2016.
- Figura 4.** Incidência e mortalidade de TB no Brasil.
- Figura 5.** Via de biosíntese de folatos.
- Figura 6.** Estrutura química do substrato DHF e de inibidores da enzima DHFR.
- Figura 7.** Reação catalisada pela enzima DHFR e mecanismo de catálise.
- Figura 8.** Sobreposições de diferentes estados conformacionais da enzima DHFR de *E. coli* e de *M. tuberculosis*.
- Figura 9.** Biologia estrutural de MtDHFR.
- Figura 10.** Comparação dos compostos identificados por HTS e por FBDD.
- Figura 11.** A estratégia do desenho de fármacos baseado em fragmentos (FBDD).
- Figura 12.** Etapas do desenho de fármacos baseado em fragmentos (FBDD).
- Figura 13.** Comparação de termogramas típicos para ensaios de calorimetria entre ligantes com alta e baixa afinidade com o alvo.
- Figura 14.** Triagem da enzima MtDHFR contra uma biblioteca de fragmentos.
- Figura 15.** Ensaio de calorimetria para dois fragmentos identificados como *hits*.
- Figura 16.** Modo de ligação do Fragmento1 com sítio ativo de MtDHFR.
- Figura 17.** Espectroscopia por STD-NMR confirma a interação do Fragmento1 e 2 com MtDHFR.
- Figura 18.** Purificação da enzima MtDHFR.
- Figura 19.** STD-NMR confirma a relevância do ácido benzoico nas estruturas químicas dos fragmentos para a interação com MtDHFR.
- Figura 20.** STD-NMR confirma a relevância do grupo carboxila e anéis aromáticos interligados nas estruturas químicas dos fragmentos para a interação com MtDHFR.
- Figura 21.** STD-NMR confirma a interação de compostos com características hidrofóbicas com MtDHFR.

Figura 22. Variedade química relevante para a interação com MtDHFR através de STD-NMR.

Figura 23. Termogramas da interação de fragmentos com MtDHFR.

Figura 24. Perfis termodinâmicos das interações de fragmentos com MtDHFR.

Figura 25. Cristais típicos de complexos MtDHFR:NADPH:Fragmentos.

Figura 26. Biologia Estrutural de MtDHFR em complexo com fragmentos.

Figura 27. Modos de ligação do Diidrofolato e de fragmentos com o sítio ativo de MtDHFR.

Figura 28. Modos de ligação de fragmentos contendo um grupo carboxila relevante para interação com MtDHFR.

Figura 29. Modos de ligação de fragmentos com características hidrofóbicas com MtDHFR.

Figura 30. STD-NMR confirma a interação de compostos análogos obtidos em busca virtual por catálogo SAR.

Figura 31. Modos de ligação de compostos análogos aos *hits* de fragmentos obtidos em busca virtual por catálogo SAR.

Figura 32. Termograma da interação do Composto1 com MtDHFR.

Figura 33. Caracterização biofísica das interações do Fragmento7 e Composto1 com MtDHFR.

Figura 34. Termogramas da interação de compostos análogos aos Fragmento4 e 10 com MtDHFR.

Figura 35. Comparação dos parâmetros termodinâmicos das interações do Fragmento4, Composto5 e Composto6 com MtDHFR.

Figura 36. Comparação dos parâmetros termodinâmicos das interações do Fragmento10, Composto7, Composto8 e Composto9 com MtDHFR.

Figura 37. Modo de ligação do Composto9 com a enzima MtDHFR.

Figura 38. Modo de ligação do Composto10 com a enzima MtDHFR.

Figura 39. Fluxograma de FBDD aplicado à enzima MtDHFR.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Purificação da enzima MtDHFR.

Tabela 2. Estruturas químicas dos fragmentos identificados como *hits* em triagem contra uma biblioteca de fragmentos e testados por STD-NMR.

Tabela 3. Parâmetros termodinâmicos das interações entre MtDHFR e fragmentos.

Tabela 4. Condição de cristalização, processamento de dados de difração e refinamento cristalográfico de complexos MtDHFR:NADPH:Fragmentos/DHF.

Tabela 5. Estrutura química dos compostos escolhidos após busca virtual e *docking* molecular.

Tabela 6. Processamento de dados de difração e refinamento cristalográfico de complexos de MtDHFR com compostos obtidos por catálogo SAR.

Tabela 7. Parâmetros termodinâmicos da interação do Composto1 com MtDHFR.

Tabela 8. Parâmetros termodinâmicos das interações entre MtDHFR e compostos análogos aos Fragmentos 4 e 10.

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

°C - Graus Celsius

μg - Micrograma (10^{-6} g)

μL- Microlitro (10^{-6} L)

μM - Micromolar (10^{-6} M)

Å - Angstrom

ADMET – Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade

ART – *Antiretroviral therapy*

CFR – *Case fatality ratio*

cm - Centímetro

D.O. – Densidade óptica

D₂O – Óxido de deutério

DHF – Diidrofolato

DHFR – Diidrofolato redutase

DMSO – Dimetil sulfóxido

DMSO-d₆ – Dimetil sulfóxido deuterado

DOTS - *Directly Observed Treatment Short course*

DSF - *Differential Scanning Fluorimetry*

FBDD – *Fragment-based drug discovery*

g - Aceleração de gravidade

g - grama

GTP – Guanosina trifosfato

h - hora

HIV – *Human immunodeficiency vírus*

HTS – *Highthroughput screening*

I/σ – I sobre sigma

INH – Isoniazida

IPTG - Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo

ITC - *Isothermal Titration Calorimetry*

ITC - *Isothermal Titration Calorimetry* (Calorimetria de titulação isotérmica)

K_a – Constante de Associação

kcal – Quilocaloria

kcal/mol – Quilocaloria por mol

kcal/sec – Quilocaloria por segundo

K_d - Constante de dissociação
kDa - QuiloDalton (10^3 Dalton)
L - Litro
LE – Eficiência de ligação
M - Molar (mol/L)
MDR-TB – *Multidrug resistance* – TB (tuberculose multi resistente)
mg - Miligrama (10^{-3} g)
min - Minuto
mL - Mililitro (10^{-3} L)
mM - Milimolar (10^{-3} M)
MtDHFR - Diidrofolato redutase de *Mycobacterium tuberculosis*
MTX – Metotrexato
NADP⁺ - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
ng - Nanograma (10^{-9} g)
Ni - Níquel
NMR – *Nuclear Magnetic Resonance*
NOE – *Nuclear Overhauser effect*
OMS - Organização Mundial de Saúde
pABA – ácido *para*-amino benzoico
PAINS – *Pan Assay Interference Compounds*
PAS - Ácido *para*-amino salicílico
pb - Pares de base
PDB - *Protein Data Bank*
PIR – Pirimetamina
PLAs – *Propargil-linked antifolates*
RIF – Rifampicina
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
rpm- Rotação por minuto
RR-TB – Tuberculose resistente à rifampicina
sec - Segundo
SAR – *Structure Activity Relationships*
SDGs - *Sustainable Development Goals*
SDS - Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE - *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

STD - *Saturation Transfer Difference*

TB – Tuberculose

TDO – Tratamento diretamente observado

THF – Tetraidrofolato

T_m – Temperatura de *melting*

TMP – Trimetoprima

U - Unidades

v/v - Volume por volume

w/v - Massa por volume

XDR-TB – Tuberculose extensivamente resistente

ΔG - Energia Livre de Gibbs

ΔH – Entalpia

μcal – Microcaloria

$\mu\text{cal}/\text{sec}$ – Microcaloria por segundo

(– $T\Delta S$) – Entropia

SUMÁRIO

1	Introdução	16
1.1	Breve Histórico Sobre a Tuberculose	16
1.2	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , Ciclo Etiológico e Patogênese	18
1.3	O "Problema da Tuberculose"	20
1.4	A Era das "Metas de Desenvolvimento Sustentável" (SDGs) e "Estratégia pelo Fim da Tuberculose" (<i>End TB Strategy</i>).....	23
1.5	A Tuberculose no Brasil	23
1.6	O Tratamento de TB e a Necessidade do Desenvolvimento de Novas Terapias	25
1.7	Desenho de Fármacos Baseado em Estrutura como Estratégia para Identificação de Novas Terapias contra TB	26
1.8	Via de Biossíntese de Folatos e sua Importância Clínica.....	28
1.9	A Enzima Dihidrofolato Redutase de <i>M. tuberculosis</i> (MtDHFR) como Alvo para o Desenvolvimento Racional de Fármacos.....	30
1.9.1	Panorama atual do Desenvolvimento Racional de Inibidores da Enzima DHFR de <i>M. tuberculosis</i>	36
1.10	A Estratégia de Desenho de Fármacos Baseado em Fragmentos (<i>Fragment based drug discovery</i> – FBDD)	37
1.11	Breve Discussão sobre as Técnicas Biofísicas Adotadas no Projeto para a Campanha FBDD	41
1.11.1	<i>Thermal Shift</i> ou <i>Thermofluor</i> ou DSF (<i>Differential Scanning Fluorimetry</i>).....	43
1.11.2	Espectroscopia por STD-NMR (<i>Saturation Transfer Difference</i>).....	43
1.11.3	Calorimetria de Titulação Isotérmica - ITC (<i>Isothermal Titration Calorimetry</i>)	45
1.11.4	Cristalografia de Raios X.....	46
2	Objetivo.....	48
3	Materiais e Métodos	49
3.1	Expressão e Purificação da Enzima DHFR de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (MtDHFR)	49
3.2	SDS-PAGE.....	50
3.3	Preparação de Amostras do Receptor (MtDHFR) e Ligantes (Fragmentos) para Ensaios de STD-NMR (<i>Saturation Transfer Difference</i>)	50
3.4	Obtenção dos Espectros STD-NMR para a Verificação de Interação Receptor - ligante	50
3.5	Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC).....	51
3.6	Busca Virtual de Compostos Análogos aos Fragmentos por Catálogo SAR.....	51
3.7	Cristalização da Enzima MtDHFR	52
3.8	Cristalização de Complexos MtDHFR:NADPH:Fragmentos através da Técnica de <i>Soaking</i> e Cocrystalização	52
3.9	Coleta e Processamento de Dados de Difração por Raios X.....	53

3.10	Resolução de Estruturas e Refinamento Cristalográfico	53
3.11	Análise do Refinamento das Estruturas	53
3.12	Análise das Estruturas Cristalográficas	54
4	Resultados e Discussão	55
4.1	Resultados Preliminares ao Projeto: Aplicação de FBDD à Enzima MtDHFR	55
4.2	Expressão e Purificação da Enzima Dihidrofolato Redutase de <i>M. tuberculosis</i> (MtDHFR)	60
4.3	Validação da Interação de <i>Hits</i> de Fragmentos com a Enzima MtDHFR por STD-NMR (<i>Saturation Transfer Difference</i>)	62
4.4	Quantificação das Afinidades e Caracterização Termodinâmica de Interações entre MtDHFR e Fragmentos	71
4.5	Modos de Interação de Complexos MtDHFR:NADPH:Fragmentos através de Cristalografia de Proteínas	76
4.6	Catálogo SAR e o Ganho de Afinidade com MtDHFR pela Interação de Compostos Análogos aos Fragmentos	86
5	Conclusão	105
6	Referências Bibliográficas.....	109
7	Apêndice	117
8	Anexos	118

1 Introdução

A tuberculose (TB) representa um grande problema de saúde pública mundial, visto que ainda mantém altos índices de mortalidade. É uma das doenças mais estudadas quanto às manifestações clínicas, patogênese, mecanismos de resistência e desenvolvimento de fármacos. Além disso, as peculiaridades da capacidade adaptativa de seu agente causador, o bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, ainda continuam por serem compreendidas.

A seguir são apresentados alguns aspectos históricos da tuberculose, suas características clínicas, os principais problemas causados pela doença no mundo e no Brasil e outros fatores que ainda fazem da tuberculose uma das doenças infecciosas mais impactantes da atualidade. Dentre esses fatores, o tratamento longo contra TB, principalmente nos casos de multirresistência, dificulta a adesão total ao regime e chama a atenção para a necessidade de novas terapias de curta duração. Uma possibilidade é a descoberta de novos inibidores de enzimas de vias essenciais do patógeno. Na busca de possíveis novos inibidores, este trabalho discute sobre o desenvolvimento racional de fármacos e é inserida neste contexto a técnica de desenho de fármacos baseado em fragmentos (FBDD), que vem ganhando destaque nas últimas décadas pela rapidez com que novos inibidores atingem a fase de testes clínicos. Além disso, são feitas considerações sobre o alvo a ser aplicado esta técnica, sendo justificada a relevância biológica da enzima diidrofolato redutase (DHFR) e definida a estratégia adotada na busca de novos inibidores para este alvo.

1.1 Breve Histórico Sobre a Tuberculose

O agente causador da tuberculose (TB) tem sua origem estimada em período anterior ao surgimento do homem, mas o estabelecimento humano primeiramente no continente africano foi essencial para a epidemiologia da doença. Devido às características infecciosas bastante complexas e eficientes, o bacilo encontrou no ser humano o seu hospedeiro ideal, sendo a sua patogênese favorecida pela relação do homem com a domesticação de animais e o surgimento das civilizações e aglomerados populacionais (DANIEL, 2006).

Estudos modernos demonstraram a ocorrência de tuberculose no antigo Egito (deformações de Pott) há cerca de 5000 anos, comprovadas através de análises moleculares que identificaram o seu bacilo causador em múmias (CRUBEZY et al, 1998). Escritos que datam aproximadamente 3000 anos e citam a doença foram encontrados em regiões da Ásia (Índia e China). Há também relatos de manifestações da doença na Grécia antiga (textos de Hipócrates), Império Romano, América pré-colombiana e Idade Média (DANIEL, 2000).

Apesar de naquele tempo já ser perceptível a íntima ligação da doença com aglomerados humanos, havia muitas dúvidas quanto à sua origem etiológica e chegou a ser associada a manifestações místicas e condutas morais, resultando em preconceito com relação aos doentes. Ao longo da história, a doença recebeu diversas denominações, como escrófula, mal do peito, peste branca, fimatose, etc. (DANIEL, 1997). Apesar dos escritos de Hipócrates já fazerem referências relevantes às manifestações clínicas da tuberculose e sua ação pulmonar e sistêmica, o período medieval caracterizou-se em certo retrocesso na área e nota-se uma incorporação de saberes árabes às principais bases do conhecimento da manifestação da doença na Europa e Ásia no final desse período (BERTOLLI FILHO, 2001).

No contexto da Idade Moderna, período caracterizado pela crescente urbanização europeia, cabe destacar a íntima relação entre tuberculose e lepra, relacionadas a agentes pertencentes ao mesmo gênero, ambos associados à grande explosão demográfica e precárias condições sanitárias de parcela da população pós Revolução Industrial (BERTOLLI FILHO, 2001). Conceitos mais modernos a respeito da patogênese, diagnóstico e tratamento da doença, inicialmente remetidos aos conhecimentos tradicionais diversos, começaram a se desenvolver no século XIX (BERTOLLI FILHO, 2001). Com a invenção do estetoscópio e dedicação de alguns pesquisadores à doença, com destaque a Théophile Hyacinthe Laennec, foi comprovado o acometimento pulmonar em pessoas infectadas (DANIEL, 2004). Ainda assim, eram obscuros os conhecimentos a respeito da etiologia da doença, vigorando nessa época a ideia de hereditariedade como mecanismo de transmissão. Somente em 1865 foi comprovada experimentalmente a origem infecciosa de TB por Jean-Antoine Villemin (DANIEL, 2006).

Em 1882, o cientista alemão Robert Koch, após isolar tubérculos ou granulomas (estruturas nos pulmões ocasionadas pela resposta imune hospedeira) contendo o bacilo *M. tuberculosis*, apresentou uma adaptação dos postulados propostos por Friedrich Gustav Jakob Henle (postulados de Henle – Koch), estabelecendo assim importantes conceitos da relação patógeno-hospedeiro da doença. Suas descobertas resultaram em imediata vigilância sanitária como medida de prevenção da disseminação do micróbio, até hoje conhecido como "bacilo de Koch". Koch também isolou dos tubérculos uma substância denominada tuberculina, que seria inovadora para o tratamento de TB, o que rapidamente caiu em descrédito. Porém, anos mais tarde foi verificada a produção de um derivado proteico da tuberculina, denominado PPD, que posteriormente resultou no teste tuberculínico que passou a ser amplamente usado no diagnóstico de tuberculose latente (DANIEL, 2006).

No século XX, apesar do declínio dos casos de TB no mundo devido às melhorias nas condições sanitárias e nutricionais na Europa (África e Ásia ainda indicavam muitos casos), houve um período marcante de elevação do número de casos da doença no pós Primeira Guerra Mundial. Assim, teve início uma campanha de saúde pública liderada por Albert Calmette e Camille Guérin que, através da atenuação de isolados de *Mycobacterium bovis*, desenvolveram a vacina BCG, ministrada principalmente em recém-nascidos e contribuiu para uma redução expressiva de TB no mundo (DANIEL, 2005). Historicamente, este período também foi denominado a "Era dos Sanatórios". Os Sanatórios eram os principais espaços físicos de tratamento e acompanhamento dos doentes que surgiram ainda no século XIX e existiram até meados do século XX, com a descoberta dos primeiros quimioterápicos contra a tuberculose (MURRAY, SCHRAUFNAGEL e HOPEWELL, 2015).

1.2 *Mycobacterium tuberculosis*, Ciclo Etiológico e Patogênese

A tuberculose é uma doença infectocontagiosa de evolução crônica e tem como agente etiológico o bacilo *M. tuberculosis*. A bactéria mostrou grande habilidade adaptativa ao organismo humano e perdeu a capacidade de multiplicação no meio exterior (meio ambiente), tornando-se um comensal dos aglomerados humanos (BERTOLLI FILHO, 2001).

O *M. tuberculosis* é disseminado principalmente pelo ar, através de gotículas salivares expelidas por pessoas infectadas. Seu ciclo biológico inicia-se com a inalação e consequente instalação do patógeno nos alvéolos pulmonares (**Figura 1**). Os macrófagos alveolares se encarregam da ação imunológica primária fagocitando os bacilos. No entanto, essa ação não promove a destruição bacteriana e é incapaz de controlar a sua proliferação (BERMUDEZ et al, 2006). Com a necrose dos macrófagos, os bacilos caem no meio extracelular e são novamente fagocitados por outros macrófagos, que também não conseguem eliminar o patógeno. Em resposta à inflamação local, são atraídas novas células de defesa para os alvéolos, os Linfócitos T (KAUFMAN, 2005). Neste momento da evolução da doença são formadas estruturas denominadas granulomas ou tubérculos, caracterizadas por uma região interna contendo macrófagos infectados inativos e outra região externa formada por Linfócitos T ativos que controlam a infecção. O bacilo entra em uma fase de latência e permanece vivo dentro dos macrófagos inativos no interior dos granulomas por um período relacionado a capacidade imunológica do indivíduo (CARDONA, 2007). Em situações de imunodepressão do indivíduo, a bactéria volta a se replicar no interior dos macrófagos, o que ocasiona a formação de uma solução caseosa que rompe os tubérculos e libera esse líquido formado por macrófagos mortos e bacilos vivos no tecido pulmonar. Esse evento inicia

novamente uma resposta inflamatória e a parede alveolar é danificada pela liberação de citocinas. Esse processo resulta em erosão brônquica e após o material liquefeito ser drenado pelo organismo, verifica-se a formação de cavidades pulmonares. Desse modo, o bacilo pode formar novos granulomas ou atingir a corrente sanguínea e vasos linfáticos se instalando em outras regiões do corpo, caracterizando a evolução sistêmica da doença (CARDONA, 2010).

A tuberculose apresenta um grande espectro sintomático de difícil caracterização que pode se expressar por sinais comuns, como tosse e febre, até lesões de caráter neurológico, influenciando no comportamento do indivíduo (RUSSELL, 2001). Os danos causados pela doença podem ser influenciados por fatores como virulência, imunidade ou fase de evolução e são apresentados na **Figura 1**.

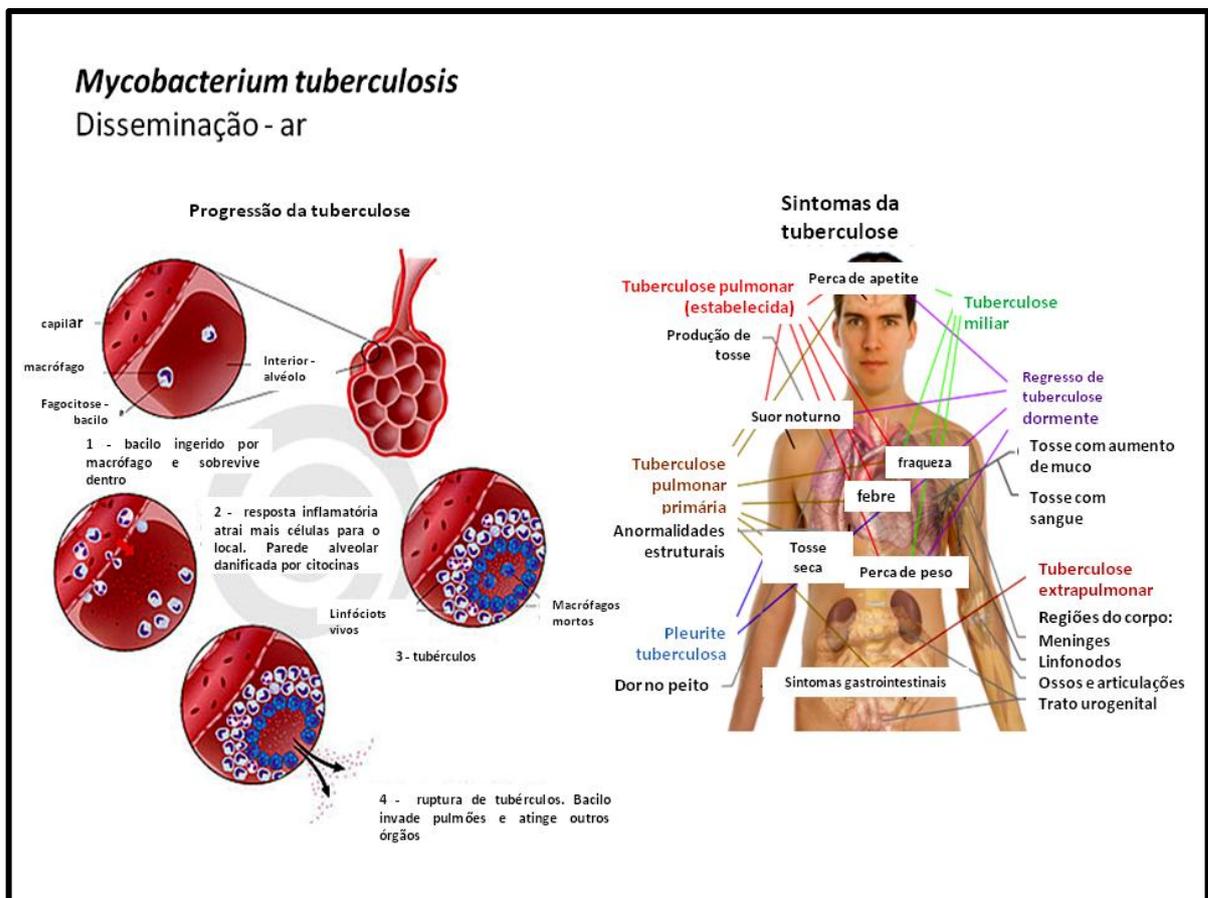


Figura 1. Ciclo biológico do bacilo *M. tuberculosis* e principais sintomas da tuberculose. Na esquerda é mostrada a progressão da tuberculose com a formação dos granulomas. Na direita são relacionados os diversos sintomas de TB com os órgãos afetados (Figura adaptada de HÄGGSTRÖM, 2014).

Mecanismos evolutivos fizeram deste patógeno um dos mais adaptados quanto à habilidade de evasão da resposta imune humana. Esses mecanismos estão relacionados com a capacidade de sobrevivência de sua forma latente no interior dos macrófagos, caracterizado por hipóxia, pH ácido e presença de diversas hidrolases (DIAZ et al, 2016; DEY e BISHAI, 2014; FU et al, 2015). Quando corpos estranhos são fagocitados pelos macrófagos, são encapsulados em vesículas denominadas fagossomos e mecanismos celulares promovem a fusão destes com os lisossomos que degradam os corpos estranhos. No entanto, em TB, o bacilo interfere na produção de glico/lipoproteínas envolvidas na sinalização do processo de fusão do fagossomo com o lisossomo (PIETERS, 2008). Nesta relação com o macrófago, *M. tuberculosis* também é capaz de superexpressar genes envolvidos no reparo de DNA, no aumento de fatores de virulência, no metabolismo de ácidos graxos e colesterol como fonte alternativa de carbono e na proteção de sua parede celular (VANDERVEN et al, 2016).

Apesar da existência de tratamento específico, a baixa eficiência de fármacos e a propensão de multi-resistência também estão relacionadas à natureza impermeável da parede celular bacteriana (PIETERS, 2008). A parede celular do *M. tuberculosis* possui características peculiares na composição (peptideoglicano, arabinogalactano e ácido micólico) e no processo de divisão celular. O bacilo possui a capacidade de se dividir diferencialmente e originar células filhas assimétricas, resultando na heterogeneidade da população de *M. tuberculosis*, o que contribui para a evasão da resposta imune hospedeira (KIESER e RUBIN, 2014).

1.3 O "Problema da Tuberculose"

Em 2016 foi estimado um número de 1,7 bilhões de pessoas infectadas com o bacilo *M. tuberculosis* no mundo. A probabilidade de desenvolver a doença se eleva entre os imunodeprimidos, com destaque aos portadores do vírus HIV e aqueles expostos a fatores de risco, como subnutrição, diabetes, tabagismo e abuso de álcool. O impacto relacionado à TB é calculado por meio de três fatores: incidência, prevalência e mortalidade. Considerando-se esses fatores, a Organização Mundial de Saúde (OMS) mapeou as regiões do mundo mais acometidas pelos casos de TB, de coinfeção com vírus HIV (TB/HIV) e/ou TB multi-resistente (MDR-TB). Os países mais afetados terão atenção especial do programa "End TB Strategy" (Estratégia para o fim da tuberculose), que será desenvolvido pela OMS até o ano de 2035 (**Figura 2A**) (WHO, 2017).

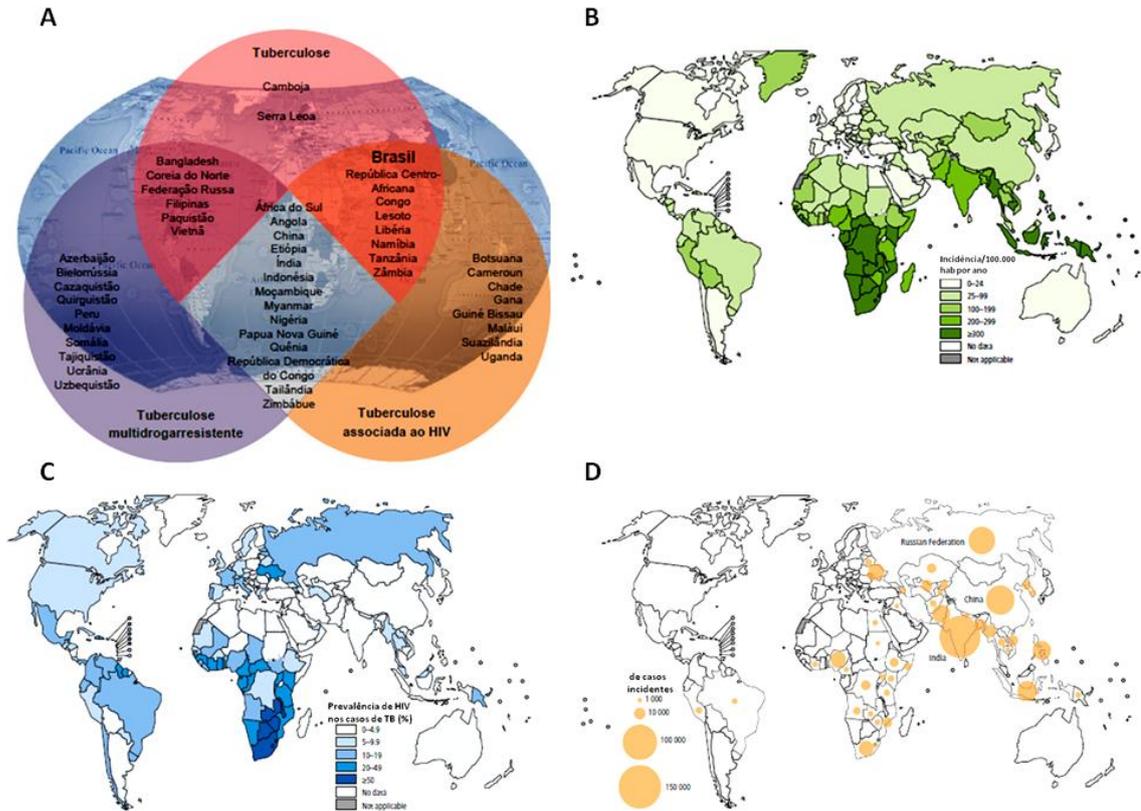


Figura 2. O impacto relacionado à tuberculose no mundo. A) Países mais afetados por TB, MDR-TB e TB/HIV. B) Taxa de incidência por 100.000 habitantes no ano de 2016. C) Prevalência de HIV nos casos de TB. D) Números de casos incidentes maiores ou igual 1000 dos países mais afetados por MDR-TB. (WHO, 2017).

A incidência de TB foi de aproximadamente 10,4 milhões de casos em 2016. Geralmente, a tuberculose afeta regiões mais populosas e/ou subdesenvolvidas do globo e está relacionada com problemas socioeconômicos, como pobreza e falta de saneamento básico. A maioria dos casos ocorreu no sudeste asiático (45 %), na África subsaariana (25 %) e na região oeste do Pacífico (17 %) (**Figura 2B**). A lista em ordem decrescente dos cinco países que juntos representam 56 % dos casos de TB são: Índia, Indonésia, China, Filipinas e Paquistão (WHO, 2017).

Cerca de 10% dos casos de TB (aproximadamente 1 milhão) ocorreu entre os portadores de HIV e o maior índice foi observado em países africanos, respondendo por mais de 50% dos casos (**Figura 2C**) e com elevado número de mortes. Entre indivíduos HIV positivos, a probabilidade de se desenvolver TB ativa foi 21 vezes maior comparado ao resto da população. A tuberculose responde por 25% dos óbitos relacionados ao HIV (**Figura 3**) (WHO, 2017).

Outro agravante em TB é a alta propensão do estabelecimento de cepas multi-resistentes de *M. tuberculosis* (MDR-TB) e apenas em 2016 foram registrados 490 mil novos casos. Em geral, MDR-TB resultam em casos de TB resistentes à rifampicina (RIF) e isoniazida (INH), que são os fármacos mais eficazes no tratamento de tuberculose (BLUMBERG et al, 2003). Em 2016, houve ainda um adicional de 110 mil casos sensíveis a INH, mas resistentes a RIF (RR-TB). A mortalidade relacionada à MDR/RR-TB chegou a aproximadamente 240 mil no ano de 2016 e os países mais afetados foram China, Índia e Rússia (**Figura 2D**) (WHO, 2017). Ainda neste contexto de TB multi-resistente, existem cepas consideradas extensivamente resistentes (XDR-TB). A tuberculose relacionada a estas cepas é definida como uma MDR-TB acrescida de resistência a pelo menos um fármaco dentre as fluoroquinolonas e aminoglicosídeos injetáveis (amicacina, capreomicina ou canamicina).

Atualmente, a tuberculose se enquadra entre as dez principais causas de morte da população humana e, desde 2012, tem-se mostrado líder em mortalidade dentre as doenças provocadas pela ação de um único agente infeccioso, superando as mortes causadas por AIDS/HIV. Foi estimado em 2016 um número de 1,3 milhões de mortes relacionadas aos casos de TB e um adicional de 374 mil mortes relacionadas à coinfeção TB/HIV (**Figura 3**) (WHO, 2017).

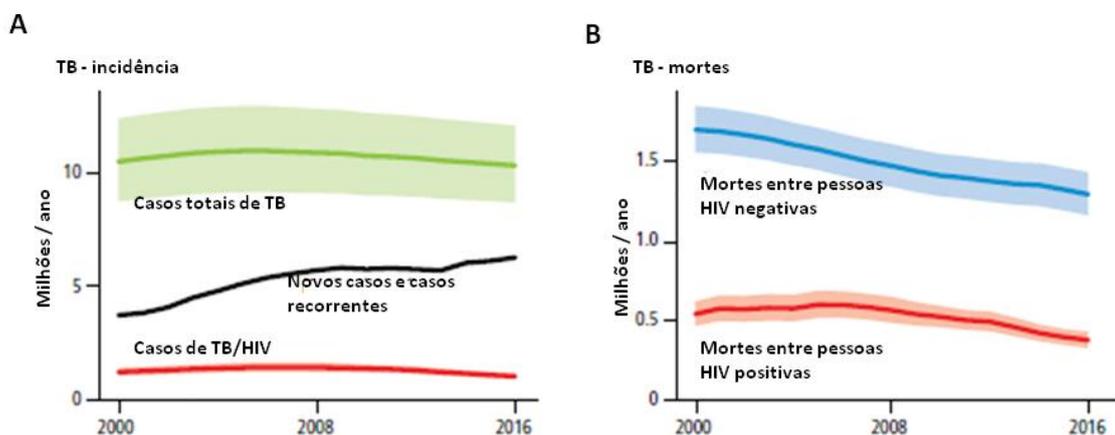


Figura 3. Incidência e mortalidade de TB de 2000 a 2016. A) Incidência de casos totais de TB, casos de TB/HIV e novo-recorrentes casos de TB em milhões de pessoas por ano. B) Mortes entre indivíduos HIV negativos e positivos. (WHO, 2017).

Entre 2000 e 2016, o tratamento da tuberculose, aplicado e administrado de forma correta, foi capaz de impedir cerca de 44 milhões de mortes entre os afetados com TB e cerca

de 9 milhões entre os afetados com TB/HIV, nestes últimos combinados com a terapia antirretroviral (ART). O problema se configura no crescente número de novos casos e casos recorrentes, devido à falta ou abandono do tratamento (**Figura 3**) (WHO, 2017).

1.4 A Era das "Metas de Desenvolvimento Sustentável" (SDGs) e "Estratégia pelo Fim da Tuberculose" (*End TB Strategy*)

As SDGs são medidas adotadas pelas Nações Unidas em 2015 que visam promover a melhoria de diversos fatores socioeconômicos que impactem na qualidade de vida e do meio ambiente até o ano de 2035. Uma dessas medidas é o oferecimento de boas condições de saúde e bem estar para a população mundial, em que a epidemia de tuberculose ganha destaque e é tratada como urgência para ações de saúde pública (WHO, 2017).

A meta denominada "Estratégia pelo Fim da Tuberculose", aprovada pela Assembleia Mundial da Saúde em 2014, visa uma redução de 90% em mortes por tuberculose e uma redução de 80% na taxa de incidência da tuberculose até 2035, em comparação com dados de 2015 (WHO, 2016). Incentivos à pesquisa tem como objetivo a descoberta de novas terapias e melhoria da eficiência de métodos de diagnóstico, principalmente em países subdesenvolvidos. Para se atingir a meta proposta pelo programa, a OMS classificou os três pilares de atuação: diminuição de mortes, diminuição da taxa de incidência e diminuição do custo demandado para amenizar o impacto da epidemia de TB no mundo (WHO, 2017).

A taxa de fatalidade (CFR) tem uma atenção especial da entidade e consiste na proporção, expressa em porcentagem, de pessoas infectadas pelo *M. tuberculosis* que morrem em decorrência da doença ao longo de um ano. A CFR se relaciona diretamente com o acesso ao diagnóstico e a eficiência do tratamento, que ainda se dá de forma bastante heterogênea entre as diversas regiões do mundo. Neste contexto, o Brasil é citado como exemplo de como os valores da taxa de fatalidade de TB podem ser muito diferentes entre os estados, revelando falhas em programas especializados de combate à doença (WHO, 2016). A OMS cobra uma maior coordenação e integração de campanhas de saúde visando aumentar a eficiência no diagnóstico e promover o tratamento mais adequado para cada caso de TB (WHO, 2016).

1.5 A Tuberculose no Brasil

O Brasil está entre os 20 países que apresentam maior incidência de TB, encontrando-se na vigésima posição em relação à TB sensível e na décima nona posição ao considerar somente os casos de TB/HIV (WHO, 2017). Estão mais vulneráveis à tuberculose os povos indígenas, a população carcerária, moradores de rua e habitantes de grandes

aglomerados urbanos. Isso se dá devido à precariedade das condições sanitárias nessas áreas e à dificuldade de acesso aos serviços de saúde. Pessoas infectadas com o vírus HIV também estão entre os mais vulneráveis à doença. Em 2015, 9,7% dos indivíduos diagnosticados com TB apresentavam coinfeção por HIV (Ministério da Saúde, 2016).

Outro fator preocupante está relacionado aos casos de multirresistência, apesar de haver um maior controle no número de novos casos, principalmente a partir de 2010, os casos de resistência a um dos fármacos utilizados no tratamento aumentaram em relação ao mesmo período e merece atenção especial no combate à doença (Ministério da Saúde, 2016).

Em 2016, foram registrados 66,7 mil novos casos e 12,8 mil casos de recorrência de TB no Brasil. Os estados do Rio de Janeiro (5/100 mil habitantes), de Pernambuco (4,5/100 mil habitantes), do Amazonas (3,2/100 mil habitantes) e do Pará (2,6/100 mil habitantes) apresentaram os maiores riscos de morte por TB (**Figura 4**) (Ministério da Saúde, 2016).

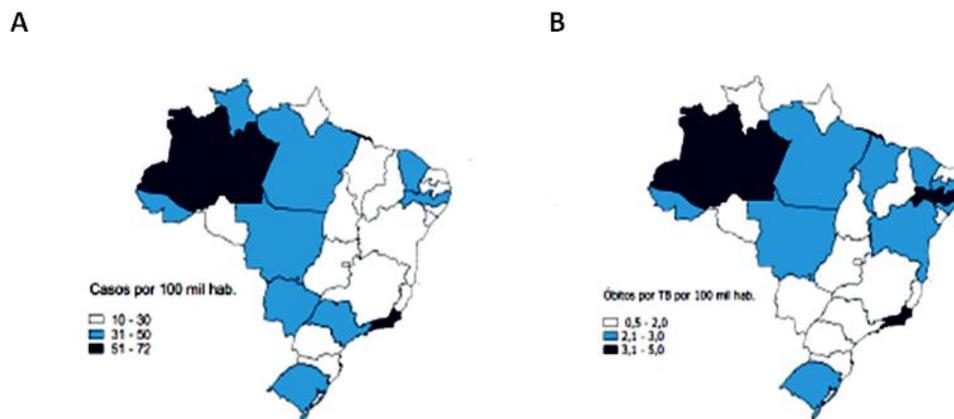


Figura 4. Incidência e mortalidade de TB no Brasil. A) Incidência de casos de TB por 100 mil habitantes. **B)** Mortes relacionadas à TB por 100 mil habitantes. (Ministério da Saúde, 2016).

Com a melhoria progressiva dos indicadores de incidência de TB, combinada à redução de TB/HIV para 10/100 mil habitantes e ao aumento da cobertura do Tratamento Diretamente Observado (TDO) atingindo até 90,0% do infectados, estima-se que no período de 21 anos serão evitados 138.440 casos de TB no Brasil. Além disso, o governo brasileiro tem ainda um compromisso com a OMS de contribuir para a redução da incidência da doença na população mundial. Assim, o Ministério da Saúde lançou o "Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose" com a meta de chegar a uma incidência de menos de 10/100 mil habitantes até o

ano de 2035 e um coeficiente de mortalidade menor do que um óbito por 100 mil habitantes (Ministério da Saúde, 2017).

1.6 O Tratamento de TB e a Necessidade do Desenvolvimento de Novas Terapias

Após ações de saúde pública no tratamento da tuberculose, desenvolvidas nos Sanatórios no início do século XX, na década de 40, os primeiros quimioterápicos começaram a serem descobertos contra TB. Inicialmente foi introduzida a estreptomicina e o ácido *p*-amino salicílico (PAS) e ambos foram moderadamente efetivos e causadores de efeitos tóxicos. Nesta época, começou a ser observada a alta capacidade de resistência do *M. tuberculosis*, sendo necessária a prescrição conjunta de medicamentos para o tratamento da doença (MURRAY, SCHRAUFNAGEL e HOPEWELL, 2015).

O tratamento atual contra a TB sensível começou a se consolidar na década de 60 com a descoberta da isoniazida (INH), que passou a ser utilizada em tripla combinação com PAS e estreptomicina, com duração de mais de 20 meses. Por ser mais efetivo, o etambutol substituiu o PAS e houve a inclusão da rifampicina (RIF) no tratamento, diminuindo o regime de tratamento a 9 meses. Com a substituição da estreptomicina pela pirazinamida, esse regime pôde ser diminuído para 6 meses (GROSSET et al, 2012). Hoje, o tratamento padrão para TB sensível compreende a prescrição dos chamados fármacos de primeira linha RIF, INH, pirazinamida e etambutol por 2 meses e mais 4 meses em que somente RIF e INH são utilizados. A problemática consiste nos casos de multirresistência e coinfeção com HIV. No caso de MDR-TB, em conjunto com os fármacos de primeira linha, são prescritos fármacos injetáveis, como a estreptomicina e a canamicina, além de algum fármaco do grupo das quinolonas. Em etapa posterior são adicionados ao tratamento os chamados fármacos de segunda linha, com efeitos tóxicos severos e representados principalmente pela etionamida. Sendo assim, o tratamento de MDR-TB dura entre 12 a 24 meses e pode causar danos funcionais aos pacientes (MITCHISON, 2005).

Na falta de tratamento de TB, a probabilidade de morte ultrapassa 70% dos casos. Com o cumprimento do tratamento adequado para cada caso de TB, o índice de cura no caso de TB sensível atinge os 90%. Porém, no caso de MDR-TB, esse índice atinge apenas 54%, principalmente devido ao longo período, efeitos colaterais além do custo elevado do tratamento integral. Com isso, muitos casos de abandono ao tratamento são relatados e isso talvez seja a principal causa do estabelecimento de cepas multirresistentes, além da recorrência dos casos de TB sensível (WHO, 2017; SILVA et al, 2003; MIGLIORI et al, 2007). A estratégia de prevenção da multirresistência é a correta aplicação dos fármacos de

primeira linha. Para isso, atualmente existe um programa aplicado mundialmente chamado "DOTS" (*Directly Observed Treatment Short course*) ou Tratamento de Curta Duração Diretamente Observado (TDO). Essa estratégia possui como componentes o compromisso político e financeiro, a disponibilidade de testes diagnósticos com controle de qualidade, logística eficiente de medicamentos e vigilância ativa dos casos (DALCOLMO, 2007).

Apesar da quantidade de fármacos utilizados para o tratamento de TB, incluindo os de primeira e segunda linha, aminoglicosídeos injetáveis entre outros, a descoberta de novas terapias ainda é necessária. A principal meta de novos regimes terapêuticos é o encurtamento do tratamento, com a finalidade de evitar a evasão e reduzir a toxicidade (WHO, 2017). Idealmente, novos medicamentos contra a TB devem ser ativos após a administração oral, exibir efeitos colaterais mínimos, serem compatíveis com antirretrovirais, terem atividade contra cepas resistentes e possuírem propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas susceptíveis de diminuição de dosagem (NIXON et al, 2014). Além disso, seriam revolucionários medicamentos que revertessem danos pulmonares permanentes e combatessem os casos de tuberculose latente, evitando a evasão da resposta imune hospedeira (WALLIS et al, 2016).

Atualmente, existem 17 fármacos que se encontram na fase de testes clínicos para tratamentos individuais e em regimes de combinações com outros fármacos. Dentre estes, bedaquilina que foi introduzido em 2014 (DIACON et al, 2009) e o nitroimidazol delamanida que está em testes clínicos confirmatórios de fase 3 (BLAIR e SCOTT, 2015). Estes medicamentos apresentaram uma taxa de sucesso de 87 – 90 % em regimes de curta duração em pacientes da África e Ásia que sofrem de MDR/XDR-TB. Além disso, apesar da eficácia da vacina BCG em recém-nascidos, outras 12 vacinas se encontram em testes clínicos de fases 1, 2 e 3 (WHO, 2017).

1.7 Desenho de Fármacos Baseado em Estrutura como Estratégia para Identificação de Novas Terapias contra TB

Projetos de sequenciamento do genoma humano e de microrganismos ampliaram a possibilidade de identificação de alvos biomoleculares e desenvolvimento de novos fármacos. Um alvo biomolecular (mais comumente uma proteína ou ácido nucleico) pode ser uma molécula chave envolvida em determinada via metabólica associada a uma doença. Os avanços nos estudos de proteômica e genômica estrutural permitiram um melhor entendimento dos mecanismos moleculares relacionados à função biológica desses alvos e sua interação com diversas moléculas. Houve ainda um rápido desenvolvimento de mecanismos

de triagem de diversos compostos químicos e o estabelecimento da Química Medicinal como estratégia de desenho de novos fármacos (BLUNDELL et al, 2002).

O desenvolvimento racional de medicamentos parte da hipótese de que a modulação de um alvo biológico específico, ou de uma substância, pode ter valor terapêutico. Esta modulação pode ser avaliada pela interação de uma molécula pequena interferindo com a atividade biológica, por exemplo, de uma enzima (CAMPBELL, 2000).

O conceito de desenho de fármacos baseado em estrutura se apoia no conhecimento da estrutura tridimensional do alvo biológico em complexo com moléculas candidatas obtido através de métodos como cristalografia de raios X, espectroscopia de RMN e predições *in silico* de modelos computacionais. Estas estruturas relacionam-se com a complementaridade de interações entre alvos e ligantes e fornecem informações essenciais para especialistas em química orgânica, que são responsáveis na otimização dessas interações e consequente melhoria na potência e seletividade dessas moléculas a seus alvos (WHITTLE e BLUNDELL, 1994; BLUNDELL, 1996; GREER et al, 1994). Por exemplo, uma vez obtida a estrutura tridimensional de uma proteína, é possível uma análise detalhada das propriedades químicas do seu sítio ativo. Pode-se, por exemplo, identificar as interações moleculares com resíduos de aminoácidos específicos e prever novas interações pela geração de potenciais eletrostáticos de regiões inexploradas do sítio ativo. Desta maneira, a otimização de candidatos a fármacos promove novas interações de hidrogênio, eletrostáticas e hidrofóbicas com correções pontuais de penalidades entrópicas desfavoráveis à afinidade com a macromolécula (BLUNDELL e MIZUGUCHI, 2000). Idealmente, os compostos candidatos obtidos devem ser "semelhantes a fármacos", isto é, devem possuir propriedades que conduzam à biodisponibilidade oral e apresentar estabilidade química e metabólica adequadas com efeitos tóxicos mínimos. Vários métodos estão disponíveis para estimar bons parâmetros de ADMET, como a "regra dos cinco de Lipinski" que avalia, por exemplo, a eficiência lipofílica observada em fármacos administrados por via oral (LIPINSKI et al, 1997).

O número de estruturas tridimensionais aumentou exponencialmente nos últimos 30 anos, inclusive as relacionadas com complexos proteína:ligante. Estudos de desenvolvimento de fármacos baseado em estrutura deram origem a vários medicamentos disponíveis atualmente no mercado, principalmente aqueles utilizados para o tratamento da AIDS, como o amprenavir (ALA et al, 1998). Os resultados obtidos no tratamento contra o vírus HIV vêm influenciando o desenvolvimento de novos fármacos contra várias doenças infecciosas, dentre elas, a tuberculose (BLUNDELL et al, 2002). Devido às características únicas da parede celular do *M. tuberculosis*, é necessária a descoberta de moléculas ativas que

apresentem diferenças em tamanho, lipofilicidade e outras propriedades químicas. Assim, o desenvolvimento de fármacos baseado em fragmentos (FBDD) guiado por informações estruturais surge como uma alternativa interessante na obtenção de novos agentes contra diversos alvos de *M. tuberculosis* (MALHOTRA et al, 2016).

1.8 Via de Biossíntese de Folatos e sua Importância Clínica

Folato é um termo genérico que remete a diferentes cofatores, como o ácido fólico (vitamina B9), diidrofolato (DHF), tetraidrofolato (THF), entre outros, e são derivados essenciais para o crescimento celular e replicação tanto em procariotos quanto em eucariotos. Estes cofatores atuam como carreadores de unidades únicas de carbono em diversas vias biossintéticas, incluindo o metabolismo de metionina e nucleotídeos de purina e pirimidina, estando, portanto, diretamente relacionados à biossíntese de DNA e proteínas (BERMINGHAM e DERRICK, 2002). Essa via biossintética é extensivamente estudada para diversas doenças como o câncer e artrite reumatoide, e algumas características a torna relevante no desenvolvimento de fármacos contra doenças infecciosas. Ao contrário de eucariotas superiores, que utilizam derivados de folato oriundos da dieta através da atuação de proteínas transportadoras de folato associadas à membrana celular, procariotas e eucariotas inferiores são dependentes de várias enzimas para a biossíntese "de novo" de folatos (HENDERSON e HUENNEKENS, 1986). Assim, algumas enzimas da via de procariotos não apresentam ortólogos em eucariotos e aquelas que são conservadas nos dois grupos de organismos apresentam sítios ativos não completamente conservados e diferenças podem ser exploradas no desenvolvimento de fármacos seletivos, como por exemplo, a trimetoprima (LI et al, 2000). Recentemente, novas estruturas cristalográficas para as enzimas desta via tornaram-se disponíveis, permitindo um maior conhecimento sobre os seus mecanismos de catálise, inibição por fármacos e planejamento de inibidores baseado em estrutura (BERMINGHAM e DERRICK, 2002).

A via de síntese de folato em bactérias utiliza-se de seis enzimas conhecidas e uma reação não específica por uma fosfatase alcalina. De maneira geral, esta via inicia com a modificação da molécula de GTP para a produção diidropteroato, que por sua vez é fundido com uma molécula de *p*ABA (sintetizado pela via de síntese corismato) e uma molécula de glutamato para formar tetraidrofolato (**Figura 5**) (DIAS et al, 2018). Das seis enzimas envolvidas, somente duas não apresentam estruturas cristalográficas elucidadas para *M. tuberculosis*, a GTP ciclohidrolase I, que catalisa o primeiro passo, e a 2-amino-4-hidroxi-6-hidroximetil diidropteridina difosfoquinase (HPPK), que catalisa o terceiro passo. Todos os

outros passos da via apresentam estruturas cristalográficas resolvidas a alta resolução para suas enzimas, sendo elas a diidroneopterina aldolase (DHNA) (GOULDING et al, 2005), a diidropteroato sintase (DHPS) (BACA et al, 2000), a folipoliglutamato sintase (FPGS) (YOUNG et al, 2008) e a diidrofolato redutase (DHFR) (LI et al, 2000; DIAS et al, 2014). Assim, a aplicação de desenho de fármacos baseado em estrutura para estas enzimas é prontamente aplicável.

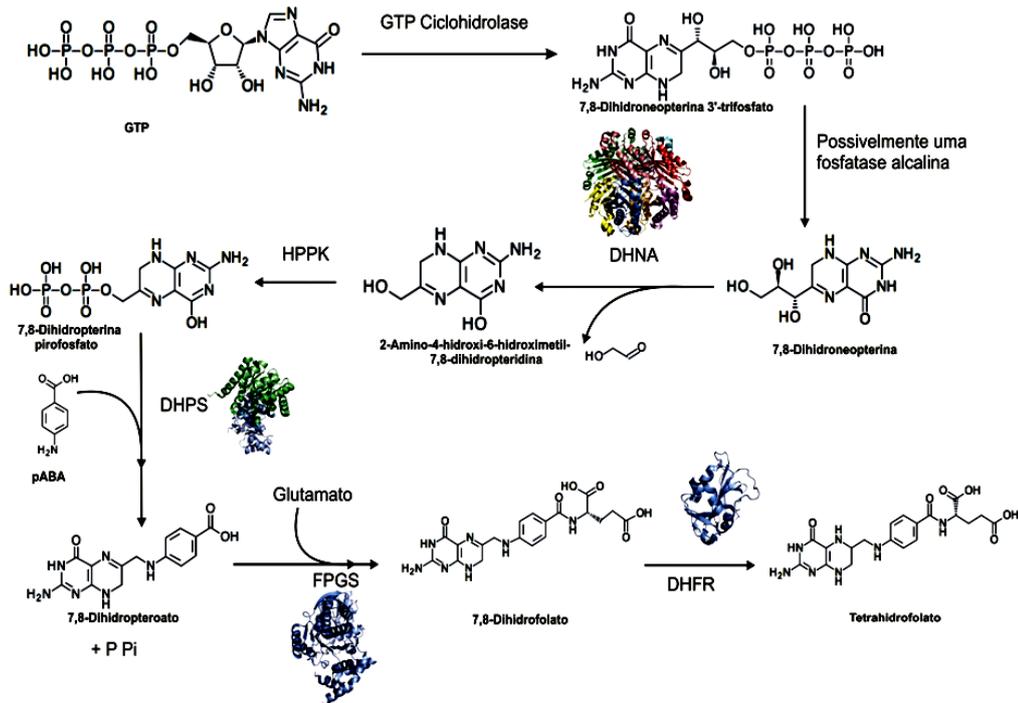


Figura 5. Via de biosíntese de folatos. É esquematizada a transformação da molécula de GTP em tetraidrofolato pela incorporação de pABA e glutamato na via. São ilustradas as estrutura cristalográfica obtidas de quatro enzimas.

Duas enzimas desta via apresentam vários medicamentos que são amplamente utilizados no tratamento de infecções: a diidrofolato reductase (DHFR) e a diidropteroato sintase (DHPS) (BURMAN, 1986; ANAND, 1996). Entretanto, nenhum desses fármacos é usado no tratamento de infecção por *M. tuberculosis*. Trimetoprima e pirimetamina são potentes inibidores da DHFR bacteriana e de parasitas do filo apicomplexa, como *Plasmodium vivax*, respectivamente (ANAND, 1996). Além disso, os antibióticos sulfonamidas (análogos do pABA), que foram os primeiros antibióticos sintéticos a serem usados (introduzidos na década de 30) (SAMMES, 1990), são inibidores da enzima diidropteroato sintase (DHPS) e são usados para o tratamento de várias infecções, incluindo

Neisseria meningitidis e *Pneumocystis carinii* (BERMINGHAM e DERRICK, 2002). Estes compostos também são utilizados atualmente no tratamento por infecções causadas por *Mycobacterium leprae*, o agente causador da lepra (ANAND, 1996). A coadministração de inibidores para as enzimas DHFR e DHPS é utilizada para tratamento de infecções urinárias, apesar de casos de resistência já terem sido reportados (BERMINGHAM e DERRICK, 2002).

1.9 A Enzima Diidrofolato Redutase de *M. tuberculosis* (MtDHFR) como Alvo para o Desenvolvimento Racional de Fármacos

A enzima diidrofolato redutase (DHFR) (E.C. 1.5.1.3) é um dos alvos mais estudados da via de síntese de folatos, principalmente em estudos de desenvolvimento de novos fármacos contra diversas doenças, como artrite, leucemias, infecções parasitárias, fúngicas e bacterianas (DIAS et al, 2018). Assim, esta enzima possui a mais extensa literatura dedicada ao processo de desenho racional de fármacos entre as enzimas da via de biossíntese de folatos. Devido à elucidação de genomas entre diferentes organismos, obtenção de inúmeras estruturas tridimensionais e o reduzido tamanho da enzima (aproximadamente 150 aminoácidos), a DHFR representa um excelente modelo para estudos de atividade enzimática e movimentos relacionados ao mecanismo catalítico, sendo amplamente explorada em técnicas de dinâmica molecular, Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e cristalografia de raios X, principalmente a DHFR de humanos e *E. coli* (OYEN et al, 2015).

Em relação aos principais inibidores da enzima, a DHFR é um alvo bem caracterizado do metotrexato, um análogo de folatos utilizado como quimioterápico contra vários tipos de cânceres e doenças autoimunes, como linfomas e artrite reumatoide (McGUIRE, 2003; CIPRIANI et al, 2014). Fármacos como a trimetoprima (TMP) e a pirimetamina (PIR) são largamente utilizados para tratamento de infecções estafilococas e protozoárias, respectivamente (HAWSER et al, 2006; GANGJEE et al, 2007; ANDERSON, 2005). PIR é um fármaco de primeira linha utilizado no tratamento da malária. A TMP vem sendo usada monoterapeuticamente desde os anos 70 para o tratamento de infecções urinárias e é um agente bactericida contra diversas bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus spp.* e Gram-negativas, como *E. coli* e *Salmonella spp.* (HAWSER et al, 2006). Devido à resistência relacionada ao tratamento com TMP, esta passou a ser usado em combinação com as sulfonamidas (análogos do *pABA*), sendo mais relevante no passado para o tratamento de infecções urinárias (ANAND, 1996; HAWSER et al, 2006). Inibidores como o metotrexato (classe das diaminopteridinas), análogos do substrato (DHF), são denominados clássicos e aqueles denominados não clássicos, como a trimetoprima e

pirimetamina (classe das diaminopirimidinas), apresentam baixa capacidade de inibição contra a enzima MtDHFR (DIAS et al., 2014) (**Figura 6**). A estratégia de desenvolvimento de fármacos contra a enzima DHFR sempre foi focada na otimização química ou no desenho de novos análogos de diaminopteridinas ou diaminopirimidinas, como a iclaprima, que foi eficaz contra diversos tipos bacterianos resistentes a TMP, mas para a enzima MtDHFR, esta estratégia continuou sendo ineficiente (SCHNEIDER et al, 2003). Ainda para o caso de tuberculose, foi descrito recentemente o mecanismo de inibição indireta de MtDHFR provocada pelo PAS, um dos primeiros fármacos utilizados para o tratamento da doença e que, através da interação com a enzima diidropteroato sintase (DHPS) (anterior a DHFR na via de folatos), está envolvido na produção de um metabólito análogo ao substrato de DHFR (DHF) inativo que inibe a ação da enzima DHFR. Porém, a sua ineficácia quando utilizado monoterapeuticamente já foi descrita, além da propensão para o estabelecimento de resistência (ZHENG et al, 2013).

O sucesso da inibição de DHFR na medicina clínica favorece seu uso como um alvo relevante em programas de descoberta de fármacos, embora apenas algumas moléculas diferentes de metotrexato, trimetoprima e pirimetamina tenham alcançado os ensaios clínicos no tratamento de doenças humanas e infecciosas (SINCAK e SCHMIDT, 2009).

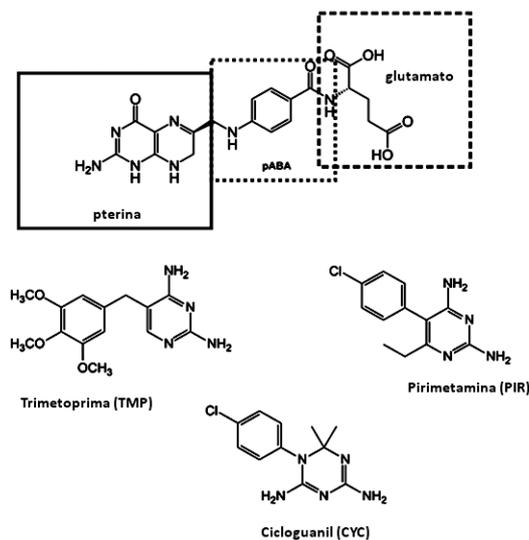


Figura 6. Estrutura química do substrato DHF e de inibidores da enzima DHFR. Acima é ilustrada a estrutura química do diidrofolato (DHF) subdividida em seus grupos formadores essenciais (grupo pterina, pABA e glutamato). Abaixo são ilustradas as estruturas químicas de alguns inibidores da enzima DHFR (DIAS et al, 2014).

A DHFR é a última enzima da via de biossíntese de folatos e é responsável pela redução dependente de NADPH do diidrofolato (DHF) para tetraidrofolato (THF) (**Figura**

7A). Seu mecanismo catalítico envolve a transferência de um hidrogênio (próton) de NADPH para um carbono (C6) do anel pterina do diidrofolato, após este substrato sofrer uma protonação no nitrogênio (N5) da pterina (WAN et al, 2014). Apesar de terem sido propostos diferentes mecanismos para a redução do diidrofolato, existe um consenso de que a ligação deste substrato e do cofator (NADPH) no sítio ativo é favorável à transferência de hidrogênio, uma vez que o grupo nicotinamida do NADPH e o grupo pterina de DHF ficam justapostos devido à ação de resíduos chave no sítio ativo da enzima (FRANCIS e KOHEN, 2014). O mecanismo de catálise foi mais bem caracterizado em *E. coli* e os resíduos de aminoácidos chave são representados pelo aspartato 27 (Asp27), pela tirosina 100 (Tyr100) e pela metionina 20 (Met20). Asp27 e Tyr100 estão envolvidos na orientação do substrato, proporcionando um ambiente eletrostático negativo nesta região do sítio ativo para a interação do grupo pterina do DHF. Já Met20, devido a sua importância e localização, dá nome a alça em que esse resíduo está presente. A alça Met20 orienta uma molécula de água envolvida na protonação do nitrogênio N5 do DHF, necessária para a redução deste em THF (**Figura 7B**) (WAN et al, 2014; LIU et al, 2014; MATTHEWS et al, 1977; SAWAYA e KRAUT, 1997).

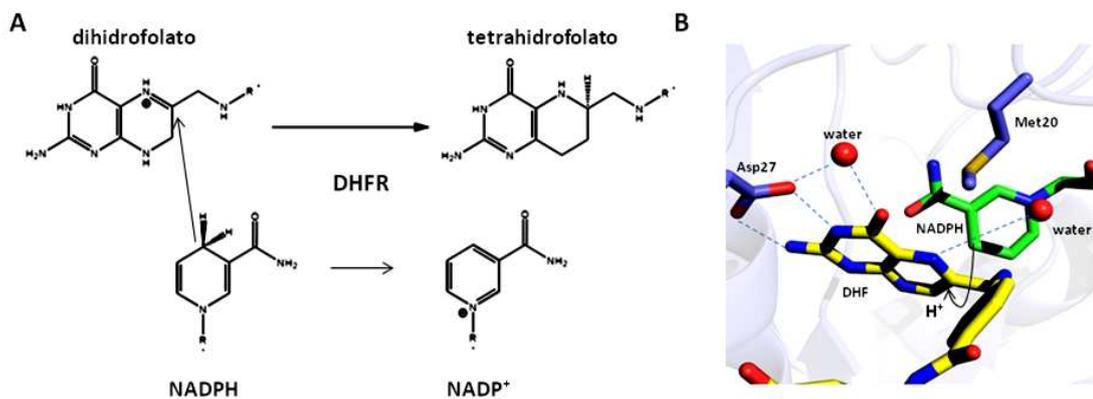


Figura 7. Reação catalisada pela enzima DHFR e mecanismo de catálise. A) Reação catalisada por DHFR. É representada a oxidação sofrida pela molécula de NADPH e a redução do diidrofolato para tetraidrofolato. **B)** Mecanismo de catálise de DHFR. Asp27 é destacado na interação com DHF e alça Met20 orienta uma molécula de água para a protonação do substrato, necessária para a transferência de H⁺ realizada pelo grupo nicotinamida de NADPH. Imagem gerada no PyMOL.

A elucidação do mecanismo catalítico da DHFR é de interesse da área acadêmica e clínica há décadas. Desde a obtenção de sua primeira estrutura cristalográfica, resolvida em 1977, e diversas informações estruturais obtidas de RMN, movimentos de subdomínios

presente nas diversas DHFRs têm chamado a atenção quanto a sua importância no processo de catálise (MATTHEWS e al, 1977; SAWAYA e KRAUT, 1997).

E. coli é o organismo modelo com a enzima DHFR mais caracterizada quanto ao mecanismo catalítico e informações de estrutura tridimensional. Ensaio de caracterização cinética indicaram a presença de pelo menos cinco intermediários na formação do complexo da sua reação enzimática: E:THF:NADP⁺, E:THF, E:THF:NADPH, holoenzima E:NADPH e o complexo de Michaelis-Menten E:DHF:NADPH (OYEN et al, 2015). Os movimentos característicos da enzima foram observados entre suas diferentes homólogas e ocorrem devido a mudanças conformacionais, principalmente nos subdomínios mais flexíveis de alças, que são típicos nas enzimas DHFRs. Na DHFR de *E. coli*, essas regiões de alças são denominadas Met20, F-G e G-H. A alça Met20 é uma das regiões mais estudadas por RMN e seus movimentos orientam estados conformacionais classificados como ocluído, fechado, aberto e desordenado (**Figura 8A**) (SAWAYA e KRAUT, 1997). Embora os movimentos da DHFR de *E. coli* tenham sido mais compreendidos, alguns estudos indicaram que diferentes organismos podem ter movimentos catalíticos diferentes. As estruturas cristalográficas das enzimas de *M. tuberculosis* e humana revelaram estados conformacionais mais rígidos quando comparados com *E. coli*, e foram classificados simplesmente em estados aberto e fechado, relacionados à interação do substrato (DHF) ao sítio ativo (DIAS et al, 2014; DIAS et al, 2018). Em MtDHFR, o grupo nicotinamida do NADPH pode se ligar ou não ao sítio ativo, influenciado por Tyr100. Na ausência de DHF, um impedimento estérico provocado por Tyr100 torna o grupo nicotinamida do NADPH flexível e a enzima adota uma conformação aberta. Já na presença de DHF, a interação hidrofóbica do tipo "*π stacking*" entre o grupo pterina do DHF e o grupo nicotinamida do NADPH não ocasiona o impedimento estérico de Tyr100 e aproxima o subdomínio de alças (*loop 1*) do subdomínio de ligação de adenosina, configurando a conformação fechada (**Figura 8B**) (DIAS et al, 2014; DIAS et al, 2018). Tyr100, que em alguns organismos é substituída por uma fenilalanina, tem um impacto importante na afinidade de diferentes inibidores. A estrutura tridimensional do mutante de *S. aureus* F98Y revelou que o grupo hidroxila da tirosina tem um papel fundamental na resistência a trimetoprima, pois contribui para induzir uma conformação alternativa do NADPH, diminuindo sua afinidade, semelhante ao que ocorre na enzima DHFR de *M. tuberculosis* (FREY et al, 2009).

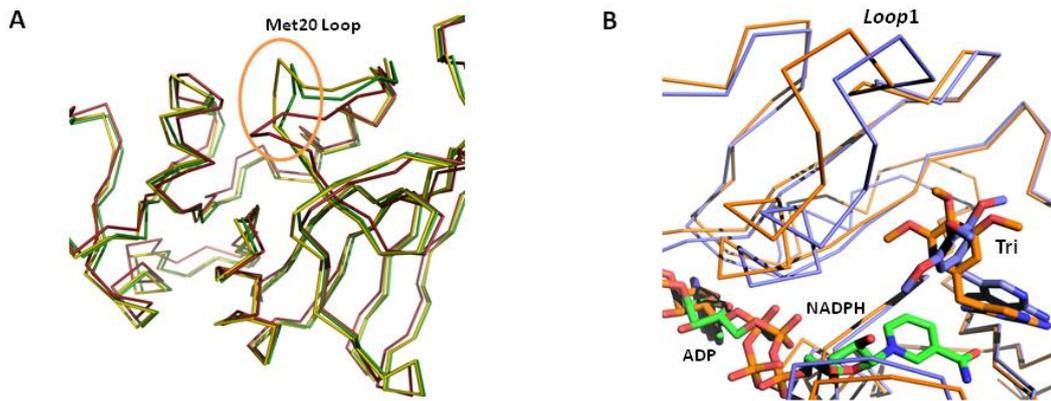


Figura 8. Sobreposições de diferentes estados conformacionais da enzima DHFR de *E. coli* e de *M. tuberculosis*. **A)** Sobreposição de estados conformacionais da enzima DHFR de *E. coli*: aberto, em verde; fechado, em vermelho; e ocluído, em amarelo. A alça Met20 está circulada em laranja. **B)** Sobreposição de conformações aberta, em laranja, e fechada, em azul, do complexo de MtDHFR com trimetoprima e NADPH (DIAS et al, 2018). Imagens geradas no PyMOL.

A primeira estrutura cristalográfica da enzima DHFR de *M. tuberculosis* foi publicada em 2000 e revelou um enovelamento comum ao observado em outras estruturas tridimensionais de DHFRs. Esse enovelamento é denominado *Rossmann fold* e é constituído por um conjunto de oito fitas β flanqueadas por quatro α hélices. A estrutura possui dois subdomínios estruturais: subdomínio de ligação de adenosina (região de interação do NADPH) e subdomínio de alças (DIAS et al., 2014) (**Figura 9A**). As estruturas cristalográficas de MtDHFR ligada ao metotrexato (MTX) (**Figura 9B**) e a outros inibidores (trimetoprima, pirimetamina e cicloguanil), sugerem que o sítio ativo de MtDHFR é composto por quatro sub-regiões (LI et al, 2000; DIAS et al, 2014). A primeira sub-região consiste em um sítio polar mais profundo, localizado próximo à região de interação do grupo nicotinamida do NADPH, com caráter eletrostático negativo e formado por Asp27, Tyr100 e o grupo carbonila de isoleucina 94 (Ile94). A segunda sub-região é um local de caráter hidrofóbico, formado por fenilalanina 31 (Phe31), leucina 50 (Leu50), prolina 51 (Pro51), leucina 57 (Leu57) e valina 54 (Val54). A terceira sub-região é um local com caráter eletrostático positivo, situado próximo à superfície da proteína, representando a região de interação do *p*ABA e glutamato (grupos químicos integrantes da molécula de DHF) e formado por glutamina 28 (Gln28), alanina 29 (Ala29), arginina 32 (Arg32) e arginina 60 (Arg60). Na quarta sub-região, o triptofano 22 (Trp22), leucina 24 (Leu24), aspartato 27 (Asp27) e glutamina 28 (Gln28) formam um sítio ausente na DHFR humana, onde interage uma

molécula de glicerol oriunda da condição de cristalização utilizada (**Figura 9B e C**) (LI et al, 2000).

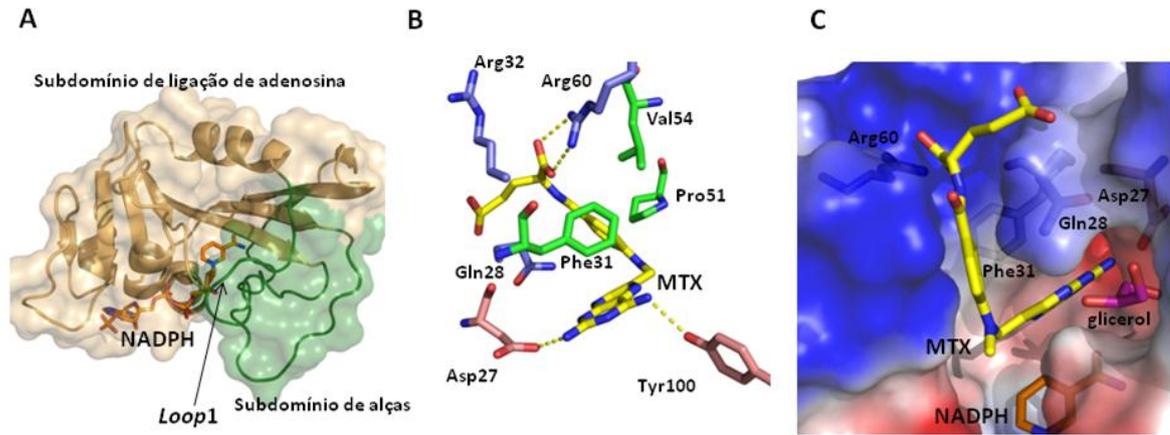


Figura 9. Biologia estrutural de MtDHFR. A) É representado o complexo binário MtDHFR:NADPH. Subdomínio de alças é ilustrado em verde e subdomínio de ligação de adenosina em marrom. Acredita-se que alterações conformacionais que ocorrem em L1 podem ser críticas para o ciclo catalítico de DHFR. Imagem gerada no PyMOL usando a estrutura APO 1DG8 (LI et al, 2000). B) São ilustradas características importantes do sítio ativo de MtDHFR e mostrados os resíduos que formam as sub-regiões do sítio ativo ligados ao metotrexato (amarelo). Em salmão são ilustrados os resíduos que fazem parte da sub-região eletrostática negativa situada profundamente. Em verde, os resíduos que compõem a sub-região hidrofóbica. Os resíduos azuis pertencem à sub-região eletrostática positiva localizada na superfície. Interações de hidrogênio e iônicas estão representadas por linhas tracejadas em amarelo. C) É ilustrado o potencial eletrostático estimado do sítio ativo de MtDHFR (vermelho: negativo; azul: positivo; branco: neutro). O bolsão de glicerol, localizado ao lado do sítio ativo onde o metotrexato está ligado, é delineado por Asp27 e Gln28. Imagens geradas no PyMOL com a estrutura APO 1DF7 (LI et al, 2000).

Diversas características dessa enzima podem ser exploradas no desenvolvimento de novos inibidores, inclusive, contra a tuberculose. Quando são considerados os movimentos relacionados à catálise, uma questão que surge é se estados conformacionais mais flexíveis (*E. coli*) ou mais rígidos (*H. sapiens* e *M. tuberculosis*) podem influenciar os modos de interação e afinidades de possíveis inibidores aos sítios ativos de DHFRs. Outra possibilidade se relaciona com a maior eficácia de inibidores que realizam interações hidrofóbicas com o NADPH, como é observado no caso do grupo diaminopteridina do MTX (análogo ao DHF) e das diaminopirimidinas (trimetoprima e pirimetamina). Baseado nisto, seria interessante o desenvolvimento de inibidores com novos grupos químicos (novos *scaffolds*) que possam interagir mais eficientemente com o grupo nicotinamida do NADPH e/ou com as outras regiões propícias a interações moleculares observadas em estrutura tridimensional, discutidas

anteriormente. Outra questão se relaciona com a busca de novos inibidores que sejam seletivos contra a enzima DHFR de *M. tuberculosis*. As comparações entre a DHFR humana e MtDHFR revelam uma identidade de sequência de apenas 26%. Além disso, com sítio ativo compartilhando 55% de similaridade, observa-se um número de resíduos altamente conservados, mas algumas diferenças podem influenciar no planejamento racional de fármacos (LI et al, 2000). Pode-se notar, por exemplo, que a MtDHFR apresenta uma cavidade eletrostática polar, delimitada principalmente pela glutamina 28, onde interage uma molécula de glicerol. Na enzima DHFR humana, Gln28 é substituído por uma fenilalanina e o anel aromático desse resíduo causa um bloqueio estérico nessa região, impedindo a formação de uma cavidade. Explorando esta região da enzima através do planejamento racional de interatores que mimetizam a interação realizada pela molécula de glicerol, pode-se chegar ao desenvolvimento de um inibidor altamente seletivo para MtDHFR (EL-HAMAMSY et al, 2007).

1.9.1 Panorama atual do Desenvolvimento Racional de Inibidores da Enzima DHFR de *M. tuberculosis*

Apesar de a DHFR ser um alvo já validado para o desenvolvimento de fármacos contra diversos patógenos e câncer, atualmente não há inibidores desta enzima utilizados no tratamento de TB. Inibidores como o metotrexato, a trimetoprima, a pirimetamina e o trimetrexato são potentes inibidores *in vitro* da enzima MtDHFR, porém não são eficientes em inibir o crescimento de cultura de *M. tuberculosis*. Provavelmente, isso ocorre devido a falhas na permeabilidade da parede celular lipídica do bacilo (NIXON et al, 2014; KUMAR et al, 2015). A busca de novos inibidores têm focado no desenvolvimento de análogos de antifolatos conhecidos de MtDHFR e informações de biologia estrutural orientam o processo. Vêm sendo estudados como possíveis novos inibidores, séries de compostos análogos de pteridinas, diaminopirimidinas e triazinas (Li et al, 2000; GERUM et al, 2002; El-Hamamsy et al, 2007).

Para os análogos de pteridina, que é o grupo presente em inibidores clássicos de DHFR, merecem destaque análogos contendo um anel quinazolina (KUMAR et al, 2012) e análogos do grupo das deazapteridinas que tiveram atividade contra o crescimento de *Mycobacterium spp* (SULING e MADDRY, 2001; DEBNATH, 2002).

Dentre as diaminopirimidinas, se destacam o inibidor K-130 e análogos, epiroprima e as diaminopirimidinas ligadas a um grupo propargil (PLAs) (HAWSER et al, 2006; HAJIAN et al, 2016). O inibidor K-130 e a epiroprima, apesar de serem poucos

eficientes contra o bacilo *M. tuberculosis*, apresentaram resultados promissores em relação a outras espécies de *Mycobacterium* e MDR-TB (HAWSER et al, 2006). K-130 em combinação com a dapsona (análogo do *pABA*) mostrou atividade contra *Mycobacterium lufu* e *Mycobacterium leprae* (DHOPE, 1999). A epiroprima mostrou sinergismo com INH e se destacou em estudos de atividade contra cepas resistentes a isoniazida (INH) e a rifampicina (RIF). Nestes estudos, o uso dessa combinação foi capaz de prevenir o estabelecimento de resistência a INH (DHOPE, 2002). Ainda entre as diaminopirimidinas, um grupo de inibidores tiveram resultados satisfatórios a respeito da boa permeabilidade na parede celular do bacilo. Estes são representados pelos PLAs e também tiveram alta eficiência de inibição *in vitro* da enzima MtDHFR (HAJIAN et al, 2016).

Também vêm sendo desenvolvidos inibidores diferentes de diaminopirimidinas e outros inibidores clássicos. Esses possíveis novos inibidores de MtDHFR são os derivados do grupo triazina. São representados principalmente pelo WR99210 e apesar de apresentar atividade *in vitro* e *in vivo* contra o *M. tuberculosis*, foram associados problemas de tolerância gastrointestinal a esse composto (GERUM et al, 2002). Alguns compostos deste grupo das triazinas tiveram efeitos citotóxicos mais moderados e um deles apresentou bom sinergismo com o PAS (LELE et al, 2015).

1.10 A Estratégia de Desenho de Fármacos Baseado em Fragmentos (*Fragment based drug discovery* – FBDD)

Uma das estratégias utilizadas no desenvolvimento de fármacos baseado em estrutura e que não tem sido explorada para a via de síntese de folatos, tanto em *M. tuberculosis*, como em outros organismos, é o desenho de fármacos baseado em fragmentos (FBDD – *Fragment based drug discovery*) (MURRAY e BLUNDELL, 2010). FBDD tem se tornado uma das principais alternativas aos métodos tradicionais (*High throughput screening* – HTS) na triagem de moléculas candidatas a fármacos nos últimos anos (MURRAY e REES, 2009).

Até o momento, somente três fármacos foram obtidos a partir dessa estratégia, apesar de um crescente aprimoramento da otimização de compostos candidatos (*hits*) em compostos líderes ou pré-fármacos. Dezenas de novos compostos alcançaram fases de testes clínicos em um período relativamente curto, o que mostra a alta eficiência de FBDD. Para os fármacos que já atingiram o mercado, Vemurafenib (Plexxikon / Roche) em 2011, Venetoclax (AbbVie / Genentech) em 2016 e Ribociclib (Astex / Novartis) em 2017, desenvolvidos para o tratamento de câncer de pele, leucemia linfocítica e câncer de mama, respectivamente, em

todas as campanhas de FBDD, a otimização de fragmentos foi orientada por estruturas tridimensionais dos alvos (THOMAS et al, 2017). A partir do sucesso inicial com alvos proteicos pertencentes à classe das quinases, a versatilidade desta abordagem se expande para uma ampla gama de classes de proteínas, incluindo chaperonas, β -secretases, fatores de transcrição e proteases relacionadas ao vírus HIV, além de alcançarem diversos alvos em doenças infecciosas negligenciadas e a tuberculose (SCOTT et al, 2012).

A estratégia HTS identifica compostos interatores próximos a líderes que necessitam de menores modificações para a obtenção de fármacos, pois normalmente possuem características químicas que se aproximam da chamada "regra dos cinco" de Lipinski (compostos de peso molecular até 500 Da, doadores e aceptores de hidrogênios de 5 e clogP de 5), que são compostos mais lipofílicos e com melhor biodisponibilidade por via oral (MURRAY e REES, 2009; LIPINSKI et al, 2001). Apesar de compostos obtidos de HTS necessitarem de etapas mais curtas na otimização, são observadas maiores dificuldades de caracterização quanto à interação com seus alvos, já que a baixa solubilidade dificulta a realização de diversas técnicas biofísicas. Além disso, a presença de grupos mais lipofílicos nessas moléculas aumenta o número de restrições estéricas com o alvo, o que dificulta a otimização química, além de apresentarem maiores efeitos tóxicos (**Figura 10**) (SCOTT et al, 2012; CHEN e HUBBARD, 2009).

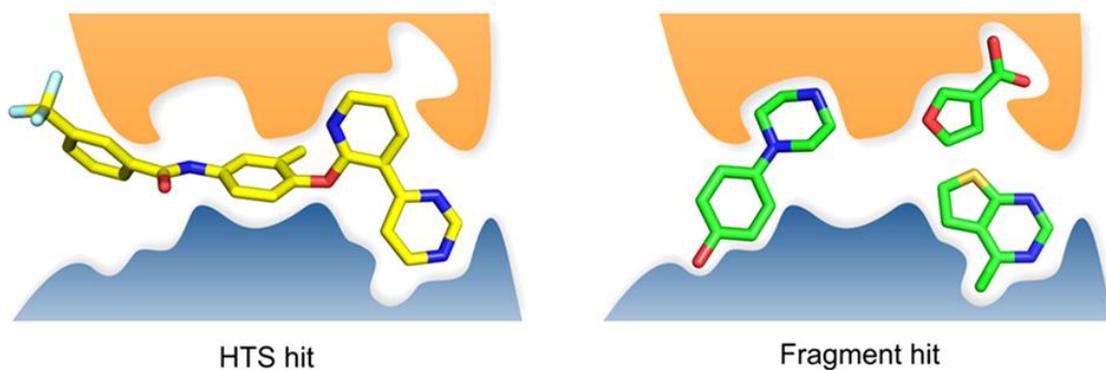


Figura 10. Comparação dos compostos identificados por HTS e por FBDD. À esquerda é representado um exemplo de composto típico identificado em estratégias HTS com alguns impedimentos estéricos a serem corrigidos com o alvo. À direita são representados exemplos de *hits* de fragmentos identificados em FBDD realizando interações-chave com diferentes regiões do alvo (SCOTT et al, 2012).

A triagem de alvos contra bibliotecas de fragmentos identifica compostos interatores (*hits*) em sítios específicos e com baixa afinidade (**Figura 10**). Fragmentos são

compostos menores, mais solúveis, menos lipofílicos e seguem a denominada "regra dos três", que foi proposta por Congreve e colaboradores (peso molecular até 300 Da, doadores e aceptores de hidrogênios de 3 e clogP de 3) (CONGREVE et al, 2003; JHOTI et al, 2013). O método de FBDD também consiste na caracterização química dos *hits* identificados e na habilidade de aperfeiçoá-los em compostos líderes que apresentem propriedades químicas mais próximas de fármacos. Porém, é discutida qual a melhor estratégia no alcance dessas moléculas, além da necessidade do uso de diversos filtros na construção de bibliotecas de fragmentos que atentem para a presença de compostos químicos instáveis, super-reativos (*PAINS*) e tóxicos (THOMAS et al, 2017; BAELL e NISSINK, 2018). Em FBDD, em alguma etapa do processo, também é necessária a adição de grupos mais lipofílicos que se relacionam com parâmetros adequados de ADMET presentes em fármacos. Entretanto, essa estratégia não tem se mostrado eficiente quando adotada em etapas iniciais de otimização. É desejável inicialmente uma maior contribuição em entalpia para a interação, que pode ser alcançada através de interações moleculares mais fortes, como de hidrogênio. Dessa maneira, mantém-se maior solubilidade para a realização dos experimentos e diminuindo impedimentos estéricos observados em compostos obtidos por HTS. Assim, são aproveitadas para a otimização a posição inicial e bem definida de interação dos *hits*. Primeiramente, busca-se o ganho de afinidade e potência através da adição de grupos polares que visam novas interações de hidrogênio, para posterior adição de grupos hidrofóbicos (lipofílicos) que favoreçam características farmacocinéticas presentes em compostos líderes (CIULLI e ABELL, 2007; LADBURY et al, 2010).

A taxa de sucesso na triagem de fragmentos é tipicamente mais alta do que a observada nos métodos HTS, devido à relação inversa entre a complexidade de compostos triados e a probabilidade dos compostos possuírem boa complementaridade com a proteína alvo (CARR et al, 2005). Assim, um menor número de moléculas precisa ser triado (geralmente por volta de 1000 compostos) para a identificação de múltiplos *hits* candidatos. Outra vantagem da técnica é que, devido à maior solubilidade dos compostos, é possível trabalhar em altas concentrações e explorar um largo conteúdo de informações obtidas por diferentes técnicas, como cristalografia, ressonância magnética nuclear, análise do ponto de desenovelamento térmico utilizando DSF (*Differential Scanning Fluorimetry*) ou, simplesmente, *thermal shift*, calorimetria além de outros métodos biofísicos e técnicas de bioensaio (ZARTHLER e SHAPIRO, 2008; SCHIEBEL et al, 2016). A aplicação desse amplo espectro de técnicas oferece melhor controle de qualidade dos *hits* identificados e direciona melhores pontos de partida para a síntese química. Entretanto, para as abordagens

de FBDD há a necessidade de se utilizar técnicas com alta sensibilidade para detecção de candidatos com afinidade na faixa de milimolar (De KLOE et al, 2009; SILVESTRE et al, 2013).

A integração de cristalografia de raios X dentro do processo de FBDD é fundamental para o detalhamento espacial das interações proteína-ligante e, conseqüentemente, para o desenho de moléculas com maior eficiência (JHOTY e LEACH, 2007; SCHIEBEL et al, 2015). Somente com uma visão estrutural, os modos de interação desses compostos em diferentes regiões do alvo são confirmados e assim, procedimentos de crescimento (*growing*), mescla (*merging*) e união (*linking*) desses fragmentos favorecem, de maneira eficaz, a exploração de regiões específicas, por exemplo, do sítio ativo de enzimas em termos de interações moleculares (**Figura 11**) (KARAWAJCZYK et al, 2015; SCOTT et al, 2012).

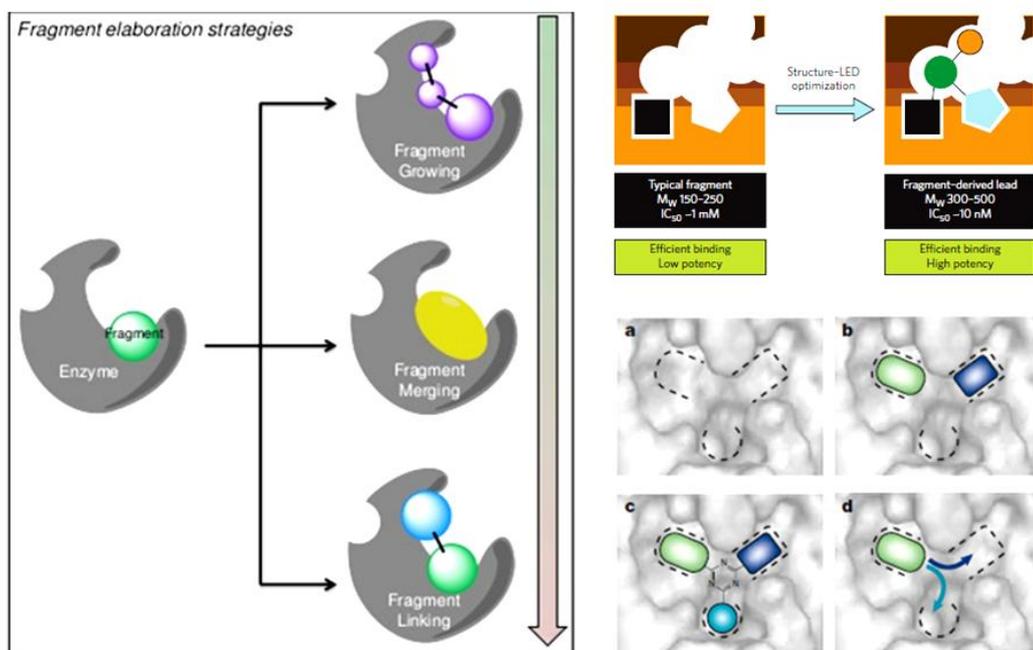


Figura 11. A estratégia do desenho de fármacos baseado em fragmentos (FBDD). São ilustrados procedimentos de crescimento (*growing*), mescla (*merging*) e união (*linking*) de fragmentos para exploração eficaz do sítio ativo de enzimas. À direita é exemplificado como a obtenção de informações estruturais do alvo auxilia neste processo (BLUNDELL et al, 2002; MURRAY e REES, 2009; MARCHETTI et al, 2017).

Estruturas tridimensionais de complexos proteína:fragmentos aliados com a obtenção de parâmetros termodinâmicos obtidos através de calorimetria, permitem uma

análise de regiões essenciais de interações (*hotspots*), sejam elas polares ou apolares. Essas regiões orientam ganho de afinidade pelas possibilidades de novas interações de hidrogênio ou interações hidrofóbicas. Esta última, com o encaixe adequado do grupo químico hidrofóbico e com o deslocamento eficiente de moléculas de água de sítios específicos, ocasiona contribuições entrópicas para as interações (McCARTHY et al, 2014). Com isso, a combinação de biologia estrutural e termodinâmica ganha especial relevância em FBDD, pois relacionam tipos de interações (polares ou apolares), tipos de resíduos de aminoácidos essenciais para a interação e parâmetros energéticos (entalpia e entropia), que auxilia no oferecimento de potência e orienta as modificações químicas para a obtenção de moléculas líderes (BLUNDELL, 2017). A FBDD é a principal estratégia que permite a correlação de um maior número possível de informações sobre a interação dos *hits* de fragmentos com passos futuros de síntese orgânica guiada pela Química Medicinal (MARCHETTI et al, 2017).

1.11 Breve Discussão sobre as Técnicas Biofísicas Adotadas no Projeto para a Campanha FBDD

Devido às propriedades físico-químicas dos compostos identificados (*hits*), a estratégia de desenho de fármacos baseada em fragmentos permite a aplicação de uma gama de técnicas biofísicas usadas para a confirmação e caracterização de interações moleculares com o alvo. Aliados a métodos estruturais, ganho de potência pode ser planejado pela identificação de *hotspots* e com o incremento de novas interações moleculares. Com isso, um ciclo iterativo de planejamento racional de fármacos é criado até que potência (afinidade e inibição) e similaridade farmacocinética a fármacos sejam obtidas para o início de testes pré-clínicos e clínicos (**Figura 12**) (THOMAS et al, 2017).

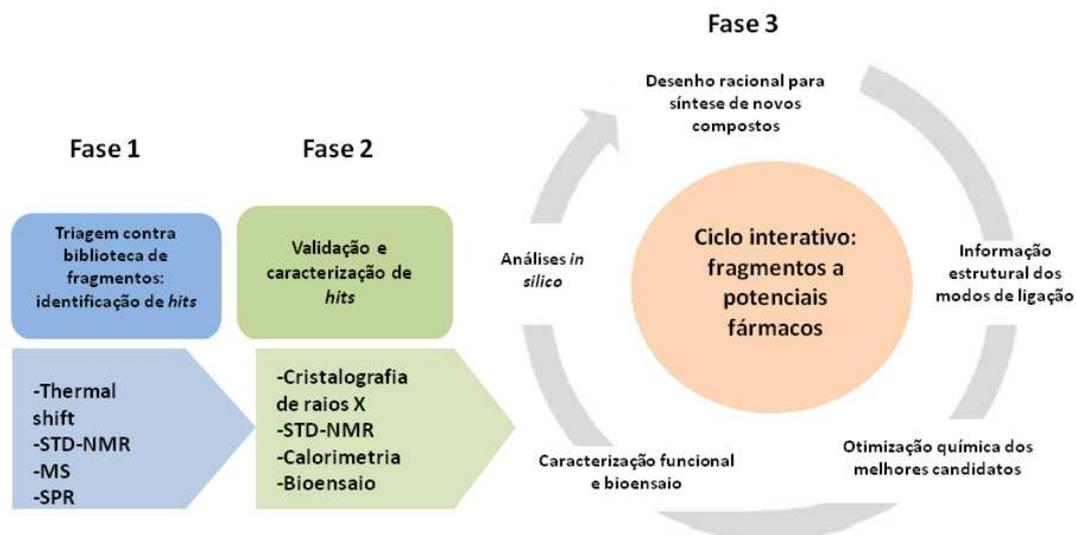


Figura 12. Etapas do desenho de fármacos baseado em fragmentos (FBDD). São representadas as fases a serem atingidas em campanhas FBDD e as respectivas técnicas experimentais adotadas na validação e caracterização dos *hits* (Figura adaptada de THOMAS et al, 2017).

Uma metodologia multitécnicas em FBDD é necessária devido ao cuidado com o trato de compostos falso-positivos. É imprescindível um regime de técnicas confirmatórias e/ou complementares a outras técnicas usadas na mesma campanha, além da obtenção do modo de ligação em estruturas tridimensionais de complexos enzima:fragmentos (SCOTT et al, 2012). O emprego dessa abordagem possui como função a discriminação entre *hits* duvidosos dos *hits* que experimentalmente se revelam como bons pontos de partida para a otimização em compostos líderes (CIULLI, 2013). Diferentes técnicas favorecem o acúmulo de conhecimento a respeito da variedade química, estrutural e energética das interações entre proteína e fragmentos. Com isso, é esperada uma maior qualidade dos compostos, bem como a redução de custo e tempo no processo de desenvolvimento de fármacos (JHOTI et al, 2007).

Neste trabalho, diversas técnicas biofísicas foram realizadas na fase1 de triagem contra uma biblioteca de fragmentos e nas fases 2 e 3 de caracterização e otimização dos *hits*. Essas técnicas foram o *thermal shift* ou *thermofluor* ou ainda DSF (*Differential Scanning Fluorimetry*), STD-NMR (*Saturation Transfer Difference*), a calorimetria de titulação isotérmica por ITC (*Isothermal Titration Calorimetry*) e a cristalografia de raios X.

1.11.1 *Thermal Shift* ou *Thermofluor* ou DSF (*Differential Scanning Fluorimetry*)

Ensaio que identifica a interação entre proteína-ligante representa uma poderosa abordagem na identificação de ligantes com potencial para candidatos a *hits*. Uma técnica que tem sido bastante utilizada devido ao baixo custo, automatização e a rápida obtenção de resultados é o *thermal shift*. Essa técnica é utilizada principalmente em triagens contra bibliotecas de compostos químicos e consiste em mensurar a estabilidade intrínseca da proteína alvo por desenovelamento termicamente induzido. Na interação de um ligante, ocorre um aumento na temperatura de desenovelamento da proteína devido à energia de estabilização entre os dois. Essa diferença do ponto de desenovelamento de uma proteína na ausência e presença de um ligante pode então ser mensurada (KRANZ e SCHALK-HIHI, 2011).

A estabilidade da proteína e também enovelamento são altamente dependentes da temperatura (PANTOLIANO et al, 2001). A temperatura em que uma proteína perde a sua completa estrutura terciária é chamada de temperatura de *melting* (T_m), moléculas que se ligam a uma proteína podem conduzir ao aumento ou diminuição de T_m , devido às mudanças na estabilidade dessa associação. Essa variação na T_m é chamada de *thermal shift* e pode ser ensaiada (PANTOLIANO et al, 2001).

Um corante fluorescente (SYPRO Orange) que se liga ao ambiente hidrofóbico da proteína enovelada é utilizado para mensurar a T_m . Esse corante é misturado com a proteína e com os ligantes a serem testados e quando ocorre o máximo de desnaturação, ocorre o máximo de emissão de fluorescência. Utilizando uma máquina de qPCR, a temperatura é gradualmente aumentada e a proteína desenovela, expondo os seus resíduos hidrofóbicos que geralmente estão enterrados na estrutura nativa. A sonda fluorescente se liga a estes resíduos hidrofóbicos e fluoresce.

Em FBDD, normalmente devido à baixa afinidade dos fragmentos com a proteína, são esperadas pequenas variações na temperatura de *melting*. Um *hit* normalmente é obtido quando possui uma T_m maior do que as temperaturas de *melting* usadas como referência (temperatura de desnaturação da proteína sem o ligante). Normalmente essa diferença representa temperaturas de *melting* maiores que 0,5 °C ou 1 °C. Porém, há a possibilidade de obtenção de falsos positivos e consequente necessidade de realização de outras técnicas capazes de confirmar as interações (SCOTT et al, 2012).

1.11.2 Espectroscopia por STD-NMR (*Saturation Transfer Difference*)

A técnica STD-NMR, baseada em Ressonância Magnética Nuclear (RMN), também permite a detecção de interação proteína-ligante, inclusive para sua aplicação em

FBDD (PENG et al, 2016). O método consiste na transferência de magnetização via "efeito nuclear de Overhauser" (NOE), responsável pela observação de sinais em um espectro de RMN. Este efeito envolve a transferência de magnetização por relaxação através do processo de difusão de spin entre prótons (H^+). A diferença do efeito NOE consiste na possibilidade da transferência no espaço e não necessita que a difusão ocorra entre átomos conectados. Com isso, a STD-NMR é capaz de identificar a transferência direta de magnetização para hidrogênios dos ligantes ou de grupos químicos de ligantes que estejam próximos da cadeia lateral da proteína, incorporando assim, características da própria macromolécula. Experimentos de STD-NMR são capazes de confirmar interações moleculares de baixa afinidade, com valores de K_d (constante de dissociação) que variam entre 100 nM e 10 mM, ideais para fragmentos, e remetem à troca de estados ligados e livres desses ligantes (YANG et al, 2016).

Em FBDD, é comum através de STD-NMR, a utilização de alguns termos, como grupos farmacóforos ou epítomos (TANOLI et al, 2015; SILVA et al, 2014). Para o caso de STD-NMR aplicado em conjunto com cristalografia de raios X, esses termos são de grande utilidade, pois além de confirmar a interação dos *hits*, revelam grupos químicos essenciais para interação e o modo como estes interagem, possibilitando a construção de um mapa que mostra epítomos interatores com resíduos específicos e novas possibilidades de interações com o alvo (JHOTI et al, 2007).

O resultado de STD-NMR a ser analisado é um espectro 1D de sinais de H^+ magnetizados dos grupos químicos dos ligantes. Para a obtenção desse espectro são necessárias duas fases relacionadas à transferência de energia magnética via efeito NOE, a fase de "*on-resonance*", para a completa e seletiva saturação do alvo (enzima), e a fase "*off-resonance*" (sem a presença de energia eletromagnética), caracterizada pela transferência natural de energia da enzima saturada para grupos químicos do ligante, caso este esteja próximo da cadeia lateral do sítio ativo. A partir da fase "*off-resonance*" obtêm-se o espectro de referência com os sinais de prótons da absorção de energia nos ligantes. O espectro final compreende a diferença entre os espectros relativos "*on*" e "*off-resonance*" e, se ainda forem observados sinais de prótons referentes aos grupos químicos dos ligantes, fica configurada a interação molecular. A STD-NMR merece atenção especial para a presença de falso-positivos e espectros da diferença "*on*" e "*off-resonance*" para fragmentos, que devem ser analisados com cuidado devido à possibilidade de interações inespecíficas (PENG et al, 2016). Para corrigir esse problema, seria ideal realizar STD-NMR em testes de competição com compostos que ligam especificamente. Na falta desses ensaios, é necessária a adequada

normalização dos picos do espectro, cálculo da relação sinal/ruído (valores > 5 são preferíveis), discriminação de sinais de outras moléculas (cofatores de enzimas) e, principalmente, a comprovação das interações através de outras técnicas, como calorimetria e cristalografia de raios X (CALA e KRIMM, 2015).

1.11.3 Calorimetria de Titulação Isotérmica - ITC (*Isothermal Titration Calorimetry*)

Calorimetria de titulação isotérmica (ITC) é uma técnica amplamente empregada na caracterização da interação proteína-ligante. A técnica consiste na titulação direta de uma solução na seringa contendo o ligante através de microinjeções em uma solução na célula contendo a proteína. Isto permite que variações de calor oriundas da reação química provocadas pela interação entre proteína e ligante sejam mensuradas. Essas variações de calor podem ser negativas, para o caso de reações exotérmicas com liberação de calor ou podem ser positivas, no caso de reações endotérmicas com absorção de calor. À medida que são feitas as microinjeções do ligante na solução da proteína, caso haja interação, a variação de calor diminui com o tempo, indicando saturação do sistema, ou seja, uma menor quantidade de proteína fica disponível para a interação com o ligante até que não é mais observada variação de calor (LADBURY et al, 2010).

ITC, além de ser uma técnica capaz de quantificar a estequiometria e a afinidade da interação proteína-ligante pelo valor da constante de dissociação (K_d), também permite a caracterização termodinâmica da reação. Parâmetros termodinâmicos como a energia de interação ΔG (Energia livre de Gibbs), valores de entalpia (ΔH) e valores de entropia ($-T\Delta S$) podem ser obtidos, o que oferece um panorama do balanço dessas forças para a contribuição ou restrição da interação química (EDINK et al, 2011).

Para o caso de FBDD, algumas peculiaridades da técnica devem ser observadas, devido à baixa afinidade dos compostos (K_d entre 100 μM e 10 mM). Há a necessidade do uso de altas concentrações de ligantes e alguns termogramas obtidos de reações de interação com fragmentos apresentam grande calor de diluição, em que a saturação da reação não é atingida eficientemente (**Figura 13**). Outro fator limitante em experimentos de calorimetria aplicado à FBDD é o correto balanço estequiométrico nas reações, observados pelo valor de N . Para o tratamento dos dados de uma curva de titulação para fragmentos é comum fixar esse valor em "1" assumindo-se, portanto, no equilíbrio, um sítio ativo de enzima para a interação (CIULLI, 2013).

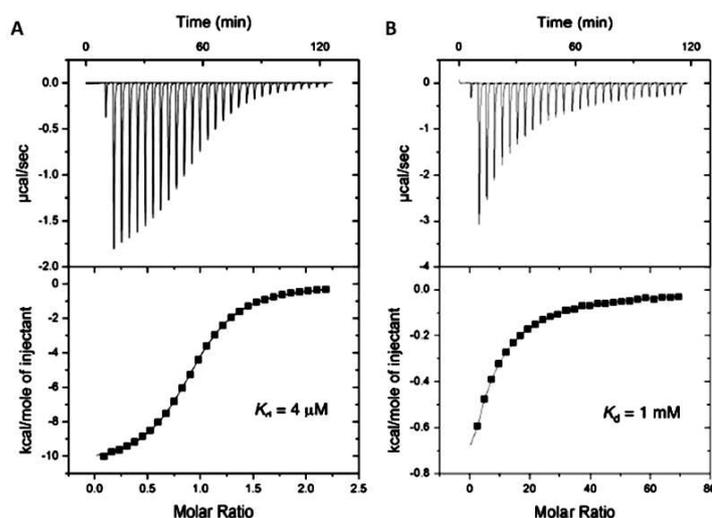


Figura 13. Comparação de termogramas típicos para ensaios de calorimetria entre ligantes com alta e baixa afinidade com o alvo. A parte superior das figuras representa o padrão dos calores de diluição observados em função do tempo em $\mu\text{cal/segundo}$ e a parte inferior representa a variação de entalpia relacionada a cada injeção de ligante em kcal/mol . Curvas com padrão sigmoidal são observadas para interações de maiores afinidades e curvas com padrão de hipérbole são observadas para interações de baixas afinidades, típicas para compostos denominados fragmentos (CIULLI, 2013).

Outro parâmetro que pode ser obtido por calorimetria e muito importante em campanhas FBDD é a eficiência de ligação (LE). LE é obtida através do valor de ΔG dividido pelo número de átomos pesados (diferentes de hidrogênio) dos ligantes. Esse parâmetro se relaciona diretamente com a afinidade e é inversamente proporcional ao peso molecular dos compostos (MURRAY et al, 2014). Aliado com informações cristalográficas do modo de ligação dos fragmentos, a LE é muito útil no processo de otimização química em compostos líderes, pois permite explorar espaços químicos (*hotspots*) do sítio ativo através da união de fragmentos que realizam interações-chave ou oferece novas possibilidades de crescimento dos fragmentos através de novas interações em regiões vizinhas (HUNG et al, 2016). No geral, maiores taxas de sucesso em FBDD são alcançadas quando se mantém constantes os valores de LE na otimização de fragmentos em compostos líderes (MURRAY e REES, 2009). Desta maneira, são obtidas moléculas líderes mais potentes com o menor peso molecular possível (SCHIEBEL et al, 2015).

1.11.4 Cristalografia de Raios X

Cristalografia de raios X é a principal técnica envolvida com a biologia estrutural de projetos envolvendo o desenho de fármacos baseado em estrutura (GEERLOF et al, 2006).

De maneira geral, a técnica consiste em incidir um feixe de raios X sobre o cristal a ser analisado. Esse cristal é formado devido ao modo repetitivo e ordenado adotado pelo alvo (macromolécula) sob condições específicas. O feixe se difunde em várias direções de acordo com a simetria do agrupamento de átomos e, por difração, dá origem a um padrão de intensidades em um detector. Através do princípio da lei de Bragg, este padrão é interpretado de acordo com a distribuição dos átomos no cristal. Ao final do processo é produzida uma imagem tridimensional referente a densidade de elétrons dentro do cristal. A partir desta densidade de elétrons, as posições médias dos átomos e suas ligações químicas no cristal podem ser determinadas (RUPP e WANG, 2004).

Para o desenvolvimento de fármacos é necessária a formação de cristais em ensaios de cocrystalização com compostos químicos ou resistentes a procedimentos de *soaking*. A técnica de cristalização empregada geralmente é a de difusão de vapor. Nessa abordagem mistura-se em uma gota a condição de cristalização e a solução contendo o alvo. A diferença de concentração do poço contendo a condição e a gota formada favorece a perda de água na gota e diminui a solubilidade de seus componentes gradualmente. O crescimento de cristais em solução é caracterizado por uma etapa de nucleação seguida do crescimento dos núcleos formados. As condições de cristalização devem balancear essas duas etapas para favorecer a formação de cristais com maior qualidade de resolução. As várias condições podem usar um ou mais mecanismos físicos para diminuir a solubilidade da molécula, como alteração do pH, temperatura, concentrações de sais ou uso de polímeros grandes, como o polietilenoglicol (CHERNOV, 2003).

2 Objetivo

Este projeto teve como objetivo o desenvolvimento racional de novos inibidores da enzima diidrofolato redutase de *Mycobacterium tuberculosis* (MtDHFR) através do desenho de fármacos baseado em fragmentos (FBDD). O intuito foi de validar e caracterizar a interação de *hits* identificados em triagem prévia contra uma biblioteca de fragmentos. Em colaboração com grupos da área de Química Medicinal, o projeto buscou atingir a etapa iterativa de FBDD. Nesta etapa, síntese química seguida de caracterização das interações têm orientado sobre ganho de potência até que sejam obtidos compostos líderes com potencial a novos fármacos contra a tuberculose.

3 Materiais e Métodos

3.1 Expressão e Purificação da Enzima DHFR de *Mycobacterium tuberculosis* (MtDHFR)

Para a obtenção da enzima MtDHFR, seguiu-se com a expressão e purificação a partir de genes previamente clonados em vetores de expressão pET28a e pET20b pelo Prof. Dr. Marcio V. B. Dias. Construções gênicas em pET28a levaram à obtenção da enzima fusionada a uma cauda de 6xhistidina no N-terminal, enquanto que construções gênicas em pET20b, devido ao processo de clonagem com a adição de *stop códon* no C-terminal do gene, a enzima produzida não continha cauda de histidina. MtDHFR sem cauda de fusão foi utilizada no processo de cristalização, já MtDHFR com cauda 6xhistidina foi utilizada nas outras técnicas biofísicas utilizadas neste trabalho.

Essas construções plasmidiais foram transformadas por choque térmico a 42 °C por 1 minuto em linhagem bacteriana BL21(DE3) e a expressão da proteína recombinante foi realizada em um volume de cultura de 8L, suplementada com o antibiótico canamicina ou ampicilina nas concentrações de 50 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente. As culturas bacterianas foram inoculadas e incubadas a 37 °C sob agitação de 200 rpm. Após D.O. atingir 0,6, a expressão foi induzida por IPTG na concentração de 0,2 mM por 20 h a 18°C, sob agitação de 200 rpm. Após a centrifugação das culturas, os *pellets* das foram lisados por sonicação em tampão A (**Tabela 1**) e os extratos proteicos foram submetidos a uma cromatografia por afinidade (**Tabela 1**) com as enzimas DHFRs eluídas através de um gradiente com tampão de eluição B (**Tabela 1**). Após este processo de purificação, as frações nas quais as enzimas estavam presentes foram recuperadas e concentradas a um volume de 5 ml. Em seguida, para um maior polimento da amostra, as enzimas foram submetidas a uma purificação por gel filtração (coluna 16/60 superdex 200 – GeHealthcare), eluídas com tampão final (**Tabela 1**) e concentradas a uma concentração final de aproximadamente 10 mg/ml, ideal para realização dos ensaios previstos no projeto.

Tabela 1. Purificação da enzima MtDHFR.

Enzima / tag	Afinidade / matriz	Tampão A	Tampão B	Tampão final
MtDHFR 6x His N-ter	Níquel (Ni)	20 mM K ₃ PO ₄ , 50 mM KCl, pH8,0	Tampão A + 0,3 M imidazol	20 mM K ₃ PO ₄ , 50 mM KCl, pH8,0
MtDHFR s/ His	Metotrexato (MTX)	20 mM K ₃ PO ₄ , 50 mM KCl, pH8,0	Tampão A + 2 mM dihidrofolato (DHF)	20 mM K ₃ PO ₄ , 50 mM KCl, pH8,0, glicerol 5%

3.2 SDS-PAGE

Amostra contendo a proteína MtDHFR purificada foi analisada por SDS-PAGE. Um volume de 8 μ L da solução contendo a MtDHFR foi misturada a 2 μ L do tampão de corrida 4x (New England Biolabs) e após ser aquecida a 90 °C, foi aplicada em um gel de poliacrilamida 12 - 15 %. Após o gel ser submetido a uma eletroforese, o mesmo foi corado com uma solução de Coomassie Blue. As bandas do fracionamento em gel foram analisadas através do peso molecular em comparação com o padrão de bandas do marcador de peso molecular (BioRad).

3.3 Preparação de Amostras do Receptor (MtDHFR) e Ligantes (Fragmentos) para Ensaio de STD-NMR (*Saturation Transfer Difference*)

Ligantes testados por STD-NMR foram dissolvidos em DMSO deuterado (DMSO-d₆ / SigmaAldrich) e o NADPH (cofator) em D₂O (SigmaAldrich). Para os experimentos, a mistura contendo a enzima MtDHFR em tampão final (**Tabela 1**), NADPH e ligantes foram diluídos em D₂O a um volume final de amostra de 600 μ L. A concentração final de MtDHFR nas amostras foi de 5 μ M, enquanto que a concentração de NADPH e fragmentos foi de 500 μ M cada.

3.4 Obtenção dos Espectros STD-NMR para a Verificação de Interação Receptor - ligante

Os espectros de RMN foram obtidos num espectrômetro Agilent DD2 de 500 MHz equipado com uma sonda de ressonância tripla (15N / 13C / 1H) a 298 K. O espectro STD foi obtido por subtração de espectros saturados (*on resonance*) dos espectros de referência (*off resonance*) após idênticos processamento e faseamento.

A subtração de espectros saturados dos espectros de referência foi realizada simultaneamente por ciclo de fase usando uma sequência *dpfgse_satxfer* implementada no pacote *biopack* do software VNMRJ (Agilent). Os espectros STD-NMR foram registrados com 8192 varreduras e saturação seletiva de ressonâncias proteicas a -0,5 ppm e 30 ppm para espectro *off resonance* usando uma série de 40 pulsos Gaussianos (50 ms, 1 ms de atraso entre pulsos), para um tempo total de saturação de 2,04s. Os espectros de referência (*off resonance*) foram registrados com 4096 varreduras. A medição das intensidades de picos foi realizada por comparação direta dos espectros STD-NMR e dos espectros de referência (*off resonance*). A fração do efeito STD foi calculado por $(I0-Isat)/I0$, em que $(I0-Isat)$ é a intensidade de pico medida diretamente no espectro STD e $I0$ é a intensidade de pico do espectro de referência não saturado.

3.5 Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)

O ensaio de ITC foi realizado em um instrumento MicroCal VP-ITC 200. Ambas as soluções da célula e seringa continham Tampão A (**Tabela1**), NADPH a uma concentração de 1 mM e DMSO até 5% (v / v). A concentração utilizada de proteína MtDHFR na célula foi de 100 μ M e a concentração dos fragmentos na seringa foi de 2 – 10 mM. Todas as titulações ocorreram a uma temperatura de 20 °C. O mesmo protocolo de titulação foi seguido para todas as repetições: uma injeção de 0,2 μ L seguida de 19 injeções de 2,2 μ L, com um intervalo de injeção (espaçamento) de 300 segundos e uma velocidade de agitação de 300 rpm. Para a análise dos pontos da variação de entalpia em kcal/mol, as curvas foram ajustadas por regressão não linear de mínimos quadrados usando o modelo de um sítio de interação ou o modelo para sítios sequenciais através do programa Origin v.7.0 (MicroCal). Para cálculos dos parâmetros termodinâmicos, a constante de dissociação (K_d) foi obtida pelo cálculo de $1/K_a$, em que K_a é a constante de associação e é calculada pelo programa Origin v.7.0 (MicroCal). O ΔG (Energia Livre de Gibbs) foi extraído pela fórmula $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, em que o ΔH é o valor de entalpia e $-T\Delta S$ representa o valor de entropia. Por fim, a eficiência de ligação (LE) foi obtida pelo cálculo de $\Delta G/n$, em que n representa o número de átomos pesados, ou seja, diferentes de hidrogênio.

3.6 Busca Virtual de Compostos Análogos aos Fragmentos por Catálogo SAR

Foi realizada uma busca virtual de vários compostos com grau de similaridade de até 70% para os fragmentos identificados na triagem por *thermal shift*. A intenção foi que estes compostos apresentassem grupos químicos que poderiam aumentar a afinidade com a

enzima e que fosse possível obtê-los comercialmente. Assim, foi utilizado o programa vROCs da OpenEye que calculou a similaridade 3D desses fragmentos. Esse programa calcula a similaridade entre forma (formato/volume 3D) e características químicas (grupos funcionais/farmacofóricos). Para isso, foram utilizados na busca a base de dados ZINC (IRWIN et al., 2012) com confôrmeros calculados pelo programa OMEGA2, da OpenEye. Após essa busca, foram escolhidos compostos que mantinham características químicas relacionadas com os grupos funcionais presentes em alguns fragmentos identificados por STD-NMR. Em seguida, para obtenção das cargas atômicas, os arquivos obtidos foram salvos no formato *.mol2, selecionando a opção de carga eletrostática para os confôrmeros e, após minimização de energia, esses compostos foram utilizados como ponto de partida para o *docking* no sítio ativo da MtDHFR. Assim, seguiu-se com ensaios de *docking* computacional receptor-ligante para predição dos modos de ligação dos compostos escolhidos. Após o processo de "dockagem", quatro compostos foram escolhidos para teste biofísicos e cristalográficos.

3.7 Cristalização da Enzima MtDHFR

A cristalização de MtDHFR foi realizada por difusão de vapor pelo método de “gota suspensa” na qual 1 μ L da condição de cristalização (1,6 M sulfato de amônio, 100 mM MES pH 6,5, 10 mM cloreto de cobalto) presente no poço da placa foi misturado com 1 μ L da solução contendo a proteína na concentração de 10 mg/mL. A solução contendo a proteína também continha 10 mM de NADPH. A condição foi obtida através de *screens* padronizados e comercializados pela Hampton Research e JENA Bioscience, nos quais foi utilizado o método de *sitting drop* em que 0,3 μ L de solução contendo proteína foram misturadas com 0,3 μ L da condição presente no poço realizado por robô de cristalização Oryx4. Para isso foram utilizadas 5 placas com 96 poços contendo 96 condições de cristalização por placa. Os cristais de MtDHFR na forma apo apareceram após incubação por 24 há 18 °C. Já os cristais de MtDHFR na presença de ligantes apareceram em até 2 meses de incubação nas mesmas condições.

3.8 Cristalização de Complexos MtDHFR:NADPH:Fragmentos através da Técnica de *Soaking* e Cocrystalização

Para obtenção dos complexos da proteína com fragmentos foram utilizados os processos de *soaking* e cocrystalização. Para o *soaking*, cristais de proteína na sua forma apo foram incubados em sua solução original na presença de concentrações de 100 - 200 mM de

compostos. Para a cocristalização, a solução contendo a proteína (10 mg/mL de MtDHFR + 10 mM de NADPH) foi incubada com uma solução de 15 a 40 mM dos compostos por 15 minutos e foi utilizada para a cristalização.

3.9 Coleta e Processamento de Dados de Difração por Raios X

A coleta de dados de difração por raios X foi realizada no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS/CNPEM). Antes da coleta, os cristais foram mergulhados em uma solução crioprotetora contendo a condição de cristalização e 30 % de glicerol. A estratégia adotada na coleta das 1800 imagens dos padrões de difração foi de 0,2° por imagem, com tempo de exposição ao feixe de 0,5 segundos em um total de 360° do cristal difratado. O processamento dos dados foi realizado pelo programa XDS (KABSCH, 2010) e o corte de resolução ocorreu de acordo com os valores do I/σ na última camada. Os dados, para esse limite de resolução, foram escalonados no programa Aimless (EVANS, 2011), presente no pacote de programas do CCP4 (BAILEY, 1994).

3.10 Resolução de Estruturas e Refinamento Cristalográfico

As estruturas cristalográficas foram resolvidas pelo método de substituição molecular através do programa Phaser MR (McCOY et al, 2007), presente no pacote de programas do programa Phenix (ADAMS et al., 2010). O modelo utilizado foi o de código 1DG8 (LI et al, 2000) do PDB.

O refinamento cristalográfico das estruturas foi efetuado no programa Phenix.Refine (AFONINE et al, 2012). A inspeção e a construção dos modelos foram efetuados pelo programa COOT (EMESLEY e COWTAN, 2004) utilizando mapas de densidade eletrônica $2F_o - F_c$, e *omit map* contornados a 1.0 e 1,6 sigma, respectivamente.

3.11 Análise do Refinamento das Estruturas

A análise do refinamento cristalográfico foi realizada pelo acompanhamento dos valores de R_{factor} e R_{free} , calculado pelo programa Phenix.Refine (AFONINE et al, 2012). Esses fatores são índices de concordância entre os dados de difração de raios-X e o modelo que está sendo construído. Normalmente, são esperados valores de R_{factor} menores que 20% e R_{free} menores que 30%, para o modelo final da estrutura. Além disso, durante o refinamento cristalográfico foram inspecionados os valores de B_{factor} (análise do fator temperatura dos átomos da proteína) principalmente para águas e ligantes, em que foram somente aceitas águas ou ligantes com um valor igual ou inferior de 60 \AA^2 . Também foram inspecionados os

valores de rotâmeros e o gráfico de Ramachandran. A qualidade estereoquímica dos modelos finais foi validada pelo programa MolProbity (CHEN et al, 2010).

3.12 Análise das Estruturas Cristalográficas

As estruturas cristalográficas finais foram analisadas e visualizadas no programa COOT (EMESLEY, COWTAN, 2004). O valor de corte de 3,2 Å, para as distâncias das interações polares (interação de hidrogênio e interação eletrostática) foram calculadas pelo programa LIGPLOT (WALLACE, LASKOWSKI e THORNTON, 1995). As análises de superposição entre estruturas foram realizadas pelo programa COOT (EMESLEY, COWTAN, 2004). A análise e produção de figuras de elementos de estrutura secundária, de interações no sítio ativo, dos mapas de densidade eletrônica e de superfície eletrostática foram geradas no programa PyMOL (DeLANO, 2002).

4 Resultados e Discussão

4.1 Resultados Preliminares ao Projeto: Aplicação de FBDD à Enzima MtDHFR

A aplicabilidade de FBDD para a enzima DHFR de *M. tuberculosis* foi previamente testada e teve início em colaboração com a Universidade de Cambridge (Reino Unido) pelo aluno Petros Tyrakis e Pós-Doutor Marcio V. B. Dias. Como descrito a seguir, o processo de triagem contra uma biblioteca de fragmentos favoreceu a obtenção de alguns potenciais candidatos interatores (*hits*). Além disso, para dois desses fragmentos foi possível a verificação da interação através de ensaios de calorimetria e, no caso de um deles, foi obtido o modo de ligação através de estrutura cristalográfica resolvida. Já no Brasil, nas dependências do Laboratório Nacional de Biociências (LnBio/CNPEM/Campinas-SP), ensaios baseados em Ressonância Magnética Nuclear (STD-NMR) confirmaram a interação desses dois fragmentos com MtDHFR. Com isso, esses resultados deram fundamento à aplicabilidade de FBDD para esse alvo e serviram como base para a confirmação e caracterização da interação de vários outros *hits* obtidos na triagem que será discutido neste trabalho.

Na triagem contra a biblioteca de fragmentos através de ensaio de desenovelamento térmico (*thermal shift*), a concentração experimental ótima de MtDHFR para a obtenção de um sinal adequado foi 30 μM . A T_m média de MtDHFR observada neste experimento foi de 52,8 °C. Todos os ensaios foram conduzidos na presença do cofator NADPH a uma concentração de 1 mM por poço, uma vez que foi estabelecido que a ocupação do local de ligação de NADPH permitiria a identificação de fragmentos capazes de interagir com a região de ligação do DHF.

A biblioteca de fragmentos utilizada foi construída através da chamada "Regra dos Três" (Congreve et al, 2003) e consistiu de 1250 compostos dispostos em placas de 96 poços. Foram incluídos múltiplos controles positivos (5% (v / v) de DMSO, 1 mM de NADPH e 5 mM de TMP) e negativos (5% (v / v) DMSO e 1 mM NADPH) para cada placa utilizada na triagem. Ao final do processo de triagem, foram coletadas 105 observações de T_m de MtDHFR dos controles negativos. Assim, seguiu-se com a validação dessas temperaturas através de um modelo estatístico para descrever a T_m desses controles. Para testar se esses dados estavam adequados a uma distribuição normal de valores de T_m , foram realizados dois testes estatísticos (teste de Kolmogorov-Smirnov e teste Qui-Quadrado). Ambos os testes sugeriram que esses dados estavam normalmente distribuídos, com uma T_m média de 53,16 °C e um desvio padrão (σ) de 0,7 °C, até um nível de significância de $\alpha = 0,01$. Usando essa informação, foi construído um intervalo de confiança de 99%, ou seja, uma variação de temperaturas (52.98 °C - 53.34 °C) dentro das quais a T_m média dos controles negativos

esteve em 99% das vezes. Os *hits* positivos foram então definidos como fragmentos que deram um ΔT_m de $\geq 1,0$ °C acima de 53,34 °C (temperatura limite do intervalo de confiança encontrado). No geral, esta análise produziu 42 resultados positivos estatisticamente significativos (3,2% da biblioteca) e alguns dos quais a diversidade química está ilustrada na **Figura 14B**. Os grupos químicos mais comuns entre os *hits* são retratadas na **Figura 14C** e a presença de dois anéis aromáticos ligados foi muito comum, assim como fragmentos contendo um ácido benzoico.

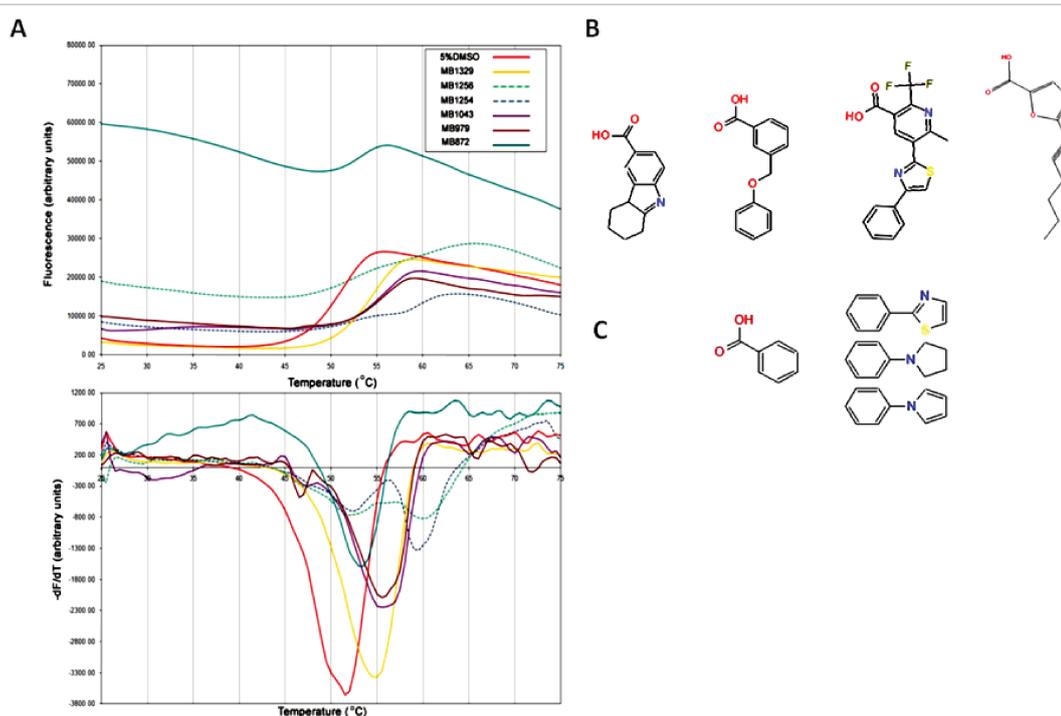


Figura 14. Triagem da enzima MtdHFR contra uma biblioteca de fragmentos. **A)** Ensaio de desenovelamento térmico (*thermal shift*). Parte inferior representa a primeira derivada negativa das curvas de desenovelamento (*melting*) de MtdHFR da parte superior para os fragmentos da biblioteca que tiveram os maiores valores de ΔT_m . **B)** Estrutura química de quatro fragmentos com valores significativos de ΔT_m . **C)** Grupos químicos presentes em muitos dos *hits* identificados na triagem realizada por Petros Tyrakis e Marcio Dias.

A **Figura 14A** mostra os perfis das curvas de desenovelamento dos compostos com ΔT_m mais significativos e quatro deles são representados na **Figura 14B**. Notavelmente, os compostos MB1254 e MB1256 deram um ΔT_m de mais de 8 °C. Porém, suas curvas de desenovelamento (linhas tracejadas) possuem perfis bifásicos sugerindo que MtdHFR pode sofrer dois eventos de desenovelamento que são separados por um evento de reenovelamento na presença desses compostos.

Para um maior refinamento do processo de triagem contra a biblioteca de fragmentos descrita, foram realizadas duas repetições do experimento somente para os 42 *hits* obtidos e apenas os compostos que deram valores ΔT_m consistentes (38 *hits*) em ambas as réplicas (dados não mostrados) foram transferidos para ensaios de calorimetria através de ITC e de cristalização.

Nestes resultados preliminares, somente dois compostos (MB1329 (**Fragmento1**) e MB872 (**Fragmento2**) foram caracterizados termodinamicamente contra a MtDHFR e seus termogramas são apresentados na **Figura 15**.

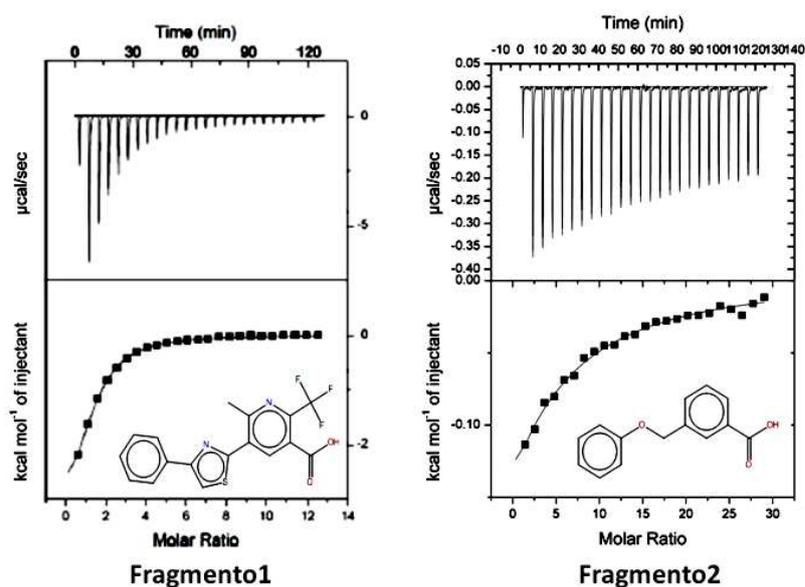


Figura 15. Ensaio de calorimetria para dois fragmentos identificados como *hits*. São ilustrados os termogramas das titulações dos **Fragmentos1** e **2** presentes na seringa com MtDHFR presente na célula em ensaios de calorimetria. Parte superior das figuras representa o padrão dos calores de diluição observados em função do tempo em $\mu\text{cal/segundo}$ e parte inferior representa a variação de entalpia relacionada a cada injeção de ligante em kcal/mol . Figuras construídas através do programa Origin v.7.0 (MicroCal) (Petros Tyrakis e Marcio Dias).

De acordo com esses resultados, os fragmentos MB1329 (**Fragmento1**) e MB872 (**Fragmento2**) apresentaram curvas obtidas de termogramas esperadas para fragmentos e, além disso, tiveram afinidades (K_d) de aproximadamente $100 \mu\text{M}$ e $500 \mu\text{M}$, respectivamente. Esses resultados de afinidade e de parâmetros termodinâmicos da interação para esses dois fragmentos serão discutidos posteriormente juntamente com os resultados de calorimetria obtidos para outros *hits* apresentados neste trabalho.

Devido a importância de informações do modo de interação, através de estruturas tridimensionais resolvidas de complexos enzima:fragmentos em campanhas FBDD, era necessário a obtenção deste tipo de informação para o seguimento do projeto. Assim, estrutura cristalográfica de MtDHFR em complexo com o fragmento MB1329 (**Fragmento1**) foi resolvida (**Figura 16**).

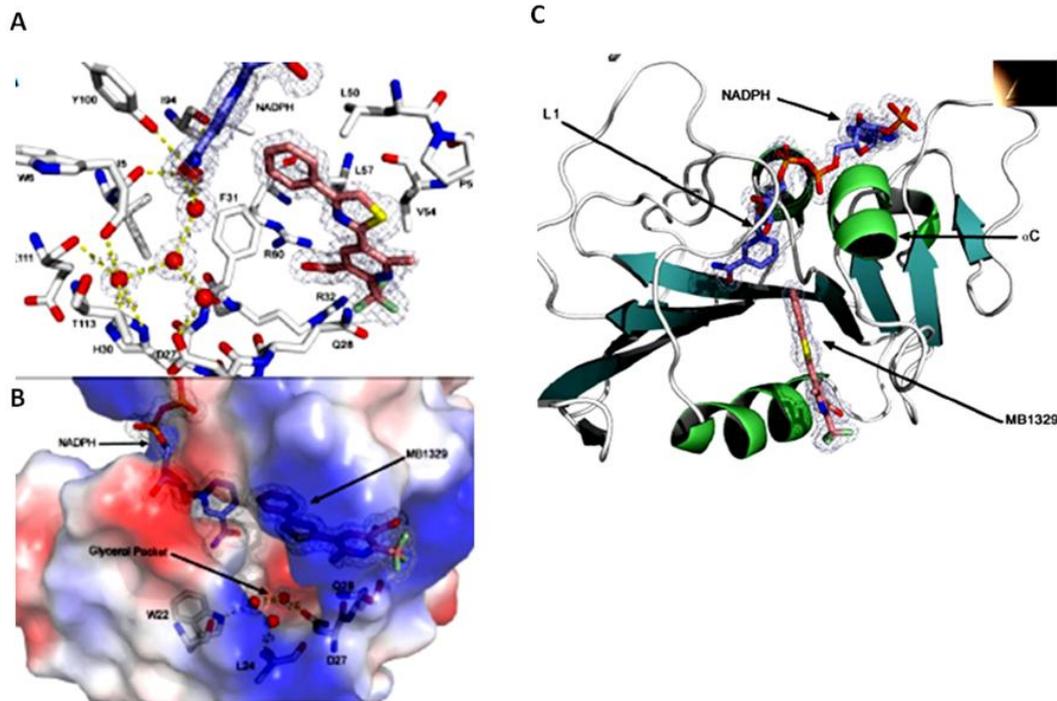


Figura 16. Modo de ligação do Fragmento1 com sítio ativo de MtDHFR. **A)** Interações moleculares realizada pelo **Fragmento1** com o sítio ativo de MtDHFR. São destacados os principais resíduos de aminoácidos. **B)** É representado o modo de ligação do **Fragmento1** com o sítio ativo de MtDHFR. É ilustrado o potencial eletrostático estimado (vermelho: negativo; azul: positivo; branco: neutro). É destacado o bolsão de glicerol. São representados o NADPH e o **Fragmento1** com seus mapas de densidade eletrônica $2F_o - F_c$ contornados a 1σ . **C)** Enovelamento de estrutura terciária do tipo *Rossmann fold* e divisão de MtDHFR em seus subdomínios de alças e de ligação de adenosina. A alça L1 é indicada pela seta. São representados o NADPH e o **Fragmento1** com seus mapas de densidade eletrônica $2F_o - F_c$ contornados a 1σ . **Fragmento1** é ilustrado na cor rosa. Imagens geradas no PyMOL (Petros Tyrakis e Marcio Dias).

De acordo com a **Figura 16**, o fragmento MB1329 se liga na posição de interação do motivo *pABA* do DHF. Este fragmento, através de seu grupo carboxila realiza uma interação iônica com a arginina 60 e também são verificadas interações hidrofóbicas principalmente pela proximidade do anel aromático do fragmento com a fenilalanina 31.

Também foi testada inicialmente ao projeto, uma técnica que confirmasse interações proteína-ligante, principalmente a ser utilizada como primeiro controle de qualidade dos *hits* a serem caracterizados em nossa estratégia de FBDD. Devido à rapidez e a sensibilidade adequada para identificação deste tipo de interatores, a técnica escolhida foi STD-NMR. Assim, inicialmente foram submetidos a esse ensaio, os fragmentos MB1329 (**Fragmento1**) e MB872 (**Fragmento2**) e seus respectivos espectros 1D de sinais de hidrogênios são ilustrados na **Figura 17**.

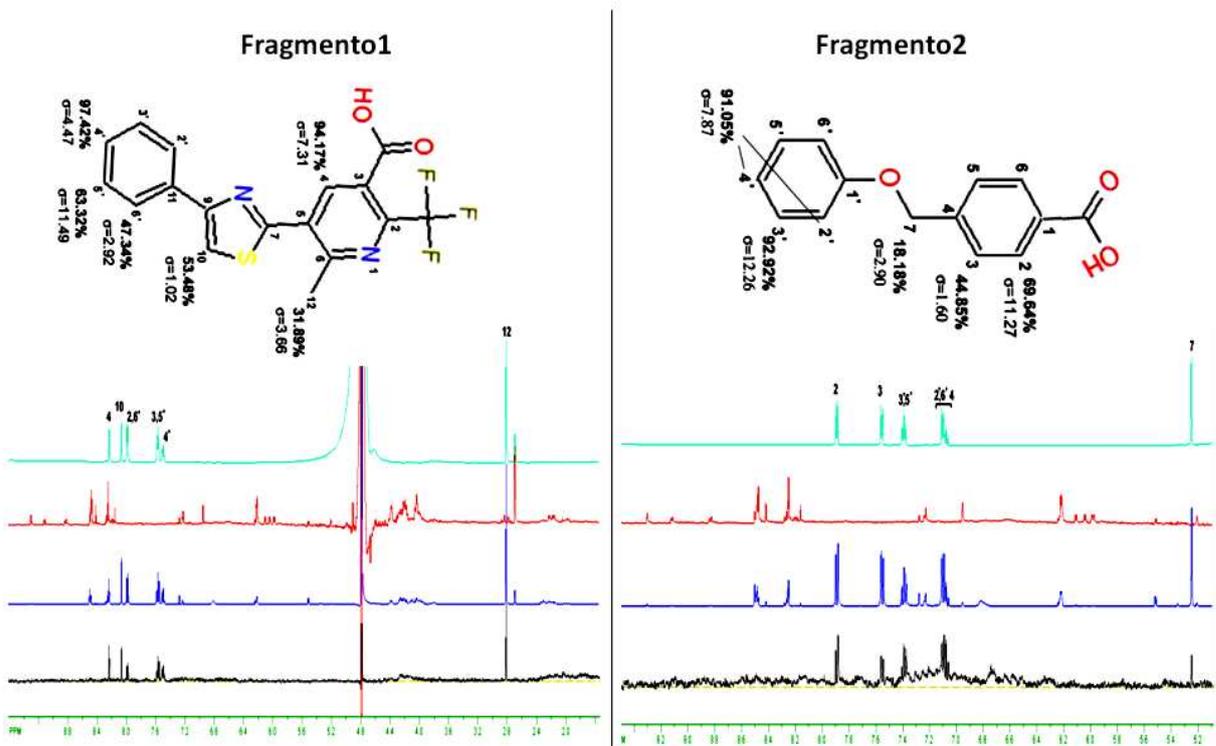


Figura 17. Espectroscopia por STD-NMR confirma a interação do Fragmento1 e 2 com MtDHFR. Em azul claro é representado o espectro controle (*on resonance*) de amostra contendo somente 500 μM dos ligantes. Em vermelho é representado o espectro controle (*on resonance*) de amostra contendo somente 500 μM de NADPH. Em azul é representado o espectro de referência (*off resonance*) de amostra contendo 500 μM de NADPH, 500 μM dos ligantes e 5 μM da enzima MtDHFR. Em preto é representado o espectro STD-NMR (diferença *on* e *off resonance*) de amostra contendo as mesmas concentrações de NADPH, dos ligantes e da enzima MtDHFR. Graus relativos de saturação de hidrogênios individuais são mapeados nas estruturas químicas dos compostos e medidos em porcentagem (João Augusto Ribeiro e Maurício Sforça).

De acordo com os espectros, foi possível a detecção de sinais de prótons no espectro da diferença "*on* e *off resonance*" e consequente a confirmação das interações de ambos os fragmentos testados. Cabe lembrar que foram discriminados sobreposições de sinais do NADPH utilizado nos experimentos controle. Portanto, além de STD-NMR mostrar-se um

método eficaz na confirmação de interatores, evidenciou grupos químicos presentes na estrutura química dos fragmentos que são relevantes para a interação. Por essa análise, há indícios de que as regiões do ácido benzoico e do anel aromático do **Fragmento1** e **2** são essenciais para a interação com a MtDHFR.

De posse desses resultados, pôde-se observar que a enzima MtDHFR responde de forma satisfatória a ampla gama de experimentos necessária para a caracterização da interação de fragmentos em FBDD. Com essa base experimental, uma margem de segurança foi desenvolvida na expectativa da otimização química dos *hits* de fragmentos em colaboração com grupos especialistas na área de Química Medicinal.

4.2 Expressão e Purificação da Enzima Diidrofolato Redutase de *M. tuberculosis* (MtDHFR)

Para a aplicação da técnica de desenho de fármacos baseado em fragmentos (FBDD), inicialmente foi necessário a obtenção da enzima MtDHFR pura e em grande quantidade, devido a ampla gama de experimentos a serem realizados para a validação da interação proteína-ligante dos *hits* previamente identificados. Assim, foram utilizadas duas fontes diferentes para a obtenção desta enzima, relacionadas com as construções plasmidiais em que foram clonados os genes codificantes da MtDHFR (*dfrA*). Essas construções plasmidiais foram realizadas previamente na Universidade de Cambridge pelo Prof. Dr. Marcio V. B. Dias e consistiram na subclonagem do gene *dfrA* nos vetores de expressão pET28a e pET20b. A partir destes clones, a expressão proteica em larga escala foi realizada em sistema bacteriano (linhagem BL21(DE3)) e a proteína MtDHFR foi obtida na fração solúvel do extrato bacteriano para ambos os sistemas de expressão.

Após expressão proteica, seguiu-se com a purificação da proteína recombinante através de duas etapas cromatográficas, sendo a primeira através de cromatografia de afinidade e a segunda por cromatografia de exclusão molecular por gel filtração. Para a cromatografia de afinidade, níquel e metotrexato foram usados como matrizes para o fracionamento de extrato bacteriano de acordo com sistema de expressão em pET28a (**Figura 18A**) e em pET20b (**Figura 18B**), respectivamente. Após a cromatografia de afinidade, para polimento final da amostra e retirada dos eluentes (imidazol e DHF), as proteínas MtDHFRs foram submetidas a purificação por gel filtração e análise SDS-PAGE do fracionamento em gel de poliácridamida 15% das proteínas eluídas é mostrada na **Figura 18C**.

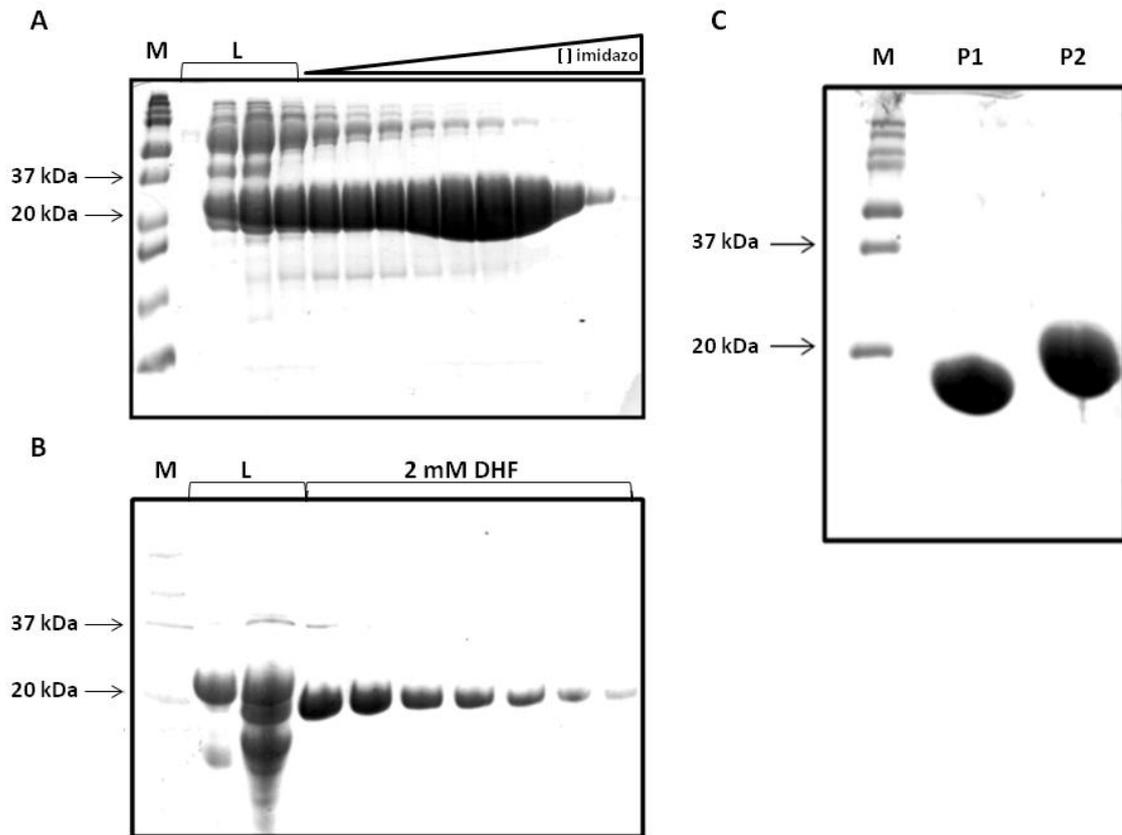


Figura 18. Purificação da enzima MtDHFR. A) Gel SDS-APAGE 12 % corado com Coomassie blue contendo amostras obtidas de expressão heteróloga em sistema bacteriano pET28a seguida de cromatografia de afinidade ao níquel. Amostras contendo a proteína foram eluídas com gradiente de concentração de imidazol. B) Gel SDS-APAGE 15 % corado com Coomassie blue contendo amostras obtidas de expressão heteróloga em sistema bacteriano pET20b seguida de cromatografia de afinidade ao metotrexato. Amostras contendo a proteína foram eluídas com 2 mM de DHF. C) Gel SDS-APAGE 15 % corado com Coomassie blue contendo amostras de solução contendo a MtDHFR após gel filtração. L: Lavagens em tampão A + 5 % tampão B; P1: MtDHFR sem cauda 6x histidina; P2: MtDHFR com cauda 6x histidina; M: marcador de peso molecular (Biorad).

De acordo com a **Figura 18**, nota-se êxito na obtenção da enzima MtDHFR pura e o rendimento final em massa, para o sistema de expressão em pET28a foi 30 mg e para pET20b foi de aproximadamente 10 mg. É possível observar também uma diferença na migração das amostras no gel (**Figura 18C**) e isso diferencia a proteína fusionada com a cauda de 6x histidina (~20 kDa) da proteína não fusionada com peso molecular de 17 kDa. O motivo para a obtenção de MtDHFR sem cauda ocorreu pela necessidade dessa característica para os experimentos de cristalização de acordo com condição de cristalização identificada neste projeto. Devido falhas com a reprodutibilidade de condições de cristalização

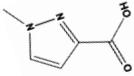
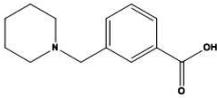
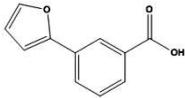
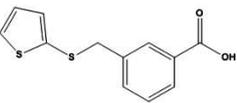
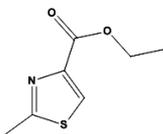
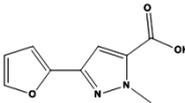
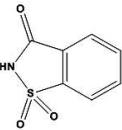
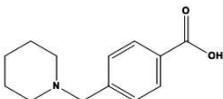
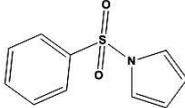
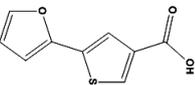
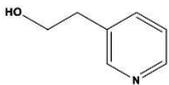
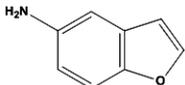
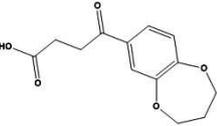
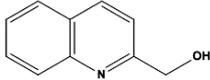
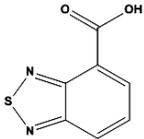
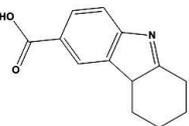
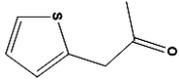
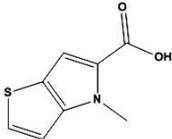
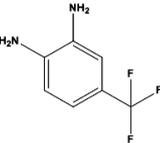
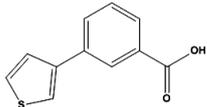
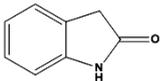
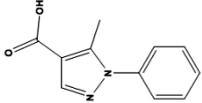
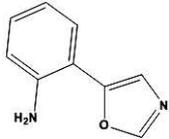
previamente reportadas na literatura, triagens de novas condições foram requeridas. Somente foram observados cristais promissores na condição descrita no tópico 3.6 de materiais e métodos e quando é utilizada no experimento a proteína sem cauda. Assim, a proteína MtDHFR contendo cauda de 6x histidina em sua porção N-terminal foi utilizada para os demais ensaios biofísicos, devido ao seu custo mais baixo de produção, bem como por ter um protocolo de execução mais rápido.

4.3 Validação da Interação de *Hits* de Fragmentos com a Enzima MtDHFR por STD-NMR (*Saturation Transfer Difference*)

De posse da enzima MtDHFR purificada, esta primeiramente foi utilizada para a confirmação da interação de alguns *hits* identificados na triagem contra uma biblioteca de fragmentos. Como discutido anteriormente, STD-NMR é um método rápido e amplamente usado para detecção de interação proteína-ligante na faixa de afinidade de 100 μM – 10 mM, ideal para as afinidades esperadas para fragmentos. Neste projeto, a estratégia foi a utilização desta técnica como filtro para os *hits* identificados da triagem, devido ao cuidado com falsos positivos exigido em FBDD. Portanto, ficou estabelecido que somente os fragmentos confirmados como interatores por STD-NMR seriam transferidos para ensaios de cristalografia de raios X e calorimetria.

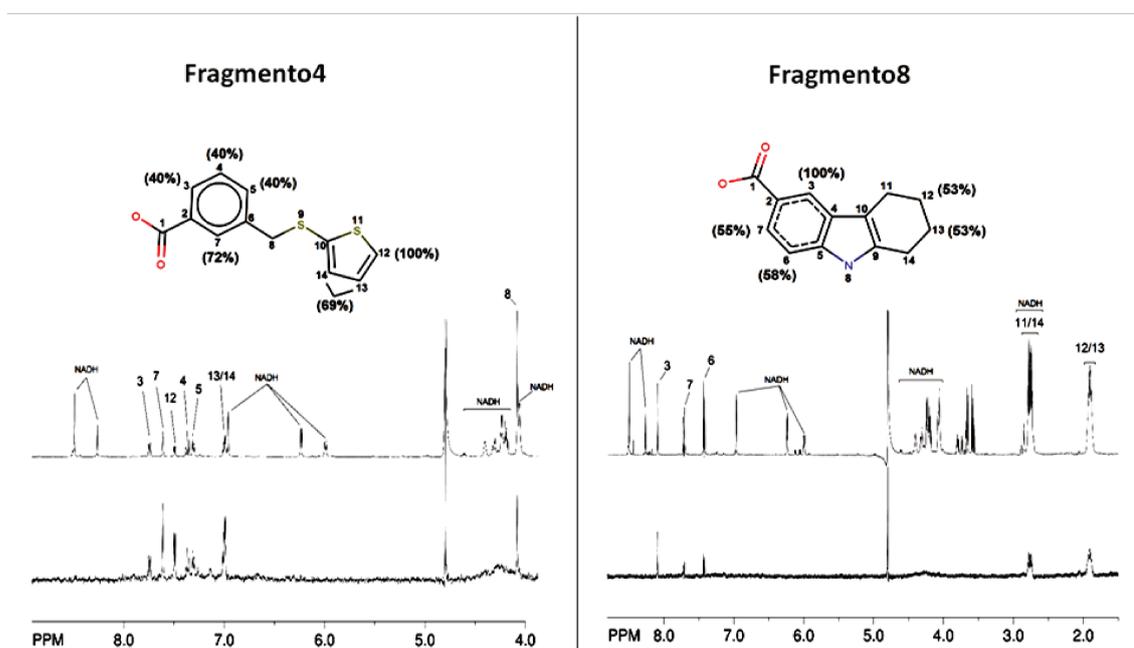
Devido ao alto custo para a obtenção comercial de todos os 38 *hits*, somente alguns deles foram selecionados para serem testados. Para essa seleção, levaram-se em consideração os valores de ΔT_m obtidos na triagem, a diversidade química, o preço e a disponibilidade para a entrega. Assim, as estruturas químicas dos fragmentos utilizados nos experimentos de STD-NMR são representadas na **Tabela 2**. Além disso, esses *hits* foram renomeados e enumerados para simplificação na apresentação dos resultados. Não estão incluídos nesta lista os dois fragmentos que tiveram interações previamente confirmadas por STD-NMR apresentados nos resultados preliminares deste trabalho. Entretanto esses resultados foram utilizados para as discussões e comparações.

Tabela 2. Estruturas químicas dos fragmentos identificados como *hits* em triagem contra uma biblioteca de fragmentos e testados por STD-NMR. Fragmentos que foram positivos na interação com MtDHFer por STD-NMR são destacados em verde.

Fragmento3		Fragmento11		Fragmento19	
Fragmento4		Fragmento12		Fragmento20	
Fragmento5		Fragmento13		Fragmento21	
Fragmento6		Fragmento14		Fragmento22	
Fragmento7		Fragmento15		Fragmento23	
Fragmento8		Fragmento16		Fragmento24	
Fragmento9		Fragmento17		Fragmento25	
Fragmento10		Fragmento18			

A seguir, são apresentados os espectros 1D de sinais de prótons (H^+) dos fragmentos que tiveram as interações confirmadas com MtDHFR. Cabe lembrar que STD-NMR não somente identifica a interação proteína-ligante, mas também revela grupos funcionais relevantes dos compostos para essa interação. Isso ocorre devido à capacidade desses grupos, pela proximidade com a cadeia lateral do sítio ativo da enzima, incorporarem mais energia da macromolécula. Além disso, os espectros 1D de controles de soluções contendo somente o fragmento e soluções da proteína na presença de seu cofator (NADPH) foram obtidos para discriminação de sinais. Porém, na sequência de resultados apresentados a seguir, esses espectros foram retirados para melhor visualização. Assim, somente espectros de referência (*off resonance*) e espectros STD-NMR (diferença entre espectros *on* e *off resonance*) são representados e os *hits* de fragmentos são confirmados como interatores pela presença de sinais de prótons nos espectros da diferença STD-NMR (**Figuras 19, 20 e 21**).

Como controle de qualidade para os experimentos, após normalização dos sinais, os valores para a relação sinal/ruído foram calculados e todos os espectros mostrados abaixo apresentaram esse valor igual ou maior que 5, indicando maior confiabilidade nos ensaios. Além disso, foi atribuído aos H^+ com os sinais mais intensos do efeito STD o valor de 100%. Estes foram utilizados como referência para o cálculo da porcentagem da intensidade dos sinais dos demais átomos de H^+ dos ligantes.



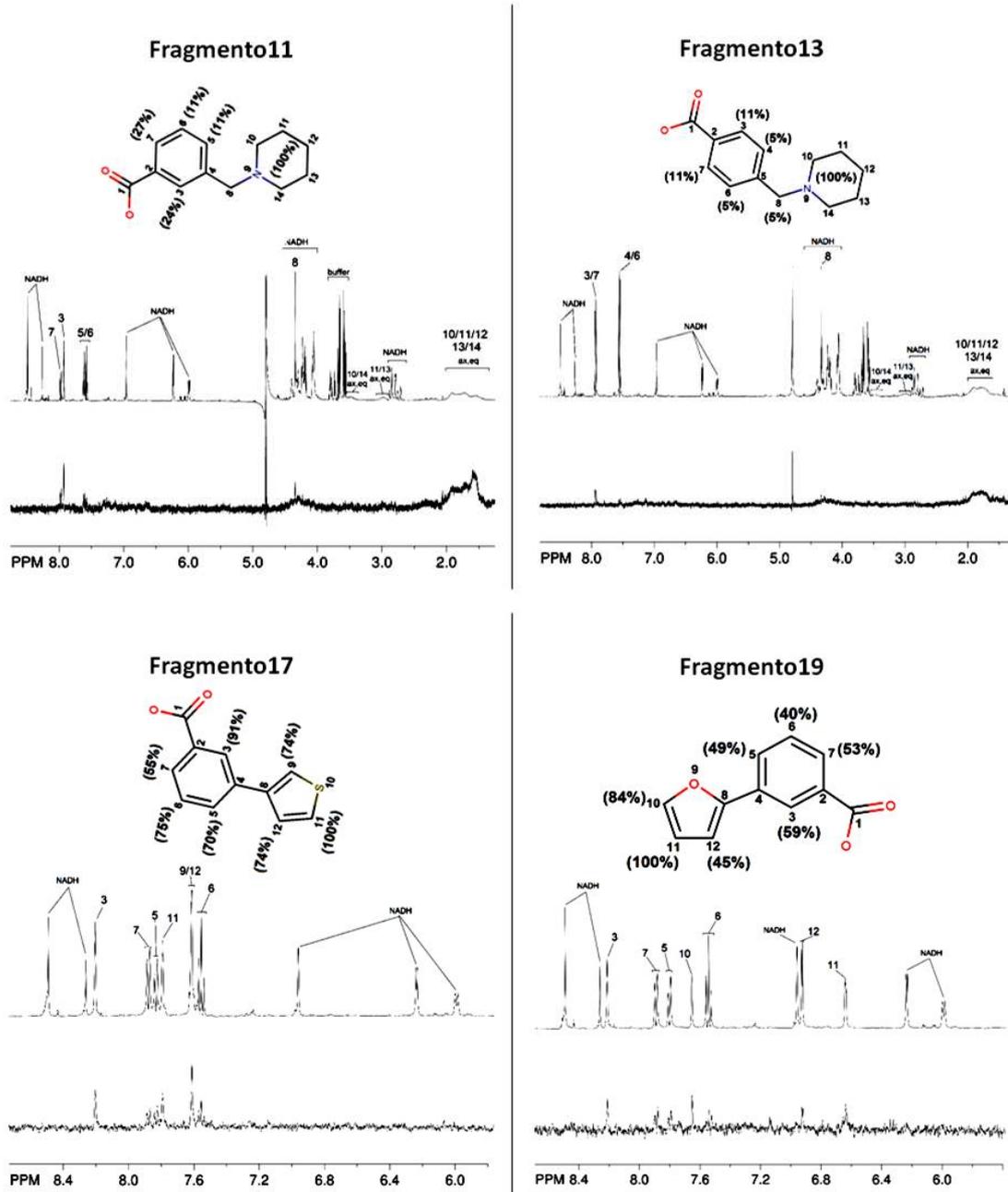


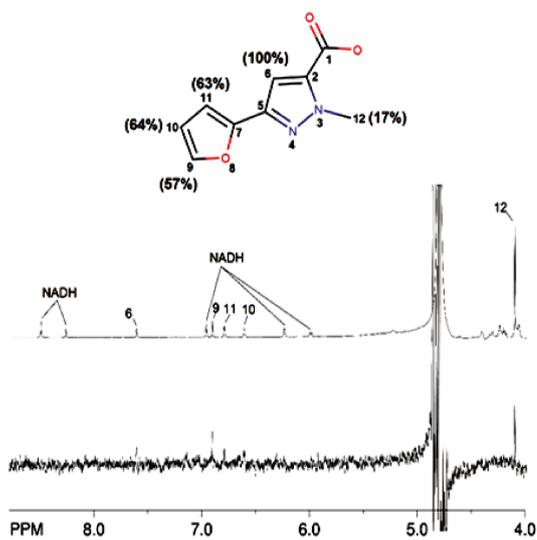
Figura 19. STD-NMR confirma a relevância do ácido benzoico nas estruturas químicas dos fragmentos para a interação com MtDHF. Na parte superior são representados os espectros de referência (*off resonance*) e na parte inferior são representados os espectros STD-NMR (diferença entre espectros *off resonance* e *on resonance*). Graus relativos de saturação de hidrogênios individuais são mapeados nas estruturas químicas dos compostos e medidos em porcentagem (João A. Ribeiro e Maurício Sforça).

De acordo com os espectros STD-NMR apresentados acima, as interações com MtDHF para esse grupo de fragmentos foram confirmadas e sinais de prótons (H^+) dos mesmos foram facilmente assimilados e discriminados dos sinais referentes à molécula de NADPH. Uma característica comum observada para este grupo de fragmentos é a presença de

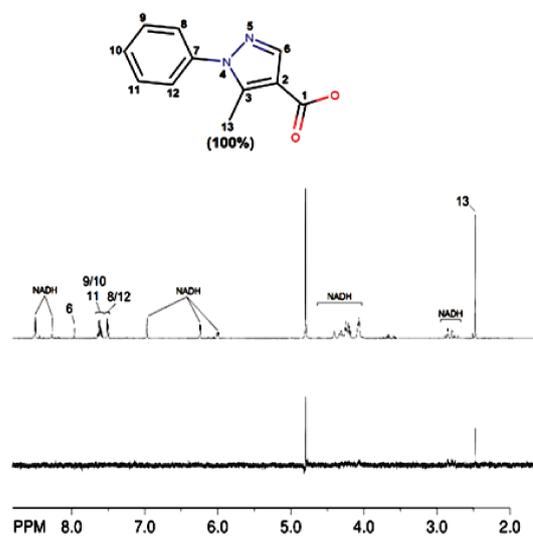
um ácido benzoico que se revela como um grupo químico relevante para a interação com MtDHFR. Além disso, este resultado está em acordo com os obtidos na triagem, na qual foram obtidos diversos *hits*, nos quais esse grupo estava presente. Também foi observado que a maioria dos compostos desse grupo, com exceção ao **Fragmento8**, compartilha a presença do ácido benzoico interligado a algum anel heterocíclico. Esse anel pode ser aromático, para o caso de grupos como o furano (**Fragmento19**) e o tiofeno (**Fragmento4** e **Fragmento17**), ou não aromático para o caso do grupo piperidina, que é uma amina heterocíclica, presente no **Fragmento11** e no **Fragmento13**. Estes dois fragmentos (**11** e **13**) são muito similares, diferindo somente na posição ("*meta*" ou "*para*") que o grupo carboxila adota no anel benzeno. Esta posição, de acordo com os espectros STD-NMR, parece favorecer a posição "*meta*" na interação, já que são observados sinais de prótons mais intensos para a região do ácido benzoico do **Fragmento11**. Cabe destacar, que para os **Fragmentos4, 17 e 19**, a carboxila também se encontra na posição *meta*. Assim, essa posição poderia favorecer a aproximação desse grupo a um resíduo com carga positiva, como observado na estrutura cristalográfica para o complexo MtDHFR:NADPH:**Fragmento1**, descrito nos resultados preliminares, na qual é possível observar o grupo carboxila deste fragmento realizando uma interação iônica com Arg60 e mimetizando a posição de um dos ácidos carboxílicos do glutamato da molécula de DHF.

O próximo conjunto de espectros 1D de H⁺ apresentados na **Figura 20** também remete a importância da presença do grupo carboxila para a interação, já que são observados sinais de prótons dos hidrogênios dos átomos de carbonos vizinhos. A diferença desse grupo de fragmentos para o anterior se dá na falta do ácido benzoico e a carboxila agora aparece em grupos heterocíclicos aromáticos, como o pirazol (**Fragmento20** e **Fragmento10**) e o tiofeno (**Fragmento6**).

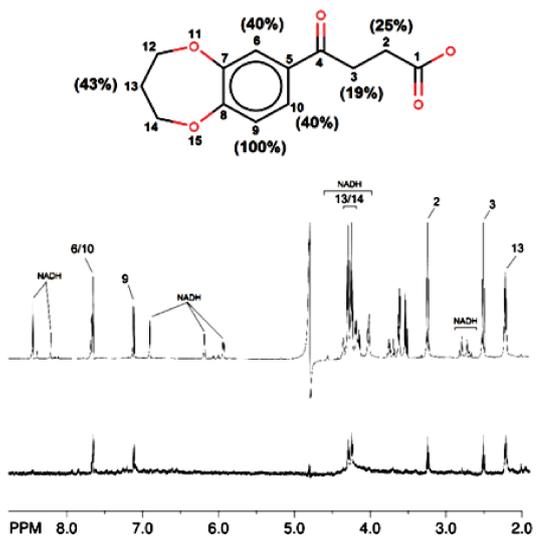
Fragmento20



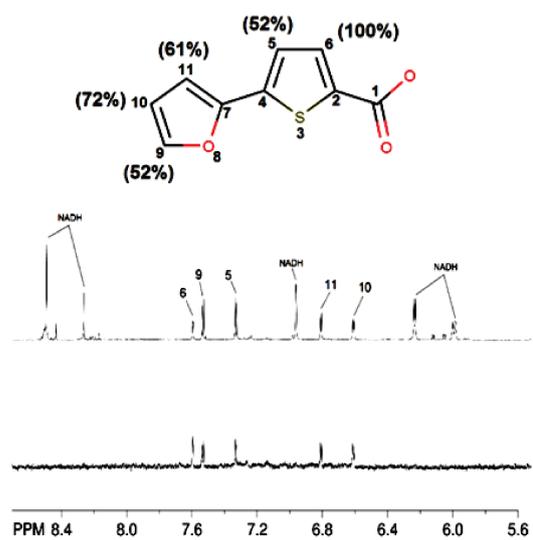
Fragmento10



Fragmento7



Fragmento6



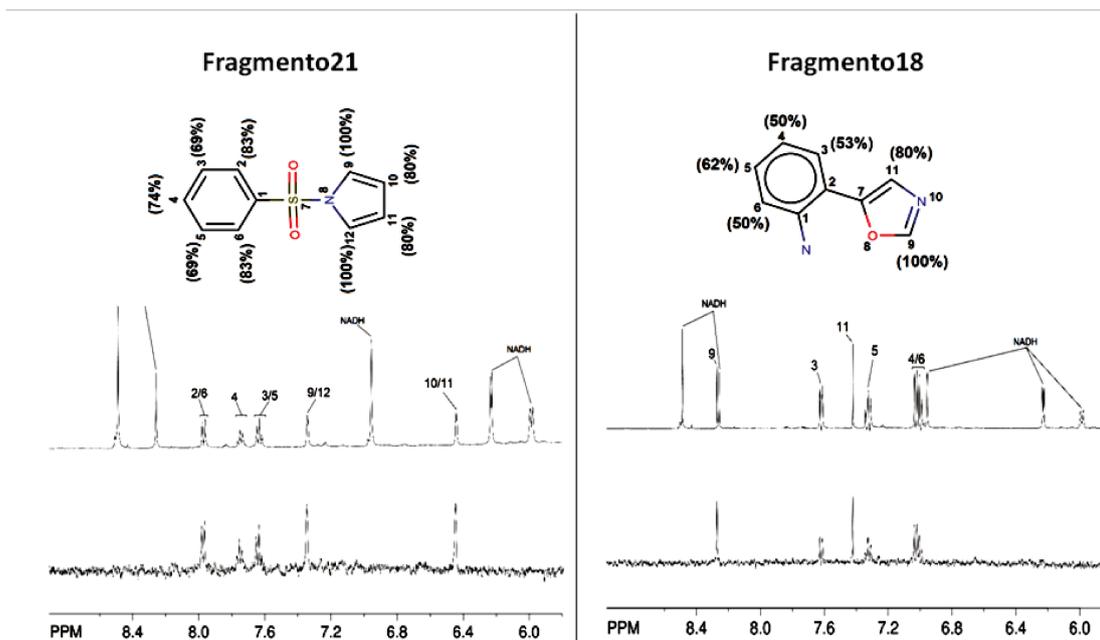


Figura 20. STD-NMR confirma a relevância do grupo carboxila e anéis aromáticos interligados nas estruturas químicas dos fragmentos para a interação com MtDHFR. Na parte superior são representados os espectros de referência (*off resonance*) e na parte inferior são representados os espectros STD-NMR (diferença entre espectros *off resonance* e *on resonance*). Graus relativos de saturação de hidrogênios individuais são mapeados nas estruturas químicas dos compostos e medidos em porcentagem (João A. Ribeiro e Maurício Sforça).

Os espectros que confirmam a interação para esses fragmentos novamente reforçam a presença de *scaffolds* que apresentam anéis interligados. Neste grupo todos esses anéis são aromáticos (benzênicos ou heterocíclicos) e mostram-se relevantes para a interação. Além do tiofeno e o furano presentes no **Fragmento20** e **Fragmento6**, abundantes nas estruturas dos *hits* confirmados, diferentes anéis interligados com o benzeno são observados. Estes anéis são representados pelo pirazol (**Fragmento10**), pelo oxazol (**Fragmento18**) e pelo pirrol (**Fragmento21**), que neste caso se liga ao benzeno por um grupo sulfonamida. Somente um fragmento deste grupo não segue as características citadas, ou seja, não possui um grupo carboxila ligado a um anel e não é formado por dois anéis interligados. Este é representado pelo **Fragmento7**, em que a interação com a enzima parece ser dirigida por sua extremidade carboxila e por sua região hidrofóbica através do anel benzeno. O mesmo é fusionado a um grupo heterocíclico não aromático, cujos sinais sobrepuseram os sinais do NADPH, dificultando a caracterização.

Por fim, os últimos espectros 1D de H^+ das confirmações das interações de *hits* são apresentados na **Figura 21**.

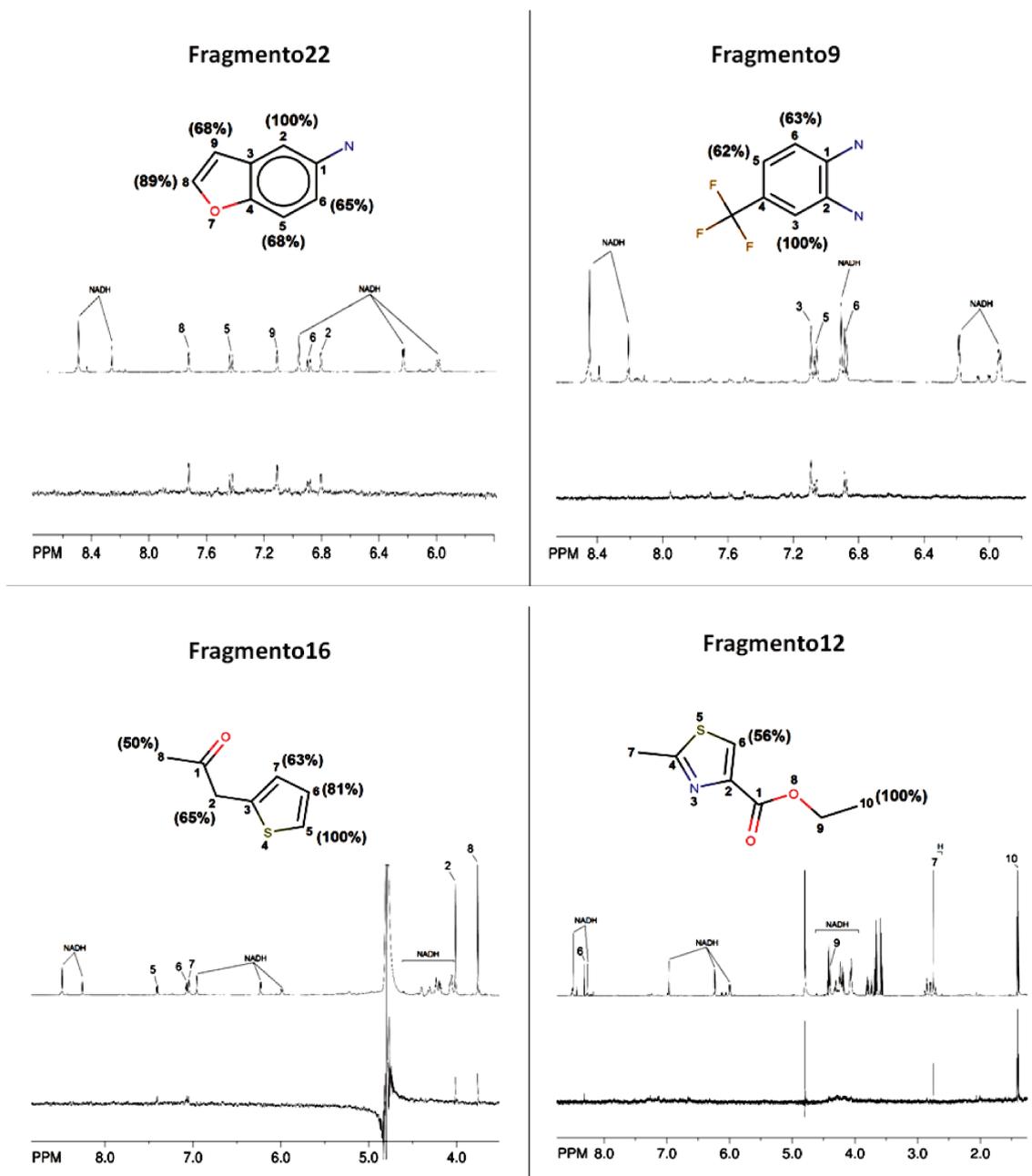


Figura 21. STD-NMR confirma a interação de compostos com características hidrofóbicas com MtDHFR. Na parte superior são representados os espectros de referência (*off resonance*) e na parte inferior são representados os espectros STD-NMR (diferença entre espectros *off resonance* e *on resonance*). Graus relativos de saturação de hidrogênios individuais são mapeados nas estruturas químicas dos compostos e medidos em porcentagem (João A. Ribeiro e Maurício Sforça).

O conjunto de fragmentos apresentados na **Figura 21** é caracterizado por estruturas químicas diferentes dos apresentados anteriormente. Estes compostos não são ácidos carboxílicos e também não possuem anéis interligados como a ampla maioria dos interatores identificados por STD-NMR apresentados. Os mesmos são representados por

compostos químicos menores, de características mais hidrofóbicas e são formados basicamente por anéis aromáticos, os quais são os grupos químicos mais relevantes para a interação de acordo com análise dos espectros de RMN. Além do anel benzeno e do anel tiofeno, já observados em estruturas anteriores, e relevantes na interação dos **Fragmento9** e **Fragmento16** respectivamente, surgem como novas variedades químicas interatoras, outros anéis aromáticos heterocíclicos. Um mononuclear representado pelo tiazol presente na estrutura do **Fragmento12** e outro polinuclear representado pelo benzofurano presente no **Fragmento22**.

Como discutido no tópico 1.11.2 de introdução, o termo "epítipo" é bastante frequente na literatura para a caracterização de interatores através de STD-NMR. Estes representam os hidrogênios dos ligantes que estão próximos da enzima como consequência de uma interação química. Estão presentes em grupos farmacóforos, que em Química Medicinal são regiões dos ligantes essenciais para a interação. A partir desse ponto, na campanha FBDD explorada neste projeto, os epítipos foram identificados e seus grupos são representados na **Figura 22** abaixo.

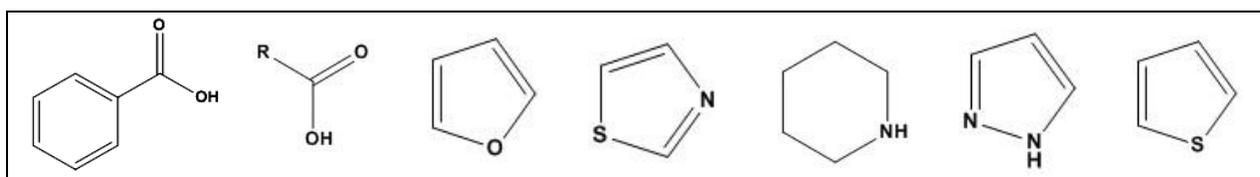


Figura 22. Variedade química relevante para a interação com MtDHFR através de STD-NMR. São representados os grupos químicos que tiveram os sinais de prótons H^+ mais intensos em espectros STD-NMR.

Desta maneira, através da análise de STD-NMR pôde se validar compostos identificados previamente através de DSF e permitir uma filtragem para os compostos a serem explorados em ensaios calorimétricos e cristalográficos. De um total de 25 fragmentos testados, 18 (72%) tiveram a interação com MtDHFR confirmada e, em ação com colaboradores, abriu-se a possibilidade de obtenção de moléculas líderes contendo *scaffolds* diferentes dos existentes em inibidores conhecidos de DHFRs. Um fator relevante se encontra na variedade de grupos aromáticos envolvidos em interações moleculares e isso pôde favorecer o processo de otimização devido a maior estabilidade química destes quando comparado com grupos cíclicos não aromáticos. De posse dessa variedade química identificada, tornou-se viável a busca por novas alternativas frente aos análogos de pirimidina

ou pteridina, que são grupos farmacóforos de inibidores de DHFRs desenvolvidos até o momento e sem eficácia para o tratamento de TB (HAWSER et al, 2006).

4.4 Quantificação das Afinidades e Caracterização Termodinâmica de Interações entre MtDHFR e Fragmentos

Como parte da estratégia do desenho de fármacos baseado em fragmentos, após as fases de identificação de *hits* em triagem contra uma biblioteca e posterior confirmação das interações através de STD-NMR, iniciou-se a fase de caracterização da interação química das principais moléculas orgânicas identificadas contra a enzima. Essa fase é de grande importância, pois seleciona os fragmentos com melhor potencial a tornarem-se líderes. Juntamente com informações a respeito do modo de ligação em estruturas cristalográficas resolvidas, esses compostos são encaminhados ao processo iterativo de otimização química até que afinidades na faixa de baixo micromolar ou nanomolar sejam alcançadas. Neste trabalho, caracterizar interações entre fragmentos e a enzima visou, não somente quantificar a afinidade dessa interação, como também extrair alguns parâmetros que pudessem influenciar diretamente na afinidade com MtDHFR. Para esse fim, a técnica escolhida foi a calorimetria de titulação isotérmica (ITC), pois é amplamente usada em campanhas FBDD e permite a quantificação da afinidade pela obtenção da constante de dissociação (K_d). Além disso, a técnica possibilita uma análise energética da interação através de diversos parâmetros termodinâmicos, como energia livre de Gibbs (ΔG), entalpia (ΔH) e entropia ($-T\Delta S$), além do cálculo da eficiência de ligação, visando a estimativa da contribuição de cada átomo diferente de hidrogênio para a afinidade de um composto com a proteína (EDINK et al, 2011)

Fragmentos que foram positivos quanto à interação por STD-NMR, foram ensaiados através de calorimetria de titulação isotérmica, e os termogramas da titulação são apresentados na **Figura 23**. Entretanto, devido as características hidrofóbicas de alguns fragmentos, não foram encontradas condições ideais para a realização dos experimentos.

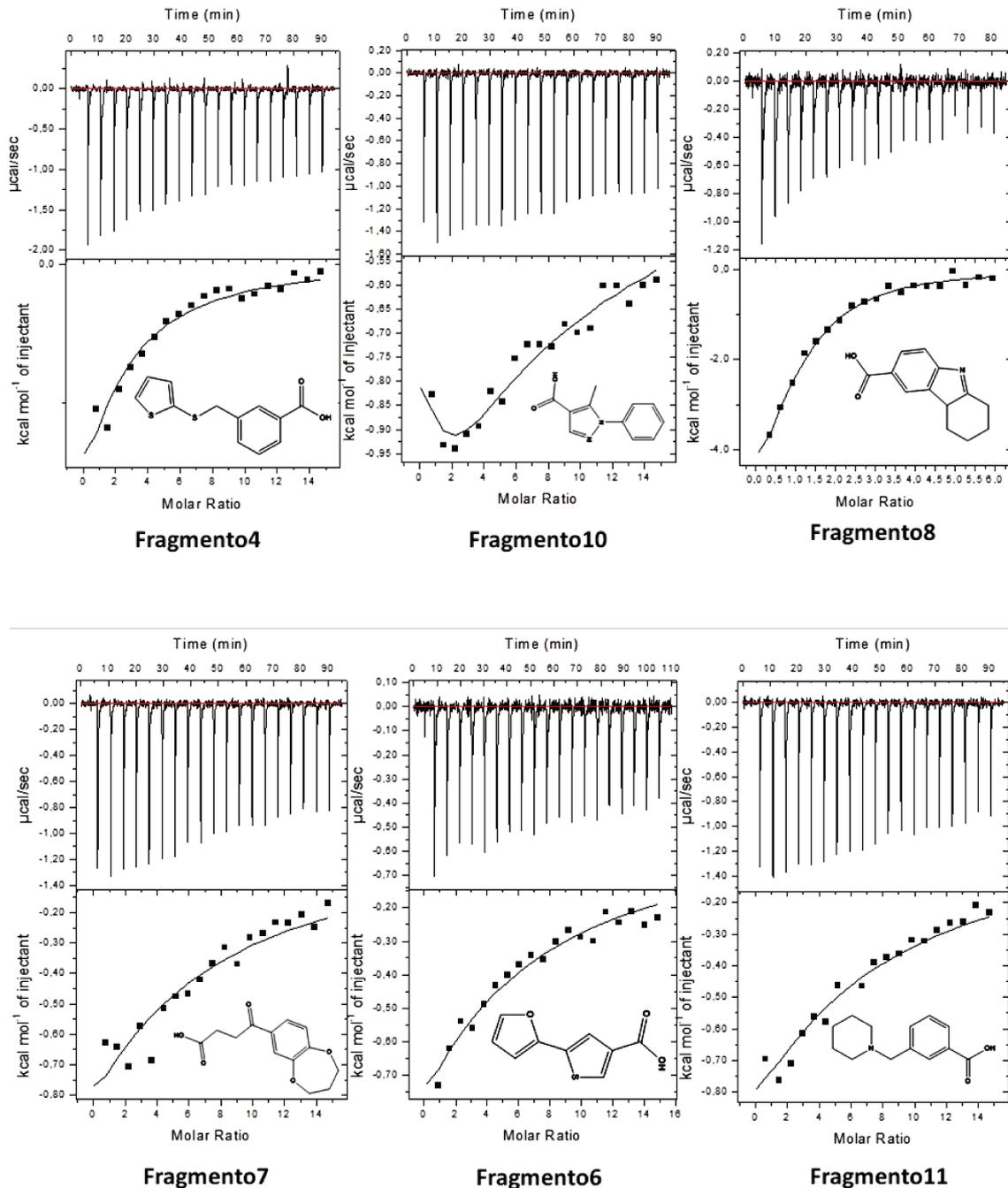


Figura 23. Termogramas da interação de fragmentos com MtDHFR. São ilustrados os termogramas das titulações dos **Fragmentos4, 10, 8, 7, 6 e 11** presentes na seringa com MtDHFR presente na célula em ensaios de calorimetria. Parte superior das figuras representa o padrão dos calores de diluição observados em função do tempo em $\mu\text{cal}/\text{segundo}$ e parte inferior representa a variação de entalpia relacionada a cada injeção de ligante em kcal/mol . As figuras foram construídas através do programa Origin v.7.0 (MicroCal).

Pela observação dos termogramas, pôde-se constatar que todas as reações foram exotérmicas (liberação de calor). Pelas altas concentrações dos ligantes necessárias para a realização dos ensaios (3 mM – 10 mM), observaram-se grandes calores de diluição com

ineficiência para se atingir o ponto de saturação da reação para alguns fragmentos. Normalmente isso é observado como indicativo de baixa afinidade entre receptor-ligante. Além disso, foi observado no termograma referente ao **Fragmento10**, um modelo para ligação em sítios sequenciais, que pode indicar mais de um sítio de ligação por monômero, ou mesmo a presença de interações inespecíficas. Em geral, foi possível o tratamento dos pontos das curvas de titulações e os valores para os cálculos das afinidades (K_d) e demais parâmetros termodinâmicos foram obtidos. Somente uma análise mais refinada desses dados poderia revelar melhor o comportamento energético das interações entre os fragmentos e MtDHFR. Assim, esses parâmetros somados com aqueles obtidos previamente das titulações do **Fragmento1** e **Fragmento2** (tópico 4) são apresentados na **Tabela 3** abaixo.

Tabela 3. Parâmetros termodinâmicos das interações entre MtDHFR e fragmentos.

Fragmento	ΔG (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	(-) T ΔS (kcal/mol)	K_d (mM)	LE
Fragmento1	-5,50	-3,94 \pm 0,154	-1,53	0,095 \pm 0,005	0,20
Fragmento2	-4,46	-2,11 \pm 0,045	-2,35	0,502 \pm 0,017	0,26
Fragmento4	-4,19	-8,75 \pm 0,586	4,57	0,752 \pm 0,091	0,26
Fragmento6	-3,67	-13,87 \pm 0,805	10,19	2,506 \pm 0,212	0,28
Fragmento7	-3,45	-16,11 \pm 1,759	12,65	2,777 \pm 0,430	0,19
Fragmento8	-5,45	-4,72 \pm 0,203	-0,73	0,098 \pm 0,018	0,34
Fragmento10	-4,28	-4,69 \pm 0,255	0,41	0,641 \pm 0,124	0,28
Fragmento11	-3,37	-18,93 \pm 1,994	15,56	3,205 \pm 0,466	0,21

De acordo com a **Tabela 3**, observou-se que os valores das afinidades (K_d) foram compatíveis com o esperado para estes compostos. Os **Fragmento1** e **8** com K_d s de 95 μ M e 98 μ M, respectivamente, foram os que apresentaram maiores afinidades com MtDHFR. Outro parâmetro importante em FBDD é a eficiência de ligação (LE) e pelos valores observados para esses dois fragmentos, o **Fragmento8** (0,34), de menor peso molecular, teve esse parâmetro mais elevado que o **Fragmento1** (0,20) devido a maior capacidade de interação de grupos químicos em sua estrutura química, já que tiveram afinidades e energia de interação (ΔG) com praticamente as mesmas magnitudes. O peso molecular do **Fragmento8** é 215 g/mol enquanto o peso molecular do **Fragmento1** é de 352 g/mol. Desta maneira, pelos valores de LE, fica evidente a presença de grupos químicos presentes no **Fragmento1** que não contribuem com a interação com MtDHFR.

Como citado acima, ITC também revela informações importantes a respeito das contribuições de forças referentes à entalpia (ΔH) e à entropia ($-T\Delta S$) para a energia final de interação (ΔG). O balanço final, relacionado ao equilíbrio termodinâmico dessas forças em kcal/mol, para a interação com a enzima MtDHFR é representado nos gráficos de perfis termodinâmicos da **Figura 24** abaixo.

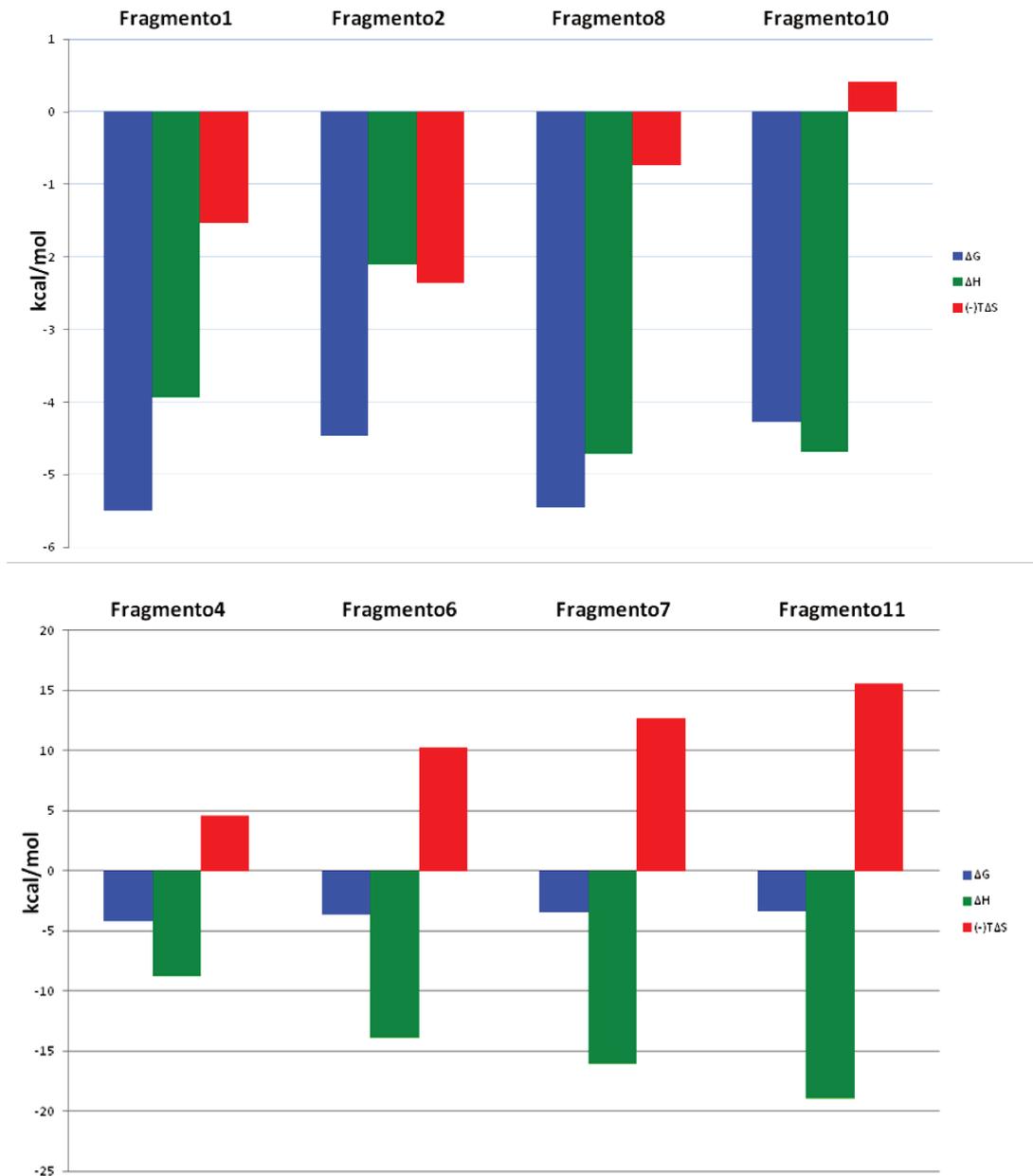


Figura 24. Perfis termodinâmicos das interações de fragmentos com MtDHFR. São representados os perfis termodinâmicos pelos gráficos com os valores em kcal/mol da energia de interação ΔG (Energia livre de Gibbs) em azul, da entalpia (ΔH) em verde e da entropia ($-T\Delta S$) em vermelho na caracterização da interação com MtDHFR. Gráficos foram elaborados no Excel (João A. Ribeiro e Gerardo A. Libreros).

As análises dos perfis termodinâmicos das interações dos fragmentos com MtDHFR revelaram que as reações foram todas favoráveis nas condições experimentais testadas, devido aos valores negativos observados para as energias de interação ΔG . Os valores de ΔG observados nos gráficos da parte inferior para os **Fragmentos6** (-3,67), **7** (-3,45) e **11** (-3,37), foram menores quando comparados com o valor desse parâmetro para o **Fragmento4** (-4,19) e os da parte superior, que variaram de -4,28 kcal/mol a -5,50 kcal/mol. Isso se relaciona diretamente com as menores afinidades (**Tabela 3**) observadas para os fragmentos representados na parte inferior da **Figura 24**.

Outra característica marcante observada nas interações é que estas são regidas predominantemente por entalpia, como esperado para FBDD. Nas interações desses fragmentos com a enzima predominam interações mais fortes e esses resultados se relacionam aos grupos identificados como interatores por STD-NMR. Esta técnica detectou a relevância de grupos como a carboxila e o ácido benzoico que, por possuírem carga negativa, poderiam realizar interações eletrostáticas com resíduos básicos como, por exemplo, uma arginina ou realizarem interações de hidrogênio com outros resíduos. Pelos gráficos da **Figura 24**, somente o **Fragmento2** apresentou uma contribuição predominante entrópica para a interação. Neste caso, a diminuição de entalpia pode ser explicada pela posição "para" do grupo carboxila no ácido benzoico, que provavelmente interferiu que este grupo fizesse algum tipo de interação mais forte. Nos testes de STD-NMR, essa diferença na posição da carboxila também culminou na diminuição de sinais de prótons vizinhos. Outra relação com os experimentos de STD-NMR foi a presença de grupos hidrofóbicos como possíveis interatores e estes se relacionam diretamente com valores de entropia. Pela análise dos gráficos da **Figura 24**, principalmente para os fragmentos da parte superior, contribuições de entropia foram detectadas nas interações do **Fragmento1** (-1,53), **2** (-2,35) e **8** (-0,73) com a MtDHFR. Porém, nos gráficos da parte inferior, grandes penalidades entrópicas (valores positivos) observadas para os **Fragmentos6**, **7** e **11** revelaram uma possível instabilidade conformacional (movimentação dos átomos) desses grupos hidrofóbicos no sítio ativo da enzima.

Programas de FBDD normalmente priorizam alguns compostos cujos valores relacionados à entalpia e entropia, podem revelar interações-chave com o sítio ativo (FERENCZY e KESERU, 2012). Normalmente, como a estratégia mais aceita, é priorizada contribuição de entalpia (interações eletrostáticas e interações de hidrogênio) para que se obtenha ganho de afinidade no início do processo (LADBURY et al, 2010) e neste caso, os **Fragmentos1**, **8**, **10** e **4** levam certa vantagem. Por outro lado, grandes restrições de entropia

observadas nas contribuições energéticas para alguns fragmentos (**Fragmento6, 7 e 11**) podem dificultar processos futuros de modificações químicas. Porém, é necessário a visualização dessas interações em estruturas cristalográficas resolvidas para a correta avaliação sobre os tipos de interações e identificação de *hotspots* no sítio ativo de MtDHFR. Levando em consideração as contribuições dessas forças para a interação, assim como valores de LE, é possível direcionar modificações químicas nos compostos que favoreçam ganho entálpico (interações polares) ou ganho entrópico (adição de grupos hidrofóbicos que deslocam efetivamente moléculas de água), corrigindo as penalidades de entropia que dificulta o processo de FBDD.

4.5 Modos de Interação de Complexos MtDHFR:NADPH:Fragmentos através de Cristalografia de Proteínas

Como parte de campanhas FBDD, a elucidação do modo de interação de fragmentos com a proteína alvo representa uma poderosa ferramenta para a otimização destes em compostos líderes. Assim, condições favoráveis e altamente reprodutíveis de cristalização são de grande relevância no planejamento racional de fármacos devido à demanda de informações requeridas. Devido uma baixa reprodutibilidade experimental de condições previamente identificadas na literatura (LI et al, 2000; DIAS et al, 2014), esse projeto também buscou encontrar novas condições de cristalização que proporcionassem maior celeridade no processo FBDD. Com isso, em triagem de possíveis condições favoráveis, foi identificada uma condição reprodutível, com formação de cristais bem definidos. Estes também foram resistentes em experimentos de cocrystalização com altas concentrações de ligantes, que é requisito necessário para o sucesso na obtenção de complexos estruturais com fragmentos (**Figura 25**) além de serem permissíveis para técnicas de *soaking*.



Figura 25. Cristais típicos de complexos MtDHFR:NADPH:Fragmentos. Cristais obtidos de ensaios de cocristalização de MtDHFR com fragmentos.

Os cristais da enzima MtDHFR (**Figura 25**) foram obtidos em experimentos de gota suspensa e o tempo de incubação necessário para o crescimento variou de 3 dias até alguns meses. A condição identificada é diferente das anteriormente descritas na literatura e contém 1,6 M de sulfato de amônio, 0,1 M de MÊS (pH 6,5) e 10 mM de cloreto de cobalto. Além disso, o crescimento dos cristais não foi evitado pela concentração de fragmentos utilizados, que variaram de 15 mM a 40 mM dissolvidos em DMSO em ensaios de cocristalização. Entretanto, para a formação de cristais, foi necessário a incubação da MtDHFR na presença do seu cofator NADPH (10 mM) nas soluções contendo a enzima e fragmentos.

Os cristais de MtDHFR em complexo com fragmentos (foram testados somente os *hits* positivos na técnica STD-NMR), foram difratados e de posse dos conjuntos de dados contendo as imagens de difração por raios X, estruturas foram resolvidas a alta resolução para 7 complexos MtDHFR:NADPH:Fragmentos. A **Tabela 4** mostra os parâmetros estatísticos do processamento de dados, refinamento cristalográfico e qualidade estereoquímica das estruturas obtidas. Vale destacar, que o **Fragmento1** que também teve seu modo de ligação caracterizado previamente, não é incluído nas discussões a seguir devido as semelhanças das interações com os diferentes complexos da MtDHFR com fragmentos caracterizados neste trabalho.

Tabela 4. Condição de cristalização, processamento de dados de difração e refinamento cristalográfico de complexos MtDHR:NADPH:Fragmentos/DHF.

	Fragmento4	Fragmento7	Fragmento10	Fragmento11	Fragmento9	Fragmento16	Fragmento20	DHF
Condição de cristalização	1,6 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1 M MES (pH 6,5), 0,01 M CoCl ₂							
Dados de difração de raios X e refinamento cristalográfico								
Beamline	MX2-Pilatus							
Comprimento de onda (Å)	1,459							
# reflexões (únicas)	409192 (35767)	261901 (21402)	372719 (31632)	337371 (27501)	174536 (14223)	102058 (8517)	266847 (26688)	346170 (30640)
Resolução (Å)	46,81 – 1,69	46,77 – 2,06	46,72 – 1,76	46,60 – 1,84	46,54 – 2,30	46,22 – 2,63	46,46 – 1,85	46,49 – 1,76
Grupo espacial	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Cela unitária								
a, b, c (Å)	61,74; 71,17; 71,80	61,55; 70,90; 71,94	61,47; 70,45; 71,87	61,01; 70,58; 72,20	60,91; 70,70; 72,13	60,27; 70,78; 72,10	61,16; 70,57; 71,42	60,98; 70,86; 72,11
α, β, γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90
Completeza (%)	99,40	99,40	99,60	99,50	99,10	99,50	98,90	99,00
Multiplicidade	11,44	12,23	11,78	12,26	12,27	11,98	9,99	11,29
I /σ(I)	21,00 (1,80)	11,10 (2,10)	19,00 (2,20)	17,70 (2,10)	13,20 (2,60)	8,20 (3,40)	12,5 (2,40)	15,21 (2,6)
R-merge	0,073 (0,95)	0,230 (1,59)	0,088 (0,95)	0,109 (1,18)	0,180 (1,03)	0,302 (0,69)	0,137 (0,70)	0,082 (0,94)
R-pim	0,022 (0,36)	0,070 (0,48)	0,026 (0,33)	0,032 (0,39)	0,053 (0,31)	0,092 (0,20)	0,044 (0,26)	0,028 (0,36)
CC1/2	0,99 (0,69)	0,99 (0,73)	0,99 (0,71)	0,99 (0,75)	0,99 (0,77)	0,98 (0,88)	0,99 (0,80)	0,99 (0,73)
R-factor ^a	0,18	0,17	0,21	0,19	0,18	0,22	0,19	0,17
R-free ^b	0,21	0,21	0,26	0,22	0,23	0,26	0,22	0,21
Qualidade do modelo								
Gráfico de Ramachandran (%)								
"favorável"	96,00	97,00	97,00	97,00	97,00	97,00	97,00	97,00
"desfavorável"	0,96	0,00	0,32	0,00	0,32	0,64	0,00	0,00
Geometria								
"ligação" (Å)	0,015	0,016	0,007	0,015	0,017	0,041	0,032	0,019
"Angulo" (°)	1,50	1,55	1,40	1,48	1,54	1,60	1,43	1,76
Fator de temperatura (B-factor)								
Solvente	33,60	29,38	32,35	35,12	32,79	30,50	29,44	34,07
Ligantes	23,93	20,77	20,39	28,00	32,57	22,55	20,76	28,05

De acordo com a **Tabela 4**, foram obtidos parâmetros estatísticos aceitáveis em relação à qualidade do processamento de dados e refinamento cristalográfico para os modelos finais obtidos. Todos os complexos MtDHFR:NADPH:**Fragmentos** foram cristalizados no grupo espacial $P 2_1 2_1 2_1$ e com os mesmos parâmetros de cela unitária. Essas características proporcionaram sempre a visualização de dois protômeros de MtDHFR na unidade assimétrica. Entre os protômeros pôde se observar a presença de dois átomos de cobalto que apresentavam coordenações envolvendo resíduos de ambas as moléculas. Porém, não foram realizados experimentos que indicassem se os íons de cobalto promovem a dimerização desta enzima. Além disso, as resoluções das estruturas variaram de 1,6 Å a 2,5 Å.

Todas as estruturas dos complexos da MtDHFR com fragmentos apresentadas neste trabalho apresentam as mesmas características estruturais da primeira estrutura da MtDHFR descrita por LI et al, 2000. Sucintamente, a MtDHFR, apresenta um único domínio central composto por oito fitas β , que é flanqueado por quatro α hélices, característico do enovelamento do tipo "*Rossmann fold*" (LI et al, 2000). São observadas também a divisão dos domínios de MtDHFR, isto é, um subdomínio de ligação de adenosina (interação do NADPH) e um subdomínio flexível de alças (**Figura 26A**). A enzima adotou a conformação fechada em todas as estruturas e conseqüentemente o correto ancoramento do grupo nicotinamida da molécula de NADPH (LI et al, 2000; DIAS et al, 2014) (**Figura 26B**). Além disso, são observadas as mesmas quatro sub-regiões do sítio ativo da enzima. A primeira, com potencial eletrostático com carga positiva na "entrada" do sítio ativo, a segunda, hidrofóbica mais interna, a terceira, mais profunda com carga negativa e a quarta pela presença da região de ligação de uma molécula de glicerol, que diferencia a enzima de *M. tuberculosis* da DHFR humana (**Figura 26C**) (LI et al, 2000).

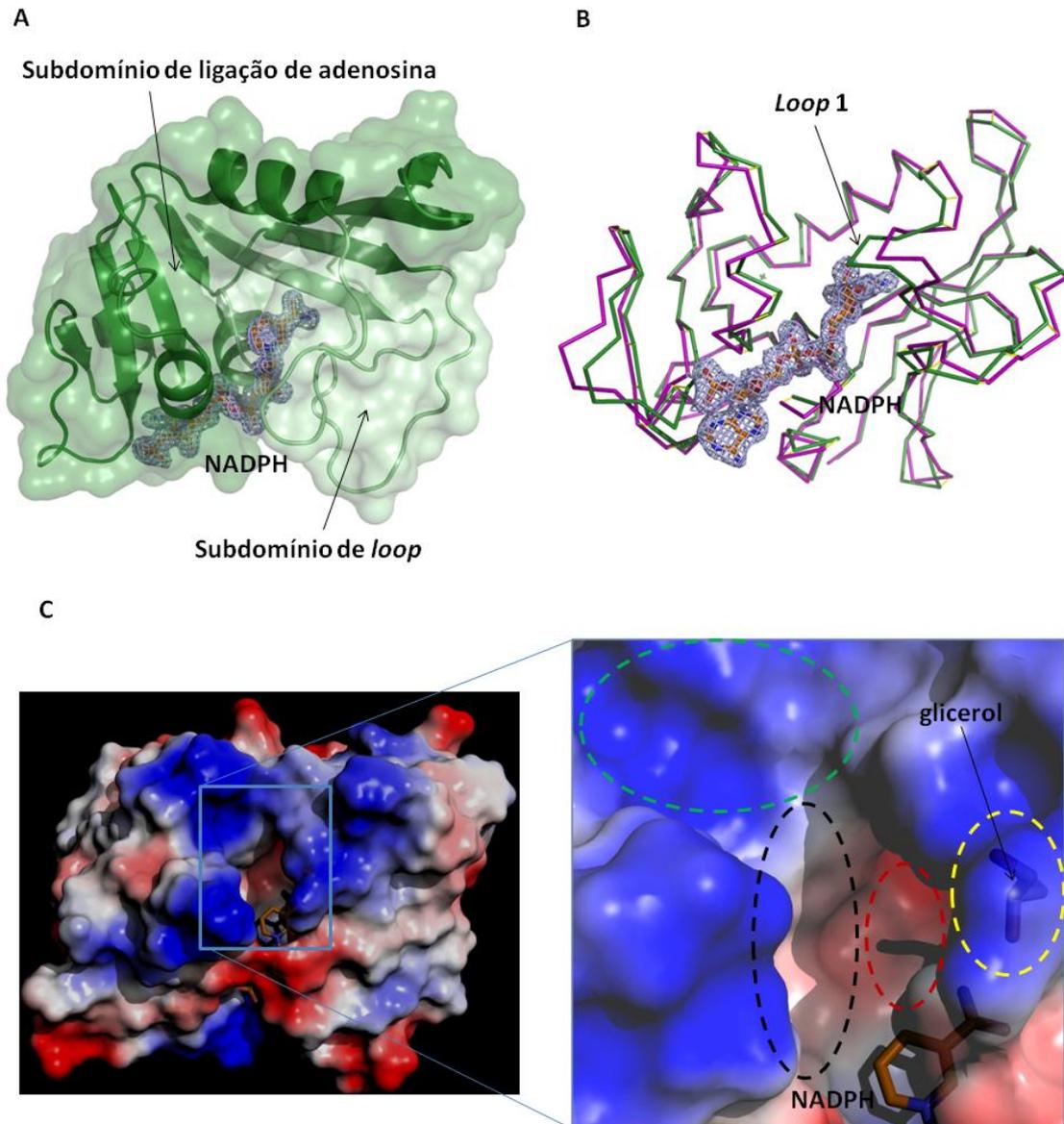


Figura 26. Biologia Estrutural de MtDHFR em complexo com fragmentos. **A)** Enovelamento de estrutura secundária do tipo *Rossmann fold* e divisão de MtDHFR em seus subdomínios de alças e de ligação de adenosina. É representado o NADPH e seu mapa de densidade eletrônica $2F_o - F_c$ contornado a 1σ . **B)** Sobreposição de estados conformacionais aberto (roxo) e fechado (verde) de MtDHFR. É representado o NADPH e seu mapa de densidade eletrônica $2F_o - F_c$ contornado a 1σ . Imagem da conformação aberta gerada no PyMOL com a estrutura 4KLX (DIAS et al, 2014). **C)** São destacadas as sub-regiões do sítio ativo de MtDHFR. É ilustrado o potencial eletrostático estimado (vermelho: negativo; azul: positivo; branco: neutro). Sub-região eletrostática polar positiva é delimitada por tracejados verdes, sub-região eletrostática polar negativa é delimitada por tracejados vermelhos, sítio hidrofóbico é delimitado por tracejados pretos e o bolsão de glicerol é indicado por tracejados amarelos. Moléculas de glicerol e NADPH são destacadas. Imagens geradas no PyMOL .

Ainda sobre a Biologia Estrutural da enzima e confirmando as características químicas do sítio ativo citadas acima, a estrutura da enzima em complexo com o DHF também foi

determinada (**Figura 27B**). Foi possível determinar as interações moleculares do substrato com resíduos específicos do sítio ativo, confirmando hipóteses sobre o mecanismo catalítico em *M. tuberculosis*. Até o momento, ainda não foi reportada estrutura de MtDHFR com o DHF na literatura. Como esperado, Asp27, Phe31 e Arg60 ganham destaque nessas interações além da interação hidrofóbica da pterina do DHF com a nicotinamida do NADPH (**Figura 27A**). Consequentemente, de acordo com as características químicas dos fragmentos, as regiões do sítio ativo envolvidas na interação com esses compostos puderam ser mapeadas (**Figura 27D**). Alguns fragmentos compartilharam semelhanças a respeito das interações com os mesmos resíduos de aminoácidos envolvidos na interação de MtDHFR com o DHF (**Figura 27C**).

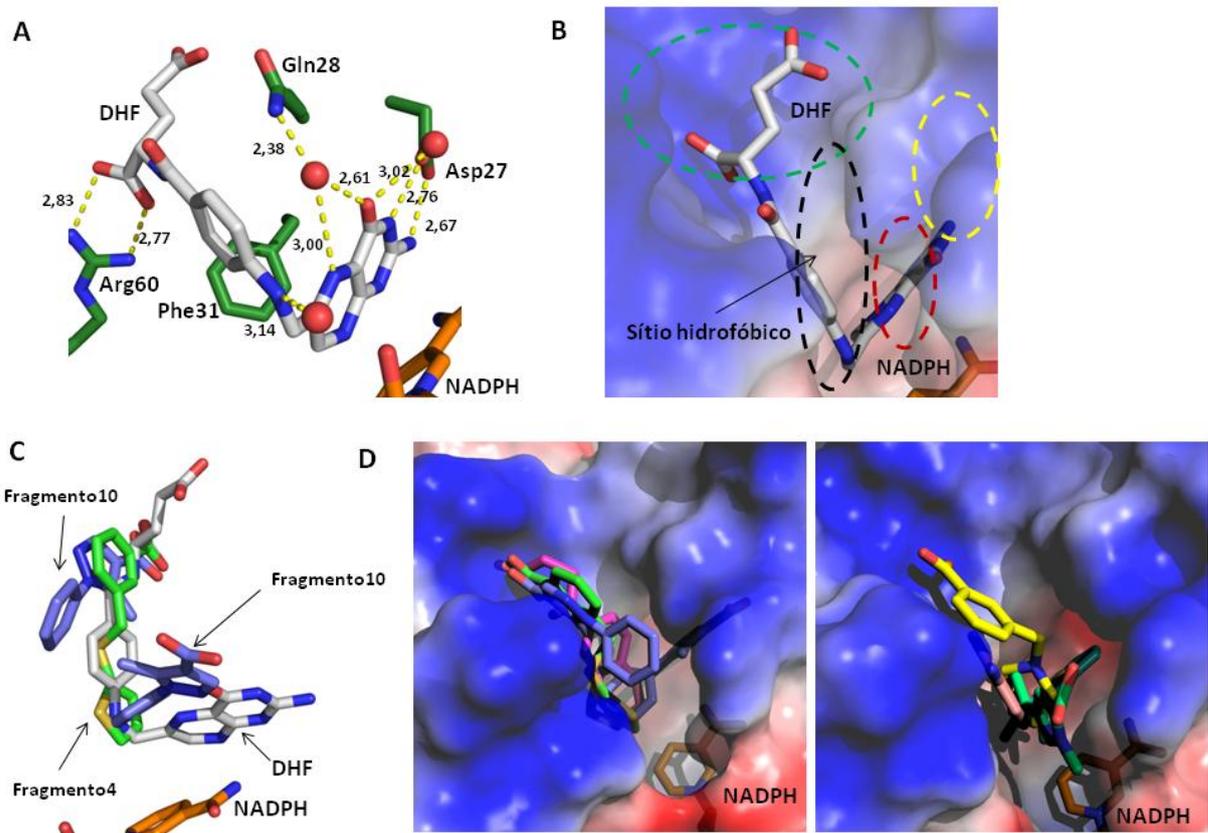
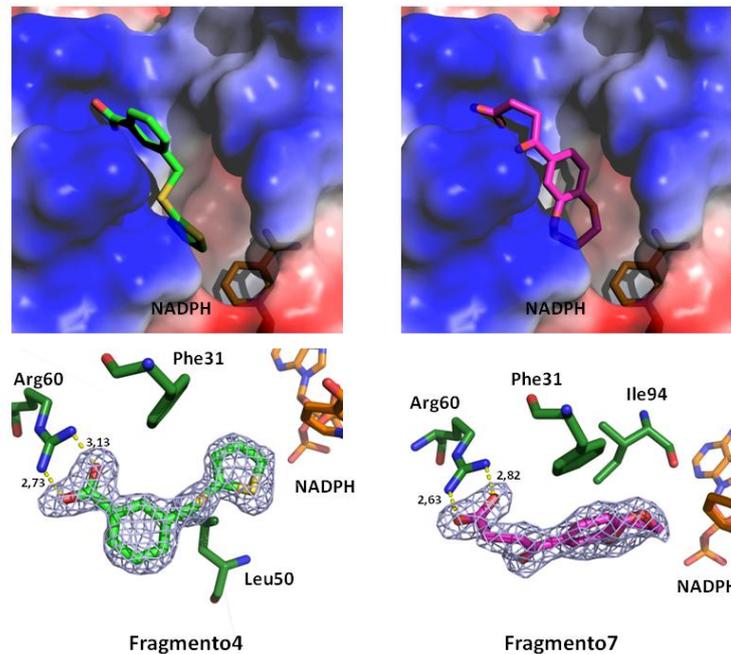


Figura 27. Modos de ligação do Diidrofolato e de fragmentos com o sítio ativo de MtDHFR. **A)** São representadas as interações moleculares realizadas pelo DHF. Resíduos e águas envolvidas na interação estão destacados. Interação de hidrogênio ou interação iônica são indicadas por pontilhados amarelos e distâncias medidas em Å. **B)** São destacadas as sub-regiões do sítio ativo de MtDHFR. É ilustrado o potencial eletrostático estimado (vermelho: negativo; azul: positivo; branco: neutro). Sub-região eletrostática polar positiva é delimitada por tracejados verdes, sub-região eletrostática polar negativa é delimitada por tracejados vermelhos, sítio hidrofóbico é indicado por seta e delimitado por tracejados pretos e o bolsão de glicerol é indicado por tracejados amarelos. **C)** Sobreposição dos modos de ligação do DHF com os **Fragmentos4** e **10**. **D)** É mostrada a sobreposição dos modos de ligação dos **Fragmentos4, 7, 10, 11, 20, 9** e **16**. Imagens geradas no PyMOL (João A. Ribeiro, Jademilson C. dos Santos e Sair M. S. Pacheco).

De acordo com a **Figura 27D**, as interações dos fragmentos ocorreram em três das quatro sub-regiões do sítio ativo da MtDHFR. Nenhuma molécula foi observada interagindo com a sub-região mais profunda com carga negativa. Apesar disso, foi possível a exploração do sítio ativo de MtDHFR, em que interações-chave foram identificadas e puderam ser aproveitadas no planejamento de possíveis compostos líderes. Assim, semelhanças e diferenças relacionadas com a interação molecular de cada fragmento e os resíduos de aminoácidos envolvidos, são abordadas a seguir.

Na **Figura 28**, são indicadas os modos de interações dos fragmentos com a MtDHFR que são estruturalmente semelhantes e apresentam um grupo ácido carboxílico em sua estrutura química. Os resultados obtidos de STD-NMR indicam que esse motivo é relevante para interação e pelas análises de calorimetria, provavelmente está relacionado com a contribuição de entalpia influenciando a afinidade com a enzima.



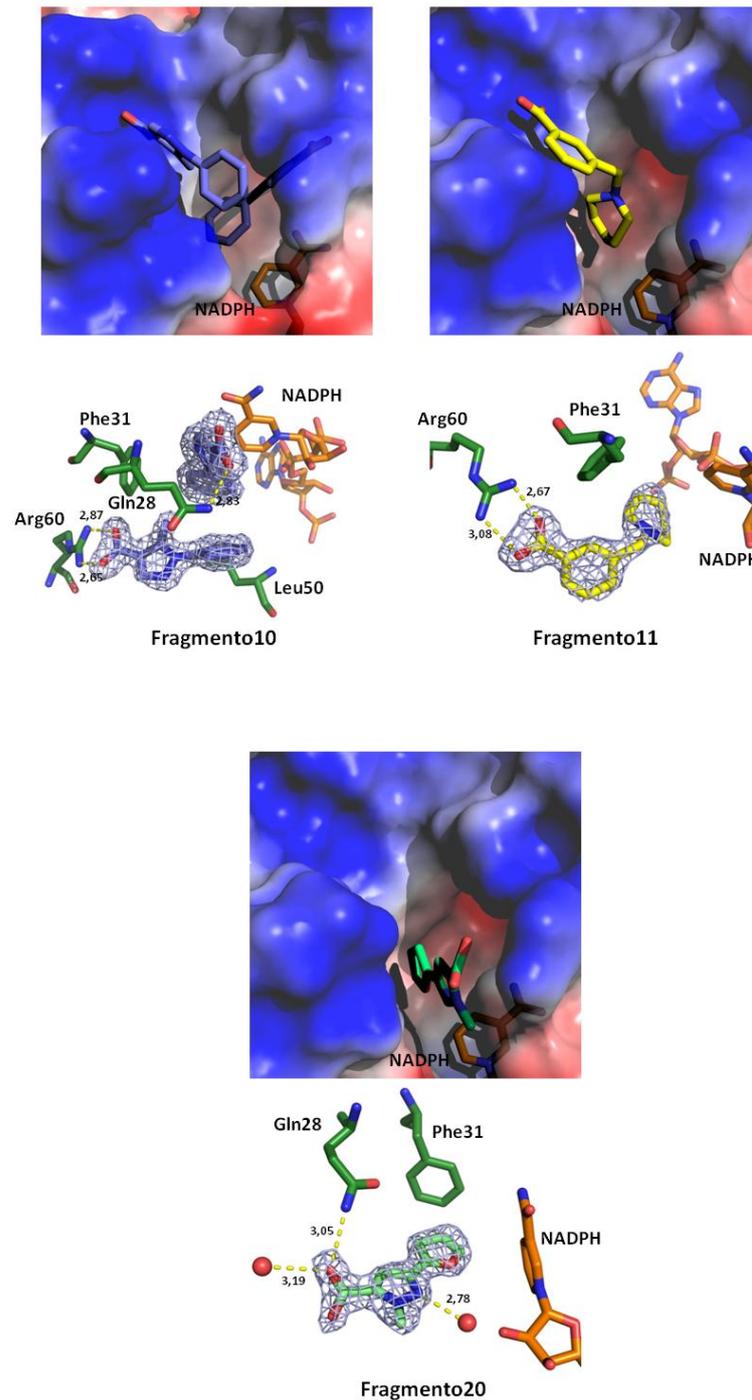


Figura 28. Modos de ligação de fragmentos contendo um grupo carboxila relevante para interação com MtDHFR. Nas partes superiores são ilustrados os modos de ligação dos Fragmentos4, 7, 10, 11 e 20 com o sítio ativo de MtDHFR. É ilustrado o potencial eletrostático estimado (vermelho: negativo; azul: positivo; branco: neutro). Nas partes inferiores são representadas as interações moleculares realizadas por esses fragmentos. Resíduos envolvidos na interação estão destacados. Interação de hidrogênio ou interação iônica são indicadas por pontilhados amarelos e distâncias medidas em Å. São mostrados os mapas das densidades eletrônicas $2F_o - F_c$ contornados a 1σ . Imagens geradas no PyMOL (João A. Ribeiro e Jademilson C. dos Santos).

Pela **Figura 28**, são observadas interações iônicas do grupo carboxila com a cadeia lateral da Arg60. As Arg60 e Arg32 são os resíduos de MtDHFR que interagem com os grupos *p*ABA e glutamato do DHF. Além disso, esse conjunto de fragmentos fazem diversas interações hidrofóbicas. Estas também são indicadas como relevantes nos resultados de STD-NMR e ITC e se relacionam com as contribuições ou restrições de entropia observadas anteriormente para alguns desses fragmentos. A fenilalanina 31 destaca-se nas interações hidrofóbicas do tipo π *stacking* com os anéis (heterocíclicos e/ou aromáticos) presentes na estrutura química dos fragmentos. Além disso, outros resíduos dessa região do sítio que realizam interações hidrofóbicas são a leucina 50 e a isoleucina 94. Estes resíduos estão próximos dos anéis dos **Fragmentos4, 7 e 10**. Adicionalmente, os **Fragmentos4, 7 e 10** também fazem interações hidrofóbicas com o grupo nicotinamida do NADPH. Interessantemente, o **Fragmento20**, apesar de também conter uma carboxila em sua estrutura, não realiza interação iônica com Arg60. Por outro lado, este fragmento faz uma interação de hidrogênio com o nitrogênio da cadeia lateral da Gln28 e uma interação hidrofóbica com Phe31 pelo seu grupo furano. Ainda como mostrado na **Figura 28**, o **Fragmento10** foi a única molécula que ocupou o sítio de ligação do glicerol. Neste sítio, esta molécula realiza uma interação de hidrogênio do seu grupo carboxila com a cadeia lateral da Gln28. Do ponto de vista de especificidade, talvez esse fragmento seja um dos mais interessantes para o planejamento de novos compostos para a enzima MtDHFR, uma vez que este bolsão não é encontrado na enzima humana.

Na **Figura 29**, são mostrados os modos de interação de fragmentos com a MtDHFR, que apesar de terem sido detectados como interatores por STD-NMR, não foram possíveis a detecção das suas afinidades e outros parâmetros termodinâmicos por calorimetria, provavelmente pela baixa afinidade e/ou baixa solubilidade dos mesmos nas condições testadas.

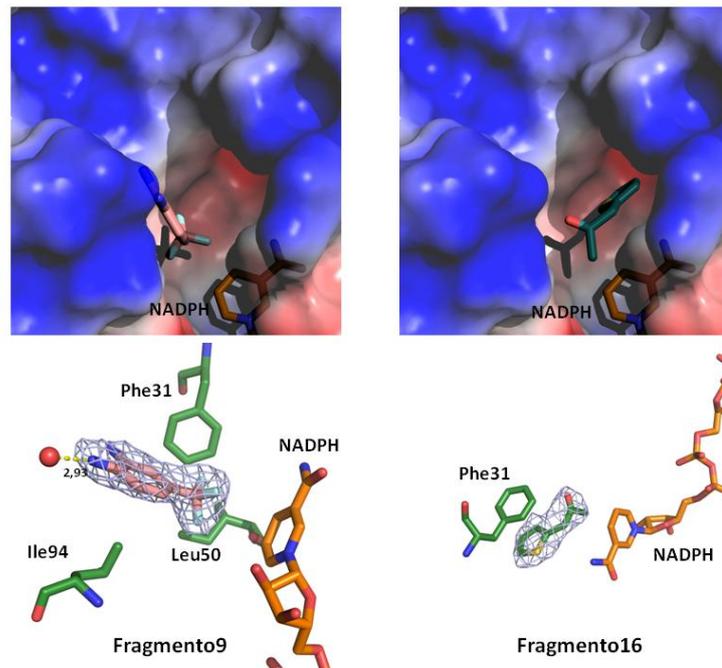


Figura 29. Modos de ligação de fragmentos com características hidrofóbicas com MtDHFR. Na parte superior são ilustrados os modos de ligação dos **Fragmentos9** e **16** com o sítio ativo de MtDHFR. É ilustrado o potencial eletrostático estimado (vermelho: negativo; azul: positivo; branco: neutro). Na parte inferior são representadas as interações moleculares hidrofóbicas realizadas por esses fragmentos. Resíduos hidrofóbicos envolvidos na interação estão destacados. Interação de hidrogênio com uma molécula de água para o **Fragmento9** é indicada por pontilhados amarelos e distância medida em Å. São mostrados os mapas das densidades eletrônicas $2F_o - F_c$ contornados a 1σ . Imagens geradas no PyMOL (João A. Ribeiro e Jademilson C. dos Santos).

Estes fragmentos apresentam características hidrofóbicas e realizam interações mais fracas com a região apolar do sítio ativo da enzima, quando comparados com os fragmentos do grupo anterior. Novamente os resíduos Phe31, Leu50 e Ile94 são relevantes para interações hidrofóbicas com o **Fragmento9** e este, pelo seu átomo de nitrogênio, também faz uma interação de hidrogênio com uma molécula de água. Por outro lado, o **Fragmento16** apresenta apenas interação hidrofóbica do tipo π *stacking* com Phe31 (**Figura 29**).

Com a obtenção de informações do modo de ligação dessas sete moléculas com a MtDHFR, aliada com os resultados obtidos de STD-NMR e da caracterização termodinâmica das interações, tornou-se possível a busca de novos compostos que pudessem ter maior afinidade com a enzima. A integração de diferentes dados experimentais identificou modos de ligação e interações-chave que esses fragmentos estão realizando com o sítio ativo de MtDHFR. Consequentemente, puderam ser identificados grupos químicos relevantes e resíduos de aminoácidos específicos envolvidos nessas interações. Assim, em colaboração

com especialistas em Química Medicinal, iniciamos uma otimização iterativa para o planejamento de novos compostos. Esses compostos devem apresentar grupos que favoreçam contribuição de entalpia e correção de penalidades de entropia observadas para os fragmentos e conseqüentemente ganho de afinidade com MtDHFR.

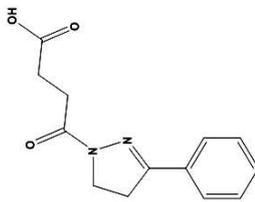
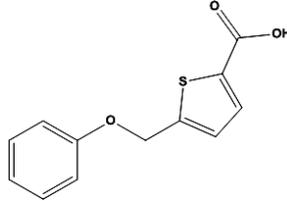
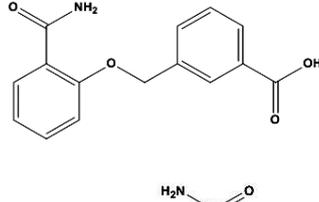
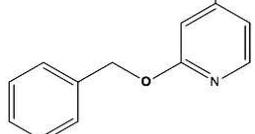
4.6 Catálogo SAR e o Ganho de Afinidade com MtDHFR pela Interação de Compostos Análogos aos Fragmentos

A partir dos modos de interações da MtDHFR com diversos fragmentos obtidos por cristalografia de raios X e parâmetros energéticos por calorimetria, alguns fragmentos foram selecionados para otimização química com auxílio de colaboradores.

Técnicas envolvidas nas relações estrutura-atividade (SAR – *Structure Activity Relationships*) são práticas tradicionais de Química Medicinal que tentam modular o efeito ou a potência (isto é, atividade) de compostos químicos bioativos através de modificações em sua estrutura química. Os químicos medicinais usam técnicas de síntese química para inserir novos grupos químicos em compostos e testar essas modificações para seus efeitos biológicos. Durante a execução dessa tese, não houve tempo hábil para a síntese de novas moléculas baseado nos fragmentos identificados, desta forma, alternativas foram adotadas na tentativa de obtenção de compostos com maior afinidade para a MtDHFR. Assim optamos por buscas de compostos análogos aos fragmentos através da estratégia de *SAR by catalog* ou catálogo SAR (HUBBARD, 2008). Essa abordagem se deu de duas maneiras: 1) busca em bancos de dados virtuais, como o ZINC database (IRWIN et al, 2012) e 2) busca de análogos sintetizados e dispostos em bibliotecas de compostos químicos de nosso colaborador Chris Abell.

Em colaboração com o grupo do prof. Gustavo H. G. Trossini (Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo) foi realizada uma triagem virtual contra o ZINC, para moléculas que apresentassem estruturas químicas análogas aos fragmentos com um grau de similaridade de até 70%. As moléculas selecionadas tiveram suas poses na estrutura da MtDHFR preditas por *docking* molecular (resultados não mostrados). Os quatro compostos que tiveram melhores pontuações (menores valores de energia e menores RMSDs, comparados a estrutura cristalográfica do complexo MtDHFR:NADPH:**Fragmento1**) nesses ensaios *in silico* foram obtidos comercialmente (**Tabela 5**) e suas interações com a MtDHFR caracterizadas por STD-NMR (**Figura 30**), ITC (**Figura 32**) e cristalografia de raios X (**Figura 31**).

Tabela 5. Estrutura química dos compostos escolhidos após busca virtual e *docking* molecular.

Nome	Estrutura química
Composto1	
Composto2	
Composto3	
Composto4	

A **Figura 30** mostra os resultados de ensaios de STD-NMR confirmando as interações dos compostos testados contra a MtDHFR. Estes compostos apresentavam as características gerais dos fragmentos iniciais, ou seja, grupo carboxila (na posição meta, quando presente em anel benzeno) e a disposição das estruturas químicas em anéis aromáticos interligados.

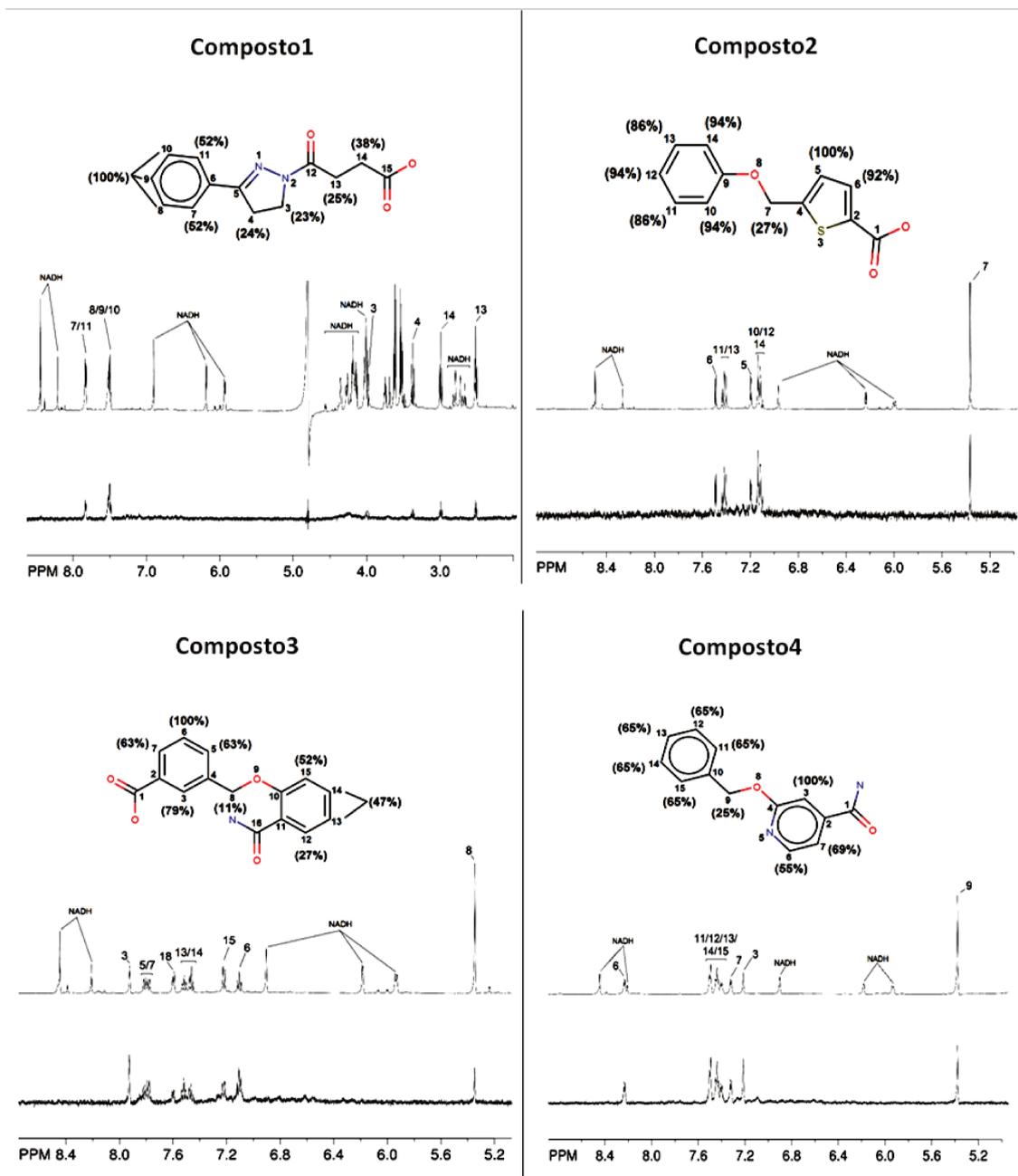


Figura 30. STD-NMR confirma a interação de compostos análogos obtidos em busca virtual por catálogo SAR. Na parte superior são representados os espectros de referência (*off resonance*) e na parte inferior são representados os espectros STD-NMR (diferença entre espectros *off resonance* e *on resonance*). Graus relativos de saturação de hidrogênios individuais são mapeados nas estruturas químicas dos compostos e medidos em porcentagem (João A. Ribeiro e Maurício Sforça).

Pela análise dos espectros, no geral foram observadas as mesmas características das interações destes compostos com os fragmentos. Entretanto, foi identificado outro grupo químico que também parece relevante para a interação, que é representado pelo grupo carboxamida presente nos **Compostos3** e **4** da parte inferior da **Figura 30**. Isto pode ser um

achado importante, pois o intuito do processo de otimização é a adição de novos grupos químicos nos compostos, de modo que estes possam fazer novas interações que permitam um ganho de afinidade. Porém esta informação só poderia ser válida com a determinação de estruturas cristalográficas dos complexos entre MtDHFR e esses compostos e através da determinação da K_d .

Desta maneira, para a obtenção do modo de ligação com MtDHFR, obtivemos as estruturas cristalográficas para complexos da MtDHFR e esses compostos. A **Tabela 6** mostra as estatísticas de processamento de dados de raios X, do refinamento cristalográfico e qualidade estereoquímica para estas estruturas.

Tabela 6. Processamento de dados de difração e refinamento cristalográfico de complexos de MtDHFR com compostos obtidos por catálogo SAR.

	Composto3	Composto4	Composto1	Composto9	Composto10
Dados de difração de raios-X e refinamento cristalográfico					
# reflexões (únicas)	321255 (26172)	424552 (37420)	224689 (20192)	185433 (14991)	123707 (12361)
Resolução (Å)	46,55 – 1,86	46,73 – 1,66	32,15 – 2,01	46,80 – 2,28	46,83 – 2,45
Grupo espacial	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁				
Cela unitária					
a, b, c (Å)	60,99; 71,13; 72,04	61,38; 70,81; 72,06	61,77; 71,01; 72,10	61,17; 71,49; 72,21	61,52; 72,18; 72,85
α , β , γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90
Completeza (%)	97,60	100,00	93,50	99,50	99,90
Multiplicidade	12,27	11,34	11,12	12,36	10,00
I/ σ (I)	20,20 (2,50)	21,50 (1,80)	12,30 (4,90)	9,50 (2,20)	6,20 (2,80)
R-merge	0,133 (1,21)	0,075 (1,04)	0,150 (0,35)	0,237 (1,26)	0,276 (0,81)
R-pim	0,039 (0,40)	0,023 (0,40)	0,046 (0,11)	0,070 (0,39)	0,091 (0,27)
CC1/2	0,99 (0,70)	0,99 (0,57)	0,99 (0,95)	0,99 (0,80)	0,97 (0,70)
R-factor ^a	0,19	0,20	0,20	0,22	0,20
R-free ^b	0,23	0,23	0,26	0,28	0,24
Qualidade do modelo					
Gráfico de Ramachandran (%)					
"favorável"	97,00	97,00	96,00	96,00	96,00
"desfavorável"	0,64	0,64	0,32	0,00	0,64
Geometria					
"ligação" (Å)	0,033	0,015	0,036	0,043	0,009
"ângulo" (°)	1,48	1,48	1,59	1,40	1,20
Fator de temperatura (B-factor)					
Solvente	30,40	34,55	29,08	28,58	26,28
Ligantes	21,06	24,44	21,94	33,18	33,02

A análise das estruturas cristalográficas para os complexos MtDHFR e esses compostos apresentaram, como esperado, modos de ligação semelhantes aos fragmentos utilizados na busca (**Figura 31**). Isto é, o grupo carboxila dos **Compostos1 e 3** fazem uma interação iônica com a Arg60 e suas partes hidrofóbicas estão acomodadas no sítio hidrofóbico da enzima, realizando interação principalmente com Phe31. Interessantemente, o grupo químico carboxamida, cujos sinais de prótons dos carbonos do anel, em que está presente, foram detectados por STD-NM, apareceram dispostos em regiões diferentes para os dois compostos. Assim, para o **Composto4**, o mesmo interage com a cadeia lateral da Arg60 realizando uma interação de hidrogênio. Por outro lado, para o **Composto3**, apesar de a carboxamida estar próxima da região de ligação de glicerol, nenhuma interação com resíduos deste bolsão foi observada.

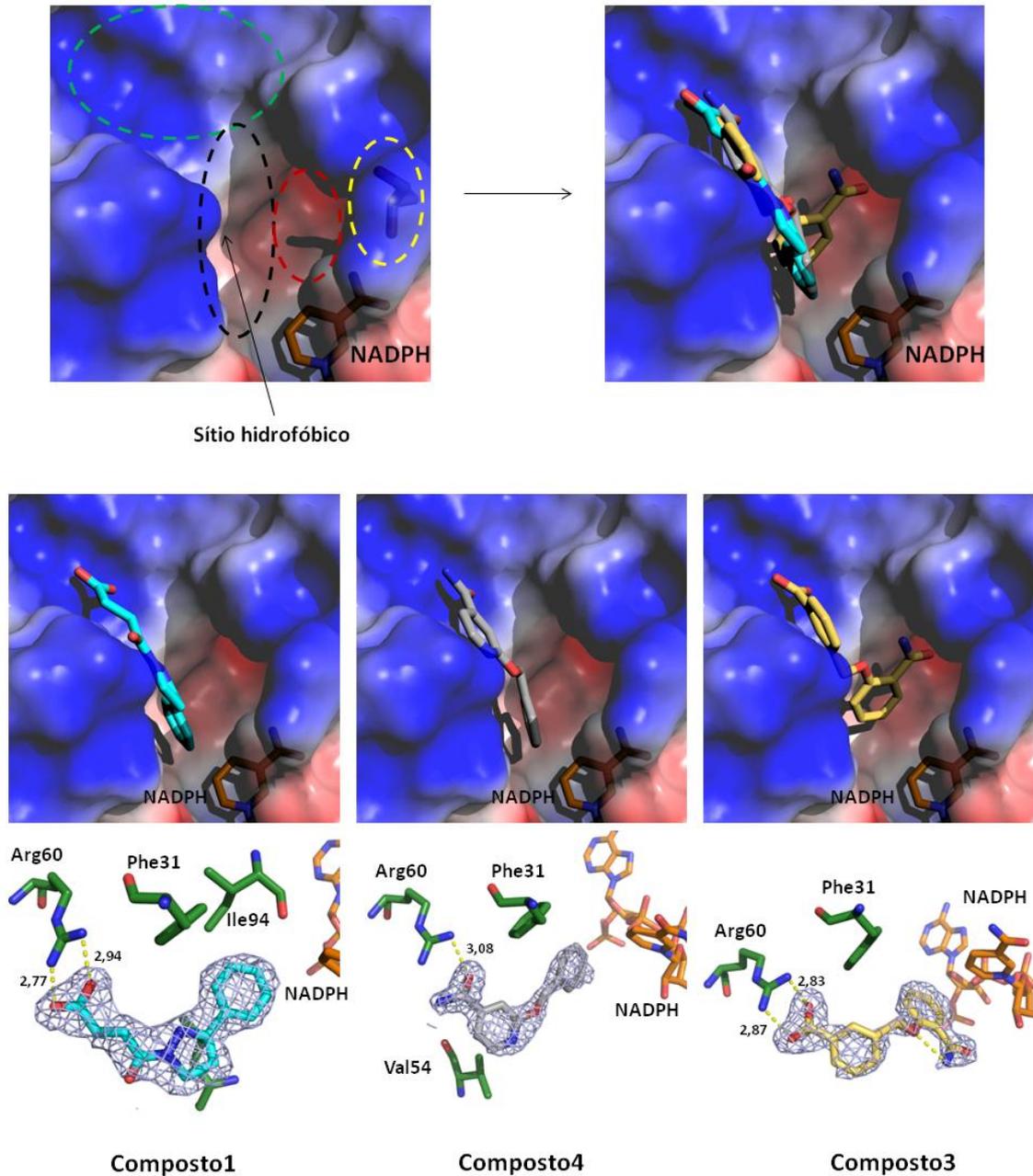


Figura 31. Modos de ligação de compostos análogos aos *hits* de fragmentos obtidos em busca virtual por catálogo SAR. Na parte superior são destacadas as sub-regiões do sítio ativo de MtDHFR. É ilustrado o potencial eletrostático estimado (vermelho: negativo; azul: positivo; branco: neutro). A sub-região eletrostática polar positiva é delimitada por tracejados verdes, a sub-região eletrostática polar negativa é delimitada por tracejados vermelhos. O sítio hidrofóbico é indicado por seta e delimitado por tracejados pretos e o bolsão de glicerol é indicado por tracejados amarelos. Também é mostrada a sobreposição dos modos de ligação dos **Compostos1, 3 e 4**. Na parte inferior são ilustrados os modos de ligação dos **Compostos1, 3 e 4** separadamente com o sítio ativo de MtDHFR e as interações moleculares realizadas. São mostrados os mapas das densidades eletrônicas $2F_o - F_c$ contornados a 1σ . Também são representadas interações iônicas com Arg60 (**Composto1 e 3**) e interações de hidrogênio com Gln28 (**Composto4**) em pontilhados amarelos e distâncias medidas em Å. Imagens geradas no PyMOL.

Embora várias tentativas de obtenção de dados de ITC para estes compostos terem sido realizadas, tivemos dificuldade na padronização das condições experimentais devido a problemas de solubilidade. Assim, somente para o **Composto1** foi possível a realização da titulação e conseqüentemente a obtenção de uma curva que pôde ser tratada para determinação de parâmetros termodinâmicos da interação (**Figura 32**) (**Tabela 7**).

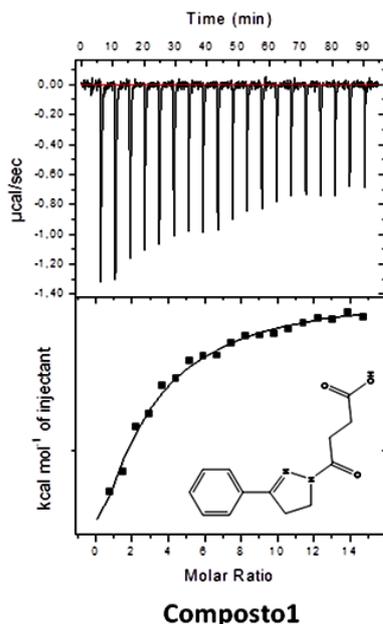


Tabela 7. Parâmetros termodinâmicos da interação do Composto1 com MtDHFR.

Composto1	
ΔG (kcal/mol)	-4,18
ΔH (kcal/mol)	$-9,22 \pm 0,242$
$(-)\Delta S$ (kcal/mol)	5,04
Kd (mM)	$0,746 \pm 0,035$
LE	0,23

Figura 32. Termograma da interação do Composto1 com MtDHFR. É ilustrado o termograma da titulação do **Composto1** presente na seringa com MtDHFR presente na célula em ensaios de calorimetria. Parte superior representa o padrão dos calores de diluição observados em função do tempo em $\mu\text{cal}/\text{segundo}$ e parte inferior representa a variação de entalpia relacionada a cada injeção de ligante em kcal/mol . Figura construída através do programa Origin v.7.0 (MicroCal).

De acordo com o termograma e a **Tabela 7**, o **Composto1** interage com a enzima com uma afinidade de $746 \mu\text{M}$. Esse valor não indica que houve um ganho de afinidade expressivo, sendo inclusive menor do que alguns fragmentos caracterizados anteriormente. Porém, nesta fase de FBDD, torna-se interessante a comparação de algumas características do **Composto1** com algum fragmento mais similar a este que possa enquadrá-lo como um importante ponto de partida em processos futuros de otimização química. Assim, algumas características relacionadas a espectroscopia STD-NMR e perfis termodinâmicos das interações do **Fragmento7** e do **Composto1** são abordadas mais detalhadamente na **Figura 33**.

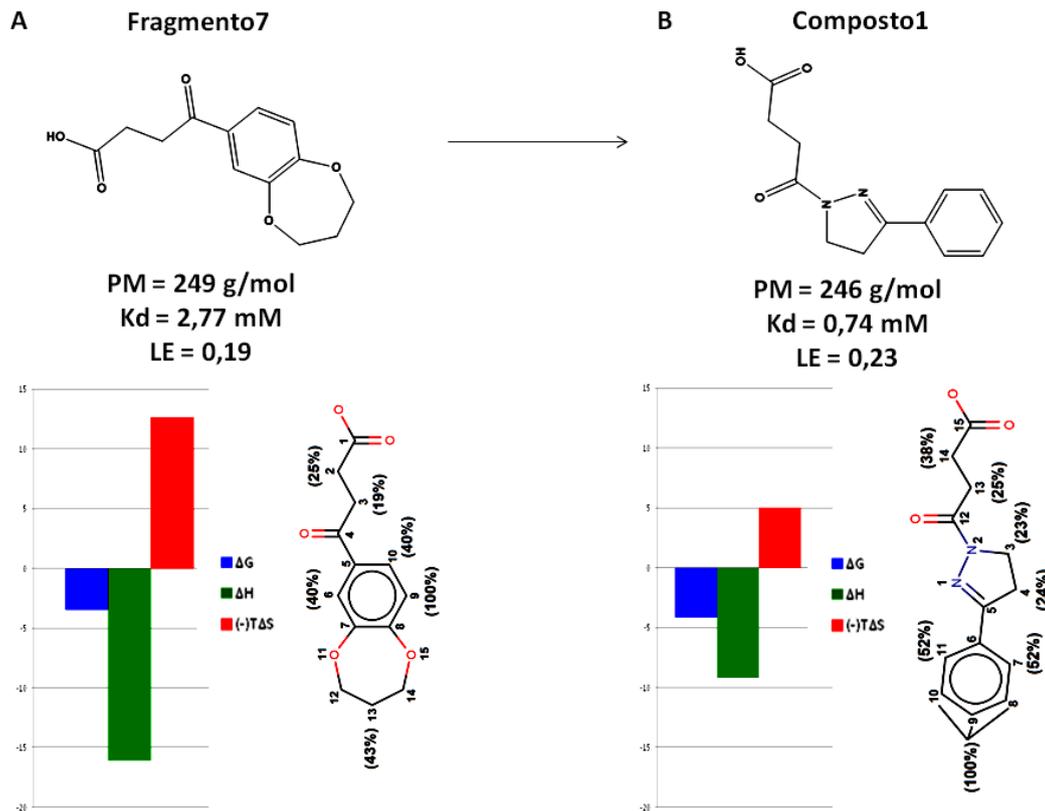


Figura 33. Caracterização biofísica das interações do Fragmento7 e Composto1 com MtDHFR. São representados gráficos com os valores da energia de interação ΔG (Energia livre de Gibbs) em azul, de entalpia (ΔH) em verde e de entropia ($-T\Delta S$) em vermelho na interação com MtDHFR. São ilustrados o peso molecular em g/mol, a constante de dissociação K_d em milimolar e a eficiência de ligação LE. Também são ilustradas as estruturas químicas com as intensidades de sinais de prótons (H^+) medidas em porcentagens em análise de STD-NMR. Esses parâmetros biofísicos foram calculados para o **Fragmento7** (A) e **Composto1** (B).

Quando são comparadas as características verificadas para a interação do **Fragmento7** (Figura 33A) e do **Composto1** (Figura 33B) com o sítio ativo da MtDHFR, nota-se que há um efeito da diferença de grupos químicos presentes em suas estruturas químicas. Neste caso, houve alteração principalmente na entropia, em que foi observada uma diminuição da penalidade entrópica na interação do **Composto1** (5,04), provavelmente devido ao radical fenil, que realiza de forma mais eficiente uma interação hidrofóbica na região do sítio ativo com essa característica. Nota-se também que o valor de entalpia foi de -9,22 kcal/mol e não está relacionado ao fenômeno de compensação entálpica (-16,11 kcal/mol) ocasionada pela alta penalidade de entropia observada para o **Fragmento7** (12,65 kcal/mol). A substituição pelo radical fenil na estrutura química do **Composto1** também favoreceu a

eficiência de ligação (LE), já que o **Composto1** tem menor peso molecular (246 g/mol) e uma afinidade maior (746 μ M) com MtDHFR do que o **Fragmento7** (2,7 mM). Com isso, nota-se claramente o efeito da substituição de grupos químicos e o melhor estabelecimento de interações moleculares inferindo no ganho de afinidade com a enzima. Valores relacionados à contribuição entálpica observada para ambos se referem a interações eletrostáticas promovidas do grupo carboxila com Arg60, já que não houve interações de hidrogênio adicionais do **Composto1** com outros resíduos (**Figura 31**).

A segunda estratégia adotada por catálogo SAR foi a busca de análogos dos fragmentos em bibliotecas construídas de compostos químicos sintetizados nas dependências do Departamento de Química da Universidade de Cambridge no Reino Unido. Em colaboração com o grupo de professor Chris Abell, etapa ainda em andamento, foram identificados alguns compostos promissores com um ganho de afinidade considerável. Esses compostos apresentam similaridade em estrutura com os **Fragmentos4** e **10** caracterizados anteriormente neste trabalho. A escolha dos fragmentos como modelos foi baseada nas caracterizações termodinâmica e estrutural das interações com MtDHFR apresentadas anteriormente. Esse critério baseou-se também nos valores de LE e na facilidade de obtenção de compostos com grupos químicos adicionais em suas estruturas químicas que contribuíssem para a diminuição de penalidade entrópica, ocorrência de novas interações de hidrogênio e ganho de afinidade. Desta maneira, apesar das maiores afinidades com a enzima obtidas (~100 μ M), foram excluídos desse processo o **Fragmento1** devido ao baixo valor de LE (0,20) na interação com MtDHFR e o **Fragmento8** devido a falta de informações do modo de ligação em estrutura cristalográfica. Os fragmentos **4** e **10** tiveram valores de LE de 0,26 e 0,28 respectivamente, apesar do menor peso molecular em relação ao **Fragmento1**, ou seja, nota-se a presença de grupos químicos na estrutura do **Fragmento1** que não são relevantes para a interação. O motivo da busca de compostos baseados no **Fragmento10**, além das características citadas, foi devido a esse fragmento ligar-se adicionalmente no bolsão de ligação de glicerol da MtDHFR. Com isso, esses novos compostos foram inicialmente identificados pelo grupo do Prof. Chris Abell da Universidade de Cambridge, que também realizou suas caracterizações termodinâmicas por ITC (**Figura 34** e **Tabela 8**).

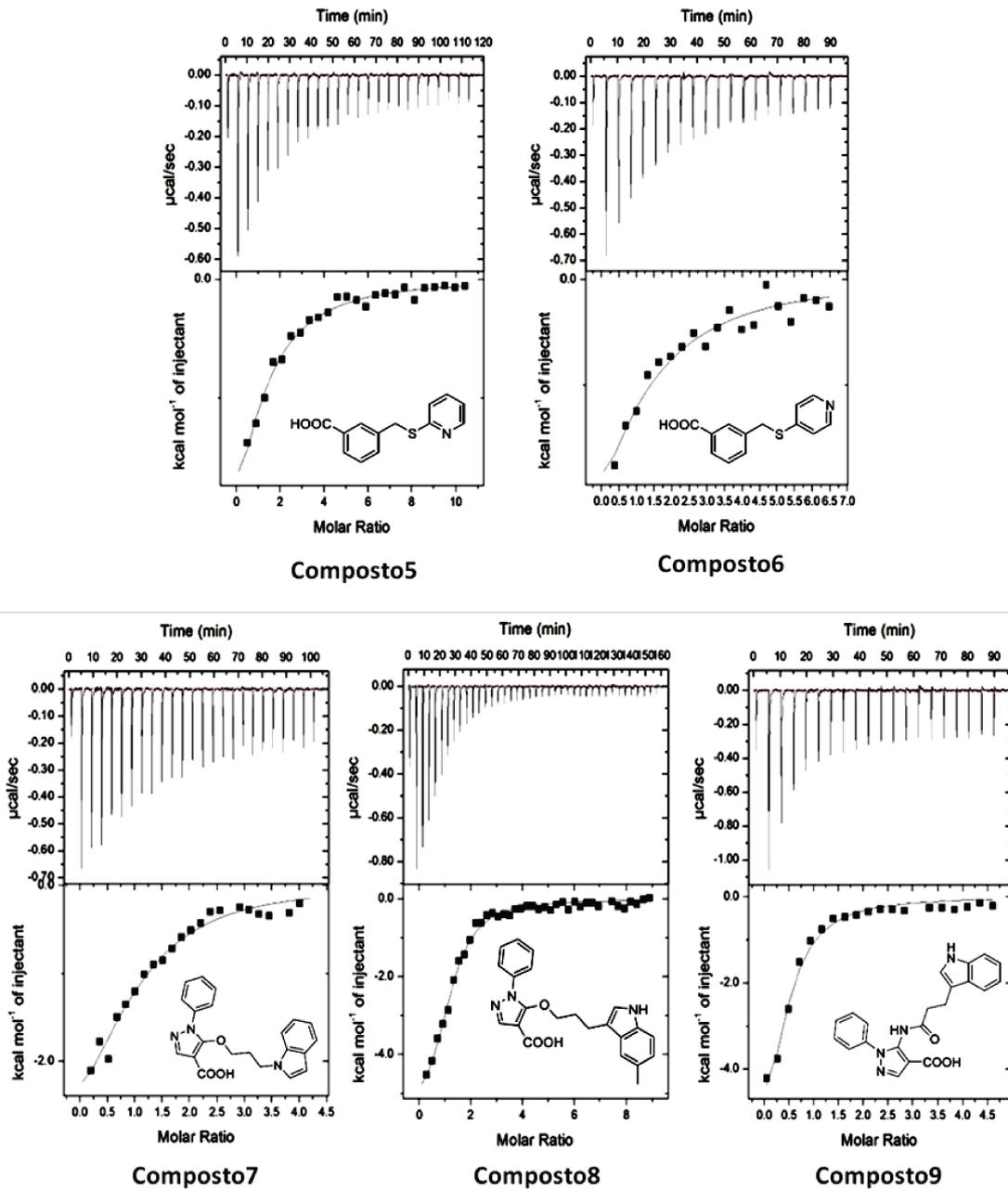


Figura 34. Termogramas da interação de compostos análogos aos Fragmento4 e 10 com MtDHFR. São ilustrados os termogramas das titulações dos compostos análogos ao Fragmento4 e 10 presentes na seringa com MtDHFR presente na célula em ensaios de calorimetria. Parte superior das figuras representa o padrão dos calores de diluição observados em função do tempo em $\mu\text{cal/segundo}$ e parte inferior representa a variação de entalpia relacionada a cada injeção de ligante em kcal/mol . Figuras construídas através do programa Origin v.7.0 (MicroCal) (Alex Hammer/Universidade de Cambridge).

Tabela 8. Parâmetros termodinâmicos das interações entre MtDHFR e compostos análogos aos Fragmentos 4 e 10. Experimentos realizados por Alex Hammer (Universidade de Cambridge).

Composto	ΔG (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)	K_d (mM)	LE
Composto5	-5,30	$-4,43 \pm 0,145$	-0,91	$0,118 \pm 0,009$	0,32
Composto6	-5,21	$-5,43 \pm 0,397$	0,23	$0,157 \pm 0,024$	0,31
Composto7	-5,66	$-3,69 \pm 0,684$	-1,97	$0,065 \pm 0,016$	0,22
Composto8	-6,11	$-8,84 \pm 0,192$	2,69	$0,034 \pm 0,008$	0,22
Composto9	-6,48	$-5,97 \pm 0,279$	-0,51	$0,017 \pm 0,002$	0,24

Para os compostos identificados como análogos aos **Fragmento4** e **10**, a caracterização termodinâmica da interação apresentou alguns pontos cruciais para os ganhos de afinidades observados. Comparando os valores do K_d , que foi de 750 μM para **Fragmento4** (**Tabela 4**), os valores das afinidades dos **Compostos5** e **6** apresentam um K_d de 118 μM e 157 μM , respectivamente (**Tabela 8**), indicando um ganho de afinidade de 6,3 x e 4,7 x. Já para os análogos do **Fragmento10** que teve K_d de 640 μM (**Tabela 4**), o ganho de afinidade foi mais significativo. Os **Compostos7**, **8** e **9** apresentam um K_d de 65 μM , 34 μM e 17 μM , respectivamente e tiveram um ganho de 9,8 x, 18,8 x e 37,6 x em afinidade comparado ao fragmento inicial.

Além das comparações de K_d , algumas ponderações são interessantes quando se compara os parâmetros termodinâmicos para estes compostos que podem justificar o ganho de afinidade com MtDHFR (**Figuras 35 e 36**).

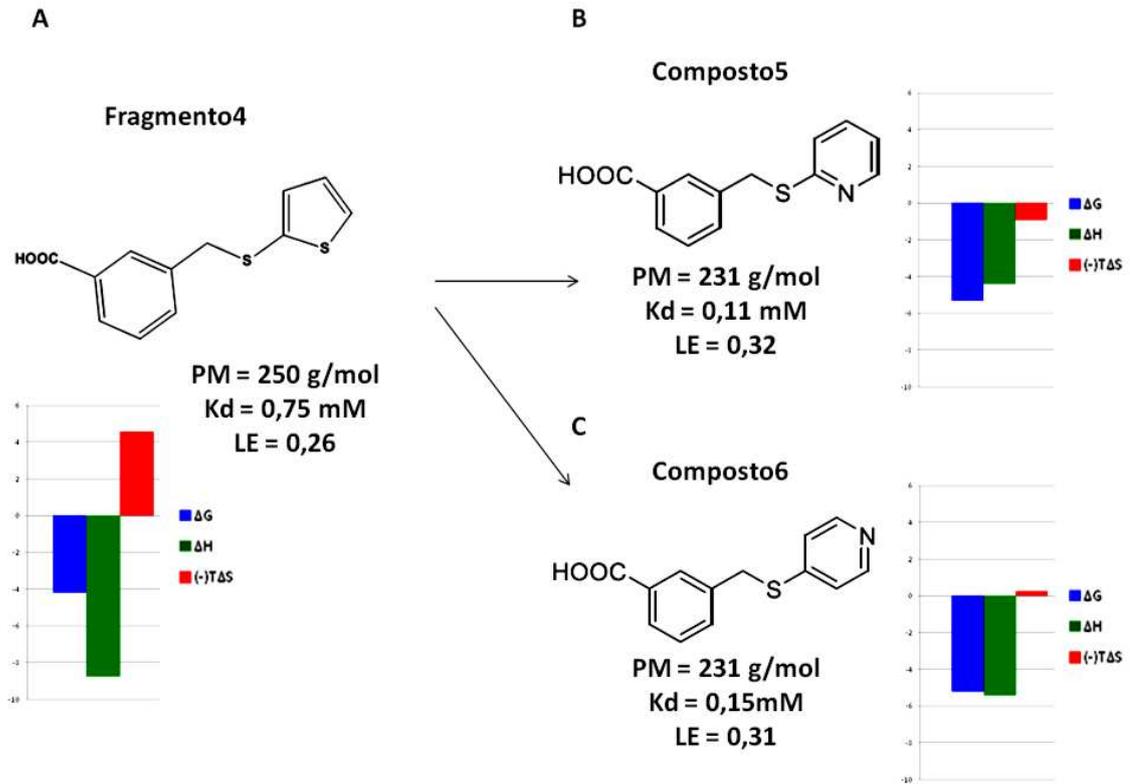


Figura 35. Comparação dos parâmetros termodinâmicos das interações do Fragmento4, Composto5 e Composto6 com MtDHFR. São representados gráficos com os valores da energia de interação ΔG (Energia livre de Gibbs) em azul, de entalpia ΔH em verde e de entropia $(-)\Delta S$ em vermelho na interação com MtDHFR. Também são ilustrados o peso molecular em g/mol, a constante de dissociação K_d em milimolar e a eficiência de ligação (LE). Esses parâmetros termodinâmicos foram calculados para o **Fragmento4** (A), **Composto5** (B) e **Composto6** (C).

Pelos gráficos dos perfis termodinâmicos das interações do **Fragmento4** (Figura35A) e seus análogos com a enzima (Figura 35B e C), apesar de a interação ser regida por entalpia, verificou-se a correção da penalidade entrópica ocasionada provavelmente pela substituição do anel tiofeno presente no **Fragmento4** ($-T\Delta S = 4,57$ kcal/mol) (Figura 35A). Para os **Compostos5** e **6**, ao invés do tiofeno, o grupo piridina parece realizar de forma mais eficiente interações hidrofóbicas pelos valores de entropia que foram de $-0,91$ kcal/mol e $0,23$ kcal/mol, respectivamente (Figura 35B e C). Para o caso do **Composto5**, observou-se ainda uma contribuição entrópica (Figura 35B). Outro ponto importante foi o aumento da eficiência de ligação observada nos análogos e isso está relacionado também à substituição do tiofeno pela piridina, que contribuiu no ganho de afinidade. A substituição promoveu a diminuição do peso molecular dos compostos e LE passou de $0,26$ do **Fragmento4** para $0,32$

e 0,31 dos **Compostos 5 e 6**, respectivamente. Porém, para a confirmação das hipóteses descritas acima, visualização em estrutura cristalográfica ainda é necessária.

Abaixo, são analisados agora os parâmetros de energia que comparam a interação dos **Compostos7, 8 e 9** e do **Fragmento10** com MtDHFR (**Figura 36**).

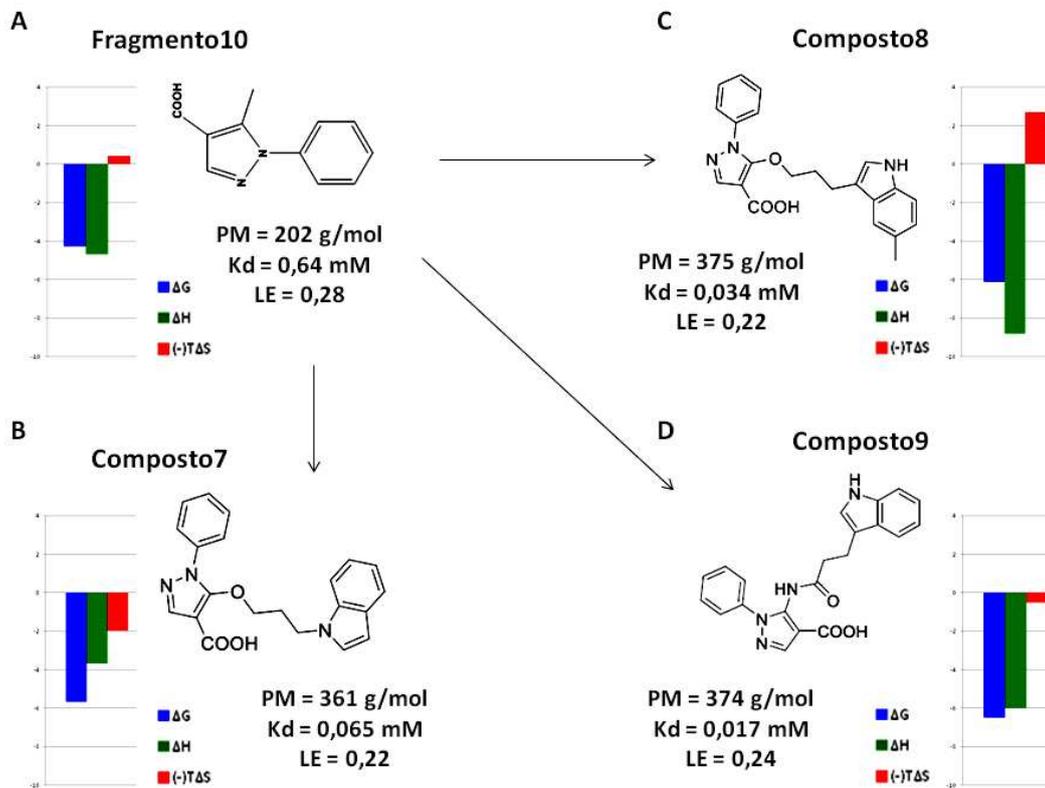


Figura 36. Comparação dos parâmetros termodinâmicos das interações do **Fragmento10**, **Composto7**, **Composto8** e **Composto9** com MtDHFR. São representados gráficos com os valores da energia de interação ΔG (Energia livre de Gibbs) em azul, de entalpia ΔH em verde e de entropia $(-)\Delta S$ em vermelho na interação com MtDHFR. Também são ilustrados o peso molecular em g/mol, a constante de dissociação K_d em milimolar e a eficiência de ligação (LE). Esses parâmetros termodinâmicos foram calculados para o **Fragmento10** (A), **Composto7** (B), **Composto8** (C) e **Composto9** (D).

Como observado pela **Figura 36**, o ganho de afinidade foi mais expressivo para esses três compostos identificados. As altas afinidades adquiridas para esses compostos são regidas por contribuição de entalpia, principalmente para os **Compostos8** (-8,84 kcal/mol) (**Figura 36C**) e **9** (-5,97 kcal/mol) (**Figura 36D**) que provavelmente realizam interações de hidrogênio com outras regiões do sítio ativo. Foram observadas contribuições entrópicas para o **Composto7** (-1,97 kcal/mol) (**Figura 36B**) e para o **Composto9** (-0,51 kcal/mol) (**Figura**

36D), possivelmente pelo melhor estabelecimento de interações hidrofóbicas do grupo indol. Penalidade de entropia somente foi observada para o **Composto8** (2,69 kcal/mol) (**Figura 36C**), provavelmente provocada por algum impedimento estérico pela presença do grupo metil no anel indol, mas esse efeito foi compensado pelo aumento do valor de entalpia (-8,84 kcal/mol) interferindo pouco na afinidade com a enzima (**Figura 36C**). Um ponto positivo está relacionado ao fato da pouca variação relacionada aos valores da eficiência de ligação (LE). Um dos objetivos de campanhas FBDD é o crescimento de fragmentos sem a perda considerável de eficiência de ligação. Para esses compostos, esses valores foram praticamente da mesma magnitude, comparado ao valor de LE do **Fragmento10** (0,28), mesmo com o aumento do peso molecular destes compostos. Isso quer dizer que grupos químicos adicionados nesses compostos provavelmente fazem interações chave no sítio ativo de MtDHFR.

Para a verificação de possíveis interações adicionais que culminaram neste ganho de afinidade com a enzima era necessário a determinação de estruturas cristalográficas. Assim, alguns compostos descritos foram submetidos a ensaios de cristalização. Desta maneira, para se entender o mecanismo de ligação desta série de compostos com MtDHFR, a estrutura do complexo da enzima com o **Composto9** foi obtida (**Figura 37**) e as estatísticas do processamento de dados e refinamento cristalográfico são apresentados na **Tabela 6** (pág 90).

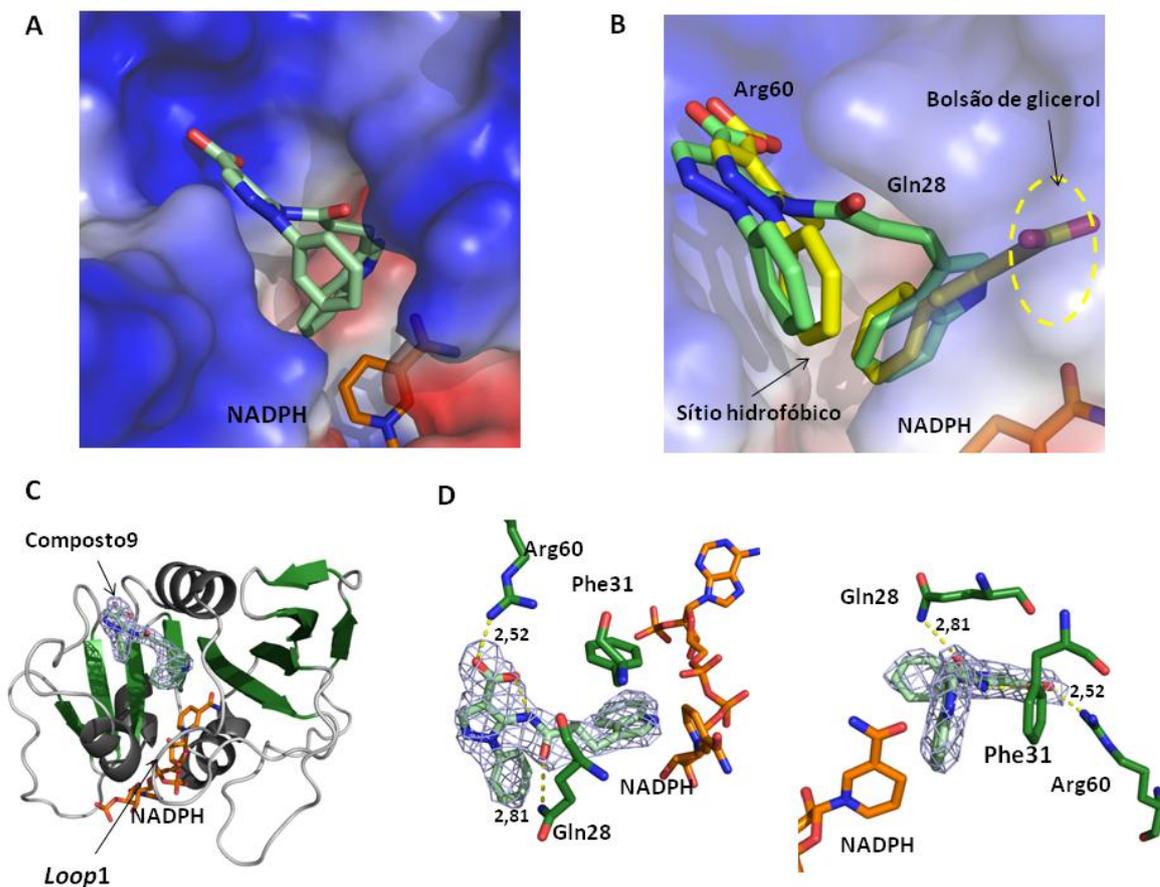


Figura 37. Modo de ligação do Composto9 com a enzima MtDHFR. A) Modo de ligação do **Composto9** com sítio ativo de MtDHFR. É ilustrado o potencial eletrostático estimado de MtDHFR (vermelho: negativo; azul: positivo; branco: neutro). Também é mostrado o modo de ligação do NADPH. B) Sobreposição do modo de ligação do **Composto9** com o modo de ligação do **Fragmento10**. São especificados os resíduos relevantes para a interação, a sub-região hidrofóbica do sítio ativo e o bolsão de glicerol representado por linha tracejada amarela. C) Representação do enovelamento de estruturas secundárias de MtDHFR. É mostrado o mapa da densidade eletrônica $2F_o - F_c$ contornadas a 1σ do **Composto9**. D) Interações moleculares realizadas pelo **Composto9** com o sítio ativo. É mostrado o mapa da densidade eletrônica $2F_o - F_c$ contornado a 1σ do **Composto9**. São representadas interações iônicas com Arg60 e interações de hidrogênio com Gln28 em pontilhados amarelos e distâncias medidas em Å. Imagens geradas no PyMOL.

Pela estrutura cristalográfica representada na **Figura 37**, o grupo indol do **Composto9** realiza interação hidrofóbica com Phe31 e com o anel nicotinamida do NADPH (**Figura 37D**). Também se observa que o **Composto9** realiza uma interação iônica com a Arg60, como observado anteriormente para outros compostos e fragmentos. Entretanto, o ganho de afinidade foi causado por uma nova interação ocorrida pela introdução do grupo amida no **Composto9**. O oxigênio deste grupo realiza uma interação de hidrogênio com o nitrogênio da cadeia lateral da Gln28 e com isso causa um melhor posicionamento deste

composto no sítio ativo de MtDHFR (**Figura 37D**). Como esperado, na sobreposição do **Composto9** com o **Fragmento10** (**Figura 37B**), algumas semelhanças a respeito do modo de ligação são notadas. A parte da estrutura química do **Composto9**, semelhante à estrutura química do **Fragmento10**, realiza o mesmo tipo de interação (iônica com a cadeia lateral da Arg60), porém o grupo indol do **Composto9**, unido pela amida e uma cadeia carbônica, se sobrepõe a parte hidrofóbica da molécula do **Fragmento10** que interage com o bolsão de glicerol. Com isso, planejamento de novas etapas de síntese deve ser realizado e a adição de grupos polares no indol poderá favorecer a formação de interações de hidrogênio com essa região, mimetizando a interação do glicerol presente em estruturas de MtDHFR.

Adicionalmente, foi obtida a estrutura cristalográfica de MtDHFR em complexo com um outro análogo do **Fragmento10** e da mesma série dos **Compostos7, 8 e 9** (dados termodinâmicos não obtidos). Este foi denominado de **Composto10** e o modo de interação com a enzima é mostrado na **Figura 38**. As estatísticas de processamento de dados e refinamento cristalográfico são mostradas na **Tabela6** (pág. 90). A principal diferença entre as estruturas químicas do **Composto10** e os outros compostos da série é a substituição da carboxila dos compostos por uma sulfonamida (**Figura38A**). Essa substituição causou um distanciamento desse grupo da Arg60. Porém, um dos oxigênios da sulfonamida passou a realizar uma interação de hidrogênio com a cadeia lateral da Gln28 (**Figura38C**).

De acordo com a **Figura38B**, a interação do grupo sulfonamida com Gln28 promoveu uma disposição da molécula de modo que seu radical fenil passou a ocupar a cavidade de ligação do glicerol pela interação hidrofóbica com o Trp22. Em análises de sobreposição (**Figura38D**), foi possível comparar os modos de ligação deste composto com o **Fragmento10** e o **Composto9**. Assim como o **Fragmento10**, o **Composto10** ocupa o bolsão de glicerol e a semelhança com o modo de interação do **Composto9** é pela interação hidrofóbica realizada pelo grupo indol com o anel benzeno da cadeia lateral da Phe31 e com o grupo nicotinamida do NADPH.

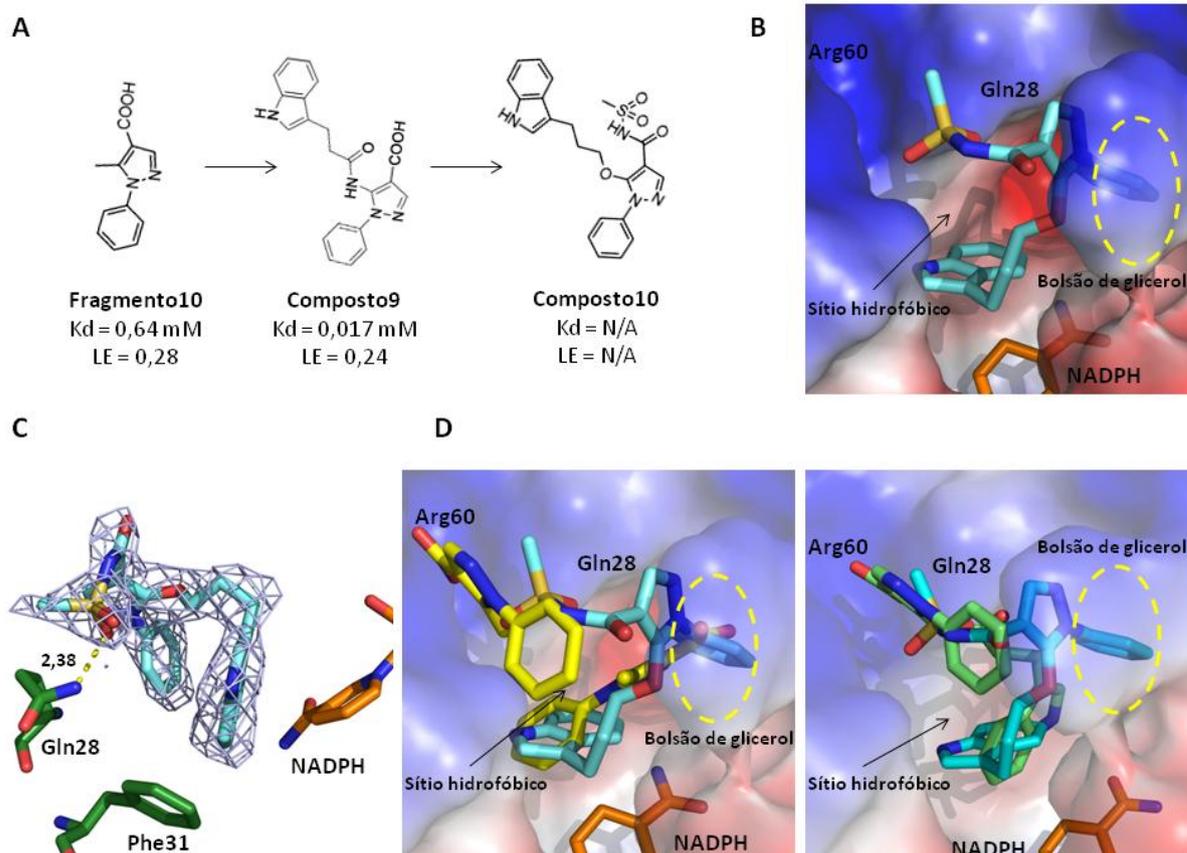


Figura 38. Modo de ligação do Composto10 com a enzima MtDHFR. A) Comparação entre as estruturas químicas do **Fragmento10**, **Composto9** e **Composto10**. B) Modo de ligação do **Composto10** com sítio ativo de MtDHFR. É ilustrado o potencial eletrostático estimado de MtDHFR (vermelho: negativo; azul: positivo; branco: neutro). Também é mostrado o modo de ligação do NADPH e o bolsão de glicerol é destacado por linha tracejada amarela. C) Interações moleculares realizadas pelo **Composto10** com o sítio ativo. É mostrado o mapa da densidade eletrônica $2F_o - F_c$ contornado a 1σ do **Composto10**. São representadas interações de hidrogênio com Gln28 em pontilhados amarelos e distâncias medidas em Å. D) Sobreposição do modo de ligação do **Composto10** com o modo de ligação do **Fragmento10** e do **Composto9**. São especificados os resíduos relevantes para as interações, a sub-região hidrofóbica do sítio ativo e o bolsão de glicerol representado por linha tracejada amarela. Imagens geradas no PyMOL.

De maneira geral, para este trabalho, o catálogo SAR mostrou ser uma estratégia prontamente aplicável no processo de FBDD. Os novos compostos identificados e caracterizados, tanto o **Composto1** obtido de triagem virtual quanto os compostos obtidos em triagem contra uma biblioteca de compostos químicos, foram classificados como os principais pontos de partida para a otimização de novas séries de compostos com maiores afinidades. Entretanto, o **Composto9** já se encontra em uma faixa de afinidade que pode ter alguma

atividade contra o *M. tuberculosis*, que apesar de não ter sido realizado neste trabalho, abre novas perspectivas no desenvolvimento de fármacos contra tuberculose.

5 Conclusão

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram êxito quanto à aplicabilidade da técnica de desenho de fármacos baseada em fragmentos (FBDD) para a enzima diidrofolato redutase de *M. tuberculosis* (MtDHFR) (**Figura 39**). A partir de resultados prévios, a validação e a caracterização das interações de fragmentos com MtDHFR levaram este trabalho ao desenvolvimento e caracterização de moléculas que apresentaram valores de até 100 vezes mais potência em afinidade que os fragmentos iniciais. Conhecida por ser uma estratégia multitécnicas e pela necessidade de obtenção de diversas informações úteis na validação de interações e também no direcionamento de etapas posteriores de otimização química, este trabalho proporcionou um estudo minucioso a respeito do comportamento de algumas moléculas com sítio ativo da enzima.

FBDD - MtDHFR

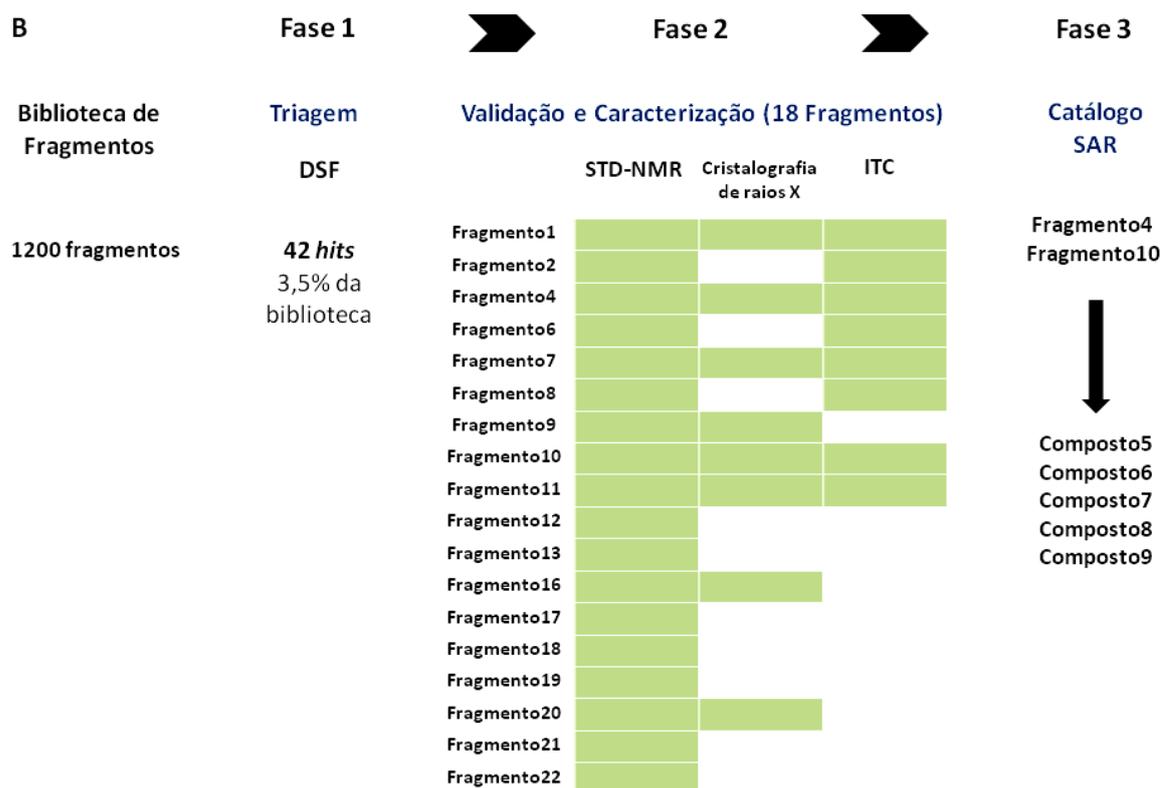
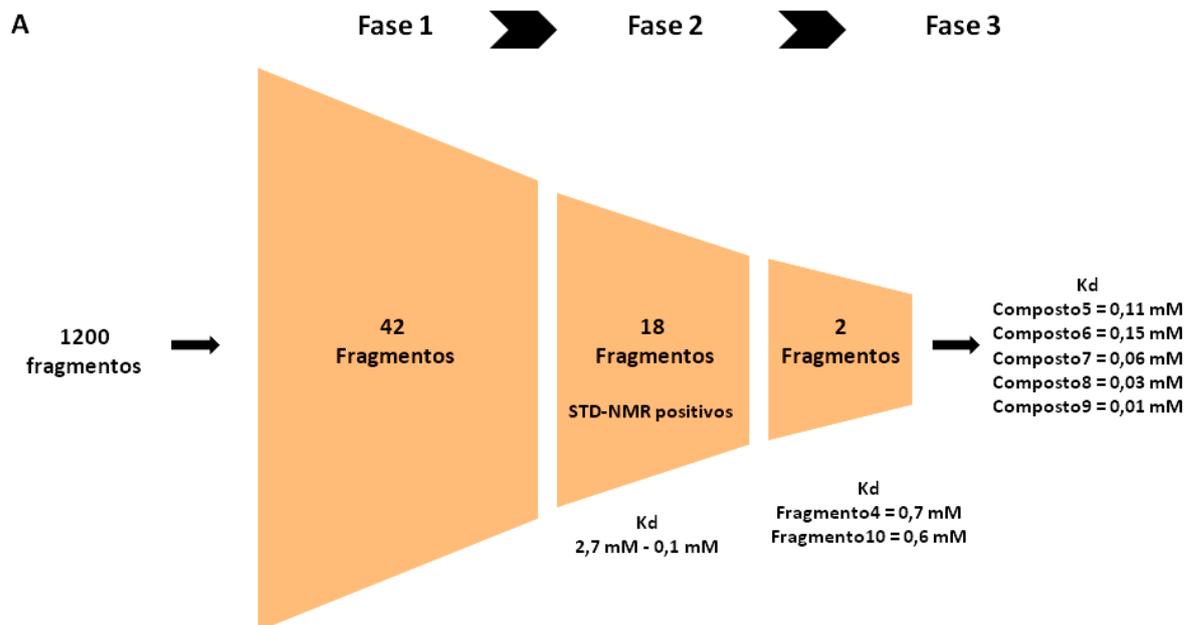


Figura 39. Fluxograma de FBDD aplicado à enzima MtDHFR. **A)** Panorama geral referente às fases de FBDD que foram alcançadas no projeto. São mostrados os números de fragmentos inicialmente triados presentes na biblioteca e os fragmentos mais promissores transferidos para fase 3 de otimização química. Ganho de afinidade é representado pelo valor do K_d (constante de dissociação) em milimolar. **B)** Etapas de FBDD especificando as técnicas utilizadas na triagem (Fase 1), validação e caracterização das interações (Fase 2) e obtenção de novos compostos (Fase 3). Barras em verde representam êxito na obtenção de informações para validação/caracterização através de STD-NMR, cristalografia de raios X e calorimetria para alguns fragmentos.

Pelo fluxograma apresentado da técnica FBDD na **Figura 39**, STD-NMR foi utilizada como um "filtro" para a confirmação dos *hits* de fragmentos obtidos na triagem e foi capaz de inferir alguns principais grupos químicos presentes na estrutura química destes que são relevantes para a interação. Somente os fragmentos que foram positivos para a interação em STD-NMR foram transferidos para estudos termodinâmicos e/ou cristalográficos.

Ensaio de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) foram capazes de quantificar a afinidade de alguns fragmentos positivos em STD-NMR. Afinidades na faixa de 100 μM a 700 μM foram detectadas para os fragmentos mais promissores de atingirem etapas futuras de otimização química. Além disso, a calorimetria também proporcionou uma caracterização energética das interações, em que contribuições de entalpia e entropia foram aferidas, relacionando-as aos tipos de interações moleculares e aos grupos químicos relevantes identificados em STD-NMR.

Um fator limitante no início do projeto foi a dificuldade da reprodutibilidade de experimentos de cristalização. Assim, neste trabalho foi determinada uma nova condição de cristalização diferente das reportadas na literatura. Essa condição de cristalização proporcionou a produção de cristais favoráveis às condições experimentais de ensaios de cocristalização com altas concentrações de fragmentos. Como resultado, foram determinadas várias estruturas tridimensionais de complexos MtDHFR:NADPH:**Fragmentos**. Interações moleculares e balanço energético previstos nos ensaios termodinâmicos puderam ser confirmados e grupos químicos relevantes para a interação em STD-NMR foram observados próximos a resíduos de aminoácidos envolvidos com a interação do DHF. Com isso, além da visualização do modo de ligação destas moléculas no sítio ativo da enzima, novas possibilidades de interações com diferentes regiões do sítio ativo puderam ser discutidas para a síntese de compostos visando o ganho de afinidade.

Por fim, o projeto atingiu o estágio iterativo de otimização, que em colaboração com especialistas em Química Medicinal, foram identificados por catálogo SAR novos compostos análogos aos fragmentos caracterizados. Alguns desses compostos tiveram a interação caracterizada termodinamicamente com confirmação de ganho de afinidade e correções de penalidades entrópicas. Até o momento, afinidades de 34 μM e 17 μM foram atingidas para os compostos mais promissores. Além disso, foi determinada a estrutura cristalográfica para o complexo MtDHFR:NADPH:**Composto9**, que estabeleceu pontos importantes para o ganho de afinidade com a enzima e novas possibilidades de interação com MtDHFR.

Como perspectivas, acreditamos que com esse trabalho geramos conhecimento que permitirá um avanço significativo no desenvolvimento de novos inibidores da MtDHFR que podem ser úteis para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento da tuberculose.

6 Referências Bibliográficas

ADAMS, P.V. et al. Phenix: a comprehensive python-based system for molecular structure solution. *Acta Cryst.allog sect D*, v.66, p.213-221, 2010

AFONINE, R.W. et al. Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.*, 68, 352-67, 2012

ANAND, N. Medicinal chemistry and drug discovery. In Wolff, M.E, p.527-573, 1996

ANDERSON, A.C. Targeting DHFR in parasitic protozoa. *Drug Discov Today*, 10, 121–128, 2005

BACA, A.M. et al. Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropteroate synthase in complex with pterin monophosphate: New insight into the enzymatic mechanism and sulfa-drug action. *J Mol Bio*, v.302, 1193-1212, 2000

BAELL, J.B.; NISSINK, W.M. Seven Year Itch: Pan-Assay Interference Compounds (PAIS) in 2017-Utility and Limitations. *ACS Chem. Biol*, 13, 36–44, 2018

BAILEY, S. CCP4 suite – programs for protein crystallography. *Acta Crystallog sect D*, v.50, p.760-763, 1994

BERMINGHAM, A.; DERRICK, J.P. The folic acid biosynthesis pathway in bacteria: evaluation of potential for antibacterial drug discovery. *BioEssays*, v24, p.637-648, 2002

BERMUDEZ, L.E. et al. Mycobacteria and macrophage apoptosis: complex struggle for survival. *Microbe*, 1, 372–375, 2006

BERTOLLI FILHO, C. História social da tuberculose e do tuberculoso: 1900-1950. Rio de Janeiro, Editora FIOCRUZ, Antropologia & Saúde collection, 248p., 2001

BHABHA, G. et al. Divergent evolution of protein conformational dynamics in dihydrofolate reductase. *Nat Struct Mol Biol*, 20(11), 1243-1249, 2013

BLAIR, H.A.; SCOTT, L.J. Delamanid: a review of its use in patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Drugs*, 75, (1), 91–100, 2015

BLUNDELL, T.L. Protein crystallography and drug discovery: recollections of knowledge exchange between academia and industry. *IUCrJ*, 4, 308–321, 2017

BLUNDELL, T.L. Structure-based drug design. *Nature*, 384, S23–S26, 1996

BLUNDELL, T.L.; JHOTI, H.; ABELL, C. High-throughput crystallography for lead discovery in drug design. *nature reviews | drug discovery*, volume 1, 45-54, january 2002

BLUNDELL, T.L.; MIZUGUCHI, K. Structural genomics: an overview. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 73, 289–295, 2000

BURMAN, L.G. The antimicrobial activities of trimethoprim and sulfonamides. *Scand J Infect Dis*, v.18, p.3-13, 1986

CALA, O.; KRIMM, I. Ligand-Orientation Based Fragment Selection in STD NMR Screening. *J. Med. Chem.*, 58, 8739–8742, 2015

CAMPBELL, S.F. Science, art and drug discovery: a personal Perspective. *Clin. Sci.*, 99, 255–260, 2000

CARDONA, P.J. New insights on the nature of latent tuberculosis infection and its treatment. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 6, 27–39, 2007

CARDONA, P.J. Revisiting the Natural History of Tuberculosis The Inclusion of Constant Reinfection, Host Tolerance, and Damage-Response Frameworks Leads to a Better Understanding of Latent Infection and its Evolution towards Active Disease. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 58, 7–14, 2010

CARR, R.A. et al. Fragment-based lead discovery: leads by design. *Drug Discov Today*, v.10, p.987-992, 2005

CHEN, I.J.; HUBBARD, R.E. Lessons for fragment library design: Analysis of output from multiple screening campaigns. *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, 23, 603–620, 2009

CHEN, V.B. et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Cryst*, D66, 16-21, 2010

CHERNOV, A.A. Protein crystals and their growth. *J. Struct. Biol.*, **142** (1), 3–21, 2003

CIPRIANI, P. et al. Methotrexate: an old new drug in autoimmune disease. *Expert Rev Clin Immunol*, **10**(11), 1519-1530, 2014

CIULLI, A. Biophysical Screening for the Discovery of Small-Molecule Ligands. *Methods Mol Biol*, 1008, 357–388, 2013

CIULLI, A.; ABELL, C. Fragment-based approaches to enzyme inhibition. *Curr Opin Biotechnol*, 18(6), 489–496, December 2007

CONGREVE, M. et al. A ‘rule of three’ for fragmentbased lead discovery? *Drug Discov. Today*, 8, 876–877, 2003

CRUBE'ZY, E.' et al. Identification of Mycobacterium DNA in an Egyptian Pott's disease of 5400 years old. *C R Acad Sci Paris (Sciences de la vie)*, 321, 941–51, 1998

DALCOLMO, M.P. Tuberculose multirresistente no Brasil: histórico e medidas de controle. *Rev Saúde Pública*, 41(Supl.1):34-42, 2007

DANIEL, .TM. Captain of death: the story of tuberculosis. University of Rochester Press, 1997

- DANIEL, T.M. Leon Charles Albert Calmette and BCG vaccine. *Int J Tuberc Lung Dis*, 9, 205–6, 2005
- DANIEL, T.M. Rene´ Theophile Hyacinthe Laennec and the founding of pulmonary medicine. *Int J Tuberc Lung Dis*, 8, 517–8, 2004
- DANIEL, T.M. The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine*, 100, 1862–1870, 2006
- DANIEL, T.M. The origins and precolonial epidemiology of tuberculosis in the Americas: can we figure them out?. *Int J Tuberc Lung Dis*, 4, 395–400, 2000
- De KLOE, G.E. et al. Transforming fragments into candidates: small becomes big in medicinal chemistry. *Drug Discov Today*, v.14, p.630-646, 2009
- DEBNATH, A.K. Pharmacophore mapping of a series of 2,4-diamino-5-deazapteridine inhibitors of *Mycobacterium avium* complex dihydrofolate reductase. *J Med Chem*, 45, 41–53, 2002
- DeLANO, W.L. Pymol Molecular graphics system. DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA, 2002
- DEY, B.; BISHAI, W.R. Crosstalk between *Mycobacterium tuberculosis* and the host cell. *Semin Immunol*, 26, 6, 486–496, 2014
- DHOPLE, A.M. In vitro and in vivo activity of K-130, a dihydrofolate reductase inhibitor, against *Mycobacterium leprae*. *Arzneim Forsch/Drug Res*, 49, 267–71, 1999
- DHOPLE, A.M. In vitro activity of epiroprim, a dihydrofolate reductase inhibitor, singly and in combination with dapson, against *Mycobacterium leprae*. *Int J Antimicrob Agents*, 19, 71–4, 2002
- DIACON, A.H. et al. The diarylquinoline TMC207 for multidrug-resistant tuberculosis. *N Engl J Med*, 360, 2397-405, 2009
- DIAS, M.V.B. et al. Mycobacterium tuberculosis Dihydrofolate Reductase Reveals Two Conformational States and a Possible Low Affinity Mechanism to Antifolate Drugs. *Structure*, 22, 94–103, January 2014
- DIAS, M.V.B. et al. Folate biosynthesis pathway: mechanisms and insights into drug design for infectious diseases. *Future Med. Chem.*, 10 (8), 935 – 959, 2018
- DIAZ, G. et al. Changes in the Membrane-Associated Proteins of Exosomes Released from Human Macrophages after *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Sci. Rep.*, 6, 37975; doi: 10.1038, 2016
- ECHOLS, N. et al. Automating crystallographic structure solution and refinement of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 70, 144-54, 2014

- EDINK, E. et al. Fragment Growing Induces Conformational Changes in Acetylcholine-Binding Protein: A Structural and Thermodynamic Analysis. *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 5363–5371, 2011
- EL-HAMAMSY, M. et al. Structure-based design, synthesis and preliminary evaluation of selective inhibitors of dihydrofolate reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorg Med Chem*, 15, 4552-4576, 2007
- EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallog Sect D*, v.60, p.2126-2132, 2004
- EVANS, P.R. An introduction to data reduction: space-group determination, scaling and intensity statistics. *Acta Cryst*, D67, 282-292, 2011
- FERENCZY, G.G.; KESERU, G.M. Thermodynamics of fragment binding. *J. Chem. Inf. Model.*, 52, 1039–1045, 2012
- FRANCIS, K.; KOHEN, A. Protein motions and the activation of the CH bond catalyzed by dihydrofolate reductase. *Curr Opin Chem Biol*, 21, 19-24, 2014
- FREY, K. et al., Crystal Structures of Wild-type and Mutant Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Dihydrofolate Reductase Reveal an Alternative Conformation of NADPH that may be Linked to Trimethoprim Resistance. *J Mol Biol*, 387, 1298–308, 2009
- FU, Y.R. et al. Differential Transcriptional Response in Macrophages Infected with Cell Wall Deficient versus Normal *Mycobacterium Tuberculosis*. *Int. J. Biol. Sci.*, Vol. 11, 1, 22-30, 2015
- GANGJEE, A. et al. Dihydrofolate reductase as a target for chemotherapy in parasites. *Curr Pharm Des*, 13(6), 609-639, 2007
- GEERLOF, A. et al. The impact of protein characterization in structural proteomics. *Acta Crystallographica D.*, 62 (Pt 10), 1125–36, 2006
- GERUM, A.B. et al. Novel *Saccharomyces cerevisiae* screen identifies WR99210 analogues that inhibit *Mycobacterium tuberculosis* dihydrofolate reductase. *Antimicrob Agents Chemother*, 46, 3362–3369, 2002
- GOULDING, C.W. et al. Regulation by oligomerization in a mycobacterium folate biosynthetic enzyme. *J Mol Bio*, v.349, p.61-72, 2005
- GREER, J. et al. Application of the three-dimensional structures of protein target molecules in structure-based drug design. *J. Med. Chem.*, 37, 1035–1054, 1994
- GROSSET et al. Modeling early bactericidal activity in murine tuberculosis provides insights into the activity of isoniazid and pyrazinamide. *Proc Natl Acad Sci*, 11;109(37):15001-5, Sep 2012
- HAJIAN, B. et al. Propargyl-Linked Antifolates Are Potent Inhibitors of Drug-Sensitive and Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE*, 11(8), e0161740, 2016

- HAWSER, S. et al. Dihydrofolate reductase inhibitors as antibacterial agents. *Biochem Pharmacol*, 71(7), 941-948, 2006
- HENDERSON, G.B.; HUENNEKENS, F.M. Membrane-associated folate transport proteins. *Methods Enzymol*, 122:260–269, 1986
- HUBBARD, R.E. Fragment approaches in structure-based drug discovery. *Journal of synchrotron radiation*, 15, Part 3, 227-230, 2008
- HUNG, A.W. et al. Optimization of Inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* Pantothenate Synthetase Based on Group Efficiency Analysis. *ChemMedChem*, 11, 38 – 42, 2016
- IRWIN; STERLING; MYSINGER; BOLSTAD; COLEMAN. *J. Chem. Inf. Model.*, DOI:10.1021/ci3001277, 2012
- JHOTI, H. et al. Fragment-based screening using X-ray crystallography and NMR spectroscopy. *Current Opinion in Chemical Biology*, 11, 485–493, 2007
- JHOTI, H. et al. The 'rule of three' for fragment-based drug discovery: where are we now? *Nat. Rev. Drug. Discovery*, 12, 644–645, 2013
- JHOTI, H.; LEACH, A. *Structure-based drug discovery*. Dordrecht:Springer, 249 p., 2007
- KARAWAJCZYK, A. et al. Expansion of chemical space for collaborative lead generation and drug discovery: the European Lead Factory Perspective. *Drug Discovery Today*, Volume 20, Number 11, 1310-1316, November 2015
- KAUFMANN, S.H. et al. *Mycobacterium tuberculosis* and the host response. *J Exp Med*, 201,1693–1697, 2005
- KIESER, K.J.; RUBIN, E.J. How sisters grow apart: mycobacterial growth and division. *nature reviews/microbiology*, volume 12, august 2014
- KRANZ, J.K; SCHALK-HIHI, C. Protein thermal shifts to identify low molecular weight fragments. *Methods Enzymol*, v. 493, p. 277-298, 2011
- KUMAR, A. et al. A focused screen identifies antifolates with activity on *Mycobacterium tuberculosis*. *ACS Infect Dis*, 1, 604–14, 2015
- KUMAR, A. et al. High-throughput Screening and Sensitized Bacteria Identify an *M. tuberculosis* Dihydrofolate Reductase Inhibitor with Whole Cell Activity. *PLoS ONE*, 7(6), e39961, 2012
- LADBURY, J.E. et al. Adding calorimetric data to decision making in lead discovery: a hot tip. *nature reviews | Drug Discovery*, voLume 9, 23-27, 2010
- LELE, A.C. et al. Design and Synthesis of a Focused Library of Diamino Triazines as Potential *Mycobacterium tuberculosis* DHFR Inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.*, 6, 1140–1144, 2015

- LI, R. et al. Three-dimensional structure of *M. tuberculosis* dihydrofolate reductase reveals opportunities for the design of novel tuberculosis drugs. *J Mol Biol*, v.295, p.307-323, 2000
- LIPINSKI, C.A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 46, 3–26, 2001
- LIU, C.T. et al. Escherichia coli dihydrofolate reductase catalyzed proton and hydride transfers: temporal order and the roles of Asp27 and Tyr100. *Proc Natl Acad Sci*, 111(51), 18231-18236, 2014
- MALHOTRA, S. et al. Structure-guided, target-based drug discovery – exploiting genome information from HIV to mycobacterial infections. *Postępy Biochemii*, 62(3), 262-272, 2016
- MARCHETTI, C. et al. Fragment-based approaches to TB drugs. *Parasitology*, Volume 145, 2, pp. 184-195, 2017
- MATTHEWS, D.A. et al. Dihydrofolate reductase: x-ray structure of the binary complex with methotrexate. *Science*, 197(4302), 452-455, 1977
- MCCARTHY, J.D. et al. Fragment-based lead discovery and design. *J. Chem. Inf. Model.*, 54, 693–704, 2014
- McCOY, A.J. et al. Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr.*, 40, 658-674, 2007
- McGUIRE, J.J. Anticancer antifolates: current status and future directions. *Curr Pharm Des*, 9(31), 2593-2613, 2003
- MIGLIORI, G.B. et al. Extensively drug-resistant tuberculosis, Italy and Germany. *Emerg Infect Dis*, 13(5):780-2, May 2007
- MITCHISON, D.A. The control of tuberculosis: progress & prospect. *Indian J Med Res*, 121(3):137-9, Mar 2005
- MURRAY, C.W. et al. Validity of ligand efficiency metrics. *ACS Med. Chem. Lett.*, 5, 616–618, 2014
- MURRAY, C.W.; BLUNDELL, T.L. Structural biology in fragment-based drug design. *Curr Opin Struc Bio*, v.20, p.497-507, 2010
- MURRAY, C.W.; REES, D.C. The rise of fragment-based drug discovery. *Nat Chem*, v.1, p.187-192, 2009
- MURRAY, J.F.; SCHRAUFNAGEL D.E.; HOPEWELL P.C. Treatment of Tuberculosis A Historical Perspective. *Ann Am Thorac Soc*, Vol 12, No 12, pp 1749–1759, Dec 2015
- NIXON, M. et al. Folate Pathway Disruption Leads to Critical Disruption of Methionine Derivatives in Mycobacterium tuberculosis. *Chem Biol*, 21, 819–30, 2014

- OYEN, D. et al. Cofactor-Mediated Conformational Dynamics Promote Product Release From Escherichia coli Dihydrofolate Reductase via an Allosteric Pathway. *J Am Chem Soc*, 137(29), 9459-9468, 2015
- PANTOLIANO, M.W. et al. High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery. *J Biomol Screen*, v.6, p.429-440, 2001
- PENG, C. et al. Fast and Efficient Fragment-Based Lead Generation by Fully Automated Processing and Analysis of Ligand-Observed NMR Binding Data. *J. Med. Chem.*, 59, 3303–3310, 2016
- PIETERS, J. Mycobacterium tuberculosis and the Macrophage: Maintaining a Balance. *Cell Host & Microbe*, 3, 399-407, June 2008
- RUPP, B.; WANG, J. Predictive models for protein crystallization. *Methods*, 34 (3), 390–407, 2004
- RUSSELL, D.G. Mycobacterium tuberculosis: here today, and here tomorrow. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, 2, 569–577, 2001
- SAMMES, P.G. *Comprehensive medicinal chemistry*. Oxford:Pergamon Press, p.255-270, 1990
- SAWAYA, M.R.; KRAUT, J. Loop and subdomain movements in the mechanism of Escherichia coli dihydrofolate reductase: crystallographic evidence. *Biochemistry*, 36(3), 586-603, 1997
- SCHIEBEL, J. et al. One Question, Multiple Answers: Biochemical and Biophysical Screening Methods Retrieve Deviating Fragment Hit Lists. *ChemMedChem*, 10, 1511 – 1521, 2015
- SCHIEBEL, J.S. et al. Six Biophysical Screening Methods Miss a Large Proportion of Crystallographically Discovered Fragment Hits: A Case Study. *ACS Chem. Biol.*, 11, 1693–1701, 2016
- SCHNEIDER, P. et al. Iclaprim, a novel diaminopyrimidine with potent activity on trimethoprim sensitive and resistant bacteria. *Bioorg Med Chem Lett*, 13, 4217–21, 2003
- SCOTT, D.E. et al. Fragment-Based Approaches in Drug Discovery and Chemical Biology. *Biochemistry*, 51, 4990–5003, 2012
- SES/Sinan/Ministério da Saúde/ IBGE e Estimativas, 2016
- SILVA, M. et al. Epitope mapping of imidazolium cations in ionic liquid-protein interactions unveils the balance between hydrophobicity and electrostatics towards protein destabilisation. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 16, 23394–23403, 2014
- SILVA, V.M. et al. Factors associated with humoral response to ESAT-6, 38 kDa and 14 kDa in patients with a spectrum of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*, 7(5):478-84, May 2003

- SILVESTRE, H.L. et al. Integrated biophysical approach to fragment screening and validation for fragment-based lead discovery. *PNAS*, vol.110, 32, 12984–12989, 2013
- SINCAK, C.A.; SCHMIDT, J.M. Iclaprim, a novel diaminopyrimidine for the treatment of resistant gram-positive infections. *Ann Pharmacother*, 43(6), 1107-1114, 2009
- SULING, W.J; MADDY, J.A. Antimycobacterial activity of 1-deaza-7,8-dihydropteridine derivatives against *Mycobacterium avium* complex in vitro. *J Antimicrob Chemother*, 47, 451–4, 2001
- TANOLI, N.U. et al. Evaluation of binding competition and group epitopes of acetylcholinesterase inhibitors by STD NMR, Tr-NOESY, DOSY and molecular docking: an old approach but new findings. *Med. Chem. Commun*, 6, 1882–1890, 2015
- THOMAS, S.E. et al. Structural Biology and the Design of New Therapeutics: From HIV and Cancer to Mycobacterial Infections A Paper Dedicated to John Kendrew. *J Mol Biol*, 429, 2677–2693, 2017
- VANDERVEN, B.C. The minimal unit of infection: *M. tuberculosis* in the macrophage. *Microbiol Spectr*, 4, 6, December 2016
- WALLIS, R.S. et al. Tuberculosis—advances in development of new drugs, treatment regimens, host-directed therapies, and biomarkers. *Lancet Infect Dis*, 16: e34–46, 2016
- WAN, Q. et al. Toward resolving the catalytic mechanism of dihydrofolate reductase using neutron and ultrahigh-resolution X-ray crystallography. *Proc Natl Acad Sci*, 111(51), 18225-18230, 2014
- WHITTLE, P.J.; BLUNDELL, T.L. Protein structure-based drug design. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 23, 349–375, 1994
- WHO / Global Tuberculosis Report, 2016
- WHO / Global Tuberculosis Report, 2017
- WINN, L.C. et al. Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr*, 40, 658-674, 2007
- YANG, H. et al. Interaction of lafutidine in binding to human serum albumin in gastric ulcer therapy: STD-NMR, WaterLOGSYNMR, NMR relaxation times, Tr-NOESY, molecule docking, and spectroscopic studies. *Arch. Biochem. Biophys.*, 606, 81–89, 2016
- YOUNG, P.G. et al. Structure of *Mycobacterium tuberculosis* folylpolyglutamate synthase complexed with ADP and AMPPCP. *Acta Cryst D*, v.64, p.745-753, 2008
- ZARTLER, E.R.; SHAPIRO, M. Fragment-based drug discovery: a practical approach. Chichester: John Wiley & Sons, 285 p., 2008
- ZHENG, J. et al. para-Aminosalicylic acid is a prodrug targeting dihydrofolate reductase in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem*, 288(32), 23447-23456, 2013

7 Apêndice

Review

For reprint orders, please contact: reprints@future-science.com

Future
**Medicinal
Chemistry**

Folate biosynthesis pathway: mechanisms and insights into drug design for infectious diseases

Marcio V Bertacine Dias^{*1,2,3}, Jademilson C Santos¹, Gerardo A Libreros-Zúñiga^{1,3,4}, João A Ribeiro^{1,2} & Sair M Chavez-Pacheco¹

¹Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Microbiologia, Avenida Professor Lineu Prestes, 1374, Butantã, 05508000, São Paulo, SP, Brasil

²Universidade Estadual de Campinas, Programa de Pós-Graduação em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos, Instituto de Biologia, CPG/IB/UNICAMP, Rua Monteiro Lobato, 255, Cidade Universitária, CEP 13083-862, Campinas/SP, Brazil

³Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE, Rua Cristóvão Colombo, 2265, São José do Rio Preto, São Paulo, 15054-000, Brasil

⁴Universidad del Valle, Facultad de Salud, Escuela de Ciencias Básicas, Departamento de Microbiología, Calle 4B # 36-00, Cali, Valle, Colombia

* Author for correspondence: Tel.: +55 113 091 7420; mvdias@usp.br

Folate pathway is a key target for the development of new drugs against infectious diseases since the discovery of sulfa drugs and trimethoprim. The knowledge about this pathway has increased in the last years and the catalytic mechanism and structures of all enzymes of the pathway are fairly understood. In addition, differences among enzymes from prokaryotes and eukaryotes could be used for the design of specific inhibitors. In this review, we show a panorama of progress that has been achieved within the folate pathway obtained in the last years. We explored the structure and mechanism of enzymes, several genetic features, strategies, and approaches used in the design of new inhibitors that have been used as targets in pathogen chemotherapy.

8 Anexos



**Sociedade Brasileira de Bioquímica e
Biologia Molecular - SBBq**

CERTIFICATE

We hereby certify that the abstract entitled

**Integration of Biophysics Techniques Confirms the Interaction of New
Compounds to Mycobacterium tuberculosis Dihydrofolate Reductase
(L13)**

By authors: RIBEIRO, J.A. 1,2, Sforça, M.L. 2, Rocco, S.A. 2, Tyrakis, P. 3, Blundell, T.L. 3,
DIAS, M.V.B. 2 from 1 UNICAMP-Instituto de Biologia (Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Tecnologia de Produtos Biotivos), 2 (LNBio-CNPq, Caixa Postal 6192
- 13063-970 - Campinas/SP), 3 University of Cambridge (Department of Biochemistry,
Cambridge-UK)

received the **"SBBq AWARD"** for the best poster presented during the XLIII Annual
Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq),
May 17th to 20th, 2014, in the Convention Center of the Rafain Palace Hotel in Foz
do Iguaçu, Paraná, Brazil.

May 20th, 2014



Moacir Wajner
President of SBBq



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109. 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao **§5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15**, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Tese de Doutorado, intitulada "**APLICAÇÃO DA TÉCNICA FBDD "FRAGMENT BASED DRUG DISCOVERY" PARA A ENZIMA DHFR DA VIA DE BIOSÍNTESE DE FOLATOS EM MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS**", desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: João Augusto Ribeiro
Nome do(a) aluno(a): João Augusto Ribeiro

Assinatura: Marcio Vinicius Bertacine Dias
Nome do(a) orientador(a): Prof. Dr. Marcio Vinicius Bertacine Dias

Data: 15/082018

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos à arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **APLICAÇÃO DA TÉCNICA FBDD “FRAGMENT BASED DRUG DISCOVERY” PARA A ENZIMA DHFR DA VIA DE BIOSÍNTESE DE FOLATOS EM MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 15 de agosto de 2018.

Assinatura : João Augusto Ribeiro
Nome do(a) autor(a): **João Augusto Ribeiro**
RG n.º 8896467-5

Assinatura : Marcio Vinicius Bertacine Dias
Nome do(a) orientador(a): **Prof. Dr. Marcio Vinicius Bertacine Dias**
RG n.º 20270420-8

FINANCIAMENTO

