



IV Mostra de Pesquisa
da Pós-Graduação
PUCRS

Aplicação de Virtual Screening para descoberta de novos potenciais inibidores de EPSPS de *Mycobacterium tuberculosis*

Rafael Andrade Caceres, Luis Augusto Basso, Diógenes Santiago Santos, Walter Filgueira de Azevedo Junior (orientador)

Programa de Pós-Graduação Em medicina e Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, PUCRS,

Resumo

Mycobacterium tuberculosis é considerado o segundo agente infeccioso que mais mata no mundo, estando atrás apenas do vírus da imunodeficiência humana (HIV). De acordo com a última pesquisa da Organização Mundial da Saúde (OMS) o número de casos reportados de tuberculose (TB) aumentou em 9.27 milhões apenas no ano de 2007. O desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos mais eficientes e menos tóxicos para reduzir a duração do tratamento da TB poderia levar a otimização do tratamento de TB-MDR, TB-XDR e de pacientes co-infectados com HIV. O presente trabalho busca identificar novos potenciais inibidores da enzima EPSPS de *Mycobacterium tuberculosis* utilizando ferramentas de bioinformática, através da técnica de *virtual screening*.

Introdução

O tratamento da TB é um dos agravantes no combate da doença. O tratamento consiste de quatro antibióticos de primeira linha (isoniazida, pirazinamida, rifampicina e etambutol) tendo de ser administrados durante seis meses. Além dos diversos efeitos colaterais, o tempo prolongado de tratamento possibilitou o surgimento de cepas multi-resistentes, devido ao seu abandono pelos pacientes infectados.

Um das abordagens utilizadas para o desenvolvimento de novas drogas é o princípio da toxicidade seletiva que, significa inibir proteínas que estejam presentes e que sejam vitais para o patógeno e ausentes no hospedeiro. As enzimas da via metabólica do ácido chiquímico são alvos em potencial para o desenvolvimento de agentes antimicrobianos não-tóxicos e herbicidas, pois esta via é essencial para a bactéria e plantas, enquanto que esta ausente em mamíferos, enquadrando-se perfeitamente no critério de toxicidade seletiva. Esta via é

responsável pela biosíntese de corismato, que é o precursor comum utilizado na geração de vários compostos importantes para a sobrevivência da bactéria, entre eles aminoácidos aromáticos e é composta por sete passos metabólicos, catalisados pelas enzimas: DAHP sintase, 3-desidroquinato sintase, 3-desidroquinato desidratase, chiquimato desidrogenase, chiquimato quinase, EPSP sintase, e corismato sintase.

A EPSPS utiliza uma molécula de fosfoenolpiruvato com chiquimato—fosfato para produzir 5-enoilpiruvilchiquimmato 3-fosfato. Para tanto, o objetivo deste trabalho consiste na utilização de ferramentas de bioinformática para se vasculhar bancos de dados de pequenas moléculas através da técnica de *virtual screening* (VS) onde algumas delas possam inibir a atividade da enzima EPSPS de *Mycobacterium tuberculosis*.

Metodologia

Banco de dados

Inicialmente montamos uma biblioteca de análogos do ácido chiquímico utilizando o *drug-binding database* denominado ZINC. A utilização do ácido chiquímico (AC) como molde para a aquisição dos demais ligantes segue o critério de inibidores competitivos, ou seja, análogos estruturais que possuam uma maior afinidade com a EPSPS que o seu substrato, o chiquimato-3-fosfato. O ZINC forneceu 754 compostos que assemelham estruturalmente com o substrato base.

Virtual Screening

Molecular *docking* é um procedimento de simulação computacional para predizer a conformação do complexo proteína-ligante. Onde geralmente o receptor é uma proteína e a pequena molécula ou outra proteína. Utilizamos o programa MolDock, que é um programa de *docking* flexível para varrer uma biblioteca de análogos do AC.

Para a determinação do protocolo do VS utiliza-se uma técnica denominada validação, onde utilizamos como referência uma estrutura cristalográfica já determinada. Neste caso utilizamos a proteína EPSPS complexada com chimato-3-fosfato, que encontra-se depositada no Protein Data Bank sob o código 1G6T.

Dinâmica molecular

O conhecimento exato do modelo utilizado para a descrição da matéria real é de fundamental importância no tratamento computacional de um sistema de interesse. O fundamento para a simulação de Dinâmica Molecular é o conhecimento da equação do movimento para o sistema considerado. O algoritmo de um programa de Dinâmica Molecular consiste da solução numérica destas equações de movimento fornecendo uma trajetória (coordenadas e momentos conjugados em função do tempo) do sistema sob estudo. A partir da trajetória, propriedades de equilíbrio e grandezas dinâmicas podem ser calculadas em um programa de Dinâmica Molecular. Para a simulação de dinâmica molecular dos compostos que apresentarem maior afinidade com a EPSPS, dos sistemas estudados no presente projeto de pesquisa, utilizamos o pacote de programas GROMACS (Berendsen *et al.*, 1995, Lindahl *et al.*, 2001, van der Spoel *et al.*, 2004), versão do GROMACS 3.3.1 disponível como *freeware* sob licença (GNU *General Public License*).

Resultados (ou Resultados e Discussão)

O protocolo da validação para EPSPS complexada com chiquimato-3-fosfato obteve um desvio médio quadrático (RMSD) de 0,86. Ou seja, o protocolo desenvolvido foi plenamente capaz de encontrar a posição do substrato, por isso este protocolo foi utilizado como padrão para a busca de novos potenciais inibidores utilizando o banco de dados baseados na estrutura do AC.

Conclusão

As simulações ainda estão em andamento, por isso os dados são preliminares. Mas como perspectiva para os 3 compostos que apresentaram maior afinidade com a enzima realizaremos testes de atividade enzimática. Comprovando se o nosso modelo teórico tem correspondência com ensaios *in vitro*.

Referências

WHO World Health Organization. WHO Report. Geneva. Switzerland. WHO/ CDS/ TB/ 2003.

Lindahl, E.; Hess, B.; Van der Spoel, D. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. *J. Mol. Mod.* 2001(7):306-317.