UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

VANESSA KIRALY THOMAZ RODRIGUES

Estudos estruturais e computacionais das proteínas tirosina fosfatase A e B de *Mycobacterium tuberculosis*

São Carlos

2016

VANESSA KIRALY THOMAZ RODRIGUES

Estudos estruturais e computacionais das proteínas tirosina fosfatase A e B de *Mycobacterium tuberculosis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestra em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Rafael V. C. Guido

Versão Original

São Carlos
2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica revisada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Rodrigues, Vanessa Kiraly Thomaz
Estudos estruturais e computacionais das proteínas tirosina fosfatase A e B de *Mycobacterium tuberculosis* / Vanessa Kiraly Thomaz Rodrigues; orientador Rafael Victório de Carvalho Guido -- São Carlos, 2016.
93 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2016.

1. Proteína tirosina fosfatase. 2. Tuberculose. 3. Purificação. 4. Cristalografia. 5. Modelagem computacional. I. Guido, Rafael Victório de Carvalho , orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Vanessa Kiraly Thomaz Rodrigues

Dissertação apresentada ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de Concentração: Física Aplicada - Opção: Física Biomolecular.

Aprovado(a) em: 27/10/2016

Comissão Julgadora

Dr(a). Rafael Victório Carvalho Guido

Instituição: (IFSC/USP)

Dr(a). Maria Cristina Nonato Costa

Instituição: (FCFRP/USP)

Dr(a). Fábio Cardoso Cruz

Instituição: (UNIFESP/São Paulo)

Aos meus pais Sérgio e Raquel, minha irmã, Juliana, e todos meus familiares e amigos pelo suporte, carinho, compreensão e dedicação.

AGRADECIMENTOS

A minha família, em especial meus pais Sérgio e Raquel, por terem me dado todas as oportunidades para chegar onde estou e por terem me apoiado em todo o caminho percorrido.
A minha irmã, Juliana, por ter sido um grande exemplo e meu porto seguro. A minha irmã de coração Patrícia, por sua incondicional dedicação e companheirismo.
Ao Prof. Dr. Rafael V. C. Guido, pela oportunidade de fazer parte de um grupo de excelência, pela orientação, pelos ensinamentos e pela paciência.
Aos meus amigos, por estarem ao meu lado durante esse trabalho, me auxiliando em todos os momentos, em especial Renata Moreira Grass, Daniel Tozadore, Ana Paula Mazzini e minhas companheiras de moradia, Luana Rodrigues, Julia Modesto e Bianca Biancardi. A família Handebol CAASO, que sempre esteve ao meu lado.
Aos meus colegas do Laboratório de Química Medicinal e Computacional pelos ensinamentos valiosos, ajuda e paciência.
Aos amigos do Laboratório de Bioquímica e Biofísica de Proteínas, que me auxiliaram a conciliar trabalho e estudo nas etapas finais deste mestrado.
Ao Instituto de Física de São Carlos, pela oportunidade da realização do curso de mestrado.
A CAPES, ao CNPq e a FAPESP pelo auxílio financeiro.

RESUMO

RODRIGUES, V. K. T. **Estudos estruturais e computacionais das proteínas tirosina fosfatase A e B de *Mycobacterium tuberculosis***. 2016. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

Tuberculose (TB) é um grave problema de saúde pública, sendo a segunda maior causa de morte entre doenças infecto contagiosas. Em 2014, 9,6 milhões de casos e, aproximadamente, 1,5 milhão de mortes foram reportados. O Programa Nacional de Controle da Tuberculose preconiza para o tratamento a administração simultânea de quatro medicamentos. Contudo, casos de tratamento inadequado favorecem o surgimento de cepas multirresistentes e extensivamente resistentes aos medicamentos disponíveis. Diante disso, torna-se urgente a necessidade de investigar novos alvos moleculares e desenvolver novos fármacos que sejam úteis e eficazes para o tratamento da infecção. As proteínas tirosina fosfatases (PTPs) constituem uma grande família de enzimas responsáveis pela hidrólise do fosfato ligado aos resíduos de tirosina em proteínas. A importância destas fosfatases reside no fato de estarem envolvidas na regulação de uma série de funções celulares, tais como crescimento, interação intercelular, metabolismo, transcrição, motilidade e resposta imune. A partir da análise do genoma do *Mycabacteirum tuberculosis*, foram identificadas duas proteínas tirosinas fosfatases (PtpA e PtpB), responsáveis pela sua sobrevivência nos macrófagos do hospedeiro. Ambas as enzimas têm sido exploradas como alvo molecular para o desenvolvimento de novos fármacos para a tuberculose. Nessa dissertação, as sequências gênicas que codificam para as enzimas PtpA e PtpB de *M. tuberculosis* foram clonadas com sucesso nos vetores de expressão. A expressão solúvel das proteínas permitiu o estabelecimento de um protocolo padronizado de purificação. Ensaios de cristalização foram conduzidos e cristais de proteínas obtidos tiveram os dados cristalográficos coletados. Para a enzima PtpB foi possível determinar a estrutura cristalográfica em alta resolução em complexo com um grupo fosfato no sítio catalítico. Essa estrutura foi então utilizada na etapa posterior de descoberta de novos candidatos a inibidores. Os trabalhos computacionais conduzidos incluíram uma combinação de estratégias para a identificação de pontos de interação relevantes para o processo de reconhecimento molecular e ligação bem como para a construção de modelos farmacofóricos 3D específicos para cada enzima. Esses dados foram utilizados para a seleção de um conjunto de 8 candidatos a inibidores da PtpA e 5 candidatos a inibidores da PtpB. Portanto, estudos de biologia molecular estrutural e química medicinal

foram empregados com sucesso para o estabelecimento de uma plataforma produtiva dos alvos selecionados bem como para a seleção de novos candidatos a inibidores.

Palavras-Chave: Proteína tirosina fosfatase. Tuberculose. Purificação. Cristalografia. Modelagem computacional.

ABSTRACT

RODRIGUES, V. K. T. **Structural and computational studies from protein tyrosine phosphatase A and B of *Mycobacterium tuberculosis*.** 2016. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

Tuberculosis (TB) is a serious public health problem and the second leading cause of death among infectious diseases. In 2014, 9.6 million cases, and approximately 1.5 million deaths were reported. The National Program for Tuberculosis Control recommends the simultaneous administration of four drugs as treatment for the disease. However, inadequate treatment determines the emergence of multidrug- and extensively-resistant strains to available drugs. Therefore, new molecular targets and drugs are urgently needed for the treatment of the infection. The protein tyrosine phosphatases (PTPs) are a large family of enzymes responsible for the hydrolysis of phosphate group bound to tyrosine residues in proteins. The importance of these molecules is related to the regulation of a number of cellular functions, including growth, intercellular interaction, metabolism, transcription, motility and immune response. Based on *Mycabacteirum tuberculosis* genome analysis, two protein tyrosine phosphatases (PTPA and PtpB) were related to mycobacterium survival in host macrophages. Both enzymes have been explored as a molecular target for the development of new drugs for TB. In this dissertation, the gene sequences encoding the enzymes PtpA and PtpB from *M. tuberculosis* were successfully cloned in expression vectors. The soluble expression of the proteins allowed the establishment of a standardized purification protocol. Crystallization assays were conducted, protein crystals were obtained, and crystallographic data were collected. We determine the crystallographic structure of PtpB in complex with a phosphate group in the catalytic site at high resolution. This structure was then used in the subsequent step for the discovery of new inhibitor candidates. Computational studies included a combination of strategies for identifying interaction points relevant to the process of molecular recognition and binding as well as the construction of 3D pharmacophore models specific for each enzyme. These data were used to select a set of 8 and 5 compounds as PtpA and PtpB inhibitor candidates, respectively. Therefore, structural molecular biology and medicinal chemistry studies have been successfully conducted for the establishment of a platform aimed to the production of the selected targets as well as for the selection of new inhibitor candidates.

Keywords: Protein tyrosine phosphatase. Tuberculosis. Purification. Crystallography. Computational modeling.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Número de novos casos de tuberculose e sua distribuição mundial, em 2014 25

Figura 2 - Representação esquemática da parede celular *do Mycobacterium tuberculosi* 26

Figura 3 - Representação esquemática da patogênese da tuberculose. A) Micobactéria atinge os pulmões e é fagocitada pelos macrófagos alveolares. B) Dentro dos macrófagos a mesma evita a fusão com o lisossoma quando se inicia o processo de rápida divisão e o sistema imunológico responde recrutando macrófagos adicionais e outras células de defesa para a região, que formam o tubérculo inicial ou precoce. C) Depois de algumas semanas, alguns macrófagos morrem, libertando a micobactéria e formando um centro caseoso no tubérculo. D) Começa o processo chamado de liquefação. Uma cavidade tuberculosa cheia de ar é formada, na qual os bacilos aeróbicos multiplicam-se fora dos macrófagos. E) A liquefação continua até que o tubérculo rompa, permitindo que as micobactérias extravasem para os bronquíolos 27

Figura 4 - Alinhamento de PTPs de baixo peso molecular *de Mycobaterium tuberculosis* (mPTPA), *Bos taurus* (LMW-PTPase), *Staphylococcus aureus* (PtpA) *e Bacillus subtilis* (YfkJ), destacando o motivo assinatura do domínio catalítico e os resíduos aspartato conservados 33

Figura 5 - Alinhamento de PTPs de *Mycobaterium tuberculosis* (mPTPB), *Homo sapiens* (Ptp1B), *Mus musculus* (R-PTP-S), *Yersinia enterocolitica* (Yoph) e *Rattus novergicus* (Vascular PTP-1), destacando o motivo assinatura do domínio catalítico 33

Figura 6 - Estrutura 3D da proteína tirosina fosfatase A - PtpA (PDB ID, 1U2P) 34

Figura 7 - Estrutura 3D da proteína tirosina fosfatase B - PtpB (PDB ID, 2OZ5) 38

Figura 8 - Gráfico do crescimento do número de estruturas depositadas no PDB de 1972 até 2016 44

Figura 9 - Gel de eletrofore em agarose 1%. Primeiras duas bandas são respectivas à amplificação dos genes de PtpA e PtpB de *M. tuberculosis* a partir do vetor de origem, demais reações são PCR dos clones recombinantes para verificação da positividade das construções 62

Figura 10 - Gel SDS-PAGE 15%. Elevada pureza, representada pela presença de banda única, obtida após etapas cromatográficas para as enzimas PtpA e PtpB de *M. tuberculosis* 63

Figura 11 - Técnicas de cristalização por difusão de vapor, gota assentada e gota suspensa, empregadas na triagem e otimização das condições de cristalização das enzimas PtpA e PtpB, respectivamente 64

Figura 12 - Cristais de PtpB de *M. tuberculosis* obtidos na condição 50 mM de KH2PO4, 20 % PEG 8000, 10 mM de acetato de sódio pH 5,5, 4 ºC 65

Figura 13 - Imagem representativa do padrão de difração de raios X obtidos para os cristais de PtpB de *M. tuberculosis*, obtidos na linha de luz MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) 65

Figura 14 - (A) Estrutura 3D da PtpB de M. tuberculosis. (B) Topologia da PtpB de *M. tuberculosis*. (C) Modo de ligação do íon fosfato no sítio catalítico da PtpB de *M. tuberculosis.* Os elementos de estrutura secundária hélice-α, folhas-β e alças estão indicados em azul, amarelo e cinza, respectivamente. A hélice-α6, P-loop e íon fosfato estão indicados em laranja, verde e magenta, respectivamente 69

Figura 15 - Figura 15 - Sobreposição estrutural dos modelos 3D *da PtpB* de M. tuberculosis. (A) Estrutura determinada nesta dissertação está indicada em azul e a estrutura depositada no banco de dados de proteínas (PDB ID, 1YWF) está indicada em magenta. (B) Estrutura determinada nesta dissertação está indicada em azul e a estrutura depositada no banco de dados de proteínas em complexo com inibidor (PDB ID, 2OZ5) está indicada em laranja. Os ligantes estão indicados no modelo de esferas e coloridos de acordo com a estrutura a qual estão **em** complexo. (C) Visão ortogonal da mudança conformacional observada na transição da forma aberta e fechada *da PtpB* de *M. tuberculosis*. 71

Figura 16 - Sondas utilizadas para o mapeamento do sítio catalítico da PtpA, com o auxílio do programa Surflex 74

Figura 17 - Sondas utilizadas para o mapeamento do sítio catalítico da PtpB, com o auxílio do programa Surflex 74

Figura 18 - (A) Modelo farmacofórico 3D para PtpA, obtido através do mapeamento com sondas moleculares (C=O, N-H e CH4). As regiões favoráveis para interação com grupos aceptores de ligação de hidrogênio são representadas por esferas vermelhas, as favoráveis para interação com grupos doadores representadas por esferas azuis e a favorável para interação com grupos hidrofóbicos em amarelo. (B) Figura 18 (A) rotacionada 90° em torno do eixo x 75

Figura 19 - (A) Modelo farmacofórico 3D para PtpB, obtido através do mapeamento com sondas moleculares (C=O, N-H e CH4). As regiões favoráveis para interação com grupos aceptores de ligação de hidrogênio são representadas por esferas vermelhas, as 76

favoráveis para interação com grupos doadores representadas por esferas azuis e a favorável para interação com grupos hidrofóbicos em amarelo. (B) Figura 19 (A) rotacionada 90° em torno do eixo y

Figura 20 - Dendograma dos 43 ligantes identificados para PtpA (A) e dos 8 ligantes identificados para PtpB, elaborado com o auxílio do programa Sybyl-X 1.1 80

Figura 21 - Modo de ligação predito pelo programa Glide dos candidatos a inibidores da PtpA. Os resíduos envolvidos no modo de ligação de cada ligante são representados em modelo bastão e coloridos de acordo com a característica do respectivo ponto farmacofórico (aceptor de ligação de hidrogênio = vermelho; doador de ligação de hidrogênio = azul e grupos hidrofóbicos = amarelo. (A) ZINC78682334-1. (B) ZINC04099038-18. (C) ZINC20502353-10. (D) ZINC19910531-1. (E) ZINC02047684. (F) ZINC04075025. (G) ZINC16955539-12. (H) ZINC21964365-2 81

Figura 22 - Modo de ligação predito pelo programa Glide dos candidatos a inibidores da PtpB. Os resíduos envolvidos no modo de ligação de cada ligante são representados em modelo bastão e coloridos de acordo com a característica do respectivo ponto farmacofórico (aceptor de ligação de hidrogênio = vermelho; doador de ligação de hidrogênio = azul e grupos hidrofóbicos = amarelo. (A) ZINC95478179. (B) ZINC06855300. (C) ZINC16955539. (D) ZINC71186594-4 (E) ZINC28536442 82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estrutura química, principal alvo molecular e mecanismo de ação dos fármacos tuberculostáticos de primeira escolha. 29

Tabela 2 - Estrutura química, principal alvo molecular e mecanismo de ação dos fármacos tuberculostáticos de segunda escolha. 30

Tabela 3 - Compostos com atividade inibitória frente à PtpA relatados na literatura. 36

Tabela 4 - Compostos com atividade inibitória frente à PtpB relatados na literatura. 39

Tabela 5 - Estrutura molecular e potência inibitória dos derivados de chalcona e sulfonil-hidrazonas como inibidores da PtpB de *M. tuberculosis.* 66

Tabela 6 - Estrutura molecular e potência inibitória dos derivados de chalcona e sulfonil-hidrazonas como inibidores da PtpB de *M. tuberculosis* 72

Tabela 7 - Ligantes com melhor Glide Score selecionados para PtpA e número de correspondências dos mesmos com o modelo farmacofórico determinado anteriormente 78

Tabela 8 - Ligantes com melhor Glide Score selecionados para PtpB e número de correspondências dos mesmos com o modelo farmacofórico determinado anteriormente 79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	Tridimensional
AIDS	Acquired imune deficiency syndrome
Arg	Arginina
Asp	Ácido Aspártico
CC50	Concentração de composto requerida para obter toxicidade em 50%
CMN	Corynebacterium-Mycobacterium-Nocardia
Cys	Cisteína
DNA	Deoxyribonucleic acid
DSPs	PTPs com dupla especificidade
EMB	Etambutol
EmbB	Gene codificante da enzima arabinosil transferase do Mycobacterium tuberculosis
H37Rv	Cepa referência do Mycobacterium tuberculosis
HBC´s	High Burden Countries
His	Histidina
HIV	Human Immunodeficiency Vírus
HT	High Throughput
IC50	Concentração de composto requerida para inibir em 50% a atividade biológica observada
INH	Isoniazida
InhA	Gene codificante da enzima enoil-ACP redutase do Mycobacterium tuberculosis
KuwE	Kuwanol E
LBDD	Ligand Based Drug Design
MDR	Multidrug Resistant
OMTS	(oxalilamino-metileno) - tiofeno sulfonamida
PDB	Protein Data Bank
PTP-1	Proteína tirosina fosfatase
Ptp1B	Proteína tirosina fosfatase, não receptora tipo 1
PtpA	Proteína tirosina fosfatase A
PtpB	Proteína tirosina fosfatase B
PTPs	Proteínas tirosina fosfatases
PTPs Cdc25	Proteína tirosina fosfatase cell division cycle-25
PTPs LMW	Proteína tirosina fosfatase low molecular weight
PZA	Pirazinamida
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	Ribonucleic acid
RPM	Rifampicina
R-PTP-S	Proteína tirosina fosfatase tipo receptor
rRNA	Ribosomal Ribonucleic acid
SBDD	Structure-Based Drug Design
SM	Estreptomicina
THP-1	Linhagem de células de leucemia humana
Trp	Triptofano

Tyr	Tirosina
YfkJ	Proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular de Bacillus subtilis
YopH	Proteína tirosina fosfatase de Yersinia enterocolitica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 25
1.1 Tuberculose 25
1.2 Sintomas e tratamento 28
1.3 Cepas resistentes 29
1.4 Alvos moleculares 32
1.4.1 Proteína tirosina fosfatase A (PtpA) 34
1.4.2 Proteína tirosina fosfatase B (PtpB) 38
1.5 Planejamento de fármacos 43
1.5.1 Cristalografia 43
1.5.2 Métodos computacionais 45
2 OBJETIVOS 49
3 MATERIAL E MÉTODOS 53
3.1 Estudos Experimentais 53
3.1.1 Clonagem em vetores de expressão 53
3.1.2 Testes de expressão 54
3.1.3 Expressão em maior escala e purificação 54
3.1.4 Triagem e otimização das condições de cristalização 55
3.1.5 Coleta e processamento de dados de difração de raios X para a PtpB 55
3.2 Estudos computacionais 56
3.2.1 Desenvolvimento do modelo farmacofórico 56
3.2.2 Busca utilizando o programa UNITY 56
3.2.3 Base de dados de compostos 57
3.2.4 Docagem molecular 57
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 61

4.1 Estudos Experimentais 61

4.1.1 Clonagem, Expressão e Purificação da PtpA e PtpB de *M. tuberculosis* 61

4.1.2 Cristalização, Coleta de Dados e Determinação da Estrutura 3D da PtpB de *M. tuberculosis* 63

4.1.3 Estrutura 3D da PtpB de *M. tuberculosis* 67

4.1.4 Ensaios de *soaking* 71

4.2 Estudos computacionais 73

4.2.1. Construção do modelo farmacofórico 73

5 CONCLUSÕES 85

Referências 87

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tuberculose

Tuberculose é um grave problema de saúde pública, sendo a segunda maior causa de morte entre doenças infecto contagiosas, ficando atrás somente da infecção pelo vírus de imunodeficiência humana (HIV – do inglês *Human Immunodeficiency Vírus*). As últimas estimativas apresentadas no Relatório Global da Tuberculose de 2015 são de que existiam 9,6 milhões de novos casos e aproximadamente 1,5 milhão de mortes causadas por tuberculose em 2014. A figura 1 mostra o número de novos casos por ano e sua distribuição pelo mundo.[1]

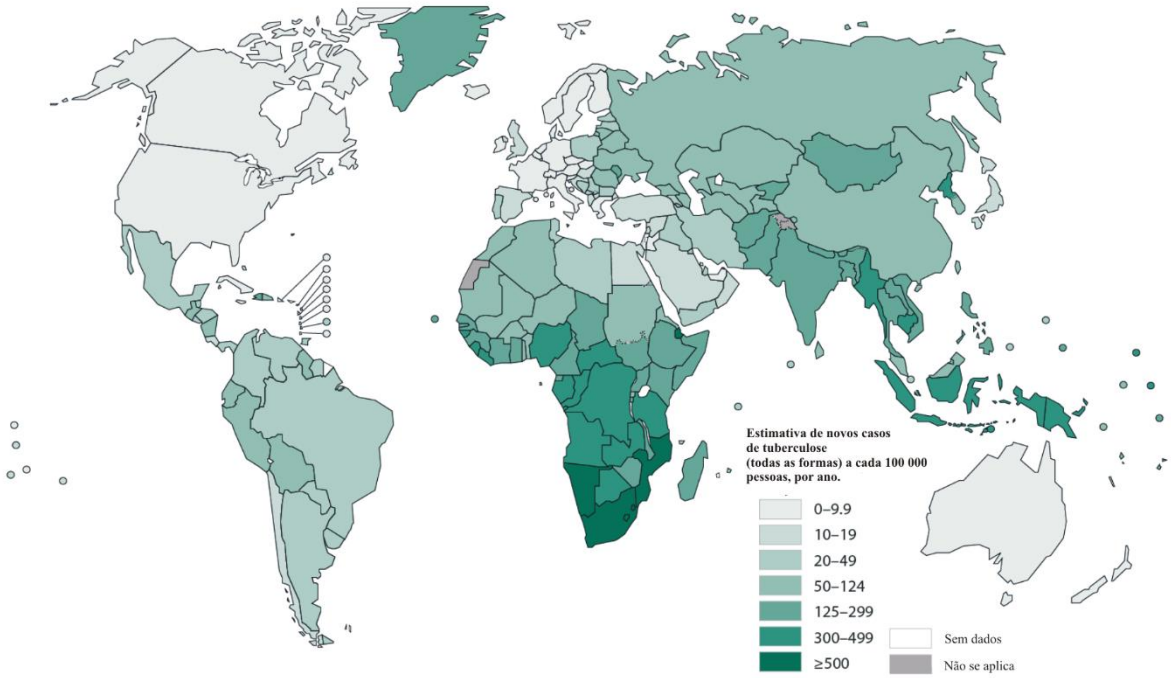


Figura 1 - Número de novos casos de tuberculose e sua distribuição mundial, em 2014.
Fonte: Adaptada de WORLD...[1]

Nota-se uma grande variação na taxa de incidência de tuberculose entre os diferentes países, sendo as menores taxas encontradas, predominantemente, entre os países de alta renda, incluindo a Europa ocidental, Canadá, Estados Unidos, Japão, Austrália e Nova Zelândia.

Nesses países a taxa de incidência é menor do que 10 casos para cada 100.000 pessoas por ano. A maioria dos países da região das Américas apresenta taxas menores que 50 casos para cada 100.000 pessoas por ano. A maioria dos países com alta incidência (HBCs – do

inglês *High Burden Countries*) apresenta taxas entre 150 e 300 casos para cada 100.000 pessoas por ano. Os países considerados HBC com menores taxas em 2014 foram o Brasil, China e Rússia, enquanto países como Moçambique e África do Sul apresentaram taxas acima de 500 para cada 100.000 pessoas[1]. Devemos considerar, ainda, o impacto da doença no aspecto socioeconômico, já que boa parte dos indivíduos afetados estão na faixa etária entre 15 e 50 anos, sendo considerados economicamente produtivos.[2]

O agente etiológico da tuberculose é o *Mycobacterium tuberculosis*, caracterizados como bacilo curvo e classificado como bactéria gram-positiva do grupo de Actinomycetos, subdivisão *Corynebacterium-Mycobacterium-Nocardia* (CMN).[3] Acometem preferencialmente o pulmão, mas também podem atacar qualquer outra parte do corpo como rins e cérebro.[4]

É bem estabelecido na literatura que micobactérias possuem a parede celular composta por três regiões distintas: i) uma camada interna (constituída por peptideoglicanos); ii) uma região intercamadas composta por ácidos micólicos e arabinogalactanos e; iii) uma camada externa composta por polissacarídeos (figura 2).[5] Portanto, como a parede celular do *M. tuberculosis* é rica em constituintes lipídicos, a penetração de antibióticos é dificultada, o que indica a importância desta estrutura para a sobrevivência da micobactéria.[6]

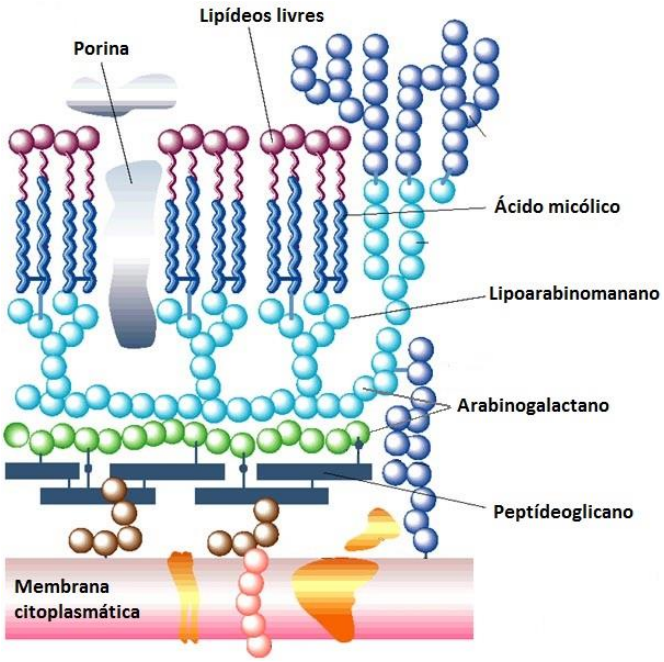


Figura 2- Representação esquemática da parede celular do *Mycobacterium tuberculosis*.
Fonte: Adaptada de PARK et al.[5]

A tuberculose é normalmente transmitida por via aérea, através de gotículas expelidas pela tosse, fala ou espirro de pessoas contaminadas com a doença. Quando o indivíduo inala essas gotículas, a micobactéria pode atingir os alvéolos, dando início a patogenicidade (figura 3).

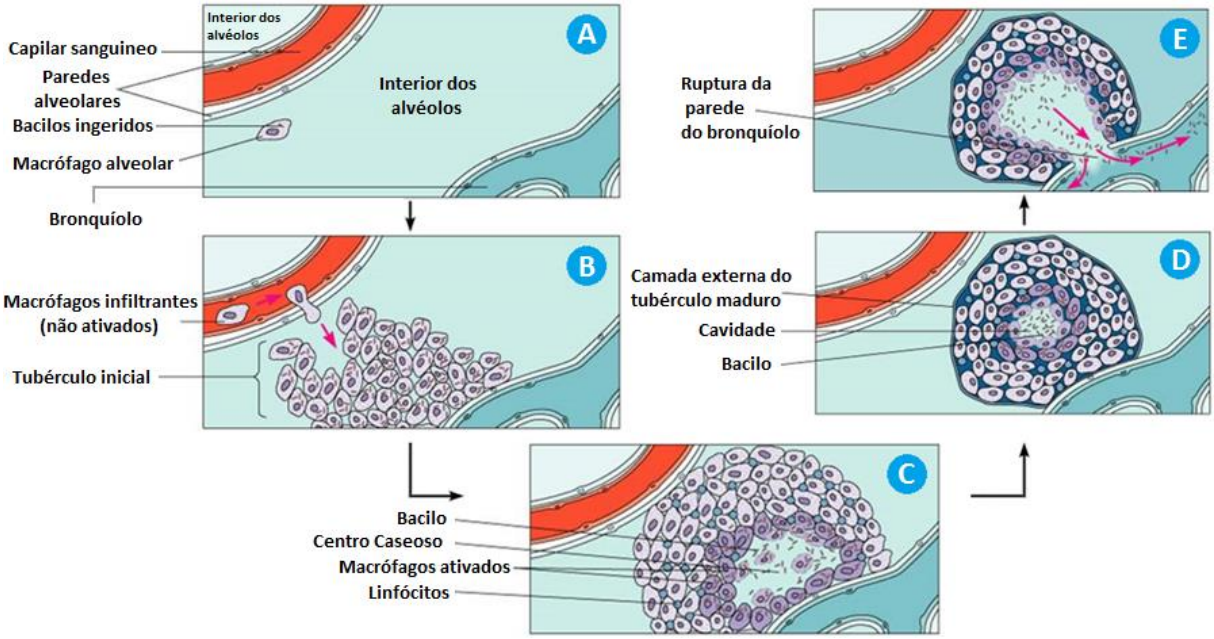


Figura 3- Representação esquemática da patogênese da tuberculose. A) Micobactéria atinge os pulmões e é fagocitada pelos macrófagos alveolares. B) Dentro dos macrófagos a mesma evita a fusão com o lisossoma quando se inicia o processo de rápida divisão e o sistema imunológico responde recrutando macrófagos adicionais e outras células de defesa para a região, que formam o tubérculo inicial ou precoce. C) Depois de algumas semanas, alguns macrófagos morrem, libertando a micobactéria e formando um centro caseoso no tubérculo. D) Começa o processo chamado de liquefação. Uma cavidade tuberculosa cheia de ar é formada, na qual os bacilos aeróbicos multiplicam-se fora dos macrófagos. E) A liquefação continua até que o tubérculo rompa, permitindo que as micobactérias extravasem para os bronquíolos.

Fonte: Adaptada de DISEASES...[7]

A infecção ocorre pela inalação da micobactéria que, quando atinge os pulmões, é fagocitada pelos macrófagos alveolares e desencadeia uma resposta inflamatória (figura 3A). Uma vez dentro dos macrófagos, a micobactéria modula a atividade do fagossoma evitando a fusão com o lisossoma, e então se dá início ao período de rápida divisão no qual a mesma cresce exponencialmente até que haja uma resposta do sistema imunológico do hospedeiro. Essa resposta se dá através do recrutamento de macrófagos adicionais e outras células de defesa para a região, que formam uma camada envolvendo os macrófagos infectados, também chamado de tubérculo inicial ou precoce (figura 3B). A maioria dos macrófagos circundantes não são bem sucedidos em destruir as micobactérias mas liberam enzimas e citocinas que

causam uma inflamação prejudicial ao pulmão. Depois de algumas semanas, os sintomas da doença aparecem, já que muitos dos macrófagos morrem, libertando a micobactéria e formando um centro caseoso no tubérculo. Os bacilos aeróbios não crescem bem neste local, porém, muitos permanecem dormentes (tuberculose latente) e servem como base para a reativação posterior da doença (figura 3C). A mesma pode permanecer presa nesta fase, e as lesões tornam-se calcificadas, porém, em alguns indivíduos a doença progride enquanto o centro caseoso aumenta, num processo chamado de liquefação. Então, é formada uma cavidade tuberculosa cheia de ar em que os bacilos aeróbicos multiplicam-se fora dos macrófagos (figura 3D). A liquefação continua até que o tubérculo rompa, permitindo que as micobactérias extravasem para os bronquíolos e, assim, sejam difundidas por todo o pulmão e, em seguida, para os sistemas circulatório e linfático (figura 3E).[8]

1.2 Sintomas e tratamento

Os sintomas da doença envolvem tosse durante pelo menos três semanas, dores no peito, fraqueza ou fadiga, perda de peso, falta de apetite, febre, calafrios, sudorese noturna e sangue no escarro.[9] O diagnóstico é feito através da baciloscopia, exame que detecta a micobactéria no escarro[10] e também através de teste tuberculínico, um teste cutâneo que determina a reatividade do indivíduo à proteína do bacilo.[11]

Desde os anos 70, quando foi desenvolvido pelo Conselho Britânico de Pesquisa Médica, o tratamento recomendado para tuberculose envolve dois estágios. Os medicamentos de primeira linha (tabela 1) são administrados simultaneamente (*e.g.*, isoniazida, rifampicina, pirazinamida e às vezes etambutol) por dois meses. Em seguida, o tratamento continua com isoniazida e rifampicina por pelo menos mais quatro meses. O uso de vários fármacos é necessário para a eficácia do tratamento e minimizar o surgimento de cepas resistentes. [12]

Tabela 1 - Estrutura química, principal alvo molecular e mecanismo de ação dos fármacos tuberculostáticos de primeira escolha.

Fármaco	Estrutura química	Alvo Molecular	Mecanismo de Ação
Isoniazida (INH)		Atua na enoil-ACP redutase (InhA)	Inibe a síntese de ácidos micólicos, principais constituintes da parede celular
Rifampicina (RPM)		Atua na subunidade β da RNA polimerase	Inibe a síntese de RNA
Pirazinamida (PZA)		Alvo exato ainda é desconhecido; é um pró-fármaco.	O ácido pirazinóico reduz o pH do ambiente e rompe a membrana plasmática
Estreptomicina (SM)		Atua na subunidade ribossomal 30S	Inibe a síntese protéica
Etambutol (EMB)		Atua na arabinosil transferase (EmbB)	Inibe a polimerização de arabinogalactano e lipoarabinomanano, constituintes da parede celular

Fonte: Adaptado de BUENO.[3]; MECHANISM...[13]; PIRAZINAMIDA.[14]

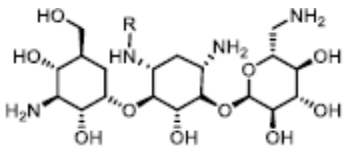
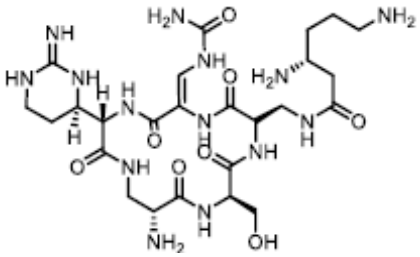
1.3 Cepas resistentes

O tratamento inadequado da tuberculose tem favorecido o surgimento de cepas resistentes aos fármacos. Inicialmente, a resistência surgia devido ao uso de um único antibiótico no tratamento de primeira linha. Diante disso, a estratégia de terapia combinada passou a ser empregada, tendo em vista a necessidade de prevenir esse surgimento. Inevitavelmente, após o uso dessa terapia por mais de trinta anos, ocorreu a seleção de cepas resistentes do *Mycobacterium tuberculosis*. Existem múltiplas razões para o surgimento dessas cepas, incluindo a prescrição inadequada de antibióticos, falta de comprometimento

com o tratamento, muitas vezes devido à sua longa duração, fornecimento de remédios de baixa qualidade, entre outros.[2, 15]

Em 2014, a estimativa mundial era de 480.000 casos de tuberculose multirresistente (MDR – do inglês M*ultidrug Resistant*).[1] As cepas identificadas apresentaram resistência à rifampicina e isoniazida.[16] O tratamento recomendado nesses casos consiste no uso de pelo menos quatro medicamentos da terapia de segunda linha (tabela 2), com duração mínima de 20 meses.[17; 18] Adicionalmente, já foram reportados casos de resistência aos fármacos de segunda linha (e.g., fluoroquinolona, capreomicina, canamicina e amicacina). Nesses casos, a tuberculose é denominada de extensivamente resistente e o tratamento é muito mais difícil,[18] já que deve ser feito um levantamento minucioso do tratamento antibacilar do indivíduo, sendo assim, muito particular. A OMS sugere utilização, por pelo menos 12 meses, de pirazinamida concomitantemente a outro fármaco de primeira linha, utilização de quinolonas de última geração e uso de um agente injetável (aminoglicosídeo ou capreomicina) para o qual a micobactéria demonstrou sensibilidade.

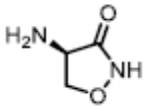
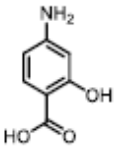
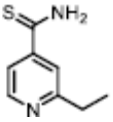
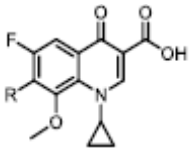
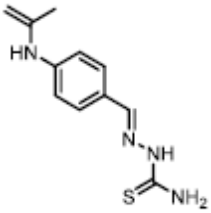
Tabela 2 - Estrutura química, principal alvo molecular e mecanismo de ação dos fármacos tuberculostáticos de segunda escolha.

Fármaco	Estrutura química	Alvo Molecular	Mecanismo de Ação
Canamicina e Amicacina	 R=H → Canamicina R=COCH(OH)CH2CH2NH2 → Amicacina	Atuam nas proteínas ribossômicas S12 e rRNA 16S (subunidade ribossômica 30S),	Inibe a síntese proteica
Capreomicina		Atua na proteína rRNA 16S (subunidade ribossômica 30S),	Inibe a síntese proteica

(continua)

(Conclusão)

Tabela 2 - Estrutura química, principal alvo molecular e mecanismo de ação dos fármacos tuberculostáticos de segunda escolha.

Fármaco	Estrutura química	Alvo Molecular	Mecanismo de Ação
Cicloserina		Atua nas enzimas D-alanil-D-alanina sintetase, alanina racemase e alanina permease	Inibe a síntese de peptideoglicanos, constituintes da parede celular
Ácido ρ-aminossalicílico		Age possivelmente na diidropteroato sintase	Inibe a síntese de folatos
Etionamida		Inibe a atividade do gene *Inh*A do *M. tuberculosis*	Inibe a síntese de ácidos micólicos, constituintes da parede celular
Fluoroquinolonas		Atuam na DNA girase, ou na topoisomerase II bacteriana	Inibe a compactação da molécula de DNA bacteriana
Tiacetazona		Alvo ainda é desconhecido	Inibe da síntese de ácidos micólicos

Fonte: Adaptado de BUENO.[3]; ARBEX.[19]

Além do surgimento de cepas resistentes, outro fator que contribui para o aumento da incidência da tuberculose é a co-infecção com o vírus da AIDS. Globalmente, pessoas portadoras do vírus da imunodeficiência têm entre 20 e 30 vezes mais chance de serem infectadas pelo *M. tuberculosis*, sendo tuberculose a causa de morte mais comum entre portadores do vírus da AIDS.[20-21] Em 2014, 1,2 milhão de pessoas que desenvolveram tuberculose estavam co-infectadas.[1]

Diante do surgimento dessas cepas multirresistentes e extensivamente resistentes aos medicamentos disponíveis, surge a necessidade de investigar novos alvos moleculares e desenvolver novos fármacos que sejam úteis e eficazes para o tratamento da tuberculose.

1.4 Alvos moleculares

O desenvolvimento de ciências como genômica, proteômica, metabolômica e citômica, juntamente com o avanço de técnicas da bioinformática e de métodos de elucidação estrutural tais como cristalografia de raios-X e ressonância magnética nuclear (RMN), tem possibilitado a elucidação estrutural e bioquímica de um número cada vez maior de alvos moleculares.[22] Com o avanço nas áreas de pesquisa, famílias de moléculas sinalizadoras estão sendo definidas e as complexidades da regulação da transdução de sinal estão se tornando aparentes. Um exemplo desse avanço é o reconhecimento da importância das proteínas fosfatases, que funcionam em coordenação com as proteínas quinases na regulação dos processos de sinalização. [23]

As proteínas tirosina fosfatases (PTPs) constituem uma grande família de enzimas responsáveis pela hidrólise do fosfato ligado aos resíduos de tirosina em proteínas e são definidas pelo motivo assinatura do seu domínio catalítico ((H/V)C$(X)_5$R(S/T)).[24] Esse motivo assinatura pode ser observado nos alinhamentos representados nas figuras 4 e 5. O domínio catalítico das PTPs consiste de estruturas secundárias α e β, sendo composto de um núcleo de folhas-β flanqueado por α-hélices.[25]

As PTPs são proteínas estruturalmente diversas divididas em quatro subfamílias: (1) PTPs clássicas específicas, (2) PTPs com dupla especificidade (DSPs), (3) PTPs Cdc25 (*cell division cycle-25*), e (4) PTPs de baixo peso molecular (LMW – *low molecular weight).* [26]

Apesar de possuírem baixa similaridade sequencial, essas proteínas são classificadas na mesma superfamília devido ao seu mecanismo catalítico comum, no qual o resíduo de cisteína catalítico executa um ataque nucleofílico no grupamento fosfato do substrato. Além disso, para as PTPs de baixo peso molecular, um resíduo de aspartato conservado também é importante para a catálise (figura 4), primeiramente protonando o grupo fenolato do substrato, agindo como um ácido e, depois, como uma base, ativando uma molécula de água para promover a hidrólise.[27]

A importância destas proteínas fosfatases reside no fato de estarem envolvidas na regulação de uma série de funções celulares, tais como crescimento, motilidade, interação intercelular, metabolismo, transcrição, motilidade e resposta imune.[28] Pesquisas realizadas a partir da determinação das primeiras sequências de PTPs indicam o envolvimento das mesmas em várias doenças humanas, tais como diabetes mellitus tipo 2, alguns tipos de câncer,

esquizofrenia, desordem bipolar, osteoporose, obesidade, entre outros[29], revelando assim, seu potencial como uma nova classe de alvos terapêuticos.

```
mPtpA              --------------MSDPLHVTFVCTGNICRSPMAEKMFAQQLRHRGLGDAVRVTSAGTGNWHVGSCADERAAGVLRAHGYPTDHRAAQV
LMW-PTPase         -------------AEQVTKSVLFVCLGNICRSPIAEAVFRKLVTDQNISDNWVIDSGAVSDWNVGRSPDPRAVSCLRNHGINTAH-KARQ
PtpA (S. aureus)   ------------AYFQGMVDVAFVCLGNICRSPMAEAIMRQRLKDRNI-HDIKVHSRGTGSWNLGEPPHEGTQKILNKHNIPFDGMISEL
YfkJ               GSHMASMTGGQQMGRGSMISVLFVCLGNICRSPMAEAIFRDLAAKKGLEGKIKADSAGIGGWHIGNPPHEGTQEILRREGISFDGMLARQ
                                          * *** *******:** :: .   .: :       * . . *.:*   .  :   *. .        :.

mPtpA              GT--EHLAADLLVALDRNHARLLRQLGVEAAR-VRMLRSFDPRSGTHALDVEDPYYGDHSDFEEVFAVIESALPGLHDWVDERLARNGPS
LMW-PTPase         VTKEDFVTFDYILCMDESNLRDLNRKSNQVKNCRAKIELLGSYDPQKQLIIEDPYYGNDADFETVYQQCVRCCRAFLEKVR---------
PtpA (S. aureus)   FE--ATDDFDYIVAMDQSNVDNIKSINPNLKG--QLFKLLEF-SNMEESDVEDPYYTN--NFEGVYDMVLSSCDNLIDYIVKDANLKG--
YfkJ               VSEQDLDDFDYIIAMDAENIGSLRSMAGFKNT-SHIKRLLDYVEDSDLADVEDPYYTG--NFEEVCQLIKTGCEQLLASIQKEKQL----
                            * ::.:* ..   :.             . :   .  .   : ****    :** *          :   :
```

Figura 4 - Alinhamento de PTPs de baixo peso molecular de *Mycobaterium tuberculosis* (mPTPA), *Bos taurus* (LMW-PTPase), *Staphylococcus aureus* (PtpA) e *Bacillus subtilis* (YfkJ), destacando o motivo assinatura do domínio catalítico e os resíduos aspartato conservados.

Fonte: Elaborada pela autora.

```
mPtpB            ------------------------------------------------------------------------------------------MGSSHHHHHHSSGLVPRG--
Ptp1B            -------------------------GHMASMEMEKEFEQIDKSGSWAAIYQDIRHEASDFPCRVAKLPKNKNRNRYRDVSPFDHSRIKLHQ----EDNDYINASLIKMEEA
R-PTP-S          ----MHHHHHHMLS--------HPPIPITDMAEHMERLKANDSLKLSQEYESIDP-GQQFTWEHSNLEANKPKNRYANVIAYDHSRVILQPLEGIMGSDYINANYVDGYRR
Yoph             MRERPHTSGHHGAGE----ARATAPSTVSPYG---PEARAELSSRLTTLRNTLAPA-TNDPRYLQ-ACGGEKLNRFRDIQCRRQT----------AVRADLNANYIQVG--
Vascular PTP-1   WRKKRKDAKNNEVSFSQIKPKKSKLIRVENFEAYFKKQQADSNCGFAEEYEDLKLIGISLPKYAAEIAENRGKNRYNNVLPYDISRVKLSV-QTHSTDDYINANYMPGYHS
                                                                                                          .:  :

mPtpB            --SHM-AV----RELPGAWNFRDVADTAT-------------ALRPGRLFRSSELSRLDDAGRATLRRLGI--TDVADLRSSREVA--RRGPGRVPDGIDVHLLPFPDLAD
Ptp1B            QRSYILTQGPLPNTCGHFWEMVWEQKSRGVVMLNRVMEK--GSLKCAQYWPQKEEKEMIFEDTN--LKLTLISEDIKSYYTVRQLELENLTTQETREILHFHYTTWPDFGV
R-PTP-S          QNAYIATQGPLPETFGDFWRMVWEQRSATVVMMTRLEEK--SRIKCDQYWPNRGTETYGF------IQVTLLDTMELATFCVRTFSLHKNGSSEKREVRHFQFTAWPDHGV
Yoph             NTRTIACQYPLQSQLESHFRMLAENRTPVLAVLASSSEIANQRFGMPDYFRQSGTYGSITVESKMTQQVGLGDGIMADMYTLTI---R-EAGQKTISVPVVHVGNYPDQTA
Vascular PTP-1   KKDFIATQGPLPNTLKDFWRMVWEKNVYAIVMLTKCVEQ--GRTKCEEYWPSKQAQDYGD------ITVAMTSEVVLPEWTIRDFVVKNMQSSESHPLRQFHFTSWPDHGV
                     :            :.:                          : .              : :                     .     .:   :**

mPtpB            DDADDSAPHETAFKRLLTNDGSNGESGESSQSINDAATRYMTDEYRQFPTRNGA--QRALHRVVTLLAAGRPVLTHCFAGKDRTGFVVALVLEAVGLDRDVIVADYLRSND
Ptp1B            PESP---------A----------------------------SFLNF-------LFKVR-ESGSLSPEHGPVVVHCSAGIGRSGTFCLADTCLLLMDKR-KDPSSVDIKK
R-PTP-S          PEYP---------T----------------------------PFLAF-------LRR---VKTCNPPDAGPIVVHCSAGVGRTGCFIVIDAMLERI----KTEKTVDVYG
Yoph             VSSE----VTKALA----------------------------SLVDQTAETKRNMYESKGSSAVADDSKLRPVIHCRAGVGRTAQLIGAMCMND------SRNSQLSVED
Vascular PTP-1   PDTT---------D----------------------------LLINF-------RYLVR-DYMKQIPPESPILVHCSAGVGRTGTFIAIDRLIYQI----ENENTVDVYG
                  .                                                                  : ** **  *:. .                 . :

mPtpB            SVPQLRARISEMIQQRFDTELAPEVVTFTKARLSDGVLG------VRAEYLAAARQTIDET-----------------YGSLGGYLRDAGISQATVNRMRGVLLG------
Ptp1B            VLLEMRKFRMGLIQTAD-------QLRFSYLAVIEGAKFIMGDSSVQDQWKELSH-EDLEPHN-----------------------------------------------
R-PTP-S          HVTLMRSQRNYMVQTED-------QYGFIHEALLEAVGCGNTEVPARSLYTYIQKLAQVEPGEHVTGMELEFKRLASSKAHTSRFITASLPCNKFKNRLVNILPYESSRVC
Yoph             MVSQMRVQRNGIMVQKDE------QLDVL-IKLAEGQGRPLLNS-----------------------------------------------------------------
Vascular PTP-1   IVYDLRMHRPLMVQTED-------QYVFLNQCVLDIIRAQKDSKV-DLIYQNTTAMTIYENLERVSMF-----------GKANGYIA------------------------
                  :  :*     ::              .    : :

mPtpB            ------------------------------------------------------------------------------------------------------------
Ptp1B            ------------------------------------------------------------------------------------------------------------
R-PTP-S          LQPIRGVEGSDYINASFIDGYRQQKAYIATQGPLAETTEDFWRALWENNSTIVVMLTKLREMGREKCHQYWPAERSARYQYFVVDPMAEYNMPQYILREFKVTDARDGQSR
Yoph             ------------------------------------------------------------------------------------------------------------
Vascular PTP-1   ------------------------------------------------------------------------------------------------------------

mPtpB            ------------------------------------------------------------------------------------------------------------
Ptp1B            ------------------------------------------------------------------------------------------------------------
R-PTP-S          TVRQFQFTDWPEQGAPKSGEGFIDFIGQVHKTKEQFGQDGPISVHCSAGVGRTGVFITLSIVLERMRYEGVVDIFQTVKVLRTQRPAMVQTEDEYQFCFQAALEYLGS
Yoph             ------------------------------------------------------------------------------------------------------------
Vascular PTP-1   ------------------------------------------------------------------------------------------------------------
```

Figura 5 - Alinhamento de PTPs de *Mycobaterium tuberculosis* (mPTPB), Homo *sapiens* (Ptp1B), *Mus musculus* (R-PTP-S), *Yersinia enterocolitica* (Yoph) e *Rattus novergicus* (Vascular PTP-1), destacando o motivo assinatura do domínio catalítico.

Fonte: Elaborada pela autora.

Assim, a partir da análise do genoma do *M. tuberculosis*, foram identificadas duas proteínas tirosinas fosfatases (PtpA e PtpB), responsáveis pela sua sobrevivência nos macrófagos do hospedeiro.[30] Ambas contêm as sequências consenso que as definem como proteínas tirosina fosfatases, o motivo P *loop* do sítio ativo e um aspartato essencial para a

reação catalítica. Enquanto PtpA é classificada como uma fosfatase de baixa massa molecular (LMW), a PtpB é classificada como clássica específica (PTP).[31]

A inativação dos genes que codificam essas proteínas inviabilizou a sobrevivência do *M. tuberculosis* nos macrófagos, validando ambas as PTPs como alvos terapêuticos atrativos para o desenvolvimento de novos fármacos.[30,32]

1.4.1 Proteína tirosina fosfatase A (PtpA)

A proteína tirosina fosfatase A (PtpA) pertence à família das proteínas tirosinas fosfatases de baixa massa molecular (LMW), com massa molecular de 18 kDa e presente em espécies de micobactérias de crescimento lento, bem como saprófitos de crescimento rápido. Não apresentam aparente homologia de sequência com as fosfatases de massa molecular elevada, exceto o motivo assinatura conservado ((H/V)C$(X)_5$R(S/T)), mencionado anteriormente e apresentado na figura 4, situado perto da extremidade N-terminal.[33]

A ampla distribuição das PTPases de baixa massa molecular entre organismos desde bactérias a humanos sugere o seu papel fundamental nas funções celulares.[33] A estrutura da proteína tirosina fosfatase A do *Mycobacterium tuberculosis* (PtpA) é composta por um único domínio caracterizado por um conjunto de quatro folhas β centrais, paralelas, torcidas e flanqueadas por α hélices de ambos os lados (figura 6).

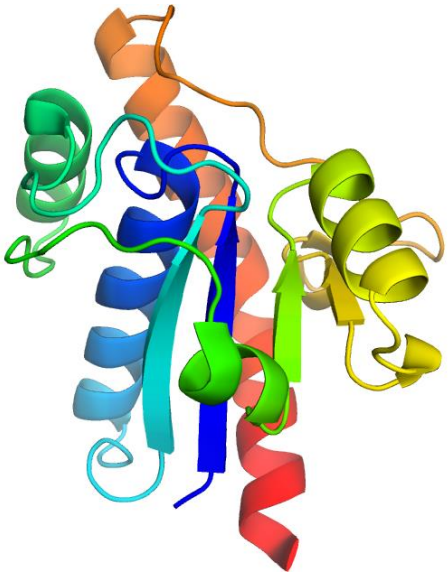


Figura 6 - Estrutura 3D da proteína tirosina fosfatase A - PtpA (PDB ID, 1U2P).

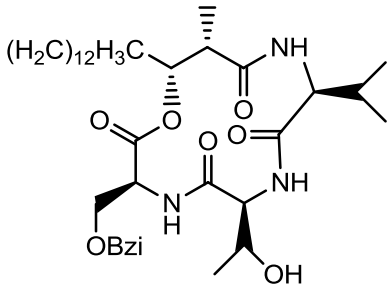
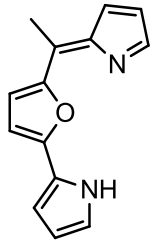
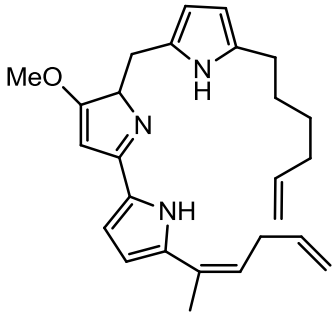
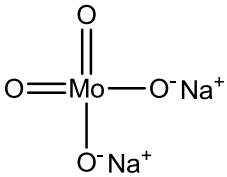
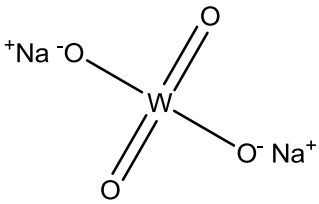
Fonte: Elaborada pela autora.

O sítio de ligação ao fosfato, que compreende os resíduos 11 ao 18, é localizado em uma cavidade profunda. As paredes dessa cavidade são formadas principalmente por resíduos aromáticos e hidrofóbicos, tais como Trp48, His49, Tyr128 e Tyr129. A Cys11 funciona como um nucleófilo catalítico que ataca o átomo de fósforo do substrato, formando uma fosfoenzima intermediária. O resíduo Arg17 tem papel crítico no reconhecimento e ligação de substratos fosforilados. A liberação do substrato desfosforilado ocorre após a transferência de um próton do resíduo Asp126.[34]

O crescimento de uma cepa de *Mycobacterium tuberculosis* com *knockout* do gene codificante para PtpA em células THP-1 de macrófagos mostrou ser atenuado quando comparado com a cepa H37Rv. Esse dado indicou que a inibição seletiva da PtpA tem impacto significativo na viabilidade intracelular do *M. tuberculosis.*[33]

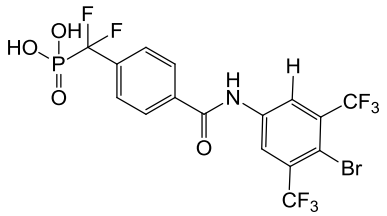
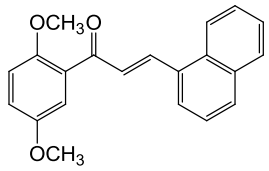
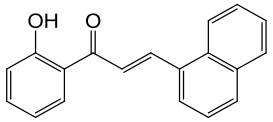
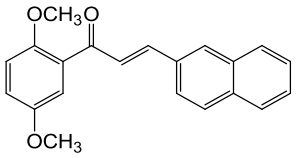
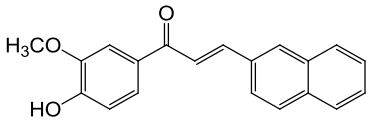
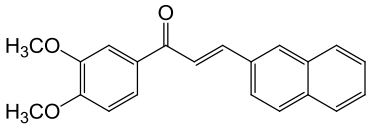
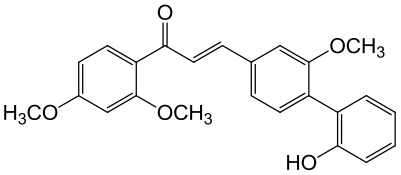
Os pioneiros na descrição de inibidores de PtpA de *M. tuberculosis*, Waldmann et al.[35], avaliaram os análogos de produtos naturais estevastelina, roseofilina e prodigiosinas, e obtiveram valores de IC_{50} entre 8,8 e 28,7 μM (tabela 3). Além disso, outros pesquisadores também estudaram a PtpA como alvo molecular. Por exemplo, Madhurantakam et al.[36] caracterizaram molibdato, ortovanadato e tungstato de sódio como inibidores reversíveis de PtpA e Ellman et al. identificaram um derivado benzanilida como inibidor seletivo da PtpA, com um valor de Ki de 1,4 μM[37]. Mais recentemente, uma série de naftil chalconas foi descrita como inibidores de alta afinidade para PtpA.[30, 37-38] Mascarello et al.[38], descobriram cinco compostos ativos frente a PtpA que apresentaram valores de *Ki* variando de 4,9 a 21,3 μM. As naftil chalconas são compostos sintéticos que atuam como inibidores competitivos de PtpA e que mostraram significativa atividade inibitória do crescimento de *M. tuberculosis* em macrófagos infectados. Já Chiaradia et al.[37] identificaram um derivado de vanilina benzilada com valor de IC_{50} = 15 μM (tabela 3), cuja predição do modo de ligação indica que interações polares são essenciais para a orientação do composto no sitio ativo, bem como interações não polares que auxiliam da estabilização no inibidor na cavidade.[39]

Tabela 3 - Compostos com atividade inibitória frente à PtpA relatados na literatura.

Inibidor	Estrutura	IC_{50} e/ou Ki	Referência
Análogo de Estevastelina		IC_{50} = 8,8 µM	Waldmann et al. [35]
Análogo de Roseofilina e Prodigiosinas		IC_{50} = 9,4 µM	Waldmann et al. [35]
Análogo de Roseofilina e Prodigiosinas		IC_{50} = 28,7 µM	Waldmann et al. [35]
Molibdato de Sódio		IC_{50} = 24,5 µM Ki = 2,67 µM	Madhurantakam et al. [36]
Tungstato de Sódio		IC_{50} = 30,8 µM Ki = 0,53 µM	Madhurantakam et al. [36]

(continua)

(Conclusão)
Tabela 3- Compostos com atividade inibitória frente à PtpA relatados na literatura.

Inibidor	Estrutura	IC_{50} e/ou Ki	Referência
Derivado Benzanilida		Ki = 1,4 μM	Ellman et al.[37]
Derivado de Naftil Chalconas		IC_{50} = 39,5 μM Ki = 21,3 μM	Mascarello et al.[30]
Derivado de Naftil Chalconas		IC_{50} = 50,2 μM Ki = 9,1 μM	Mascarello et al.[30]
Derivado de Naftil Chalconas		IC_{50} = 8,4 μM Ki = 5,4 μM	Mascarello et al.[30]
Derivado de Naftil Chalconas		IC_{50} = 53,7 μM Ki = 17,9 μM	Mascarello et al.[30]
Derivado de Naftil Chalconas		IC_{50} = 23,1 μM Ki = 4,9 μM	Mascarello et al.[30]
Derivado de Vanilina Benzilada		IC_{50} = 15 μM Ki = 12 μM	Chiaradia et al.[37]

Fonte: Elaborada pela autora.

1.4.2 Proteína tirosina fosfatase B (PtpB)

A proteína tirosina fosfatase B (PtpB) é uma proteína globular de, aproximadamente, 30 kDa, e domínio único constituído de quatro folhas β paralelas centrais, cercada de hélices α (figura 7). A comparação da sequência da PtpB de *M. tuberculosis* com outras PTPs de organismos procarióticos revelou duas grandes inserções únicas à proteína homóloga de *M. tuberculosis*. A primeira região da inserção (85-117) forma um segmento desordenado com 31 resíduos na alça que conecta a folha β3 e a hélice α4. A segunda inserção compreende os resíduos 211-224, que formam uma "tampa" composta por duas grandes hélices que cobrem completamente o sítio ativo. Esta "tampa" tem de se mover para permitir o acesso ao sítio catalítico, o qual está completamente enterrado na estrutura PtpB.[31]

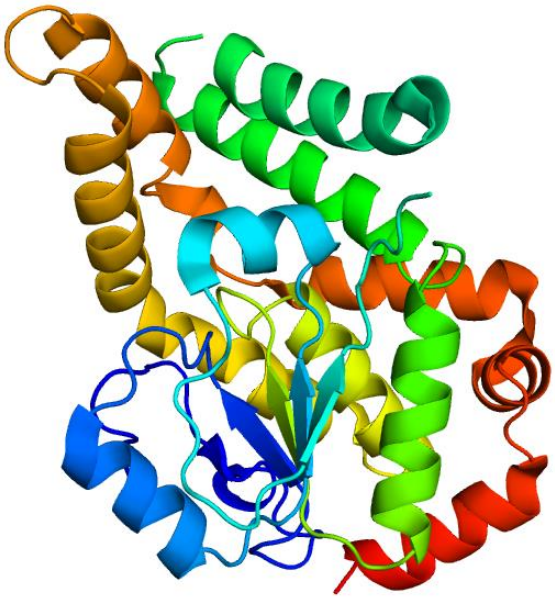


Figura 7 - Estrutura 3D da proteína tirosina fosfatase B - PtpB (PDB ID, 2OZ5).

Fonte: Elaborada pela autora.

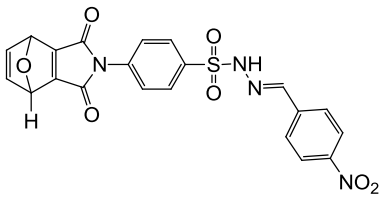
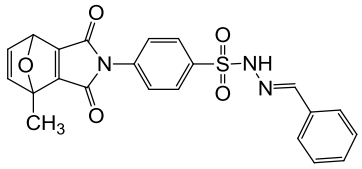
A PtpB compartilha as mesmas características estruturais de sítio ativo com outras PTPs. Por exemplo, a cisteína catalítica (Cys160) encontra-se posicionada na sequência consenso da alça P entre a folha β5 e a hélice α6. O dipolo formado pela hélice α6, as cargas positivas parciais dos hidrogênios das amidas da cadeia principal da alça P e a cadeia lateral do resíduo Arg166 orientam o grupo fosfato do substrato que se liga na extremidade N-terminal da hélice α6.[31]

A PtpB de *M. tuberculosis* tem sido explorada como alvo molecular para o desenvolvimento de fármacos por exercer função central na sobrevivência da micobactéria no macrófago.[38-40] Nesse sentindo, Oliveira et al.[41] estudaram a atividade inibitória de sulfonil-hidrazonas contra PtpB de *M. tuberculosis* e identificaram essa classe de moléculas como inibidores competitivos e reversíveis com valores de *Ki* entre 2,5 e 15 µM (tabela 4). Mascarello et al.[38] descobriram o inibidor Kuwanol E (KuwE), que apresentou valor de *Ki* = 1,6 µM (tabela 4). As naftil chalconas descobertas por Chiaradia et al.[39] como inibidores da PtpA também apresentaram atividade inibitória frente a PtpB, entre os quais oito compostos mostraram-se inibidores potentes dessa enzima (IC_{50} < 100 µM). Dentre eles, o derivado de 2-naftilaldeído foi o mais potente, com IC_{50} de 12 µM (tabela 4).

Grundner et al.[32] descobriram um derivado oxalilamino-metileno tiofeno sulfonamida (OMTS) como inibidor potente competitivo e seletivo de PtpB de *M. tuberculosis* com valor de IC_{50} de 0,44 µM (Tabela 4). A estrutura tridimensional do complexo PtpB-OMTS foi resolvida cristalografia de raios-X na resolução de 2,0 Å, revelando uma grande mudança conformacional que envolve a movimentação da hélice α8, permitindo assim o acesso ao sítio ativo.

Outras classes de inibidores de PtpB de *M. tuberculosis* foram identificados e caracterizados entre elas citam-se: os derivados de indol com valor de IC_{50} entre 0,36µM e 1,12 µM e com índice de seletividade de até 100 vezes para PtpB de *M. tuberculosis*[42]; os hexapeptídeos cíclicos extraídos de cianobactéria *Tychonema sp* apresentaram valor de IC_{50} de, aproximadamente, 8,0 µM,[43]; os derivados indolil-espirotiazolidinonas com valores de IC_{50} de 35,5 a 1,2 µM[44] e, recentemente, benzofuranos com atividade inibitória sub-micromolar.[38; 45]

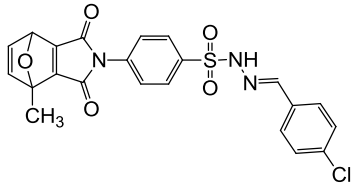
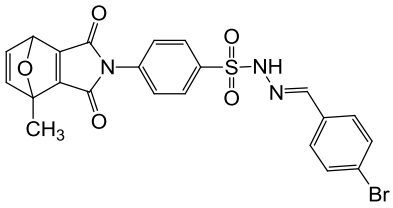
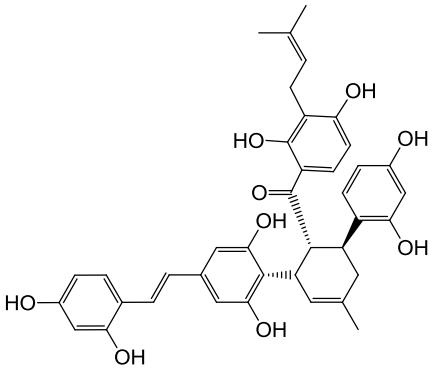
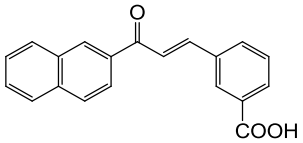
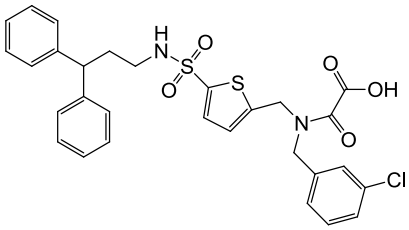
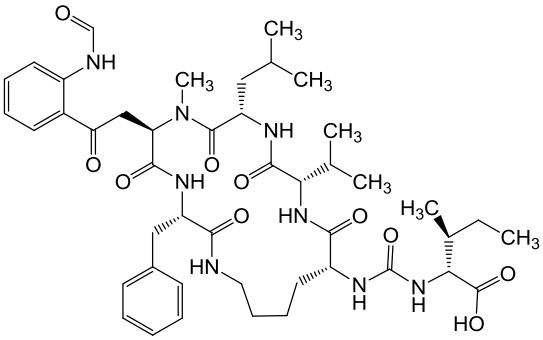
Tabela 4 - Compostos com atividade inibitória frente à PtpB relatados na literatura.

Inibidor	Estrutura	IC_{50} e/ou Ki	Referência
Sulfonil-hidrazona derivada da N-fenilmaleimida		IC_{50} = 41 µM Ki = 15 µM	Oliveira et al. [41]
Sulfonil-hidrazona derivada da N-fenilmaleimida		IC_{50} = 18 µM Ki = 7,0 µM	Oliveira et al. [41]

(continua)

(Continuação)

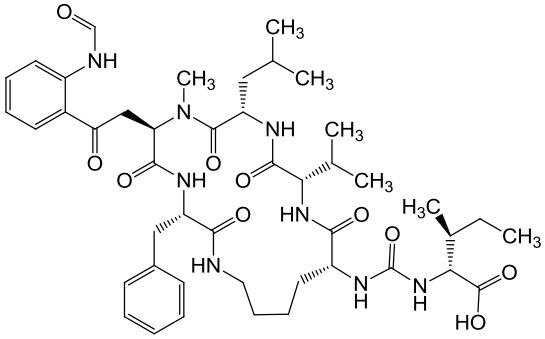
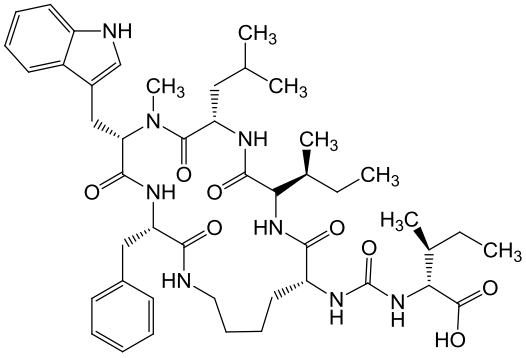
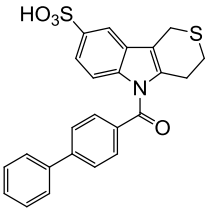
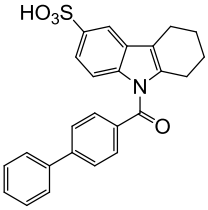
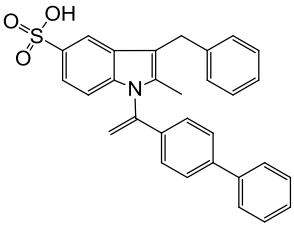
Tabela 4 - Compostos com atividade inibitória frente à PtpB relatados na literatura.

Inibidor	Estrutura	IC_{50} e/ou Ki	Referência
Sulfonil-hidrazona derivada da N-fenilmaleimida		IC_{50} = 21 µM Ki = 2,5 µM	Oliveira et al. [41]
Sulfonil-hidrazona derivada da N-fenilmaleimida		IC_{50} = 39 µM Ki = 9,0µM	Oliveira et al. [41]
Kuwanol E (KuwE)		IC_{50} = 1,9 µM Ki = 1,6 µM	Mascarello et al. [38]
Derivado de 2-naftildeído		IC_{50} = 12 µM	Chiaradia et al. [39]
OMTS (oxalilamino-metileno) - tiofeno sulfonamida		IC_{50} = 0,44 µM	Grundner et al. [32]
Brunsvicamida C (hexapeptídeos cíclicos de cianobactéria *Tychonema sp*)		IC_{50} = 8,0 µM	Müller et al.[43]

(continua)

(Continuação)

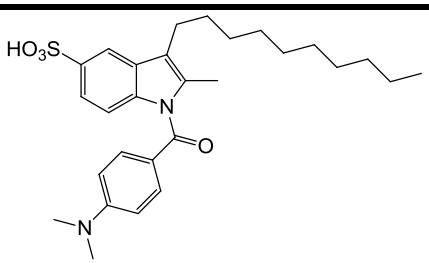
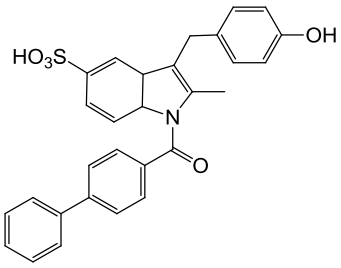
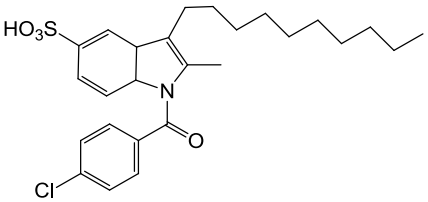
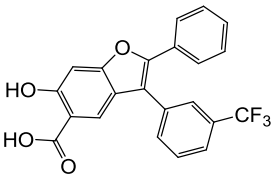
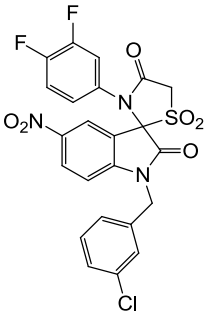
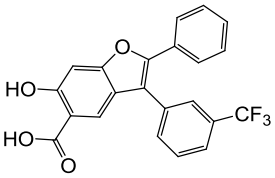
Tabela 4 - Compostos com atividade inibitória frente à PtpB relatados na literatura.

Inibidor	Estrutura	IC_{50} e/ou Ki	Referência
Brunsvicamida C (hexapeptídeos cíclicos de cianobactéria *Tychonema sp*)		IC_{50} = 8,0 μM	Müller et al.[43]
Brunsvicamida B (hexapeptídeos cíclicos de cianobactéria *Tychonema sp*)		IC_{50} = 7,3 μM	Müller et al.[43]
Derivado de indol		IC_{50} = 0,36 μM	Nören-Müller et al. [42]
Derivado de indol		IC_{50} = 0,42 μM	Nören-Müller et al. [42]
Derivado de indol		IC_{50} = 0,43 μM	Nören-Müller et al. [42]

(continua)

(Conclusão)

Tabela 4 - Compostos com atividade inibitória frente à PtpB relatados na literatura.

Inibidor	Estrutura	IC_{50} e/ou Ki	Referência
Derivado de indol		IC_{50} = 0,52 µM	Nören-Müller et al. [42]
Derivado de indol		IC_{50} = 0,86 µM	Nören-Müller et al. [42]
Derivado de indol		IC_{50} = 1,12 µM	Nören-Müller et al. [42]
Derivados indolil-espirotiazolidinonas		IC_{50} = 1,2 µM	Vintonyak et al.[44]
Derivados indolil-espirotiazolidinonas		IC_{50} = 2,1 µM	Vintonyak et al.[44]
Derivado de benzofurano		IC_{50} = 0,038 µM	He et al.[45]

Fonte: Elaborada pela autora.

1.5 Planejamento de fármacos

Determinar e compreender a interação entre macro- e micromoléculas, que pode atuar tanto como agonista/antagonista ou substrato/inibidor, é uma etapa importante para se compreender a maioria dos mecanismos moleculares e processos celulares.[46] Com os grandes avanços na genômica e proteômica houve um aumento significativo no número de alvos moleculares bem como na elucidação do seu papel no processo fisiopatológico. Esse cenário favoreceu a geração de novas oportunidades para o planejamento de novos fármacos.[47]

O processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos é complexo, longo e de alto custo. Os avanços expressivos da química e biologia e a melhor compreensão de vias bioquímicas, alvos moleculares e de mecanismos que levam ao aparecimento e desenvolvimento de doenças, tornaram possível a descoberta de inovações terapêuticas notáveis, proporcionando melhorias significativas na qualidade de vida das diversas populações no mundo.

As moléculas bioativas (ou ligantes, do inglês *hits*) podem ser identificadas a partir de triagens reais (*e.g.*, fenotípicas ou bioquímicas) ou virtuais (*e.g.*, computacionais) de produtos naturais, compostos sintéticos ou coleções combinatórias, ou ainda mediante planejamento racional. É importante mencionar que em todos os casos, as propriedades biológicas devem ser determinadas experimentalmente, sendo necessário o desenvolvimento de ensaios padronizados e validados de alta qualidade.[22]

1.5.1 Cristalografia

O desenvolvimento de novos fármacos mais eficazes e seguros é o objetivo principal do processo de descoberta e planejamento de moléculas bioativas. Nesse contexto, a cristalografia de raio-X tem desempenhado um papel importante na revolução da biologia estrutural como um dos métodos técnica mais poderosa para decifrar a arquitetura tridimensional de macromoléculas biológicas em resolução atômica ou próximo de atômica.[48]

A cristalografia de raio-X é uma ciência dedicada ao estudo da estrutura molecular e cristalina, bem como das relações entre essa estrutura e suas propriedades, e integra especialidades como a física, química, biologia, bioquímica e computação.[49] Os avanços significativos nos métodos de cristalografia de proteínas bem como a disponibilização de feixes de alta intensidade em síncrotrons de última geração têm levado a uma redução drástica

no tempo necessário para a elucidação de estruturas macromoleculares.[50] Um resultado direto desses avanços pode ser observado no crescimento constante no número de estruturas depositadas em bancos de dados que podem ser acessados livremente, entre os quais se destaca o banco de dados de proteínas (PDB, do inglês, *Protein Dara Bank*). A figura 8 representa o aumento exponencial de estruturas depositadas desde 1972 até 2016, no qual o número de estruturas depositadas até o mês de Agosto era de cerca de 122 mil estruturas.

Esses avanços também contribuem para o desenvolvimento dos estudos de macromoléculas, tanto a abordagem tradicional quanto a de larga escala. A abordagem tradicional integra estudos cristalográficos com métodos bioquímicos, biofísicos e de química medicinal para a resolução de um pequeno conjunto de macromoléculas. Já a abordagem em larga escala envolve a elucidação do genoma estrutural através da determinação da estrutura tridimensional do maior número possível de proteínas de um determinado organismo.[49]

Figura 8 - Gráfico do crescimento do número de estruturas depositadas no PDB de 1972 até 2016.

Fonte: Adaptada de PROTEIN...[51]

O objetivo da cristalografia de raio-X é determinar a estrutura tridimensional de uma molécula a partir de um cristal. Para tanto, é necessária uma amostra pura e de alta concentração da molécula de interesse, a qual é cristalizada em condições especiais e, então, exposta à um feixe de raio-X. O padrão de difração resultante é analisado e fornece informações tais como simetria do cristal e organização da proteína na célula unitária. É a partir do padrão de difração que se obtém o mapa de densidade eletrônica, o qual auxilia na determinação da posição dos átomos que constituem o cristal.[52]

Os estudos cristalográficos são componentes fundamentais para o desenvolvimento e a aplicação de métodos em bioinformática, incluindo a modelagem molecular e o planejamento de fármacos baseado na estrutura de receptores (SBDD, do inglês, S*tructure-Based Drug Design*). De fato, diversos métodos em bioinformática utilizam como pré-requisito o conhecimento tridimensional detalhado da macromolécula em estudo.[49]

1.5.2 Métodos computacionais

Desde a seleção do alvo biológico até a descoberta de um novo fármaco inúmeras abordagens computacionais podem ser aplicadas nos diferentes estágios de desenvolvimento. Nos estágios iniciais, o foco principal concentra-se em reduzir o número de possíveis ligantes para um alvo biológico, enquanto que nos estágios mais avançados o trabalho é focado em se obter ligantes com propriedades físico-químicas, farmacodinâmicas e farmacocinéticas próximas ao ideal.[53]

Como existe um grande número de alvos moleculares utilizados no planejamento de fármacos, é necessário que se faça uso de métodos rápidos e relativamente precisos que sejam capazes de reduzir o número de compostos de partida. Uma das principais técnicas utilizadas para tanto é a triagem virtual, que utiliza métodos computacionais, também conhecidos pelo termo "*in silico*", para selecionar compostos orgânicos promissores como ligantes de alvos terapêuticos de interesse. Assim, os compostos identificados como promissores, tanto do ponto de vista farmacofórico como do ponto de vista de suas propriedades físico-químicas, podem ser sintetizados, ou adquiridos de empresas especializadas e, posteriormente, investigados em ensaios biológicos.[54]

Os métodos baseados na estrutura do alvo molecular utilizam como estratégia principal os cálculos de docagem para seleção de ligantes. Os métodos de docagem molecular (do inglês *molecular docking*) são baseados no modelo chave-fechadura, proposto por Emil Fischer em 1894, no qual o alvo molecular é associado à uma "fechadura" e seu sítio de ligação é considerado como o "buraco da fechadura". A possível "chave" é o ligante, e a interação entre o ligante e o alvo está relacionada à uma das possíveis ações de "abrir ou trancar" a porta. É importante lembrar que, no meio biológico, tanto o ligante como o alvo molecular são flexíveis e essa flexibilidade pode influenciar o processo de formação do complexo receptor-ligante.[55]

Atualmente existem diversos programas de docagem molecular disponíveis, sendo Gold,[56] Glide,[57-58] FlexX,[59] Surflex-Dock,[60] Autodock[61] e DOCK[62] os que mais se destacam.[63] Resumidamente, os programas de docagem molecular geram diferentes conformações para os ligantes, em seguida avaliam e classificam as conformações de menor energia através de funções de pontuação de energia. Os programas distinguem-se principalmente pelo método de busca e pela função de pontuação empregada. Programas de busca estocástica, como Glide, AutoDock e Gold empregam tanto algoritmos genéticos como métodos de Monte Carlo para avaliar conformações dos ligantes flexíveis no sítio ativo, enquanto que os algoritmos de construção incremental, como por exemplo Surflex e FlexX, envolvem a montagem de fragmentos rígidos unidos por ligações rotacionáveis. De modo geral, os programas de docagem têm como objetivo principal gerar modos de ligação realistas mantendo o custo computacional dentro de um limite aceitável, permitindo, assim, a identificação e classificação de conformações bioativas úteis para o processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos.[64-65]

Uma das alternativas para se restringir o imenso espaço químico atualmente disponível consiste na utilização de modelos farmacofóricos. A definição de um farmacóforo, de acordo com a IUPAC é,

> "Um farmacóforo é um conjunto de características eletrônicas e estéricas necessárias para garantir a interação supramolecular ideal com a estrutura do alvo molecular específico e ativar (ou inibir) a sua resposta biológica." [66]

Um modelo farmacofórico tridimensional pode ser construído com base em ligantes conhecidos, de modo a sobrepô-los e analisar características em comum dos mesmos, ou através do uso de sondas que são posicionadas na cavidade do sítio de ligação da molécula de interesse indicando possíveis pontos de interação entre a micro- e a macromolécula.[67] Portanto, após a construção do modelo farmacofórico, é possível fazer uma busca tridimensional e selecionar ligantes em banco de dados que tenham as características desejada de acordo com o farmacóforo, em seguida, as moléculas que satisfazem as restrições farmacofóricas podem ser utilizadas no processo de triagem virtual baseado no alvo receptor.

Alguns programas utilizados para a construção do farmacóforo são MOE (*Chemical Computing Group*), PHASE (Schrödinger Inc.) e Sybyl (Tripos Inc.), que também apresenta integrado à plataforma o sistema Unity, utilizado para a busca tridimensional.

Objetivos

2 OBJETIVOS

O objetivo fundamental desta dissertação de mestrado é estabelecer uma plataforma produtiva para a obtenção das enzimas PtpA e PtpB de *M. tuberculosis* em sua forma pura visando-se a determinação estrutural e a utilização dessa informação para a identificação de novos candidatos a ligantes. Para alcançar esse objetivo fundamental estabelecemos os seguintes objetivos específicos:

- Clonagem das sequências codificadoras para as enzimas PtpA e PtpB de *M. tuberculosis*;
- Expressão e purificação das enzimas PtpA e PtpB de *M. tuberculosis*;
- Cristalização das enzimas PtpA e PtpB de *M. tuberculosis* em complexo com inibidores previamente identificados;
- Determinação da estrutura de complexos por cristalografia de raios X;
- Construção de modelos farmacofóricos tridimensionais baseados nos sítios de ligação da PtpA e PtpB de *M. tuberculosis*;
- Triagem virtual com as enzimas PtpA e PtpB de *M. tuberculosis*;
- Identificação e aquisição de candidatos a novos inibidores das enzimas PtpA e PtpB de *M. tuberculosis.*

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Estudos Experimentais

3.1.1 Clonagem em vetores de expressão

A amplificação dos genes que codificam as enzimas PtpA e PtpB de *M. tuberculosis* foi realizada através da reação em cadeia da polimerase (PCR), empregando o sistema Phusion™ (Finnzymes) – polimerase de alta fidelidade. Na reação foram empregados como DNA molde para reação plasmídeos contendo o fragmento a ser amplificado, gentilmente cedido pelo Prof. Hernán Terenzi da Universidade Federal de São Catarina, e os seguintes oligonucleotídeos iniciadores:

PtpA_LIC_Fw – 5' **CAGGGCGCCA**TGGTGTCTGATCCGCTGC 3'
PtpA_LIC_Rv – 5' **GACCCGACGCGGT**TAACTCGGTCCGTTCCG 3'
PtpB_LIC_Fw – 5' **CAGGGCGCCA**TGGCTGTCCGTGAACTGC 3'
PtpB_LIC_Rv – 5' **GACCCGACGCGGT**TATCCGAGCAGCACCC 3'

onde, destacado em **negrito** estão as sequência de bases adicionais necessárias para o emprego do sistema LIC escolhido.

Após a amplificação do segmento gênico de interesse os fragmentos foram purificados a partir do gel de agarose e tratados com T4 DNA polimerase na presença de dATP, formando-se as extremidades coesivas necessárias à clonagem. Os vetores pETM11, pETTrx e pETNus-1a, por sua vez, foram extraídos de *E. coli* DH5α, tratados com BsaI e recuperados do gel, seguindo-se o tratamento com T4 DNA polimerase na presença de dTTP. A clonagem foi realizada com um conjunto de vetores adaptados para a clonagem independente de Ligação (LIC, do inglês *Ligation Independent Cloning*),[68] e o produto das reações de anelamento foi empregado na transformação de células competentes de *E. coli* DH10B. Confirmou-se a presença do plasmídeo nos clones recombinantes através de PCR de colônia (figura 9), e em seguida essas colônias positivas foram cultivadas em meio LB a 37 ºC por 16h para extração do DNA plasmidial.

3.1.2 Testes de expressão

Células de *E. coli* Rosetta (DE3) foram transformadas com DNA plasmidial extraído dos clones recombinantes e cultivadas a 37 ºC em meio LB até a densidade óptica de 0,8 em 600 nm. Em seguida a expressão proteica foi induzida pela adição de 1 mM isopropil-β-galactosídeo (IPTG). Após o término do período de expressão, 4 h para expressão conduzida a 37 ºC e 16 h para expressão conduzida a 20 ºC, as células foram centrifugadas (4000 g, 4 º C, 20 min) e lisadas por meio de ciclos de congelamento em Ni_2 e descongelamento. A expressão protéica na fração solúvel e insolúvel foi avaliada por eletroforese em gel de acrilamida.

3.1.3 Expressão em maior escala e purificação

Para expressão em maior escala utilizou-se 10 mL de pré-inóculo crescido por 16 horas em LB a 37 º C para 1000 mL de meio auto indutor ZYM5052[69]. A expressão ocorreu por 16 h a 20 º C, seguindo-se a separação das células por centrifugação. Após a ressuspensão em tampão (50 mM Tris pH 8,0; 500 mM NaCl; 10% glicerol e 20 mM imidazol) as células foram lisadas por sonicação em banho de gelo na presença do inibidor de protease PMSF (2 mM) e do agente redutor DTT (4 mM). A fração solúvel foi separada por centrifugação (20.000 g, 4 ºC, 20 minutos) para a purificação em etapas de cromatografia por afinidade e exclusão molecular.

A primeira etapa de purificação foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna HisTrap HP 5 mL explorando gradiente de imidazol, utilizando-se para tanto os tampões A (50 mM Tris pH 8,0; 500 mM NaCl; 10% glicerol e 20 mM imidazol) e B (50 mM Tris pH 8,0; 500 mM NaCl; 10% glicerol e 500 mM imidazol). Após a remoção do imidazol realizada por cromatografia de exclusão molecular em coluna HiPrep Desalting 26/40 Sephadex G-25 Fine, a fração contendo a proteína de interesse foi incubada com TEV protease por 16h a 4 ºC para remoção da cauda de afinidade. Ao final da clivagem, a proteína foi separada por nova etapa de cromatografia de afinidade utilizando o tampão A e submetida à cromatografia de exclusão molecular em coluna Hiload 16/60 Superdex 200, utilizando o tampão composto por 20 mM Tris pH 7,5 e 200 mM NaCl.

3.1.4 Triagem e otimização das condições de cristalização

A proteína pura foi concentrada até 10 mg/mL para a triagem das condições de cristalização. Foram utilizados os kits comerciais *Index, Crystal Screen* (Hampton Research), *Classics* e *PEGs* (Qiagen). Os experimentos de cristalização, conduzidos a 18 ºC, foram realizados manualmente empregando o método de gota assentada. As gotas de 2 µL seguiram a proporção de 1:1 de proteína e solução da condição de cristalização. Os experimentos de triagem foram inspecionados nos dias 1,3,5,7,14 e 28 utilizando lupa estereoscópica.

As condições em que surgiram *hits* de cristalização durante a triagem foram otimizadas buscando-se obter cristais com tamanho e características adequadas aos experimentos de difração de raios X. Para isso buscou-se variar a concentração do agente precipitante, do sal e do agente tamponante de cada condição de cristalização identificada como promissora. Durante a otimização, as gotas de 4 µL foram montadas empregando o método da gota suspensa, na proporção de 1:1.

A técnica de *soaking* foi empregada para obtenção de complexos proteicos com alguns inibidores identificados, para tanto, cristais proteicos previamente obtidos foram transferidos para gotas contendo o agente crioprotetor e 10 mM do composto alvo. Após a incubação de 5-20 min, os cristais foram submetidos a experimentos de difração de raios X.

3.1.5 Coleta e processamento de dados de difração de raios X para a PtpB

A coleta de dados de difração de raios X foi realizada na linha MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron do Brasil (LNLS) – Campinas/SP, utilizando o detector MAR CCD. Os cristais obtidos após otimização das condições de cristalização foram retirados da gota com o auxílio de *loop* de nylon e lavados na solução da condição de cristalização acrescida de 20% do crioprotetor etilenoglicol. Primeiramente os cristais foram analisados a partir da coleta de imagens a 0 e 90 º. A partir do padrão de difração obtido, a estratégia de coleta foi definida com auxílio do programa Imosflm,[70] buscando obter a maior completeza possível com o menor número de imagens, reduzindo assim o dano radiativo.

O conjunto completo de dados para a PtpB, composto por 90 imagens, foi processado no programa Imosflm, teve o escalonamento dos dados no programa Scala[71] (CCP4) e as fases

iniciais foram obtidas pelo método de substituição molecular. A substituição molecular foi realizada no programa Phaser[72], empregando as coordenadas da estrutura de PtpB, depositada no Banco de Dados De Proteína (PDB) sob código de acesso 1YWF[31], como modelo de busca. Ciclos de refinamento no espaço real e espaço recíproco foram estabelecidos empregando os programas Coot[73] e Refmac5,[74] respectivamente. A evolução do processo de refinamento foi acompanhada pelo monitoramento dos fatores R e R_{free}. Após a convergência do processo do processo de refinamento, o modelo final foi validado no servidor MolProbity.[75]

3.2 Estudos computacionais

3.2.1 Desenvolvimento do modelo farmacofórico

A primeira etapa do processo de construção do modelo farmacofórico 3D foi o mapeamento do sítio catalítico da enzima alvo com o auxílio de sondas moleculares, capazes de identificar as regiões mais favoráveis para interação com grupos hidrofóbicos, doadores e aceptores de ligação de hidrogênio. Para tanto, foram utilizadas as estruturas da PtpA (PDB ID, 1U2P) e PtpB (determinada nesta dissertação) de *M. tuberculosis.* Empregamos o protocolo "protomol_generate", disponível no programa Surflex-Dock, para o mapeamento das regiões favoráveis para interação com sondas moleculares específicas (i.e., C=O, NH e Csp^3). Os resíduos catalíticos Cys16 (PtpA) e Cys160 (PtpB) foram utilizados para indicar o sítio de ligação e os parâmetros -proto_thresh 0,85 e -proto_bloat 10 foram utilizados para o mapeamento das interações com as sondas moleculares em ambos os sítios catalíticos.

3.2.2 Busca utilizando o programa UNITY

As buscas tridimensionais foram realizadas com o programa UNITY (plataforma SYBYL X). Para a PtpA, os ligantes selecionados deveriam apresentar ao menos 3 das 7 características farmacofóricas do modelo, sendo elas: i. uma região favorável para interação com grupos doadores de ligação de hidrogênio; ii. uma região favorável para interação com

grupos aceptores de ligação de hidrogênio; e ii. uma região favorável para interação com grupos hidrofóbicos. Para a PtpB, os ligantes selecionados deveriam apresentar ao menos 5 das 17 características farmacofóricas do modelo, sendo elas: i. duas regiões favoráveis para interação com grupos doadores de ligação de hidrogênio; ii. duas regiões favoráveis para interação com grupos aceptores de ligação de hidrogênio e; iii. uma região favorável para interação com grupos hidrofóbicos.

3.2.3 Base de dados de compostos

A base de dados de compostos selecionada para os estudos de triagem virtual foi o subconjunto "*Leads-Now*" da ZINC database.[76] Além dos parâmetros que caracterizam esse subconjunto (e.g., MM ≤ 300 Da; log P ≤ 3,5 no. ligações rotacionáveis ≤ 7) incluímos um filtro adicional de similaridade química, para tanto, excluímos moléculas cujo índice de Tanimoto era > 60%.

3.2.4 Docagem molecular

O preparo das estruturas dos ligantes foi realizado com o programa LigPrep (versão 2.9, Schrödinger) que gerou várias conformações, diferentes isômeros e possíveis estados de protonação (Epik, pH 7 ± 2) das moléculas disponíveis na base de dados. Cargas parciais (OPLS-2005) foram atribuídas para todos os átomos das moléculas da base de dados que foram subsequentemente minimizada. As moléculas minimizadas foram exportadas para o formato *.mol2* e utilizadas na protocolo de docagem molecular.

A modelagem molecular foi realizada com o programa GLIDE[57-58] (versão 6.2, Schrodinger, LLC, 2014). Para a execução do protocolo de docagem molecular e análise dos resultados, a interface Maestro (versão 9.7, Schrodinger, LLC, 2014) e PyMOL (versão 1.6; Schrodinger, LLC) foram empregados. Átomos de hidrogênio foram adicionados na geometria padrão; resíduos de histidina, glutamina, asparagina foram verificados manualmente para orientação, protonação e estados tautoméricos com o protocolo *side-chain wizard* no PyMOL 1.6. O protocolo *grid generation wizard* foi utilizado para definir a região na qual o modo de ligação das moléculas da base de dados deveria ser modelado. O *grid*

utilizado incluiu todos os resíduos numa caixa 3D cujo o centro consistia nas coordenadas atômicas do carbono α das cisteínas catalíticas, Cys16 (PtpA) e Cys160 (PtpB). Em seguida, utilizamos os parâmetros padrões dos modos de docagem molecular SP (*Standard Precision*) e XP (*Extra Precision*) para a seleção dos candidatos a ligantes de PtpA e PtpB. Por fim, inspeção visual aliada à pontuação de cada molécula foi empregada para a seleção dos candidatos a ligantes da PtpA e PtpB.

Resultados e Discussão

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudos Experimentais

4.1.1 Clonagem, Expressão e Purificação da PtpA e PtpB de *M. tuberculosis*

O emprego do sistema de clonagem independente de ligação (LIC) traz uma série de vantagens, mas pode-se destacar principalmente a redução do número de etapas experimentais, mesmo considerando a condução de um número maior de experimentos. Assim, foi possível a clonagem das duas sequências gênicas em três diferentes vetores, permitindo uma escolha racional sobre qual construção gênica empregar nos ensaios de expressão e purificação em maior escala.

O processo de clonagem iniciou-se com o planejamento e síntese dos oligos iniciadores empregados para amplificar o fragmento alvo. Neste processo, considera-se a sequência necessária para hibridização com os vetores empregadas na etapa posterior. A amplificação das duas sequências codificantes (PtpA e PtpA) foi realizada com sucesso (Figura 1figura 9).

Os fragmentos amplificados foram submetidos ao tratamento com a T4 DNA polimerase. Esta enzima possui dupla atividade, polimerase no sentido 5’ – 3’ e exonuclease no sentido 3’ – 5’, esta última explorada pelo sistema LIC. A presença de um único deoxinucleotídeo durante o tratamento, somado com as sequências incluídas durante o planejamento dos oligos, permitem a formação de extremidades coesivas.

A enzima T4 DNA polimerase também foi empregada para tratamento dos vetores de expressão escolhidos, gerando extremidades coesivas complementares com as extremidades dos fragmentos gênicos. A interação entre as bases do vetor e do inserto é suficientemente estável, portanto, dispensa a necessidade de um passo adicional de ligação com DNA ligase. Após a incubação dos vetores com os fragmentos, o material é utilizado para transformação de bactérias quimiocompetentes e estas fazem a ligação fosfodiéster através de seu sistema de reparo de DNA.

Os fragmentos foram clonados nos vetores de expressão pETM11, pETTrx e pETNUS. Os clones recombinantes obtidos foram avaliados por PCR de colônia (figura 9) e

as colônias positivas utilizadas para preparo de DNA plasmidial. Após a confirmação da integridade das construções por sequenciamento, os materiais foram empregados para transformação de cepas de expressão Rosetta DE3, que possuem a vantagem de complementação de tRNA raros.

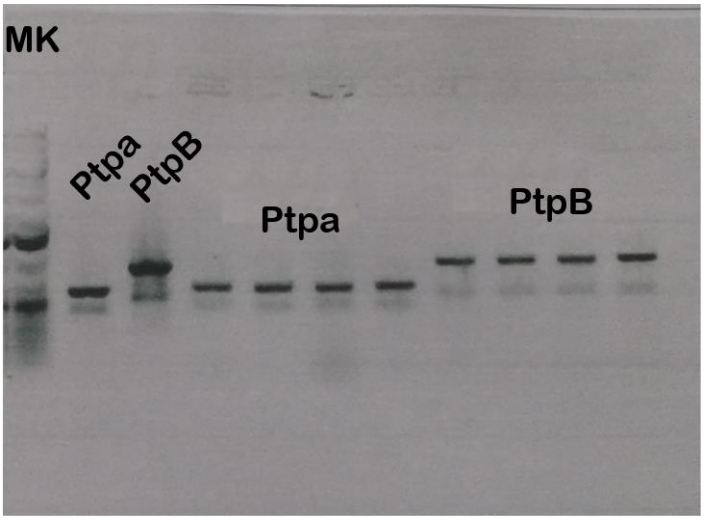


Figura 9 - Gel de eletrofore em agarose 1%. Primeiras duas bandas são respectivas à amplificação dos genes de PtpA e PtpB de M. tuberculosis a partir do vetor de origem, demais reações são PCR dos clones recombinantes para verificação da positividade das construções.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para aumentar as chances de sucesso na identificação de um sistema de expressão adequado para os estudos estruturais, estabeleceu-se três construções em paralelo. A primeira delas incluindo apenas uma cauda de hexahistidina na proteína alvo (pETM11), permitindo a purificando através de procedimentos simplificados; e as outras duas construções empregou-se duas proteínas de fusão (tiorredoxina – pETTrx , e Proteína NusA – pETNusA) adicionais a cauda de hexahistidina, buscando aumentar a proporção de proteína obtida na fração solúvel. Da mesma maneira, avaliamos a expressão a temperatura de 37 e 20 ºC, considerando que a expressão a baixa temperatura reduz a tendência de algumas proteínas se agregarem e também propicia enovelamento correto por alterar a cinética de tradução proteica.

Todos estes parâmetros foram avaliados em paralelo em pequena escala (3 mL) e o perfil de expressão de expressão de cada sistema foi avaliado através de eletroforese desnaturante (SDS-PAGE). Para as duas proteínas, PtpA e PtpB, obteve-se expressão solúvel com todas as construções quando conduzidas a baixa temperatura, no entanto, o rendimento com as construções contendo apenas a cauda de hexahistidina foi maior, desta maneira selecionou-se estas construções para aumento de escala e purificação.

A expressão da PtpA e PtpB no vetor pETM11 foi então conduzida em 8 L de meio autoindutor, com temperatura de expressão de 20ºC por 20 h. A purificação baseou-se essencialmente em etapas cromatográficas sucessivas, sendo os objetivos de cada etapa **i.** isolar a 6xProteína do lisado proteico por afinidade; **ii.** substituir o tampão para aumentar a eficiência da reação de digestão com a protease TEV; **iii.** isolar a proteína alvo das remanescentes 6xHisProteína, 6xHis e TEV; **iv.** garantir a homogeneidade do estado oligomérico e conformacional. O alto grau de pureza pode ser verificado pela eluição de pico isolado e simétrico durante a etapa de gel filtração, bem como, pela presença de banda única no gel de eletroforese desnaturante (figura 10). O rendimento final típico foi de 15 e 30 mg/L de expressão de proteína pura para PtpA e PtpB, respectivamente.

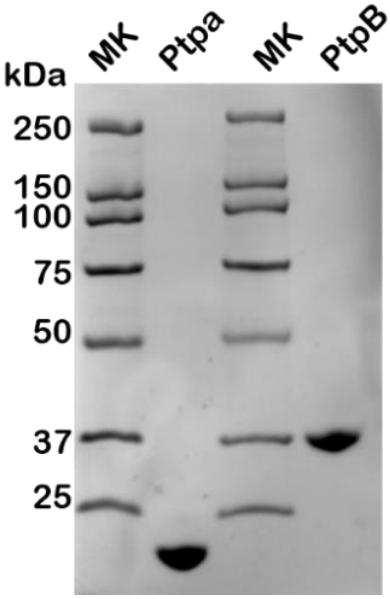


Figura 10 - Gel SDS-PAGE 15%. Elevada pureza, representada pela presença de banda única, obtida após etapas cromatográficas para as enzimas PtpA e PtpB de M. tuberculosis.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.2 Cristalização, Coleta de Dados e Determinação da Estrutura 3D da PtpB de *M. tuberculosis*

Inicialmente, buscou-se reproduzir as condições de cristalização identificadas anteriormente e depositadas no banco de dados de proteínas (PDB). No entanto, apenas uma

condição para a proteína PtpB conseguiu produzir cristais. Desta maneira, procedeu-se com a triagem e identificação de novas condições favoráveis para a cristalização das proteínas.

As duas proteínas (PtpA e PtpB) puras foram inicialmente concentradas a 10 mg/mL e submetidas a triagem de aproximadamente 400 condições de cristalização, empregando a estratégia de matriz esparsa e a técnica de difusão de vapor com gota assentada (do inglês, *sitting drop* –Figura 11 figura 11).

Para a proteína PtpA foram identificadas mais de 10 condições promissoras, com a formação de cristais proteicos pequenos em forma de pequenas agulhas. Testes iniciais de difração de raios X evidenciaram a natureza proteica do material cristalino e etapas de otimização foram realizadas para a obtenção de cristais adequados para a coleta de dados cristalográficos. Até o momento, os cristais obtidos após as etapas de otimização não foram suficientes adequados para coleta de um conjunto de dados de difração completo a média/alta resolução. Os cristais de PtpA obtidos apresentam baixo poder de difração, com resolução máxima de apenas 5 Å.

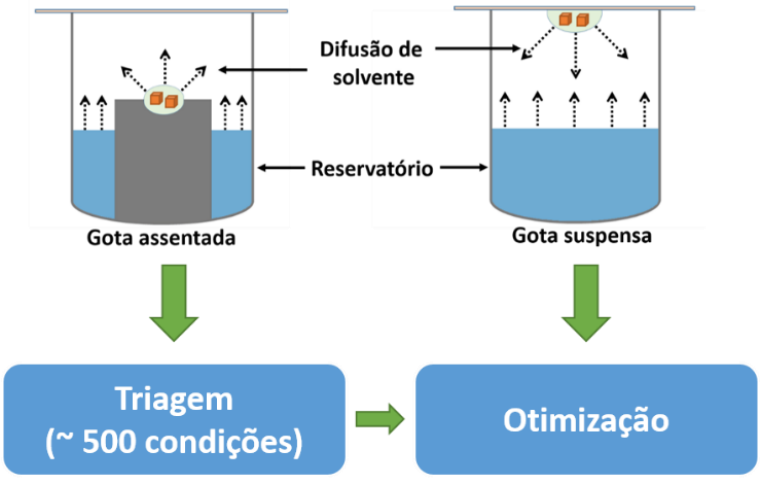


Figura 11- Técnicas de cristalização por difusão de vapor, gota assentada e gota suspensa, empregadas na triagem e otimização das condições de cristalização das enzimas PtpA e PtpB, respectivamente.

Fonte: MALUF.[49]

Para a proteína PtpB conseguiu-se reproduzir com sucesso a condição disponível na literatura, obtendo-se cristais suficientemente adequados para os experimentos de difração de raios X (figura 12). Os cristais obtidos foram resfriados a temperatura criogênica (-196 ºC) e os dados cristalográficos coletados na linha MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS – Campinas). Um conjunto completo de dados foi coletado a resolução de 1,95 Å. A figura 13 indica uma imagem representativa do padrão de difração de raios X típico de PtpB

obtido durante a coleta de dados. A tabela 5 apresenta os principais parâmetros estatísticos obtidos durante o processamento.

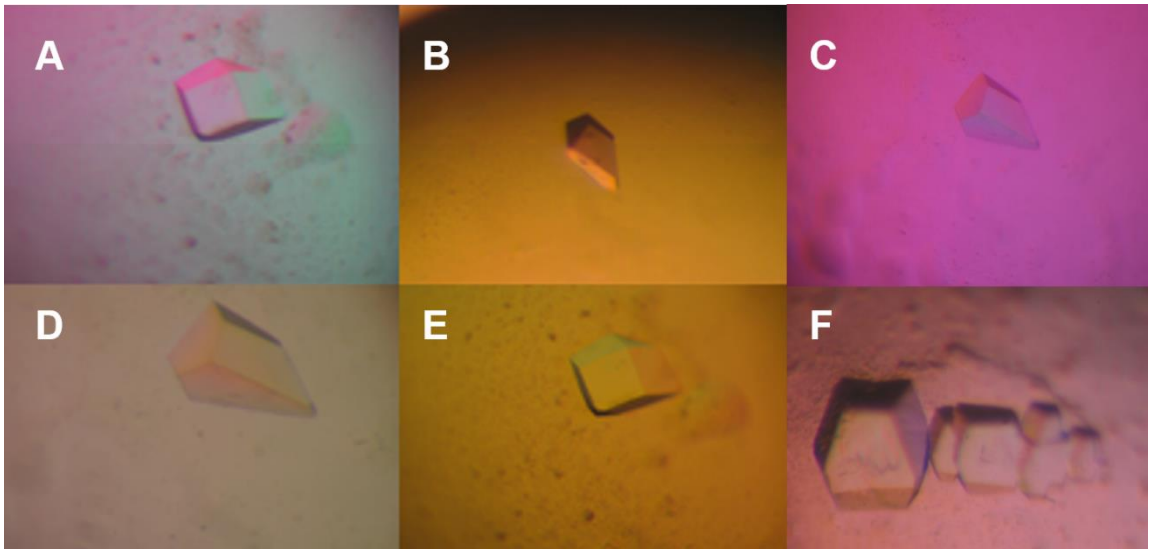


Figura 12 - Cristais de PtpB de M. tuberculosis obtidos na condição 50 mM de KH2PO4, 20 % PEG 8000, 10 mM de acetato de sódio pH 5,5, 4 ºC.

Fonte: Elaborada pela autora.

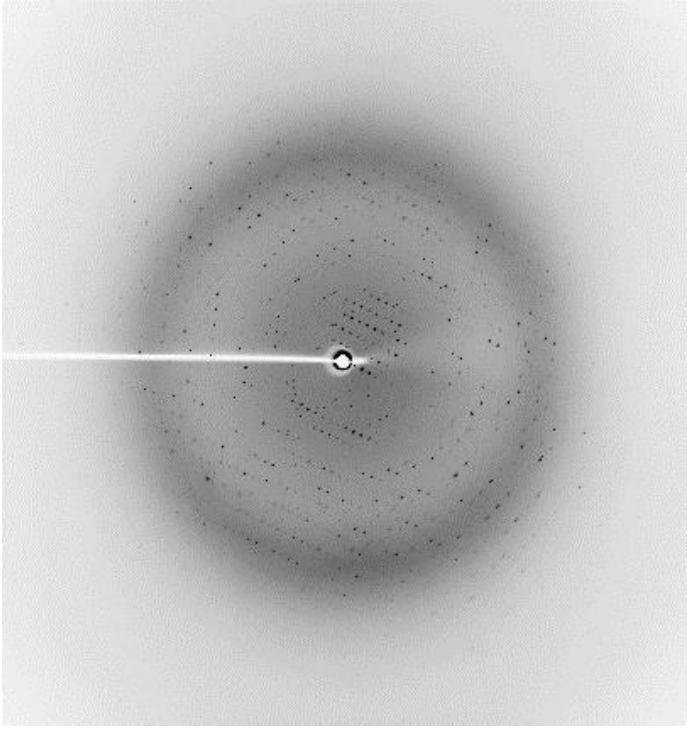


Figura 13 - Imagem representativa do padrão de difração de raios X obtidos para os cristais de PtpB de M. tuberculosis, obtidos na linha de luz MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS).

Fonte: Elaborada pela autora.

As fases iniciais para a determinação da estrutura de PtpB foram obtidas por substituição molecular utilizando apenas uma cadeia do modelo cristalográfico proveniente do mesmo organismo (*M. tuberculosis*), depositado no banco de dados de proteínas (PDB ID 1YWF[31]), como modelo de busca no programa Phaser.[72] A solução fornecida pelo programa foi verificada quanto aos parâmetros estatísticos, bem como, pela qualidade dos mapas de densidade eletrônica iniciais.

Os mapas iniciais (2Fo–Fc contornado a 1σ e Fo–Fc contornado a 3σ) foram empregados nas etapas de construção e refinamentos das coordenadas atômicas no espaço real, seguido de refinamento no espaço recíproco atrelado a restrições esteroquímicas. A evolução do processo de refinamento foi acompanhada pelo monitoramento dos parâmetros *R e* R_{free}. O modelo final foi validado no servidor Molprobity[75], que faz uma avaliação sistemática da geometria e estereoquímica do modelo apresentado. Além disso, buscou-se reduzir a possibilidade de artefatos mascarados na estatística global, através de inspeção visual local.

Tabela 5 - Estrutura molecular e potência inibitória dos derivados de chalcona e sulfonil-hidrazonas como inibidores da PtpB de M. tuberculosis.

	PtpB
Coleta	
Fonte	MX2 (LNLS)
Detector	Mar CCD
Δφ	1
Imagens	90
Processamento	
Resolução (Å)	47,59 – 1,90
Grupo espacial	I 4_1
Parâmetros de cela - a,b,c (Å)	113,42 113,42 52,42
Parâmetros de cela (°)	90,00 90,00 90,00
N° reflexões totais	177.541
N° reflexões únicas	24.422
Multiplicidade	7,3 (7,2)
Completeza (%)	99,8 (100,0)
R_{meas} (%)	0,067 (0,593)

(continua)

(Conclusão)

Tabela 5 - Estrutura molecular e potência inibitória dos derivados de chalcona e sulfonil-hidrazonas como inibidores da PtpB de M. tuberculosis.

<(I)/σ(I)>	17,0 (3,6)
Mosaicidade média	0,24
Refinamento	
R_{work} (%)	0,19
R_{free} (%)	0,24

Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.3 Estrutura 3D da PtpB de *M. tuberculosis*

O modelo estrutural compreende os resíduos 4-85 e 117-275, uma molécula de fosfato ligado no sítio catalítico, e 195 moléculas de água. A densidade eletrônica não foi observada para os resíduos 86-116. Os resíduos ausentes na estrutura de PtpB determinada pertencem a uma inserção exclusiva de PtpB de *M. tuberculosis*.[31] Essa inserção é rica em resíduos de Gly e localiza-se imediatamente após a alça flexível FPD.

A estrutura da PtpB de *M. tuberculosis* determinada indica um único domínio globular com uma folha β paralela central de quatro fitas rodeada por hélices α que flanqueiam a folha β central (figura 14 A e B). A PtpB apresenta a sequência consenso comum a todas proteínas tirosina fosfatases HCXAGXGRT que contém os resíduos catalíticos Cys160 e Arg166, o motivo "P loop" localizado no sítio ativo e o resíduo Asp165 que atua como ácido geral na reação catalítica.[77] A PtpB de *M. tuberculosis* pertence à classe das PTP convencionais ou fosfatase de especificidade dual (DSP, do inglês, *dual-specificity phosphatase*).

A análise estrutural do modelo 3D construído indicou a presença de um íon fosfato ligado na cavidade central da estrutura. A ligação desse íon, proveniente das condições de cristalização, é estabilizada por ligações de hidrogênio com os átomos das cadeias laterais dos resíduos Cys160, Asp165, Arg166, Glu218 e os grupos NH das cadeias principais dos resíduos Ala162, Lys164, Asp165 e Arg166. Além disso, o íon fosfato está orientado no centro do sítio catalítico pelo dipolo positivo da hélice α5. Estas interações auxiliam o correto posicionamento do substrato fosfatado para que ocorra o ataque nucleofílico do grupo tiol da

cisteína catalítica.[31; 77] A análise detalhada do sítio catalítico indica que o C4 do resíduo Phe222 está a 4,3 Å do átomo de oxigênio do íon fosfato, numa orientação que sugere um estado conformacional equivalente ao ligado ao substrato natural da enzima. O resíduo Phe222 está localizado em uma segunda região de inserção exclusiva de PtpB de *M. tuberculosis*.[31] Essa inserção enovela-se na forma de duas hélices-α que se fecham sobre o sítio catalítico bloqueando o acesso do solvente. A presença desse elemento de estrutura secundária inserido na PtpB de *M. tuberculosis* sugere um mecanismo de regulação da atividade catalítica. Estudos anteriores demonstraram que a atividade da PtpB é sensível a oxidação reversível do resíduo catalítico Cys160.[78; 79] Nesse sentido, a conformação fechada observada na estrutura resolvida nesta dissertação preveniria o resíduo Cys160 de ser oxidado protegendo assim a atividade enzimática da PtpB. Portanto, a estrutura determinada de PtpB de *M. tuberculosis* mimetiza uma conformação inativa da enzima.

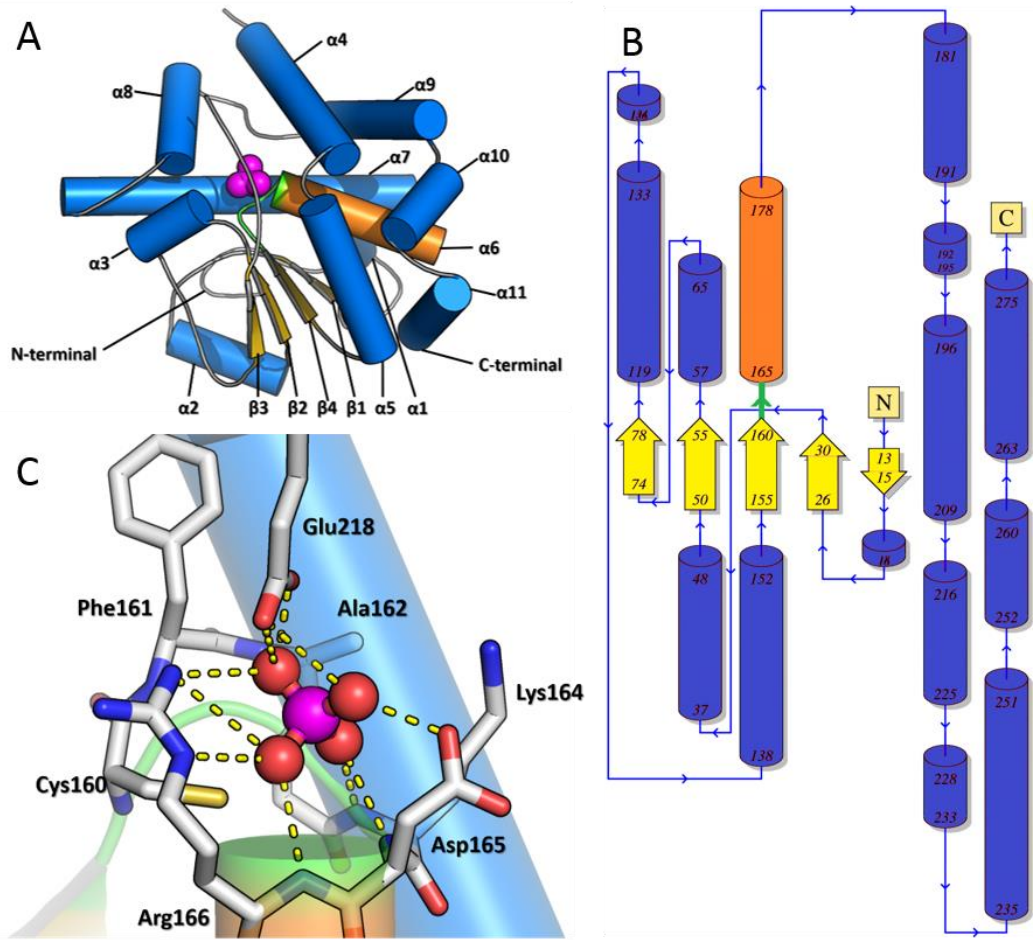


Figura 14- (A) Estrutura 3D da PtpB de M. tuberculosis. (B) Topologia da PtpB de M. tuberculosis. (C) Modo de ligação do íon fosfato no sítio catalítico da PtpB de M. tuberculosis. Os elementos de estrutura secundária hélice-α, folhas-β e alças estão indicados em azul, amarelo e cinza, respectivamente. A hélice-α6, P-loop e íon fosfato estão indicados em laranja, verde e magenta, respectivamente.

Fonte: Elaborada pela autora.

Atualmente no banco de dados de proteínas há somente duas estruturas de PtpBs de *M. tuberculosis* disponíveis. A primeira, sob o código 1YWF[31], corresponde a estrutura da enzima em complexo com o íon fosfato, e a segunda, sob o código 2OZ5, corresponde a PtpB em complexo com um inibidor derivado do ácido oxâmico.[32] A comparação estrutural entre a PtpB resolvida em nosso laboratório com as estruturas de PtpBs disponíveis no banco de dados de proteínas indicam valores de desvio médio das raízes quadradas (rmsd, do inglês, *root mean square deviation*) de 0,1 (1YWF) e 3,8 (2OZ5) Å para os Cα de resíduos equivalentes.

No primeiro caso, o valor de rmsd calculado indica elevada semelhança estrutural na sobreposição entre os dois modelos 3D (figura 15 A). Esse dado sugere que nossa estratégia de clonagem, expressão, purificação e determinação estrutural foi eficaz na produção e determinação da estrutura 3D de PtpB de *M. tuberculosis*. É importante mencionar que a

estratégia utilizada para a obtenção da PtpB de *M. tuberculosis* neste trabalho baseou-se em uma construção gênica diferente daquela reportada com equivalência de eficiência, além disso, a estratégia tem como vantagem a obtenção da proteína alvo em grandes quantidades (rendimento ~ 20 mg/L).

A comparação da estrutura resolvida nesta dissertação com aquela em complexo com o inibidor derivado do ácido oxâmico (rmsd = 3,8 Å), indica que a conformação da proteína em complexo é significativamente diferente, sugerindo grande mudança conformacional em função da interação com o inibidor (figura 15 B). De fato, a principal mudança conformacional induzida pelo inibidor refere-se a região de inserção entre os resíduos 211-224, exclusiva da PtpB de *M. tuberculosis* (figura 15 C).

Esses dados permitiram a melhor compreensão das bases moleculares envolvidas no processo de reconhecimento molecular bem como as características estruturais dos estados conformacionais da PtpB de *M. tuberculosis*.

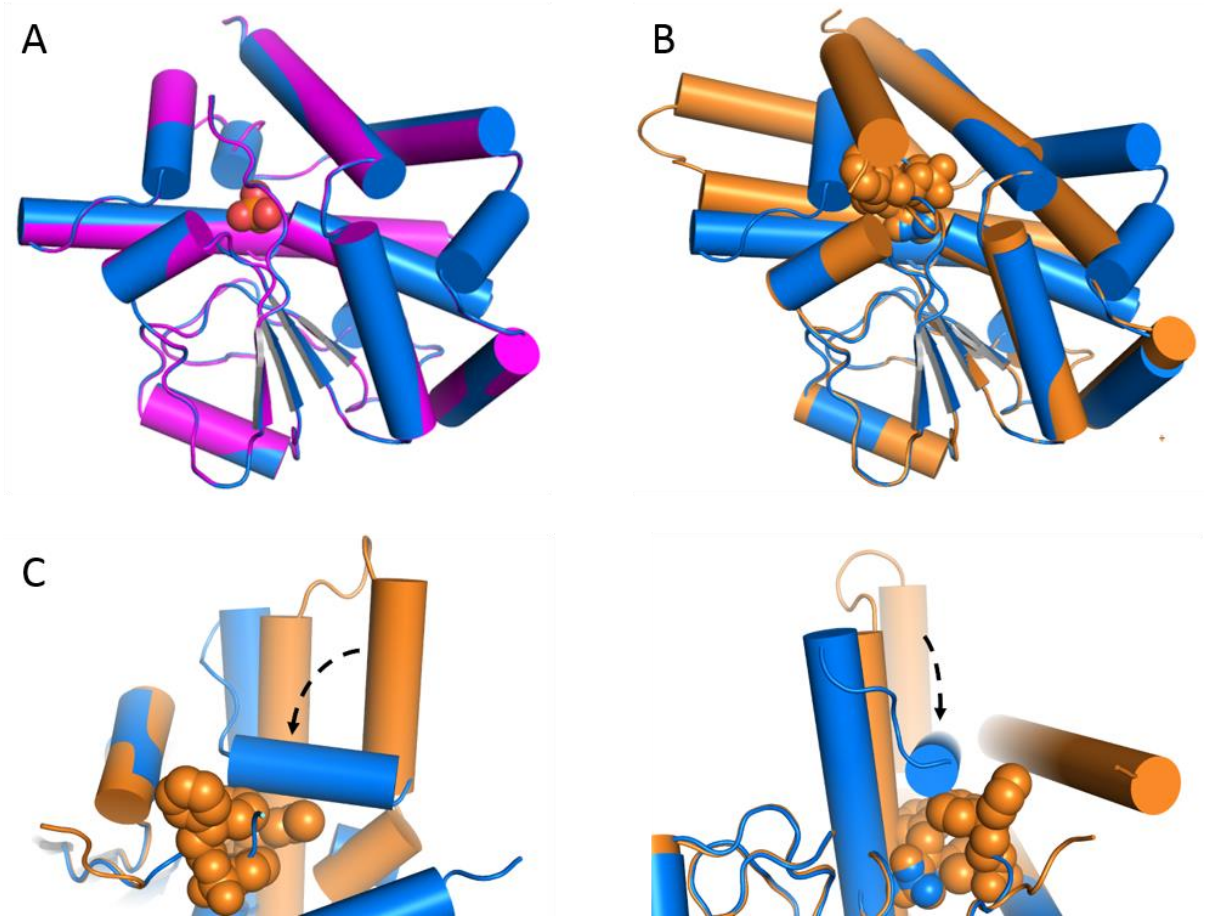


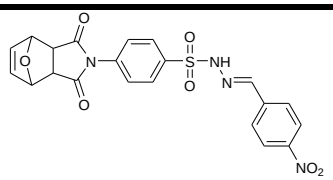
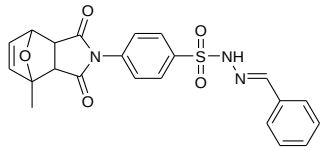
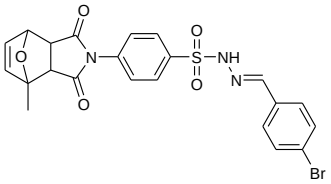
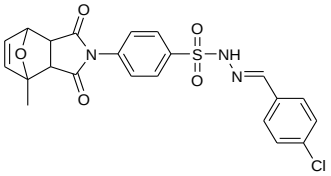
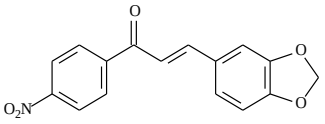
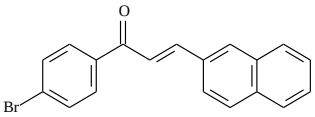
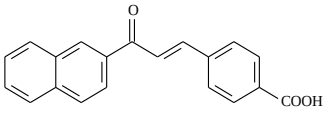
Figura 15 - Sobreposição estrutural dos modelos 3D da PtpB de M. tuberculosis. (A) Estrutura determinada nesta dissertação está indicada em azul e a estrutura depositada no banco de dados de proteínas (PDB ID, 1YWF) está indicada em magenta. (B) Estrutura determinada nesta dissertação está indicada em azul e a estrutura depositada no banco de dados de proteínas em complexo com inibidor (PDB ID, 2OZ5) está indicada em laranja. Os ligantes estão indicados no modelo de esferas e coloridos de acordo com a estrutura a qual estão em complexo. (**C**) Visão ortogonal da mudança conformacional observada na transição da forma aberta e fechada da PtpB de *M. tuberculosis*.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.4 Ensaios de *soaking*

Baseado nas informações estruturais coletadas, ensaios de *soaking* da PtpB na presença de inibidores foram realizados para a elucidação do modo de ligação. Os inibidores foram gentilmente cedidos pelo Prof. Hernán Terenzi da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os inibidores de PtpB são derivados de chalcona e sulfonil-hidrazonas com diferentes padrões de substituição (tabela 6). A potência inibitória dos compostos varia entre 12 e 41 µM[39].

Tabela 6 - Estrutura molecular e potência inibitória dos derivados de chalcona e sulfonil-hidrazonas como inibidores da PtpB de M. tuberculosis.

Código	Estrutura Molecular	PtpB - IC_{50} (µM)
K11		41 ± 1
K13		18 ± 1
K87		39 ± 1
K25		21 ± 2
P4		51 ± 8
C25		25 ± 6
R32		12 ± 2

Fonte: Elaborada pela autora.

A condição de cristalização utilizada para a determinação da estrutura 3D da PtpB de *M. tuberculosis* foi mantida para a obtenção de cristais de qualidade. A solução original da condição de cristalização (50 mM de KH_2PO_4, 20 % PEG 8000, 10 mM de acetato de sódio pH 5,5), acrescida de agente crioprotetor e 10 mM dos inibidores da tabela 6, foi empregada para os experimentos de *soaking*. Os cristais formados foram transferidos para a solução de

soaking e incubados nesta condição por até 10 min. Finalmente, os cristais foram coletados e submetidos aos experimentos de difração de raios X.

No total, obtivemos seis conjuntos de dados completos, posteriormente processados e analisados. Todos os conjuntos de dados apresentaram estatística satisfatória e resoluções em torno de 2Å. A análise da densidade eletrônica revelou em todos os conjuntos de dados a presença de íons fosfato no sítio ativo da PtpB. A presença do íon, proveniente da solução de cristalização, provavelmente impediu a orientação e interação dos ligantes com a proteína. Diante disso, realizamos a substituição do agente tamponante baseado em sal de fosfato para agente tamponante orgânico MES, buscando a obtenção de cristais em condições similares. Contudo, não obtivemos sucesso na cristalização da proteína em nenhuma das condições alternativas investigadas. Para aumentarmos a chance de sucesso na obtenção de cristais empregamos também a técnica de "macroseeding", contudo, não obtivemos sucesso na obtenção de cocristais apropriados para os experimentos de difração de raios X.

Diante dos resultados obtidos foram planejadas triagem de novas condições de cristalização utilizando o método de matriz esparsa com diversos *kits* comerciais, por exemplo, Qiagen EasyXtal (PEG, PEGII, Classics, Classics II, Cryo, MPD) e Hampton Research (SaltRX). Nesta abordagem serão avaliadas ~700 novas condições na presença dos diferentes inibidores.

4.2 Estudos computacionais

4.2.1. Construção do modelo farmacofórico

O programa de docagem molecular Surflex-Dock[60] utiliza em sua estratégia de modelagem um arquivo denominado "protomol". A informação contida nesse arquivo descreve as posições espaciais mais favoráveis para a interação entre os átomos da proteína e as sondas moleculares. As sondas moleculares disponíveis são grupo doador (N–H) e aceptor (C=O) de ligação de hidrogênio e grupo hidrofóbico (CH_4). As sondas são posicionadas no sítio de ligação da proteína em diversas posições e, em seguida, a interação entre elas e os resíduos da cavidade de ligação é otimizada. As sondas moleculares não redundantes e com alta pontuação de interação são reunidas em um arquivo *.mol*. O conjunto dessas informações

consiste em um sítio de interação idealizado da proteína em estudo. Nesta dissertação, utilizamos esse conjunto de informação molecular para construir modelos farmacofóricos 3D para as enzimas PtpA e PtpB. As figuras 16 e 17 apresentam os resultados obtidos com o protocolo "protomol" aplicado nos sítios de ligação das enzimas PtpA e PtpB, respectivamente.

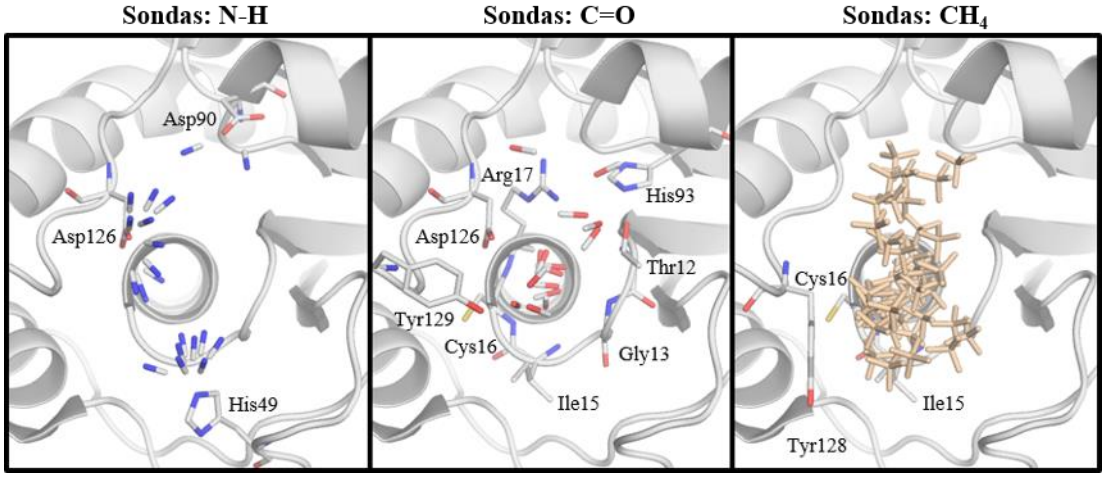


Figura 16 - Sondas utilizadas para o mapeamento do sítio catalítico da PtpA, com o auxílio do programa Surflex.

Fonte: Elaborada pela autora

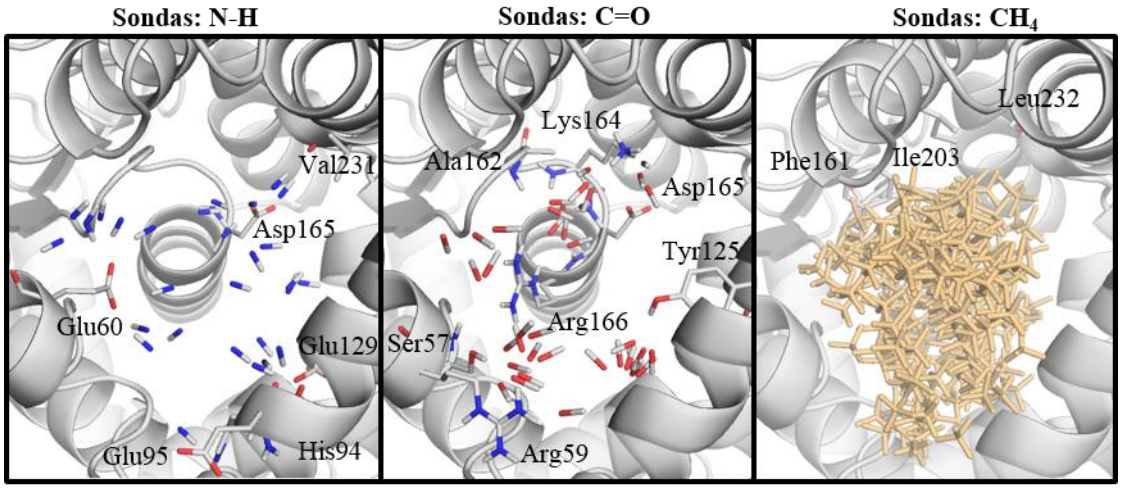


Figura 17 - Sondas utilizadas para o mapeamento do sítio catalítico da PtpB, com o auxílio do programa Surflex.

Fonte: Elaborada pela autora

A avaliação do posicionamento das sondas moleculares nos respectivos sítios de ligação levou em consideração a distância e ângulo de interação, bem como a quantidade de sondas posicionadas em relação a um determinado resíduo do sítio de ligação. De acordo com

esses critérios foi possível identificar os pontos de interação mais favoráveis, os quais foram reunidos em um modelo farmacofórico 3D específico para cada proteína alvo.

O modelo farmacofórico 3D para a PtpA incluiu i. três regiões favoráveis para interação com grupos doadores de ligação de hidrogênio (cadeia lateral dos resíduos His 49, Asp90 e Asp126); ii. três regiões favoráveis para interação com grupos aceptores de ligação de hidrogênio (cadeia principal dos resíduos Gly13, Ile15, Cys16 e Asp126 e cadeia lateral dos resíduos Thr12, Arg17, His93 e Tyr129); e iii. uma região favorável para interação com grupos hidrofóbicos (cadeia lateral dos resíduos Ile15, Cys16 e Tyr128) (figura 18). Enquanto o modelo farmacofórico 3D para a PtpB incluiu i. oito regiões favoráveis para interação com grupos doadores de ligação de hidrogênio (cadeia principal dos resíduos Glu60, His94, Glu95 e Val231 e cadeia lateral dos resíduos Glu60, Glu129 e Asp165); ii. sete regiões favoráveis para interação com grupos aceptores de ligação de hidrogênio (cadeia principal dos resíduos Ala162, Lys164, Asp165 e Arg166 e cadeia lateral dos resíduos Ser57, Arg59, Tyr125, Lys164 e Arg166); e iii. duas regiões favoráveis para interação com grupos hidrofóbicos (cadeia lateral dos resíduos Phe98, Phe161, Ile203 e Leu232) (figura 19).

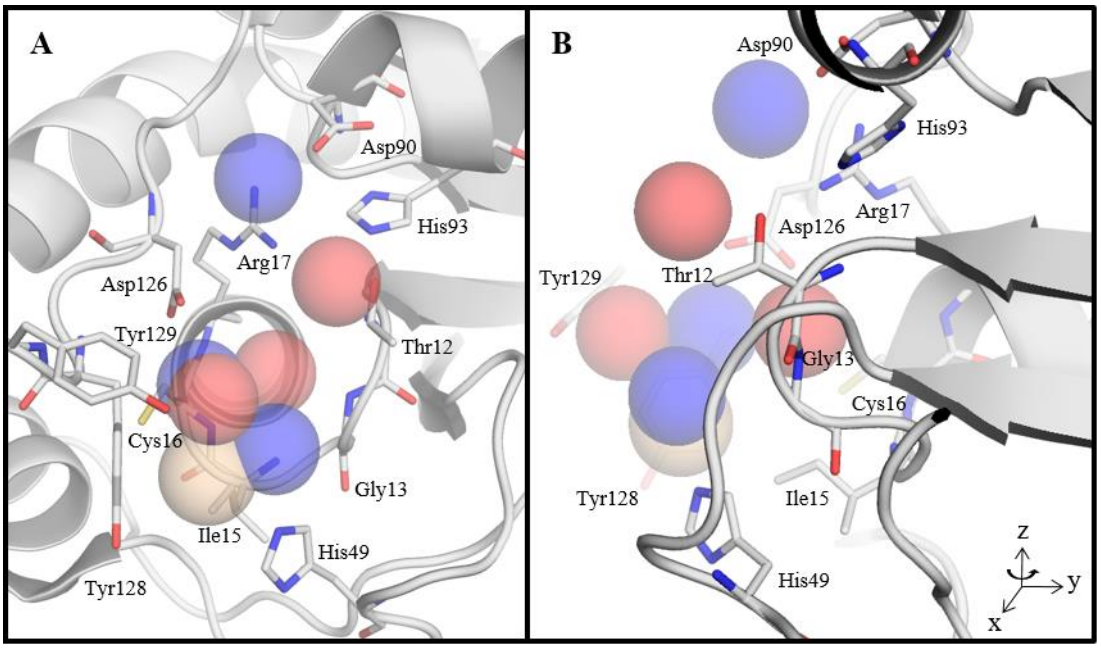


Figura 18 - (A) Modelo farmacofórico 3D para PtpA, obtido através do mapeamento com sondas moleculares (C=O, N-H e CH4). As regiões favoráveis para interação com grupos aceptores de ligação de hidrogênio são representadas por esferas vermelhas, as favoráveis para interação com grupos doadores representadas por esferas azuis e a favorável para interação com grupos hidrofóbicos em amarelo. (B) Figura 18 (A) rotacionada 90° em torno do eixo x.

Fonte: Elaborada pela autora.

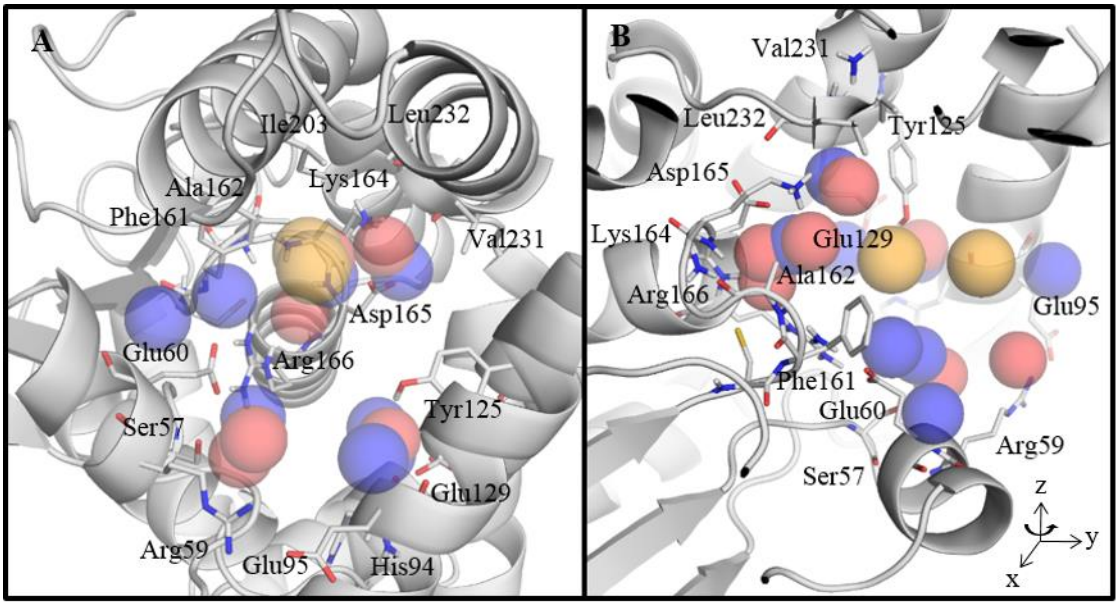


Figura 19 - (A) Modelo farmacofórico 3D para PtpB, obtido através do mapeamento com sondas moleculares (C=O, N-H e CH4). As regiões favoráveis para interação com grupos aceptores de ligação de hidrogênio são representadas por esferas vermelhas, as favoráveis para interação com grupos doadores representadas por esferas azuis e a favorável para interação com grupos hidrofóbicos em amarelo. (B) Figura 19 (A) rotacionada 90° em torno do eixo y.

Fonte: Elaborada pela autora.

ZINC é uma base de dados de compostos que reúne milhões de compostos disponíveis para aquisição. Um dos objetivos principais da ZINC é fornecer compostos virtuais para estudos de modelagem molecular, especialmente, triagem virtual. O subconjunto "*Leads-Now*" da ZINC contém 3.687.621 de moléculas disponíveis.[76] Por se tratar de um número bastante elevado aplicamos um filtro molecular que incluiu a similaridade química entre os compostos da base de dados. O objetivo dessa etapa foi identificar moléculas estruturalmente diversas, para tanto, foram selecionadas moléculas que apresentavam índice de similaridade < 60 %. Ao final deste processo a base de dados personalizada apresentou 43.910 compostos com características físico-químicas e estruturais atrativas para a descoberta de candidatos a novos compostos líderes.

A etapa seguinte da personalização da base de compostos inclui a aplicação dos modelos farmacofóricos. Nesta etapa, as moléculas presentes na base de dados deveriam satisfazer as restrições impostas pelos modelos. Essa estratégia é baseada no princípio que o microambiente da cavidade de interação determina as características estereoquímicas e eletrostáticas que os ligantes devem apresentar para serem reconhecidos pelos respectivos alvos moleculares.[80] Os modelos farmacofóricos foram então incorporados no programa UNITY[81] para a seleção de moléculas que fossem capazes de satisfazer pelo menos 3 e 7 das

restrições farmacofóricas específicas para a PtpA e PtpB, respectivamente. Ao final da aplicação do modelo farmacofórico 3D a base de dados inicialmente com 43.910 moléculas foi reduzida para 3.347 compostos para PtpA e 288 compostos para PtpB.

Uma vez selecionada a base de dados que incluíam compostos com caraterísticas moleculares que satisfaziam as restrições farmacofóricas para o reconhecimento das enzimas PtpA e PtpB, deu-se início a etapa de predição do modo de ligação dos candidatos a inibidores. Para tanto, empregou-se a metodologia de docagem molecular com a utilização do programa Glide (Grid-based LIgand Docking with Energetics).[57; 58] Glide é uma ferramenta de docagem molecular implementada na plataforma de modelagem Maestro (Schröndinger). O algoritmo de amostragem conformacional identifica interações favoráveis entre a molécula do ligante e os resíduos da proteína de maneira rápida através da utilização de filtros hierárquicos que identificam e classificam as interações polares e hidrofóbicas. As conformações geradas dos ligantes no sítio de ligação do alvo molecular são então submetidas a um processo de minimização de energia pelo método Potencial Otimizado de Simulação de Líquidos (OPLS, do inglês, *Optimized Potentials for Liquid Simulations*).[82] Finalmente, a conformação bioativa predita é avaliada pela função de pontuação empírica GlideScore.

A seleção de moléculas candidatas a inibidores da PtpA e PtpB foi baseada na análise dos 100 melhores compostos pontuados (Top100) para cada alvo. Nesse momento, foi realizada a inspeção visual dos modos de ligação dos *hits* virtuais com o objetivo de identificar os compostos que apresentaram melhor correspondência com as restrições farmacofóricas específicas para cada alvo. A análise do modo de ligação do Top100 ligantes para PtpA identificou 43 moléculas que orientavam seus substituintes para pelo menos 3 pontos farmacofóricos (tabela 7). Para PtpB, foram selecionados 8 ligantes que satisfaziam pelo menos 3 das restrições farmacofóricas (tabela 8).

Tabela 7 - Ligantes com melhor Glide Score selecionados para PtpA e número de correspondências dos mesmos com o modelo farmacofórico determinado anteriormente.

Código	Glide Score	Correspondência com pontos farmacofóricos	Código	Glide Score	Correspondência com pontos farmacofóricos
ZINC06537449-10	-3.689	6	**ZINC04099038-18**	-6.825	3
ZINC21964365_2	-7.028	5	**ZINC20052353_10**	-6.920	3
ZINC28536442_2	-5.720	5	**ZINC71624284_11**	-5.404	3
ZINC01584088-2	-5.674	5	**ZINC86862222_6**	-5.378	3
ZINC34031362_522	-3.580	5	**ZINC71766166_1**	-5.351	3
ZINC28536372_1	-6.882	5	**ZINC38339101_2**	-4.767	3
ZINC78682334_1	-6.778	4	**ZINC02296062**	-5.972	3
ZINC19910531_1	-6.819	4	**ZINC68591285_21**	-4.224	3
ZINC02047684	-8.028	4	**ZINC72321643_87**	-4.187	3
ZINC20761178_1	-5.942	4	**ZINC38529147_8**	-4.008	3
ZINC11765017	-5.717	4	**ZINC50222710_1**	-3.952	3
ZINC00478435	-5.640	4	**ZINC57331782_2**	-3.832	3
ZINC16955539_12	-6.803	4	**ZINC12506572**	-5.237	3
ZINC72196655_1	-4.707	4	**ZINC34522850_16**	-3.722	3
ZINC31156942_6	-4.909	4	**ZINC30730321_13**	-5.377	3
ZINC09419146-82	-3.439	4	**ZINC65431025_4**	-3.618	3

(continua)

(Conclusão)

ZINC09419146-82	-3.439	4	**ZINC71589486_1**	-3.499	3
ZINC64459863_7	-2.526	4	**ZINC08652691-21**	-3.536	3
ZINC01586092-76	-2.465	4	**ZINC28294650_3**	-3.424	3
ZINC02604061-6	-2.330	4	**ZINC32523710_2**	-3.250	3
ZINC03075226-36	-5.165	4	**ZINC04075025**	-8.457	3
ZINC02641623-4	-5.701	3			

Fonte: Elaborada pela autora

Tabela 8 - Ligantes com melhor Glide Score selecionados para PtpB e número de correspondências dos mesmos com o modelo farmacofórico determinado anteriormente.

Código	Glide Score	Correspondência com pontos farmacofóricos
ZINC16955539	**-8.152**	**6**
ZINC95478179	**-9.100**	**5**
ZINC09467542-1	**-5.047**	**5**
ZINC06855300	**-5.191**	**5**
ZINC36709982	**-4.021**	**3**
ZINC05774046	**-4.409**	**3**
ZINC28536442	**-8.944**	**3**
ZINC71186594-4	**-5.819**	**3**

Fonte: Elaborada pela autora.

A seleção final dos compostos para aquisição foi baseada na análise de grupos que identificou ligantes similares. O composto de menor energia de interação predita pela função de pontuação GlideScore de cada grupo foi selecionado para aquisição como candidato a inibidor da PtpA (8 compostos) e PtpB (5 compostos) (figura 20). A estrutura química e o modo de ligação predito para os candidatos a inibidores da PtpA e PtpB selecionados nesta dissertação estão indicados na figura 21 (A-H) e figura 22 (A-E).

O conjunto de moléculas selecionadas é bastante diverso e inclui para a PtpA derivados fosfanatofenila (figura 21A), diazobiciclodecanodiona (figura 21B), metilpiridina

(figura 21C), aminofenila (figura 21D), isoxazolina (figura 21E), piridinilsulfonila (figura 21F), azoimidazola (figura 21G), oxolanilformamido (figura 21 H) e para a PtpB derivados fenetilimidazola (figura 22A), pirazolacarboxiamida (figura 22B), azoimidazola (figura 22C), aminopirrolidina (figura 22D) e ciclopentaoxipiranila (figura 22E). As moléculas selecionadas encontram-se disponíveis nos catálogos das empresas SPECS[83] e eMolecules[84] e apresentam as seguintes características: as massas moleculares variam entre 250 e 330, o cLog P varia entre -2,79 e 2,40, o número de átomos doadores e aceptores de ligação de hidrogênio varia entre 2 e 6 e 4 e 9, respectivamente. O pedido de compra das moléculas selecionadas foi realizado e no momento estas encontram-se em fase de entrega.

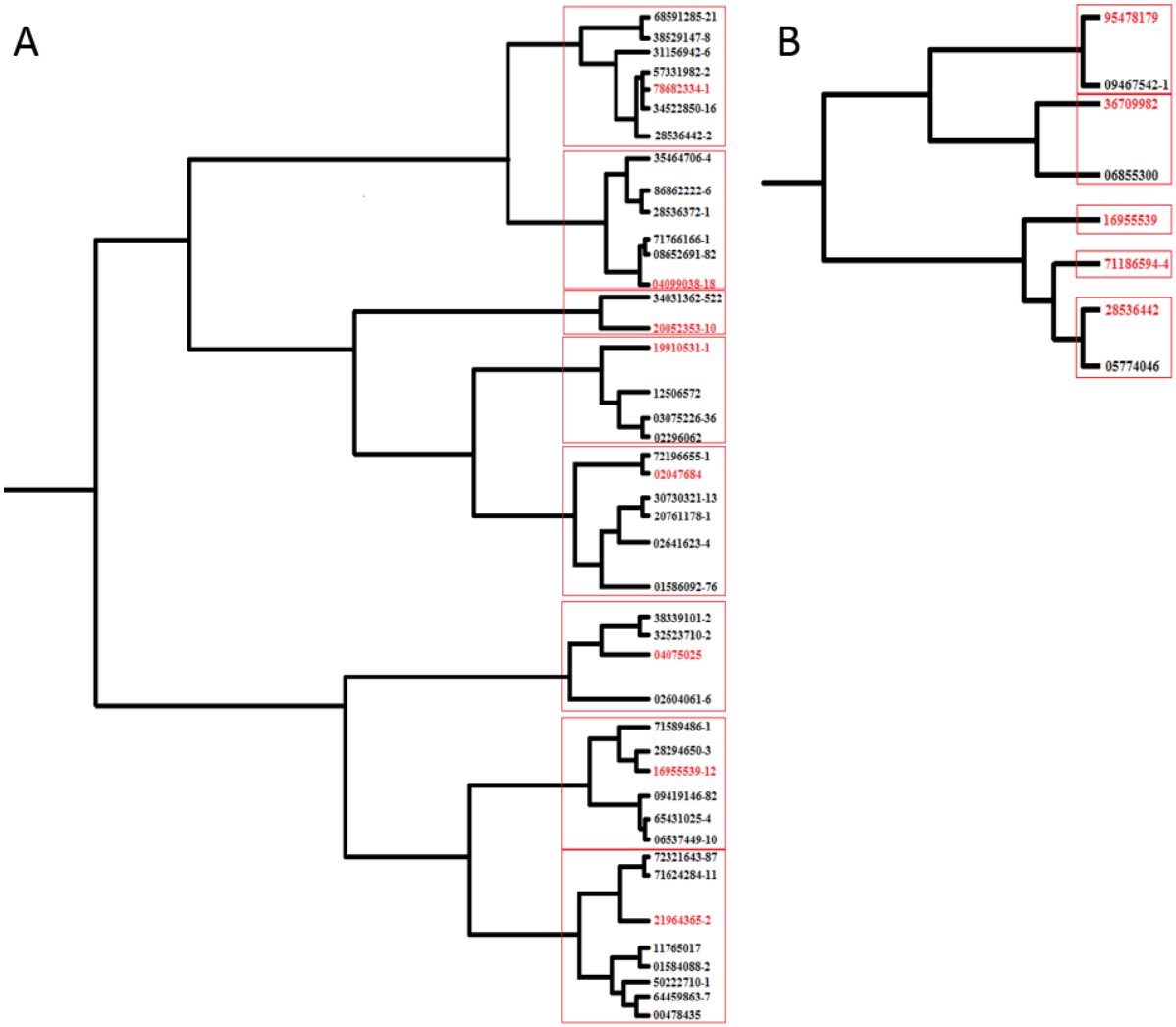


Figura 20 - Dendograma dos 43 ligantes identificados para PtpA (A) e dos 8 ligantes identificados para PtpB, elaborado com o auxílio do programa Sybyl-X 1.1.

Fonte: Elaborada pela autora.

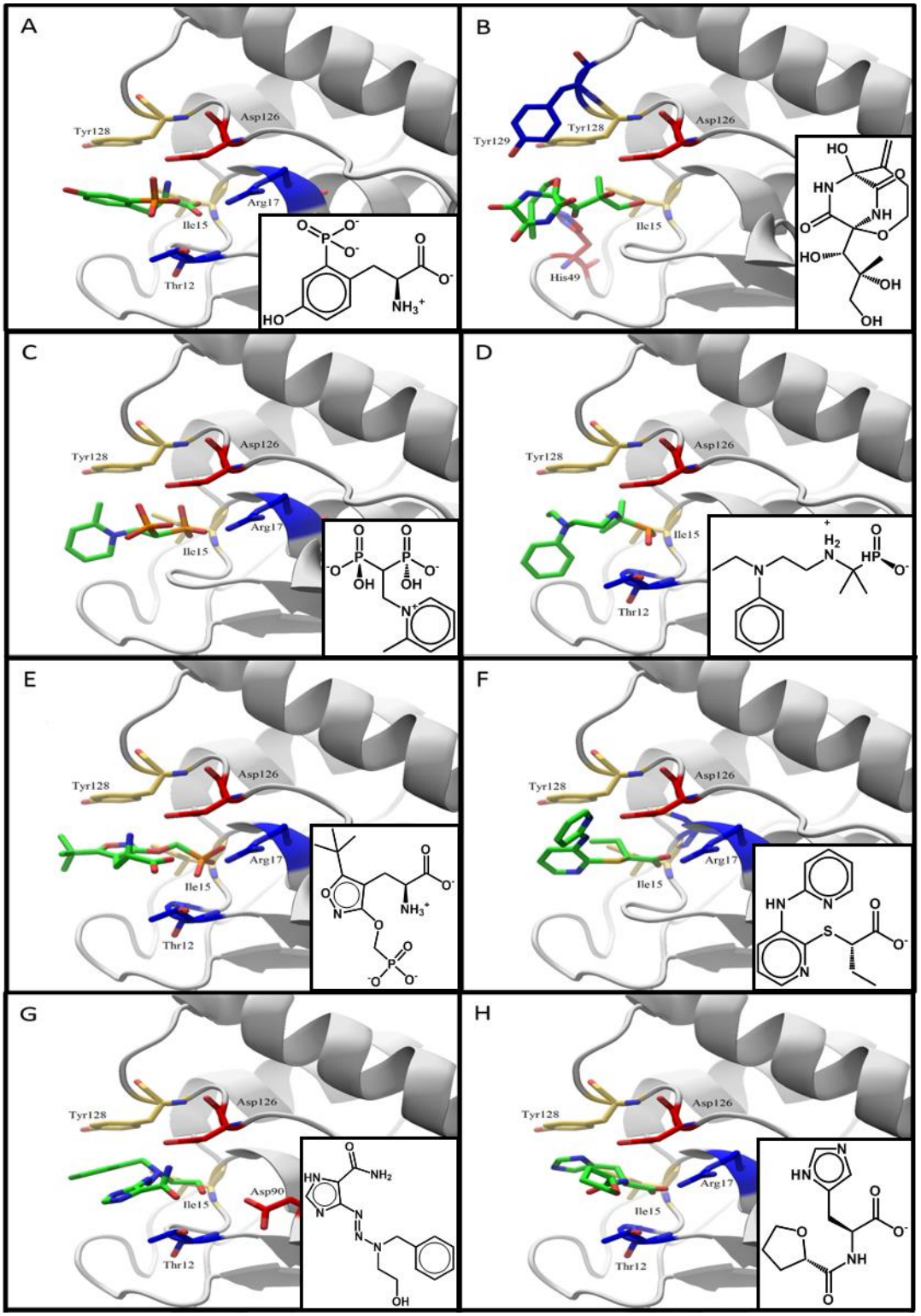


Figura 21 - Modo de ligação predito pelo programa Glide dos candidatos a inibidores da PtpA. Os resíduos envolvidos no modo de ligação de cada ligante são representados em modelo bastão e coloridos de acordo com a característica do respectivo ponto farmacofórico (aceptor de ligação de hidrogênio = vermelho; doador de ligação de hidrogênio = azul e grupos hidrofóbicos = amarelo. (A) ZINC78682334-1. (B) ZINC04099038-18. (C) ZINC20502353-10. (D) ZINC19910531-1. (E) ZINC02047684. (F) ZINC04075025. (G) ZINC16955539-12. (H) ZINC21964365-2.

Fonte: Elaborada pela autora.

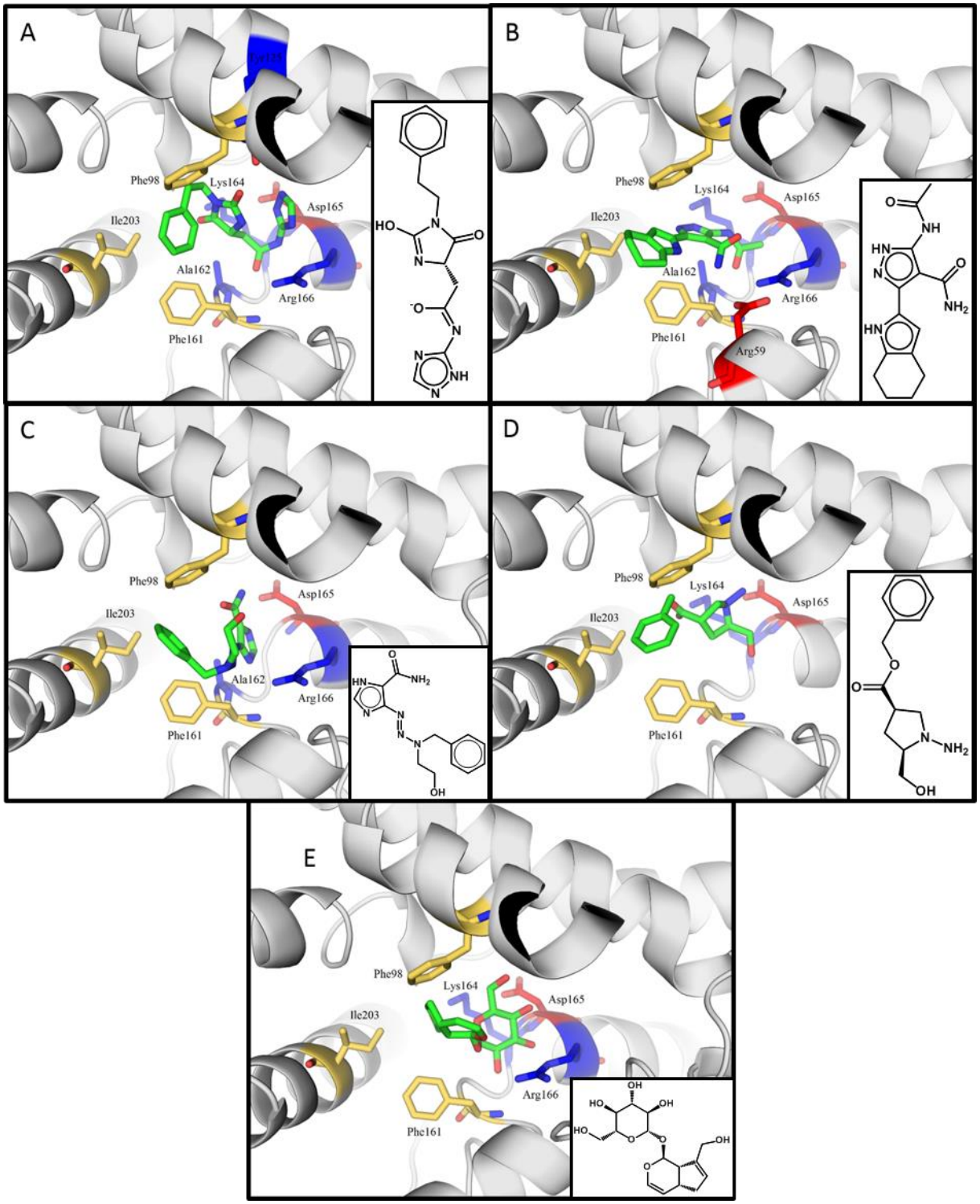


Figura 22 - Modo de ligação predito pelo programa Glide dos candidatos a inibidores da PtpB. Os resíduos envolvidos no modo de ligação de cada ligante são representados em modelo bastão e coloridos de acordo com a característica do respectivo ponto farmacofórico (aceptor de ligação de hidrogênio = vermelho; doador de ligação de hidrogênio = azul e grupos hidrofóbicos = amarelo. (A) ZINC95478179. (B) ZINC06855300. (C) ZINC16955539. (D) ZINC71186594-4 (E) ZINC28536442.

Fonte: Elaborada pela autora.

Conclusões

5 CONCLUSÕES

Essa dissertação de mestrado empregou diversos métodos experimentais (clonagem, expressão, purificação, coleta de dados cristalográficos e determinação de estrutura 3D) para o estabelecimento de uma plataforma produtiva para obtenção na forma pura das enzimas PtpA e PtpB de *M. tuberculosis*. Resultados significativos foram alcançados para ambas as enzimas. As sequências gênicas que codificam para as enzimas PtpA e PtpB foram clonadas com sucesso nos vetores de expressão. A expressão solúvel das proteínas permitiu o estabelecimento de um protocolo reprodutível de purificação com rendimento satisfatório. Estudos de cristalização foram conduzidos e cristais de proteínas obtidos tiveram os dados cristalográficos coletados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). Para a enzima PtpA os cristais obtidos apresentavam baixo poder de difração de raios X (resolução $\geq$ 5 Å). Novas condições de cristalização foram planejadas para a obtenção de cristais apropriados para os experimentos de difração de raios X. Para a enzima PtpB foi possível determinar a estrutura cristalográfica a alta resolução (1,95 Å) em complexo com um grupo fosfato no sítio catalítico. Essa estrutura foi, então, utilizada na etapa posterior de descoberta de novos candidatos a inibidores.

Os trabalhos computacionais conduzidos incluíram: i. mapeamento dos sítios de ligação das enzimas PtpA e PtpB de *M. tuberculosis* com sondas moleculares; ii. identificação de pontos de interação relevantes para o processo de reconhecimento molecular; iii. construção de modelos farmacofóricos 3D específicos para ambas as enzimas; iv. aplicação de restrições farmacofóricas para seleção de ligantes para as enzimas alvo; v. docagem molecular dos compostos que satisfizeram as restrições farmacofóricas; e vi. seleção de um conjunto de 8 candidatos a inibidores da PtpA e 5 candidatos a inibidores da PtpB.

Portanto, estudos de biologia molecular estrutural e química medicinal foram empregados com sucesso para o estabelecimento de uma plataforma produtiva dos alvos selecionados bem como para a seleção de novos candidatos a inibidores.

REFERÊNCIAS

1 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis report 2015**. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf>. Acesso em 23 jan. 2016.

2 RISTIĆ, L.; RANCIĆ, M.; RADOVIĆ, M. Tuberculosis in the 21st century--challenges, endeavours and recommendations to doctors. **Medicinski Pregled,** v. 63, n. 11-12, p. 811-815, Nov-Dec. 2010.

3 BUENO, R. V. **Planejamento de novos candidatos a fármacos tuberculostáticos:** modelagem molecular e QSAR. 2013. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Enfermagem, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

4 PANICKER, R. O. et al. A review of automatic methods based on image processing techniques for tuberculosis detection from microscopic sputum smear images. **Journal of Medical Systems,** v. 40, n. 1, p. 17, Jan. 2016.

5 BASSO, L. A. et al. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases--a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** v. 100, n. 6, p. 475-506, Oct. 2005.

6 PARK, S. H.; BENDELAC, A. CD1-restricted T-cell responses and microbial infection. **Nature,** v. 406, n. 6797, p. 788-792, Aug. 2000.

7 DISEASES of the respiratory system. **Bacterial diseases of the lower respiratory system.** Disponível em: <http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio225/chap24/lecture4.htm>. Acesso em: 23 jan. 2016.

8 RUSSELL, D. G. et al. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. **Nature Immunology,** v. 10, n. 9, p. 943-948, Sept. 2009.

9 CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Tuberculosis** (TB). 2016. Disponível em: <http://www.cdc.gov/tb/topic/basics/signsandsymptoms.htm >. Acesso em 23 mar. 2016.

10 SOARES, V. M.; CARVALHO, W. S.; MIRANDA, S. S. Utilization of bacteriological culture for increased diagnostic performance at a tuberculosis reference center hospital. **Revista Argentina de Microbiologí,** v. 44, n. 3, p. 173-176, Jul-Sept. 2012.

11 PÉREZ-BARBOSA, L. et al. Increased detection of latent tuberculosis by tuberculin skin test and booster phenomenon in early rheumatoid arthritis patients. **Rheumatology International,** v. 35, n. 9, p. 1555-1559, 2015. doi: 10.1007/s00296-015-3246-9.

12 BALGANESH, T. S.; ALZARI, P. M.; COLE, S. T. Rising standards for tuberculosis drug development. **Trends in Pharmacological Sciences,** v. 29, n. 11, p. 576-581, Nov. 2008.

13 NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES. Mechanism of Action of Tuberculosis Drugs. 2016. Disponível em: < https://www.niaid.nih.gov >. Acesso em: 25 abr. 2016.

14 PIRAZINAMIDA (PZA). Disponível em: < http://www.far.fiocruz.br/farmanguinhos/images/stories/phocadownload/pirazinamida.pdf >. Acesso em: 2 set. 2016.

15 CAMPOS, H. S. Mycobacterium tuberculosis resistente: de onde vem a resistência? **Boletim de Pneumologia Sanitária,** v. 7, p. 51-64, 1999. Disponível em: < http://scielo.iec.pa.gov.br/pdf/bps/v7n1/v7n1a06.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2015.

16 KOCH, A.; MIZRAHI, V.; WARNER, D. F. The impact of drug resistance on Mycobacterium tuberculosis physiology: what can we learn from rifampicin? **Emerging Microbes & Infections,** v. 3, n. 3, p. e17, Mar. 2014.

17 CAMINERO, J. A. et al. Best drug treatment for multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. **Lancet Infectious Diseases,** v. 10, n. 9, p. 621-629, Sept. 2010.

18 FALZON, D. et al. WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis: 2011 update. **European Respiratory Journal,** v. 38, n. 3, p. 516-528, Sept. 2011.

19 ARBEX, M. A. et al. Drogas antituberculose: interações medicamentosas, efeitos adversos e utilização em situações especiais. parte 2: fármacos de segunda linha. **Jornal Brasileiro de Pneumologia,** v. 36, n. 5, p. 641-656, Sept./Oct. 2010.

20 PAWLOWSKI, A. et al. Tuberculosis and HIV co-infection. **PLOS Pathogens,** v. 8, n. 2, p. e1002464, Feb. 2012.

21 KWAN, C. K.; ERNST, J. D. HIV and tuberculosis: a deadly human syndemic. **Clinical Microbiology Reviews,** v. 24, n. 2, p. 351-376, Apr. 2011.

22 GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados,** v. 24, n. 70, p. 81-98, 2010. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010340142010000300006&nrm=iso >. Acesso em 15 set. 2016.

23 TONKS, N. K. Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology,** v. 7, n. 11, p. 833-46, Nov. 2006.

24 ZHANG, Z. Y. Functional studies of protein tyrosine phosphatases with chemical approaches. **Biochimica et Biophysica Acta,** v. 1754, n. 1-2, p. 100-107, Dec. 2005.

25 _____. Protein tyrosine phosphatases: structure and function, substrate specificity, and inhibitor development. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology,** v. 42, p. 209-234, Apr. 2002. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.42.083001.144616.

26 WANG, W. Q.; SUN, J. P.; ZHANG, Z. Y. An overview of the protein tyrosine phosphatase superfamily. **Current Topics in Medicinal Chemistry,** v. 3, n. 7, p. 739-748, 2003

27 PURIFICAÇÃO, M. Identificação de potenciais substratos de PTPA, tirosina-fosfatase de Mycobacterium tuberculosis. 2008. 81 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

28 BALARAMNAVAR, V. M. et al. Identification of novel PTP1B inhibitors by pharmacophore based virtual screening, scaffold hopping and docking. **European Journal of Medicinal Chemistry,** v. 87, p. 578-594, Nov. 2014. doi: 10.1016/j.ejmech.2014.09.097.

29 HENDRIKS, W. J.; PULIDO, R. Protein tyrosine phosphatase variants in human hereditary disorders and disease susceptibilities. **Biochimica et Biophysica Acta,** v. 1832, n. 10, p. 1673-1696, Oct. 2013.

30 MASCARELLO, A. et al. Inhibition of Mycobacterium tuberculosis tyrosine phosphatase PtpA by synthetic chalcones: kinetics, molecular modeling, toxicity and effect on growth. **Bioorganic & Medicinal Chemistry,** v. 18, n. 11, p. 3783-9, June 2010.

31 GRUNDNER, C.; NG, H. L.; ALBER, T. Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase PtpB structure reveals a diverged fold and a buried active site. **Structure,** v. 13, n. 11, p. 1625-1634, Nov. 2005.

32 GRUNDNER, C. et al. Structural basis for selective inhibition of Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase PtpB. **Structure,** v. 15, n. 4, p. 499-509, Apr. 2007.

33 MADHURANTAKAM, C. et al. Crystal structure of low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase from Mycobacterium tuberculosis at 1.9-A resolution. **Journal of Bacteriology,** v. 187, n. 6, p. 2175-2181, Mar. 2005.

34 MACCARI, R.; OTTANÀ, R. Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatases as emerging targets for the design of novel therapeutic agents. **Journal of Medicinal Chemistry,** v. 55, n. 1, p. 2-22, Jan. 2012.

35 MANGER, M. et al. Discovery of Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase A (MptpA) inhibitors based on natural products and a fragment-based approach. **Chembiochem,** v. 6, n. 10, p. 1749-1753, Oct. 2005.

36 MADHURANTAKAM, C.; CHAVALI, V. R.; DAS, A. K. Analyzing the catalytic mechanism of MPtpA: a low molecular weight protein tyrosine phosphatase from Mycobacterium tuberculosis through site-directed mutagenesis. **Proteins,** v. 71, n. 2, p. 706-714, May 2008.

37 RAWLS, K. A. et al. Fragment-based discovery of selective inhibitors of the Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase PtpA. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters,** v. 19, n. 24, p. 6851-4, Dec. 2009.

38 MASCARELLO, A. et al. Discovery of Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase B (PtpB) inhibitors from natural products. **PLoS One,** v. 8, n. 10, p. e77081, Oct. 2013.

39 CHIARADIA, L. D. et al. Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of chalcone derivatives as potent inhibitors of Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatases (PtpA and PtpB). **Journal of Medicinal Chemistry,** v. 55, n. 1, p. 390-402, Jan. 2012.

40 RAWLS, K. A.; GRUNDNER, C.; ELLMAN, J. A. Design and synthesis of nonpeptidic, small molecule inhibitors for the Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase PtpB. **Organic & Biomolecular Chemistry,** v. 8, n. 18, p. 4066-4070, Sept. 2010.

41 OLIVEIRA, K. N. et al. Sulfonyl-hydrazones of cyclic imides derivatives as potent inhibitors of the Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase B (PtpB). **MedChemComm,** v. 2, n. 6, p. 500-504, Mar. 2011.

42 NÖREN-MÜLLER, A. et al. Discovery of protein phosphatase inhibitor classes by biology-oriented synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 103, n. 28, p. 10606-10611, July 2006.

43 MÜLLER, D. et al. Brunsvicamides A-C: sponge-related cyanobacterial peptides with Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase inhibitory activity. **Journal of Medicinal Chemistry,** v. 49, n. 16, p. 4871-4878, Aug. 2006.

44 VINTONYAK, V. V. et al. Identification and further development of thiazolidinones spiro-fused to indolin-2-ones as potent and selective inhibitors of Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase B. **Tetrahedron,** v. 67, n. 35, p. 6713-6729, Sept. 2011.

45 HE, Y. et al. Discovery and evaluation of novel inhibitors of mycobacterium protein tyrosine phosphatase B from the 6-Hydroxy-benzofuran-5-carboxylic acid scaffold. **Journal of Medicinal Chemistry,** v. 56, n. 3, p. 832-842, Feb. 2013.

46 GUEDES, I. A.; MAGALHÃES, C. S.; DARDENNE, L. E. Atracamento. In: VERLI, H. (Org.). **Bioinformática:** da biologia à flexibilidade molecular. São Paulo: SBBq, 2014. cap. 9. p.188-208.

47 ANDRICOPULO, A. D.; SALUM, L. B.; ABRAHAM, D. J. Structure-based drug design strategies in medicinal chemistry. **Current Topics in Medicinal Chemistry,** v. 9, n. 9, p. 771-790, 2009.

48 RONDEAU, J.-M.; SCHREUDER, H. Protein crystallography and drug discovery. In: WERMUTH, C. G. (Ed.). **The practice of medicinal chemistry**. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, 2008. p. 605-634.

49 MALUF, F. V. et al. Cristalografia de proteínas. In: VERLI, H.(Org.). **Bioinformática:** da biologia à flexibilidade molecular. São Paulo: SBBq, 2014. cap. 13. p.252-282.

50 SHARFF, A.; JHOTI, H. High-throughput crystallography to enhance drug discovery. **Current Opinion in Chemical Biology,** v. 7, n. 3, p. 340-345, June 2003.

51 PROTEIN DATA BANK. Disponível em: < http://www.rcsb.org/pdb/statistics >. Acesso em: 30 ago. 2016.

52 DRENTH, J. **Principles of protein x-ray crystallography.** 3rd ed. New York: Springer, 2007. 344p.

53 ALONSO, H.; BLIZNYUK, A. A.; GREADY, J. E. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. **Medicinal Research Reviews,** v. 26, n. 5, p. 531-568, Sept. 2006.

54 RODRIGUES, R. P. et al. Estratégias de triagem virtual no planejamento de fármacos. **Revista Virtual de Química,** v. 4, n. 6, p. 739-776, 2012.

55 FERREIRA, R. S.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Integração das técnicas de triagem virtual e triagem biológica automatizada em alta escala: oportunidades e desafios em P&D de fármacos. **Química Nova,** v. 34, n. 10, p. 1770-1778, 2011.

56 VERDONK, M. L. et al. Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins,** v. 52, n. 4, p. 609-23, Sep 2003.

57 HALGREN, T. A. et al. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening. **Journal of Medicinal Chemistry,** v. 47, n. 7, p. 1750-9, Mar. 2004.

58 FRIESNER, R. A. et al. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. **Journal of Medicinal Chemistry,** v. 47, n. 7, p. 1739-49, Mar. 2004.

59 RAREY, M. et al. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. **Journal of Molecular Biology,** v. 261, n. 3, p. 470-89, Aug. 1996.

60 JAIN, A. N. Surflex: fully automatic flexible molecular docking using a molecular similarity-based search engine. **Journal of Medicinal Chemistry,** v. 46, n. 4, p. 499-511, Feb. 2003.

61 MORRIS, G. M.; HUEY, R.; OLSON, A. J. Using AutoDock for ligand-receptor docking. **Curr Protoc Bioinformatics,** v. Chapter 8, p. Unit 8.14, Dec. 2008.

62 SHOICHET, B. K.; KUNTZ, I. D. Protein docking and complementarity. **Journal of Molecular Biology,** v. 221, n. 1, p. 327-46, Sept. 1991.

63 GUIDO, R.; ANDRICOPULO, A. Modelagem molecular de fármacos. **Revista Processos Químicos,** v. 2, p. 24-26, 2008.

64 MCINNES, C. Virtual screening strategies in drug discovery. **Current Opinion in Chemical Biology,** v. 11, n. 5, p. 494-502, 2007.

65 LAVECCHIA, A.; DI GIOVANNI, C. Virtual screening strategies in drug discovery: a critical review. **Current Medicinal Chemistry,** v. 20, n. 23, p. 2839-2860, 2013. doi: 10.2174/09298673113209990001.

66 WERMUTH, C. et al. Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations 1998). **Pure and Applied Chemistry,** v. 70, n. 5, p. 1129-1143, Jan. 1998.

67 YANG, S. Y. Pharmacophore modeling and applications in drug discovery: challenges and recent advances. **Drug Discovery Today,** v. 15, n. 11-12, p. 444-50, June 2010.

68 ASLANIDIS, C.; DE JONG, P. J. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). **Nucleic Acids Research,** v. 18, n. 20, p. 6069-74, Oct. 1990.

69 STUDIER, F. W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. **Protein Expression and Purification,** v. 41, n. 1, p. 207-34, May 2005.

70 BATTYE, T. G. et al. iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. **Acta Crystallographica D,** v. 67, n. Pt 4, p. 271-81, Apr. 2011.

71 EVANS, P. R. An introduction to data reduction: space-group determination, scaling and intensity statistics. **Acta Crystallographica D,** v. 67, n. Pt 4, p. 282-92, Apr. 2011.

72 MCCOY, A. J. et al. Phaser crystallographic software. **Journal of Applied Crystallography,** v. 40, n. Pt 4, p. 658-674, Aug 2007.

73 EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallographica D,** v. 60, n. Pt 12 Pt 1, p. 2126-32, Dec 2004.

74 VAGIN, A. A. et al. REFMAC5 dictionary: organization of prior chemical knowledge and guidelines for its use. **Acta Crystallographica D,** v. 60, n. Pt 12 Pt 1, p. 2184-95, Dec 2004.

75 CHEN, V. B. et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica D,** v. 66, n. Pt 1, p. 12-21, Jan 2010.

76 IRWIN, J. J.; SHOICHET, B. K. ZINC--a free database of commercially available compounds for virtual screening. **Journal of Chemical Information and Modeling,** v. 45, n. 1, p. 177-82, 2005 Jan-Feb 2005.

77 BARFORD, D.; NEEL, B. G. Revealing mechanisms for SH2 domain mediated regulation of the protein tyrosine phosphatase SHP-2. **Structure,** v. 6, n. 3, p. 249-54, Mar. 1998.

78 GROEN, A. et al. Differential oxidation of protein-tyrosine phosphatases. **Journal of Biological Chemistry,** v. 280, n. 11, p. 10298-304, Mar. 2005.

79 SALMEEN, A. et al. Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate. **Nature,** v. 423, n. 6941, p. 769-73, June 2003.

80 SOTRIFFER, C.; KLEBE, G. Identification and mapping of small-molecule binding sites in proteins: computational tools for structure-based drug design. **Farmaco,** v. 57, n. 3, p. 243-51, Mar. 2002.

81 TRIPOS ASSOCIATES. **UNITY package**. St. Louis, MO 1999. Disponível em: < https://www.certara.com/pressreleases/certara-enhances-sybyl-x-drug-design-and-discovery-software-suite/>. Acesso em: 15 jun. 2013.

82 JORGENSEN, W. L.; TIRADO-RIVES, J. The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. **Journal of the American Chemical Society,** v. 110, n. 6, p. 1657-66, Mar. 1988.

83 SPECS. Disponível em: < http://www.specs.net >. Acesso em: 23 ago. 2013.

84 EMOLECULES. Disponível em: < www.emolecules.com >. Acesso em: 23 ago. 2013.