



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXVI SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2022

UTILIZAÇÃO DE FERRAMENTAS *IN SILICO* PARA A IDENTIFICAÇÃO DE INIBIDORES DA TIROSINA FOSFATASE A DO *Mycobacterium tuberculosis*

Víctor Magno Miranda de Oliveira¹; Manoelito Coelho dos Santos Junior²

1. Bolsista PIBIC/FAPESB, Graduando em Farmácia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail:

victormagno075@gmail.com

2. Orientador, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: mc2500@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: Triagem virtual; tuberculose; tirosina fosfatase A e B

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada pela *Mycobacterium tuberculosis* que afeta principalmente os pulmões, mas, também pode ocorrer em outros órgãos do corpo (tuberculose extrapulmonar). Mesmo sendo uma das doenças infecciosas mais antigas, bem conhecida e há mais de meio século vulnerável ao tratamento medicamentoso, a TB permanece como um dos principais agravos à saúde a ser enfrentado em âmbito global (GENGENBACHER *et al.*, 2008). Em 2020, o Brasil registrou 66.819 casos novos de TB, com um coeficiente de incidência de 31,6 casos por 100 mil habitantes. Em 2019, foram notificados cerca de 4,5 mil óbitos pela doença, com um coeficiente de mortalidade de 2,2 óbitos por 100 mil habitantes (BRASIL, 2021).

Diante disso, a necessidade de desenvolvimento de novos e eficientes fármacos é justificada para aumentar o arsenal terapêutico de combate a TB. Por conseguinte, o desenvolvimento de fármacos por técnicas *in silico* tem ganhado destaque, pois auxilia a identificar e selecionar entre grandes bibliotecas de compostos o agente terapêutico mais adequado antes mesmo de iniciar sua síntese química. (STEFANIU, 2019).

A partir da análise do genoma do *Mycobacterium tuberculosis* foi identificado a isoforma da proteína tirosina fosfatase A (PtpA), que é responsável em garantir a sobrevivência do patógeno nos macrófagos do hospedeiro. Fundamentado nesta especificidade, o desenvolvimento deste trabalho tem como tema a utilização de ferramentas *in silico* para a identificação de inibidores capazes de atuar sobre a tirosina fosfatase A do *Mycobacterium tuberculosis*.

METODOLOGIA

A triagem virtual utilizada baseou-se em características do ligante, por conseguinte, foi utilizado o filtro baseado em modelos farmacofóricos. Inicialmente, um conjunto de inibidores foi obtido no ChemBL (GAULTON *et al.*, 2017), o dado de atividade biológica (Ki) foi selecionado para a organização do banco de inibidores da proteína tirosina fosfatase A do *Mycobacterium tuberculosis*. Desse conjunto, foram selecionadas as moléculas mais potentes (Ki < 5000 nM) para compor o conjunto treino e teste, empregados para a construção e avaliação dos modelos farmacofóricos, respectivamente.

As estruturas químicas 2D dos inibidores foram construídas no programa MarvinSketch 6.0.1 e as coordenadas 2D foram convertidas ao formato 3D com o auxílio

do programa SYBYL-X2.0. As cargas parciais foram calculadas pelo método Gasteiger-Huckel, conforme disponível no SYBYL-X 2.0 (SYBYL-X 2.0, 2012).

Os modelos farmacofóricos foram construídos na plataforma de programas SYBYL-X, empregando o módulo GALAHAD™. Os confôrmeros foram obtidos através do algoritmo Genético, sendo o tamanho da população e o número máximo de gerações ajustados conforme valores padrão (50 e 70 respectivamente), o cruzamento e taxa de mutação serão mantidos em 1,0.

Os modelos foram analisados quanto à pontuação de Pareto, energia e especificidade, em seguida, foram avaliados quanto à capacidade de diferenciar inibidores verdadeiros positivos (VP) de *Mycobacterium tuberculosis* ($K_i > 1$ nM) de falsos positivos (FP). As moléculas FP foram obtidas no servidor DUD-E (MYSINGER *et al.*, 2012). Em sequência, foi feita a análise ROC após o alinhamento flexível do banco de inibidores VP e FP aos modelos farmacofóricos com o auxílio de um servidor online *ROC Analysis* (ENG, 2014), para construir a curva ROC. A seleção foi realizada com base no maior valor da Área Sob a Curva (AUC). Após a etapa de seleção, o melhor modelo farmacofórico foi utilizado para filtrar o banco *Biogenic* do ZINC15 (IRWIN *et al.*, 2015), que é um acervo de metabólitos e produtos naturais, empregando-se o alinhamento flexível do módulo UNITY. Os compostos foram organizados por número baseando-se no valor de QFIT.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A busca por inibidores no servidor online ChemBL, indicou 46 moléculas com atividade biológica frente à proteína tirosina fosfatase A do *Mycobacterium tuberculosis*. Como parâmetros de seleção, foram eleitas as moléculas com ($K_i < 5000$ nM). Dessa forma, obtiveram-se 10 moléculas com atividade que obedeceram a esse quesito, as quais foram utilizadas para compor o conjunto treino (70%) e teste (30%) empregado para a construção e avaliação dos modelos farmacofóricos no programa GALAHAD™.

A avaliação da qualidade de um modelo farmacofórico pode ser realizada através da análise de parâmetros internos do GALAHAD (Pareto, *Energy*, *Sterics*, *HBond* e *Mol_gry*) e por métricas capazes de verificar a sua capacidade de discriminar compostos ativos de falsos positivos (ex.: AUC) (ANDRADE; BRAGA, 2013). Os valores de Pareto indicam se um modelo é superior aos demais com base nos critérios de *Sterics* (similaridade estérica global entre os confôrmeros dos ligantes), *HBond* (similaridade farmacofórica global entre os confôrmeros dos ligantes) e *Mol_gry* (valor de acerto do encaixe das moléculas ao modelo), devendo possuir um valor igual a 0 (CABALLERO, 2010). Nos resultados obtidos, os valores de Pareto demonstraram que os modelos são estatisticamente equivalentes (ATHRI *et al.*, 2010), assim, não foi utilizado para descartar nenhum modelo. O valor de *Energy* (energia total de todas as moléculas do conjunto treino para as conformações codificadas no cromossomo de torção) de cada modelo farmacofórico deve ser inferior a 100,0 Kcal/mol, pois a utilização de conformações com valor de *Energy* superior a 100,0 Kcal/mol reflete distorções nas moléculas para que os átomos se aproximem do centro dos pontos farmacofóricos (CABALLERO, 2010). Dessa forma, nenhum modelo apresentou penalidade energética, portanto, não foram descartados por esse quesito.

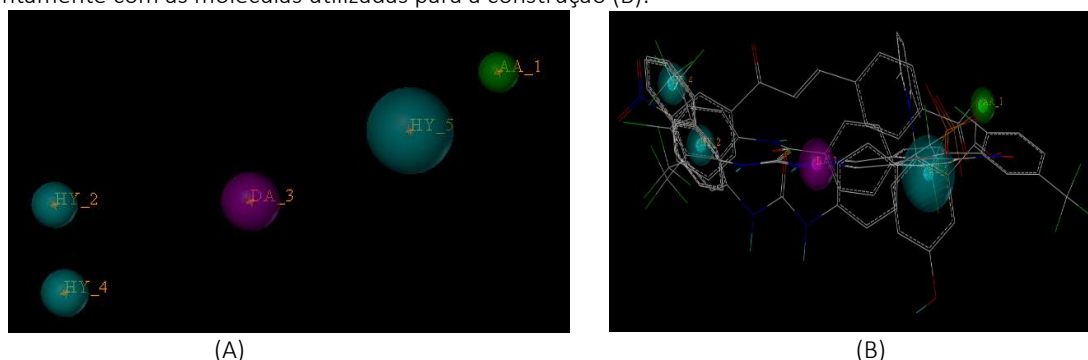
Os parâmetros anteriormente mencionados não foram suficientes para indicarem resultados precisos, dessa forma, foi adotado outro processo de seleção. Utilizou-se a análise da área sob a curva (do inglês AUC - *Area Under the ROC curve*), que possibilita avaliar a habilidade dos modelos farmacofóricos em diferenciar inibidores verdadeiros positivos de falsos positivos (NICHOLLS, 2011). Para esse critério, foram utilizadas 3 moléculas do ChemBL do conjunto teste juntamente com 150 moléculas falso positivos

gerados a partir destes ativos no Dud-E (50 *decoys* para cada molécula com atividade biológica).

Modelos que apresentam desempenho equivalente a uma seleção aleatória têm $AUC \leq 0,5$, valores de $AUC 0,9 \leq AUC \leq 1$ possuem desempenho excelente; $AUC 0,80 \leq AUC < 0,9$ bom desempenho; $0,70 \leq AUC < 0,8$, desempenho razoável. (LANGER; HOFFMAN, 2006). Nessa perspectiva, de acordo com o melhor valor de curva ROC, o modelo farmacofórico 1 ($AUC = 0,84$) foi selecionado para uma filtragem no banco *Biogenic* retirado do ZINC15 (IRWIN *et al.*, 2015).

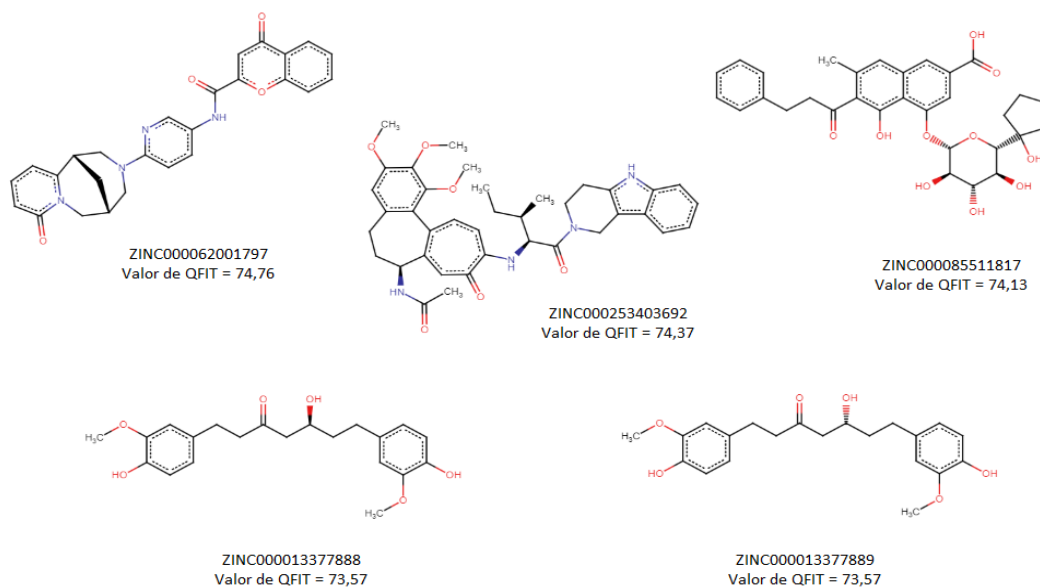
O modelo 1, como demonstrado na Figura 1 (A e B), apresenta 5 características: um grupo aceptor de ligação de hidrogênio, representado na cor verde (AA_1); um grupo doador de ligação de hidrogênio, representado na cor rosa (DA_3) e três centros hidrofóbicos, representado pela cor azul (HY_2, HY_4 e HY_5). Observando os inibidores já conhecidos na literatura, as informações encontradas corroboram com as características farmacofóricas do modelo apresentado, pois retratam que as regiões mais favoráveis para interação com a proteína tirosina fosfatase A são com grupos hidrofóbicos, doadores e aceptores de ligação de hidrogênio (RODRIGUES, 2016), propriedades presentes no Modelo 1.

Figura 1: Modelo 1 com suas 5 características farmacofóricas (A). Características farmacofóricas juntamente com as moléculas utilizadas para a construção (B).



Nessa perspectiva, após o processo de filtragem do modelo 1 com o banco *Biogenic*, foram encontradas 48.887 estruturas com os mais variados valores de QFIT. Na Figura 2, pode-se visualizar as 5 moléculas mais promissoras de acordo com o QFIT, seus respectivos códigos ZINC e suas estruturas.

Figura 2 – Cinco melhores estruturas de acordo com o valor de QFIT.



CONSIDERAÇÕES FINAIS

O emprego de uma estratégia de triagem virtual hierárquica do banco de estruturas do ZINC15 permitiu identificar dois candidatos a inibidores da proteína tirosina fosfatase A do *Mycobacterium tuberculosis*. A análise do padrão de reconhecimento molecular mostraram valores de QFIT importantes dos compostos com o alvo em questão. Dessa forma, os dados obtidos sugerem que as moléculas tem um potencial para serem observadas em etapas posteriores como acoplamento molecular, análise das interações intermoleculares e dinâmica molecular. A partir daí, pode-se analisar um possível potencial inibitório frente à proteína tirosina fosfatase A do *Mycobacterium tuberculosis*, podendo também ser submetidos a ensaios *in vitro* e/ou *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ATHRI, P.; WENZLER, T.; TIDWELL, R.; BAKUNOVA, S.M.; WILSON, W.D. Pharmacophore model for pentamidine analogs active against *Plasmodium falciparum*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 6147–6151, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim epidemiológico: Tuberculose**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2021.
- CABALLERO, J. 3D-QSAR (CoMFA and CoMSIA) and pharmacophore (GALAHAD™) studies on the differential inhibition of aldose reductase by flavonoid compounds. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 29, p. 363–371, 2010.
- ENG, J. **ROC analysis: web-based calculator for ROC curves**. Baltimore: Johns Hopkins University, 2014. Available from: <http://www.jrocfite.org>.
- GAULTON, A. *et al.* **Nucleic acids Res**. 2017.
- GENGENBACHER, M. *et al.* Biochemical and structural characterization of the putative dihydropteroate synthase ortholog. **Rev1207 of Mycobacterium tuberculosis**. FEMS Microbiol Lett. n. 287, p. 128–135, 2008.
- IRWIN, J. J. *et al.* **ZINC – A free tool to discover chemistry for biology**. Journal of chemical information and modeling, n. 1, p. 1-40, 2015.
- LANGER, T.; HOFFMAN, R. D. **Pharmacophores and Pharmacophore Searches**. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, FRG, p. 395, 2006.
- MYSINGER, Michael M. *et al.* Directory of useful decoys, enhanced (DUD-E): better ligands and decoys for better benchmarking. **Journal of medicinal chemistry**, v. 55, n. 14, p. 6582–6594, 2012.
- RODRIGUES, Vanessa Kiraly Thomaz. **Estudos estruturais e computacionais das proteínas tirosina fosfatase A e B de Mycobacterium Tuberculosis**. Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-graduação em Física Biomolecular) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2016.
- STEFANIU, A. Introductory Chapter: Molecular Docking and Molecular Dynamics Techniques to Achieve Rational Drug Design. In: **Molecular Docking and Molecular Dynamics**. [s.l.] IntechOpen, 2019.
- SYBYL-X 2.0. Discovery Software for Computational Chemistry and Molecular Modelling, version 2.0, St. Louis: **Tripos Inc**, 2012.