

Sandra Vanessa Rodrigues Leite da Silva

**Pesquisa Computacional de Inibidores de Fatores de
Virulência de *Bacillus anthracis***

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2015

Pesquisa Computacional de Inibidores de Fatores de Virulência de *Bacillus anthracis*

Sandra Vanessa Rodrigues Leite da Silva

Pesquisa Computacional de Inibidores de Fatores de Virulência de *Bacillus anthracis*

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2015

Sandra Vanessa Rodrigues Leite da Silva

Pesquisa Computacional de Inibidores de Fatores de Virulência de *Bacillus anthracis*

Trabalho apresentado à Universidade Fernando
Pessoa, como parte dos requisitos para obtenção
do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

(Sandra Vanessa Rodrigues Leite da Silva)

Resumo

O *Bacillus anthracis* é uma bactéria altamente virulenta, mais conhecida pelo ataque bioterrorista nos EUA em 2001 quando foi propagado através de correio infectando 22 pessoas e matando 5 delas. Na realidade, o uso do *B.anthraxis* como arma biológica é algo com uma longa história apesar de representar ainda uma ameaça nos dias atuais. Isto significa que ao longo do tempo e de forma paralela aos enormes avanços científicos e tecnológicos, se adquiriu mais informação acerca dos mecanismos de infecção deste bacilo que permitem hoje a pesquisa de melhores e mais eficazes formas de combate a esta ameaça.

Neste sentido, foram utilizadas neste estudo ferramentas computacionais como o YASARA e o AutoDock, para procurar melhores inibidores para o antigénio de proteção (PA) do *B.anthraxis*, obtidos por modelação molecular dos ligandos criados por Wein et al. (2012). Estas novas moléculas foram submetidas a um processo de docking e aquelas que demonstraram melhores resultados foram sujeitas a uma simulação de dinâmica molecular.

Como resultado desta pesquisa, foram encontradas algumas moléculas com potencial de se ligarem eficazmente ao PA. Adicionalmente, foi possível comparar os resultados para uma mesma molécula com conformação inicial diferente (orientação simétrica), demonstrando a influência dessas diferenças nos resultados do processo.

Abstract

Bacillus anthracis is a highly virulent bacterium, best known by the bioterrorist attack in the USA in 2001 when it was spread by mail infecting 22 people and killing 5 of them. In fact, using *B.anthraxis* as a biological weapon is something with a long history although it still represents a threat in the present days. That means that over the time and in parallel to the huge scientific and technological advances, more information about the infection mechanisms of the bacillus has been gathered, allowing the research for better and more effective ways to fight this threat.

Thus, computational tools such as YASARA and AutoDock were used in this study, to search for improved inhibitors for the protective antigen (PA) of *B.anthraxis*, obtained by molecular modulation of the ligands created by Wein et al. (2012). These new molecules underwent a process of docking and those with better results went through a molecular dynamics simulation.

As a result for this research, a few molecules were found to have potential to effectively bind to PA. Additionally, it was possible to compare the results regarding to one single molecule with two different initial conformation (symmetrical orientation), showing the influence of the initial conformation on the process results.

Agradecimentos

Aos meus pais. Pelo apoio, confiança e liberdade.

Ao meu irmão, pelo exemplo.

Aos colegas com quem contactei ao longo destes anos, que demonstraram a amizade, simpatia e entreatura que fizeram toda a diferença no balanço final do meu percurso académico.

Aos professores desta instituição com quem contactei. Deles levo a maior consideração e admiração.

Ao Prof. Pedro Silva em particular, pelo apoio e conhecimentos transmitidos, fundamentais para a realização deste trabalho.

Índice

I-	INTRODUÇÃO	1
1.1-	<i>Bacillus anthracis</i>	1
1.2-	História do Antrax como Arma Biológica	2
1.3-	Sintomatologia	3
II-	MECANISMOS BIOLÓGICOS DO <i>B.ANTHRACIS</i>	4
2.1-	Factores de Virulência.....	4
2.2-	Mecanismos de intoxicação celular	5
III-	MECANISMOS DE INIBIÇÃO.....	8
IV-	PESQUISA DE WEIN, ET AL (2012)	8
V-	ESTRATÉGIAS NA PESQUISA/MELHORAMENTO DE FÁRMACOS.....	10
5.1-	Energia de Ligação.....	11
5.2-	Métodos Computacionais	12
5.3-	Bioisosterismo	13
5.3.1-	Bioisosteros Clássicos.....	15
5.3.2-	Bioisosteros Não Clássicos	16
5.3.2.1-	Substituições Cíclicas vs Não Cíclicas	17
5.3.2.2-	Substituições de Grupos Funcionais	19
5.3.2.2.1-	Bioisosteros do Grupo Hidroxilo	19
5.3.2.2.2-	Bioisosteros do Grupo Carbonilo	20
5.3.2.2.3-	Bioisósteros do Grupo Carboxilato	21
5.3.2.2.4-	Bioisosteros do Grupo Amida	21
5.3.2.2.5-	Bioisosteros de Tioureia.....	22
5.3.2.2.6-	Bioisosteros de Halogénio	22
VI-	METODOLOGIA.....	23
6.1-	<i>Docking</i>	24
6.2-	Dinâmica Molecular	26
6.3-	<i>Docking</i> e Dinâmica Molecular combinados	28
VII-	RESULTADOS	29
7.1 -	Introdução.....	29
7.1.1 –	Distâncias.....	30
7.1.2 –	Desvios Geométricos Relativos à Estrutura Inicial	31
7.2 –	Análise de Resultados.....	32
7.2.1 -	Molécula 17_061.....	35

7.2.2 - Molécula 17_222.....	41
7.2.3 - Molécula 17_239.....	44
7.2.4 - Molécula 17_275.....	50
7.2.5 - Molécula 01_067.....	55
7.2.5.1 – Estabilidade das ligações do complexo [17_067-PA]: reprodutibilidade da trajectória.....	58
7.3 – Discussão de Resultados	64
VIII- CONCLUSÕES.....	67
IX- BIBLIOGRAFIA.....	71
X- ANEXOS	77
10.1 – Gráficos de contactos estabelecidos por resíduos de aminoácidos da proteína alvo ao longo do tempo de simulação.....	77
10.2 – Tabelas dos resíduos com melhor perfil de interacção (ordenados por ordem crescente do número do resíduo).....	79
10.3 – Tabela de resíduos que estabelecem interacções mais estáveis e as moléculas com as quais estabelecem essas interacções.....	80
10.4 – Resultados relativos à molécula 17	81
10.4.1 - Distâncias	81
10.4.2 – Desvios Relativos à Estrutura Inicial (RMSDs).....	81
10.5 – Tabelas de modificações efectuadas à molécula 01	82
10.6 – Tabelas de modificações efectuadas à molécula 17	85

Índice de Figuras

Figura 1. Exame radiológico de paciente infectado pelo <i>B.anthraxis</i> (via inalatória).....	4
Figura 2. Lesão causada pelo Antrax contraído pela via cutânea.....	4
Figura 3. Representação do Antígeno de Protecção (PA) do <i>Bacillus anthracis</i> (PDB: 3TEW).. ..	5
Figura 4. Mecanismo de Intoxicação Celular pelo Antrax	7
Figura 5. Estrutura do PA e a sua interacção com os ligandos 01 e 17. (A.).....	9
Figura 6 Estrutura base das moléculas de antergan e mepiramina	16
Figura 8 Análogo de catecolamina com a estrutura 1-fenil-2-aminoetanol (a)); Antagonista β -adrenérgico de estrutura 1-(ariloxi)-3-amino-2-propanol (b)); porção $-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2\text{NHR}$ destacada a negrito e porção C3-O2-C4-C5 destacada a cor azul	17
Figura 7 Molécula de estradiol (a) e dietilstilbestrol (b))	17
Figura 9 Ácido γ -aminobutírico (a)); Muscimol (b)); Tiomuscimol (c)); Isomuscimol (d))	18
Figura 10 Albuterol (a)), Soterenol (b)); Carbuterol (c))	20
Figura 11 1,2,4-oxadiazol (a) e 1,2,4-triazol (b)).....	21
Figura 12 Estrutura básica dos ácidos retinobenzoicos.....	22
Figura 13 Metiamina; porção da tioureia destacada a negrito	22
Figura 14 Estrutura base do 1-[(2-hidroxietoxi)metil]-5-benziluracilo	23
Figura 15. Representações bidimensionais dos inibidores 17 (a) e 01 (b).. ..	23
Figura 16. Representação em fita (<i>Ribbon</i>) do PA.	24
Figura 17. Estruturas das moléculas seleccionadas, após o <i>docking</i> , para o procedimento de dinâmica molecular	33
Figura 18. Número de Contactos vs Tempo.....	34
Figura 19. Estrutura do PA do Antrax (3TEW), com destaque para os resíduos 157, 158, 159, 226, 232, 461 e 480.....	35
Figura 20. Número de Contactos vs Tempo, para as moléculas 17 e 17_061.	36
Figura 21. Contactos estabelecidos por resíduos de aminoácidos e a molécula 17_061 ao longo da simulação.....	37
Figura 22. Distâncias (A) entre os pares de átomos [N11106-HN Trp226], [H11096-O Ser230] (B) e [O11111-HN Ser227] e [HO11096-HN Asp231] (C) ao longo da simulação, para a molécula 17_061.....	39
Figura 23. RMSD dos carbonos alfa ao longo do tempo de simulação.....	40
Figura 24. Valores de RMSD para a molécula 17_061, ao longo da simulação.....	40
Figura 25. Número de Contactos vs Tempo, para as moléculas 17 e 17_222.	41
Figura 26. Contactos estabelecidos por resíduos de aminoácidos e a molécula 17_222 ao longo da simulação.....	42

Figura 27. Distâncias (A) entre os pares de átomos [H11128-OG1 Thr461], [H11113-OG Ser475] (B) e [H11128-OG Ser475] e [N11127-HG Ser475] (C) ao longo da simulação, para a molécula 17_222.....	43
Figura 28. Valores de RMSD para a molécula 17_222, ao longo da simulação.....	44
Figura 29. Número de Contactos vs Tempo, para a molécula 17_239.....	44
Figura 30. Contactos estabelecidos por resíduos de aminoácidos e a molécula 17_239 ao longo da simulação.....	45
Figura 31. Distâncias (A) entre os pares de átomos [O11074-OG Ser475] (B) e [H11127-O Arg178], [N11113-HG1 Thr174] e [O11074-OG1 Thr174] (C) ao longo da simulação, para a molécula 17_239.....	47
Figura 32. Valores de RMSD para a molécula 17_239, ao longo da simulação.....	48
Figura 33. Sobreposição do complexo [17_239-PA] em momentos diferentes da simulação... ..	49
Figura 34. Número de Contactos vs Tempo, para as moléculas 17 e 17_275.....	50
Figura 35. Contactos estabelecidos por resíduos de aminoácidos e a molécula 17_275 ao longo da simulação.....	51
Figura 36. Contactos estabelecidos por resíduos de aminoácidos e a molécula 17_275 ao longo da simulação.....	51
Figura 37. Distâncias (A.) entre os pares de átomos [O11074-OG Ser475], [N11108-HN Trp226] (B) e [C13 11080-HN Glu158], [O11090-NH Asn476] e [HO11127-O Ser160] (C) ao longo da simulação, para a molécula 17_275.....	53
Figura 38. Valores de RMSD para a molécula 17_275, ao longo da simulação.....	54
Figura 39. Número de Contactos vs Tempo, para as moléculas 01_067 e 01_061.....	55
Figura 40. Contactos estabelecidos por resíduos de aminoácidos e a molécula 01_067 ao longo da simulação.....	56
Figura 41. Distâncias (A e B) entre os pares de átomos [O11091-HN Trp226], [C11089-HN Ser227] (C), [C11106-HN Gln158], [C11106-HN Lys159] e [C11089-HN Trp226] (D) ao longo da simulação, para a molécula 01_067.....	57
Figura 42. Valores de RMSD para a molécula 01_067, ao longo da simulação.....	58
Figura 43. Número de Contactos vs Tempo, para as moléculas 01_067 e 01_068.....	59
Figura 44. Contactos estabelecidos por resíduos de aminoácidos e a molécula 01_068 ao longo da simulação.....	60
Figura 45. Distâncias (A) entre os pares de átomos [C11089-HN Ser227], [C11089-HN Trp226] (B) e [C11106-HN Gln158] e [C11106-HN Lys159] (C) ao longo da simulação, para a molécula 01_068.....	61
Figura 46. Distâncias (A.) entre os pares de átomos [C11089-HN Ser227], [C11106-HN Gln158], [C11106-HN Lys159] e [C11089-HN Trp226] ao longo da simulação, para 01_067 e 01_068..	62
Figura 47. Gráfico relativo aos valores de RMSD para as moléculas 01_068 e 17_067..	63

Figura 48. Estrutura das moléculas 17_061 (A.) e 01_067 (B.) e respectivas moléculas de origem. 67

Figura 49. Complexo formado entre 17_061 e 01_067 e o PA..... 69

Índice de Tabelas

Tabela 1. Valores médios, desvio padrão e percentagem de distâncias inferiores a 3,5Å, das melhores ligações pesquisadas, por ordem decrescente dessas percentagens, para a molécula 17_061.....	38
Tabela 2. Valores médios, desvio padrão e percentagem de distâncias inferiores a 3,5Å, das melhores ligações pesquisadas, por ordem decrescente dessas percentagens, para a molécula 17_222.....	42
Tabela 3. Valores médios, desvio padrão e percentagem de distâncias inferiores a 3,5Å, das melhores ligações pesquisadas, por ordem decrescente dessas percentagens, para a molécula 17_275.....	52
Tabela 4. Valores médios, desvio padrão e percentagem de distâncias inferiores a 3,5Å, das melhores ligações pesquisadas, por ordem decrescente dessas percentagens, para a molécula 01_067.....	56
Tabela 5 Valores médios, desvio padrão e percentagem de distâncias inferiores a 3,5Å, das melhores ligações pesquisadas, por ordem decrescente dessas percentagens, para a molécula 01_068.....	60
Tabela 6. Resumo dos resultados relativos às interações estabelecidas por todos os complexos.	66

Abreviaturas

Ala – Alanina

AMP_c – Monofosfato cíclico de adenosina

Arg – Arginina

Asn - Asparagina

Asp – Aspartato

CMG2 – Proteína 2 da morfogénese capilar

DM – Dinâmica molecular

EF – Fator de edema

Glu – Glutamato

Gly – Glicina

Gln – Glutamina

His – Histidina

Ile – Isoleucina

Leu – Leucina

LF – Fator letal

Lys – Lisina

Met – Metionina

MM – Mecânica molecular

PA – Antígeno de proteção

Phe – Fenilalanina

Pro – Prolina

Ser – Serina

TA – Toxina do Antrax

Tyr – Tirosina

Thr – Treonina

Trp – Triptofano

Val - Valina

I- INTRODUÇÃO

1.1- *Bacillus anthracis*

O *B.anthraxis* é uma bactéria gram-positiva do tipo bacilar com capacidade de formar esporos que constituem uma forma de resistência da bactéria, isto é, permite-lhes resistir às condições desfavoráveis do meio ambiente e mesmo das defesas naturais do organismo. Pode ser encontrada naturalmente no solo, sendo comum a infecção de animais domésticos e selvagens. Em termos geográficos, é mais comumente encontrada em zonas agrícolas da América Central e do Sul, África subsaariana, Sudoeste Asiático e central, Sul e Este da Europa e Caraíbas. A infecção e transmissão entre humanos são raras mas possíveis. Há três vias de contaminação possíveis: a via oral (por ingestão de água, plantas ou produtos de origem animal contaminados), a inalação de esporos e também infecção cutânea (quando a pele apresenta lesões como feridas ou arranhões) (CDC, 2013).

Em 2010 foi ainda feita a descoberta de uma nova forma de infecção pelo Antrax, a via injectável. Apesar de produzir sintomas semelhantes ao Antrax cutâneo, pode provocar infecções subcutâneas mais profundas, ou a nível muscular. Esta infecção pode também disseminar mais rapidamente pelo corpo e ser mais difícil de detetar e tratar (CDC, 2013a). Esta descoberta foi feita após um pequeno surto ocorrido no Reino Unido e Alemanha em doentes que tinham consumido heroína por via injetável. Embora não tenha sido encontrado Antrax na heroína analisada, as provas recolhidas por epidemiologistas sugerem que esse tenha sido o veículo da contaminação (CDC, 2013b).

Em termos do ciclo de vida, enquanto se encontra no solo, o *B.anthraxis* produz os esporos, o que lhe permite resistir nesse ambiente por longos períodos de tempo, onde permanecem metabolicamente inativos. É esta forma esporulada que também lhes permite resistir às defesas dos hospedeiros (animais ou humanos), penetrando o seu organismo. Após a penetração no hospedeiro, sendo esse um ambiente rico em água e nutrientes, os esporos são ativados e tornam-se células germinativas. Assim, torna-se possível a sua multiplicação e expressão de toxinas e da própria cápsula (fatores de

virulência), surgindo a patologia denominada por Antrax (CDC, 2013; Drinks, A., 2009).

1.2- História do Antrax como Arma Biológica

Acredita-se que os primeiros relatos de Antrax na história, tenham ocorrido cerca de 1250 aC, no Egito e Mesopotâmia, acreditando-se que uma das 10 pragas do Egito, nomeadamente a quinta praga (Êxodo 9:3-7), poderá ter sido causada pelo Antrax, infectando gado, cavalos entre outros animais. As primeiras descrições clínicas só ocorreram milénios depois dos primeiros relatos históricos e só mais tarde, em 1877, Robert Koch foi capaz de estudar a bactéria, tendo determinado o seu ciclo de vida (CDC,2013b).

Já no século XX, houve bastante documentação relativamente ao Antrax, nomeadamente ao seu uso como arma biológica ou bioterrorismo. No que diz respeito ao uso do Antrax neste âmbito, terá sido utilizado na Primeira Guerra Mundial (1914-1918), pela França e Alemanha para infetar animais em outros países, no sentido de enfraquecer as suas economias e gerar um sentimento de insegurança. Na Segunda Guerra Mundial (1939-1945), também o Japão recorreu ao Antrax, entre outros agentes biológicos, para testar em populações o seu potencial como arma biológica (Chen e Zeng, 2012).

Mais recentemente, após o ataque terrorista de 11 de Setembro de 2001 nos EUA, foram usadas cartas para disseminar Antrax, tendo sido infetadas 22 pessoas, das quais 5 não sobreviveram. Este foi, de resto um bom exemplo de como uma arma biológica pode, com um pequeno grupo de vítimas, ter um grande impacto psicológico na população, inclusivamente a nível mundial. Por isto e por este caso ser recente, foram reavivadas preocupações sobre as falhas na prevenção contra este tipo de ataque (Chen e Zeng, 2012; CDC, 2001).

Acredita-se que existem atualmente vários países com meios para executar este tipo de ataque. Neste contexto e uma vez que continuam a existir e a surgir novos conflitos um

pouco por todo o mundo, são importantes as pesquisas de formas eficazes de prevenção e tratamento para infecções com estes agentes.

1.3- Sintomatologia

A sintomatologia apresentada após infecção com Antrax depende da via de infecção e tanto pode tornar-se evidente num espaço de 24h como pode aparecer apenas após alguns meses. Uma outra característica, que é comum a qualquer das vias de infecção, é o facto de que, quando não tratado, pode tornar-se uma infecção generalizada e tornar-se mesmo mortal. Relativamente à infecção por via cutânea manifesta-se pelo aparecimento de pequenas bolhas ou inchaços que podem apresentar prurido e podem evoluir para o desenvolvimento de úlceras com o centro preto. Geralmente a ferida aparecerá na face, pescoço, braços ou mãos (zonas mais expostas) e podem apresentar inchaço no seu redor. Quanto à infecção contraída por via inalatória, pode apresentar sintomas como: febre e calafrios, desconforto a nível do peito, dificuldade em respirar, confusão e tonturas, tosse, náuseas, vômitos ou dores de estômago, dor de cabeça, suores (muitas vezes abundantes), cansaço extremo e dores no corpo. Já a infecção pela via gastrointestinal, pode produzir sintomas como: febre e calafrios, inchaço no pescoço ou nas glândulas aí localizadas, dor de garganta, dor na deglutição, rouquidão, náuseas e vômitos (especialmente vomito sanguinolento), diarreia e diarreia sanguinolenta, dor de cabeça, rubefação e olhos vermelhos, dor de estômago, desmaio e inchaço a nível do abdómen. Em termos da infecção por via injetável, esta pode produzir sintomatologia semelhante à que ocorre na infecção por via cutânea, sendo a principal diferença o facto de a via injetável proporcionar uma disseminação mais rápida para todo o organismo e levar a um diagnóstico mais dificultado. Os sintomas que podem ocorrer quando há infecção por esta via são: febre e calafrios, aparecimento de algumas bolhas ou inchaços no local da injeção, que podem apresentar prurido e evoluir para feridas (indolores) com centro preto, inchaço em redor da ferida, abscessos profundos na pele ou músculo no local da injeção (CDC,2003c).



Figura 1. Exame radiológico de paciente infetado pelo *B.anthraxis* (via inalatória). O exame revelou derrame pulmonar bilateral e um mediastino alargado, que são característicos do processo da doença (Kaye, 1972)



Figura 2. Lesão causada pelo Antrax contraído pela via cutânea. Pode observar-se uma úlcera com coloração negra (Steele, 1962)

II- MECANISMOS BIOLÓGICOS DO *B.ANTHRACIS*

2.1- Fatores de Virulência

O *Bacillus anthracis* tem essencialmente dois fatores de virulência: a cápsula de ácido Poli- γ -L- α -glutâmico, que protege a bactéria da fagocitose, e o complexo proteico de exotoxinas, que é constituído pelo Antígeno Protetor (*Protective Antigen* - PA), Fator Letal (*Lethal Factor* – LF) e o Fator de Edema (*Edema Factor* – EF), que funcionam em conjunto no sentido de suprimir o sistema imune inato do hospedeiro (Wein et al., 2012). Ou seja, as toxinas produzidas pelo *B.anthraxis* são do tipo designado por AB, isto é, a toxina é composta por dois componentes diferentes (protómeros), um deles corresponde à parte enzimática (neste caso, o LF e EF) e o outro à parte responsável pela ligação à superfície da célula (neste caso o PA). Sendo assim, apesar de tanto o EF quanto o LF serem responsáveis pela letalidade da toxina do Antrax (TA), a sua atividade depende da ligação ao PA, para que as enzimas cheguem ao citosol das células. Isoladamente, nenhuma das três proteínas tem efeito tóxico (Hicks, 2004).

O EF (89 kDa) corresponde a uma adenilil ciclase dependente da calmodulina, que quando ligada ao PA forma a Toxina de Edema (*Edema Toxin* – ET) e atua na elevação

dos níveis intracelulares de AMP_c, o que será responsável por efeitos que incluem: o edema (devido a perturbações da função dos neutrófilos), interferências a nível da fagocitose e morte (observada experimentalmente em animais). Quanto ao LF (83 kDa), é uma metaloproteína contendo zinco que combinada com o PA forma a Toxina Letal (*Lethal Toxin* – LT) e actua na clivagem e inativação de cinases reguladas pelo mitogénio (MEK_s), o que se acredita resultar na superprodução de determinadas linfoquinas pelos macrófagos, causando morte celular por um tipo de choque séptico (Nguyen, 2004; Liu, 2009; Hicks, 2004).

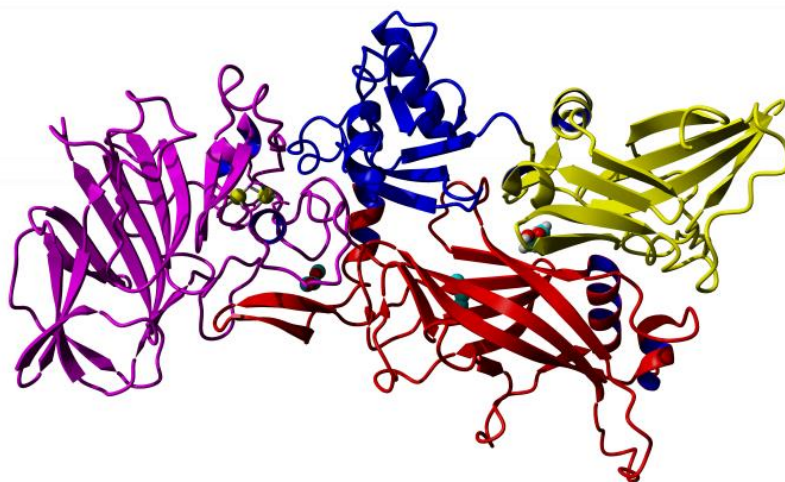


Figura 3. Representação do Antígeno de Proteção (PA) do *Bacillus anthracis* (PDB: 3TEW). Domínios 1 a 4 destacados a Magenta, Vermelho, Azul e Amarelo, respetivamente.

2.2- Mecanismos de intoxicação celular

Foi demonstrado que existe nas células recetores de superfície específicos para o PA e a sua ligação a esses recetores produz, por sua vez, um novo tipo de recetor, que é reconhecido quer pelo EF quanto pelo LF. O facto de o PA ser necessário para que quer EF como LF exerçam atividade e após se ter demonstrado que o EF era uma adenilil ciclase e portanto a sua ação era exercida no citoplasma onde se encontra o seu substrato e produto, levou a que se presumisse que a ação do PA era exercida a nível da superfície celular. Isto veio a ser demonstrado, explicando também a competitividade de EF e LF que já havia sido verificada (Leppala, 1982).

Um outro aspeto de grande importância é o facto de o PA estar inicialmente numa forma inativa, precisando ser enzimaticamente ativado. Isto ocorre através da clivagem

da estrutura inicial do PA, com 83 kDa, separando-o em dois fragmentos com 20 kDa e 63 kDa. No estudo de Gordon, et al. (1995), mostraram-se evidências da importância do papel da Furina nessa ativação. A clivagem dá-se junto à sequência RKKR¹⁶⁷ (Arg164-Lys165-Lys166-Arg167) e expõe um local ao qual se pode ligar um dos dois polipeptídeos ativos (LF ou EF). Após a endocitose desse complexo esse meio enzimaticamente ativo é levado para o interior da célula alvo, intoxicando-a (Gordon, et al., 1995). É de referir que apesar da sua reconhecida importância neste processo, foi demonstrado que outras pró-proteína convertases como a Furina podem atuar da mesma forma (Gordon, et al., 1995; Shiryayev, et al., 2007)

O mecanismo de intoxicação celular pode então ser descrito da seguinte forma:

- Ligação do PA₈₃ (83 kDa) a um de dois recetores: o Marcador Endotelial Tumoral (TEM8, também designado por ANTXR1) ou (sobretudo) a proteína do Gene da Morfogénese Capilar (CMG 2, também designada por ANTXR2)
- Clivagem de fragmentos de 20 kDa N-terminal do PA₈₃ pela Furina ou por uma proteína relacionada, dando origem a PA₆₃ ativo (63 kDa)
- Após ativação, ocorre oligomerização dos PA₆₃, formando heptâmetros que se ligam ao EF ou LF (ligação de 1 a 3 moléculas de EF ou LF)
- A toxina entra então por endocitose, mediada por Clatrina, e um abaixamento do pH leva a uma mudança conformacional no PA, que induz à formação de um poro, através do qual LF e EF transpassam para o citosol (Wein et al., 2012).

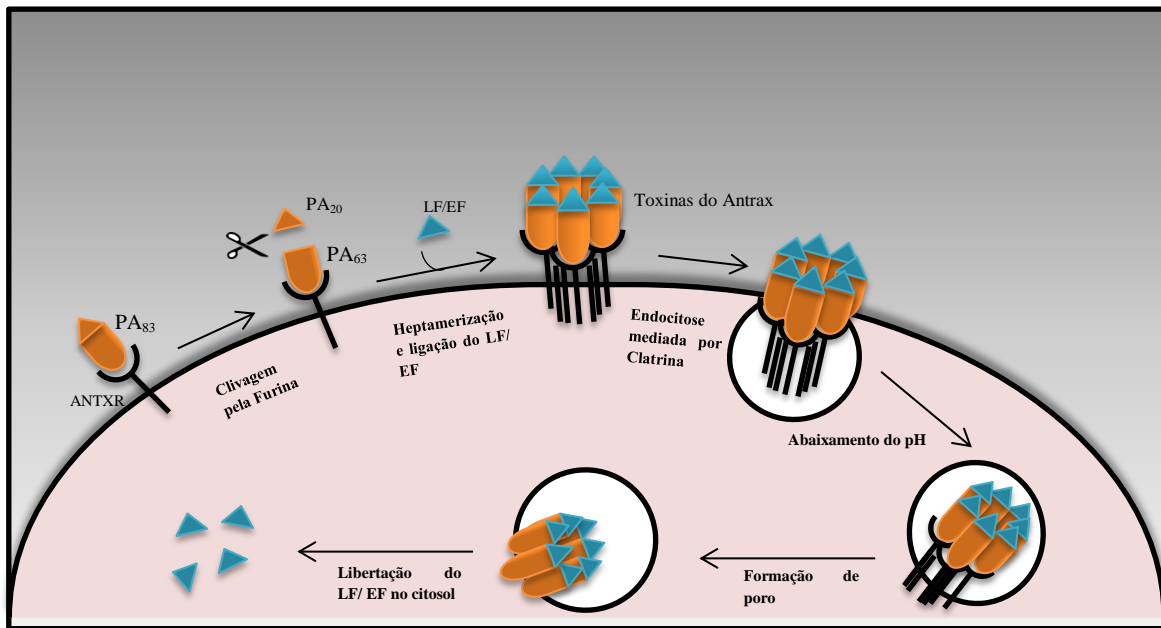


Figura 4. Mecanismo de Intoxicação Celular pelo Antrax

Analisando este processo, é perceptível que em termos de estrutura o PA é constituído por diferentes componentes. Pode então falar-se em quatro domínios estruturais do PA:

Domínio 1 (resíduos 1-258) – contém o PA₂₀ (antigénio de protecção com 20 kDa) e o local de ligação para dois iões Cálcio e também o local de atuação da Furina e o local de ligação do EF/LF;

Domínio 2 (resíduos 259-487) – está envolvido na formação do poro e contém um grande loop flexível que se acredita estar envolvido no processo de inserção da membrana;

Domínio 3 (resíduos 488-595) – está envolvido na formação do heptâmero (oligomerização);

Domínio 4 (resíduos 596-735) – é responsável pela ligação ao recetor da toxina do Antrax, localizado na superfície da célula hospedeira (Petosa, 1997; Nguyen, 2004).

De acordo com um estudo de Martchenko et al. (2012) no Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS), utilizando células de 234 pessoas de várias

proveniências geográficas e raciais, a toxicidade do Antrax pode depender também da composição genética do indivíduo. Foi descoberto que quando expostos à bactéria cultivada em laboratório, os linfócitos de algumas pessoas demonstraram menor propensão para morrer do que outros. Essa diferença estará relacionada com o nível de expressão do CMG2 (responsável por uma proteína de superfície), que determina a facilidade com que a toxina entra na célula (Harmon, 2012).

III- MECANISMOS DE INIBIÇÃO

Conhecido o mecanismo da intoxicação celular, tornou-se possível perceber várias vias potenciais de inibição da infecção. Nesse âmbito, essa inibição pode ser possível por vias como a inibição da ligação do PA à membrana (I), inibição da clivagem do PA₈₃ pela Furina (II), prevenção da endocitose da toxina do Antrax (III), inibição da atividade catalítica específica do LF ou EF (Wein et al., 2012).

Tendo em conta a ação do PA, como elemento essencial à função das toxinas do Antrax no processo da intoxicação celular, as vias de inibição feita a este nível são especialmente atrativas. Apesar destes avanços quer a nível das noções dos mecanismos de intoxicação pelo Antrax, como das vias potenciais de inibição, existem ainda obstáculos no que diz respeito à procura de agentes capazes de prevenir ou curar a doença. A raridade do Antrax e a impossibilidade de fazer testes clínicos em voluntários humanos são exemplo disso.

IV- PESQUISA DE WEIN, ET AL (2012)

A presente pesquisa tem como ponto de partida as conclusões retiradas por Wein, et al (2012). Nesse estudo, procurava-se pequenas moléculas com capacidade de inibição da formação da estrutura oligomérica de PA (forma funcional) a partir dos monómeros. Foi focada a fase da oligomerização uma vez que uma inibição a este nível é eficaz quer para LF quanto para o EF. A maior especificidade (moléculas desenhadas para interagir especificamente com o PA, sem interação com proteínas do hospedeiro) e o facto de pequenas moléculas poderem apresentar biodisponibilidade oral, foram também razões apresentadas pelos investigadores para justificar o foco do estudo. Recorrendo a bases

de dados e à comparação de forças de ligação previsíveis, levou a que o estudo se focasse ainda no local de ligação localizado junto ao *loop* de Furina (sequência entre Arginina 164 e Arginina 167) – ver **Figura 5 A.** Como resultado, identificaram-se quatro compostos, referenciados como 5180717, 5181401, 5181385 e 5117235 sendo que os inibidores 5180717 e 5181401 (doravante referenciados como 17 e 01) demonstraram maior atividade em ensaios de cultura celular, sendo capazes de inibir a clivagem do PA pela Furina e a sua oligomerização. Demonstrou-se ainda que ambos os ligandos estabelecem pontes de hidrogénio com cadeias laterais da Glutamina 158, Glutamina 483 e Lisina 157 e o ligando 17 estabelece ainda ligações de hidrogénio com a Serina 475 (**Figura 5 B.**). O grupo de resíduos entre o Glutamato 479-Glutamina 483 e Aspartato 512-Glutamato 515 (**Figura 5 B.**), importantes na estabilização da heptamerização, também delimitam o local de ligação.

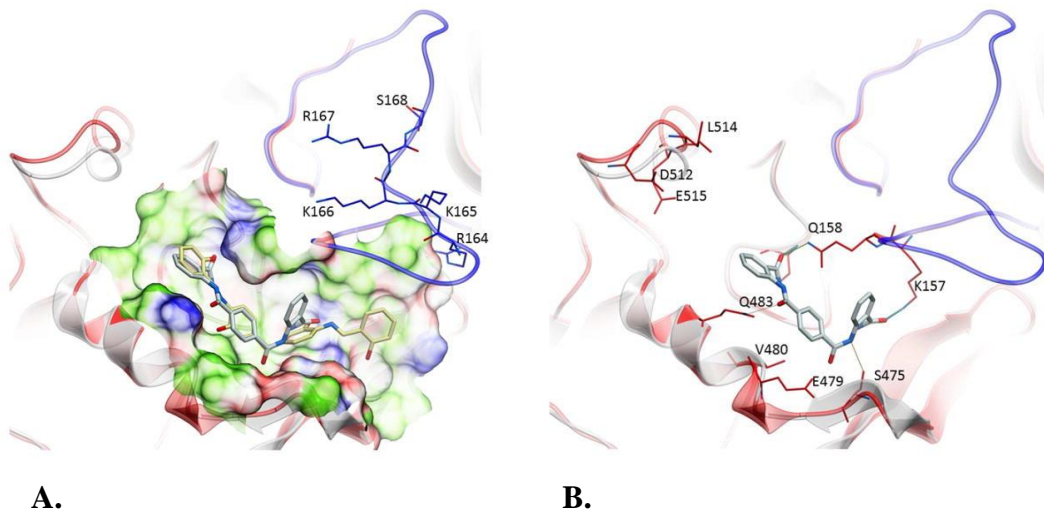


Figura 5. Estrutura do PA e a sua interação com os ligandos 01 e 17. (A.) Estrutura cristalográfica 1T6B (fita vermelha) sobreposta à estrutura cristalográfica 3TEW (fita cinzenta), com o *loop* de Furina ordenado em 3TEW destacado a azul; Estruturas dos inibidores 17 (amarelo) e 01 (cinzento) nas posições de ligação previstas. **(B.)** Pontes de hidrogénio estabelecidas pelo inibidor 17 (com os resíduos 157, 158, 475 e 483), demonstradas por pequenas esferas vermelhas (Wein, et al., 2012).

Apesar das boas características de ligação ao recetor, estas moléculas não estão, no entanto, isentas de aspetos desfavoráveis e com potencial para serem melhorados. Para além de ter sido identificada potencial toxicidade para uma exposição prolongada ao inibidor 17, a maior desvantagem encontrada para estes inibidores foi o seu carácter hidrofóbico. Para ultrapassar estes problemas e efetuar melhoramentos, podem então ser exploradas algumas estratégias que permitem, num intervalo de tempo e com recursos económicos relativamente baixos, obter resultados muito favoráveis. Estratégias de

modificação molecular como os bioisómeros e utilizando métodos computacionais permitirão, neste caso, explorar melhorias para aqueles inibidores no sentido de, por exemplo, melhorá-las em termos da energia de ligação ao receptor (PA) e/ou características de solubilidade.

V- ESTRATÉGIAS NA PESQUISA/MELHORAMENTO DE FÁRMACOS

Nas últimas décadas houve um enorme investimento, no âmbito da pesquisa de novos fármacos. No entanto, destas pesquisas apenas uma pequena parte acabou por se tornar viável, por motivos que vão desde a falta de especificidade, a baixa potência, toxicidade e outros efeitos adversos, entre outros fatores. Por esses motivos, muitas vezes os princípios ativos encontrados acabam por não chegar à comercialização havendo grandes perdas, nomeadamente perdas económicas. Neste sentido, entendeu-se a importância do desenvolvimento de novas estratégias usando métodos complementares, com recurso à bioinformática, química computacional, biologia celular, biologia molecular e estrutural etc., que permitissem pesquisas mais económicas e no geral mais viáveis (Ghitti et al., 2013; Schlick et al., 2011).

Assim, embora se acredite que há ainda muito espaço para evolução neste campo, o desenvolvimento de fármacos tem atualmente ao seu dispor uma grande quantidade de dados trazidos por numerosos estudos de genómica e proteómica, facilitando a descoberta de novos alvos, o uso de química combinatória racional para a produção de bases de dados de compostos, o uso de modelos animais geneticamente modificados para o desenvolvimento de testes de novos fármacos e a possibilidade de realizar testes com recurso a técnicas de alto rendimento para bases de dados de grande dimensão (Alonso et al., 2006).

5.1- Energia de Ligação

No que diz respeito às moléculas de cariz farmacológico, estas devem preferencialmente apresentar grande afinidade e seletividade para o alvo de ligação. A afinidade resulta da função combinada da entalpia e entropia de ligação, que devem contribuir para uma solução favorável a que haja uma boa energia de ligação. As forças associadas a essa ligação entre uma molécula de fármaco e o local alvo podem classificar-se em forças de atração (como as forças de van der Waals e as de hidrogénio) e de repulsão (como o efeito hidrofóbico que tende a forçar o fármaco a sair do solvente aquoso, em direção à cavidade hidrofóbica). A energia de ligação pode traduzir-se na expressão matemática $K_a = e^{-(\Delta G/RT)}$, estando então dependente da Energia Livre de Gibbs (ΔG), que é expressa pela equação matemática $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ (onde ΔH representa a entalpia e ΔS a entropia). Assim se demonstra a influência da entalpia e entropia para a afinidade de ligação.

O controlo no sentido da otimização da entalpia de ligação tem sido um dos grandes obstáculos para o alcance de moléculas com um potencial ótimo. Atualmente existem tecnologias capazes de otimizar esses parâmetros mas podem demorar anos até que se consigam resultados e geralmente aparecem apenas em produtos de segunda geração. As dificuldades da otimização da entalpia e entropia estão relacionadas com a dificuldade de otimizar as forças que contribuem para a entalpia de ligação e o facto de que mesmo quando essa otimização é conseguida, frequentemente isso não se traduz num aumento da afinidade, uma vez que a entalpia ganha é compensada por uma perda de entropia (tal como demonstrado no estudo de Velazquez-Campoy, et al., 2001). Em oposição, a entropia é mais fácil de controlar uma vez que está dependente primariamente pelo efeito hidrofóbico. Para além disso, a entropia sofre menos efeito de compensação do que a entalpia. Este tipo de abordagem leva a que atualmente exista uma tendência para o aparecimento de candidatos a fármacos entropicamente otimizados, com características hidrofóbicas e fraca solubilidade – um relatório (TCI, 2014) revelou que só entre os anos 2012-2013 foram lançados nos EUA 30 fármacos sólidos de administração oral com baixa solubilidade e biodisponibilidade.

Adicionalmente, para além de todas as questões relacionadas com a otimização das interações atómicas, a otimização de um fármaco ou composto líder tem de ter em conta

outras questões como por exemplo a biodisponibilidade e a toxicidade, não esquecendo o facto de que alterações na entalpia e entropia e o balanço entre as duas (assinatura termodinâmica), afeta não só a afinidade mas também outras propriedades como a seletividade (Freire, 2008).

5.2- Métodos Computacionais

As interações entre biomoléculas são fundamentais para qualquer processo biológico e são o que permite a manutenção das interações regulatórias e metabólicas que caracterizam a vida. Os métodos computacionais são uma ferramenta importante para perceber esses processos e encontrar moléculas com possível bioatividade na sua regulação e modificação.

Para a análise das interações moleculares deve idealmente existir um conhecimento tão grande quanto possível sobre as estruturas tridimensionais das moléculas envolvidas. É neste sentido e no sentido do desenvolvimento de novos algoritmos que tem ocorrido grande evolução, o que permite que exista atualmente uma boa e crescente base de dados sobre as estruturas biomoleculares, sobretudo no que diz respeito a proteínas e métodos computacionais cada vez mais eficazes. Muitos dos estudos computacionais de ancoragem molecular (*docking*) têm como um dos elementos da ancoragem as proteínas, pelo seu interesse e também pelo já referido vasto conhecimento das suas estruturas. Dependendo do tipo de molécula à qual a proteína se liga (DNA, RNA, outras proteínas, pequenos compostos orgânicos ou metal-orgânicos), são necessários diferentes modelos computacionais e algoritmos.

Por outro lado, é também possível usar estes métodos, mesmo quando a estrutura do ligando ou proteína não é conhecido. Muitas proteínas alvo de interesse para a criação de novos fármacos não têm uma estrutura tridimensional determinada experimentalmente, sendo possível usar técnicas de correlação que permitem prever as afinidades de ligação a novos ligandos. Ou seja, em alguns casos podem ser utilizadas técnicas computacionais no sentido de prever a estrutura tridimensional de uma proteína, a partir da estrutura de uma outra proteína homóloga, intimamente relacionada com a primeira e cuja estrutura é já conhecida. Esta modelação por homologia pode

então ser utilizada para criar modelos de estruturas proteínas que, embora não tão bons quanto as estruturas determinadas experimentalmente, constituem uma alternativa para os processos de *docking*. Inclusivamente, é possível usar os métodos computacionais para gerar novos ligandos para um dado recetor, não sendo obrigatório o recurso à base de dados dos ligandos já conhecidos. (Alonso et al., 2006; Lengauer e Rarey, 1996)

No âmbito da pesquisa de novos fármacos não existe uma solução única para os desafios que surgem nesse processo. A escolha dos métodos computacionais (assim como acontece com as técnicas experimentais), vai depender das características do próprio sistema em pesquisa e da informação que existe ou não acerca do mesmo. Há de resto uma grande variedade de abordagens computacionais que poderão ser aplicadas em diferentes estágios do processo de pesquisa. Podem por exemplo aplicar-se num fase inicial, no sentido de reduzir o número de ligandos possíveis ou no final do processo no estágio de otimização. O objetivo é conseguir menores custos experimentais e redução dos tempos de pesquisa (Alonso et al., 2006).

Métodos computacionais de *docking*, dinâmica molecular, assim como outras ferramentas computacionais são aprofundados mais à frente.

5.3- Bioisosterismo

No sentido de melhorar os inibidores encontrados pela pesquisa de Wein et al. (2012), nomeadamente na tentativa de torna-los mais viáveis para futura formulação de fármacos, uma estratégia que pode ser utilizada para a modelação molecular é a utilização de bioisosteros.

O Bioisosterismo é utilizado no âmbito das pesquisas de compostos farmacológicos com determinada atividade biológica e também na alteração desses compostos para torná-los, por exemplo, mais efetivos ou mais seguros. Assim sendo, no âmbito desta pesquisa, os bioisosteros formados a partir dos inibidores 17 e 01, procurarão aumentar a sua hidrofília, sem que seja perdida a atividade biológica que, neste caso será a ligação ao PA₈₃ inibindo a sua clivagem a PA₆₃. Esta capacidade de Bioisosteros manterem atividade biológica semelhante pode relacionar-se com o facto de possuírem

propriedades físico-químicas em comum, tais como eletronegatividade, efeito estérico e lipofilicidade.

Langmuir, em 1919 comparou as propriedades físicas de várias moléculas, como por exemplo N_2 e CO , N_2O e CO_2 (tendo isto vindo a ser reforçado pela descoberta de que ambos atuavam como anestésicos reversíveis) e N_3^- e NCO^- , e concluiu a existência de similaridade entre elas, identificando vários grupos de isosteros, que então foram definidos como compostos ou grupos de átomos com o mesmo número e arranjo de elétrons. Mais tarde acrescentou novas moléculas com similaridade, concluindo que o Argon (Ar) seria um isostero do ião Potássio (K^+) e o Metano (CH_4) um isostero do catião Amónio (NH_4^+). Deduziu então que os iões K^+ e NH_4^+ deveriam ser semelhantes, uma vez que Ar e CH_4 apresentam muitas semelhanças em termos de propriedades físicas.

Mais tarde, em 1925, o conceito de isosteros foi alargado através da Lei de Deslocamento do Hidreto de Grimm, que diz que a ligação de átomos de hidrogénio (1 a 4) a átomos localizados, na tabela periódica, antes de um gás inerte (1 a 4 posições antes), leva à formação de pseudoátomos, que apresentam semelhanças a nível das propriedades físicas relativamente aos elementos que se lhes seguem na tabela.

Posteriormente houve um novo alargamento ao conceito de isóstero, proposta por Erlenmeyer, que redefiniu o conceito de isóstero como átomos, iões e moléculas nas quais as camadas periféricas de elétrons podem ser consideradas idênticas.

O termo Bioisosterismo foi introduzido por Harris Friedman em 1950 com base nos conceitos de isóstero, reconhecendo que nem todos os isosteros são necessariamente bioisosteros, ou seja, não apresentam necessariamente o mesmo efeito biológico. O desenho de bioisosteros pode então traduzir-se na introdução de mudanças a nível estrutural, com tamanho, forma, distribuição eletrónica, polaribilização, dipolo, polaridade, lipofilicidade e pK_a com potencial contribuição no reconhecimento molecular e mimetização.

Os bioisosteros podem dividir-se numa classificação mais clássica, com origem na noção mais primária de bioisostero, ligada aos conceitos propostos por Grimm e Erlenmeyer e uma classificação não clássica com um conceito mais alargado.

O conceito clássico de Bioisosterismo faz uma subdivisão em 5 categorias: átomos ou grupos monovalentes; átomos ou grupos divalentes; átomos ou grupos trivalentes; átomos tetrasubstituídos; anéis equivalentes. Quanto ao conceito não clássico, não obedece às mesmas regras eletrónicas e estéricas dos bioisosteros clássicos, mas produzindo atividade biológica semelhante. Para além disto, os bioisosteros não clássicos não têm o mesmo número de átomos da molécula que vêm substituir. Os bioisosteros não clássicos podem também ser subdivididos em: anéis vs estruturas acíclicas; grupos convertíveis (Patani e LaVoie, 1996; Meanwell, 2011).

5.3.1- Bioisosteros Clássicos

No que diz respeito ao subgrupo dos Grupos e Átomos Monovalentes, estes podem ser divididos em:

- Substituições de Fluor vs Hidrogénio

- Intersubstituições Amino-Hidroxilo

- Intersubstituições Tiol-Hidroxilo

- Intersubstituições dos grupos Fluor, Hidroxil, Amino e Metil (aplicação da classificação de Grimm)

- Intersubstituições do grupo Cloro, Bromo, Tiol e Hidroxil (aplicação da Classificação de Erlenmeyer)

Relativamente aos bioisosteros divalentes, estes podem também ser divididos em duas classes distintas: a que envolve substituições de átomos envolvidos em ligações duplas (por exemplo C=C, C=N, C=O e C=S) e uma outra classe que inclui os bioisosteros divalentes em que a substituição de um átomo diferente resulta na alteração de duas ligações simples (como por exemplo C-C-C, C-NH-C, C-O-C e C-S-C).

Um exemplo relativo aos bioisosteros trivalentes é a substituição de $-CH=$ por $-N=$, sendo que esta tem vindo a ser usada na descoberta de novos fármacos.

Quanto aos átomos tetrasubstituídos, a substituição mais utilizada neste âmbito dos bioisosteros é a substituição de um azoto quaternário com um átomo de carbono terciário.

Por fim, em relação aos bioisosteros de anéis equivalentes, o uso de bioisosteros clássicos como o benzeno, tiofeno e piridina resulta em análogos com retenção da atividade biológica, para diferentes classes de agentes farmacológicos. Um exemplo disso foi o desenvolvimento da mepiramina (anti-histamínico) a partir do antegran, por substituição do grupo fenil (do antegran) por um grupo piridil. (Patani e LaVoie., 1996; Meanwell, 2011).

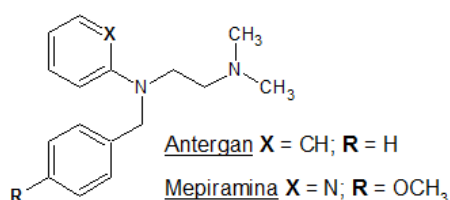


Figura 6 Estrutura base das moléculas de antegran e mepiramina (imagem gerada no ACD/ChemSketch)

5.3.2- Bioisosteros Não Clássicos

Esta classe diz respeito às substituições que divergem das definições clássicas de bioisosteros nomeadamente em termos estéricos e eletrónicos. Nesta classe é conservada a atividade biológica das moléculas pela mimetização do arranjo espacial, propriedades eletrónicas ou qualquer outra propriedade físico-química que seja importante para a atividade biológica daquela molécula ou grupo funcional. Uma outra

característica importante desta classe de bioisosteros é o facto de não conservarem o mesmo número de átomos da molécula ou substituinte original. Dentro deste grupo, podem distinguir-se:

- Substituições Cíclicas vs Não Cíclicas

- Substituições de Grupos Funcionais (Patani e LaVoi, 1996).

5.3.2.1- Substituições Cíclicas vs Não Cíclicas

Por vezes um grupo cíclico pode ser substituído por um grupo não cíclico, mantendo-se a atividade biológica em termos estéricos ou eletrónicos. São exemplo disto os análogos estruturais do estradiol, tendo sido descoberta a importância da ligação central do dietilstilbestrol para a orientação dos grupos etil e fenólico que

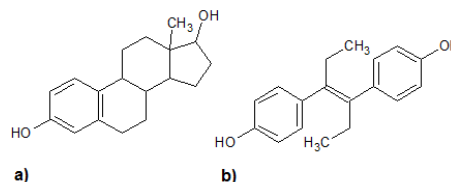


Figura 7 Molécula de estradiol (a) e dietilstilbestrol (b)

permitem a ligação aos recetores estrogénicos. O uso de metilenoaminóximetil ($C=NOCH_2$) como

bioisostero de grupos arilo e outros grupos aromáticos, veio estender este conceito. Por

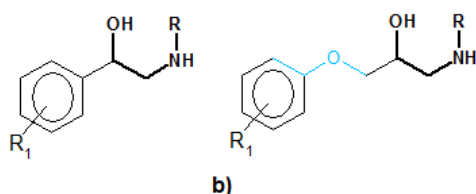


Figura 8 Análogo de catecolamina com a estrutura 1-fenil-2-aminoetanol (a)); Antagonista β -adrenérgico de estrutura 1-(ariloxi)-3-amino-2-propanol (b)); porção $-CH(OH)-CH_2NHR$ destacada a negrito e porção C3-O2-C4-C5 destacada a cor azul

outro lado, estudos relativos ao desenvolvimento de fármacos β -adrenérgicos vieram dar suporte à utilidade destes bioisosteros. Um exemplo disto é a porção 1-

fenil-2-aminoetanol incorporada nos análogos sintéticos de catecolaminas, que estão intimamente relacionados com derivados 1-(ariloxi)-3-amino-2-propanol, que são antagonistas β -adrenérgicos, apresentando

ambos uma porção $-CH(OH)-CH_2NHR$. Isto sugeriu que esta porção era responsável pela ligação aos recetores. O núcleo aromático, por sua vez, demonstrou ter influência no tipo de atividade (agonista ou antagonista) apresentada pela molécula. Estudos teóricos deram conta da possibilidade de a porção C3-O2-C4-C5 de uma classe de bloqueadores β -adrenérgicos simularem uma porção daquele anel aromático, em termos

estéricos e eletrônicos. Foi demonstrado que a distribuição eletrônica gerada por aquela porção era semelhante à gerada pelo anel aromático de antagonistas como o representado na figura 7, sendo isto sugestivo de que essa distribuição, que é essencial para a interação com o recetor, não requer um anel aromático. Todos estes resultados levaram ao desenvolvimento de derivados antagonistas β -adrenérgicos e também à utilização deste tipo de substituição bioisostérica em outros fármacos (Patani e LaVoi, 1996).

O uso de estruturas cíclicas para substituir não cíclicas é geralmente utilizado para aumentar a rigidez estrutural. Quando estas substituições são utilizadas na formação de bioisosteros, nomeadamente nos grupos éster, podem resultar em análogos mais estáveis (Meanwell, 2011).

Um dos exemplos da aplicação deste tipo de substituições bioisostéricas é nos moduladores do GABA (ácido γ -aminobutírico), um importante neurotransmissor de inibição no sistema nervoso central nos mamíferos, cuja pesquisa de agonistas poderá traduzir-se no desenvolvimento de novos antiepilépticos, analgésicos e fármacos utilizados na melhoria da memória. Embora tenha sido possível o desenvolvimento desses agonistas, como por exemplo o muscimol, tiomuscimol e isomuscimol, estes

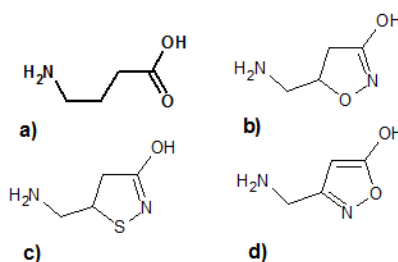


Figura 9 Ácido γ -aminobutírico (a); Muscimol (b); Tiomuscimol (c); Isomuscimol (d))

revelaram-se pouco tolerantes a alterações (Krogsgaard-Larsen, et al., 1985) que mesmo quando de pequena dimensão, levavam frequentemente a grande perda ou mesmo perda total da atividade. O desenvolvimento de análogos bicíclicos revelou-se no entanto como algo promissor. Embora a aplicação desses bioisosteros não se tenha traduzido no desenvolvimento de agonistas com potência significativamente maior, permitiu que se compreendesse melhor a geometria espacial requerida para que estes agentes terapêuticos mantenham a sua especificidade para determinado alvo farmacológico.

Um outro exemplo da aplicação deste tipo de substituições é o caso do desenvolvimento de diversos peptidomiméticos. A capacidade de um péptido se ligar especificamente a um determinado recetor pode requerer uma dada conformação do péptido e por isso têm

sido usados, entre outros, os bioisosteros de estrutura cíclica no sentido de restringir a torção dos ângulos e avaliar a conformação bioactiva essencial para a obtenção da atividade fisiológica pretendida (Patani e LaVoi, 1996).

5.3.2.2- Substituições de Grupos Funcionais

São inúmeros os grupos funcionais atualmente conhecidos e utilizados nas terapêuticas e tal como estes se foram desenvolvendo ao longo do tempo e foi crescendo o domínio sobre as suas propriedades e características funcionais, também se foi tornando possível perceber cada vez mais sobre as alterações que são possíveis realizar nesses grupos no sentido de melhorá-los ou torna-los mais favoráveis para determinado objetivo. As pesquisas neste sentido proporcionam não só o desenvolvimento de novos e melhores grupos funcionais de uma forma direta, constituindo também muitas vezes um processo de progressivo conhecimento das dinâmicas de atividade e da estrutura dos grupos funcionais. Neste sentido são apresentados se seguida alguns exemplos da aplicação de bioisosteros não clássicos por substituições de grupos funcionais (nomeadamente dos grupos hidroxilo, carbonilo, carboxilato, amida, tiureia e halogénios), que demonstram não só a obtenção de grupos mais eficazes mas também a obtenção de outras conclusões acerca das estruturas e atividades dos grupos.

5.3.2.2.1- Bioisosteros do Grupo Hidroxilo

Os bioisosteros não clássicos para grupos hidroxilo fenólicos, não se assemelham geralmente a esse grupo funcional no que diz respeito ao tamanho ou potencial como grupo electrodador. Serão assim pouco desejáveis nos casos em que a atividade biológica é afetada negativamente pelo aumento do tamanho molecular ou em que é fortemente dependente dos parâmetros electrónicos. Os casos em que estes bioisosteros serão desejáveis são quando o grupo hidroxilo fenólico atua quer como aceitador quer como dador nas interações de hidrogénio e ainda quando a atividade biológica é melhorada por uma moderada hidrofiliçidade.

Como exemplo destes bioisosteros podem referir-se:

- Substituição do grupo hidroxilo por alquilsulfonamida, tendo ambos uma semelhante acidez para o próton permutável e a porção –N-H da sulfonamida é capaz de se alinhar relativamente ao recetor de uma forma semelhante à do –O-H;

- Substituição do grupo 3-hidroxil do DPDA (N,N-di-n-propildopamina) por NHSO_2CH_3 (metanosulfonamida) para o desenvolvimento de análogo com melhor afinidade para o recetor D_2

- Substituição do grupo 3-hidroxil de agonistas de β -adenoreceptores por 3- CH_2OH (albuterol), 3- NHSO_2CH_3 (soterenol), 3- NHCONH_2 (carbuterol)

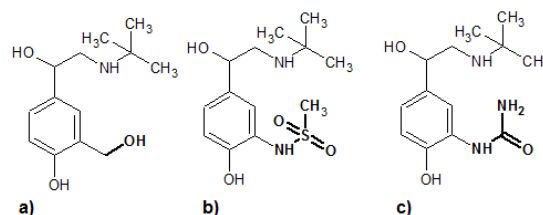


Figura 10 Albuterol (a), Soterenol (b); Carbuterol (c)

- Certos heterociclos com nitrogénio como o pirrol, indol ou benzimidazola, com um próton ligado ao azoto e cujo par de eletrões se encontra envolvido na manutenção da aromaticidade, foram bioisosteros utilizados com comprovada eficácia (Patani e LaVoi, 1996).

5.3.2.2.2- Bioisosteros do Grupo Carbonilo

Na pesquisa de antagonistas de LTB_4 (Leucotrieno B_4 ; associado a doenças inflamatórias) mais potentes e seletivos, foram feitas este tipo de substituição (grupo carbonilo) por uma variedade de bioisosteros polares e não polares, resultando em diferenças pouco significativas no que diz respeito à atividade antagonista. Essas substituições apresentavam no entanto diferenças significativas em termos de polaridades e hibridização o que sugere que esta porção da molécula não terá muito envolvimento na ligação ao recetor do LTB_4 . Este é assim um exemplo que demonstra como análogos bioisostericos podem ser utilizados para a identificação dos locais das moléculas de fármaco com maior impacto na interação com o farmacóforo.

Um outro exemplo da aplicação destas substituições ocorre no desenvolvimento de novos inibidores da aldose redutase relacionados com o sorbinil e também no

desenvolvimento de uma nova série de tiazolidina-2,4-dionas avaliadas como potentes agentes euglicêmicos (Patani e LaVoi, 1996).

5.3.2.2.3- Bioisósteros do Grupo Carboxilato

Este grupo de bioisosteros pode envolver a substituição do hidroxilo ou então de ambos os fragmentos (hidroxilo e carbonilo). A determinação de substituições desejáveis para o grupo carboxilato relaciona-se frequentemente com a capacidade do bioisostero apresentar acidez e propriedades físico-químicas semelhantes. A substituição do hidroxilo de um ácido carboxílico com uma fenil-sulfonamida, por exemplo, origina uma sulfonimida, que possui pKa semelhante ao apresentado pelo ácido carboxílico do grupo arilo. Um exemplo prático da substituição do hidroxilo do grupo carboxilato é o desenvolvimento de antagonistas do leucotrieno derivados do indol.

Em termos da substituição da totalidade do carboxilato, a utilização de tetrazole tem suscitado um crescente interesse. O uso dessa substituição numa benzodiazepina de segunda geração (antagonista da CCK-B/ colecistoquinina), levou a um aumento da potência devido à redução da hidrofiliçidade. A utilização de oxadiazole seguiu este mesmo sentido, nomeadamente a obtenção de uma potencia ainda maior do que aquela conseguida pela substituição pelo tetrazole. Também os sulfonatos e fosfatos são possíveis substituições bioisostericas para este grupo funcional, sendo ambos mais hidrofílicos do que o anião carboxilato e são totalmente ionizados a pH fisiológico (Patani e LaVoi, 1996).

5.3.2.2.4- Bioisosteros do Grupo Amida

Este tipo de substituição tem despertado grande interesse nomeadamente pelas implicações na química peptídica e no desenvolvimento de miméticos de péptidos. Existe atualmente um grande interesse em tornar moléculas formadas por péptidos, em moléculas quimicamente mais estáveis e compatíveis com a administração oral. São exemplos destes substituintes do grupo amina os esterres e anéis heterocíclicos como 1,2,4-oxadiazolas e 1,2,4-triazolas.

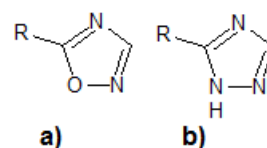


Figura 11 1,2,4-oxadiazol (a) e 1,2,4-triazol (b)

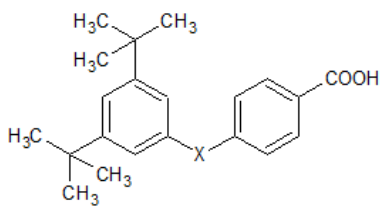


Figura 12 Estrutura básica dos ácidos retinobenzoicos

Tioamida, ureia, carbamato e sulfonamida são outros exemplos de bioisosteros de ligações contendo amidas. Um exemplo prático foi a utilização destas substituições no grupo amida de ácidos retinobenzoicos, que demonstrou que grupos como $-\text{CONH}$, $-\text{SO}_2\text{NH}-$, $-\text{COCH}=\text{CH}-$ ou $-\text{N}=\text{N}$, permitiam a manutenção da atividade da molécula, o que levou a concluir que a função da amida na molécula está relacionada com o espaçamento ou posicionamento do m-dialquilfenil relativamente ao grupo p-carboxifenil (Patani e LaVoi, 1996).

5.3.2.2.5- Bioisosteros de Tioureia

Estes bioisosteros foram usados com sucesso no desenvolvimento de antagonistas do recetor H_2 (tratamento de úlceras pépticas). O porção da tioureia desses compostos foi no tanto associada a efeitos adversos como agranulocitose observados com o antagonista H_2 , metiamida. Foram então testadas substituições dessa porção da molécula do antagonista. O grupo guanidino (NH) trouxe problemas a nível da absorção uma vez possuir um elevado grau de ionização a pH fisiológico; por outro lado o derivado cianoguanidino (NCN) levou à obtenção da cimetidina que tem dobro da actividade inibidora da secreção gástrica da metiamida. De resto, a presença de um grupo funcional polar não básico ligado à posição secundária de um substituinte (etiltio)metil num heterociclo aromático, tal como ocorre na cimetidina, é também comum aos restantes antagonistas H_2 mais utilizados atualmente na prática clínica (famotidina, ranitidina, nizatidina) (Patani e LaVoi, 1996).

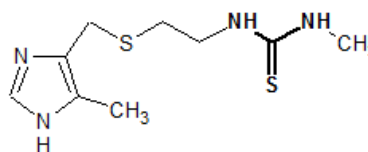
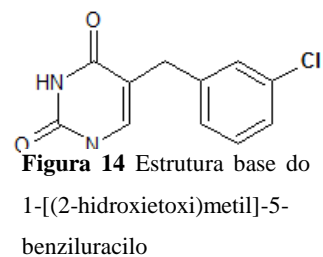


Figura 13 Metiamina; porção da tioureia destacada a negrito

5.3.2.2.6- Bioisosteros de Halogénio

Os halogénios têm vindo a ser substituídos por grupos eletroretiradores tais como grupos ciano ou trifluorometil, assim como se observa nas substituições testadas para a inibição da uridina fosforilase com uma série de 1-[(2-hidroxietoxi)metil]-5-benziluracilos, com o interesse de inibir a degradação que aquela exerce sobre

determinados agentes quimioterápicos. A substituição do átomo de cloro por grupos mais eletroretiradores na posição 3 (como CN e CF₃) demonstrou que este tipo de grupos nessa posição provocam a diminuição da potência destes agentes.



Um outro exemplo da aplicação destes bioisosteros é a substituição de halogênios de benzodiazepinas (Cl, CN, CF₃), que mantiveram o seu efeito antagonista da atividade da CCK-A (colescitoquinina-A) – tratamento de desordens a nível do apetite, problemas na motilidade gástrica, doenças do trato biliar, gestão da dor e desordens psiquiátricas (Patani e LaVoi, 1996).

VI- METODOLOGIA

Como foi já referido anteriormente, o desafio do presente trabalho é a modificação das moléculas dos inibidores 17 e 01 (Wein, et al., 2012) no sentido de as tornar menos hidrófobas e com melhores características de ligação ao recetor.

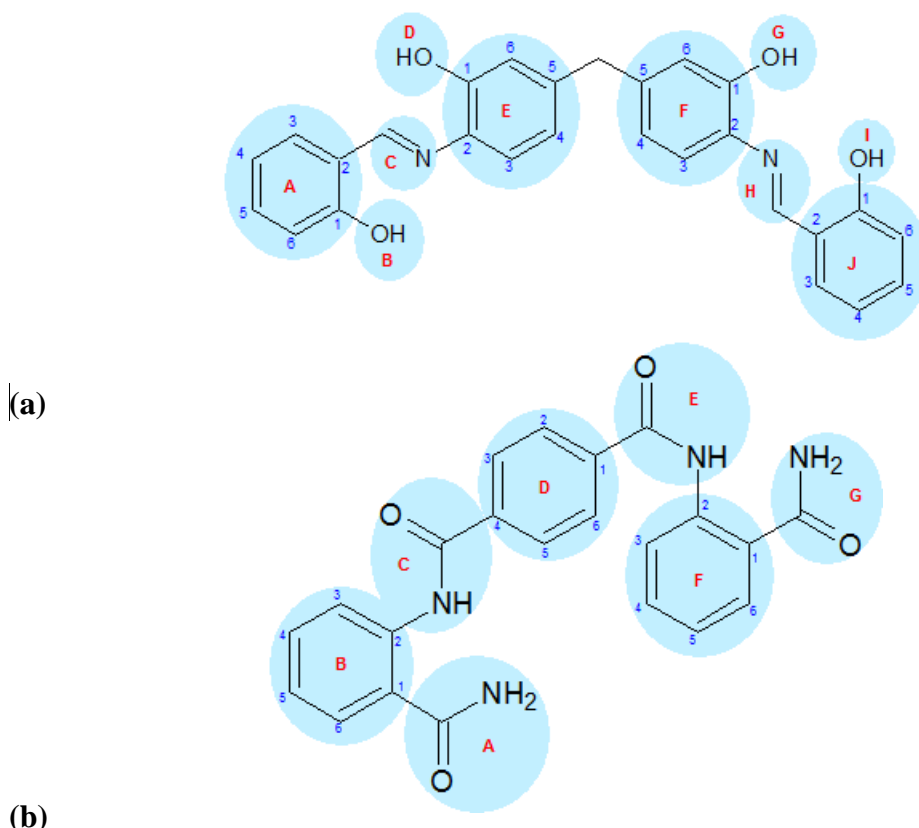


Figura 15. Representações bidimensionais dos inibidores 17 (a) e 01 (b). Estruturas com numeração e identificação dos diferentes grupos (Imagens geradas através do programa ACD/ChemSketch).

O modelo da estrutura cristalográfica do monômero de PA utilizado para esta pesquisa, foi obtido a partir do banco de dados de proteínas (PDB), estando identificado com o código 3TEW (Feld, et al., 2012). As estruturas foram trabalhadas usando o programa informático YASARA (versão 14.5.6) que permitiu utilizar a estrutura dos dois “ligandos-base” (17 e 01) para efetuar as alterações moleculares que levaram à formação de todos os potenciais ligandos testados. Posteriormente, o programa AutoDock permitiu simular a sua ligação ao local do PA selecionado (situado entre os resíduos 164 e 167 e os resíduos 475 e 483).

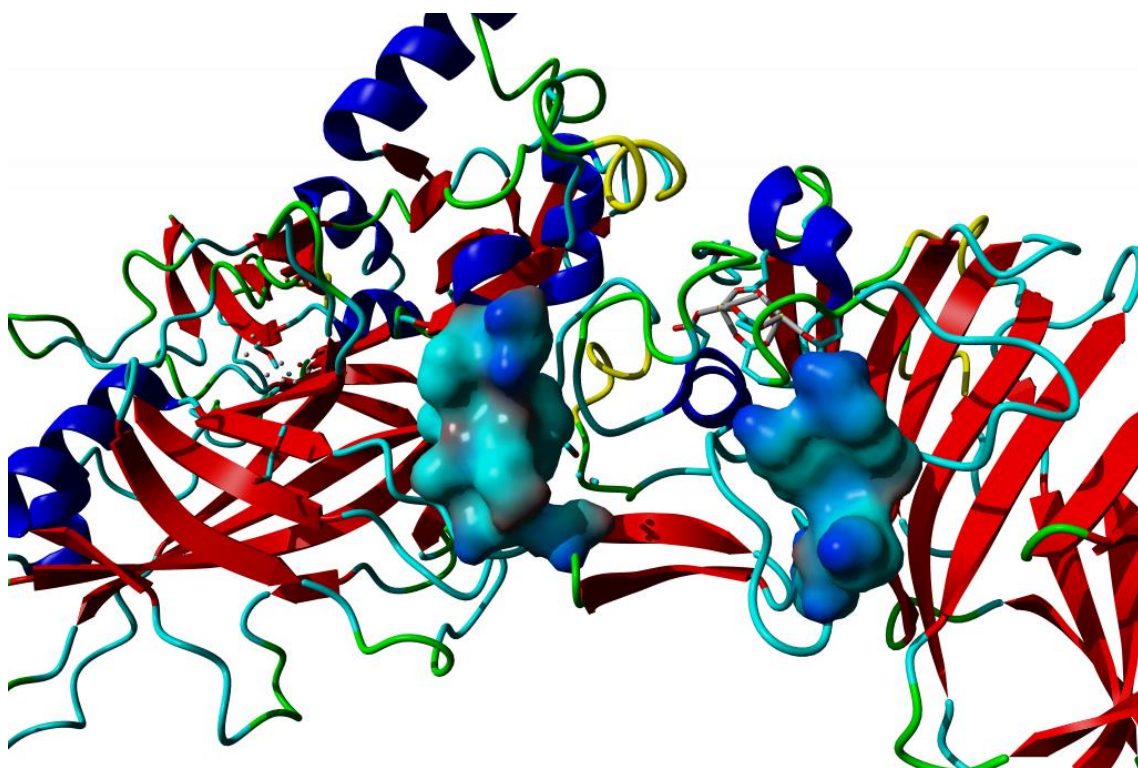


Figura 16. Representação em fita (*Ribbon*) do PA. Destaque para a superfície molecular dos resíduos 164-167 e 475-483

6.1- *Docking*

Pode falar-se em dois tipos de técnicas de *docking* automatizado: métodos de correspondência e métodos de simulação de *docking*. Os métodos de correspondência dizem respeito à criação de um modelo do local ativo (local de ligação) – que incluem

geralmente ligações de hidrogénio e locais estéricamente acessíveis – e posteriormente tentam fazer a ligação de um dado inibidor de forma rígida por correspondência geométrica entre ligando e loca de ligação. Por outro lado, nos métodos de simulação de *docking* essa simulação é feita de forma mais detalhada, isto é, o ligando começa fora da proteína e de forma aleatória a explorar translações, orientações e conformações até encontrar o local de ligação ideal. Apesar de este detalhe implicar uma maior demora do processo, permite uma maior flexibilidade ao ligando para ser modelado e permite também a utilização de mecânicas moleculares mais detalhadas para o cálculo da energia do ligando no contexto do potencial local ativo. Este método permite então a pesquisa de modificações de compostos moleculares líder e será o utilizado nesta pesquisa (Morris et al., 1998).

O AutoDock 4.2.3 foi a versão do programa de simulação de *docking* utilizado, tendo sido aplicados os parâmetros de ancoragem padrão e cargas pontuais atribuídas de acordo com o campo de força AMBER03 (Duan, et al., 2003).

O AutoDock é uma ferramenta capaz de prever de forma precisa e rápida, conformações preferenciais e energias de ligação não covalente de macromoléculas ou, como é mais frequente, de ligação de moléculas de pequena dimensão (ligandos) com os respetivos recetores macromoleculares. O principal método utilizado para a pesquisa conformacional é o algoritmo genético lamarquiano (*Lamarckian Genetic Algorithm* – LGA), que tal como os demais algoritmos genéticos, usa como base linguagem da genética natural e evolução biológica, neste caso alusiva à teoria de Lamarck. Geralmente, um procedimento no AutoDock envolve cinquenta operações do LGA com 25 milhões de avaliações em cada uma delas (Morris et al., 2009; Trott e Olson, 2010).

Nos algoritmos genéticos em geral utilizados no *docking* molecular, o arranjo de um dado ligando e de uma proteína pode definir-se por um conjunto de valores que descrevem a translação, orientação e conformação do ligando relativamente à proteína, correspondendo estes às chamadas ‘variáveis de estado’ do ligando. Pares aleatórios são conjugados por um processo de cruzamento, no qual novos indivíduos adquirem características de cada uma das parcelas do par que lhe deu origem (podendo ocorrer fenómenos de *mutação*, também de forma aleatória), resultando em diferentes soluções

possíveis. Essas soluções correspondem então à totalidade da energia de interação do ligando com a proteína e o objetivo do processo é encontrar as soluções com melhor energia.

Este procedimento permite assim o cálculo aproximado da força de ligação de cada uma das moléculas testadas ao local de ligação, neste caso situado junto ao *loop* de Furina do PA e é essa força de ligação que vai permitir prever se a molécula testada poderá representar um bom inibidor para o *Bacillus anthracis*.

Ao longo da pesquisa e à medida que foram sendo obtidos os resultados de *docking*, puderam cruzar-se algumas das alterações efetuadas aos ligandos 01 e 17 que apresentaram melhores resultados de ligação, no sentido de avaliar se essa ligação era potencializada. (Morris et al., 1998).

6.2- Dinâmica Molecular

As simulações de dinâmica molecular (DM) são uma das técnicas computacionais mais versáteis e mais aplicadas nos estudos com macromoléculas biológicas. Atualmente, após enormes avanços tecnológicos, é possível realizar simulações de DM muito mais complexas (Alonso et al., 2006).

Nestes processos, as moléculas são tratadas com base nos conceitos da Mecânica Molecular (MM). A MM calcula a energia estérica das moléculas, isto é, a energia relacionada com a sua conformação ou geometria. A proveniência dessa energia estérica, segundo a MM, inclui algumas interações intramoleculares (de átomos ligados e não ligados) como expansão/compressão das ligações, deformação dos ângulos, torção em torno das ligações, atrações/repulsões de Van der Waals, interação eletrostática entre cargas parciais devido a ligações polares. A soma das energias dessas interações resulta na energia potencial/estérica total da molécula (Shattuck, 2008; AMRITA, 2013).

Neste sentido, cada molécula é considerada como um conjunto de átomos que pode ser descrita por forças newtonianas (de movimento) sendo que a resolução dessas equações

de movimento são feitas de forma numérica para cada sistema, no sentido de extrair propriedades químicas e biofísicas a partir dos dados atômicos (Nair e Miners, 2014; Namba et al., 2008). O conjunto de potenciais de interação entre partículas é chamado de campo de força e a escolha desse campo de força, para cada processo, deve ser feita tendo em conta o sistema em estudo e as propriedades que se pretendem investigar (Namba et al., 2008). A parametrização dos campos de força envolve a definição das ligações químicas, ângulos atômicos e diédricos, assim como determinação das cargas atômicas parciais para o cálculo das energias de interação eletrostática, identificação de raios atômicos de Van der Waals apropriados, etc (Nair e Miners, 2014). Neste caso, como foi já referido, foi utilizado um campo de força AMBER, que corresponde a um dos sistemas biomoleculares mais utilizados. Os campos de forças podem ser descritos de uma forma geral pela equação:

$$V = V_{str} + V_{bend} + V_{tors} + V_{vdw} + V_{elec} + V_{cross}$$

Para o campo de forças de AMBER concretamente, a equação fica:

$$V = \sum_{str} K_r (r - r_{eq})^2 + \sum_{bend} K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 + \sum_{tors} \frac{1}{2} V_n [1 + \cos(n\Phi - \gamma)] + \sum_{nb} \left(\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} - \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right) + \sum_{hb} \left(\frac{C_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{R_{ij}^{10}} \right) + V_{cross}$$

Nestas equações, V representa a energia potencial e os termos V_{str} (*stretching*), V_{bend} (*bending*) e V_{tors} (*torsion*) remetem para os átomos ligados por ligação covalente representando respetivamente: a energia necessária para o estiramento na ligação entre dois átomos (relacionada com a distância entre esses átomos); energia associada à variação do ângulo de ligação (envolve três átomos covalentemente ligados); energia potencial para ângulos diedros (4 átomos adjacentes). Os termos V_{vdw} e V_{elec} (*non-bonded*) remetem para as interações não ligantes entre um átomo i e um átomo j e dizem respeito às contribuições por forças de Van der Waals e electrostáticas, respectivamente. O termo referente à energia de Van der Waals é representado pela fórmula do potencial de Lennard-Jones e o termo referente à energia electrostática é calculado pela equação de Coulomb. V_{hb} representa as interações por pontes de hidrogénio (Nogrody e Weaver, 2005; Tuszynski et al., 2014).

Resumidamente, o que estes processos de DM vão permitir é a mimetização *in silico* de condições *in vitro* e *in vivo*. Ou seja, permitem, por exemplo, que as simulações sejam feitas para diferentes pH, na presença de bicamada lipídica e outros componentes celulares e na presença de moléculas de água e iões, com concentrações iónicas ou de sal diferentes. A incorporação de moléculas de solvente (água) nas simulações efetuadas nesta pesquisa são particularmente importantes, permitindo fazer uma avaliação sobre a influência da água e sais na estabilidade do complexo entre proteína e ligandos (nomeadamente os mais bem classificados nos resultados do *docking*) (Nair e Miners, 2014; Namba et al., 2008).

Antes do processo das simulações, os sistemas devem ser submetidos a uma otimização geométrica (minimização), que vai permitir eliminar maus contactos entre átomos, isto é, encontra um conjunto de coordenadas que minimizam a energia potencial do sistema (forças mais pequenas sobre cada átomo) (Namba et al., 2008).

Nesta pesquisa, depois de obtidos os resultados da energia de ligação dos ligandos testados ao local de ligação (*docking*), foi efetuada uma avaliação da Dinâmica Molecular, nomeadamente para aqueles ligandos que apresentaram melhores resultados, no sentido de perceber o comportamento dinâmico ao longo do tempo (Namba et al., 2008). A evolução dos complexos ao longo do tempo de simulação é um indicador da sua estabilidade e fiabilidade. Estruturas incorretamente ancoradas vão provavelmente produzir trajetórias instáveis, levando ao rebentamento do complexo, enquanto os complexos mais realistas vão produzir um comportamento mais estável (Alonso et al., 2006). Ou seja, este procedimento na presente pesquisa permitiu perceber se, para além de um dado ligando apresentar à partida bom potencial de ligação ao PA (local alvo), se essa ligação se mantinha ao longo do tempo. Esta abordagem do uso do processo de *docking* combinado com a DM, pode ser de resto uma solução viável para este tipo de pesquisas.

6.3- *Docking* e Dinâmica Molecular combinados

Os processos de *docking* implicam geralmente um menor esforço económico e são processos mais rápidos. No entanto apresentam desvantagens, como por exemplo o

facto de não permitirem a flexibilidade da proteína, que levam a que não sejam obtidos resultados tão precisos quanto os das simulações de DM. Por outro lado, as simulações de DM são mais demoradas do que os processos de *docking*. Assim, o *docking* pode ser usado numa fase inicial para reduzir possibilidades, nomeadamente a quantidade de ligandos prováveis para um dado recetor e numa fase seguinte, esses ligandos são sujeitos a um processo mais complexo de simulação de DM que explora conformações do recetor, otimiza as estruturas dos complexos finais e calcula energias de forma mais precisa (Alonso et al., 2006).

No final de um processo deste tipo, é gerada uma grande variedade de resultados que pode ser seleccionada e tratada da forma mais conveniente de maneira a permitir tirar as conclusões que se objetivavam para a pesquisa em curso.

VII- RESULTADOS

7.1 - Introdução

Os dados obtidos nesta pesquisa passam pelos resultados do processo de *docking* (energia de ligação dos complexos ligando-proteína) para todas as moléculas criadas a partir dos ligandos designados como 01 e 17 (**Anexos 10.5 e 10.6**). A partir desses resultados, foi possível seleccionar as moléculas que indicavam uma melhor ligação. Para essas moléculas foi efetuada uma simulação de dinâmica molecular, que permitiu fundamentalmente obter dados mais detalhados quanto àquelas ligações, os aminoácidos e resíduos envolvidos nessas ligações e o comportamento dos complexos em geral ao longo do tempo. No **Anexo 10.1** é possível consultar também os dados extraídos das simulações de DM, para a frequência de ligação dos resíduos da proteína alvo ao longo da simulação. Isto é, para cada um desses resíduos e numa escala temporal que é dividida em blocos de 40 subunidades de 25ps (40x25ps), é dado o número de ciclos em que se verificou a ocorrência de interações. Isto permite ter uma percepção de quais os resíduos/aminoácidos mais associados ao estabelecimento de interações e a representação gráfica possibilita também uma perspetiva do seu perfil de ligação no decorrer da simulação. Poderão assim observar-se resíduos com perfil de interação mais estável ao longo do tempo e também resíduos que têm um

comportamento inconstante, apresentando quebras momentâneas ou progressivas ou pelo contrário um progressivo aumento ao longo da simulação. Perfis inconstantes, com quebras significativas ou que apenas demonstrem um bom perfil de interação num curto período de tempo de simulação, serão pouco interessantes para a pesquisa em curso. Pelo contrário, resíduos com bons perfis de interação, com poucas oscilações, são objeto de foco nesta pesquisa. Pode inclusive fazer-se uma relação desses resíduos para todas as moléculas pesquisadas verificando-se quais os que se repetem nas diferentes moléculas, podendo dar também uma ideia dos locais da proteína mais relevantes para estas ligações.

Foi ainda possível analisar, a partir dos resultados das simulações de DM, as distâncias para algumas ligações de interesse, diferentes energias correspondentes ao complexo e desvios nas conformações (relativamente à conformação inicial).

7.1.1 – Distâncias

Após a análise dos contactos estabelecidos pelos resíduos de aminoácidos da proteína alvo e identificar aqueles que mais estabilidade apresentam nas suas interações, pode fazer-se também a análise do tipo dessas interações. Essa análise pode ser feita primariamente pela análise de várias imagens (*snapshots*) do complexo correspondentes a diferentes momentos da simulação uma vez que a conformação do complexo se pode alterar ao longo da simulação. No entanto, para resultados mais detalhados, pode avaliar-se as distâncias entre os pares de átomos selecionados.

As distâncias selecionadas para análise nesta pesquisa serviram para pesquisar a proximidade de pares de átomos identificados como potenciais dadores e aceitadores em interações do tipo ponte de hidrogénio. As pontes de hidrogénio são um tipo de ligação muito forte- exceto se comparadas com as ligações covalentes- (energia média de ligação até 40 KJ/mol) que ocorre entre um átomo de hidrogénio numa ligação polar (como por exemplo N-H, O-H ou F-H) e um átomo eletronegativo. Têm, por isso, uma grande influência na estrutura e nas propriedades de muitos compostos (Chang e Cruickshank, 2005). Estão nomeadamente envolvidas em fenómenos como a formação e estabilização de estruturas secundárias, enovelamento de proteínas e a sua

estabilidade, reconhecimento molecular, ligação de fármacos e reações enzimáticas que envolvam transferência de prótons (Fabiola et al., 2001). Moléculas com maior número de pontes de hidrogénio demonstrarão maior hidrossolubilidade (Lodish et al., 2000).

Nessa análise pode perceber-se a variação das distâncias entre esses átomos ao longo do tempo de simulação. É considerado como um limite aceitável para o estabelecimento de ponte de hidrogénio uma distância de 3,5Å (Fabiola et al., 2002). Uma vez que ao longo da simulação os complexos não se mantêm absolutamente estáveis, pode fazer-se uma avaliação no sentido de verificar quais as ligações que apresentam uma maior percentagem de resultados (distâncias) abaixo dos 3,5Å. Os resultados mais relevantes serão analisados mais à frente.

7.1.2 – Desvios Geométricos Relativos à Estrutura Inicial

Quanto aos desvios, estão relacionados com o facto de que, tal como estas simulações vêm demonstrar, a conformação inicial que se obtém através do processo de *docking*, não corresponde exatamente à ‘realidade’ uma vez que essa conformação sofre alterações ao longo do tempo (mais ou menos significativas), decorrentes de fatores como as interações entre a proteína, ligando e o próprio meio em que se encontram. Os diversos resultados encontrados nas simulações de dinâmica molecular de cada um dos ligandos testados evidenciam isso mesmo. Se se fizer a sobreposição de duas das imagens resultantes da simulação, correspondentes a momentos diferentes da mesma é possível identificar diferenças entre as duas conformações, que podem ser mais ou menos significativas

A avaliação destes desvios pode fazer-se através dos valores de RMSD (*Root-Mean-Square Deviation*). O RMSD diz respeito ao desvio da raiz média quadrática e permite fazer a comparação entre estruturas. Ou seja, o RMSD é o valor que traduz a distância entre átomos equivalentes de duas estruturas sobrepostas. Neste caso, permite comparar duas conformações resultantes da simulação de DM para dois momentos diferentes, dando ideia dos desvios que possam ter ocorrido na estrutura tridimensional no intervalo de tempo correspondente. Um RMSD igual a zero, significa que as estruturas comparadas são idênticas e à medida que esse valor aumenta, maior é a diferença entre

essas estruturas, ou seja, significa que há maior desvio relativamente à estrutura inicial (Carugo e Pongor, 2001). A ocorrência de grandes desvios ao longo das simulações relativamente à estrutura inicial, indiciam interações menos estáveis na formação do complexo. Os valores de RMSD serão calculados relativamente aos carbonos alfa, cadeia principal e a todos os átomos pesados (não-hidrogénios) e serão naturalmente tanto maiores quanto mais átomos forem incluídos na comparação.

O RMSD entre duas estruturas vai estar dependente do tamanho da molécula, a sua flexibilidade e as condições da simulação (Lyman e Zuckerman, 2006).

7.2 – Análise de Resultados

Os resultados do processo de docking e das dinâmicas moleculares podem ser consultados nos anexos e nos próximos subcapítulos. Foram sujeitos ao processo de *docking* 285 moléculas formadas a partir do ligando 17 e 78 moléculas formadas a partir do ligando 01 (**Anexos 10.5 e 10.6**). De acordo com as melhores energias de ligação obtidas, focou-se a pesquisa sobre as moléculas referenciadas como 17_061 (11,3 Kcal/mol), 17_275 (10,9 Kcal/mol), 17_239 (10,8 Kcal/mol), 17_222 (10,8 Kcal/mol), 01_068 (10,9 Kcal/mol) e 01_067 (10,8 Kcal/mol), cujas estruturas podem ser observadas na **Figura 17**.

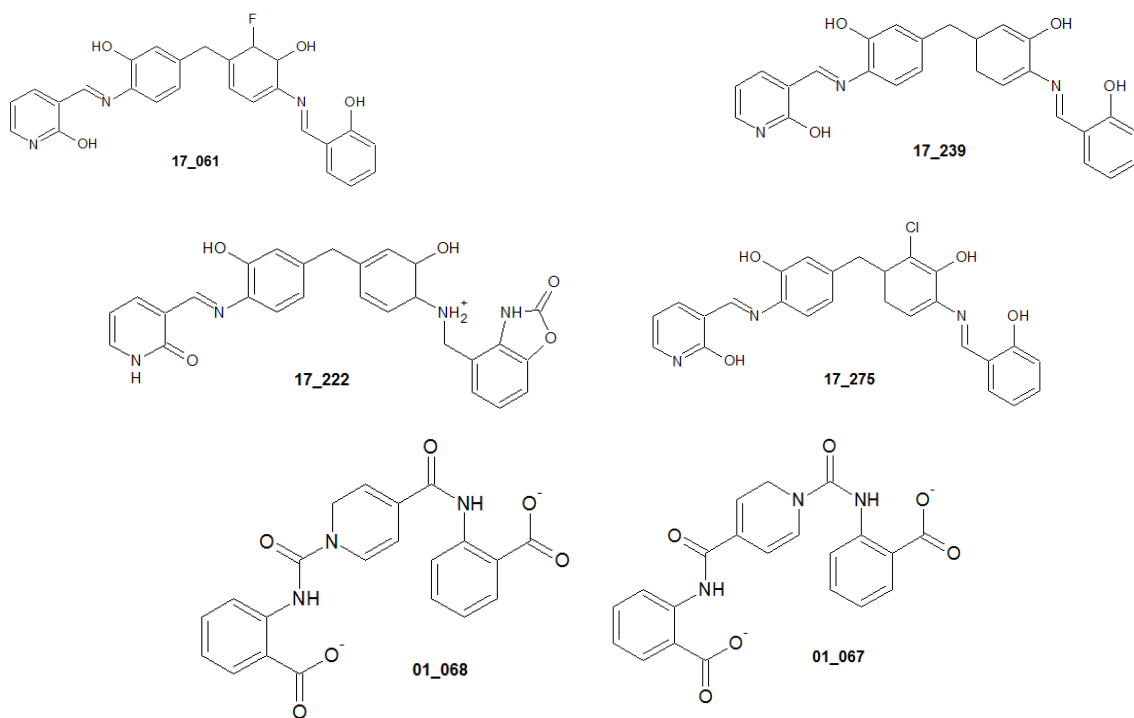
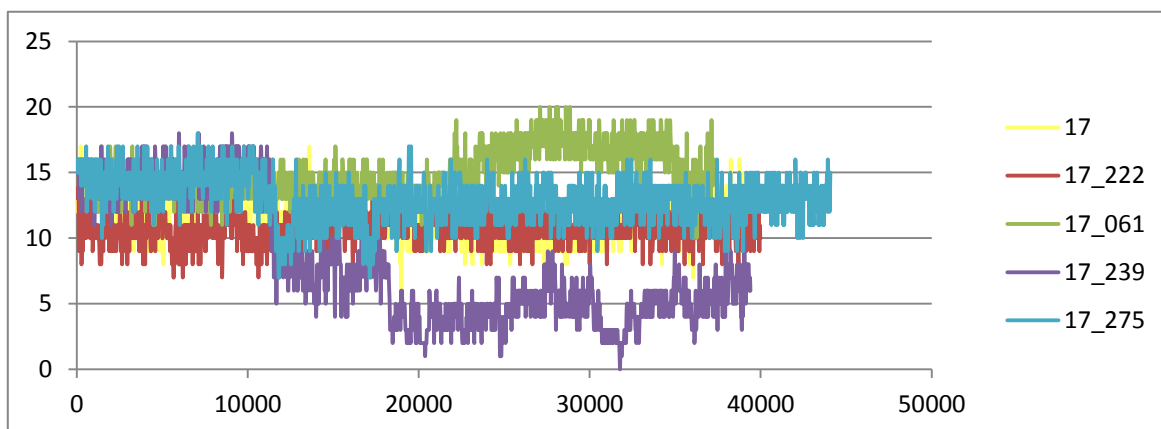


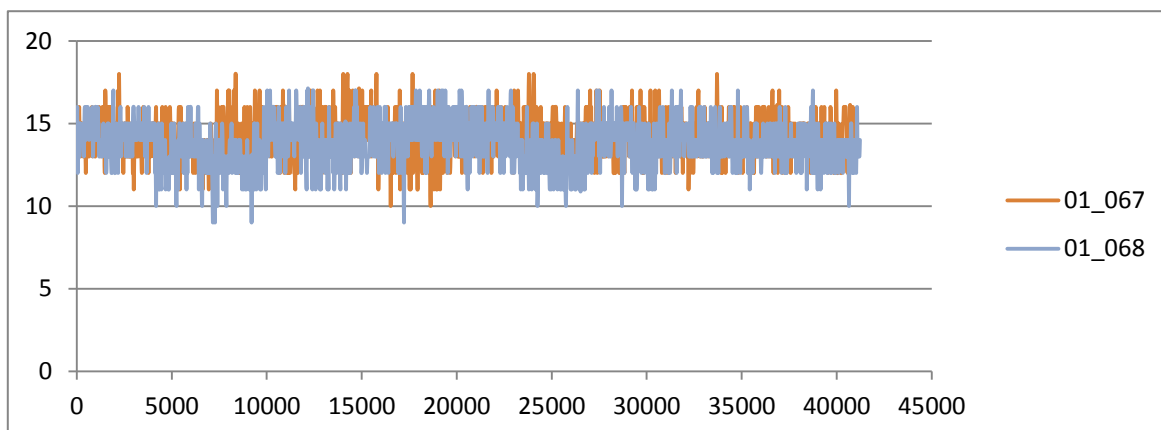
Figura 17. Estruturas das moléculas selecionadas, após o *docking*, para o procedimento de dinâmica molecular

Foram também sujeitos a este processo os ligandos originais (**Figura 15**), sendo que o ligando 17 apresentou uma energia de ligação de 8,2 Kcal/mol e o ligando 01 de 9,1 Kcal/mol.

Todos estes potenciais ligandos foram depois sujeitos a uma simulação de DM. Um dos dados retirados deste processo pode ser observado na **Figura 18** e diz respeito à quantidade de contactos estabelecidos pelos complexos formados entre aquelas moléculas e a proteína alvo, ao longo do tempo de simulação.



A.



B.

Figura 18. Número de Contactos vs Tempo [ps]. Contactos estabelecidos por cada uma das moléculas sujeitas ao processo de DM, ao longo do tempo de simulação.

Estes gráficos permitem uma rápida comparação entre os perfis de ligação para esses complexos. Relativamente à molécula 17, que deu origem à maioria das moléculas pesquisadas neste trabalho, é importante que se estabeleçam alguns pontos de comparação, já que o objetivo é que estas tragam melhorias em relação à molécula original. Neste sentido, observando a **Figura 18** é desde logo possível verificar que todas as moléculas apresentam um perfil de contactos semelhante ou melhor do que a molécula 17, à exceção da molécula 17_239. Para esta, os resultados demonstram que não será uma molécula com interesse uma vez que a ligação rapidamente é quebrada. Ainda em relação à molécula 17, apesar de no trabalho de Wein et al. (2012) ser referido o estabelecimento de algumas pontes de hidrogénio, nomeadamente com os resíduos 157, 158, 475, e 483, nesta pesquisa não se encontrou para qualquer um desses resíduos uma interação suficientemente forte ou estável (resultados para esta molécula não serão analisados de forma individual mas poderão ser consultados no **Anexo 10.4**).

Estes e outros resultados serão analisados individualmente nos próximos subcapítulos, para cada uma das moléculas em estudo.

A análise dos contactos pode ainda ser feita na perspectiva dos resíduos dos aminoácidos envolvidos, como será demonstrado nos próximos capítulos para os resíduos mais relevantes (e no **Anexo 10.1**, para uma maior quantidade de resíduos). Isto permite então destacar os resíduos mais relevantes para essas interações (**Anexo 10.2**) para cada uma das moléculas sujeitas à simulação. A comparação pode ser feita entre essas moléculas como demonstrado no **Anexo 10.3**, que consiste num resumo dos resíduos que estabelecem interações com todas as moléculas que foram sujeitas à simulação de DM e as que estão envolvidas em interações com 3, 4, 5 e 6 dessas 7 moléculas. Destacam-se assim a Lisina 157, Glutamina 158, Lisina 159, Triptofano 226, Prolina 232, Treonina 461 e Valina 480, por estabelecerem contactos com todas as moléculas.

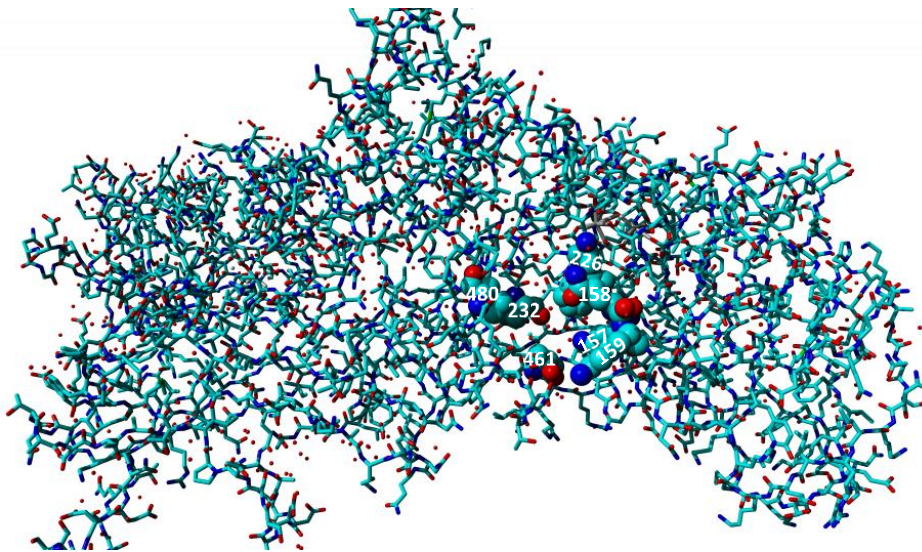


Figura 19. Estrutura do PA do Antrax (3TEW), com destaque para os resíduos 157, 158, 159, 226, 232, 461 e 480. As esferas destacam os resíduos que estabelecem interações mais estáveis com todas as moléculas sujeitas à simulação de DM.

7.2.1 - Molécula 17_061

A análise dos resultados da simulação de DM para as interações entre os ligandos e proteína, permite perceber o comportamento das moléculas ao longo do tempo de

simulação. Os resultados para esta molécula estão representados na **Figura 20** e demonstram um perfil em termos de interações melhor do que o apresentado pelo complexo formado com o ligando original (17) ao longo de toda a simulação, com destaque para depois de cerca de 23000ps, em que ocorre um aumento do número médio de interações. Esse número médio de interações é então de cerca de 14 contactos até esse momento e 16,5 no restante tempo.

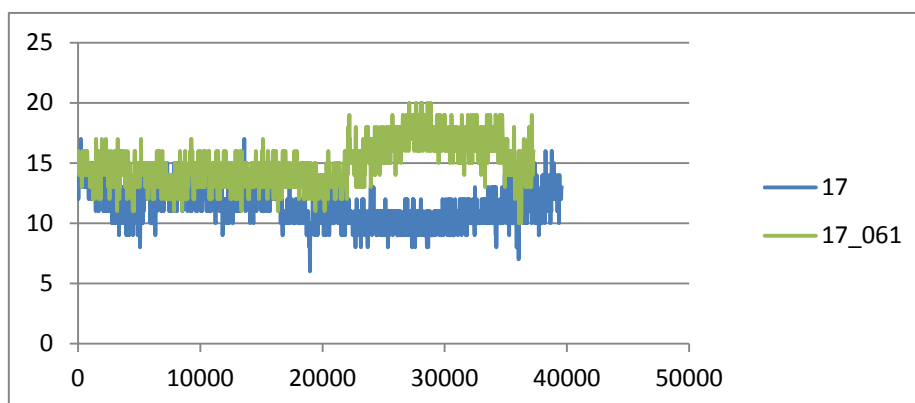


Figura 20. Número de Contactos vs Tempo [ps], para as moléculas 17 e 17_061. Contactos estabelecidos pelas moléculas, ao longo do tempo de simulação

Esta análise também pode ser feita em relação a cada um dos resíduos dos aminoácidos. Neste sentido, analisando a **Figura 21 (A.)** pode por exemplo perceber-se que ao momento identificado anteriormente com a subida do número de interações, corresponde sensivelmente o momento em que ocorre um aumento de interações com os resíduos Glu224, Ile459, Asp472, Ser475 e Gln483. Por outro lado, os resíduos da proteína que apresentam perfis de interação mais constantes (**Figura 21 B.**) são os resíduos Lys157, Lys225, Trp226 e Ser227 e Thr461. O resíduo Asp231 merece também destaque (**Figura 21 C.**), apresentando apenas uma quebra um pouco mais acentuada após cerca de metade da simulação à semelhança do que ocorre com o resíduo Gln158. O resíduo Asn463, assim como a Val480, embora apresentem um perfil menos constante, mantêm uma quantidade significativa de contactos ao longo da simulação. O resíduo Lys159 apresenta um perfil também moderadamente instável e uma quebra no número de contactos um pouco mais precoce do que os outros resíduos. Os restantes apresentaram perfis mais inconstantes e com maiores quebras nas interações.

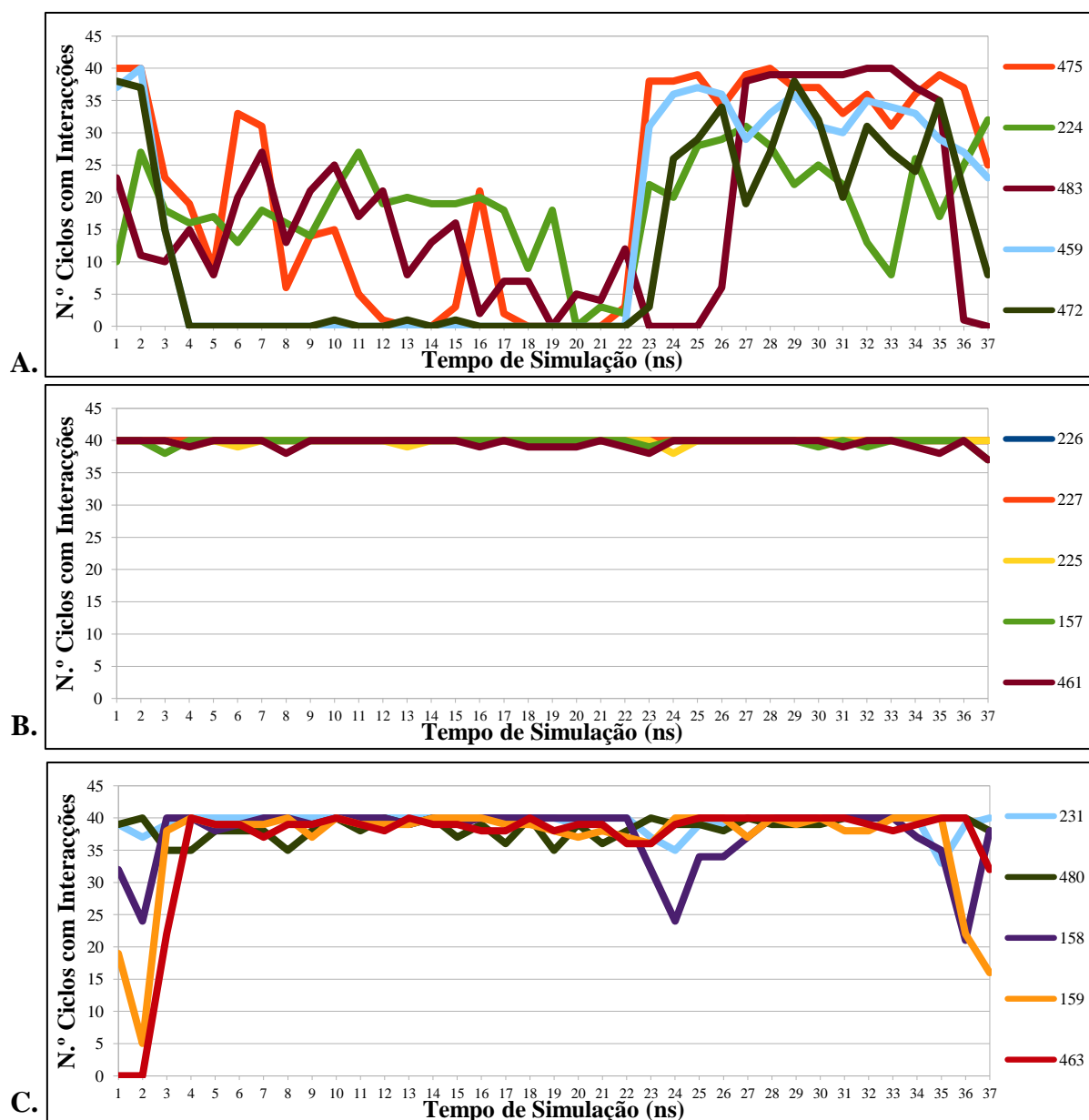


Figura 21. Contactos estabelecidos por resíduos de aminoácidos e a molécula 17_061 ao longo da simulação.

Identificados os resíduos com melhores perfis de interação pode ainda ser feita a abordagem ao tipo de interação. Neste sentido, foram analisadas imagens do complexo (proteína-ligando) extraídas em diferentes fases da simulação para identificar, dentro daqueles resíduos, quais os que têm potencialidade para formar pontes de hidrogénio. Na análise das distâncias entre esses pares de átomos pode considerar-se a média de distâncias (tendo em conta que nos primeiros cerca de 500ps há um período de estabilização da simulação) e o respetivo desvio padrão e também as percentagem de resultados abaixo dos 3,5Å obtida para cada uma das potenciais ligações. Para a análise de dados foi estabelecida uma ordem decrescente de percentagens de resultados abaixo dos 3,5Å, tendo-se destacado as seguintes ligações:

	17_061			
	O11111-HN Ser227	N11106-HN Trp226	H11096-O Ser230	HO11096-HN Asp231
Média	2.075	2.335	3.216	3.562
Média, após 500ps	2.074	2.336	3.210	3.562
D.Padrão, após 500ps	0.175	0.278	0.443	0.409
% abaixo 3.5A	99.87	99.87	74.73	45.17

Tabela 1. Valores médios, desvio padrão e percentagem de distâncias inferiores a 3,5Å, das melhores ligações pesquisadas, por ordem decrescente dessas percentagens, para a molécula 17_061

Verifica-se então que para as duas primeiras ligações da tabela, a sua distância média é inferior a 3,5Å quase na totalidade da simulação, com um desvio padrão reduzido. A terceira ligação da tabela (**H11096-O Ser 230**), embora tenha também uma grande percentagem de resultados de distâncias abaixo dos 3,5Å, já apresenta maiores desvios com uma média de cerca de $3,2 \pm 0,4 \text{Å}$. Isto significa que o intervalo de distâncias entre os átomos desta ligação, tem um valor máximo de 3,6Å, um pouco superior aos limites considerados razoáveis para o estabelecimento de pontes de hidrogénio. Por fim, os átomos da ligação **HO11096-HN Asp 231** apresentam uma distância média um pouco superior aos 3,5Å, com um desvio padrão também considerável. A percentagem de resultados abaixo dos 3,5Å é inferior a 50%, o que reforça a ideia de que o estabelecimento desta interação não é muito favorável. Tudo isto é perceptível na **Figura 22**, em que as duas primeiras ligações são visivelmente mais estáveis e com distâncias inferiores e as duas últimas já apresentam maiores oscilações e distâncias.

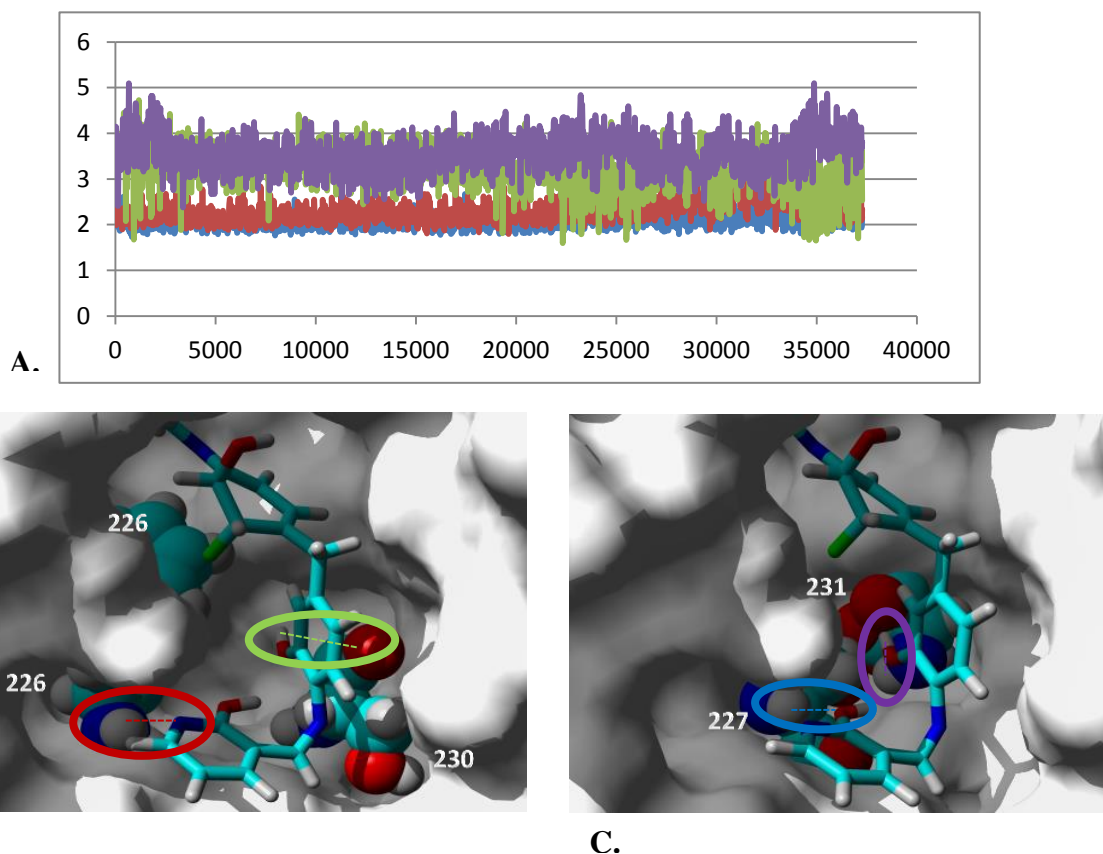


Figura 22. Distâncias (A) entre os pares de átomos [N11106-HN Trp226], [H11096-O Ser230] (B) e [O11111-HN Ser227] e [HO11096-HN Asp231] (C) ao longo da simulação, para a molécula 17_061. Imagens retiradas aleatoriamente de um momento da simulação de dinâmica molecular (cerca de 10000ps); [N11106-HN Trp226] a vermelho, [H11096-O Ser230] a verde e [O11111-HN Ser227] a azul e [HO11096-HN Asp231] a roxo.

Os valores médios dos RMSD's para esta molécula são dos maiores, comparativamente com as outras moléculas em estudo. A **Figura 23** permite fazer essa comparação, relativamente aos valores de RMSD para os carbonos alfa de todas as moléculas deixando perceber que embora outras moléculas alcancem em alguns momentos valores superiores aos alcançados pela molécula 17_061, esta mantém-se consistentemente com valores elevados de RMSD ao longo da simulação.

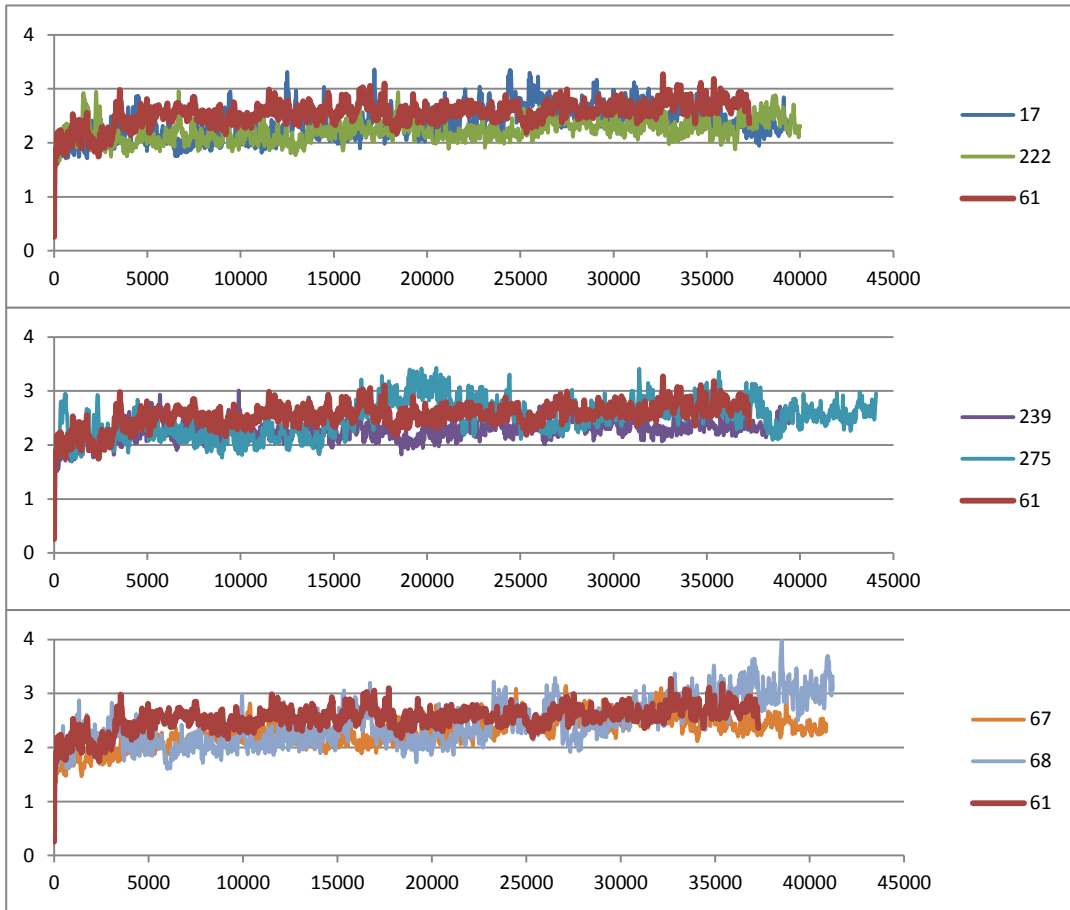


Figura 23. RMSD dos carbonos alfa ao longo do tempo de simulação [ps]. RMSD dos carbonos alfa para os complexos formados com todas as moléculas sujeitas à simulação de dinâmica molecular.

Analisando a **Figura 24**, verifica-se também que embora não seja uma subida abrupta, todos os valores de RMSD para esta molécula vão aumentando ao longo do tempo. Isto indicia que há alguma variabilidade do complexo ao longo da simulação, mas que não se traduz numa significativa instabilidade.

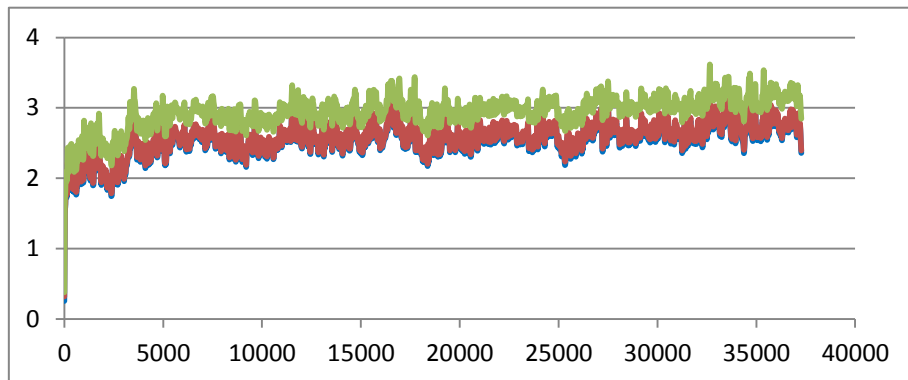


Figura 24. Valores de RMSD para a molécula 17_061, ao longo da simulação [ps]. Valores de RMSD relativos aos Carbonos α (azul), à cadeia principal (vermelho) e átomos não-hidrogénio (verde), ao longo do tempo de simulação.

Na realidade, voltando à análise que foi feita anteriormente ao número de contactos estabelecidos pelo complexo ao longo do tempo (**Figura 20**), nomeadamente ao aumento no número de contactos por volta dos 23000ps, não se verifica que haja um particular desvio da conformação do sistema nesse momento. Isto significa que não terá sido uma modificação nessa conformação a responsável pelo maior número de contactos estabelecidos.

A molécula 17_061 demonstra então estabelecer uma ligação forte e estável com a proteína alvo, estabelecendo com esta duas pontes de hidrogénio consideradas estáveis.

7.2.2 - Molécula 17_222

Os resultados obtidos, representados no gráfico da **Figura 25** permitiram perceber que o perfil de contactos estabelecido com esta molécula ao longo do tempo de simulação é bastante estável, sendo semelhante ao perfil obtido para a molécula 17.

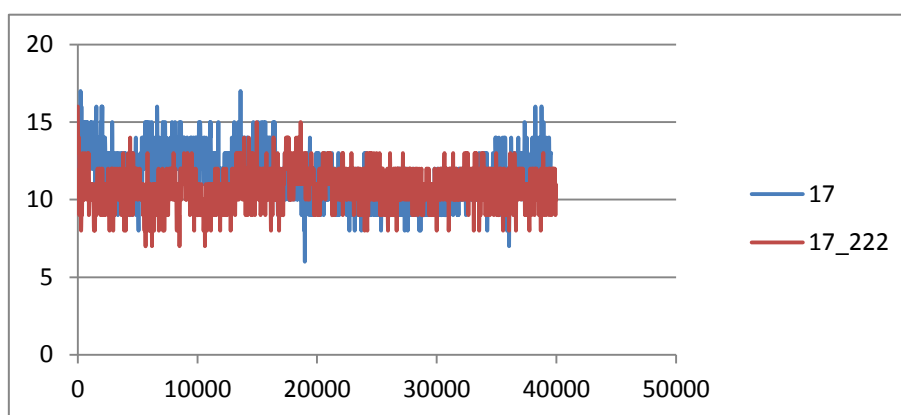


Figura 25. Número de Contactos vs Tempo [ps], para as moléculas 17 e 17_222. Contactos estabelecidos pelas moléculas, ao longo do tempo de simulação.

Calculou-se para o complexo formado com esta molécula, uma média de aproximadamente 11 interações com um desvio padrão de cerca de 1,2 interações, ao longo da simulação.

Em termos de interações com os diferentes resíduos de aminoácidos, os resíduos Gln158, Thr461 e Ser475 são aqueles que demonstram um perfil de interações mais constante. Para além destes, os resíduos Trp226, Pro232 e Val480 também apresentam um bom perfil, com a diferença de apresentarem alguma instabilidade na fase inicial da simulação. Por fim, a Lys157 também pode ser destacado, embora apresente um puko mais de instabilidade ao longo da simulação, comparativamente aos anteriormente mencionados. Os restantes resíduos, embora apresentassem algum envolvimento em interações, são como se pode verificar neste gráfico, muito inconstantes.

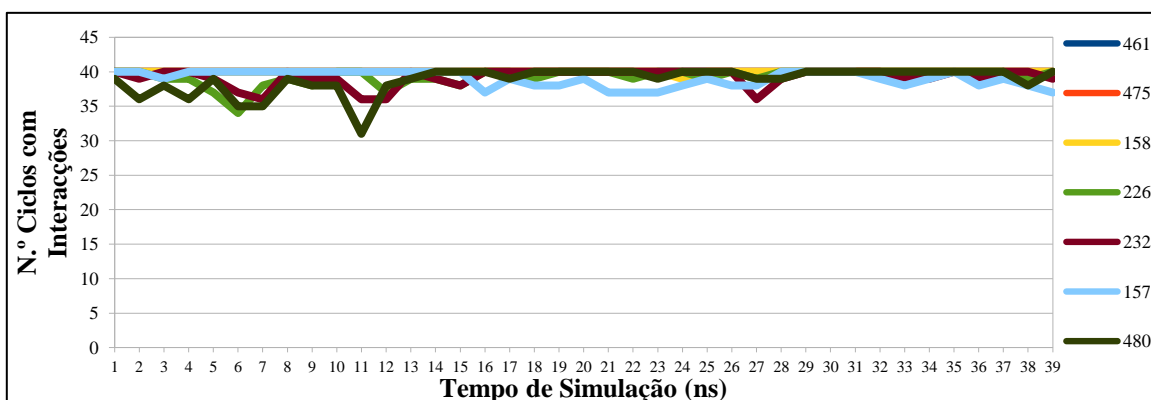


Figura 26. Contactos estabelecidos por resíduos de aminoácidos e a molécula 17_222 ao longo da simulação.

A análise de imagens do complexo (resultantes da simulação de DM), nomeadamente para os resíduos anteriormente mencionados, permitiu a identificação de pares de átomos como potenciais dadores e aceitadores em pontes de hidrogénio. A análise das distâncias para cada par, permite perceber que todos estes pares de átomos apresentam distâncias médias relativamente pequenas, destacando-se:

	17_222			
	H11128-OG1 Thr 461	H11113-OG Ser 475	H11128-OG Ser 475	N11127-HG Ser 475
Média	1.984	2.060	3.171	3.284
Média, após 500ps	1.984	2.061	3.170	3.283
D.Padrão, após 500ps	0.167	0.267	0.379	0.296
% abaixo 3.5	99.88	99.69	81.76	79.89

Tabela 2. Valores médios, desvio padrão e percentagem de distâncias inferiores a 3,5Å, das melhores ligações pesquisadas, por ordem decrescente dessas percentagens, para a molécula 17_222.

Para além das ligações destacadas nesta tabela, outras apresentaram percentagens superiores a 50% de resultados inferiores a 3,5Å, no entanto os desvios padrão calculados demonstram que estavam associadas a maiores oscilações. Como se percebe

também pelo gráfico da **Figura 27**, as duas primeiras ligações da tabela são as que apresentam maior aproximação e maior estabilidade. As restantes ligações, já demonstram maiores oscilações e maior distância, embora se mantenham com valores médios dentro dos considerados aceitáveis para o estabelecimento desta interação.

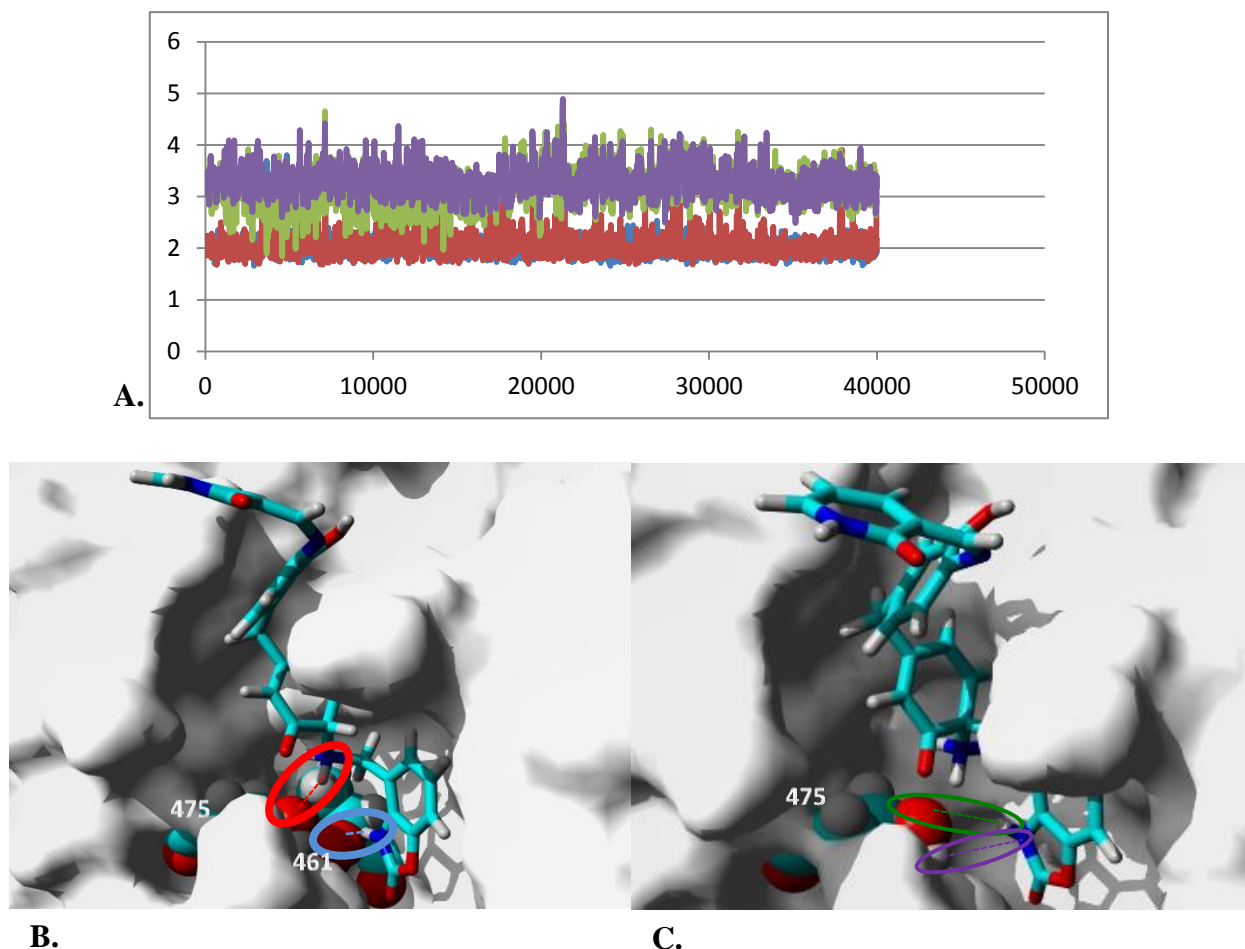


Figura 27. Distâncias (A) entre os pares de átomos [H11128-OG1 Thr461], [H11113-OG Ser475] (B) e [H11128-OG Ser475] e [N11127-HG Ser475] (C) ao longo da simulação, para a molécula 17_222. Imagens retiradas de momentos aleatórios da simulação de dinâmica molecular; [H11128-OG1 Thr461] a azul, [H11113-OG Ser475] a vermelho, [H11128-OG Ser475] a verde e [N11127-HG Ser475] a roxo.

Relativamente aos desvios, esta molécula destacou-se das restantes por apresentar os menores valores médios de RMSD quer relativamente aos carbonos alfa, cadeia principal e átomos pesados, mesmo que não se tratem de diferenças muito substanciais. Este facto é também perceptível no gráfico relativo a estes valores (**Figura 28**).

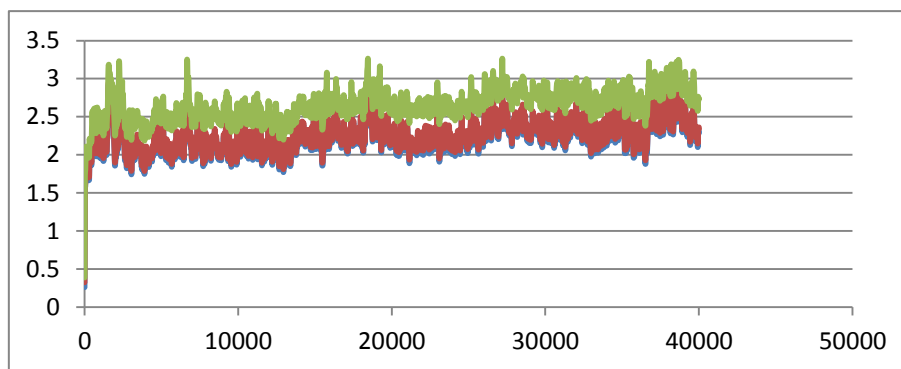


Figura 28. Valores de RMSD para a molécula 17_222, ao longo da simulação. Valores de RMSD relativos aos Carbonos α (azul), à cadeia principal (vermelho) e átomos não-hidrogênio (verde), ao longo do tempo [ps] de simulação.

Estes dados vão de encontro aos anteriormente analisados, indicando que esta molécula forma um complexo estável com a proteína alvo, mesmo que não seja aquela que mais contactos estabelece. Isso mesmo é demonstrado relativamente à molécula 17_061, analisada no capítulo anterior. Relativamente a essa molécula, esta demonstra menor interesse em termos da média de contactos estabelecida ao longo da simulação.

7.2.3 - Molécula 17_239

Uma análise primária aos resultados da DM correspondentes aos contactos estabelecidos pelo complexo (**Figura 29**), permite desde logo perceber que esta molécula se destaca de uma forma negativa, pela instabilidade que demonstra.

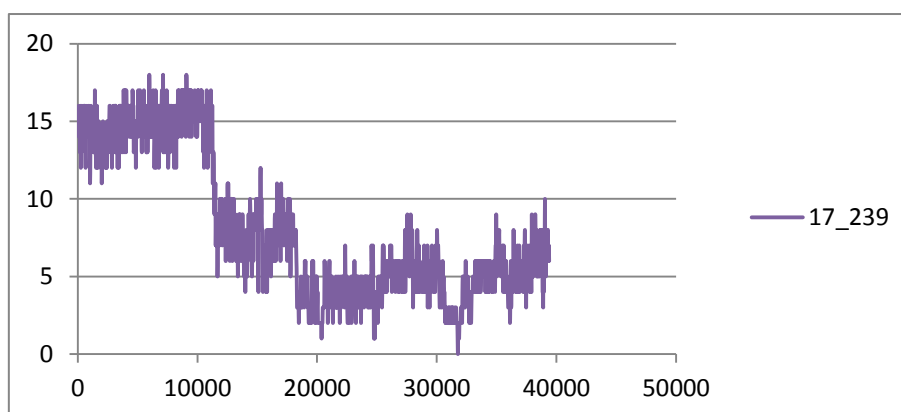


Figura 29. Número de Contactos vs Tempo [ps], para a molécula 17_239. Contactos estabelecidos pelas moléculas, ao longo do tempo de simulação.

Nesse gráfico demonstra-se que o complexo formado com a proteína apresenta inicialmente uma quantidade de contactos significativa, mas que após pouco mais de 10000ps sofrem uma quebra abrupta.

O mesmo foi perceptível pela análise dos resultados relativos aos contactos estabelecidos por cada um dos resíduos de aminoácidos. Com esses dados pode perceber-se que até àquele momento, uma maior quantidade de resíduos de aminoácidos estabelecem um número de contactos significativo (embora muitas vezes não muito estáveis), mas depois desse período de tempo, verifica-se que nenhum dos resíduos estabelece interações minimamente contantes até ao final da mesma. Por outro lado, se se fizer por exemplo a análise da Arginina 167 (**Figura 30**), que foi a que mais vezes demonstrou estabelecer interações ao longo dos ciclos, verifica-se que esta apenas estabelece um perfil de contactos com algum interesse decorrida aproximadamente metade da simulação, embora nunca alcance uma estabilidade nesse perfil. Na realidade, os resíduos Lys157, Gln158, Lys159, Lys225, Trp226, Ser227, Ser230, Asp231, Pro232, Ile459, Thr461, Asp472, Ser475, Val480, e Leu514 estão envolvidos em interações (mais ou menos estáveis) até pouco depois do 10º ciclo (10000ps), sensivelmente. No entanto, após esse período há em geral uma quebra de interações muito significativa. Após essa quebra, alguns resíduos surgem com maior ocorrência de interações, no entanto são interações temporárias, que demonstram grande instabilidade.

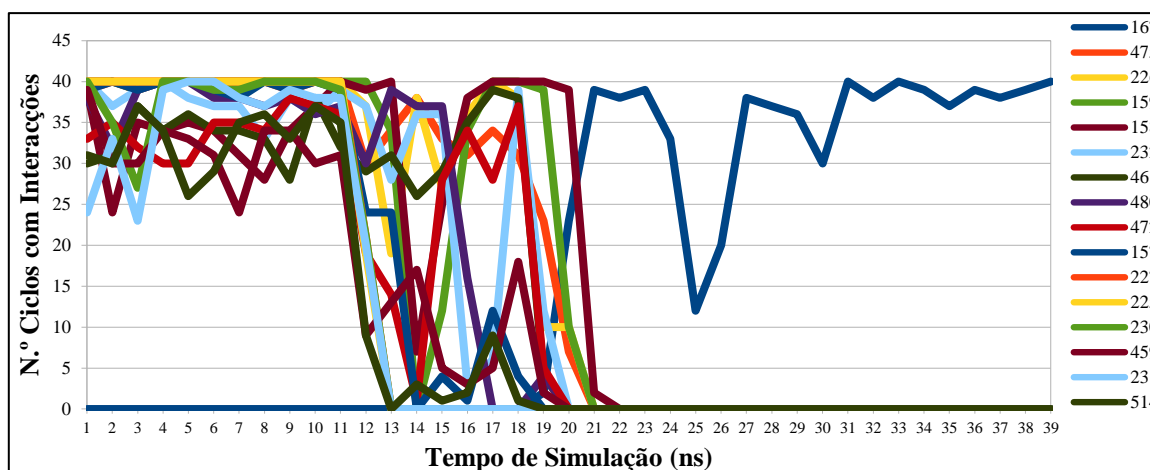


Figura 30. Contactos estabelecidos por resíduos de aminoácidos e a molécula 17_239 ao longo da simulação.

Entende-se então que ao longo da simulação são estabelecidos diversos contactos entre proteína e ligando mas sempre com ligações instáveis, que não se mantêm por muito tempo.

A análise de imagens do complexo no sentido de procurar (tendo em conta os melhores perfis de interação) resíduos com possibilidade de estabelecer pontes de hidrogénio e posteriormente das distâncias entre esses pares de átomos, foram de encontro aos resultados mencionados anteriormente. Não se encontrou para qualquer um destes pares de átomos, uma distância média suficientemente próxima e constante para o estabelecimento de pontes de hidrogénio estáveis. Ou seja, estes pares de átomos só por curtos períodos de tempo conseguiram aproximar-se suficientemente para que esse tipo de interação pudesse estabelecer-se. Todos os pares ficaram a uma distância superior a 3,5Å em mais de 80% da simulação, apresentando desvios padrão muito elevados. De resto, a análise do gráfico correspondente a esses valores na **Figura 31**, é demonstrativa dessa instabilidade. Os painéis **B.** e **C.** desta figura permitem também observar a distância dos resíduos 178 e 174 (esferas no canto superior direito, em **B.**) relativamente à molécula 17_239, num momento mais inicial da simulação e a distância entre esta molécula e o resíduo 475 (esferas à esquerda, em **C.**), após mais de metade da simulação.

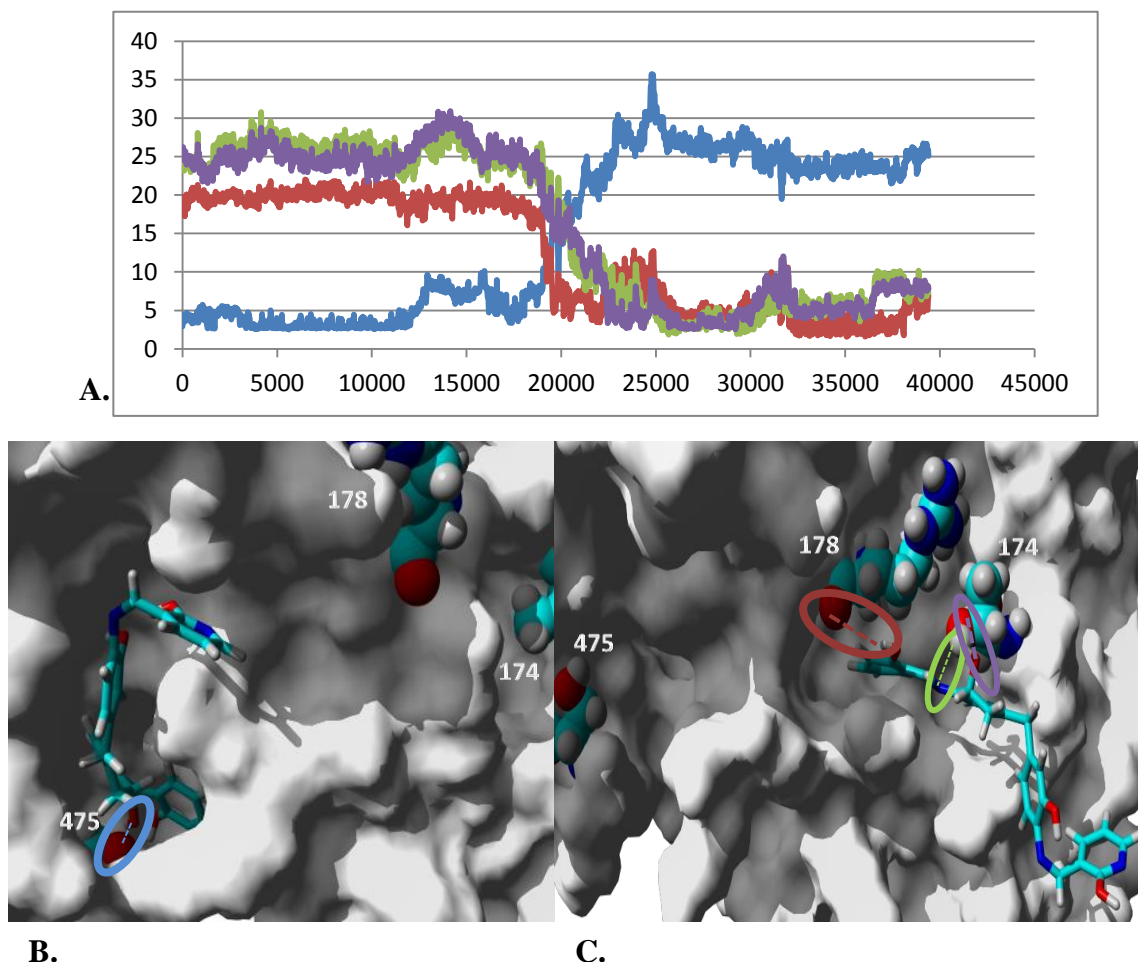


Figura 31. Distâncias (A) entre os pares de átomos [O11074-OG Ser475] (B) e [H11127-O Arg178], [N11113-HG1 Thr174] e [O11074-OG1 Thr174] (C) ao longo da simulação, para a molécula 17_239. Imagens retiradas da simulação de dinâmica molecular antes (B.) e depois (C.) da oscilação visível no gráfico (A.); [O11074-OG Ser475] a azul, [H11127-O Arg178] a vermelho, [N11113-HG1 Thr174] a verde e [O11074-OG1 Thr174] a roxo.

Quanto aos valores médios de RMSD (**Figura 32**) relativamente ao carbono alfa e à cadeia principal, para o complexo formado com esta molécula os valores são dos mais baixos relativamente às outras moléculas. No entanto, no que diz respeito aos resultados para o RMSD relativo aos átomos pesados, este é o complexo que apresentou a média de resultados mais alta.

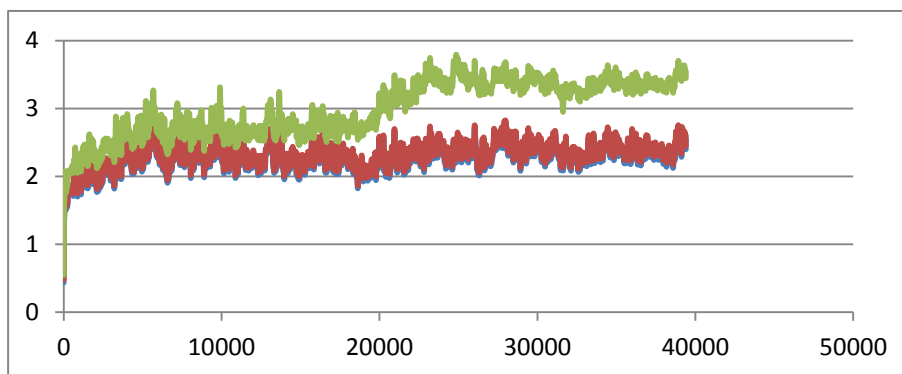


Figura 32. Valores de RMSD para a molécula 17_239, ao longo da simulação. Valores de RMSD relativos aos Carbonos α (azul), à cadeia principal (vermelho) e átomos não-hidrogênio (verde), ao longo do tempo [ps] de simulação.

A análise da estrutura formada entre o PA e esta molécula, ao longo do tempo de simulação, permitiu perceber que esta subida nos valores de RMSD estão associados à grande movimentação da molécula, inclusivamente para fora do centro ativo (entre os resíduos 164-167 e 475-483, como foi anteriormente mencionado). Na **Figura 33** é representado o complexo [17_239-PA] sobreposta em quatro momentos da simulação (no momento inicial e a cerca de 5ns, 20ns e 30ns), com destaque para a movimentação do ligando ocorrida entre esses momentos.

Adicionalmente, é possível observar-se que a estrutura do PA aqui sobreposta, não sofre grandes desvios entre os momentos da simulação analisados, o que vai de encontro com os resultados de RMSD obtidos nomeadamente para os carbonos alfa, representados na forma de fita.

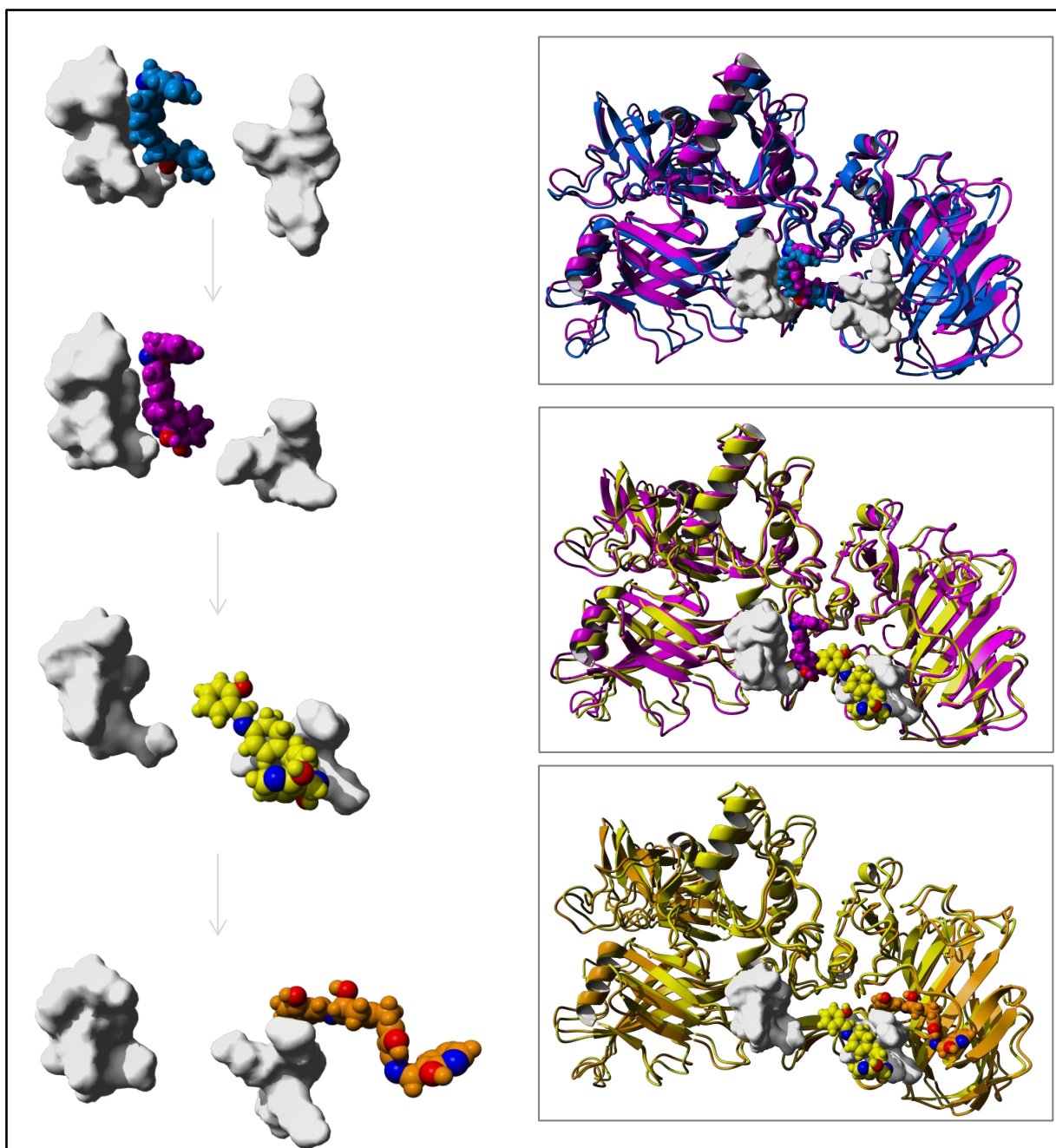


Figura 33. Sobreposição do complexo [17_239-PA] em momentos diferentes da simulação. Representação do PA em fita no início da simulação (azul), aos 5ns (magenta), 20ns (amarelo) e 30ns (laranja); Superfície molecular dos resíduos 164-167 e 475-483 a branco; Molécula 17_239 representada com esferas.

Relativamente às moléculas analisadas anteriormente demonstra-se que a molécula 17_239 é aquela que tem as características de ligação mais desfavoráveis. Dado o perfil demonstrado, esta não será aliás uma molécula a considerar como potencial ligando para o antígeno de proteção (PA) do Antrax.

7.2.4 - Molécula 17_275

Os resultados da DM correspondentes à relação dos contactos estabelecidos pelos complexos formados com esta molécula ao longo do tempo, demonstram que o perfil para esta molécula não é muito diferente do apresentado para molécula 17 (**Figura 34**), apresentando no entanto uma média de resultados superior.

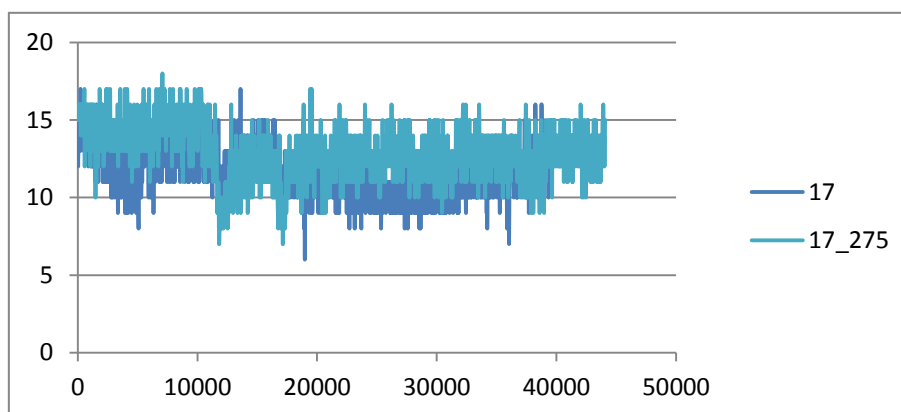


Figura 34. Número de Contactos vs Tempo [ps], para as moléculas 17 e 17_275. Contactos estabelecidos pelas moléculas, ao longo do tempo de simulação.

Os dados relativos aos contactos estabelecidos por cada um dos resíduos de aminoácidos com esta molécula, demonstram que se destacam com um perfil de contactos mais forte e constante (**Figura 35**), os resíduos Lys157 e Lys159. Também os resíduos Pro232, Ser475, Asn476 e Val480, se podem destacar uma vez que acabam por estabelecer uma boa ligação, apesar de isso não acontecer na fase inicial da simulação. Os resíduos Gln158, Thr461 e ainda o Glu479 já apresentam mais alguma instabilidade e quebras mais significativas.

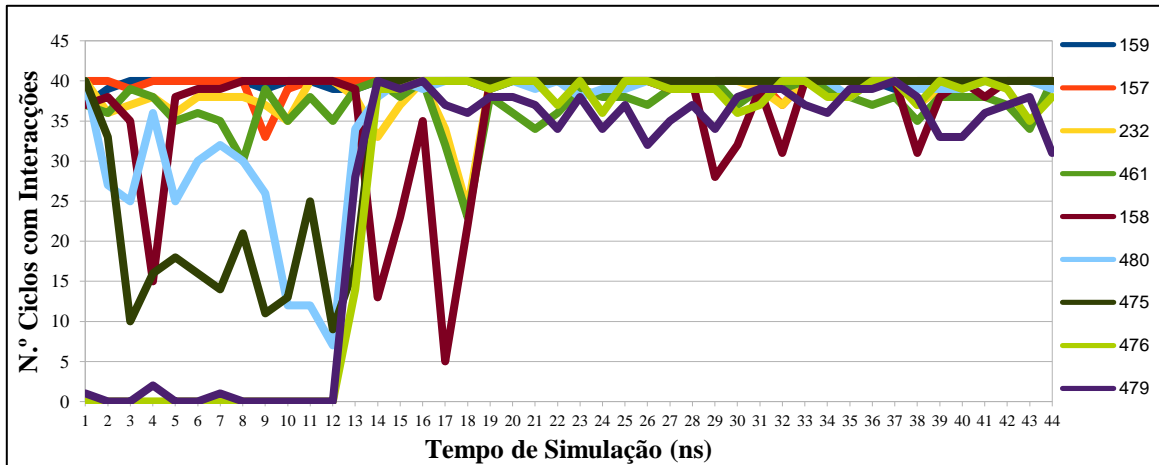


Figura 35. Contactos estabelecidos por resíduos de aminoácidos e a molécula 17_275 ao longo da simulação.

A leitura da **Figura 36** permite ainda verificar que entre os 10ns e 15ns, há uma descida das linhas correspondentes a vários resíduos (225, 226, 227, 230, 231, 459, 472), correspondente também a uma subida por parte de alguns resíduos (161, 475, 476, 479, 480).

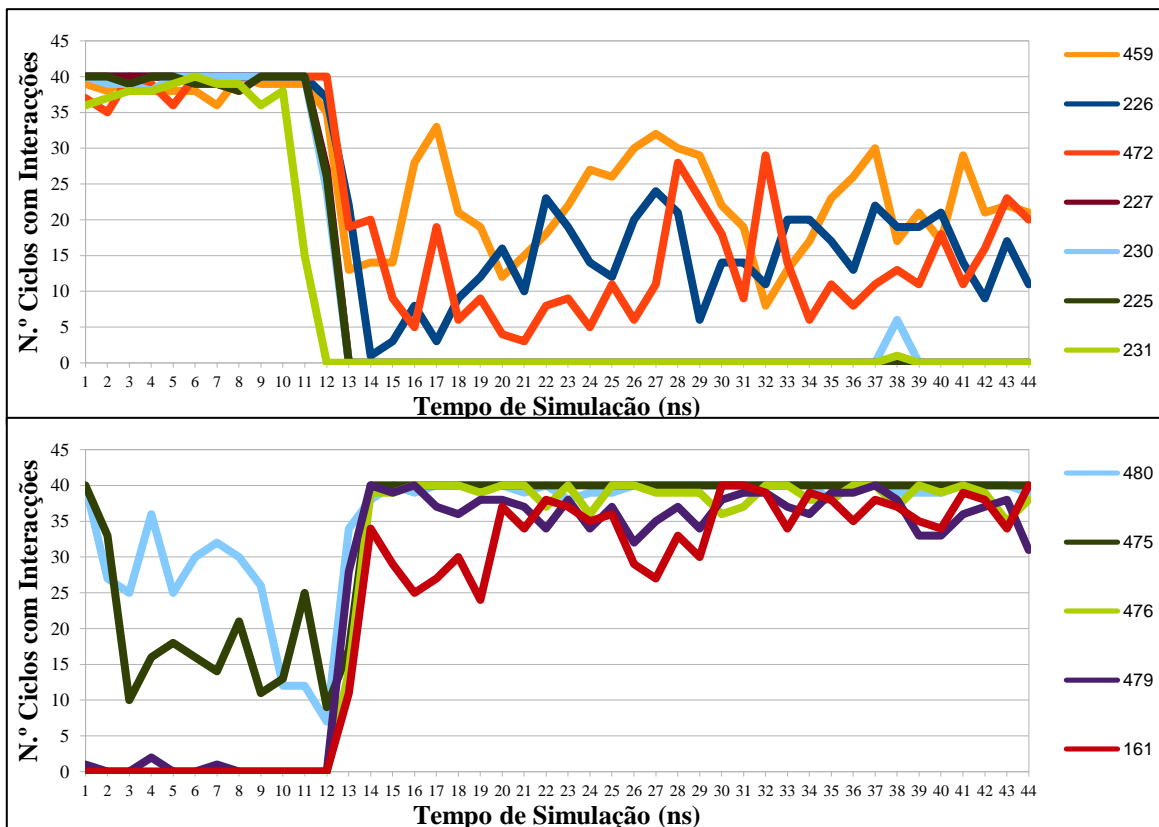


Figura 36. Contactos estabelecidos por resíduos de aminoácidos e a molécula 17_275 ao longo da simulação.

A **Figura 34** demonstrava também uma pequena descida no número de interações para esse período de tempo (um pouco depois dos 10000ps).

Para os contactos destacados, identificaram-se alguns pares de átomos como potenciais dadores e recetores em pontes de hidrogénio e após a análise das distâncias, destacaram-se:

	17_275				
	CL3 11080-HN Gln 158	O11074-OG Ser 475	O11090-NH Asn 476	HO11127-O Ser 160	N11108-HN Trp 226
Média	2.656	3.386	5.776	4.380	9.946
Média, após 500ps	2.630	3.378	5.698	4.313	10.034
D.Padrão, após 500ps	0.635	0.927	3.924	1.821	4.549
% abaixo 3.5	89.74	70.07	57.03	39.85	24.89

Tabela 3. Valores médios, desvio padrão e percentagem de distâncias inferiores a 3,5Å, das melhores ligações pesquisadas, por ordem decrescente dessas percentagens, para a molécula 17_275.

Se se fizer a análise na perspetiva das percentagens de resultados/distâncias inferiores a 3,5Å, existem três ligações com uma percentagem considerável, acima dos 50%. No entanto, analisando os valores das distâncias médias e os respetivos desvios padrão, percebe-se que, à exceção da primeira ligação da tabela (**CL3 11080-HN Gln158**), existe uma grande variabilidade em torno do valor médio. Tendo em conta esses valores, chega-se à conclusão de que o intervalo de distâncias para a ligação **O11074-OG Ser475**, podem ir até um máximo de cerca de 4,3Å, bastante acima dos 3,5Å considerados como limite para o estabelecimento de ponte de hidrogénio. Para a ligação **O11090-NH Asn476** esse máximo chega aos 9,6Å. A primeira ligação da tabela é assim a mais favorável, no sentido em que, para além da percentagem de distâncias abaixo dos 3,5Å ser elevada, o intervalo de distâncias tem um máximo de cerca de 3,3Å.

Se se fizer, no entanto a análise dos resultados na **Figura 37**, percebe-se que três destas ligações sofrem uma alteração abrupta nas distâncias, um pouco depois dos 10000ps. Para a ligação **N11108-HN Trp226**, essa alteração traduz-se num aumento acentuado dessas distâncias, enquanto nas ligações **O11090-NH Asn476** e **HO11127-O Ser160** ocorre o oposto, havendo grande diminuição das distâncias entre os átomos. Isto vai influenciar os valores da distância média assim como do desvio padrão e por essa razão fez-se o cálculo desses valores para estas duas ligações, após 12000ps. Para a ligação **O11090-NH Asn476** o resultado foi de 3,4±0,7Å e para a ligação **HO11127-O Ser160** 3,4±0,8Å. Ora, isto significa que apesar de os intervalos de distâncias ultrapassarem um

pouco, para as duas ligações, os 3,5Å no seu limite máximo, já são valores mais favoráveis à interação.

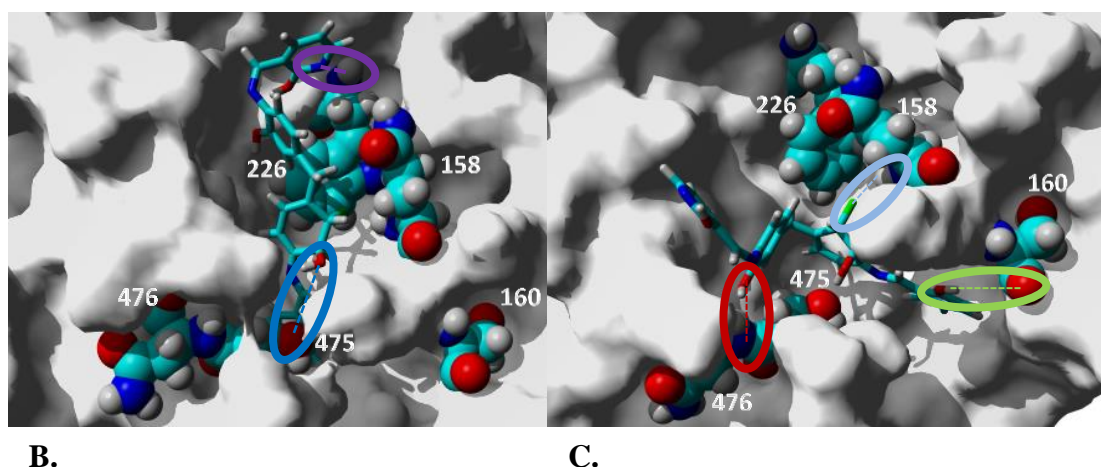
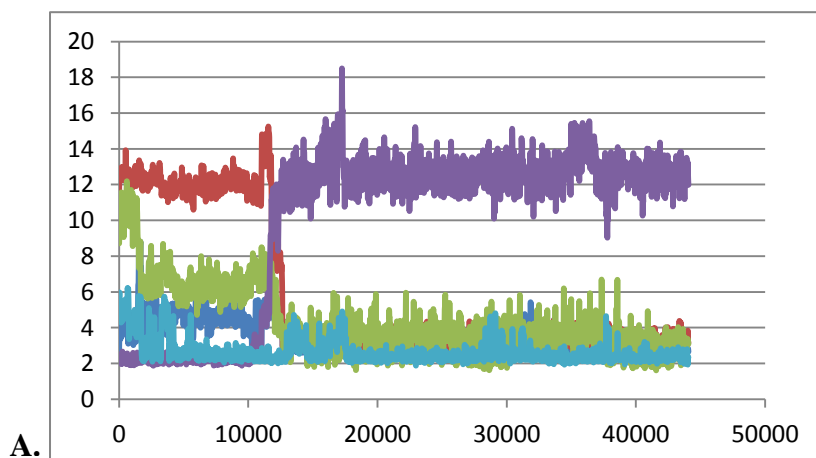


Figura 37. Distâncias (A.) entre os pares de átomos [O11074-OG Ser475], [N11108-HN Trp226] (B) e [Cl3 11080-HN Glu158], [O11090-NH Asn476] e [HO11127-O Ser160] (C) ao longo da simulação, para a molécula 17_275. Imagens retiradas de um momento da simulação de dinâmica molecular anterior aos 12000ps (B.) e posterior a esse momento (C.); [O11074-OG Ser475] a azul escuro, [N11108-HN Trp226] a roxo, [Cl3 11080-HN Glu158] azul claro, [O11090-NH Asn476] a vermelho e [HO11127-O Ser160] a verde.

Um outro aspecto a ter em conta é o tipo de ligação para a qual foi analisada a distância. Ou seja, como pode verificar-se nas ligações **O11074-OG Ser 475** e **O11090-NH Asn 476**, foi avaliada a distância entre dois átomos de oxigénio e entre um átomo de oxigénio e um azoto, respetivamente. No entanto, não são diretamente esses átomos a estabelecer a ponte de hidrogénio mas sim um desses átomos, que será o aceitador e um dos hidrogénios ligados ao outro átomo, que será o dador do protão. Isto significa no fundo que na realidade os átomos envolvidos na ligação, nomeadamente o hidrogénio, estará na realidade um pouco mais próximo do átomo aceitador. Isto não será muito

significativo para a ligação **O11090-NH Asn476**, que tem um valor médio e desvio padrão demasiado elevados. No entanto, para a ligação **O11074-OG Ser475**, pode ter um pouco mais de significado uma vez que o valor médio que foi calculado é um pouco mais baixo, embora ainda assim com oscilações (desvio padrão) demasiado elevadas.

Tendo em conta que anteriormente se verificou que esta molécula estabelecia um número significativo de interações estáveis e uma vez que apenas uma das ligações analisadas apresenta distância e estabilidade significativos para estabelecer ponte de hidrogénio, a interação desta molécula com a proteína alvo dever-se-á a outro tipo de interações.

Adicionalmente, os resultados de RMSD permitem perceber que embora não tenha apresentado os maiores valores médios relativamente às outras moléculas em estudo, é ainda assim uma das que apresenta valores mais elevados. Analisando o gráfico relativo a estes resultados (**Figura 38**), percebe-se que o complexo formado com esta molécula apresenta oscilações marcadas, nomeadamente um aumento entre os 16000ps e 26000ps, sensivelmente. Esta subida nos valores de RMSD não parece estar associado a qualquer oscilação nos contactos analisados anteriormente pelo que se poderá dever por exemplo a rotações que não se traduzem em modificações significativas nas interações estabelecidas.

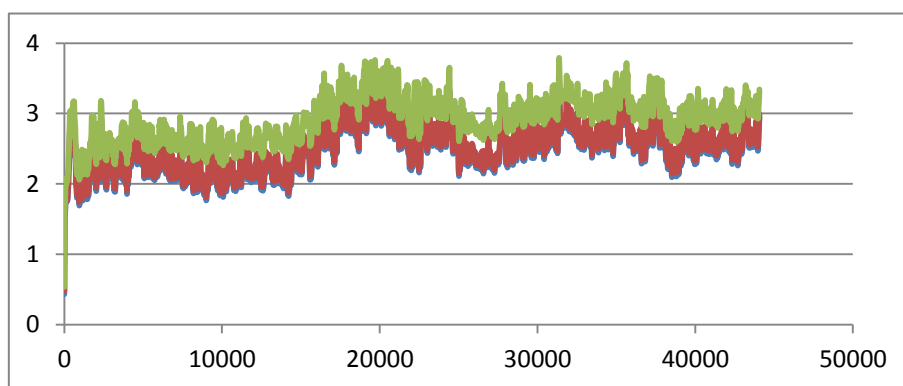


Figura 38. Valores de RMSD para a molécula 17_275, ao longo da simulação. Valores de RMSD relativos aos Carbonos α (azul), à cadeia principal (vermelho) e átomos não-hidrogénio (verde), ao longo do tempo [ps] de simulação.

Relativamente às moléculas analisadas anteriormente, nomeadamente à molécula 17_222, demonstrou-se que o perfil de contactos estabelecidos ao longo do tempo de

ambas é semelhante ao da molécula 17. O que as poderá distinguir é, por exemplo, o tipo de contactos estabelecidos. Ou seja, no que diz respeito às pontes de hidrogénio estabelecidas, a molécula 17_222 apresentava menos oscilações nessas interações, estabelecendo um maior número de pontes de hidrogénio consideradas estáveis.

7.2.5 - Molécula 01_067

Os resultados da simulação de DM permitiram perceber que esta é a segunda molécula com melhor média de resultados, depois da molécula 17_061. A representação gráfica desses resultados na **Figura 39**, demonstra que o perfil para estas duas moléculas é bastante semelhante (sensivelmente entre os 12 e os 16 contactos por intervalo de 25ps) até cerca dos 22000ps, momento em que a molécula 17_061 apresenta um aumento desses contactos. Trata-se então de uma molécula com um perfil de interações estável, sem grandes variações.

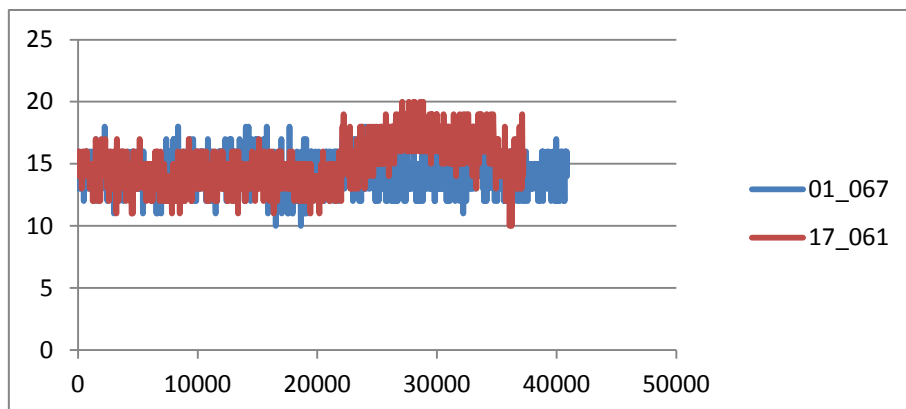


Figura 39. Número de Contactos vs Tempo [ps], para as moléculas 01_067 e 01_061. Contactos estabelecidos pelas moléculas, ao longo do tempo de simulação

Analisando os contactos na perspectiva dos diferentes resíduos de aminoácidos envolvido, percebe-se que à semelhança do que ocorreu com a molécula 17_222, esta também não apresentou as quebras acentuadas observadas nas restantes moléculas, no final da simulação, isto é, no final da simulação, mantinham-se as interações (**Figura 40**). Os resíduos de aminoácidos que se destacaram foram o Lys157, Lys159, Lys225, Trp226, Ser227, Pro232, e Val480, por terem um bom perfil de contactos que se mantém constante ao longo da simulação. Para além destes, os aminoácidos Gln158, Ser230 e Gln483 apresentam perfis interessantes, embora apresentem um pequeno

período de quebra a certo ponto da simulação. Também o Thr461 e Leu514 apresentam um perfil relativamente bom, embora menos constantes.

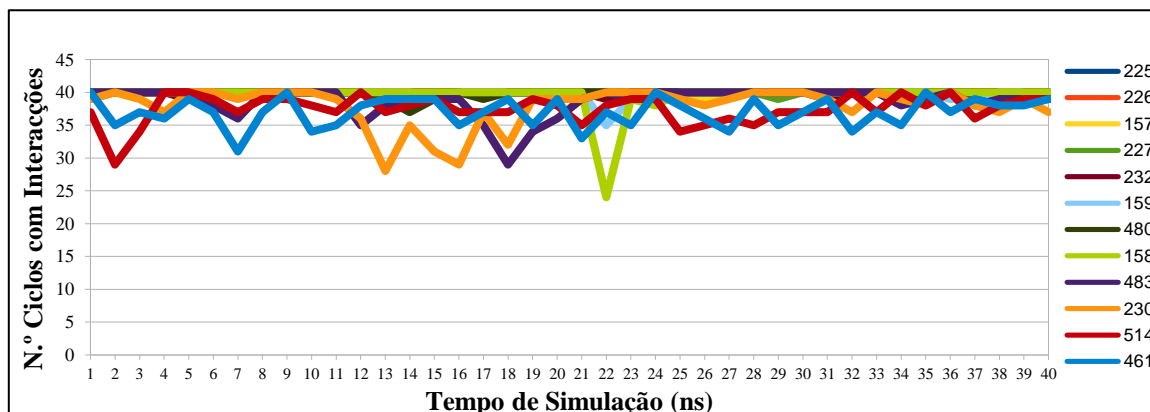


Figura 40. Contactos estabelecidos por resíduos de aminoácidos e a molécula 01_067 ao longo da simulação.

Os restantes resíduos apresentaram perfil de ligação muito inconstante ou ausência de interação. Esta foi a molécula que mais contactos (com bom perfil) estabeleceu com resíduos de aminoácidos da proteína alvo.

Tendo em conta os resíduos com melhor perfil, identificaram-se alguns de pares de átomos com potencial de formar pontes de hidrogénio. Na análise das distâncias entre esses átomos, destacaram-se pela maior percentagem de resultados abaixo dos 3,5Å:

	01_067				
	O11091-HN Trp226	C11089-HN Ser227	C11106-HN Gln158	C11106-HN Lys159	C11089-HN Trp226
Média	2.176	2.641	2.881	3.119	3.158
Média, após 500ps	2.176	2.642	2.882	3.123	3.157
D.Padrão, após 500ps	0.298	0.239	0.268	0.366	0.409
% abaixo 3.5	100.00	99.82	97.92	88.88	77.75

Tabela 4. Valores médios, desvio padrão e percentagem de distâncias inferiores a 3,5Å, das melhores ligações pesquisadas, por ordem decrescente dessas percentagens, para a molécula 01_067

Para além das altas percentagens de resultados com distâncias próximas, os valores médios e respetivos desvios padrão demonstram-se favoráveis a que todas estas ligações se estabeleçam com estabilidade. A representação gráfica destes valores na **Figura 41** demonstra o perfil destas ligações.

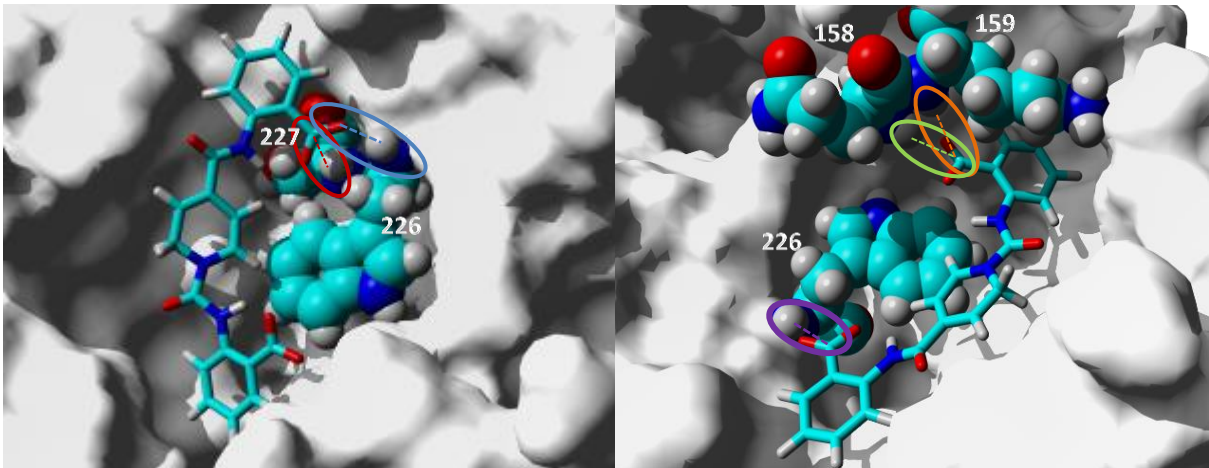
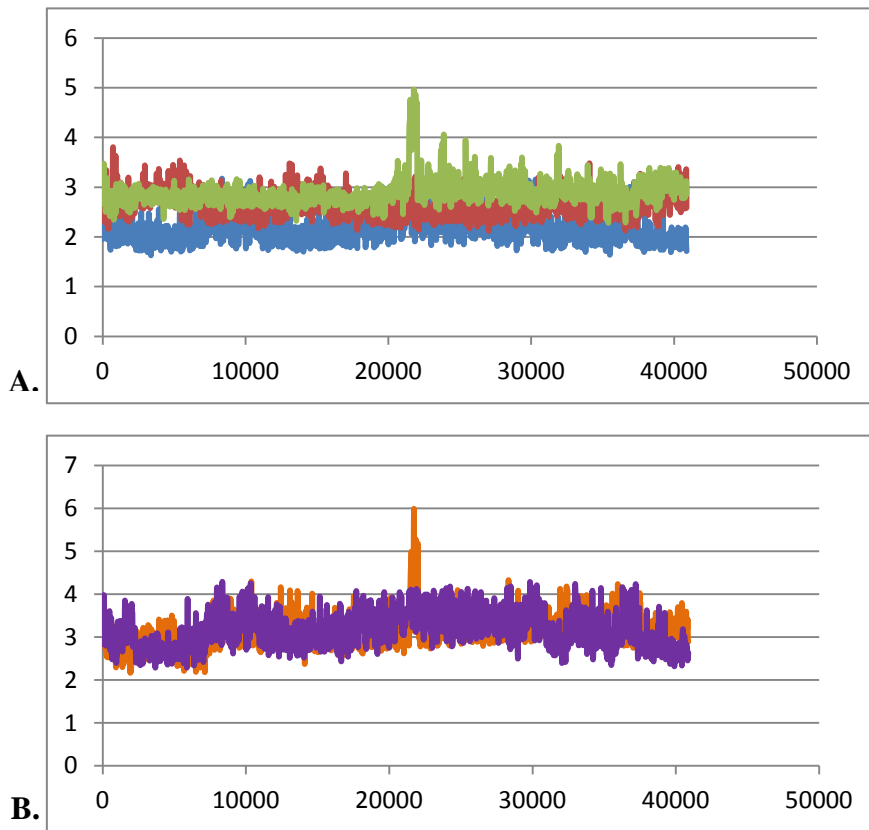


Figura 41. Distâncias (A e B) entre os pares de átomos [O11091-HN Trp226], [C11089-HN Ser227] (C), [C11106-HN Gln158], [C11106-HN Lys159] e [C11089-HN Trp226] (D) ao longo da simulação, para a molécula 01_067. Imagens retiradas de um momento aleatório da simulação de dinâmica molecular (por volta dos 10000ps), a partir de pontos de vista diferentes; [O11091-HN Trp 226] a azul, [C11089-HN Ser227] a vermelho, [C11106-HN Gln158] a verde, [C11106-HN Lys159] a laranja e [C11089-HN Trp226] a roxo.

Na realidade, à semelhança do que acontecia com a molécula 17_275, algumas destas distâncias foram calculadas entre átomos que não são realmente os que estão envolvidos na ponte de hidrogénio. Neste caso, isso acontece para todas as ligações da tabela à

exceção da primeira. As distâncias foram calculadas entre hidrogénios de resíduos da proteína e carbonos da molécula em estudo. Na realidade não são os carbonos que estão envolvidos na ligação de hidrogénio mas sim um dos oxigénios ligados àquele carbono. Isto significa que as distâncias entre os átomos que estabelecem a ponte de hidrogénio serão um pouco inferiores aos valores tabelados, para estas ligações.

Quanto aos resultados dos RMSD médios, os valores correspondentes ao complexo formado com esta molécula encontram-se entre os valores mais baixos. O gráfico para estes resultados (**Figura 42**) demonstra que existe um crescente desvio ao longo da simulação relativamente à estrutura inicial, que só pontualmente ultrapassa os 3Å para os RMSD relativos aos carbonos alfa e da cadeia principal. Para os átomos pesados o RMSD também só muito pontualmente ultrapassou os 3,5Å.

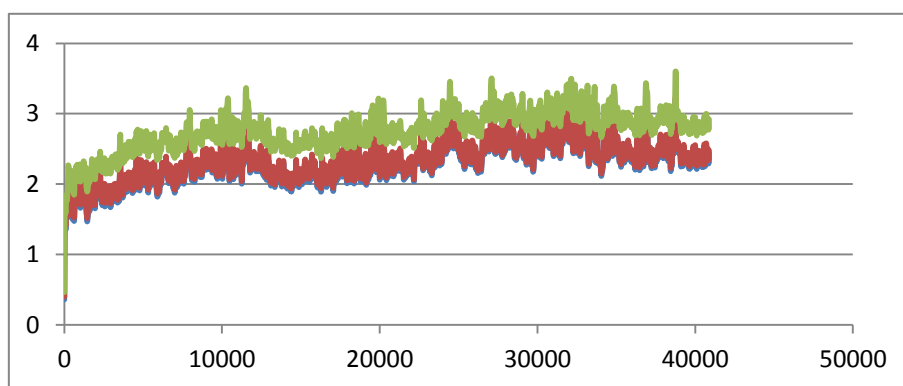


Figura 42. Valores de RMSD para a molécula 01_067, ao longo da simulação. Valores de RMSD relativos aos Carbonos α (azul), à cadeia principal (vermelho) e átomos não-hidrogénio (verde), ao longo do tempo [ps] de simulação.

Isto significa que o complexo formado com esta molécula é forte e estável. Relativamente às moléculas anteriormente analisadas esta será, à semelhança da molécula 17_061 umas das que maior interesse suscita. Para além do pequeno período em que a molécula 17_061 estabelece um número superior de contactos, a diferença mais relevante entre estas duas moléculas está relacionada com o tipo de interações estabelecidas. No caso do complexo formado com a molécula 01_067 é estabelecido um maior número de pontes de hidrogénio consideradas estáveis.

7.2.5.1 – Estabilidade das ligações do complexo [17_067-PA]: reprodutibilidade da trajetória

Relativamente às moléculas 17_067 e 17_068, estas são na realidade a mesma molécula com orientação simétrica. Por esta razão, é expectável que produzam resultados semelhantes e a comparação desses resultados permite perceber a influência da orientação da molécula no ponto de partida para a simulação de MD.

Essa semelhança é evidenciada não só pelo perfil de interação destas moléculas mas também pela semelhança dos resíduos destacados por estabelecerem contactos mais estáveis e também pelas pontes de hidrogénio estabelecidas. As pontes de hidrogénio identificadas para a molécula 01_068, são todas estabelecidas também pela molécula 01_067, mesmo que os perfis dessas ligações não sejam iguais para ambas.

À semelhança da molécula 01_067, o perfil de contactos para 01_068 relativamente ao tempo de simulação é estável, com uma média de resultados de aproximadamente 14 contactos por intervalo de 25ps, para ambas.

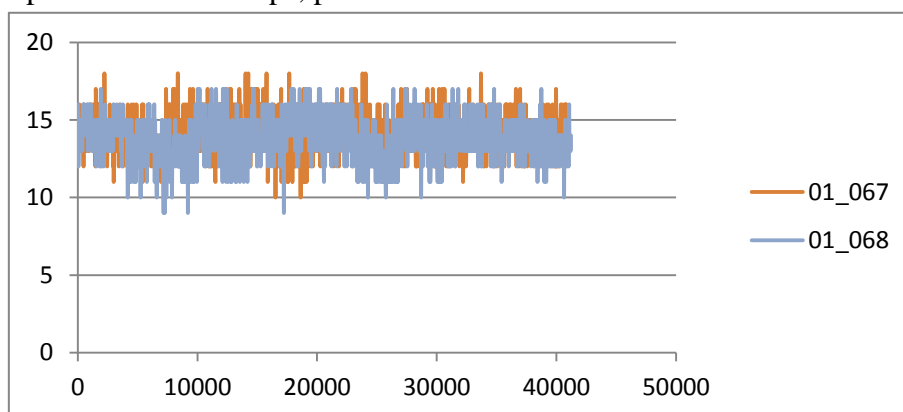


Figura 43. Número de Contactos vs Tempo [ps], para as moléculas 01_067 e 01_068. Contactos estabelecidos pelas moléculas, ao longo do tempo de simulação.

Dos contactos identificados entre a molécula 17_068 e a proteína, destacam-se os que envolvem os resíduos de aminoácidos Lys157, Lys225, Trp226, Ser227, Ser230 e Pro232, que apresentam um bom perfil de contactos, mais constante (**Figura44**). O mesmo ocorre com o resíduo Gln158, apesar deste apresentar uma quebra no início da simulação. Também os resíduos Thr461 e Leu514 se destacam, mas apresentam um perfil de ligação um pouco menos constante.

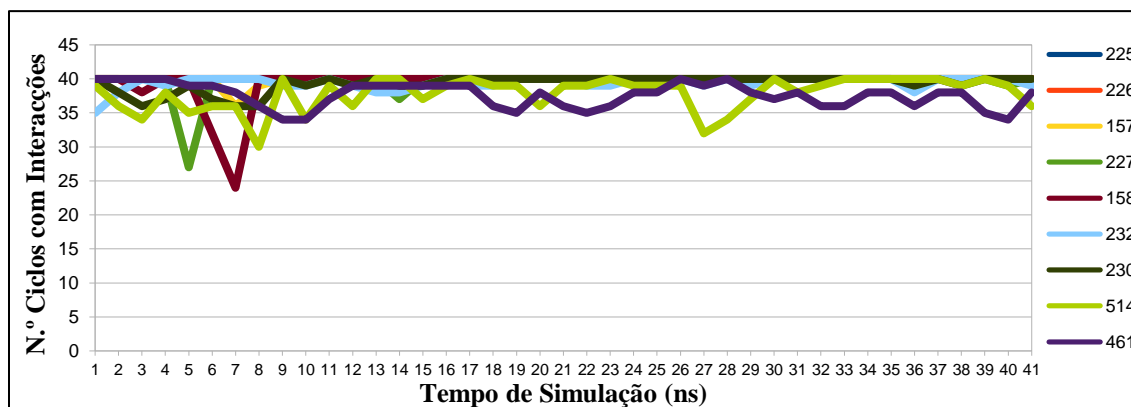


Figura 44. Contactos estabelecidos por resíduos de aminoácidos e a molécula 01_068 ao longo da simulação.

Lembrando que, para a molécula 17_067, os resíduos Lys157, Lys159, Lys225, Trp226, Ser227, Pro232, e Val480 assim como Gln158, Ser230 e Gln483 e também Thr461 e Leu514, foram os que se destacaram, percebe-se a semelhança entre estes resultados.

Para os resíduos destacados para o complexo formado com 17_068, procuraram-se átomos com possibilidade de formar pontes de hidrogénio com átomos desta molécula. Da análise das distâncias entre esses pares de átomos, destacaram-se:

	01_068			
	C11089-HN Ser227	C11089-HN Trp226	C11106-HN Gln158	C11106-HN Lys159
Média	2.771	2.838	2.902	3.713
Média, após 500ps	2.773	2.834	2.903	3.719
D.Padrão, após 500ps	0.215	0.318	0.625	0.959
% abaixo 3.5	99.09	94.67	92.67	54.91

Tabela 5 Valores médios, desvio padrão e percentagem de distâncias inferiores a 3,5Å, das melhores ligações pesquisadas, por ordem decrescente dessas percentagens, para a molécula 01_068.

A duas primeiras ligações da tabela para além de uma grande percentagem de resultados com distâncias próximas, têm também um valor médio de distâncias e um desvio padrão indicativos de uma interação estável. Quanto à ligação do resíduo 11106 desta molécula e a Glutamina 158, já demonstra um desvio padrão um pouco mais elevado. No entanto, estes valores traduzem-se num intervalo de distâncias com um máximo de 3,5Å, estando dentro do limite considerado razoável para que esta ligação se estabeleça. Por outro lado, a última ligação da tabela tem um desvio padrão significativamente alto, levando a que o intervalo de distâncias possa chegar a um máximo de 4,7Å, muito

acima do limite considerado para que a ligação se estabeleça. Isto é muito perceptível no gráfico correspondente a estes valores (**Figura 45**), em que esta última ligação demonstra um perfil extremamente instável.

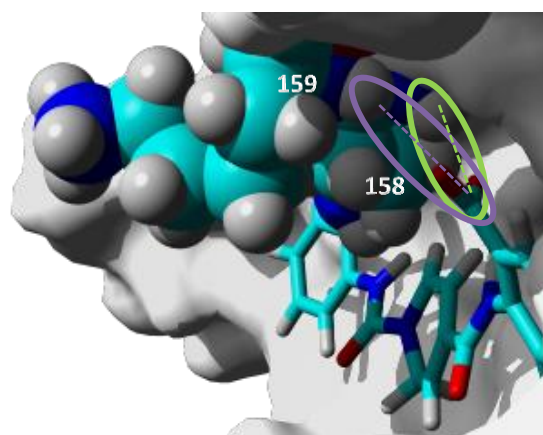
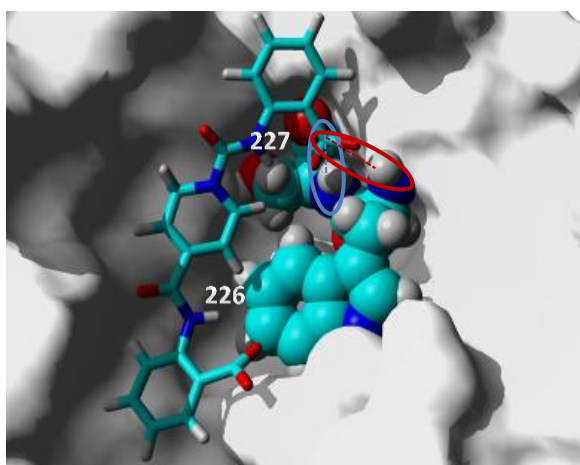
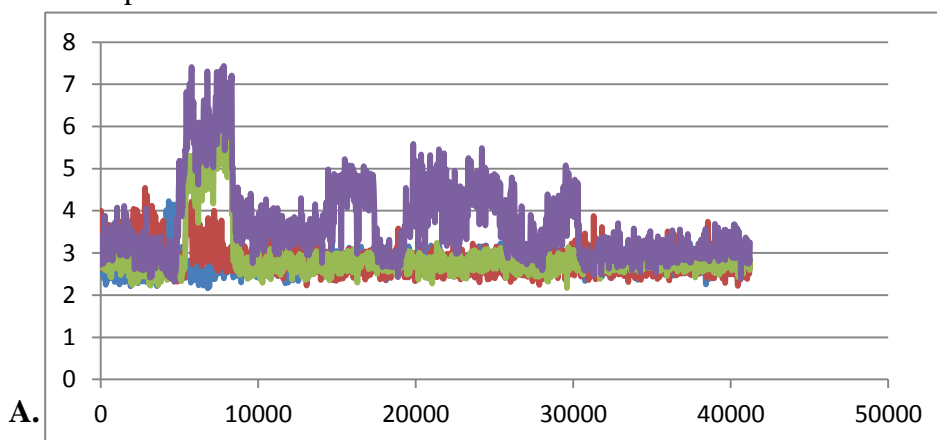


Figura 45. Distâncias (A) entre os pares de átomos [C11089-HN Ser227], [C11089-HN Trp226] (B) e [C11106-HN Gln158] e [C11106-HN Lys159] (C) ao longo da simulação, para a molécula 01_068. Imagens retiradas de um momento aleatório da simulação de dinâmica molecular, a partir de pontos de vista diferentes; [C11089-HN Ser227] a azul, [C11089-HN Trp226] a vermelho [C11106-HN Gln158] a verde e [C11106-HN Lys159] a roxo.

É de referir ainda que tal como se percebe neste mesmo gráfico, todas estas ligações começam por demonstrar distâncias um pouco superiores nos primeiros 10000ps, sensivelmente. As ligações com o C11106 em particular demonstram um grande aumento na distância entre os seus átomos um pouco antes dos 10000ps, voltando rapidamente a valores mais baixos. Após esse momento, todas as ligações da tabela (com a exceção da última) demonstram perfis de maior estabilidade com maior proximidade entre os átomos envolvidos.

Se se fizer a comparação destes dados com os obtidos para 17_067, percebe-se que todas as ligações destacadas na **Tabela 5** e **Figura 45**, para a 17_068 foram também destacadas para 17_067, mesmo que apresentem algumas diferenças a nível do perfil apresentado. Para demonstrar isto mesmo, na **Figura 46** são expostos esses perfis para cada uma das quatro ligações comuns a 17_67 e 17_068.

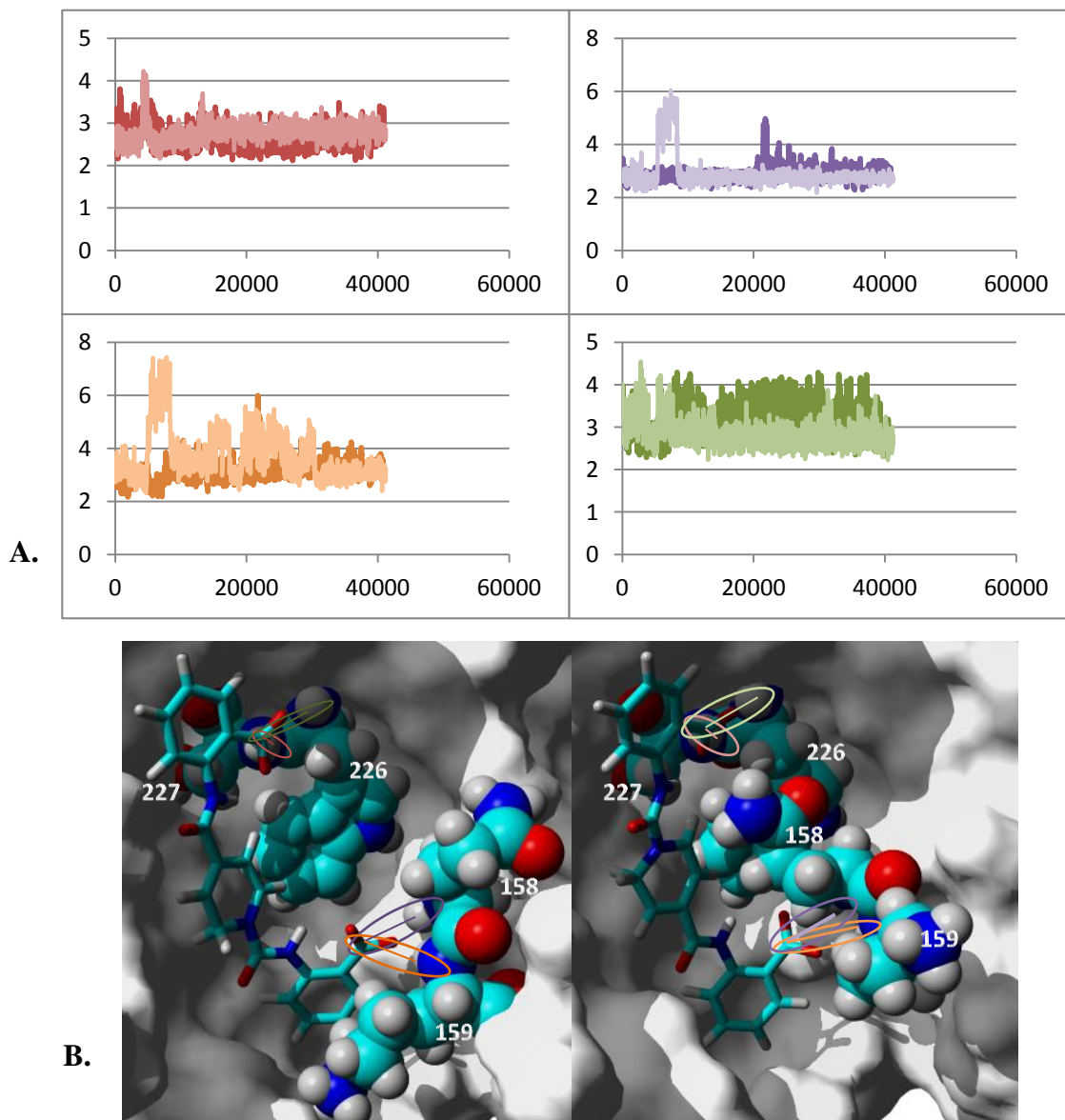


Figura 46. Distâncias (A.) entre os pares de átomos [C11089-HN Ser227], [C11106-HN Gln158], [C11106-HN Lys159] e [C11089-HN Trp226] ao longo da simulação, para 01_067 e 01_068. Imagens (B.) retiradas de um momento inicial da simulação de dinâmica molecular (cerca de 10000pc), para 17_067 (à esquerda) e 17_068 (à direita); Linhas mais escuras correspondem a 17_067 e mais claras a 17_068; [C11089-HN Ser227] a vermelho, [C11089-HN Trp226] a roxo, [C11106-HN Gln158] a laranja e [C11106-HN Lys159] a verde.

A análise desses gráficos permite perceber que, em termos destas ligações, a maior diferença ocorre para a ligação entre o carbono 11106 e os resíduos Gln158 e Lys159. Para a primeira (C11106-HN Gln158), a ligação é mais favorável/estável com 17_067 e para a outra (C11106-HN Lys159) a ligação é mais favorável com 17_068.

Quanto aos desvios na estrutura ocorridos ao longo da simulação, avaliando pelos resultados de RMSD, 01_068 demonstra um crescente desvio na sua estrutura à semelhança do que ocorre com a 01_067 (**Figura 47**). No caso da 01_068, o desvio é no entanto mais acentuado, sendo inclusivamente a molécula que maiores valores de RMSD alcança, comparativamente a todas as moléculas sujeitas à simulação.

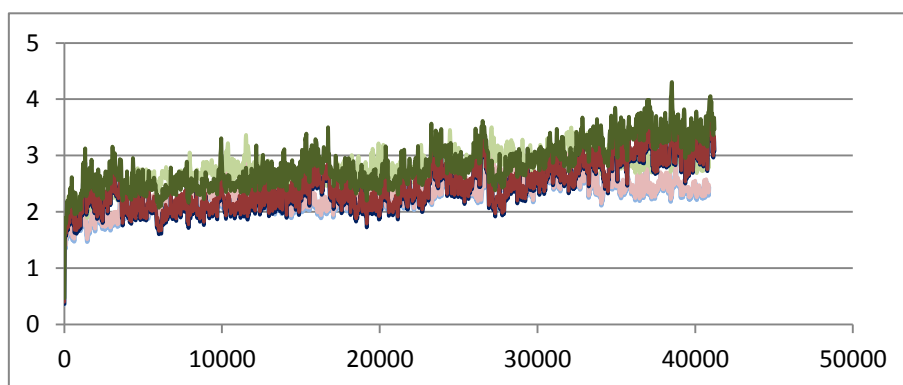


Figura 47. Gráfico relativo aos valores de RMSD para as moléculas 01_067 e 17_067. Linhas mais claras correspondem aos resultados para 17_067 e linhas mais escuras para 17_068; Valores de RMSD relativos aos Carbonos α (azul), à cadeia principal (vermelho) e átomos não-hidrogénio (verde), ao longo do tempo [ps] de simulação.

O momento de maior subida dos valores para 17_068 é sensivelmente no intervalo entre os 30000ps e o final da simulação, sendo que a este período de tempo não se associam maiores variações em termos de contactos (como foi possível observar na **Figura 43**). Inclusivamente, os resíduos dos aminoácidos envolvidos nessas interações apresentaram nesse período de tempo uma maior estabilidade em termos dos contactos estabelecidos. Isto significa que o aumento de distâncias entre átomos equivalentes da estrutura para os sucessivos momentos da simulação, não se traduz numa maior instabilidade do complexo [17_068-PA].

Tendo em conta todos estes dados, entende-se que existe efetivamente algumas diferenças de comportamento quando no ponto de partida a molécula apresenta diferente orientação. Neste caso, isto não se traduziu no entanto em diferenças

significativas na estabilidade das moléculas ou mesmo na quantidade e nos resíduos envolvidos nas ligações estabelecidas com o PA. Essas diferenças verificaram-se fundamentalmente no tipo de ligação, sendo que para 17_067 se estabeleceram maior número de pontes de hidrogénio estáveis.

7.3 – Discussão de Resultados

Os resultados dos processos de *docking* demonstraram que quase todas as alterações efetuadas às moléculas designadas por 01 e 17, resultaram em moléculas com melhor energia de ligação ao antigénio de proteção do *B.anthraxis*. Das moléculas selecionadas para o processo de dinâmica molecular, algumas demonstraram no entanto que essa aparente boa ligação à proteína alvo, não se verifica quando fatores como o tempo e o solvente são considerados. A simulação de DM demonstrou então que, por exemplo, a molécula 17_239 apesar de ter resultado numa energia de ligação de 10,8 Kcal/mol, esta corresponde a interações instáveis e nomeadamente nenhuma ponte de hidrogénio minimamente estável. Essa instabilidade pode associar-se às alterações da estrutura que se verificaram ao longo da simulação, nomeadamente para as cadeias laterais.

A molécula 17_222 apresenta o perfil de interação mais estável, com um desvio padrão de apenas 1,2 contactos. Apesar disto é a segunda molécula com menor valor médio de interações. Tem a possibilidade de estabelecer algumas pontes de hidrogénio e não apresenta qualquer momento de particular quebra. Trata-se assim de uma molécula que, apesar de não ter a mais forte interação com a proteína alvo, é a que mantém essa interação com maior estabilidade.

Por outro lado, a molécula 17_275, para além de ter resultado numa das maiores energias de ligação (10,9 Kcal/mol) no processo de *docking*, demonstrou relativa estabilidade na interação com a proteína mas com um pequeno momento de quebra nessa interação, sensivelmente aos 13000ps da simulação. Essa quebra na estabilidade está associada à quebra de ligação de vários resíduos da proteína, incluindo uma ponte de hidrogénio mas, de acordo com os resultados de RMSD, não está associada a um particular desvio na estrutura, sendo que apesar de haver um aumento desses valores, isto só acontece após aquele momento de quebra, por volta dos 16000ps.

Relativamente às moléculas 01_067 e 01_068, apresentaram ambas um número médio de cerca de 14 contactos, valor que só é superado pela molécula 17_061, com 15 contactos. Concluiu-se ainda que para ambas as orientações, as interações estabelecidas envolvem praticamente os mesmos resíduos de aminoácidos. Também as ligações destacadas nas **Tabelas 5 e 4** correspondem praticamente aos mesmos pares de átomos, apresentando apenas algumas diferenças em termos de distâncias/estabilidade e também o facto de que para 01_067 existe uma ponte de hidrogénio que nunca se estabelece para 01_068. De resto, a orientação de 01_067 apresentou resultados um pouco melhores do que 01_068 também em termos de RMSDs. Percebe-se então que ocorreram variações nos resultados associadas à diferente orientação da molécula, no entanto essas diferenças traduziram-se fundamentalmente no tipo de interações, nomeadamente na maior quantidade de pontes de hidrogénio estabelecidas por 01_067 (5 pontes de hidrogénio estáveis) relativamente a 01_068 (3 pontes de hidrogénio estáveis), o que lhe atribui um carácter de maior polaridade. Considera-se então que apesar disto, não há uma grande relevância nas diferenças de comportamento encontradas nas simulações de dinâmica molecular cujo ponto de partida corresponde a estas duas orientações. .

Comparando 01_067 com a molécula 17_061 (que são as moléculas que mais se destacam), a primeira mantém-se a oscilar em torno dos 14 contactos ao longo de toda a simulação, enquanto a outra oscila em torno desse mesmo número de contactos até cerca de 23000ps mas sofre depois um aumento, passando a ter um número médio de 16,5 contactos. Em termos de pontes de hidrogénio, a molécula 01_067 foi a que demonstrou estabelecer um maior número deste tipo de ligação. Na **Tabela 6** faz-se um resumo destes e de outros resultados relativos às interações estabelecidas pelos complexos formados com todas as moléculas em análise.

Ligando	PH estáveis	Outras PH	Nº médio de contactos	Resíduos
17_061	O11111-HN Ser227 N11106-HN Trp226	H11096-O Ser230	15	157 225 226 227 461
17_222	H11128-OG1 Thr461 H11113-OG Ser475	H11128-OG Ser475 N11127-HG Ser475	11	158 461 475
17_239	-	-	8	-
17_275	CL3 11080-HN Gln158	O11074-OG Ser475	13	157 159
01_067	O11091-HN Trp226 C11089-HN Ser227 C11106-HN Gln158 C11106-HN Lys159 C11089-HN Trp226	-	14	157 159 225 226 227 232 480
01_068	C11089-HN Ser227 C11089-HN Trp226 C11106-HN Gln158	-	14	157 225 226 227 230 232

Tabela 6. Resumo dos resultados relativos às interações estabelecidas por todos os complexos. Pontes de Hidrogénio (PH) estáveis; Outras PH estabelecidas com menor estabilidade ou com maior distância média entre os átomos envolvidos; Número médio de contactos estabelecidos pelo complexo ao longo do tempo da simulação; Resíduos de aminoácidos envolvidos em interações estáveis.

Conclui-se então que desta pesquisa se destaca a estabilidade da molécula 17_222, embora estabeleça um menor número de contactos quando comparado, por exemplo, com a molécula 17_275 que já apresenta um número maior de contactos, mas com menor estabilidade. Essa maior estabilidade da molécula 17_222 pode no entanto ser comparável com a apresentada pela molécula 01_067 que tem também um perfil estável mas com um maior número médio de interações. A molécula 01_067 assim como a 17_061 são de resto as que maior destaque merecem em termos de quantidade de interações. O que as distingue é o facto de a molécula 17_061 alcançar após 23000ps melhores resultados em termos de contactos, embora esses contactos se traduzam no menor número de pontes de hidrogénio quando comparado com todas as outras moléculas e sobretudo com a 01_067 que é a que demonstrou estabelecer o maior

número de pontes de hidrogénio. Por estas razões, a molécula 01_067 será aquela que melhor traduz a satisfação dos objetivos desta pesquisa.

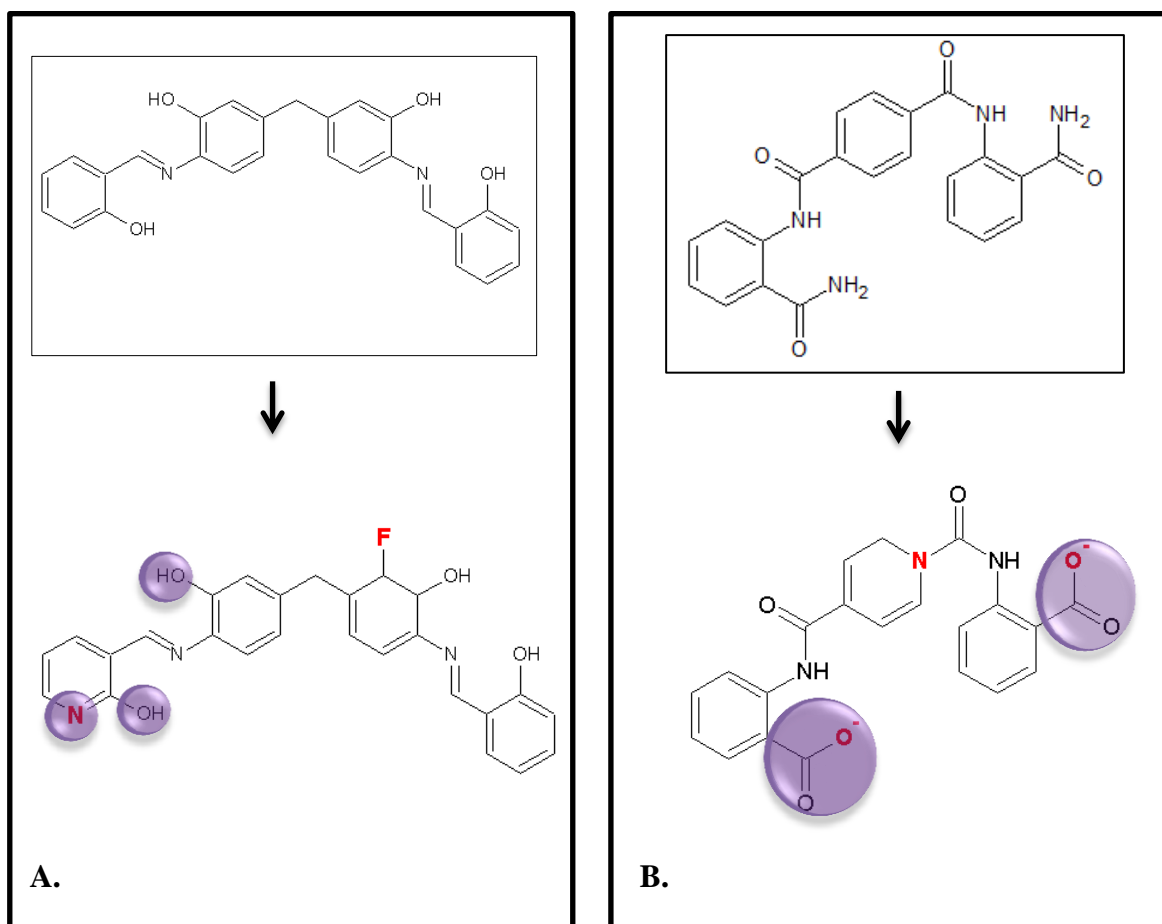


Figura 48. Estrutura das moléculas 17_061 (A.) e 01_067 (B.) e respectivas moléculas de origem. Nos painéis superiores, as moléculas de base e nos painéis inferiores, as moléculas otimizadas; A vermelho as otimizações que trouxeram maior hidrofiliicidade às moléculas; A roxo estão assinaladas as regiões das moléculas otimizadas que estabelecem pontes de hidrogénio com o PA.

VIII- CONCLUSÕES

A problemática do bioterrorismo tem já uma longa história, não sendo um tema desconhecido quer para os profissionais da área da saúde, quer para a população em geral. Apesar dessa longa história, é no entanto uma questão que não se dissipou com o desenvolvimento e globalização mundial. Estas trazem porém vantagens que permitem um melhor combate e prevenção destes ataques ou das suas consequências. O crescente desenvolvimento tecnológico, maior número de pesquisas nas mais diversas áreas e a

partilha de informação permitem que seja hoje mais fácil encontrar soluções mais eficazes. No âmbito da área farmacêutica, o processo de desenvolvimento de novos fármacos, neste caso de combate a estes agentes infecciosos com grande virulência, é de enorme valor. É, portanto de grande interesse que pesquisas deste tipo continuem a trazer novos dados que permitam conhecer cada vez melhor estes agentes, assim como as formas de os combater ou mesmo de prevenir a sua infeção.

Esta pesquisa computacional permitiu, para além de adquirir conhecimentos técnicos relativos a estes processos, encontrar algumas moléculas que se demonstrou serem promissoras, por apresentarem boas características de ligação ao antigénio de proteção do *B.anthraxis* (**Figura 49**).

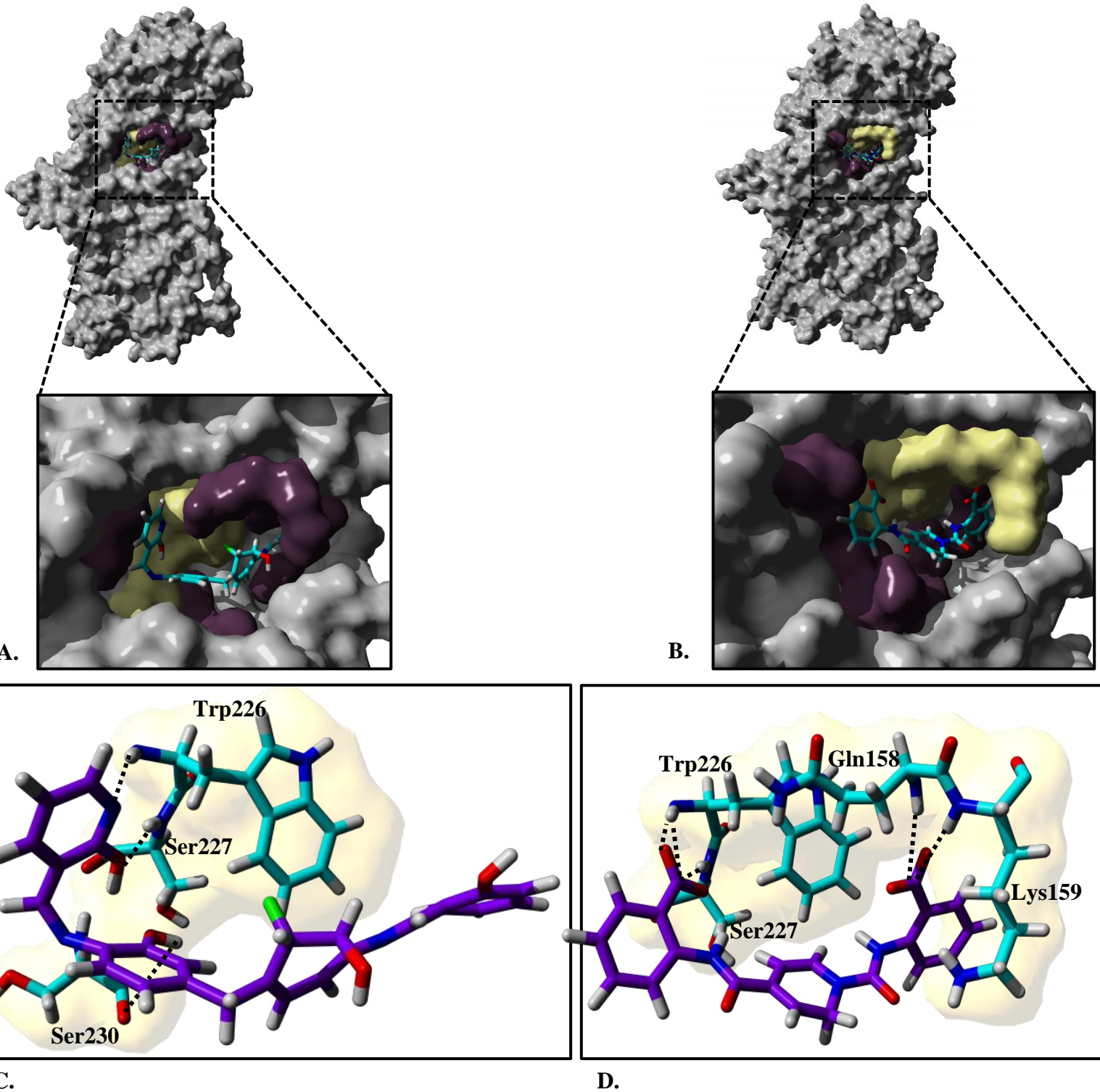


Figura 49. Complexo formado entre 17_061 e 01_067 e o PA. Os painéis à esquerda (A. e C.) são referentes ao complexo formado com 17_061 e à direita (B. e D.) aos complexos formados com 01_067; Nos painéis A. e B., o PA (superfície molecular a cinzento) tem destacados os resíduos de aminoácidos envolvidos em interações - estáveis ou moderadamente estáveis - (roxo), incluindo os que estabelecem pontes de hidrogênio estáveis (amarelo); Nos painéis C. e D., a estrutura dos aminoácidos envolvidos nas pontes de hidrogênio é representada em *stick* e a estrutura das moléculas 17_061 (C.) e 01_067 (D.) está representada com carbonos coloridos a roxo; As pontes de hidrogênio estão representadas por tracejado preto.

Dado aquilo que se conhece e foi discutido acerca da implicação desta proteína no processo infeccioso por este bacilo, estas moléculas poderão apresentar interesse para pesquisas subsequentes, como recurso para a pesquisa de novos compostos líder e no sentido da formulação de novos fármacos.

Os objetivos desta pesquisa passavam pela obtenção de ligandos com boas características quer em termos da ligação ao PA do Antrax, como em termos de polaridade das moléculas, partindo nomeadamente das moléculas encontrados por Wein et al. (2012). Esses objetivos foram alcançados, com a obtenção de moléculas com maior capacidade de ligação e com maior polaridade do que os ligandos originais.

IX- BIBLIOGRAFIA

Alonso, H. *et al.* (2006). Combining Docking and Molecular Dynamic Simulation in Drug Design. *Medicinal Research Reviews*, 26 (5), pp.531-568.

AMRITA. (2013). Energy minimization of a molecule. [Em linha]. Disponível em <<http://vlab.amrita.edu/index.php?sub=3&brch=277&sim=1491&cnt=1>>. [Consultado em 12/03/2015].

Carugo, O. e Pongor, S. (2001). A normalized root-mean-square distance for comparing protein three-dimensional structures. *Protein Science*, 10, pp.1470-1473.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. (2013). [Em linha]. Disponível em <<http://www.cdc.gov/anthrax/basics/>>. [Consultado em 04/10/2014].

CDC. (2001). *Update: Investigation of Bioterrorism-Related Anthrax and Interim Guidelines for Exposure Management and Antimicrobial Therapy, October 2001*. MMWR, 50(42), pp.909-919 .

CDC. (2013a). Injection Anthrax. [Em linha]. Disponível em <<http://www.cdc.gov/anthrax/types/injection.html>>. [Consultado em 07/10/2014].

CDC. (2013b). A History of Anthrax. [Em linha]. Disponível em <<http://www.cdc.gov/anthrax/history/index.html>>. [Consultado em 07/10/2014].

CDC. (2013c). Symptoms. [Em linha]. Disponível em <<http://www.cdc.gov/anthrax/basics/symptoms.html>>. [Consultado em 28/01/2015].

Chang, R. e Cruickshank, B. (2005). *Química, 8ª Edição*. Madrid, McGraw-Hill, p.411.

Chen, S. e Zeng, M. (2012). Anthrax Bioterrorism and Current Vaccines. [Em linha]. Disponível em <<http://www.omicsonline.org/anthrax-bioterrorism-and-current-vaccines-2157-2526.S4-003.php?aid=4690>>. [Consultado em 19/10/2014].

Drinks, A. (2009). The *Bacillus anthracis* spore. [Em linha]. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0098299709000557>>. [Consultado em 04/10/2014].

Duan, Y. *et al.* (2003). A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations. *Journal of Computational Chemistry*, 24(16), pp.1999-2012.

Fabiola, F. *et al.* (2002). An improved hydrogen bond potential: Impact on medium resolution protein structures. *Protein Science*, 11 (6), pp.1415-1423.

Feld, G. *et al.* (2012). Domain flexibility modulates the heterogeneous assembly mechanism of anthrax toxin protective antigen. *Journal of Molecular Biology*, 415(1), pp.159-174

Freire, E. (2008). Do enthalpy and entropy distinguish first in class from best in class?. *Drug Discovery Today*, 13(19-20), pp.869-874.

Ghitti, M. *et al.* (2013). NMR and Computational Methods in the Structural and Dynamic Characterization of Ligand-Receptor Interactions. In: Han, K., et al (Ed.). *Protein Conformational Dynamics*. Springer, pp.271-304.

Gordon, V. *et al* (1995). Proteolytic Activation of Bacterial Toxins by Eukaryotic Cells is Performed by Furin and by Additional Cellular Proteases. *Infection and Imunity*, 63(1), pp.82-87.

Hicks, R. *et al.* (2004). The Anthrax Protective Antigen (PA₆₃) Bound Conformation of a Peptide Inhibitor of the Binding of Lethal Factor to PA₆₃: As Determined by

trNOESY NMR and Molecular Modeling. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(22), pp.5347-5355.

Harmon, K. (2012). Bioterrorismo. Toxicidade do Antraz depende da genética humana. [Em linha]. Disponível em <<http://www2.uol.com.br/sciam/noticias/bioterrorismo.html>>. [Consultado em 27/10/2014].

Kaye, A. (1972). This posteroanterior (PA) chest x-ray was taken 4 mo. After the onset of anthrax in a 46 yr. old male (ID#: 5146). [Em linha]. Disponível em <<http://phil.cdc.gov/phil/imageidsearch.asp>>. [Consultado em 09/02/2015].

Krogsgaard-Larsen, P., *et al.* (1985). Heterocyclic Analogues of GABA: Chemistry, Molecular Pharmacology and Therapeutic Aspects. In: Ellis, G. e West, G. (Eds.). *Progress in Medicinal Chemistry*. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, B.V. (Biomedical Division), pp. 67-120.

Lacy, D. *et al.* (2004). Structure of heptameric protective antigen bound to an anthrax toxin receptor: A role for receptor in pH-dependent pore formation. *PNAS*, 101(36), pp.13147-13151.

Lengauer, T. e Rarey, M. (1996). Computational methods for biomolecular docking. *Current Opinion in Structural Biology*, 6(3), pp.402-406.

Leppla, S. (1982). Anthrax toxin edema factor: A bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentrations in eukaryotic cells. *PNAS*, 79, pp.3162-3166.

Liu, S. *et al.* (2009). Capillary morphogenesis protein-2 is the major receptor mediating lethality of anthrax toxin in vivo. *PNAS*, 106(30), pp.12424-12429.

Lodish, H. *et al.* (2000). *Molecular Cell Biology*. Nova York, W. H. Freeman.

Lyman, E. e Zuckerman, D. (2006). Ensemble-Based Convergence Analysis of Biomolecular Trajectories. *Biophysical Journal*, 91, pp.164-2.

Maple, J. *et al.* (1988). Derivation of force fields for molecular mechanics and dynamics from *ab initio* energy surfaces. *Proc. of the Natl. Acad. Sci. USA*, 88, pp.5350-5354.

Martchenko, M. *et al.* (2012). Human genetic variation altering anthrax toxin sensitivity. *Proc. of the Natl. Acad. Sci. USA*, 108(8), pp.2972-2977.

Meanwell, N. (2011). Synopsis of Some Recent Tactical Application of Bioisosteres in Drug Design. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54, pp.2529-2591.

Morris, G. *et al.* (1998). Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function. *Journal of Computational Chemistry*, 19(14), pp.1639-1662.

Morris, G. *et al.* (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30, pp.2785-2791.

Nair, P. e Miners, J. (2014). Molecular dynamics simulations: from structure function relationships to drug discovery. *In Silico Pharmacology*, 2(4).

Namba, A. *et al.* (2008). Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. *Eclética Química*, 33(4), pp.13-24.

Nguyen, T. (2004). Three-dimensional Model of the Pore Form of Anthrax Protective Antigen. Structure and Biological Implications. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 22(3), pp. 253-265.

Nogady, T. e Weaver, D. (2005). *Medicinal Chemistry: A Molecular and Chemical Approach*. Nova Iorque. Oxford University Press.

Patani, G. e LaVoie E. (1996). Bioisosterism: A Rational Approach in Drug Design. *Chemical Reviews*, 96, pp. 3147-3176.

Petosa, C. *et al.* (1997). Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen. *Nature*, 385, pp. 833-838.

Schlick, T., *et al.* (2011). Biomolecular modeling and simulation: a field coming of age. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 44(2), pp.191.228.

Seeliger, D. e Groot, B. (2010). Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina. *J Comput Aided Mol Des.* 24, pp.417-422.

Shattuck, T. (2008). Molecular Mechanics Tutorial. [Em linha]. Disponível em <<http://www.colby.edu/chemistry/CompChem/MMtutor.pdf>>. [Consultado em 12/03/2015].

Shiryaev, S. *et al* (2007). Targeting Host Cell Furin Proprotein Convertases as a Therapeutic Strategy against Bacterial Toxins and Viral Pathogens. *The Journal of Biochemistry*, 282(29), pp.20847-20853.

Steele, J. (1962). Anthrax lesion on the skin of the forearm caused by the bacterium *Bacillus anthracis* (ID#: 2033). [Em linha]. Disponível em <<http://phil.cdc.gov/phil/imageidsearch.asp>>. [Consultado em 09/02/2015].

TCI, (2014). Delivery of Poorly Soluble or Poorly Permeable Drugs – 7th Edition. [Em linha]. Disponível em <http://www.technology-catalysts.com/reports_services/delivery_poorly.asp>. [Consultado em 28/06/2015].

Trott, A. e Olson, A. (2010). AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *J Comput Chem.* 31, pp. 455-461.

Tuszynski, J. *et al.* (2014). Mathematical and computational modeling in biology at multiple scales. *Theor Biol Med Model.* 11(52).

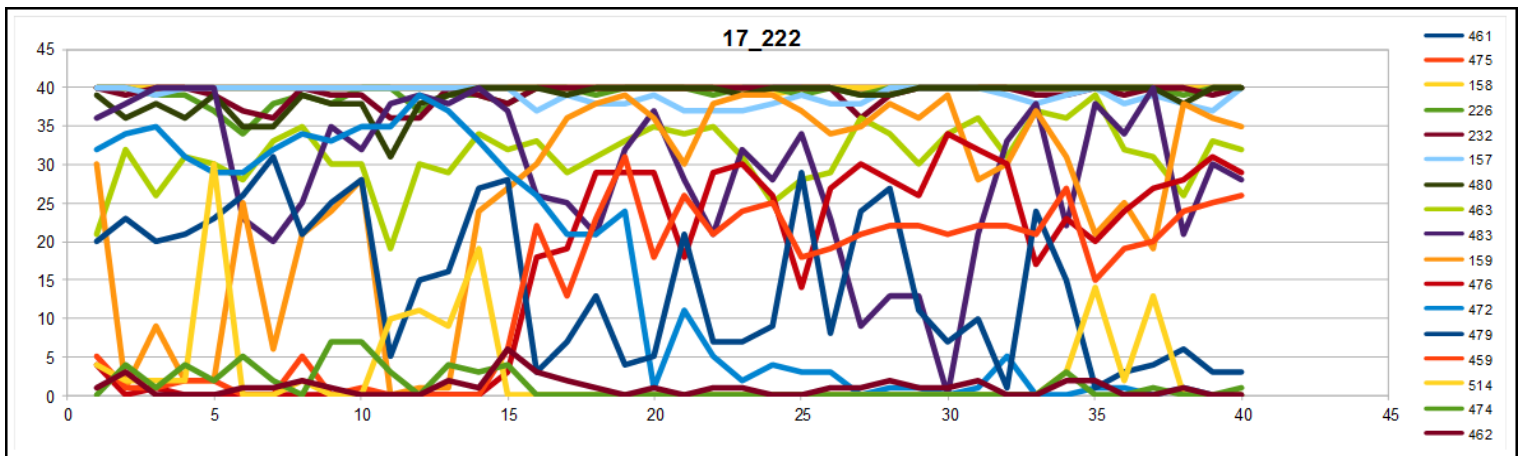
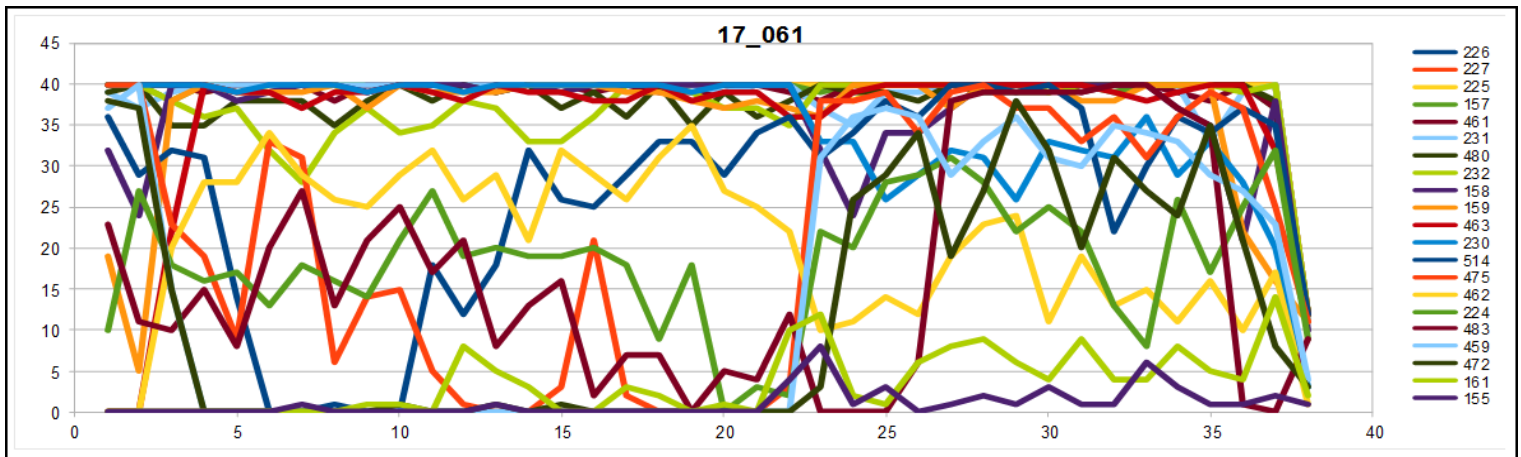
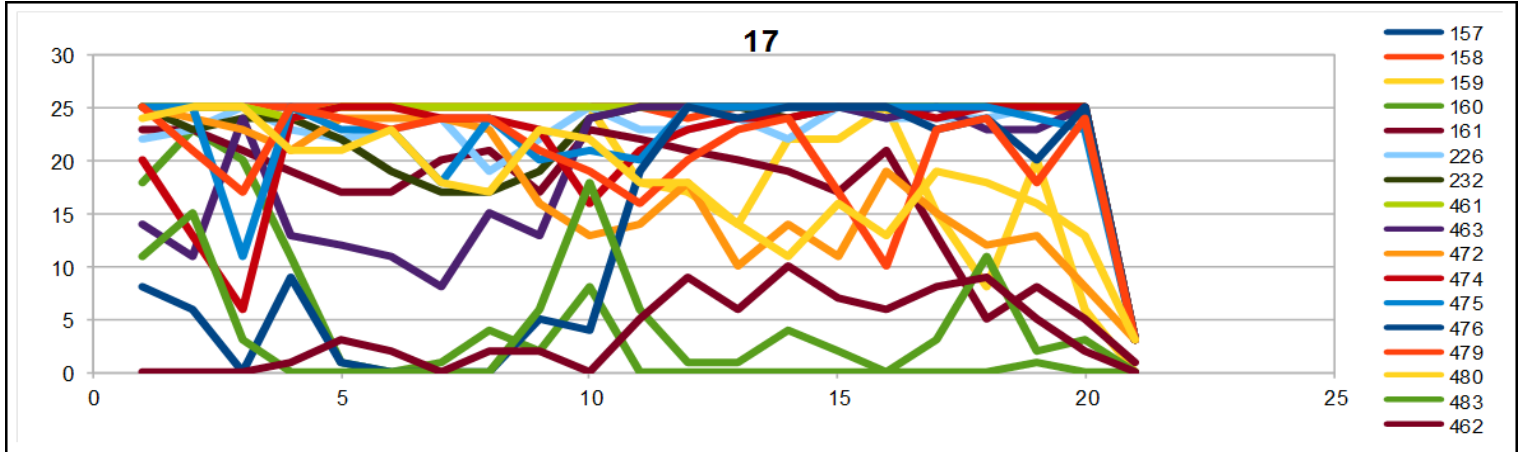
Velazquez-Campoy, *et al.* (2001). The binding energetics of first- and second-generation HIV-1 protease inhibitors: implications for drug design. *Arch Biochem Biophys*, 390(2), pp. 169-175.

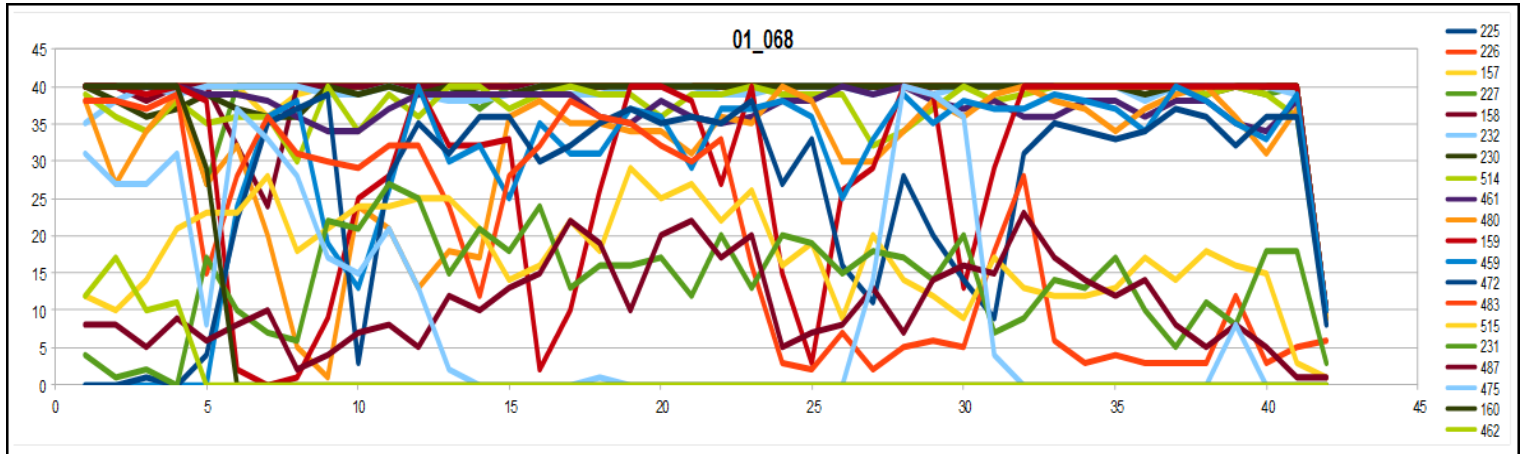
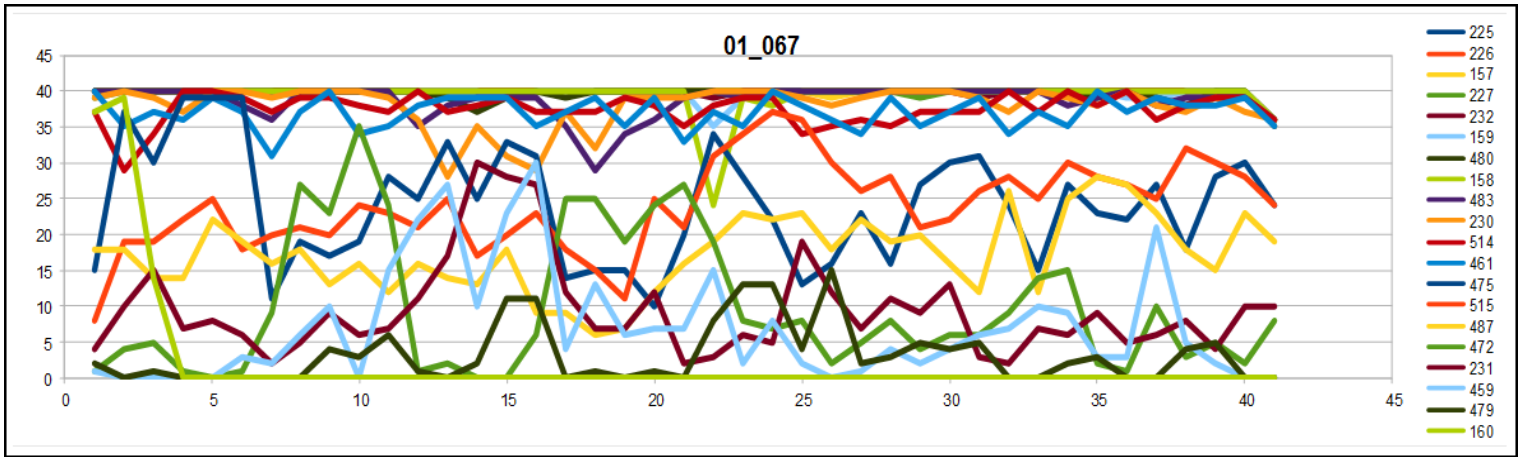
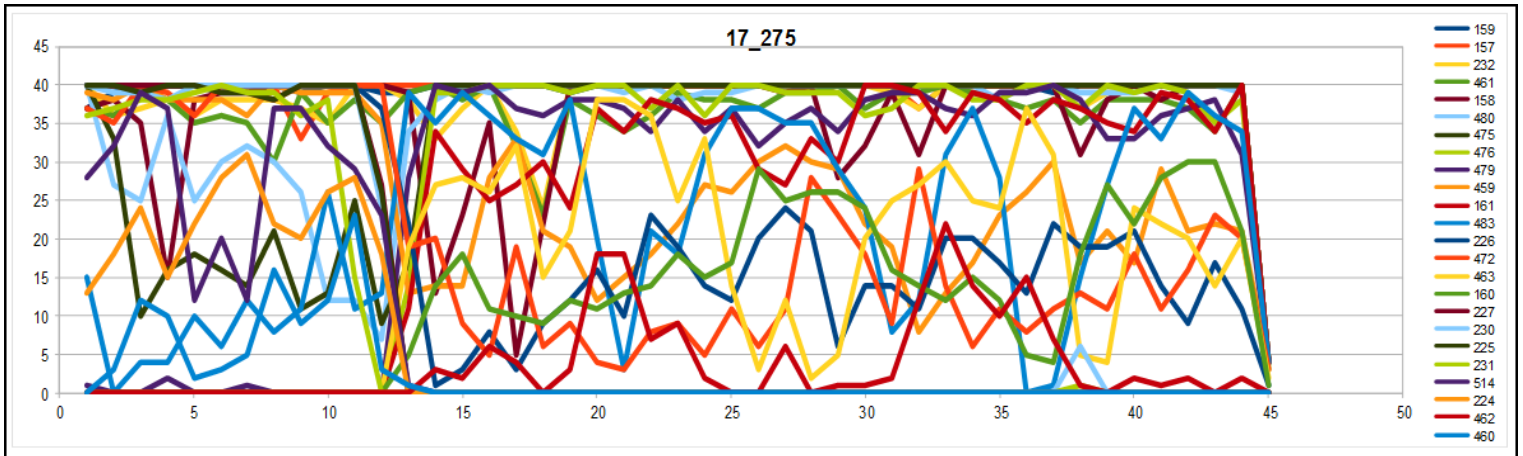
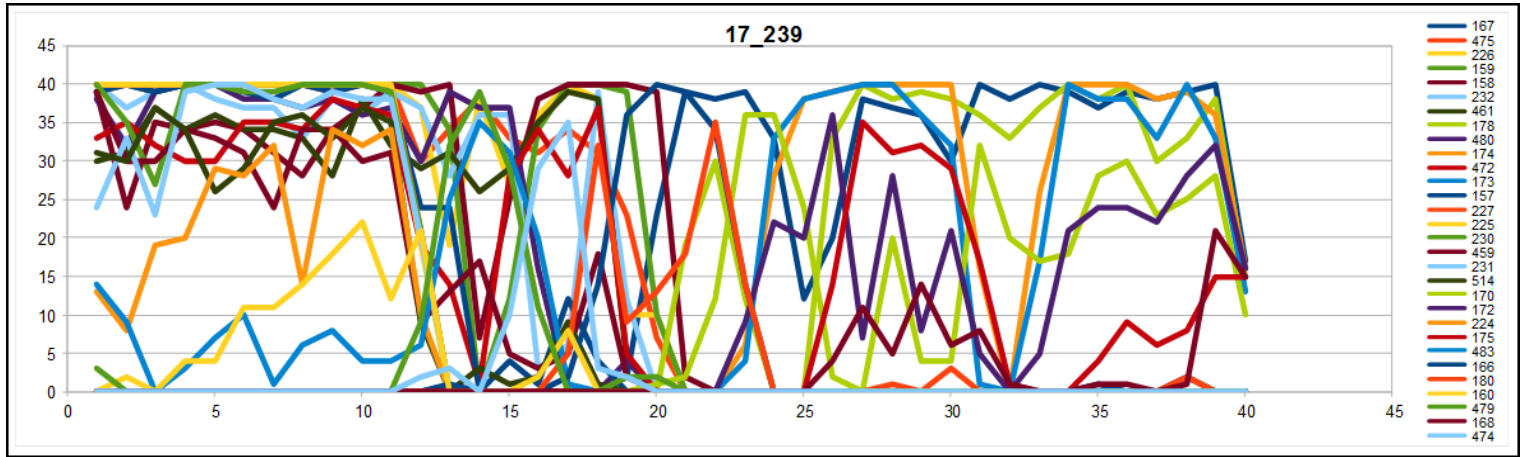
Wein, A. *et al.* (2012). Small Molecule Inhibitors of Bacillus anthracis Protective Antigen Proteolytic Activation and Oligomerization. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(18), pp.7998-8006.

WHO, UNAIDS (2008). Anthrax in humans and animals. [Em linha]. Disponível em <http://www.who.int/csr/resources/publications/anthrax_webs.pdf>. [Consultado em 07/11/2014].

X- ANEXOS

10.1 – Gráficos de contactos estabelecidos por resíduos de aminoácidos da proteína alvo ao longo do tempo de simulação





10.2 – Tabelas dos resíduos com melhor perfil de interação (ordenados por ordem crescente do número do resíduo)

17	
Lys	157
Gln	158
Lys	159
Ser	160
Ser	161
Trp	226
Pro	232
Thr	461
Tyr	462
Asn	463
Asp	472
Gly	474
Ser	475
Asn	476
Glu	479
Val	480
Gln	483

17_61	
Lys	157
Gln	158
Lys	159
Glu	224
Lys	225
Trp	226
Ser	227
Ser	230
Asp	231
Pro	232
Ile	459
Thr	461
Tyr	462
Asn	463
Ser	475
Val	480
Gln	483
Leu	514

17_222	
Lys	157
Gln	158
Lys	159
Trp	226
Pro	232
Ile	459
Thr	461
Tyr	462
Asn	463
Asp	472
Gly	474
Ser	475
Asn	476
Glu	479
Val	480
Gln	483
Leu	514

17_239	
Lys	157
Gln	158
Lys	159
Arg	167
Ser	170
Gly	172
Pro	173
Thr	174
Arg	178
Glu	224
Lys	225
Trp	226
Ser	227
Ser	230
Asp	231
Pro	232
Ile	459
Thr	461
Asp	472
Ser	475
Val	480
Leu	514

17_275	
Lys	157
Gln	158
Lys	159
Ser	160
Ser	161
Trp	226
Pro	232
Ile	459
Thr	461
Asn	463
Asp	472
Ser	475
Asn	476
Glu	479
Val	480
Gln	483

01_067	
Lys	157
Gln	158
Lys	159
Lys	225
Trp	226
Ser	227
Ser	230
Pro	232
Thr	461
Ser	475
Val	480
Gln	483
Thr	487
Leu	514
Glu	515

01_068	
Lys	157
Gln	158
Lys	159
Lys	225
Trp	226
Ser	227
Ser	230
Asp	231
Pro	232
Ile	459
Thr	461
Asp	472
Val	480
Gln	483
Leu	514
Glu	515

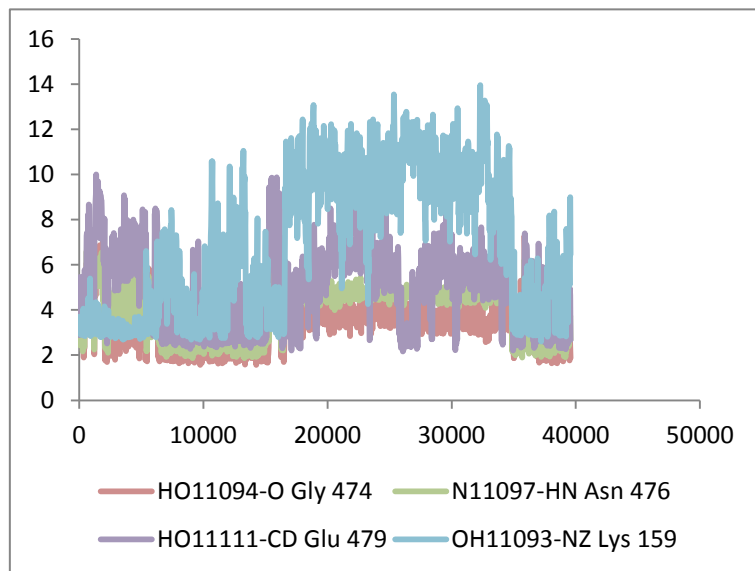
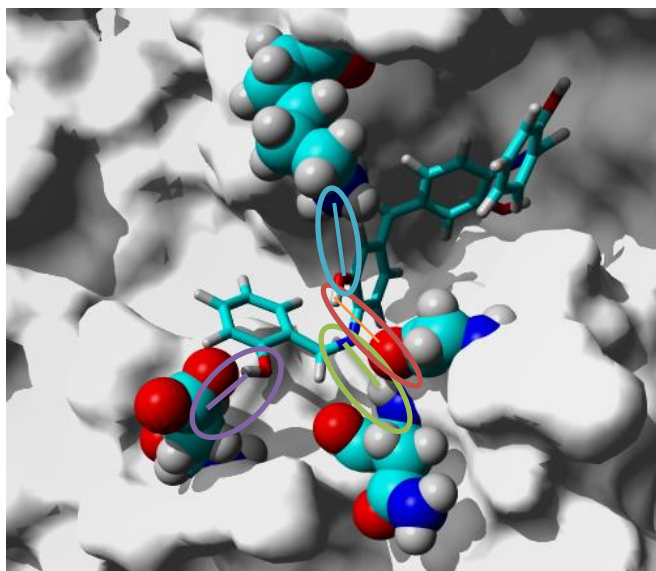
10.3 – Tabela de resíduos que estabelecem interações mais estáveis e as moléculas com as quais estabelecem essas interações

	17	17_061	17_222	17_239	17_275	01_067	01_068
157	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
158	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
159	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
226	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
232	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
461	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
480	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
459	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>
475	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
483	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
472	<input checked="" type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>
514		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
227		<input checked="" type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
225		<input checked="" type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
230		<input checked="" type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
463	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>		
231		<input checked="" type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>			<input checked="" type="checkbox"/>

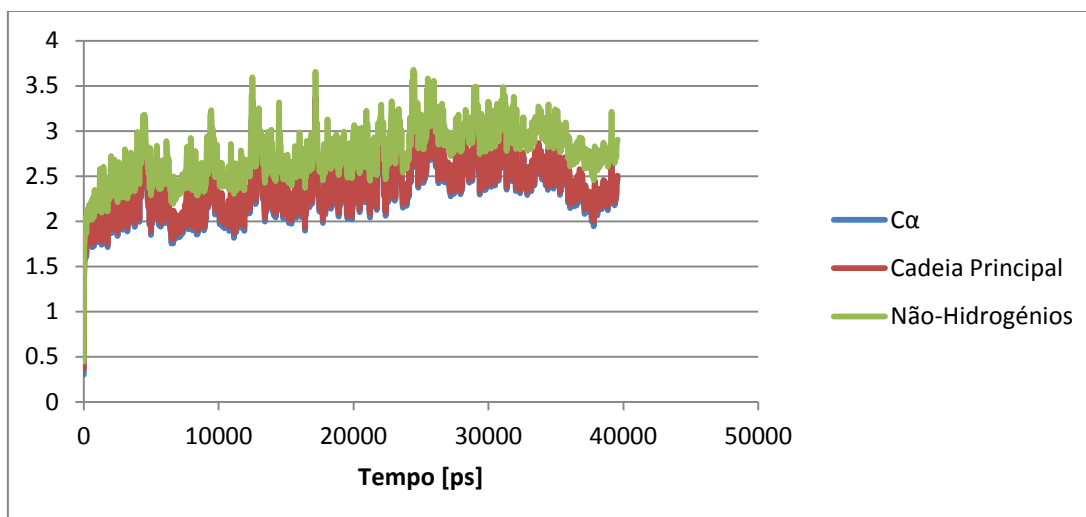
10.4 – Resultados relativos à molécula 17

10.4.1 - Distâncias

	17			
	HO11094-O Gly474	N11097-HN Asn476	HO11111-CD Glu479	OH11093-NZ Lys159
Média	3.306	3.938	4.924	6.866
Média (após 500ps)	3.301	3.949	4.931	6.911
D.Padrão (após 500ps)	1.033	1.149	1.828	3.158
% abaixo 3.5	56.439	35.922	31.376	23.990



10.4.2 – Desvios Relativos à Estrutura Inicial (RMSDs)



10.5 – Tabelas de modificações efetuadas à molécula 01

	Energia Lig. (Kcal/mol)	A	B	C	D	E	F	G
01	9.113							
01_068	10.917	COO ⁻			N4			COO ⁻
01_067	10.814	COO ⁻			N1			COO ⁻
01_071	10.567	COO ⁻	N2		N4			COO ⁻
01_053	10.412	COO ⁻	CONH2 (on 4)					COO ⁻
01_006	10.335	COO ⁻						COO ⁻
01_045	10.181	COO ⁻			N=N (on 5)			COO ⁻
01_033	10.095				N4			
01_055	10.083	COO ⁻	COO- (on 6)					COO ⁻
01_048	10.039	COO ⁻	-CH2-NH- (on 3)					COO ⁻
01_047	10.031	COO ⁻	-CH2-NH- (on 4)					COO ⁻
01_050	9.987	COO ⁻			-NH-CH2- (on 2)			COO ⁻
01_057	9.978	COO ⁻	COO ⁻ (on 4)					COO ⁻
01_061	9.938	COO ⁻	CH2OH (on 4)					COO ⁻
01_062	9.936	COO ⁻	CH2OH (on 3)					COO ⁻
01_070	9.848	COO ⁻	N2					COO ⁻
01_030	9.819				N1			
01_036	9.777	COO ⁻ (on 6)						COO ⁻
01_058	9.775	COO ⁻	COO ⁻ (on 3)					COO ⁻
01_025	9.751		N2					
01_041	9.744	COO ⁻	N=N (on 3)					COO ⁻
01_076	9.739	COO ⁻	CONH ₂ (on 4)		N=N (on 5)			COO ⁻
01_074	9.727	COO ⁻	CONH ₂ (on 4)		N=N (on 5)			COO ⁻
01_012	9.726		F3					
01_009	9.723			Cetona				
01_054	9.712	COO ⁻	CONH ₂ (on 3)					COO ⁻
01_072	9.696	COO ⁻	N2		N1 N4			COO ⁻
01_056	9.69	COO ⁻	COO ⁻ (on 5)					COO ⁻
01_013	9.664		F4					
01_018	9.664				F5			

01_020	9.649				F3	
01_052	9.612	COO ⁻	CONH ₂ (on 5)			COO ⁻
01_038	9.609	COO ⁻ (on 6)				COO ⁻ (on 6)
01_049	9.609	COO ⁻		-NH-CH ₂ - (on 5)		COO-
01_021	9.608				F4	
01_024	9.607		N1			
01_051	9.603	COO ⁻	CONH ₂ (on 6)			COO ⁻
01_044	9.6	COO ⁻		N=N (on 2)		COO ⁻
01_042	9.588	COO ⁻	N=N (on 4)			COO ⁻
01_008	9.585		Éster		Éster	
01_022	9.585				F5	
01_040	9.575	COO ⁻ (on 5)				COO- (on 5)
01_010	9.57	COO ⁻	CH ₂ C H ₂ NH ₃ +			COO ⁻
01_043	9.56	COO-	N=N (on 5)			COO ⁻
01_037	9.554	COO ⁻ (on 5)				COO ⁻
01_039	9.544	COO ⁻ (on 6)				COO ⁻ (on 5)
01_015	9.535		F6			
01_060	9.531	COO ⁻	CH ₂ OH (on 5)			COO ⁻
01_078	9.53	COO ⁻	CONH ₂ (on 4)		CONH ₂ (on 4)	COO ⁻
01_014	9.519		F5			
01_029	9.514		N6			
01_023	9.505				F6	
01_077	9.465	COO ⁻	COO ⁻ (on 6)		COO ⁻ (on 6)	COO ⁻
01_017	9.463			F3		
01_026	9.454		N3			
01_019	9.451			F6		
01_016	9.446			F2		
01_001	9.441	COF				
01_073	9.439	COO ⁻	CONH ₂ (on 4)	N1		COO ⁻
01_066	9.424	COO ⁻	CH ₂ NH ₃ ⁺ (on 3)			COO ⁻
01_002	9.423	COF				COF
01_075	9.41	COO ⁻	N2 CONH ₂ (on 4)	N1 N4		COO ⁻
01_005	9.31	COO ⁻				
01_007	9.297		Éster			
01_059	9.293	COO ⁻	CH ₂ OH			COO ⁻

		(on 6)					
01_004	9.233	C=O- CH ₃					C-O-CH ₃
01_065	9.217	COO ⁻	CH ₂ NH ₃ ⁺ (on 4)				COO ⁻
01_028	9.167		N5				
01_011	9.166			Cetona		Cetona	
01_031	9.162				N2		
01_034	9.153				N5		
01_035	9.099				N6		
01_032	9.088				N3		
01_069	9.085				N4 N1		
01_064	9.073	COO ⁻	CH ₂ NH ₃ ⁺ (on 5)				COO ⁻
01_027	9.01		N4				
01_003	8.976	C=O- CH ₃					
01_063	8.865	COO ⁻	CH ₂ NH ₃ ⁺ (on 6)				COO ⁻
01_046		COO ⁻	-CH ₂ - NH- (on 5)				COO ⁻

10.6 – Tabelas de modificações efetuadas à molécula 17

	Energia Lig.(Kcal/mol)	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
17	8.207										
17_001	8.912					F6					
17_002	8.511					F4					
17_003	8.829	F4									
17_004	8.542	F5									
17_005	9.145	F3									
17_006	8.951	F6									
17_007	9.36					F3					
17_008	9.069					F6	F6				
17_009	8.898	N5									
17_010	9.728	N6 N5									
17_011	8.983	N4 and N5									
17_012	8.519	N3									
17_013	8.555					N3					
17_014	8.871					N3 and N4					
17_015	9.01					N5					
17_016	9.328					N6					
17_017	8.312	N3				N6					
17_018	9.791	N6 N3									
17_019	8.754	N4 and N3									
17_020	8.268	N3				N3					
17_021	8.453	N5				N3					

Pesquisa Computacional de Inibidores de Fatores de Virulência de *Bacillus anthracis*

17_022	9.054	N2									
17_023	9.182					N2					
17_024	8.38					N3 and N6					
17_025	8.854	N3				N5					
17_026	8.244					N2 and N5					
17_027	9.98	N6									
17_028	9.87			CH2-O					CH2-O		
17_029	9.319			CH2-O							
17_030	9.095					N4					
17_031	9.86	N6		CH2-O			F6				
17_032	8.995	N6					F6				N3
17_033	8.759	N6					F6				N4
17_034	9.144	N6					F6				N5
17_035	8.771	N6					F6				N6
17_036	9.871	N6					F6 N2				
17_037	9.977	N6					F6				
17_038	9.818	N6					F6 Nsomething				
17_039	10.021	N6					F6 N4				
17_040	9.837	N6					F6 N3				
17_041	10.041	N6				N5	F6				
17_042	9.906	N6				N6	F6				
17_043	9.423	N6				N2	F6				
17_044	9.481	N6				N3	F6				
17_045	9.025	N6				N5	F6				
17_046	10.222	N6 2,6- ciclohexadieno					F6				
17_047	9.646	N6 1,4-CHD					F6				

Pesquisa Computacional de Inibidores de Fatores de Virulência de *Bacillus anthracis*

17_048	9.113	N6 4,6-CHD					F6			
17_049	9.507	N6				1,4-CHD	F6			
17_050	9.773	N6				1,3-CHD	F6			
17_051	8.546	N6				1,5-CHD	F6			
17_052	9.99	N6				2,5-CHD	F6			
17_053	9.831	N6				3,6-CHD	F6			
17_054	8.993	N6				4,6-CHD	F6			
17_055	10.143	N6				2,6-CHD	F6			
17_056	9.645	N6				2,4-CHD	F6			
17_057	10.337	N6					F6 1,4-CHD			
17_058	8.489	N6					F6 1,3-CHD			
17_059	10.338	N6					F6 1,5-CHD			
17_060	10.306	N6					F6 4,6-CHD			
17_061	11.344	N6					F6 2,4-CHD			
17_062	8.908	N6					F6 2,5-CHD			
17_063	8.997	N6					F6 3,5-CHD			
17_064	9.664	N6					F6 3,6-CHD			
17_065	10.741	N6					F6 2,6-CHD			
17_066	10.069	N6					F6			2,5-CHD
17_067	10.194	N6					F6			2,6-CHD
17_068	10.323	N6					F6			2,4-CHD
17_069	10.178	N6					F6			1,5-CHD
17_070	10.313	N6					F6			3,5-CHD
17_071	10.383	N6					F6			1,4-CHD
17_072	9.49	N6					F6			3,6-CHD
17_073	10.288	N6					F6			4,6-CHD
17_074	10.111	N6					F6			1,3-CHD

Pesquisa Computacional de Inibidores de Fatores de Virulência de *Bacillus anthracis*

17_075	10.213	N6 N1					F6				
17_076	8.963	N6 N2					F6				
17_077	8.765	N6 N3					F6				
17_078	8.606	N6 N4					F6				
17_079	9.697	N6 N5					F6				
17_080	9.233	N6	F				F6				
17_081	8.727	N6			F		F6				
17_082	10.091	N6					F6	F			
17_083	8.824	N6					F6			F	
17_084	9.044	N6	H				F6				
17_085	8.974	N6			H		F6				
17_086	9.932	N6					F6	H			
17_087	8.667	N6					F6			H	
17_088	9.35	N6	Cl				F6				
17_089	9.093	N6			Cl		F6				
17_090	9.773	N6					F6	Cl			
17_091	8.966	N6					F6			Cl	
17_092	9.4	N6	CH3				F6				
17_093	8.594	N6			CH3		F6				
17_094	9.871	N6					F6	CH3			
17_095	9.075	N6					F6			CH3	
17_096	9.045	N6					F6			-NH- CH=CH-	
17_097	8.997	N6					F6			-NH- N=CH-	
17_098	9.63	N6					F6			-NH- C=O- NH-	
17_099	9.744	N6					F6			-NH-	

Pesquisa Computacional de Inibidores de Fatores de Virulência de *Bacillus anthracis*

17_100	8.421	N6					F6			C=O-O-	H	Pirrol
17_101	10.029	N6 complicate		O			F6			-NH- C=O- CH2- CH2-		
17_102	9.449	N6		CH2-O			F6					3- Hidroxipiridazina
17_103	9.816	N6 complicate		O			F6					2H-1,2,3-Triazol
17_104	9.63	N6 complicate		O			F6					
17_105	9.539	N6 complicate	SH	O			F6					
17_106	9.38	N6 complicate		O	SH		F6					
17_107	9.367	N6 complicate		O			F6	SH				
17_108	9.269	N6 complicate		O			F6				SH	
17_109	9.813						F6					N6 and 2,6-CHD
17_110	9.773						F6					N4 and N6
17_111	8.829	N6			CH=CH- NH-		F6					
17_112	9.273	N6			-CH=N- NH-		F6					
17_113	8.563	N6			-NH- C=O- NH -		F6					2 6 CHD
17_114	9.175	N6			-O- C=O- NH -		F6					
17_115	9.762	N6			H	Pirrol	F6					

Pesquisa Computacional de Inibidores de Fatores de Virulência de *Bacillus anthracis*

17_116	9.84	N6		CH2-O	-NH- C=O- CH2 - CH2 -		F6				
17_117	9.544	N6		CH2-O		3- Hidroxi piridazina	F6				
17_118	10.043	N6		CH2-O			F6		CH2-O		
17_119	9.532	N6					F6		O		
17_120	8.785	N6	F		Cl		F6				
17_121	8.75	N6	Cl				F6	F			
17_122	10.237	N6					F6; 2,4-CHD			H	3,6-CHD 2- Imidazolidona
17_123	10.09	N6					F6; 2,4-CHD			H	3,6-CHD 2- Oxazolidona
17_124	9.86	N6					F6; 2,6-CHD			-NH- C=O- NH-	
17_125	9.582	N6					F6; 2,6-CHD			-NH- C=O-O-	
17_126	9.645	N6					F6			-NH- C=O- NH-	
17_127	9.794	N6					F6			-NH- C=O-O-	
17_128	9.678	N6					F6	F		-NH- C=O- NH-	
17_129	9.79	N6					F6	F		-NH- C=O-O-	
17_130	9.927	N6								-NH- C=O- NH-	

Pesquisa Computacional de Inibidores de Fatores de Virulência de *Bacillus anthracis*

17_131	9.284	N6					-CH2-NH3+			-NH- C=O- NH-	
17_132	9.138	N6					-CH2-OH			-NH- C=O- NH-	
17_133	9.639	N6					-COO-			-NH- C=O- NH-	
17_134	10.461	N6 N5					F6			-NH- C=O- NH-	
17_135	10.702	N6 N3 N4					F6			-NH- C=O- NH-	
17_136	10.057	N6			N3 N4		F6			-NH- C=O- NH-	
17_137	10.119	N6					F6 N3 N4			-NH- C=O- NH-	
17_138	10.311	N6					F6			-NH- C=O- NH-	N4 N5
17_139	10.163	N6					F6			-NH- C=O- NH-	N3 N4
17_140	10.429	N6 N3 1,5 CHD					F6			-NH- C=O- NH-	
17_141	10.274	N6			N4 1,5 CHD		F6			-NH- C=O- NH-	
17_142	10.172	N6					F6 N4 1,5 CHD			-NH- C=O- NH-	

Pesquisa Computacional de Inibidores de Fatores de Virulência de *Bacillus anthracis*

17_143	10.115	N6					F6			-NH- C=O- NH-	N3 1,5 CHD
17_144	10.181	N6					F6			-NH- C=O- NH-	N5 ciclohex-1- eno
17_145	10.527	N6 O3 1,5 CHD					F6			-NH- C=O- NH-	
17_146	10.411	N6 O4 2,6 CHD					F6			-NH- C=O- NH-	
17_147	10.775	N6 O5 2,6 CHD					F6			-NH- C=O- NH-	
17_148	10.033	N6		O3 1,5 CHD			F6			-NH- C=O- NH-	
17_149	9.825	N6		O4 1,5 CHD			F6			-NH- C=O- NH-	
17_150	10.105	N6					3,5 CHD		-NH2+-CH2		
17_151	9.845	N6					F6 O3 1,5 CHD			-NH- C=O- NH-	
17_152	10.139	N6					F6			-NH- C=O- NH-	O3 1,5 CHD
17_153	10.105	N6					F6			-NH- C=O- NH-	O4 2,6 CHD
17_154	10.276	N6					F6			-NH- C=O- NH-	O5 2,6 CHD

17_155	10.724	NH (6) ciclohex-3-eno	=O				F6			-NH- C=O- NH-	
17_156	9.757	N6					F6			-NH- C=O-O-	
17_157	9.479	N6					-CH2-NH3+			-NH- C=O-O-	
17_158	9.523	N6					-CH2-OH			-NH- C=O-O-	
17_159	9.849	N6					F6			-NH- C=O-O-	
17_160	9.455	N6 N3 N4					F6			-NH- C=O-O-	
17_161	9.8	N4 N5 N6					F6			-NH- C=O-O-	
17_162	9.278	N6			N3 N4		F6			-NH- C=O-O-	
17_163	9.412	N6					F6 N3 N4			-NH- C=O-O-	
17_164	9.661	N6					F6			-NH- C=O-O-	N3 N4
17_165	9.794	N6 N3 1,5 CHD					F6			-NH- C=O-O-	
17_166	9.898	N4 N6 ciclohexano					F6			-NH- C=O-O-	
17_167	9.14	N6			NH (3) 1,5 CHD		F6			-NH- C=O-O-	
17_168	9.958	N6					F6 NH (3) 1,5 CHD			-NH- C=O-O-	
17_169	9.813	N6					OH (6) 3,5 CHD	H	-NH2+-CH2		
17_170	9.663	N6					F6			-NH- C=O-O-	NH (3) 1,5 CHD
17_171	10.019	N6					F6			-NH- C=O-O-	NH (4) 2,6 CHD

Pesquisa Computacional de Inibidores de Fatores de Virulência de *Bacillus anthracis*

17_172	9.806	N6				F6			-NH- C=O-O-	NH (5) 2,6 CHD
17_173	9.658	NH (6)	=O			3,5 CHD	=O	-NH2+-CH2-		
17_174	9.661	NH (6)	=O		N4	3,5 CHD	=O	-NH2+-CH2-		
17_175	9.592	NH (6)	=O		N3	3,5 CHD	=O	-NH2+-CH2-		
17_176	9.442	NH (6)	=O		N3	N4 3,5 CHD	=O	-NH2+-CH2-		
17_177	9.459	NH (6)	=O		N3	N3 3,5 CHD	=O	-NH2+-CH2-		
17_178	9.401	NH (6)	=O			3,5 CHD	=O	-NH2+-CH2-		N4
17_179	9.355	NH (6)	=O			3,5 CHD	=O	-NH2+-CH2-		N5
17_180	9.437	NH (6)	=O			3,5 CHD	=O	-NH2+-CH2-		N3
17_181	9.586	NH (6)	=O		NH(4) 1,5 CHD	3,5 CHD	=O	-NH2+-CH2-		
17_182	9.316	NH (6)	=O			N3 ciclohex-5-ene	=O	-NH2+-CH2-		N4
17_183	9.405	NH (6)	=O			3,5 CHD	=O	-NH2+-CH2-		NH (4) 1,5 CHD
17_184	9.474	NH (6)	=O			3,5 CHD	=O	-NH2+-CH2-		NH (5) 2,6 CHD
17_185	9.684	NH (6)	=O		O4 1,5 CHD	3,5 CHD	=O	-NH2+-CH2-		
17_186	9.311	NH (6)	=O			O3 ciclohex-5-ene	=O	-NH2+-CH2-		
17_187	9.343	NH (6)	=O			3,5 CHD	=O	-NH2+-CH2-		O(4) 1,5 CHD
17_188	9.223	NH (6)	=O			3,5 CHD	=O	-NH2+-CH2-		O(5) 2,6 CHD
17_189	9.383	NH (6)	=O			3,5 CHD	=O	-NH2+-CH2-		O(6) 1,3 CHD
17_190	9.525	NH (6)	=O		-O-CH3	3,5 CHD	=O	-NH2+-CH2-		
17_191	9.276	NH (6)	=O			3,5 CHD	=O	-NH2+-CH2-	-O-CH3	
17_192	9.319	NH (6)	=O		- CH2- NH3+	3,5 CHD	=O	-NH2+-CH2-		

Pesquisa Computacional de Inibidores de Fatores de Virulência de *Bacillus anthracis*

17_193	9.11	NH (6)	=O				3,5 CHD	=O	-NH2+-CH2-	- CH2-NH3+	
17_194	9.657	N6					- CH2-NH3+ (on 6) 2,4 CHD				
17_195	8.387	N6					- CH2-OH (on 6) 2,4 CHD				
17_196	9.907	N6					- COO- (on 6) 2,4 CHD				
17_197	10.198	n4 N5 N6					F (on 6) 2,4 CHD				
17_198	8.731	N3 N4 N6					F (on 6) 2,4 CHD				
17_199	9.579	N6				N3 N4	F (on 6) 2,4 CHD				
17_200	8.907	N6					N3 N4 F (on 6) 2,4 CHD				
17_201	8.461	N6					F (on 6) 2,4 CHD				N3 N4
17_202	8.639	N6					F (on 6) 2,4 CHD				N5 N4
17_203	9.59	N6					F (on 6) 2,4 CHD				N5 N6
17_204	8.696	N3 N6 ciclohex-6-ene					F (on 6) 2,4 CHD				
17_205	10.046	N4 N6 ciclohex-6-ene					F (on 6) 2,4 CHD				
17_206	10.195	N5 N6 ciclohex-6-ene					F (on 6) 2,4 CHD				
17_207	9.672	N6				N3 1,5 CHD	F (on 6) 2,4 CHD				
17_208	10.084	N6					F6 N4 1,4 CHD				
17_209	8.53	N6					F (on 6) 2,4				N3 1,5 CHD

17_210	8.758	N6					CHD F (on 6) 2,4 CHD				N4 2,6 CHD
17_211	8.788	N6					F (on 6) 2,4 CHD				N5 1,3 CHD
17_212	9.858	NH (6)	=O	CH2-O	-O- C=O- NH -	- CH2-CH=CH- CH2-	-CH2	=O	-NH2+-CH2		
17_213	9.851	NH (6)	=O	CH2-O	-NH- C=O- NH -	- CH2-CH=CH- CH2-	-CH2	=O	-NH2+-CH2		
17_214	9.578	NH (6)	=O	CH2-O	-NH- C=O-O -	- CH2-CH=CH- CH2-	-CH2	=O	-NH2+-CH2		
17_215	10.392	NH (6)	=O	CH2-O	-NH- C=O-O -		-CH2	=O	-NH2+-CH2		
17_216	10.296	NH (6)	=O	CH2-O	-NH- C=O- NH -		-CH2	=O	-NH2+-CH2		
17_217	10.116	NH (6)	=O	CH2-O	-O- C=O- NH -		-CH2	=O	-NH2+-CH2		
17_218	10.03	NH (6)	=O	CH2-O	=O	- NH	-CH2	=O	-NH2+-CH2		
17_219	9.789	NH (6)	=O		=O	- NH	-CH2	=O	-NH2+-CH2		
17_220	9.313	NH (6)	=O				-CH2	=O	-NH2+-CH2		
17_221	9.391	NH (6)	=O				-NH	=O	-NH2+-CH2		
17_222	10.772	NH (6)	=O				H	=O	-NH2+-CH2	- NH- C=O-O-	
17_223	10.496	N6					H	=O	-NH2+-CH2	- NH- C=O-O-	
17_224	10.255	N6					H	=O	-NH2+-CH2	- O- C=O- NH-	
17_225	10.483	N6					H	=O	-NH2+-CH2	-NH- C=O-	

									NH-		
17_226	9.822	N6					F		-NH2+-CH2	-NH- C=O- NH-	
17_227	9.982	n6		CH2-O					CH2-O		
17_228	9.489	n6	H	CH2-O					CH2-O		
17_229	9.414	n6	H	CH2-O	H				CH2-O		
17_230	9.228	n6	H	CH2-O	H			H	CH2-O		
17_231	8.866	n6	H	CH2-O	H			H	CH2-O	H	
17_232	8.829	n6	H	CH2-O	H	N3		H	CH2-O	H	
17_233	8.912	n6	H	CH2-O	H	N6		H	CH2-O	H	
17_234	8.953	n6	H	CH2-O	H		N3	H	CH2-O	H	
17_235	8.988	n6	H	CH2-O	H		N2	H	CH2-O	H	
17_236	9.107	n6	H	CH2-O	H			H	CH2-O	H	N4
17_237	8.901	n6	H	CH2-O	H			H	CH2-O	H	N5
17_238	8.813	n6	H	CH2-O	H	N6		H	CH2-O	H	N5
17_239	10.825	N6					2,6 CHD (OH pointing down)				
17_240	8.787	N6 O3 ciclohex-6-eno					F (on 6) 2,4 CHD				
17_241	9.823	N6 O4 ciclohex-6-eno					F (on 6) 2,4 CHD				
17_242	10.003	N6 O5 ciclohex-6-eno					F (on 6) 2,4 CHD				
17_243	9.869	N6				O3 1,5 CHD	F (on 6) 2,4 CHD				
17_244	9.487	N6					F6 O4 1,5 CHD				
17_245	9.868	N6					F (on 6) 2,4				O3 1,5 CHD

Pesquisa Computacional de Inibidores de Fatores de Virulência de *Bacillus anthracis*

						CHD			
17_246	8.576	N6				F (on 6) 2,4 CHD			O4 2,6 CHD
17_247	8.678	N6				F (on 6) 2,4 CHD			O5 1,3 CHD
17_248	9.53	NH (6) ciclohex-3-eno	=O			F (on 6) 2,4 CHD			
17_249	9.958	NH (6)	=O			-CH2-NH3+ (on 6) 2,6 CHD			
17_250	10.289	N6				-CH2-OH (on 6) 2,6 CHD			
17_251	9.715	NH (6)	=O			- Ch(OH)2 on 6 2,6 CHD			
17_252	9.055	NH (6) N3N4	=O			F6 2,6 CHD			
17_253	10.206	NH (6) N4N5	=O			F6 2,6 CHD			
17_254	8.916	N6			n3 N4	F6 2,6 CHD			
17_255	8.593	N6				F6 2,6 CHD			n3 N4
17_256	9.443	N6				F6 2,6 CHD			n4 N5
17_257	9.519	N6				F6 2,6 CHD			n6 N5
17_258	9.553	N6 N3 1,5 CHD				F6 2,6 CHD			
17_259	9.328	N6 N4 2,6 CHD				F6 2,6 CHD			
17_260	8.955	N6			n3 1,5 CHD	F6 2,6 CHD			
17_261	8.761	N6			n4 1,5 CHD	F6 2,6 CHD			
17_262	8.928	N6				F6 2,6 CHD			N3 1,5 CHD
17_263	8.932	N6				F6 2,6 CHD			N4 2,6 CHD
17_264	8.782	N6				F6 2,6 CHD			N5 1,3 CHD
17_265	8.969	N6 O3 1,5 CHD				F6 2,6 CHD			

17_266	9.05	N6 O4 2,6 CHD					F6 2,6 CHD				
17_267	8.776	N6				O3 1,5 CHD	F6 2,6 CHD				
17_268	8.829	N6				O4 1,5 CHD	F6 2,6 CHD				
17_269	8.785	N6				O4 1,5 CHD	F6 2,6 CHD				NH (3) 1,5 CHD
17_270	8.319	N6				O4 1,5 CHD	F6 2,6 CHD				O4 2,6 CHD
17_271	9.132	N6					F6 2,6 CHD				O5 1,3 CHD
17_272	8.794	NH (6) ciclohex-3-eno	=O				F6 2,6 CHD				
17_273	9.437	N6				-CH2- COO-	2,6 CHD (OH pointing up)				
17_274	9.857	N6					2,6 CHD (OH pointing up)				
17_275	10.899	N6					C16 2,6 CHD (OH pointing down)				
17_276	9.609	N6					CH2OH on 6, 2,6 CHD (OH pointing down)				
17_277	10.406	N6 CH2OH on 4					CH2NH3+ on 6, pointing down 2,6 CHD (OH pointing down)				CH2NH3+ on 6
17_278	10.542	N6 CH2OH on 4					CH2NH3+ on 6, pointing down 2,6 CHD	H			CH2NH3+ on 6
17_279	10.316	N6 CH2OH on 4			CH2OH		CH2NH3+ on 6, pointing down 2,6	H			CH2NH3+ on 6

						CHD				
17_280	10.219	N6 CH2OH on 4			CH2OH	CH2NH3+ on 6, pointing down 2,6 CHD	H		H	CH2NH3+ on 6
17_281	9.436	N6			CH2OH	CH2NH3+ on 6, pointing down 2,6 CHD	H		H	CH2NH3+ on 6
17_282	9.732									
17_283	11.035	N6				OH 6 2,4-CHD				
17_284	9.604	N6				OH 6 2,4-CHD			-NH- C=O- NH-	
17_285	10.657	NH (6) O5 2,6 CHD	o			F6			-NH- C=O- NH-	

