

# **Análise computacional da interação da isoniazida com as formas selvagem (wt) e mutante (G68R) da n-acetiltransferase de Mycobacterium tuberculosis**

JANAÍNA MENEZES PEREZ<sup>1</sup>  
RICARDO MARTINS RAMOS<sup>2</sup>  
MILLENE BORGES COELHO<sup>3</sup>  
MARIA LÚCIA ROSSETTI<sup>4</sup>  
HERMES LUIS NEUBAUER DE AMORIM<sup>5</sup>

## **RESUMO**

A tuberculose (TB) é a principal causa de morte no mundo por um agente infeccioso. A forma mais comum de tratamento da tuberculose é com o fármaco isoniazida (INH). Estudos recentes têm sugerido que a acetilação da INH pela N-acetiltransferase de Mycobacterium tuberculosis (TBNAT) possa ser uma possível causa de inativação do fármaco resultando, assim, em cepas resistentes. Neste trabalho, métodos de modelagem por homologia, docking e de simulações por dinâmica molecular foram utilizados para avaliar o efeito da mutação G68R na interação da TBNAT com a INH. Os resultados obtidos sugerem que mutações pontuais na TBNAT podem originar resistência do bacilo TB ao fármaco.

**Palavras-chave:** Mycobacterium tuberculosis, isoniazida, arilamina N-acetiltransferase, modelagem por homologia, docking.

<sup>1</sup> Acadêmica do Curso de Química Industrial/ULBRA

<sup>2</sup> Professor do Instituto Federal de Ciência e Tecnologia do Piauí; Doutorando pelo PPG em Genética e Toxicologia Aplicada (PPGGTA)/ULBRA

<sup>3</sup> Doutoranda pelo PPG em Genética e Toxicologia Aplicada (PPGGTA)/ULBRA

<sup>4</sup> Professora do Curso de Farmácia e do PPG em Genética e Toxicologia Aplicada (PPGGTA) ULBRA

<sup>5</sup> Professor-orientador do Curso de Química e do PPG em Genética e Toxicologia Aplicada (PPGGTA)/ULBRA (hlnamorim@yahoo.com.br)

## ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is the leading cause of death in the world from a bacterial infectious disease. The most common form of treatment of TB is with the drug isoniazid (INH). Recent studies have suggested that acetylation of INH by N-acetyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* (TBNAT) may be a possible cause of inactivation of the drug, thus resulting in resistant strains. In this work, methods of homology modeling, docking and molecular dynamics simulations were used to evaluate the effect of G68R mutation on the interaction of TBNAT with INH. The results suggest that mutations in TBNAT can be one of the causes of drug resistance of tuberculosis bacilli.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, isoniazid, arilamine N-acetyltransferase, homology modeling, docking.

## INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma das doenças infecciosas que mais mortes têm causado em todo mundo (SOINI; MUSSER, 2001; ROSSETTI et al., 2002; WADE; ZHANG, 2004), sendo responsável por mais de 9 milhões de novos casos/ano e cerca de 2 milhões de mortes/ano (WHO, 2007). A tuberculose apresenta incidência global, apresentando uma taxa de crescimento de 0,4% ao ano (MACEDO et al., 2009). O Brasil apresenta o mais elevado número de casos da América Latina, sendo o sexto país do mundo com maior incidência da doença (ROSSETTI et al., 2002). A situação da tuberculose se tornou ainda mais preocupante com propagação do vírus HIV em todo mundo, já que ele é capaz de debilitar o sistema imunológico do hospedeiro, permitindo a reativação do bacilo TB do estado latente, tornando a pessoa mais suscetível à reinfeção (ZHANG, 2004; CORBETTE et al., 2003). O ressurgimento acelerado da tuberculose, juntamente com a pandemia do HIV, ameaça o controle da doença e destaca necessidade de desenvolver fármacos novos e mais eficazes (ZHANG, 2004).

Desde sua introdução em 1952 (SANDY et al., 2004; ZHANG, 2004), a isoniazida (INH) se

tornou uma dos pró-fármacos de linha de frente no tratamento da tuberculose (MDLULI et al., 1998; SANDY et al., 2004). Apesar da simplicidade em sua estrutura química, o modo de ação desse pró-fármaco é complexo. A INH necessita da ativação pela catalase-peroxidase, codificada pelo gene KatG, para formar um composto ativo que possui efeito letal em alvos intracelulares (MDLULI et al., 1998). Baseado em experimentos *in vitro*, foi proposto que a ativação da isoniazida gera um alto número de espécies reativas, capazes de oxidar e acetilar grupos de proteínas (SOMOSKOVI et al., 2001). A INH representou um marco importante na quimioterapia da TB, pois se caracteriza por ser um fármaco altamente ativo e barato (ZHANG, 2004).

### Resistência do bacilo TB à isoniazida

Situações como o abandono ou tratamento inadequado são apontadas como as causas principais para o surgimento de linhagens de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a um ou mais fármacos (ROSSETTI et al., 2002; ZHANG, 2004). A resistência ao fármaco isoniazida foi observada logo após sua introdução (ESPINAL, 2003). O

mecanismo pelo qual ocorre resistência à INH tem sido atribuído a mutações individuais em inúmeros genes, como: *katG*, que codifica para a enzima catalase-peroxidase (KatG), *inhA*, que codifica para a enzima 2-trans-enoil-ACP (CoA) redutase (InhA), uma enzima envolvida na síntese dos ácidos micólicos (MACEDO et al., 2009), e *kasA*, gene que codifica para a  $\beta$ -cetoacil ACP sintase (ROSSETTI, et al., 2002; MACEDO et al., 2009). Vários estudos têm mostrado que as mutações no gene *katG* são os principais causadores da resistência (MDLULI, K., 1998). Algumas mutações em *katG* reduzem em 50% a atividade da enzima catalase-peroxidase, diminuindo a capacidade de ativação da INH. Outro gene muito freqüente na resistência é o *inhA*. Estudos estimam que mutações no gene *inhA* sejam responsáveis por aproximadamente 25% dos casos envolvendo resistência.

### **Arilamina N-acetiltransferases (NATs) como possível origem de resistência**

Além dos mecanismos de resistência mencionados anteriormente, alguns autores têm levantado a hipótese que a enzima arilamina N-acetiltransferase de *M. tuberculosis* (TBNAT) possa estar envolvida na resistência ao fármaco INH (PAYTON et al., 2001; BROOKE et al., 2003). Arilaminas N-acetiltransferases (NATs) são enzimas citosólicas (SUZUKI et al., 2007; SIM et al., 2008) que desempenham importante papel na destoxificação e ativação metabólica de xenobióticos (LIMA; DUPRET, 2002). Estudos têm indicado que a NAT *M. tuberculosis* é capaz de acetilar a INH, representando uma via adicional do metabolismo do fármaco (UPTON et al., 2001). Neste caso, a acetilação da INH pela NAT de *M. tuberculosis* tornaria a droga terapeuticamente inativa (UPTON et al.,

2001; SANDY et al., 2004). Estudos indicam que o derivado acetilado da isoniazida possui atividade 100 vezes menor *in vivo* e 500 vezes menor *in vitro* contra a bactéria TB (UPTON et al., 2001).

Neste sentido, a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no desdobramento da resistência serve de auxílio para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas visando a redução de linhagens resistentes circulantes, trazendo grandes benefícios à saúde pública (ROSSETTI et al., 2002).

Este trabalho teve como objetivo empregar métodos computacionais no estudo da interação do fármaco isoniazida (INH) com isoformas da enzima N-acetiltransferase de *Mycobacterium tuberculosis* (TBNAT). Correlacionar os dados obtidos com o mecanismo de resistência de certas cepas do bacilo TB ao fármaco INH.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Modelagem por homologia**

Modelos estruturais da TBNAT H37Rv e da TBNAT G68R foram gerados por modelagem por homologia com o emprego do programa MODELLER 9v7. A primeira etapa consistiu em procurar proteínas homólogas para TBNAT do *M. tuberculosis* H37rv (sequência de aminoácidos com código de acesso YP\_177989 na base NCBI) cujas estruturas experimentais encontram-se disponíveis no Protein Data Bank. Foram escolhidas duas estruturas molde, NAT de *M. Marinum* (MMNAT), código PDB 2VFB (2,0 Å de resolução, 76% de identidade de sequência), e NAT de *M. Smegmatis* (SMNAT), código PDB 1W6F (2,1 Å de resolução, 61% de identidade de sequência). A sequência da isoforma

mutante G68R foi obtida a partir da alteração da posição do aminoácido glicina (G) na posição 68 por uma argina (R) no arquivo FASTA da forma selvagem. Foram gerados 100 modelos independentes para cada TBNAT, sendo escolhido o modelo que apresentou valor mais negativo para a função de energia DOPE.

### **Dinâmica molecular das enzimas livres**

Duas simulações por dinâmica molecular (DM) foram realizadas usando como ponto de partida as coordenadas atômicas dos melhores modelos obtidos por modelagem por homologia para: a) arilamina N-acetiltransferase selvagem; b) arilamina N-acetiltransferase mutante (G68R). As simulações de DM foram realizadas utilizando o campo de forças GROMOS96 53a6 (OOSTENBRINK et al., 2004) implementado no pacote de programas GROMACS, versão 3.3.1 (LINDAHL, et al., 2001; VAN DER SPOEL et al., 2005). As estruturas geradas pelas simulações de DM foram analisadas por inspeção visual, através dos programas VMD (HUMPHREY et al., 1996) e DeepView (GUERX; PEITSCH, 1997), e com o programa de licença livre LIGPLOT 4.4.2 (WALLACE et al., 1995). As trajetórias das simulações foram analisadas utilizando-se os módulos de análise do programa GROMACS.

### **Docking molecular**

Para o *docking* da isoniazida foram escolhidas as conformações de energia mínima, de RMSD mínimo e de RMSD máximo da etapa de produção das simulações tbnatwt e tbnatg68r. Os cálculos de *docking* foram realizados com o programa Autodock

4.2 (MORRIS; LIM-WILBY, 2008), escolhendo-se o algoritmo genético lamarquiano (LGA) para a busca de geometrias otimizadas. Foram atribuídas cargas Gasteiger aos átomos dos ligantes e da enzima. Para os cálculos de *docking*, foi empregada uma resolução de 0,375 Å para a malha de afinidade (grid), que consistiu de 40 x 40 x 40 pontos. O centro da malha de afinidade foi definido a partir das coordenadas do átomo de enxofre da cisteína catalítica (Cys70). A INH foi tratada como flexível. No receptor, os resíduos Phe38 e Tyr69 foram tratados como flexíveis. Cada simulação de *docking* LGA consistiu de 100 corridas independentes, sendo escolhido 27.000 o número de gerações em cada corrida. O número máximo de avaliações de energia foi fixado em 100.000.000. O elitismo foi fixado em 1, a taxa de mutação em 0,02 e a taxa de *crossover* em 0,80. Ao final das simulações de *docking*, as configurações finais dos ligantes que diferiram em menos de 1 Å em RMSD foram agrupadas e analisadas como um único resultado.

### **Dinâmica molecular das enzimas complexadas**

As configurações mais adequadas da INH, obtidas nos procedimentos de *docking*, foram usadas para as simulações dos complexos. O procedimento geral das simulações dos complexos foi mesmo empregado nas simulações das enzimas livres, exceto pelo tempo de simulação, que foi de 5ns.

### **Preparação da isoniazida**

A geometria molecular da isoniazida foi pré-otimizada com o método de mecânica quântica semi-empírico AM1 (Austin Model 1) (DEWAR et al., 1985) implementado no programa ArgusLab. O modelo gerado foi

posteriormente submetido a cálculo tipo *single-point* pelo método HartreeFock, implementado no programa Gaussian (FRISCH et al., 2004), com conjunto de bases 6-31G\*\* (d,p). Neste procedimento, cargas atômicas foram geradas através do método do potencial eletrostático molecular quântico, MEP (*Molecular Electrostatic Potential*) (CHUANG et al., 1998), esquema CHELPG (*Charges from Electrostatic Grid Based*) (BRENEMAN; WIBERG, 1990). A topologia da isoniazida foi gerada através do programa ProDRG (VAN AALTEN et al., 1996). Com exceção das cargas atômicas, que foram substituídas pelas cargas CHELPG, os demais parâmetros obtidos através do ProDRG foram mantidos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Modelagem por homologia

As enzimas TBNAT selvagem e mutante foram obtidas através modelagem por homologia, pois suas estruturas 3D experimentais não estão disponíveis no banco de dados Protein Data Bank (PDB). De acordo com Fullam e colaboradores (2008), a baixa solubilidade da TBNAT expressada pela

via recombinante impede que se façam estudos estruturais experimentais com esta enzima. Desta forma, a modelagem por homologia foi utilizada para gerar modelos 3D das isoformas selvagem e mutante (G68R) da TBNAT. Foram utilizadas duas enzimas como estruturas moldes, a arilamina N-acetiltransferase de *M. smegmatis* (SMNAT) e a arilamina N-acetiltransferase de *M. marinum* (MMNAT). Estas enzimas foram escolhidas como molde com base no alto grau de homologia com a TBNAT (SMNAT 61% e MMNAT 76%).

Na Tabela 1 são comparados os valores dos parâmetros estereoquímicos de MMNAT e SMNAT, estruturas molde, com os valores obtidos para a TBNAT selvagem e mutante. Os resultados foram gerados pelos programas PROCHECK, VERIFY 3D e ERRAT implementados no servidor SAVES (*Structural Analysis and Verification Server*). Comparando os valores obtidos para as estruturas moldes com os valores obtidos para as estruturas modelos, pode-se considerar que as estruturas geradas apresentam boa qualidade estereoquímica. Contudo, a ausência de resolução para o segmento C-terminal nas estruturas molde resultou que a região correspondente nos modelos ficasse distorcida (dados não mostrados). Assim, uma etapa adicional de refinamento foi realizada por dinâmica molecular de 10ns.

**Tabela 1** - Parâmetros estereoquímicos das estruturas cristalográficas usadas como molde e das estruturas modelo geradas com o programa Modeller

Estrutura	Procheck				Fator G		Verify 3D	Errat	
	Fav. <sup>a</sup>	Perm. <sup>b</sup>	Gen. <sup>c</sup>	Des. <sup>d</sup>	Die. <sup>e</sup>	Glob. <sup>f</sup>	3D-1D%	Esc. <sup>g</sup>	Qualidade Global
MMNAT	85,6	12,2	1,3	0,9	-0,3	-0,1	99,27	>0,2	97,34
SMNAT	90,4	9,2	0,4	0	-0,22	-0,07	99,64	>0,2	96,89
Tbnat-wt	89,6	9,6	0,8	0	-0,13	-0,14	91,9	>0,2	80,45
Tbnat-g68r	89,6	9,1	0,8	0,4	0,01	-0,08	100	>0,2	85,77

<sup>a</sup>percentual de resíduos em regiões mais favorecidas; <sup>b</sup>percentual de resíduos em regiões permitidas; <sup>c</sup>percentual de resíduos em regiões generosamente permitidas; <sup>d</sup>percentual de resíduos em regiões não permitidas; <sup>e</sup>fator G (ENGH; HUBER, 1991), log probabilidade relativo aos ângulos diedros; <sup>f</sup>fator G (ENGH; HUBER, 1991), log probabilidade relativo às propriedades estereoquímicas globais; <sup>g</sup>escore

## Dinâmica molecular

Com as estruturas geradas a partir da modelagem por homologia foram realizadas oito simulações de dinâmica molecular distintas, que estão apresentadas na Tabela 2. Duas das simulações foram executadas por 10 ns com as enzimas TBNAT selvagem e mutante não complexadas como etapa de refinamento das estruturas obtidas por modelagem por homologia. Outras seis simulações foram realizadas na forma de complexos onde a INH foi docada nas conformações de energia mínima, RMSD mínimo e

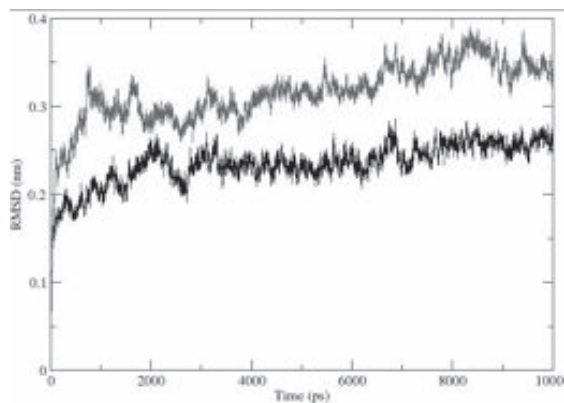
RMSD máximo obtidas na etapa de produção (5-10 ns) das simulações das enzimas livres.

As simulações realizadas para refinamento (tbnatwt e tbnatg68r) foram analisadas com o objetivo de avaliar o comportamento dos modelos gerados por modelagem por homologia. Foram feitas análises do desvio médio quadrático (RMSD) das posições atômicas, raio de giro (Rg), superfície acessível ao solvente (SASA), flutuação do desvio médio quadrático (RMSF) e número total de ligações de hidrogênio intramoleculares (NTLH).

**Tabela 2 -** Resumo das simulações realizadas

Simulação	Identificação	TBNAT	Ligante	Período simulado
1	tbnatwt	selvagem	-	10ns
2	tbnatg68r	mutante (G68R)	-	10ns
3	tbnatwt-inh_emin	selvagem	INH	5ns
4	tbnatg68r-inh_emin	mutante (G68R)	INH	5ns
5	tbnatwt-inh_rmin	selvagem	INH	5ns
6	tbnatg68r-inh_rmin	mutante (G68R)	INH	5ns
7	tbnatwt-inh_rmax	selvagem	INH	5ns
8	tbnatg68r-inh_rmax	mutante (G68R)	INH	5ns

Em função da limitação de espaço, apenas o gráfico da análise de RMSD (Figura 1) será discutido. O gráfico de RMSD mostra o desvio médio quadrático das posições dos átomos, ou seja, o quanto a estrutura da proteína muda em relação à estrutura inicial. Neste caso, podemos observar que há uma reorganização do sistema durante a simulação e uma tendência a estabilizar a partir dos 5ns de simulação. As trajetórias mostradas no gráfico podem ser divididas em três etapas, descritas a seguir: a) termalização, onde o sistema foi lentamente aquecido até a temperatura de 310 K por 25ps; b) ambientação, período onde o sistema sofreu um processo de relaxamento, até alcançar o equilíbrio termodinâmico, c) produção, onde o sistema se encontra estabilizado, a partir dos 5ns de simulação. Nesta última etapa, os valores dos parâmetros estruturais podem flutuar em torno de um valor médio.



**Figura 1 -** Desvio Médio Quadrático (RMSD) da estrutura da TBNAT selvagem (inferior) e da TBNAT mutante (superior), ambas na forma livre. Cálculo realizado com módulo *g\_rms* do programa GROMACS (VAN DER SPOEL et al., 2005).

A Tabela 3 mostra os valores médios dos parâmetros estruturais RMSD, determinado para os carbonos alfa (Calfa) e para todos os átomos da proteína (ALL), raio de giro (Rg), superfície acessível ao solvente (SASA), e número de ligações de hidrogênio intramoleculares (NTLH) da proteína, calculados para a etapa de produção das simulações de dinâmica molecular da TBNAT selvagem e mutante (5-10 ns). De uma forma geral, pode-se considerar que estes valores estão de acordo com o que se é esperado para simulações estáveis (de AMORIM et al., 2009).

Pode-se observar que, com exceção do RMSD, a diferença nos valores dos demais parâmetros é muito próxima, no caso do raio de giro, ou se encontra dentro da variação do desvio médio, no caso da superfície acessível ao solvente e do número de ligações de hidrogênio intramoleculares. A manutenção dos valores de Rg, SASA e NTLH intramoleculares nas simulações tbnatwt e tbnatg68r, combinada com a diferença significativa encontrada para o RMSD, é indicativo de que a mutação G68R provoca alterações conformacionais sutis na TBNAT.

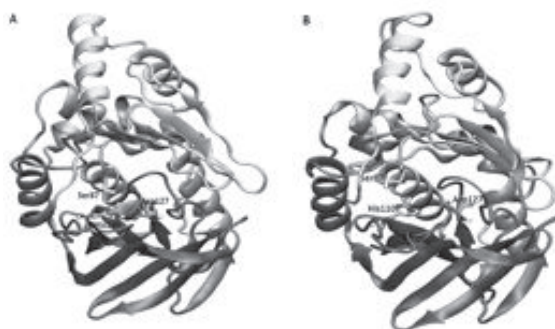
**Tabela 3** - Média dos parâmetros estruturais na etapa de produção (últimos 5ns)

Estrutura	RMSD		Rg	SASA	NTLH <sub>intra</sub>
	Calfa	ALL			
tbnat_wt	0,21±0,01	0,24±0,01	1,86±0,01	79,62±1,83	201,13±7,84
tbnat_g68r	0,30±0,02	0,34±0,02	1,84±0,01	78,42±1,75	206,00±7,14

RMSD: desvio médio quadrático; Rg: raio de giro; SASA: superfície acessível ao solvente; NTLH: número de ligações de hidrogênio intramoleculares.

As estruturas tridimensionais obtidas no final do refinamento por DM são mostradas na Figura 2. Pode-se observar que as enzimas apresentam os domínios característicos de enzimas N-acetiltransferase. A geometria Cys70, His110

e Asp127 da tríade catalítica está pré-organizada para a atividade enzimática apenas na enzima selvagem, enquanto que na TBNAT mutante a conformação das cadeias laterais afasta-se um pouco do arranjo ideal.



**Figura 2** - Estrutura final dos modelos da TBNAT selvagem (A) e TBNAT mutante (B) após 10 ns de simulação de dinâmica molecular. Domínio I, N-terminal (ciano), domínio II (vermelho), interdomínio (cinza), domínio III, C-terminal (amarelo).

## Simulações de DM dos complexos

Da etapa de produção das simulações tbnatwt e tbanatg68r foram escolhidas algumas conformações representativas, para o docking da isoniazida: conformação de menor energia potencial, conformação de menor valor de RMSD e conformação de maior valor de RMSD. A Tabela 4 apresenta os valores dos parâmetros obtidos nas

simulações de *docking*. A análise do *docking* foi concentrada nos *clusters* de menor energia e de maior número de conformações. Em cada *cluster* foi escolhida a conformação de menor energia como estrutura inicial para as simulações dos complexos. Além da análise do *cluster* de menor energia, foi observada a orientação do grupo NH<sub>2</sub> da INH em relação ao grupo SH da cisteína catalítica para a definição da conformação utilizada nas simulações de DM.

**Tabela 4** - Parâmetros de *docking* para as conformações de energia mínima, RMSD mínimo e RMSD máximo obtidas pela simulação de dinâmica molecular

Conformação	Sistema	Energia mínima $\Delta G_{\text{bind}}$ (kcal/mol)	Número de conformações no <i>cluster</i>	Energia da conformação usada <sup>a</sup> - $\Delta G_{\text{bind}}$ (kcal/mol)	Número de conformações no <i>cluster</i>
Emin	tbnat_wt	-11,82	90	-11,82	90
	tbnat_g68r	-12,29	5	-12,29	5
RMSDmin	tbnat_wt	-10,46	68	-10,46	68
	tbnat_g68r	-11,32	7	-9,95	61
RMSDmáx	tbnat_wt	-10,81	89	-10,81	89
	tbnat_g68r	-12,26	5	-12,26	5

<sup>a</sup>Usada nos casos em que o *cluster* com maior número de conformações representou condição de ligação mais razoável que o *cluster* de energia mínima

A INH foi docada nas conformações de energia mínima, RMSD mínimo e RMSD máximo extraídas da etapa de produção das simulações tbnatwt e tbanatg68r. Foram efetuadas as análises com o objetivo de se avaliar o modo de interação e a afinidade da isoniazida com as duas isoformas. Como parâmetros de afinidade foram considerados as distâncias entre grupos de interesse, o número de ligações de hidrogênio, o

número de contatos de van der Waals e a energia livre de interação ( $\Delta G_{\text{bind}}$ ), que foi obtida por dois métodos: a) na simulação de *docking*, através da função de escore implementada no programa AUTODOCK e b) a partir na simulação de DM através do método linear interaction energy (LIE) (AQVIST e MARELIUS, 2001). Os valores médios de alguns parâmetros analisados são mostrados na Tabela 5.



**Tabela 5 -** Parâmetros de afinidade de interação INH-NAT nas simulações de DM

Simulação	NLH (3-5ns)	Nvdw (LIGPLOT)	$\Delta G_{\text{bind}}$ (docking)(kcal/mol)	$\Delta G_{\text{bind}}$ (LIE)-DM (kcal/mol)
tbnatwt-inh_emin	2,31±0,89	4	-11,82	-10,10
tbnatg68r-inh_emin	2,26±1,01	4	-12,29	-10,61
tbnatwt-inh_rmin	0,67±0,49	3	-10,46	-9,99
tbnatg68r-inh_rmin	3,38±0,74	1	-9,95	-11,31
tbnatwt-inh_rmax	1,89±0,99	1	-10,81	-10,36
tbnatg68r-inh_rmax	4,56±0,86	3	-12,26	-10,81

NLH: número médio de ligações de hidrogênio calculado para a etapa de produção da DM; Nvdw: número de contatos de van der Waals calculado pelo programa LIGPLOT (estrutura final em 5ns); LIE: energia livre de ligação calculada pelo método LIE (0-5ns)

Ligações de hidrogênio constituem um parâmetro importante na interação fármaco-receptor (PATRICK, 2001). O complexo da TBNAT selvagem com maior número de ligações de hidrogênio na etapa de produção ocorreu na simulação *tbnatwt-inh\_emin* ( $2.31 \pm 0.89$ ) enquanto que para o sistema TBNAT-G68R ocorreu na simulação *tbnatg68r-inh\_rmax* ( $4.56 \pm 0.86$ ). Para o sistema selvagem, o maior número de contatos, observado na simulação *tbnatwt-inh\_emin* (NLH:  $2.31 \pm 0.89$ ; NvdW: 4) não está relacionado com a energia de interação mais favorável, encontrada na simulação *tbnatwt-inh\_rmax* (-10.36 kcal/mol). Por outro lado, a interação da isoniazida com Cys70 é mantida somente na simulação *tbnatwt-inh\_rmin* (dados não mostrados). Tais resultados não são surpreendentes, considerando que a interação da INH com a TBNAT selvagem é de baixa afinidade, o que pode permitir vários modos fracos de ligação, não efetivos. No caso do sistema mutante, pode-se atribuir como modo mais provável de interação aquele indicado pela simulação *tbnatg68r-inh\_rmin*, onde é encontrada a energia de interação mais favorável (-11.31 kcal/mol) e é observada a formação de ligação de hidrogênio com Cys70.

De uma forma geral, pode-se considerar que a interação da isoniazida com a isoforma mutante G68R da TBNAT é de maior afinidade do que com

a forma selvagem. Levando em conta a diferença entre os valores médios de interação para as três simulações de cada sistema, o maior número de ligações de hidrogênio e a energia de interação mais favorável, tanto pelo *docking* quanto pelo método LIE, são encontrados para a isoforma mutante da TBNAT. Aspectos estruturais que podem explicar a menor afinidade da isoniazida com a forma selvagem da TBNAT podem estar relacionados com a desestruturação da primeira fita beta da região que forma a aba (*lid*) do domínio C-terminal. O gráfico de RMSF (não mostrado) da TBNAT selvagem livre mostra um pico de flexibilidade nesta região, que faz face ao sítio ativo. Neste sentido, autores têm apontado a região C-terminal como importante na regulação da atividade catalítica e especificidade de NATs procarióticas e eucarióticas (PAYTON; SIM, 1998).

## CONCLUSÃO

A qualidade estereoquímica dos modelos estruturais obtidos para as isoformas selvagem e mutante G68R da arilamina N-acetiltransferase de *Mycobacterium tuberculosis* é comparável com a qualidade das estruturas molde experimentais, caracterizando que os modelos são confiáveis. Comparando as estruturas

selvagem e mutante, pode-se observar que o segmento relacionado com a primeira fita beta que compõe a aba da região C-terminal é menos extenso e mais flexível na TBNAT selvagem. Parâmetros de interação equivalentes não permitiram a definição do modo mais provável de interação da isoniazida com a isoforma selvagem da TBNAT. Os resultados podem ser atribuídos à baixa afinidade entre o par fármaco-enzima. É possível considerar que a interação da isoniazida com a isoforma mutante G68R da TBNAT é de maior afinidade do que com a forma selvagem. Como consequência, não se pode descartar a possibilidade de que mutações pontuais na região codificante do gene *kat* de *M. tuberculosis* possam gerar isoformas capazes de inativar o fármaco isoniazida. Os resultados obtidos no presente estudo podem contribuir para o planejamento de terapias mais eficientes contra a tuberculose, por duas razões: a) considerando o possível papel da TBNAT na síntese dos ácidos micólicos, esta enzima se caracteriza com um novo alvo para a terapia anti-TB; b) por outro lado, o surgimento de cepas com mutações específicas no gene *kat* pode levar à inativação do fármaco através da acetilação da INH.

## REFERÊNCIAS

- AMORIM, H. L. N.; NETZ, P. A.; GUIMARÃES, J. A. Thrombin allosteric modulation revisited: a molecular dynamics study. *Journal of Molecular Modeling*, v. 16, n. 4, p. 725-735, abr. 2010.
- AQVIST, J.; MARELIUS J. The linear interaction energy method for predicting ligand binding free energies. *Comb Chem High Throughput Screen*, v. 4, n. 8, p. 613-626, 2001.
- BRENEMAN, C. M.; WIBERG, K. B. Determining atom-centered monopoles from molecular electrostatic potentials. The need for high sampling density in formamide conformational analysis. *J. Comput. Chem.*, v. 11, p. 361-373, 1990.
- BROOKE, E. W. et al. An Approach to Identifying Novel Substrates of Bacterial Arlamine N-Acetyltransferases. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 11, p. 1227-1234, 2003.
- CHUANG, Y. Y.; CRAMER, C. J.; TRUHLAR, D. G. The interface of electronic structure and dynamics for reactions in solution. *Int. J. Quantum Chem.*, v. 70, p. 887-896, 1998.
- CORBETT, E. L. et al. The growing burden of tuberculosis: Global trends and interactions with the HIV epidemic. *Arch Intern Med*, v.163, p. 1009-1021, 2003.
- DEWAR, M. J. S. et al. AM1: A New General Purpose Quantum Mechanical Molecular Model. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 107, p. 3902-3909, 1985.
- ESPINAL, M. A. The global situation of MDR-TB. *Tuberculosis (edinb)*, v. 83, p. 44-51, 2003.
- FRISCH, M. J. et al. *Gaussian 03: Revision C.03*. [S.l.]: Gaussian, Wallingford CT, 2004.
- FULLAM, E. et al. Divergence of Cofactor Recognition across Evolution: Coenzyme A Binding in a Prokaryotic Arylamine N-acetyltransferase. *J. Mol. Biol.*, v. 375, p. 178-191, 2008.
- GUEx, N.; PEITSCH, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, v. 18, p. 2714-2723, 1997.
- HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph*, v. 14, n. 1, p. 33-38, 1996.
- LIMA, F. R.; DUPRET, J. M. 3D Modelo f Hu-

man Arylamine N-Acetyltransferase 2: Structural Basis of the Slow Acetylator Phenotype of the R64Q Variant and Analysis of the Active-Site Loop. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 291, p. 116-123, 2002.

LINDAHL, E.; HESS, B.; VAN DER SPOEL, D. GROMACS 3.0: A package for molecular simulation and trajectory analysis. *J. Mol. Mod.*, v. 7, p. 306-317, 2001.

MACEDO, R.; AMORIM, A.; PEREIRA, E. Tuberculose multirresistente: Detecção direta em amostras respiratórias com método de genética molecular MTBDRplus. *Revista Portuguesa de pneumologia*, v. 15, p. 353-365, 2009.

MDLULI, K. et al. Inhibition of a Mycobacterium tuberculosis  $\beta$ -Ketoacyl ACP Synthase by Isoniazid. *Science*, v. 280, p. 1607-1609, 1998.

MORRIS, G. M.; LIM-WILBY, M. Molecular docking. In: KUKOL, A. *Molecular Modeling of Proteins*. Totowa: Humana Press, 2008. p. 365-382.

OOSTENBRINK, C. et al. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *J. Comput. Chem.*, v. 25, p. 1656-1676, 2004.

PATRICK, G. L. *An Introduction to Medicinal Chemistry*. 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 2001.

PAYTON, M. et al. Evidence towards the role of arylamine N-acetyltransferase in Mycobacterium smegmatis and development of specific antiserum against the homologous enzyme of Mycobacterium tuberculosis. *Microbiology*, v. 147, p. 3295-3320, 2001.

PAYTON, M. A.; SIM, E. Genotyping human arylamine N-acetyltransferase type 1 (NAT1): the identification of two novel allelic variants. *Biochem. Pharmacol.*, v. 55, p. 361-366, 1998.

ROSSETTI, M. L. R. et al. Tuberculose resistente: revisão molecular. *Ver. Saúde Pública*, v. 36, p. 525-532, 2002.

SANDY, J. et al. Binding of the anti-tubercular drug isoniazid to the arylamine N-acetyltransferase protein from Mycobacterium tuberculosis. *Protein science*, v. 14, p. 775-782, 2004.

SIM, E. et al. Arylamine N-acetyltransferases: Structural and functional implications of polymorphisms. *Toxicology*, v. 254, p. 170-183, 2008.

SOINI, H.; MUSSER, J. M. Molecular diagnosis of mycobacteria. *Clin chem*, v. 47, p. 809-814, 2001.

SOMOSKOVI, A.; PARSONS, L. M.; SALFINGER, M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in Mycobacterium tuberculosis. *Respir Res*, v. 2, p. 164-168, 2001.

SUZUKI, H.; OHNISHI, Y.; HORINOUCI, S. Arylamine N-Acetyltransferase Responsible for Acetylation of 2-Aminophenols in Streptomyces griseus. *Journal of Bacteriology*, v. 189, n. 5, p. 2155-2159, 2007.

UPTON, A. M. et al. Arylamine N-acetyltransferase of Mycobacterium tuberculosis is a polymorphic enzyme and a site of isoniazid metabolism. *Molecular Microbiology*, v. 42, n. 2, p. 309-317, 2001.

VAN AALTEN, D. M. F. et al. PRODRG, a program for generating molecular topologies and unique molecular descriptors from coordinates

of small molecules. *J. Comp. Aid. Molec. Des.*, v. 10, p. 255-262, 1996.

VAN DER SPOEL, D. et al. GROMACS: Fast, Flexible, and Free. *J Comput Chem.*, v. 26, p. 1701–1718, 2005.

WADE, M. M.; ZHANG, Y. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in Bioscience*, v. 9, p. 975-994, 2004.

WALLACE, A. C.; LASKOWSKI, R. A.;

THORNTON, J. M. LIGPLOT: A program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Prot. Eng.*, v. 8, p. 127-134, 1995.

WORLD HEART ORGANIZATION. *Global Report 2009*. Disponível em: [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/2009/en/index.html](http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/en/index.html) Acesso em: 15 jul. 2010.

ZHANG, Y. The Magic bullets and tuberculosis drug targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, v. 45, p. 529-564, 2005.