



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



**“ESTUDO DE AZAÇÚCARES COMO INIBIDORES DE GLGE, UMA
MALTOSILTRANSFERASE DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*,
POR MEIO DE *DOCKING* MOLECULAR E DA AVALIAÇÃO DE
INTERAÇÕES MOLECULARES”**

Sofia Dallasta Pedroso

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos para obtenção do título de Mestre.

Orientador:

Prof. Dr. Julio Zukerman Schpector

Bolsista CNPq 164735/2021-6

**São Carlos - SP
2023**

SOFIA DALLASTA PEDROSO

“Estudo de azaçúcares como inibidores de IgE, uma maltosiltransferase de *Mycobacterium tuberculosis*, por meio de *docking* molecular e da avaliação de interações moleculares”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos para obtenção do título de Mestre.

Orientador:

Prof. Dr. Julio Zukerman Schpector

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Julio Zukerman Schpector
Departamento de Química – UFSCar

Prof. Dr. Antonio César Silva Sacco
Departamento de Química - FATEC

Profª. Drª. Stella Hernandez Maganhi
Departamento de Química - UEMG

São Carlos
2023

DEDICATÓRIA

À minha querida vó Bene. A guardarei comigo sempre em meu coração e em minha memória. Esta dissertação é dedicada a você, vó Bene, como uma forma de agradecimento por tudo o que fez por mim e pela minha formação. O seu legado de amor, perseverança e dedicação sempre estará presente em minha vida e na vida daqueles que tiveram a sorte de conhecê-la.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar a minha gratidão a todas as pessoas e instituições que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho:

Ao meu orientador, o Prof. Dr. Julio Zukerman Schpector, por ter me guiado ao longo deste processo, pelo conhecimento transmitido e pelos conselhos sempre precisos;

À Profa. Dra. Ignez Caracelli, que me ajudou a crescer como cientista e me motivou a buscar sempre o melhor;

Aos membros da banca de qualificação Prof^a Dr^a Stella Hernandez Maganhi e Prof. Dr. Antonio César Silva Sacco, pelas contribuições para o aperfeiçoamento do trabalho desenvolvido;

Ao Prof. Dr. Antonio César Silva Sacco por gentilmente ceder o programa WIM em que foram desenvolvidos parte dos cálculos apresentados no presente trabalho;

Ao Dr. Ariel Lázaro Llanes García pelos compostos avaliados neste trabalho;

Aos meus amigos, pela compreensão nos momentos em que precisei me dedicar mais à pesquisa, pelo incentivo e pela presença – mesmo que distante – no dia a dia;

À minha família, em especial aos meus pais, por todo o amor, apoio e incentivo que me deram em todos os momentos da minha vida;

À minha irmã, que sempre esteve presente e me ajudou com palavras de incentivo;

Ao Felipe, pelo amor, paciência e compreensão ao longo deste período;

À CAPES e CNPq pelo financiamento, que possibilitou a realização deste trabalho;

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, por me oferecer a oportunidade de desenvolver este projeto e ampliar os meus conhecimentos na área.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

Dallasta Pedroso, Sofia **Estudo de açúcares como inibidores de GlgE, uma maltosiltransferase de *Mycobacterium tuberculosis*, por meio de *docking* molecular e da avaliação de interações moleculares.** 2023. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia – UFSCar, São Carlos, 2023.

RESUMO

A tuberculose é uma doença ainda preocupante em todo o mundo, especialmente em países de baixa e média renda. O tratamento atual para a tuberculose envolve uma combinação de antibióticos, no entanto, frequentemente é ineficaz devido à resistência aos medicamentos e à dificuldade de eliminar completamente a bactéria causadora da doença, *Mycobacterium tuberculosis*. Nesse contexto, o uso do *docking* molecular é uma ferramenta promissora no desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento da tuberculose. O *docking* molecular consiste na análise computacional do encaixe de moléculas candidatas a fármacos com proteínas da bactéria, permitindo assim identificar compostos promissores e ainda otimizar sua eficácia, o seu uso visa acelerar o desenvolvimento de novos medicamentos, melhorando a eficácia do tratamento da tuberculose. Neste contexto os açúcares têm sido estudados como possíveis fármacos para o tratamento da tuberculose, devido à sua capacidade de inibir a enzima maltosiltransferase (GlgE), essencial para a sobrevivência do *Mycobacterium tuberculosis*. Além disso, os açúcares apresentam baixa toxicidade e alta seletividade, aumentando sua eficácia terapêutica. Nesse sentido, no presente trabalho descrevemos o estudo três séries de açúcares com o objetivo de avaliar seu potencial como anti-tuberculosos com alvo na GlgE. Os resultados apontam para um composto, denominado A532 neste estudo, como uma substância de interesse farmacológico para esse fim, devido à sua interação favorável com o sítio ativo da enzima, explicada pela existência de uma rede de interações π e ligações de hidrogênio. Além disso, os resultados apresentados trazem maiores informações sobre a estrutura de possíveis açúcares inibidores de GlgE e sua relação com os resíduos que compõem o sítio ativo.

Palavras-chave: Tuberculose, GlgE, *docking* molecular, inibidor seletivo.

Dallasta Pedroso, Sofia **Study of aza-sugars as inhibitors of GlgE, a maltosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis*, through molecular docking and evaluation of molecular interactions.** 2023. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2023

ABSTRACT

Tuberculosis is still a worrying disease around the world, especially in low- and middle-income countries. Current treatment for tuberculosis involves a combination of antibiotics, however, it is often ineffective due to drug resistance and the difficulty of completely eliminating the disease-causing bacteria, namely *Mycobacterium tuberculosis*. In this context, the use of molecular docking is a promising tool in the development of new drugs for the treatment of tuberculosis. Molecular docking consists of the computational analysis of the fitting of a drug candidate molecule with bacterial proteins, thus allowing the identification of promising compounds and optimizing their effectiveness. Its use aims to accelerate the development of new drugs, improving the effectiveness of tuberculosis treatment. In this context, azasugars have been studied as possible drugs for the treatment of tuberculosis, due to their ability to inhibit the enzyme maltosyltransferase (GlgE), essential for the survival of *Mycobacterium tuberculosis*. Furthermore, azasugars have low toxicity and high selectivity, increasing their therapeutic efficacy. In this sense, in the present work we describe the study of three series of azasugars with the aim of evaluating their potential as anti-tuberculosis drugs targeting GlgE. The results point to a compound, called A532 in this study, as a substance of pharmacological interest for this purpose, due to its favorable interaction with the active site of the enzyme, explained by the existence of a network of π interactions and hydrogen bonds. Furthermore, the results presented provide further information about the structure of possible GlgE-inhibiting azasugars and their relationship with the residues that make up its active site.

Keywords: Tuberculosis, GlgE, molecular *docking*, selective inhibitor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura tridimensional de GlgE em hélices, loops e folhas, com superfície.	27
Figura 2. Reação que ocorre para o processamento do substrato natural em GlgE.	27
Figura 3. Estrutura geral de aza-açúcares.	28
Figura 4. Estrutura de DDGIM.	28
Figura 5. Estrutura 2D dos seis ligantes avaliados no estudo.	32
Figura 6. Parâmetros utilizados pelo WIM para determinação das interações π .	35
Figura 7. Ligante RZM na cavidade de ligação de 4U2Y e sua estrutura 2D.	37
Figura 8. Subsítios que formam o sítio ativo de GlgE. O subsítio -1 é apresentado em verde e o subsítio -2, em azul.	38
Figura 9. Ligações de hidrogênio entre o substrato cristalográfico RZM e o sítio ativo de GlgE.	39
Figura 10. Interações envolvendo sistemas π entre RZM e o sítio ativo de GlgE.	40
Figura 11. Pose do <i>redocking</i> – em verde - em relação ao ligante cristalográfico – em cinza.	41
Figura 12. Projeção do anel de cinco membros em direção à abertura ligada ao subsítio -2 estabilizada pela ligação de hidrogênio com K264.	43
Figura 13. Ligações de hidrogênio entre A591 e os resíduos do sítio de ligação de GlgE.	44
Figura 14. Interações de van der Waals entre A591 e o sítio ativo de GlgE.	44
Figura 15. Ligações de hidrogênio entre A592 e o sítio ativo de GlgE.	46
Figura 16. Interações π entre A592 e o sítio ativo de GlgE.	46
Figura 17. Interações de van der Waals entre A592 e o sítio ativo de GlgE.	47
Figura 18. Posicionamento geral de A591 e A592 no sítio ativo de GlgE.	48
Figura 19. Ligações de hidrogênio para A481 no sítio de ligação de GlgE.	51
Figura 20. Projeção de A481 na abertura ligada ao subsítio -1 e ligação de hidrogênio com Y357.	52
Figura 21. Ligação π para o ligante A481.	53
Figura 22. Interações de van der Waals observadas em A481.	53
Figura 23. Anel aromático de A481 projetado pela abertura ligada ao subsítio -2 e hidrofobicidade da região.	54
Figura 24. Ligações de hidrogênio entre A482 e o sítio ativo de GlgE.	55
Figura 25. Interação π em A482.	56
Figura 26. Interação de van der Waals entre A482 e S279.	56
Figura 27. Anel aromático de A482 projetado pela abertura ligada ao subsítio -1 e hidrofobicidade da região.	57
Figura 28. Sobreposição entre os ligantes A481 (em rosa) e A482 (em azul).	58
Figura 29. Ligações de hidrogênio para A531.	59
Figura 30. Interações π para A531.	60
Figura 31. Interação de van der Waals para A531.	60
Figura 32. Sobreposição de A481 (em rosa) e A531 (em laranja) no sítio de ligação de GlgE.	61

Figura 33. Parte das ligações de hidrogênio para A532.	63
Figura 34. Parte das ligações de hidrogênio para A532.	63
Figura 35. Interações π em A532.	64
Figura 36. Interações de van der Waals em A532.	65
Figura 37. Sobreposição dos ligantes A482 e A532.	66
Figura 38. Posicionamento no sítio ativo de GlgE dos ligantes A531 e A532.	66
Figura 39. Avaliação da hidrofobicidade da região em que se projetam os anéis exclusivos à série A53 em a. A531 e b. A532.	68
Figura 40. Interações entre S279 e A591 (em amarelo), A592 (em roxo), A481 (em rosa), A482 (em azul), A531 (em laranja) e A532 (em ciano).	70
Figura 41. Interações entre Y357 e A591 (em amarelo), A592 (em roxo), A481 (em rosa), A482 (em azul), A531 (em laranja) e A532 (em ciano).	71
Figura 42. Interação entre D480 e os ligantes A481 (em rosa), A482 (em azul), A531 (em laranja) e A532 (em ciano).	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais vias alvo para compostos contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	15
Tabela 2. Resumo dos principais fármacos avaliados contra tuberculose	20
Tabela 3. Resultado do levantamento de estruturas no PDB	36
Tabela 4. Interações entre os compostos analisados e os resíduos da cavidade de ligação	42
Tabela 5. Interações entre A591 e o sítio ativo de GlgE	43
Tabela 6. Interações entre A592 e o sítio ativo de GlgE	45
Tabela 7. Detalhamento das interações entre A481 e GlgE	51
Tabela 8. Detalhamento das interações para A482	55
Tabela 9. Interações para A531 em GlgE	58
Tabela 10. Detalhamento das interações para A532	62

LISTA DE ABREVIATURAS

Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
TB	Tuberculose
WIM	<i>Weak Interaction Mapping</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
GlgE	Maltosiltransferase
5' UTR	<i>5' untranslated region</i>
M1P	Maltose-1-fosfato
DDGIM	2,5-dideoxy-3-O- α -D-glucofuranosyl-2,5-imino-D-mannitol

SUMÁRIO

Capítulo 1 – Introdução	12
1.1 Panorama global da tuberculose	12
1.2 Estado da arte no desenvolvimento de fármacos contra tuberculose	15
1.3 GlgE como um alvo específico para o desenvolvimento de fármacos contra tuberculose	25
1.4 Objetivos	29
Capítulo 2 – Materiais e Métodos	30
2.1 Levantamento de informações e estruturas de GlgE em bancos de dados	30
2.2 Análise da proteína selecionada em tela gráfica	31
2.3 Os ligantes	31
2.4 <i>Docking</i> molecular	32
2.5 Análise dos resultados	34
Capítulo 3 – Resultados e Discussão	36
3.1 Seleção da estrutura para cálculos de <i>docking</i>	36
3.2 Redocking	40
3.3 Docking	41
Capítulo 4 – Conclusões	75
Referências	78

Capítulo 1 – Introdução

1.1 Panorama global da tuberculose

O famoso poeta inglês John Keats morreu de tuberculose (Tb) em 1821, aos 25 anos de idade. A mesma doença foi responsável pela morte do escritor tcheco Franz Kafka em 1924. George Orwell, autor de "1984" também morreu de tuberculose em 1950. Frederic Chopin faleceu aos 39 pela mesma doença. Desta lista extensa das personalidades famosas acometidas por tuberculose fazem parte também o dramaturgo francês Molière, Emily Brontë, autora de "O Morro dos Ventos Uivantes", o autor russo Anton Chekhov, René Descartes, filósofo, matemático e cientista francês, bem como personalidades brasileiras como Machado de Assis, Oswald de Andrade e Lima Barreto. A tuberculose – popularizada como a “enfermidade dos poetas” – é uma doença antiga e com registros que datam a 9000 anos atrás (Bynum, 2012). No entanto, sua compreensão biológica acerca da causa e transmissão foi apresentada no final do século XIX, quando o cientista alemão Robert Koch identifica e isola o bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) e o associa à patologia hoje chamada de tuberculose. Por esta descoberta, Koch recebe o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 1905 (Pezzella, 2019).

Os fármacos efetivos contra a tuberculose foram lançados no mercado em meados de 1940 e o tratamento básico – também chamado de primeira linha - é feito com uma combinação de Isoniazida, Rifampicina, Etambutol e Pirazinamida. Esses fármacos têm como alvos celulares as principais vias biossintéticas do *Mycobacterium tuberculosis*, como a replicação e a tradução, mostrando-se efetivos em situações de alta multiplicação do bacilo em questão (Dartois & Rubin, 2022). Este tratamento padrão é conhecido como 2RHZE/4RH, já que nos primeiros dois meses, o paciente toma Isoniazida, Rifampicina, Etambutol e Pirazinamida (2RHZE) e nos quatro últimos meses, Isoniazida e Rifampicina (4RH) (Nezenega, Perimal-Lewis, & Maeder, 2020).

Apesar da revolução no tratamento de tuberculose causada pela aplicação deste protocolo de primeira linha, hoje essa abordagem convencional apresenta baixa eficácia nos casos de contaminação por linhagens resistentes de *Mycobacterium tuberculosis*, especialmente em relação à Isoniazida e à Rifampicina (Dartois & Rubin, 2022). Nestes

casos, inicia-se o que é chamado de tratamento de segunda linha (Gopaldaswamy, Shanmugam, Mondal, & Subbian, 2020), em que medicamentos menos comuns – geralmente mais potentes e com mais efeitos colaterais – são administrados. Estes compostos são do tipo fluoroquinolonas (como o Levofloxacino e Moxifloxacino), aminoglicosídeos (como a Amicacina, Kanamicina e Capreomicina), protionamidas, cicloserinas e Linezolida (Feuerriegel, et al., 2021). O tratamento de segunda linha é mais longo quando comparado ao de primeira linha e pode durar um ano ou mais, dependendo do grau de reposta apresentado pelo paciente. No entanto, há diversos casos reportados em que nenhum dos fármacos mencionados anteriormente é eficaz (Pontali, Raviglione, & Migliori, 2019). A estes, se denomina “tuberculose resistente a múltiplas drogas” ou MDR-TB (do inglês, *multidrug-resistant tuberculosis*) e o tratamento é ainda mais difícil que a segunda linha (Muthukrishnan, 2021). Neste caso, medicamentos como Bedaquilina e Delamanid são administrados, ambos com elevado custo e efeitos colaterais significativos (Hwang, et al., 2021).

A resistência bacteriana pode ser originada por diversos fatores, como a transferência horizontal de genes, o uso indiscriminado de antibióticos, mutações nas linhagens existentes, dentre outros (Abushaheen, et al., 2020). No tratamento da tuberculose, um dos principais fatores que contribuem para o surgimento da resistência bacteriana é a descontinuação dos tratamentos sem prescrição médica, principalmente devido aos efeitos colaterais muitas vezes intoleráveis aos pacientes (Pietersen, et al., 2023). Além disso, a administração prolongada de altas doses de antibióticos pode selecionar linhagens resistentes com múltiplos genes de resistência, levando à emergência de *Mycobacterium* sp. multirresistentes (Gygli, et al., 2021).

O tratamento da tuberculose torna-se excepcionalmente complexo quando consideramos a simultaneidade com outras condições médicas, especialmente em um cenário global marcado pela pandemia de COVID-19 (Shah, Shah, Yasmeen, Baloch, & Xia, 2022). Pacientes com tuberculose frequentemente sofrem de outras doenças crônicas, como diabetes ou HIV, o que enfraquece ainda mais seus sistemas imunológicos e aumenta o risco de complicações (Wong, et al., 2020). Além disso, a pandemia de COVID-19

sobrecarrega os sistemas de saúde já fragilizados em várias partes do mundo, dificultando o acesso dos pacientes aos serviços de saúde necessários para o diagnóstico e tratamento da tuberculose (Gupta, et al., 2020). A situação é agravada pelo fato de que a tuberculose e a COVID-19 compartilham sintomas semelhantes, o que pode levar a diagnósticos errôneos ou atrasos no tratamento adequado (Al Lawati, et al., 2021).

Outro desafio no tratamento da tuberculose a ser levado em conta é o ponto de vista medicamentoso, especialmente para pacientes que já estão em outros regimes de medicação devido a condições médicas coexistentes (Riccardi, et al., 2021). As interações medicamentosas representam uma preocupação significativa, pois alguns medicamentos usados no tratamento da tuberculose podem interferir com a eficácia de outros medicamentos ou aumentar o risco de efeitos colaterais (Cáceres, Calderon, & Ugarte-Gil, 2022). Pacientes com tuberculose muitas vezes precisam ser cuidadosamente monitorados para evitar interações prejudiciais entre os medicamentos antituberculose e os medicamentos para outras condições, como diabetes, hipertensão ou distúrbios cardíacos (Noor, Ismail, & Khan, 2021).

De acordo com o relatório divulgado pela Organização Mundial da Saúde em 2022 (WHO, 2023), a tuberculose continua sendo uma doença de alto índice de mortalidade e contágio, colocando novos desafios quando se leva em conta o contexto da COVID-19. O *Global Tuberculosis Report - 2022* apresentou dados alarmantes: até 2021, 10 milhões de casos foram estimados mundialmente, além de 1,5 milhões de mortes provenientes dessa doença só em 2020. Ainda, a pandemia teve impacto significativo no diagnóstico e tratamento da tuberculose, pois os relatórios de casos registrados durante a pandemia mostraram a uma redução no número de pessoas com tuberculose, além do decréscimo no número de pessoas que receberam os medicamentos adequados para o tratamento dos casos de tuberculose resistente. Por este motivo, houve um declínio global nos investimentos em recursos voltados ao estudo/tratamento desta doença, cujas consequências possivelmente serão observadas a longo prazo.

Portanto, é imperativo investir continuamente no desenvolvimento de novos medicamentos contra a tuberculose devido à persistência deste problema de saúde global.

Embora houveram avanços significativos na compreensão e tratamento da tuberculose ao longo dos anos, as cepas resistentes a medicamentos e as interações com outras condições médicas apresentam desafios consideráveis. Além disso, a pandemia de COVID-19 exacerbou ainda mais a complexidade do cenário de saúde global. O desenvolvimento de novos medicamentos é crucial para oferecer tratamentos mais eficazes, com menos efeitos colaterais e de menor duração. Além disso, a melhora dos tratamentos disponíveis tem um papel importante na redução e na propagação da doença, esta é uma outra preocupação global com relação à tuberculose.

1.2 Estado da arte no desenvolvimento de fármacos contra tuberculose

Como mostrado no item anterior, o desenvolvimento de novos fármacos é uma necessidade urgente para o tratamento efetivo da tuberculose. Neste sentido, alguns estudos buscam utilizar terapias combinatórias com medicamentos já existentes, esta uma abordagem comumente utilizada no manejo da doença. Além disso, a busca constante por novos compostos capazes de tornarem-se fármacos eficazes têm se concentrado em identificar novos alvos moleculares para o desenvolvimento de substâncias com maior eficácia e menor toxicidade para os pacientes.

Neste contexto, diversos novos alvos para atingir o Mtb são apontados, como por exemplo dentro das vias de síntese de parede celular, envolvidos na replicação, transcrição e tradução de DNA, no metabolismo energético, no processamento de proteínas e no metabolismo celular. A Tabela 1 apresenta alguns destes alvos investigados, bem como os principais trabalhos a eles relacionados.

Tabela 1. Principais vias alvo para compostos contra *Mycobacterium tuberculosis*

Função	Rota	Alvo molecular
Síntese de parede celular	Camada de peptídeo-glicano	Mur ligases
		D-alanina:D-alanina ligase
		Translocase-1
		Lipídeo II
		D,D - transpeptidase
	Camada de arabino-galactana	L,D-transpeptidase
		Inibidores de DprE1
		Arabinosyl transferase
		Inibidores de WecA
		Inibidores de MmpL3
Camada do ácido micólico	Inibidores de InhA	

	Inibidores de KasA
Replicação de DNA	DNA girase
Transcrição de DNA	RNA polimerase
Tradução de DNA	rRNA / ribossomo
Metabolismo energético	ATP-sintase
	Citocromo bc1-aa3
	NADH desidrogenase tipo II
	Inibidor MenG
Metabolismo de proteínas	ClpC
	ClpP1P12
Metabolismo celular	Triptofano sintase
	Aspartato descarboxilase

Atingir as vias de síntese de peptídeoglicanos, arabinogalactanas e ácido micólico são estratégias interessantes quando se pensa no desenvolvimento de fármacos contra a tuberculose. Isto pois, estes compostos formam a parede celular de Mtb conhecida como complexo mAGP. Esta estrutura hidrofóbica complexa tem como função proteger o *Mycobacterium tuberculosis* de fontes de estresse e a inibição de sua produção ou estabilidade pode culminar em morte celular (Shinde, Ahmad, Surana, & Patel, 2021).

No caso dos peptídeos glicanos, o primeiro alvo molecular são as enzimas Mur envolvidas nos dois estágios de síntese destes compostos. Estas proteínas são ausentes em humanos e, portanto, interessantes como alvos moleculares para fármacos contra Tb (Maitra, et al., 2021), principalmente quando se fala do desenvolvimento de compostos multi alvo, devido à semelhança em termos de sítio catalítico e reações que nele ocorrem entre as diversas enzimas Mur de Mtb (Kouidmi, Levesque, & Paradis-Bleau, 2014), (Maitra, et al., 2019). Outro alvo dentro da via dos peptídeoglicanos é a D-alanina-D-alanina ligase, responsável pela síntese de precursores destes compostos, cujo análogo estrutural D-cicloserina é um antibiótico já utilizado para o tratamento de formas resistentes de Tb (Nocentini, 2024). Ainda, a translocase 1 – também chamada de MurX ou MurY – é uma das primeiras enzimas envolvidas na síntese de peptídeoglicanos, responsável por formar o lipídeo I, que rapidamente é convertido em lipídeo II pelas proteínas Mur (Tran, et al., 2021). Neste sentido, tanto inibidores desta translocase quanto compostos capazes de ligarem-se ao lipídeo II (Han, Liu, Zhang, Quinn, & Feng, 2022) são estratégias interessantes para impedir a síntese de peptídeoglicanos. Por fim, as transpeptidases que estão relacionadas

com a capacidade de adaptação aos distúrbios à membrana causados por antibióticos, por exemplo, estando associadas com a resistência a antibióticos β lactâmicos (Aliashkevich & Cava, 2022). Logo, compostos que atinjam tal via podem estar relacionados com o tratamento de linhagens resistentes de Mtb.

Na via de síntese de arabinogalactanas, o DprE1 é um alvo interessante cuja função é a síntese de DPA, um precursor de arabinana (Liu, et al., 2020). Compostos que atingem esta enzima já são investigados como fármacos contra tuberculose, dentre eles estão o BTZ043 (1,3-benzothiazinona) e PBTZ169 – conhecido comercialmente como Macozinona -, atualmente avaliados em testes clínicos (Robertson, et al., 2021). Outro alvo interessante desta via é a arabinosiltransferase C, uma enzima responsável pela polimerização de arabinogalactana (Das, Jena, & Pradhan, 2020). Por fim, a enzima WecA é uma GlcNAc transferase também envolvida na síntese de arabinogalactanas e que faz parte da via de resistência à rifampicina (Kuang, Zhang, Wang, & Yang, 2020). Sendo assim, a redução da ação desta enzima seria uma abordagem importante para o tratamento das formas resistentes de *Mycobacterium tuberculosis*.

A proteína MmpL3 – *Mycobacterial membrane protein large 3*- é um alvo da via de síntese do ácido micólico. Sua função na célula bacteriana é importar a molécula de trealose-monomicolato que é precursora para a síntese deste ácido (Sethiya, Sowards, Jackson, & North, 2020). A MmpL3 é vista como estratégia promissora para tratamento de linhagens resistentes de Tb, visto que apresenta diversos pontos de ligação para estruturas derivadas de carbozamida, pirrol e pirazol quinolina e quinolona, adamantano, benzimidazol e acetamida (Umare, Khedekar, & Chikhale, 2021). Outro alvo interessante dentro desta via é a proteína redutase carreadora de enoil-acil (InhA), envolvida na síntese de ácidos graxos e cujo potencial anti-Mtb está relacionado com o fato de apresentar sítio ativo único de Mtb, com cavidades de ligação profundas que permitem o *design* de inibidores específicos (Prasad, Bhole, Khedekar, & Chikhale, 2021). Por fim, a β -cetoacil-ACP sintase (KasA), cujo papel está relacionado com a alongação das cadeias de ácido graxo, é um alvo molecular da via do ácido micólico com inibidores propostos como DG167 e JSF-3285, ainda em estudos pré-clínicos (Inoyama, et al., 2020).

Sobre os alvos moleculares que atingem o processamento do material genético, a DNA girase é um alvo promissor quando se fala sobre a inibição da replicação do DNA. Compostos como a Evybactina isolada de *Photorhabdus noenieputensis*, bem como G24 e G26 são moléculas que se mostram promissoras em análises iniciais na inibição desta proteína (Imai, et al., 2022) (Pakamwong, et al., 2022). A RNA polimerase, por sua vez, é um alvo molecular para inibição da transcrição e já é atingido por fármacos como a rifampicina (Lilic, et al., 2020). Neste sentido, a busca por novos compostos capazes de atuar sobre esta enzima se dá justamente em vista da existência de linhagens de Mtb resistentes a antibióticos. A síntese de proteínas também é uma via interessante a ser considerada na busca por fármacos contra tuberculose. Os segmentos ribossomais bL37 e bS22 específicos de *Mycobacterium* são os principais focos dos estudos neste campo, além disso, busca-se desenvolver estratégias de controle de Mtb voltadas para características específicas como os mRNAs ausentes de regiões 5' UTR (Kumar, Sharma, & Kaushal, 2021).

A via do metabolismo energético é também um alvo terapêutico muito visado no desenvolvimento de novos fármacos, principalmente quando se leva em conta a diferença entre procariontes e eucariontes nas enzimas que realizam as reações essenciais. Apesar de diversos pontos serem considerados como alvo farmacológico, destaca-se quatro deles (Urban, Šlachťová, & Brulikova, 2021). O primeiro é a ATP sintase, já utilizada como alvo para diversos anti-tuberculosos como a Bedaquilina, por exemplo, empregada no tratamento da forma latente da doença (Guo, et al., 2021). Esta proteína transmembrana apresenta diversos domínios, logo, é um interessante alvo para uma ampla gama de estruturas de compostos, visto que contém um grande número de sítios de ligação (Kumar, Sharma, & Kaushal, 2021). O segundo alvo é o citocromo bc1-aa3, com papel na transferência de elétrons para redução do oxigênio na respiração. Por apresentar diversas subunidades, este complexo também atrai atenção pela capacidade de abrigar uma miríade de compostos (Sindhu & Debnath, 2022). Já a NADH desidrogenase tipo II é alvo de medicamentos visando combater as formas multirresistentes de Mtb, com sucesso em ensaios *in vitro* com compostos do tipo TriSLa (*Trycyclic SpiroLactam*) (Dam, et al., 2022). O quarto e último alvo molecular da rota energética é MenG, uma metiltransferase parte

da rota de síntese de ubiquinona (Pujari, Rozman, Dhiman, Aldrich, & Crick, 2022), esta atingida pelo fármaco SQ109 com sucesso durante a fase IIB dos ensaios clínicos (Li, et al., 2014).

Outra via interessante considerada para o desenvolvimento de fármacos é a de degradação e manutenção dos níveis de proteínas. Neste caso, os alvos moleculares são as enzimas que compõe o complexo ClpC, o sistema da proteína caseinolítica (d'Andrea, et al., 2022) formado por enzimas da via proteolítica contendo duas subunidades com função de hidrolase conhecidas como ClpP1P2 (Portugal, et al., 2017). Atingir esta via é interessante em vista da importância da proteostase na adaptação ao ambiente hospedeiro, sendo assim, interrupções neste processo podem comprometer a sobrevivência do Mtb, principalmente quando se leva em conta as formas latentes da doença (Lunge, Gupta, Choudhary, & Agarwal, 2020).

Por fim, a última rota a ser destacada como alvo contra *Mycobacterium tuberculosis* é a do metabolismo celular. Nela, a triptofano sintase TrpAB é interessante dada sua importância para a sobrevivência da bactéria frente ao sistema imune do hospedeiro. Esta proteína é alvo de diversos compostos em avaliação como possíveis fármacos anti-tuberculose (Michalska, et al., 2020), como é o caso de BRD4592, que apresenta alta afinidade por um dos sítios alostéricos desta enzima (Wellington, et al., 2017). Já a descarboxilase PanD é alvo da Pirazinamida, um fármaco contra tuberculose que apresentou baixa atividade inibitória para esta enzima (Q, et al., 2020). A PanD é um alvo interessante por estar envolvida na síntese de vitamina B5, precursora da coenzima A (Ragunathan, et al., 2021). O terceiro e último alvo molecular desta via é o complexo de transporte em efluxo de antibióticos (efpA), responsável por garantir a sobrevivência de Mtb frente a uma vasta gama de compostos. Atingir esta via é essencial já que está relacionada com a resistência aos fármacos do tratamento de primeira (como rifampicina, isoniazida e streptomina) e segunda linha (como a amikacina) (Rai & Mehra, 2021).

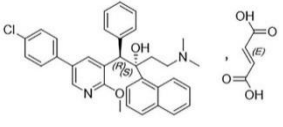
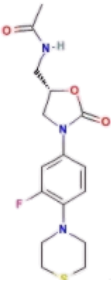
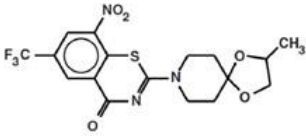
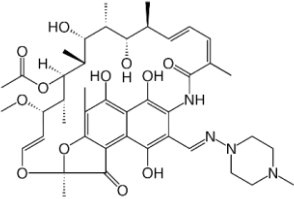
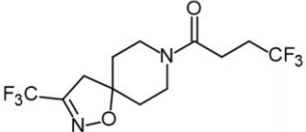
Levando em consideração o grande espectro de alvos moleculares possíveis para o desenvolvimento de fármacos contra tuberculose, uma gama ainda maior de compostos surge como possíveis fármacos ativos para tal fim. A Tabela 2 abaixo mostra os principais

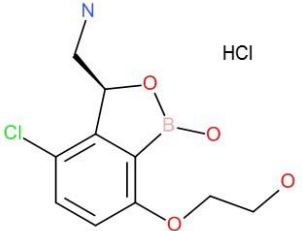
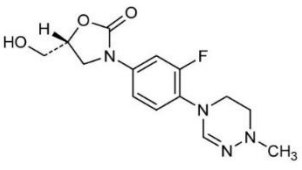
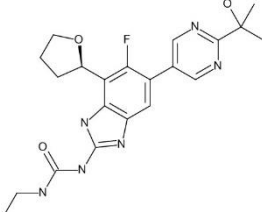
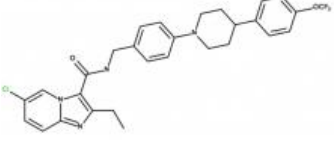
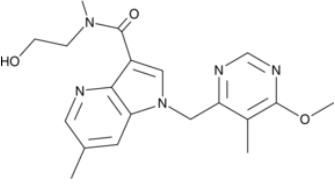
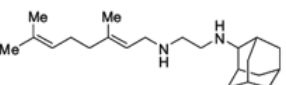
compostos para tratamento de infecções por *Mycobacterium tuberculosis* em estágios de desenvolvimento avançados.

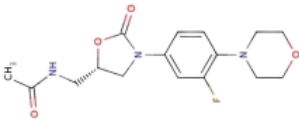
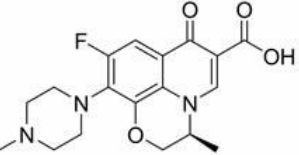
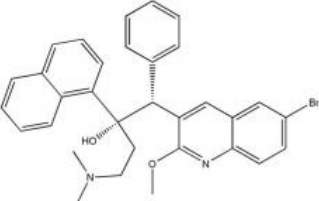
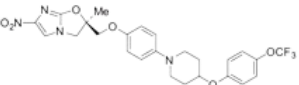
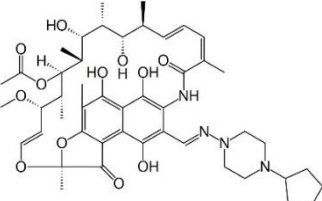
Tabela 2. Resumo dos principais fármacos avaliados contra tuberculose

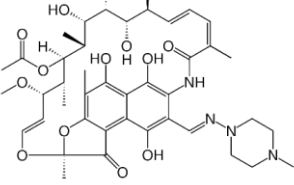
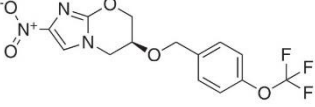
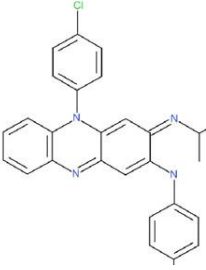
Fase	Nome	Estrutura	Referência
Ensaio pré clínico	OTB-658 (Oxazolidinona)		Guo S, 2021; Jiang J, 2021; Liu H, 2023
	TB47 (Pirazolopiridina carboxamida)		Yu, 2021
	GSK839 (Tetrazol)		Kumar A. K., 2021
	MBX-4888A (Spectinamida)		Perveen, 2022
Ensaio clínico fase I	TBD09 (MK7762) (Oxazolidinona)		ID de teste clínico: NCT05824091 Patrocinador: Bill & Melinda Gates Medical Research Institute
	GSK-286		Brown KL, 2023; Nuermberger EL, 2022 ID do teste clínico: NCT04472897 Patrocinador: GlaxoSmithKline
	TBAJ-587 (Diarylquinolina)		ID de teste clínico: NCT04890535 Patrocinador: Global Alliance for TB Drug Development

	TBI-223 (Oxazolidinona)		ID de teste clínico: NCT03758612, NCT04865536 Patrocinador: Global Alliance for TB Drug Development
	MCZ, PBTZ-169 (Macozinona)		ID de teste clínico: NCT04150224, NCT03036163, NCT03334734 Patrocinador: Nearmedic Plus LLC ID de teste clínico: NCT03776500, NCT03423030 Patrocinador: Innovative Medicines for Tuberculosis
	TBAJ-876 (Diarylquinolina)		ID de teste clínico: NCT04493671, NCT05526911, NCT06058299 Patrocinador: Global Alliance for TB Drug Development
	TBI-166 (Antibiótico riminofenazínico)		ID de teste clínico: NCT04670120 Patrocinador: Beijing Chest Hospital
Ensaio clínico fase II	OPC-167832 (Quabodepistat)		ID de teste clínico: NCT05221502, NCT03678688, Patrocinador: Otsuka Pharmaceutical Development & Commercialization, Inc. ID de teste clínico: NCT05971602 Patrocinador: Bill & Melinda Gates Medical Research Institute
	GV-104326 (Sanfetrinem)		ID de teste clínico: NCT05388448 Patrocinador: TASK Applied Science

<p>WX-081 (Sudapyridina)</p>		<p>ID de teste clínico: NCT05824871 Patrocinador: Shanghai Jiatan Pharmatech Co., Ltd</p>
<p>PNU-100480 (Sutezolida)</p>		<p>ID de teste clínico: NCT03199313 Patrocinador: Global Alliance for TB Drug Development ID de teste clínico: NCT00871949, NCT01225640, NCT00990990 Patrocinador: Sequella, Inc. ID de teste clínico: NCT03959566, NCT05807399 Patrocinador: Michael Hoelscher ID de teste clínico: NCT05971602 Patrocinador: Bill & Melinda Gates Medical Research Institute ID de teste clínico: NCT05686356 Patrocinador: The Aurum Institute NPC ID de teste clínico: NCT03237182 Patrocinador: Centre for the AIDS Programme of Research in South Africa</p>
<p>BTZ-043 (Benzothiazinona)</p>		<p>ID de teste clínico: NCT04874948, NCT03590600, NCT05926466, NCT04044001 Patrocinador: Michael Hoelscher</p>
<p>Rifampicina</p>		<p>(2023). Retrieved October 24, 2023, from Clinicaltrials.gov website: https://clinicaltrials.gov/search?cond=tuberculosis&intr=Rifampicin%E2%80%8C</p>
<p>BVL-GSK098 (Alpibectir)</p>		<p>ID de teste clínico: NCT04654143 Patrocinador: BioVersys AG ID de teste clínico: NCT05473195 Patrocinador: TASK Applied Science</p>

<p>GSK3036656 (Ganfaborole)</p>		<p>ID de teste clínico: NCT03557281, NCT05382312, NCT03075410 Patrocinador: GlaxoSmithKline</p>
<p>LCB01-0371 (Delpazolida)</p>		<p>ID de teste clínico: NCT02836483, NCT04550832 Patrocinador: LegoChem Biosciences, Inc</p>
<p>SPR720 (Fobrepodacina)</p>		<p>ID de teste clínico: NCT04553406 Patrocinador: Spero Therapeutics</p>
<p>Q203 (Telacebec)</p>		<p>ID de teste clínico: NCT03563599 Patrocinador: Qurient Co., Ltd.</p>
<p>TBA-7371</p>		<p>ID de teste clínico: NCT04176250 Patrocinador: Bill & Melinda Gates Medical Research Institute. ID de teste clínico: NCT03199339 Patrocinador: Global Alliance for TB Drug Development</p>
<p>SQ109</p>		<p>ID de teste clínico: NCT01874314, NCT01358162, NCT00866190 Patrocinador: ational Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) ID de teste clínico: NCT01218217, NCT01785186 Patrocinador: Michael Hoelscher ID de teste clínico: NCT01585636 Patrocinador: Sequella, Inc.</p>

	Linezolida		(2023). Retrieved October 24, 2023, from Clinicaltrials.gov website: https://clinicaltrials.gov/search?cond=tuberculosis&intr=linezolid
	Levofloxacina		(2023). Retrieved October 24, 2023, from Clinicaltrials.gov website: https://clinicaltrials.gov/search?cond=tuberculosis&intr=Levofloxacin
Ensaio clínico fase III	Bedaquilina		ID de teste clínico: NCT02354014, NCT02274389 Patrocinador: Janssen Research & Development, LLC
	Delamanida		ID de teste clínico: NCT02573350, NCT01131351, NCT01856634, NCT01859923, NCT01424670, NCT00685360, NCT05221502, NCT03141060, NCT03568383, NCT03678688 Patrocinador: Otsuka Pharmaceutical Development & Commercialization, Inc.
	Rifapentina		ID de teste clínico: NCT02410772 Patrocinador: Centers for Disease Control and Prevention

Rifampicina		ID de teste clínico: NCT02581527 Patrocinador: St George's, University of London
Pretomanida		ID de teste clínico: NCT01498419, NCT01215851, NCT02342886, NCT02333799, NCT03086486, NCT03338621, NCT02193776 Patrocinador: Global Alliance for TB Drug Development ID de teste clínico: NCT02589782 Patrocinador: Medecins Sans Frontieres
Clofazimina		ID de teste clínico: NCT01691534 Patrocinador: Global Alliance for TB Drug Development ID de teste clínico: NCT02754765, NCT03896685 Patrocinador: Médecins Sans Frontières ID de teste clínico: NCT04062201 Patrocinador: Wits Health Consortium (Pty) Ltd

1.3 IgE como um alvo específico para o desenvolvimento de fármacos contra tuberculose

Na identificação de alvos terapêuticos em rotas metabólicas essenciais de *Mycobacterium tuberculosis*, encontrou-se que a inibição das proteínas TreS – trealose sintase (E.C. 2.4.1.15) - e/ou Pep2 – peptidase M24 (E.C. 3.4.24.71) - resulta na morte celular desse bacilo (Kalscheuer, et al., 2010). Estas enzimas estão relacionadas com vias metabólicas distintas neste organismo, estando a Pep2 inserida na rota de degradação de proteínas, reciclagem de aminoácidos e a produção de energia a partir da degradação de proteínas em condições de estresse (Kermani, et al., 2019), enquanto a TreS está envolvida

com a síntese de trealose, um importante dissacarídeo regulador da sobrevivência e virulência de Mtb pela indução da via de conversão de α -glicanos (Thanna & Sucheck, 2016).

No contexto da via de produção dos α -glicanos da qual participa TreS, a enzima GlgE – maltosiltransferase E (E.C. 2.4.1.242) - é um alvo promissor para o desenvolvimento de fármacos contra o *Mycobacterium tuberculosis*. Isso se deve ao fato de que mutações no gene que codifica essa enzima levam necessariamente à morte do parasita. Em contraste, mutações em outras enzimas da via metabólica não apresentaram efeitos letais (Kalscheuer, et al., 2010). Além disso, é conhecido que a letalidade decorrente da ausência de GlgE funcional está relacionada ao aumento dos níveis do intermediário maltose-1-fosfato (M1P) intracelular. Esse aumento de M1P sinaliza a ativação de uma via que despolimeriza as cadeias de α -glicanos, liberando trealose, que é posteriormente convertida em M1P (Korte, et al., 2016). Esse processo leva à formação de um ciclo vicioso de produção de M1P como um metabólito tóxico dentro da célula, resultando inevitavelmente na morte do organismo.

Ainda, é importante ressaltar que mutações na enzima GlgB – maltosiltransferase B, que faz parte da via da trealose e relacionada com GlgE - também resultam na morte do parasita, uma vez que impedem a geração de ramificações, levando à agregação das cadeias de α -glicanos em um precipitado insolúvel ao longo do tempo. No entanto, a GlgE é o principal alvo farmacológico selecionado para o desenvolvimento de compostos contra a tuberculose devido à sua ausência em humanos, o que é um critério seletivo importante durante a criação de novos fármacos (Leiba, et al., 2013). Outro fator que privilegia a escolha de GlgE como alvo para o desenho de fármacos é o de que a seletividade da GlgB é problemática, pois existem diversas enzimas ramificadoras com as quais um possível composto contra o *Mycobacterium tuberculosis* tendo como alvo esta enzima pode interagir. Tal situação é um risco em potencial, já que pode gerar efeitos colaterais drásticos indesejados (Kalscheuer, et al., 2010).

Do ponto de vista estrutural, a estrutura tridimensional da GlgE de Mtb é um homodímero de 661 resíduos, no qual cada subunidade é formada por cinco domínios (Figura 1). O sitio de ligação primário da proteína (PBS), ao qual o substrato natural M1P se

liga, e é definido por quatro aminoácidos: Y357, D394, E423 e D480 (Lindenberger, Kumar Veleti, Wilson, Sucheck, & Ronning, 2015). A atividade catalítica consiste em um passo inicial de remoção da porção de fosfato do açúcar ativado (M1P), seguido por uma extensão da cadeia de polissacarídeo pela adição de unidades de monossacarídeos. A reação de remoção de fosfato é causada por D394, que ataca a ligação entre o fosfato e a maltose, fazendo com que o substituinte de fosfato abandone a molécula, sendo aceito por E423 enquanto D394 permanece ligado ao açúcar (Syson, et al., 2014). Esta sequência de reações está mostrada na Figura 2.

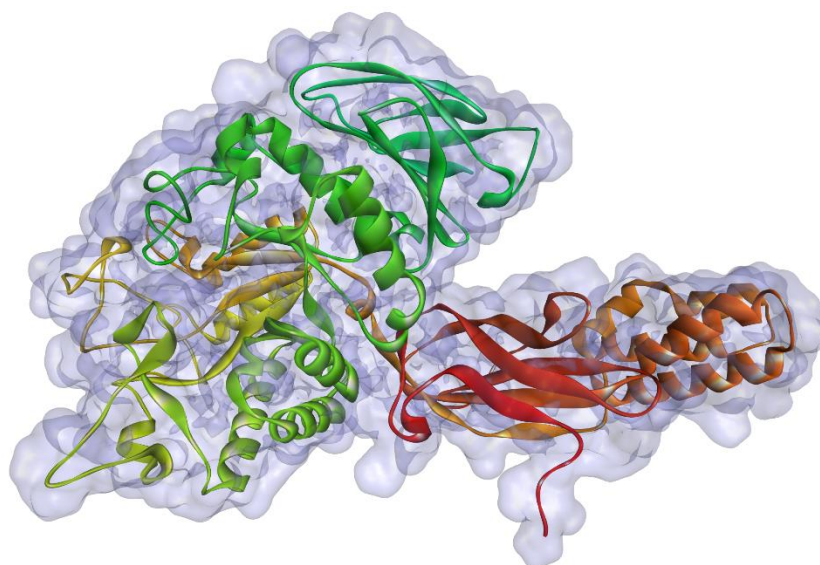


Figura 1. Estrutura tridimensional de GlgE em hélices, loops e folhas, com superfície.
Fonte: Desenvolvido pelo autor.

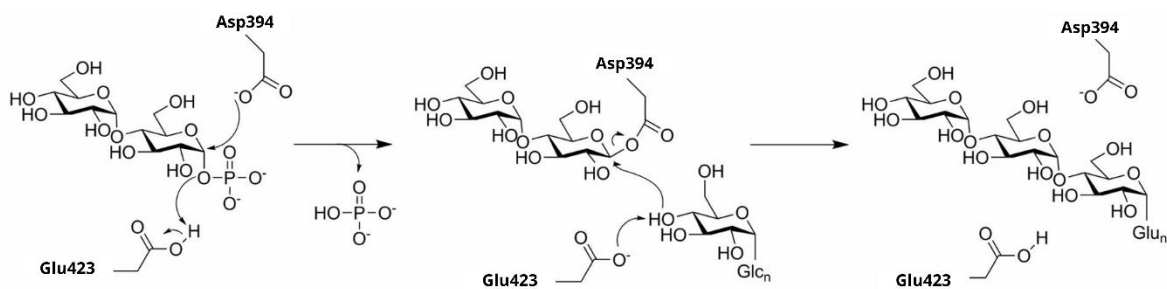


Figura 2. Reação que ocorre para o processamento do substrato natural em GlgE.
Fonte: Adaptado de Veleti, Lindenberger, Ronning & Sucheck, 2014.

Sobre as estratégias de inibição de GlgE, recentemente têm-se proposto o uso de anticorpos específicos capazes de impedir a função da enzima e, conseqüentemente, a síntese de polissacarídeos (Saliba & Pohl, 2016). Outra estratégia de inibição é o emprego

dos análogos de nucleosídeos, compostos estruturalmente semelhantes a nucleotídeos que prejudicam a função desta proteína (Colpaert, et al., 2020). Apesar disso, a abordagem mais comum permanece sendo a de busca por compostos capazes de ligarem-se ao sítio ativo desta enzima. Neste caso, moléculas fosfatadas capazes de mimetizar a ligação do substrato natural foram as primeiras propostas, como é o caso da maltose-C-fosfato (MCP) (Thanna & Sucheck, 2016). No entanto, outra alternativa explorada é o potencial de azaçúcares, cuja estrutura geral encontra-se na Figura 3, como possíveis compostos anti-tuberculose (Veleti, Lindenberger, Ronning, & Sucheck, 2014). Isto pois, estas moléculas apresentam um átomo de nitrogênio em um anel de cinco ou seis membros que causa ligação ao sítio ativo capaz de mimetizar o estado de transição observado no substrato natural. Um exemplo deste tipo de composto é DDGIM (2,5-dideoxy-3-O- α -D-glucopyranosyl-2,5-imino-D-mannitol), mostrado na Figura 4 (Lindenberger, Kumar Veleti, Wilson, Sucheck, & Ronning, 2015).

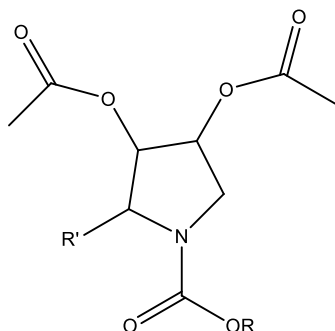


Figura 3. Estrutura geral de aza-çúcares.
Fonte: Desenvolvido pelo autor.

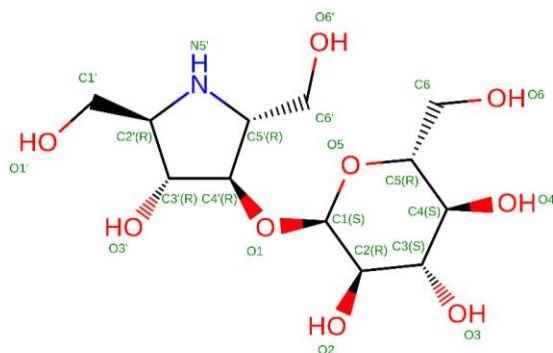


Figura 4. Estrutura de DDGIM.
Fonte: Data, P. (2023). RCSB PDB - RZM Ligand Summary Page. Retirado em Novembro, 22, 2023, de Rcsb.org website: <https://www.rcsb.org/ligand/RZM>.

1.4 Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo avaliar utilizando *docking* molecular três açúcares - a saber A48, A53 e A59 – e seus isômeros a fim de compreender o modo de ligação destes compostos no sítio ativo da GlgE, avaliar seu potencial como inibidores desta enzima e contribuir para o desenvolvimento de novos açúcares como inibidores desta enzima. Estes compostos foram desenvolvidos e sintetizados pelo Dr. Ariel Llanes (UNICAMP) e enviados ao grupo de pesquisa para avaliação teórica de seu potencial farmacológico.

Capítulo 2 – Materiais e Métodos

2.1 Levantamento de informações e estruturas de GlgE em bancos de dados

A busca de estruturas de proteínas GlgE em bancos de dados de proteínas pode ser dividida em três etapas principais: seleção do banco de dados, busca e avaliação das informações presentes nas estruturas. Neste trabalho, a busca por estruturas de proteínas GlgE foi feita utilizando-se o banco de dados de proteínas *Protein Data Bank* (Protein Data Bank, s.d.), um repositório internacional de dados que contém informações de alta qualidade sobre estruturas tridimensionais de proteínas. Além disso, outros bancos de dados como o *PDBSum* (PDBsum, s.d.) foram consultados a fim de obter informações complementares às disponibilizadas no PDB, como diagramas de estrutura tridimensional e interações com o ligante cristalográfico, quando existentes. Nesta avaliação inicial, os termos de busca utilizados foram “GlgE” e “maltosiltransferase”, inicialmente filtrando os resultados para o organismo *Mycobacterium tuberculosis*, mas depois ampliando a busca para avaliar todos os organismos fonte desta proteína disponíveis na plataforma.

Após este levantamento inicial das estruturas de GlgE, realizou-se uma avaliação das informações disponíveis sobre elas, como os resíduos que compõem o sítio ativo e a presença de ligantes ou inibidores seletivos. Além disso, uma revisão da literatura dos trabalhos científicos que abordam o sítio ativo da GlgE foi feita na plataforma PubMed (PubMed, s.d.), utilizando como filtro de busca “GlgE”, “maltosiltransferase” e “*Mycobacterium tuberculosis*”. Neste caso, buscou-se por trabalhos com estudos de mutagênese ou análises de *docking* molecular, para avaliar a relevância das informações encontradas nas estruturas selecionadas.

Ainda na etapa de análise e seleção da estrutura para os próximos passos de simulação, consideraram-se critérios como a qualidade da resolução da estrutura – selecionando-se a estrutura com melhor valor de resolução dentre as eleitas como possíveis –, o método utilizado para a determinação da estrutura – priorizando-se a difração de raios X –, a presença e o tipo de ligante no sítio ativo – idealmente selecionando estruturas cujo ligante cristalográfico fosse um azaçúcar – e a disponibilidade de informações adicionais, como mutações e interações com ligantes.

2.2 Análise da proteína selecionada em tela gráfica

Após a obtenção da estrutura tridimensional das possíveis proteínas de interesse, a escolha daquela que serviria como modelo para os cálculos de *docking* levou em consideração os critérios supramencionados de organismo fonte da proteína, resolução, integridade estrutural, existência de mutações no sítio ativo e presença de ligantes do tipo açaúcar. Para isto foi utilizado o programa *Discovery Studio* v.3.2. (*Discovery Studio Visualizer*® DSV v.3.2), pelas suas ferramentas de visualização tridimensional para identificação das regiões do sítio ativo da proteína e avaliação de sua conformação. Além disso, a análise de sequência de aminoácidos das proteínas consideradas foi feita no mesmo programa pelo alinhamento manual e verificação de identidade de resíduos.

Outra análise conduzida durante esta etapa foi a verificação das interações entre as proteínas e seus ligantes cristalográficos (caso presentes), utilizando as ferramentas de avaliação de *docking* molecular do *Discovery Studio* (*Discovery Studio Visualizer*® DSV v.3.5). Os critérios analisados nesta etapa incluem a conformação da proteína em relação ao ligante e a formação de interações específicas (como ligações de hidrogênio, interações de van der Waals e interações envolvendo sistemas π). Caso a proteína não atendesse aos critérios de qualidade estrutural ou de interação com seus ligantes naturais ou conhecidos, esta era desconsiderada para as etapas seguintes de *docking* molecular e uma nova estrutura era avaliada.

2.3 Os ligantes

Os ligantes avaliados estão apresentados na Figura 5. Os compostos A482, A532 e A592 correspondem às estruturas cristalográficas e os A481, A531 e A591 os correspondentes enantiômeros (Garcia, 2008). As estruturas cristalográficas foram otimizadas utilizando-se o programa *Discovery Studio* (*Discovery Studio Visualizer*® DSV v3.2) o qual também foi utilizado para gerar os correspondentes enantiômeros.

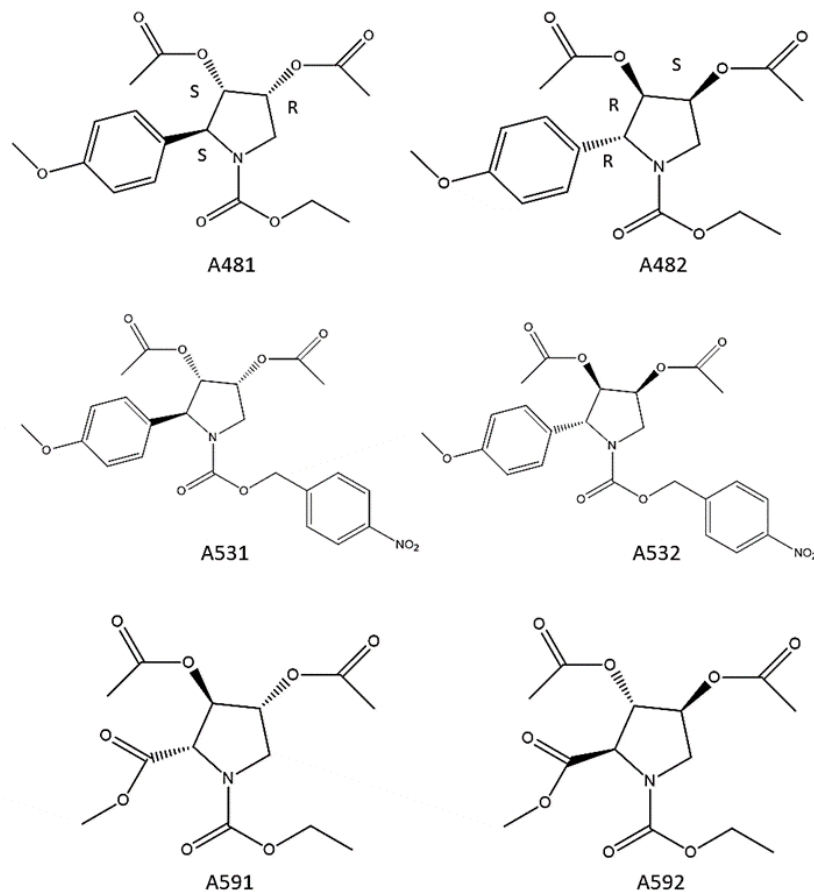


Figura 5. Estrutura 2D dos seis ligantes avaliados no estudo.
 Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Os arquivos dos ligantes foram comparados às estruturas propostas a fim de verificar a acuidade, e quando necessárias foram feitas alterações utilizando-se o programa *Discovery Studio* (*Discovery Studio Visualizer*® DSV v3.2).

2.4 Docking molecular

O *docking* molecular foi realizado utilizando o programa GOLD (*Genetic Optimisation for Ligand Docking*) (Jones G. P., 1997). A execução deste experimento compreende quatro etapas principais: preparação da proteína alvo, preparação dos ligantes, configuração dos parâmetros a serem utilizados no *docking* molecular e finalmente análise dos resultados. Na preparação da proteína alvo, após obtenção e seleção da estrutura tridimensional da proteína em formato mol2, realizou-se a remoção das moléculas de água e outros ligantes

– quando não ligados ao sítio ativo – presentes na estrutura original da proteína, em seguida foi feita a adição de hidrogênios utilizando o programa *Discovery Studio* v.3.2.

Na preparação do cálculo de *docking* molecular, definiu-se a cavidade com base na posição do ligante cristalográfico, assumindo-se um raio de 6 Å. O algoritmo para avaliação das poses geradas durante o cálculo foi a função *GoldScore* e o campo de força, Tripos 5.2 (Clark, 1989). Nesta função, contribuem para o valor final obtido para cada ligante a energia de ligação de hidrogênio do complexo receptor ligante, a energia de ligação de van der Waals, a energia de ligação de hidrogênio intramolecular do ligante e a energia de van der Waals interna do ligante (Jones G. P., A Genetic Algorithm for Flexible Molecular Overlay and Pharmacophore Elucidation., 1995a); (Jones G. P., 1995b); (Jones & Willett., 1995) (Jones G. P., 1997). Abaixo se encontra a função *GoldScore* e os parâmetros que dela fazem parte.

GoldScore Fitness

$$= -[S(hb_{ext}) + 1.3750 \times S(vdw_{ext}) - S(hb_{int}) - S(vdw_{int})]$$

Onde,

$S(hb_{ext})$: energia de ligação de hidrogênio do complexo proteína-ligante;

$S(vdw_{ext})$: energia de van der Waals entre proteína-ligante;

$S(vdw_{int})$: energia de van der Waals do ligante;

$S(hb_{int})$: energia de ligação de hidrogênio intramolecular do ligante.

Os ligantes foram deixados livres dentro da cavidade e foi permitida a terminação precoce da busca por soluções caso o algoritmo atingisse três soluções com energia similar. O ligante cristalográfico da proteína utilizada para os cálculos também foi utilizado num processo conhecido como *redocking*, que tem como objetivo determinar as variáveis que possibilitam reproduzir a estrutura cristalográfica e que serão utilizadas nos cálculos de *docking* com os compostos estudados.

2.5 Análise dos resultados

Na etapa de avaliação dos resultados do *docking* molecular, primeiro realizou-se a análise do número de clusters dos complexos proteína-ligante obtidos, suas qualidades em termos energéticos (*score*) bem como foram estudadas as interações que mantinham estes complexos, ligações de hidrogênio, interações π e interações de van der Waals. As análises dos clusters e das interações foram feitas utilizando os programas *Discovery Studio v.3.2* (*Discovery Studio Visualizer*® DSV v3.2) e WIM (*Weak Interaction Mapping*) (Brasil Patente Nº AINPC2017/004, 2019).

As ligações de hidrogênio foram tabeladas para uma posterior verificação das distâncias doador-aceptor e aceptor-hidrogênio, levando-se em conta os raios de van der Waals dos átomos envolvidos em cada uma delas, bem como o ângulo doador-hidrogênio-aceptor, sendo considerados como limite inferior 100° . As interações de van der Waals também foram avaliadas utilizando o programa *Discovery Studio v.3.2*. Neste caso, o raio de van der Waals também foi usado como parâmetro para definição da existência ou não da interação, sendo consideradas interações em que a distância entre os átomos fosse menor ou igual à soma destes raios e como limite superior a soma dos raios de van der Waals mais 10%. No caso das interações π , a situação torna-se mais intrincada, uma vez que essas interações não estão completamente integradas nos *softwares* de visualização como o *Discovery Studio*. Assim, a identificação dessas interações foi conduzida utilizando o programa WIM, o qual calcula e valida sua presença por meio de três variáveis: o vetor V1, que parte do centroide do anel aromático e é perpendicular ao plano do anel; o vetor V2, que conecta o átomo envolvido na interação π ao centroide; e o ângulo α , formado entre esses dois vetores. Estes parâmetros estão ilustrados na Figura 6.

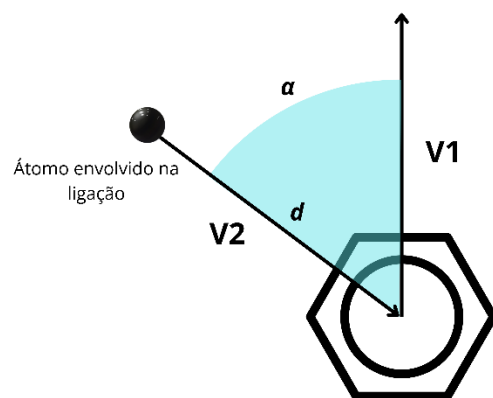


Figura 6. Parâmetros utilizados pelo WIM para determinação das interações π .
Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Capítulo 3 – Resultados e Discussão

3.1 Seleção da estrutura para cálculos de *docking*

Foram encontradas 21 estruturas de GlgE no PDB mostradas na Tabela 3, sendo 3 delas de *Mycobacterium thermoresistibile*, 2 de *Mycobacterium tuberculosis* e 16 de *Streptomyces coliecolor*. Isso é consistente com a literatura que relata a dificuldade de cristalizar proteínas de GlgE de *M. tuberculosis* (Lindenberger, Kumar Veleti, Wilson, Sucheck, & Ronning, 2015). A estrutura escolhida para o *docking* molecular foi a de PDB-ID 4U2Y, que tem boa resolução (2,48 Å) e integridade estrutural. Além disso, essa estrutura tem como ligante cristalográfico um azaçúcar intermediário, o que a torna ideal para análise das interações dos ligantes estudados, também azaçúcares. É importante observar que a estrutura 4U2Y vem de *S. coliecolor* e tem uma mutação V279S no sítio ativo para mimetizar a eletronegatividade do sítio em *M. tuberculosis*.

Tabela 3. Resultado do levantamento de estruturas no PDB

PDB-ID	Organismo Fonte	Alteração	Resolução (Å)	Ligante	Data de depósito
5CJ5	<i>Mycobacterium thermoresistibile</i>	-	3.13	alfa-maltose	2015
5CIM	<i>Mycobacterium thermoresistibile</i>	-	3.32	maltose-1-fosfato	2015
5CGM	<i>Mycobacterium thermoresistibile</i>	-	1.95	maltose-1-fosfato	2015
4U3C	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	-	3.98	alfa-maltose alfa-maltohexose	2015
4U33	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	-	3.29	alfa-maltose	2015
4U2Y	<i>Streptomyces coliecolor</i>	V279S	2.48	azaçúcar intermediario	2015
3ZST	<i>Streptomyces coliecolor</i>	-	2.30	alfa-ciclodextrina	2011
4U31	<i>Streptomyces coliecolor</i>	V279S	1.85	maltose-C-phosphonate	2015
5LGV	<i>Streptomyces coliecolor</i>	E423A	2.50	malto-octaose	2016
5CVS	<i>Streptomyces coliecolor</i>	E423A	2.30	malto-heptaose	2016
4CN4	<i>Streptomyces coliecolor</i>	E423A	2.40	2-deoxy-2-fluoro-beta-maltosyl	2014
4CN1	<i>Streptomyces coliecolor</i>	D394A	2.55	maltose-1-fosfato	2014
3ZT7	<i>Streptomyces coliecolor</i>	-	2.50	maltose	2011
3ZT6	<i>Streptomyces coliecolor</i>	-	2.19	alfa-cyclodextrina maltose	2011
3ZT5	<i>Streptomyces coliecolor</i>	-	2.09	maltose	2011
3ZSS	<i>Streptomyces coliecolor</i>	-	1.80	-	2011
4CN6	<i>Streptomyces coliecolor</i>	E423A	2.29	maltose	2014
5LGW	<i>Streptomyces coliecolor</i>	D394A	1.95	maltodextrina	2016
4U2Z	<i>Streptomyces coliecolor</i>	V279S	2.26	1,2,2-trifluromaltose	2015
5VT4	<i>Streptomyces coliecolor</i>	V279S	3.20	methyl-phosphonate pyrolidene-based	2017
5VSJ	<i>Streptomyces coliecolor</i>	V279S	2.46	ethyl-phosphonate pyrolidene-based	2017

No estudo de 4U2Y, foi observado que o ligante azaçúcar de PDB-ID RZM - (2R,3R,4R,5R) -4-hydroxy-2,5-bis(hydroxymethyl)pyrrolidin-3-yl alpha-D-glucopyranoside – onde o anel de seis átomos se liga em meia-cadeira semiplanar no sítio ativo, imitando a conformação do substrato natural. Este ligante e sua estrutura podem ser vistos na Figura 7. O sítio de ligação desta proteína é dividido em dois subsítios, -1 e -2, mostrados na Figura 8. O subsítio -1 é conhecido como o sítio de ligação ao fosfato, formado por Q324, R392, D394, E423 e D480. Nele, ocorre a interação com o fosfato da molécula de M1P, uma etapa crucial no processo catalítico. No caso dos inibidores de GlgE, as interações com este subsítio estão relacionadas com a atividade do composto. Já o subsítio -2 – formado por K264, N268, S279, A282, Y353, D359 e K534 - está envolvido no reconhecimento e na ligação da unidade de maltose do substrato, permitindo a ligação do substrato de maneira adequada. Essa ligação específica é essencial para a orientação correta da molécula de M1P durante a reação catalítica e ocorre principalmente por ligações de hidrogênio. Quando se trata de inibidores específicos de GlgE, as interações com o subsítio -2 são essenciais para a ligação inicial do composto.

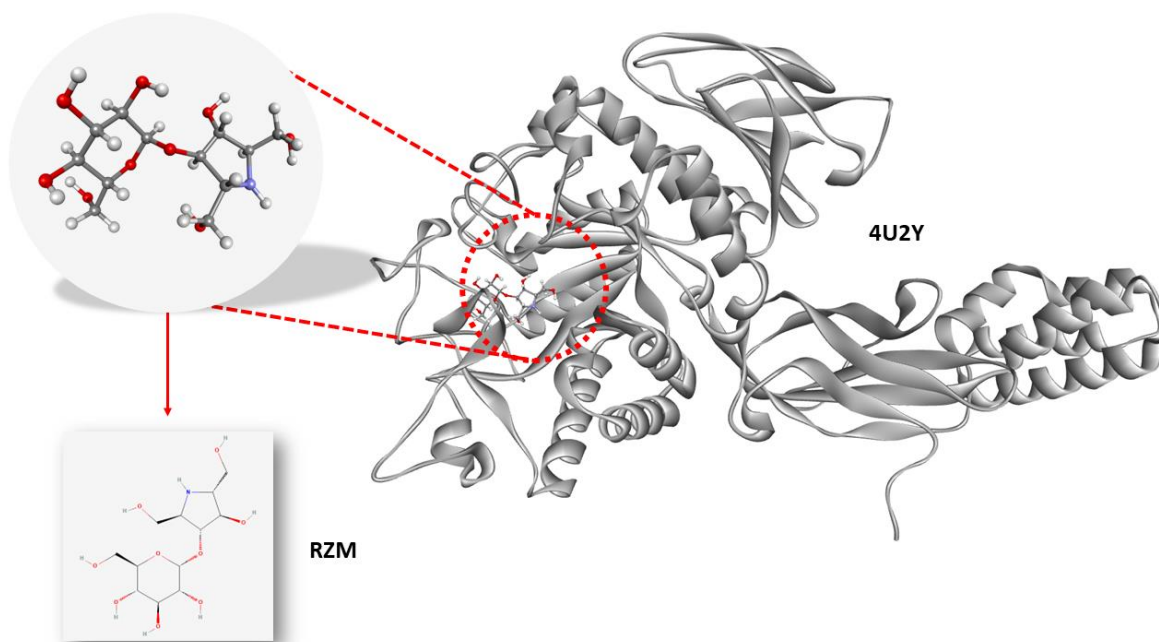


Figura 7. Ligante RZM na cavidade de ligação de 4U2Y e sua estrutura 2D.
Fonte: Desenvolvido pelo autor.

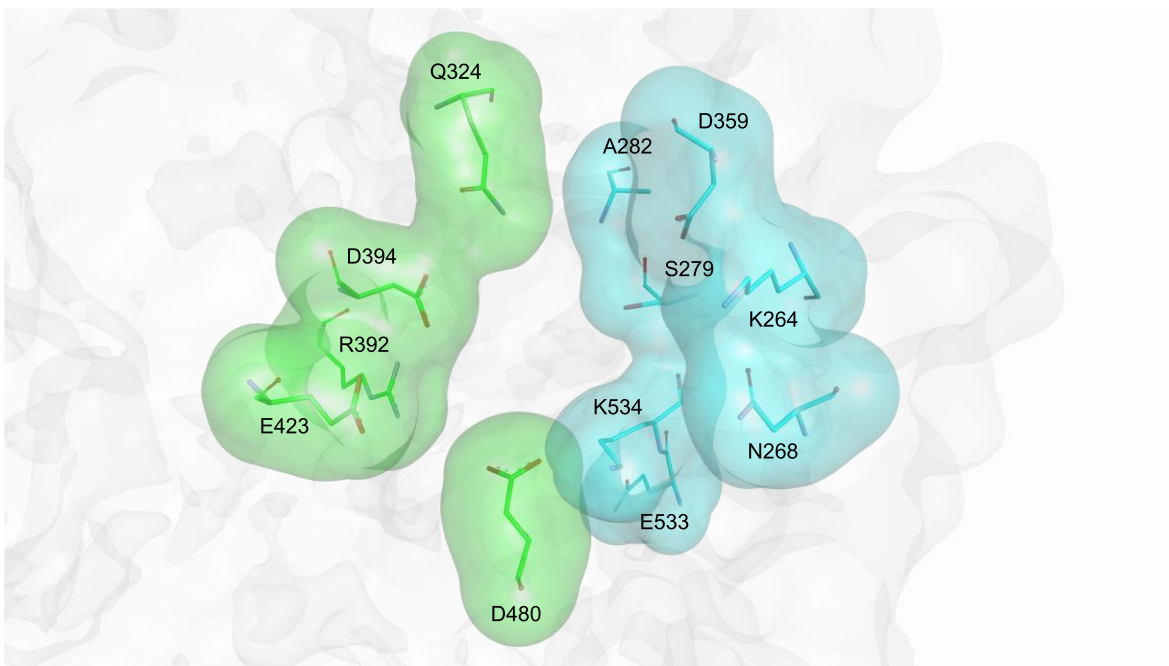


Figura 8. Subsítios que formam o sítio ativo de GlgE. O subsítio -1 é apresentado em verde e o subsítio -2, em azul.

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Sobre as interações que são responsáveis por colocar RZM na cavidade de ligação, é possível observar uma extensa rede de ligações de hidrogênio – convencionais e não convencionais. Na Figura 9, nota-se que há um maior número destas ligações entre o ligante e os resíduos do subsítio -1. Esta porção do sítio ativo tem como função alocar a porção redutora do substrato natural e a manutenção de interações com os resíduos catalíticos D394 e Q423 é essencial para determinar a capacidade inibitória deste composto. Além disso, destaca-se a presença de interação entre o nitrogênio do imino-manitol e D394, sugerida como característica dos aza-açúcares que se ligam ao sítio (Lindenberger, Kumar Veleti, Wilson, Sucheck, & Ronning, 2015). Além disso, a presença desta interação evidencia a melhor performance dos aza-açúcares formados por anéis de cinco membros com relação àqueles com anéis de seis membros em vista da capacidade dos primeiros em mimetizar a carga adotada pelo substrato natural durante o estado de transição (Veleti, Lindenberger, Ronning, & Sucheck, 2014). As ligações de hidrogênio com o subsítio -2, por sua vez, são descritas como essenciais para a acomodação dos ligantes ao sítio ativo. Neste caso, destaca-se a presença de duas ligações envolvendo D359, resíduo este que quando deletado em estudos de mutação causa a perda de atividade do fármaco avaliado,

ressaltando sua contribuição para a boa posição de compostos no sítio ativo de GlgE (Lindenberger, 2015).

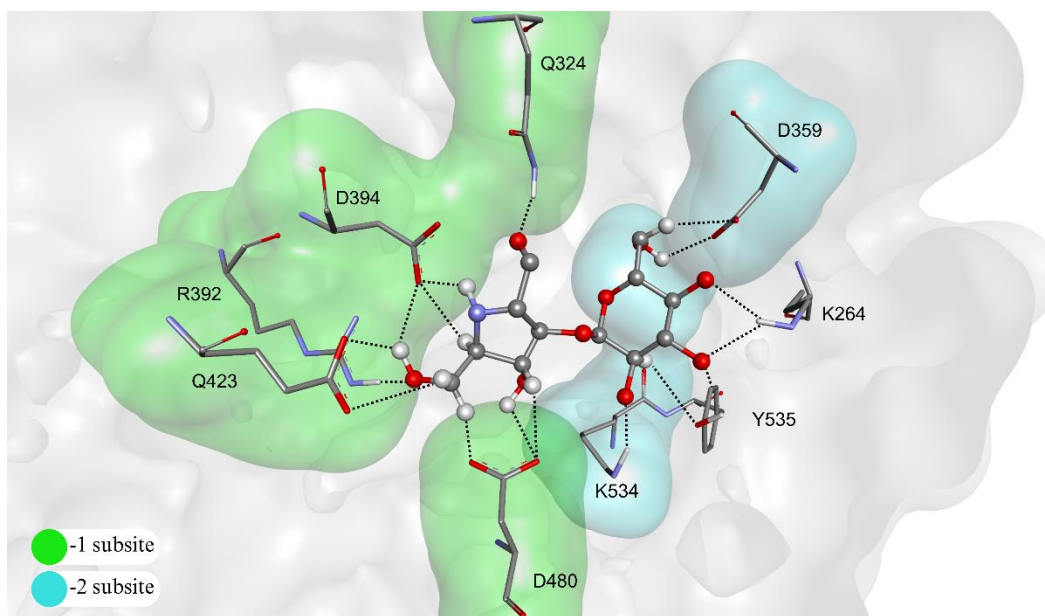


Figura 9. Ligações de hidrogênio entre o substrato cristalográfico RZM e o sítio ativo de GlgE.

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Ainda sobre as interações envolvendo o ligante cristalográfico, observa-se a contribuição das interações envolvendo sistemas π para o posicionamento deste composto no sítio. A Figura 10 mostra a interação com W281 para colocar o RZM em direção ao fundo da cavidade, estabilizando uma das substituições que parte do anel de cinco membros. Enquanto isso, as duas interações envolvendo Y357 estão possivelmente relacionadas com a estabilização dos substituintes que se direcionam para o topo da cavidade, posto que este resíduo faz parte do loop que cobre a cavidade.

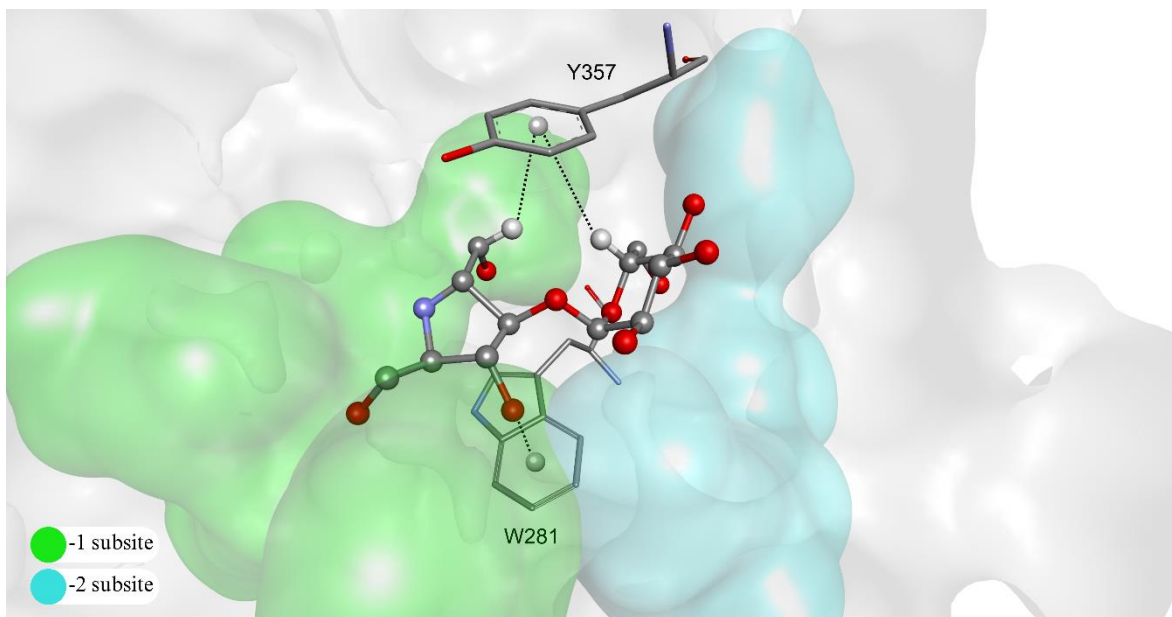


Figura 10. Interações envolvendo sistemas π entre RZM e o sítio ativo de GlgE.

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Em geral, estas interações observadas confirmam o que é descrito na literatura para o RZM, colocando-o como um bom inibidor de GlgE por sua capacidade de interagir com os subsítios -1 e -2 de forma a imitar a maneira segundo a qual se posiciona o substrato natural quando em seu estado de transição. A maioria das interações descritas em trabalhos publicados (Veleti, Lindenberger, Ronning, & Sucheck, 2014) (Lindenberger, Kumar Veleti, Wilson, Sucheck, & Ronning, 2015) foram encontradas nesta análise inicial validando, portanto, a escolha das condições de *screening* de interações intermoleculares.

3.2 Redocking

O resultado do *redocking* mostra uma excelente concordância entre a pose cristalográfica e a obtida pelo cálculo de *docking* (Figura 11). O desvio da média quadrática (RMSD pela sua sigla em inglês: *root mean square deviation*) foi de 0.331 Å. Em função destes resultados os parâmetros utilizados para o *redocking* serão utilizados nos cálculos de *docking* da GlgE e os aza-açúcares estudados.

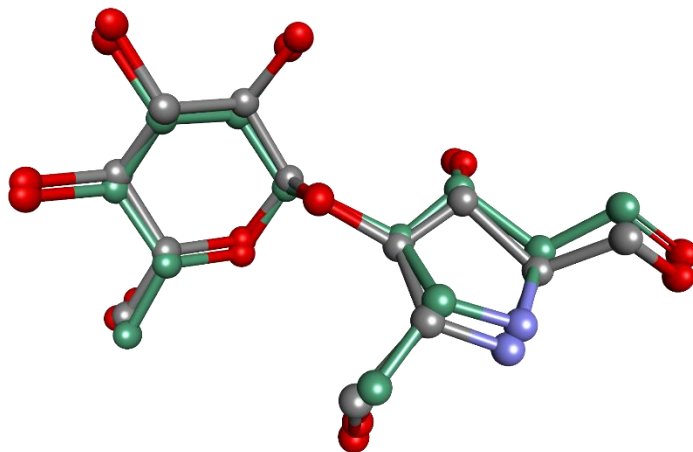


Figura 11. Pose do *redocking* – em verde - em relação ao ligante cristalográfico – em cinza.
Fonte: Desenvolvido pelo autor.

3.3 Docking

Na Tabela 4 estão apresentadas as interações de cada um dos ligantes – além de RZM - com os aminoácidos da cavidade, bem como os *scores* de *docking* calculados. O primeiro ponto a ser levantado é a prevalência das ligações de hidrogênio como o principal tipo de interação responsável pela ligação dos compostos ao sítio ativo. Como mencionado anteriormente, é típico que ligantes específicos de maltosiltransferases – tal qual os inibidores conhecidos para GlgE – apresentem extensas redes de ligações de hidrogênio distribuídas entre os dois subsítios da cavidade de ligação. Isto é observado com clareza para o ligante cristalográfico RZM, que apresenta 13 ligações deste tipo com resíduos de aminoácidos do sítio ativo. As ligações de hidrogênio são especialmente importantes por sua capacidade de modificar a atividade das proteínas, configurando, portanto, um critério importante a ser considerado na análise dos inibidores avaliados.

Tabela 4. Interações entre os compostos analisados e os resíduos da cavidade de ligação

	RZM	A591	A592	A481	A482	A531	A532
K264	hb lig-O...H-K	hb lig-O...H-K					
	hb lig-O...H-K						
N268		vdw lig-O...O-N					
S279		hb lig-O...H-S	vdw lig-O...O-S	vdw lig-O...O-S	vdw lig-O...O-S	hb lig-O...H-S	vdw lig-O...O-S
		vdw lig-O...O-S					
W281	π lig-O...Ct-W		π lig-O...Ct-W			π lig-H...Ct-W	hb lig-O...H-W
						π lig-H...Ct-W	
Q324	hb lig-O...H-Q		hb lig-O...H-Q	hb lig-O...H-Q			hb lig-O...H-Q
K355			hb lig-O...H-K		hb lig-O...H-K		
K356							hb lig-O...H-K
Y357	π lig-H...Ct-Y		hb lig-O...H-Y	hb lig-O...H-Y	π lig-O...Ct-Y	hb lig-O...H-Y	hb lig-O...H-Y
	π lig-H...Ct-Y		π lig-O...Ct-Y	π lig-O...Ct-Y		π lig-H...Ct-Y	π lig-O...Ct-Y
							π lig-O...Ct-Y
D359	hb lig-H...O-D	vdw lig-O...O-D					
	hb lig-H...O-D						
R392	hb lig-O...H-R						
D394	hb lig-H...O-D			hb lig-H...O-D			
	hb lig-H...O-D						
	hb lig-H...O-D						
N395				hb lig-O...H-N	hb lig-O...H-N		hb lig-O...H-N
E423	hb lig-H...O-E					hb lig-H...O-E	vdw lig-O...O-E
	hb lig-H...O-E						
D480	hb lig-H...O-D	hb lig-H...O-D	hb lig-H...O-D	hb lig-H...O-D	hb lig-H...O-D	hb lig-H...O-D	hb lig-H...O-D
	hb lig-H...O-D		hb lig-H...O-D	vdw lig-O...O-D			
	hb lig-H...O-D		vdw lig-O...O-D				
			vdw lig-O...O-D				
E528					hb lig-H...O-E	vdw lig-O...O-E	hb lig-H...O-E
							hb lig-H...O-E
K534	hb lig-O...H-K		hb lig-O...H-K		hb lig-O...H-K		hb lig-O...H-K
Y535	hb lig-H...O-Y						vdw lig-O...O-Y
	hb lig-O...H-Y						

Para análise mais detalhada das interações de A591, a Tabela 5 apresenta os parâmetros utilizados para definir as interações entre o ligante e o sítio ativo de GlgE.

Tabela 5. Interações entre A591 e o sítio ativo de GlgE

Tipo de interação	Resíduo	Átomo ligante	Átomo resíduo	Distância entre átomos (Å)	Ângulo D-H...A (°)	Ângulo α (°)
LH	K264	O6	HZ3	1,92	136	-
	S279	H4A	OG	2,12	135	-
	D480	H6A	OD2	2,32	154	-
VdW	N268	O6	OD1	3,19	-	-
	S279	O7	OG	2,78	-	-
	N359	O8	OD2	2,76	-	-

Analisando a tabela acima, é evidente que A591 estabelece ligações de hidrogênio e interações de van der Waals. No caso deste composto, a ligação de hidrogênio com D480 está diretamente ligada ao posicionamento de A591 no subsítio -1, enquanto a interação com S279 orienta o anel de cinco membros para o subsítio -2, desempenhando um papel fundamental na estabilização dessa estrutura no centro da cavidade molecular. Além disso, a ligação de hidrogênio com K264 estabiliza uma das projeções que se estendem deste anel de cinco membros em direção à abertura associada ao subsítio -2, como ilustrado na Figura 12. Essas interações são visualizadas de maneira mais detalhada na Figura 13.

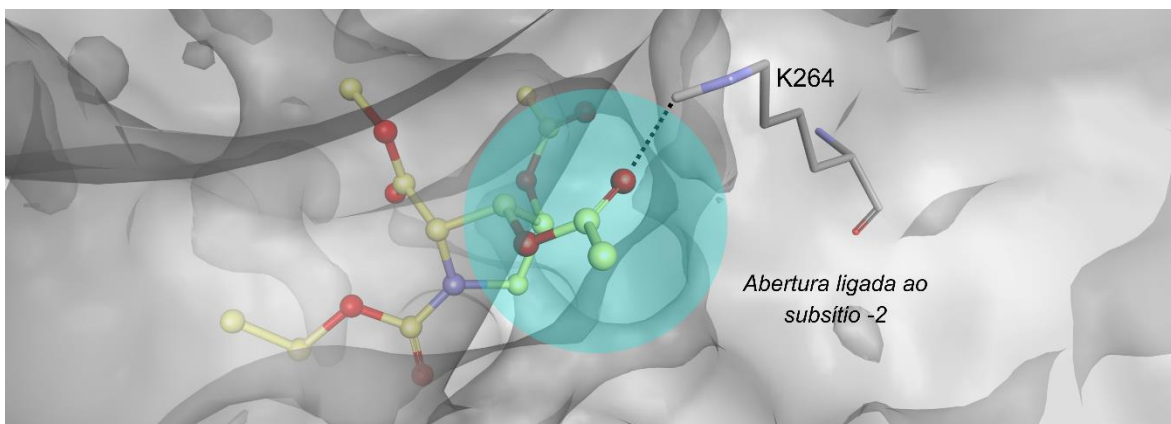


Figura 12. Projeção do anel de cinco membros em direção à abertura ligada ao subsítio -2 estabilizada pela ligação de hidrogênio com K264.

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

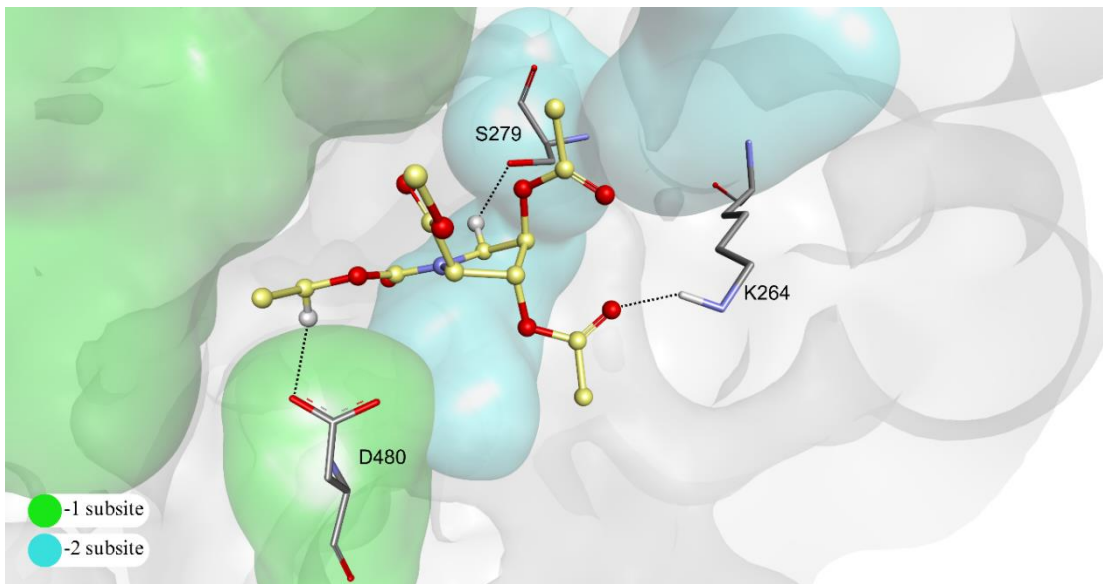


Figura 13. Ligações de hidrogênio entre A591 e os resíduos do sítio de ligação de GlgE.
 Fonte: Desenvolvido pelo autor.

No que diz respeito às interações de van der Waals envolvendo A591, três delas foram identificadas, todas do tipo O...O. As interações com S279 e D359 desempenham um papel crucial na ligação de uma das projeções que se estende do anel de cinco membros em direção ao subsítio -2. Simultaneamente, a interação com K268 complementa a função da ligação de hidrogênio com K264, conectando a projeção do anel de cinco membros à abertura associada ao subsítio -2. A Figura 14 mostra estas interações.

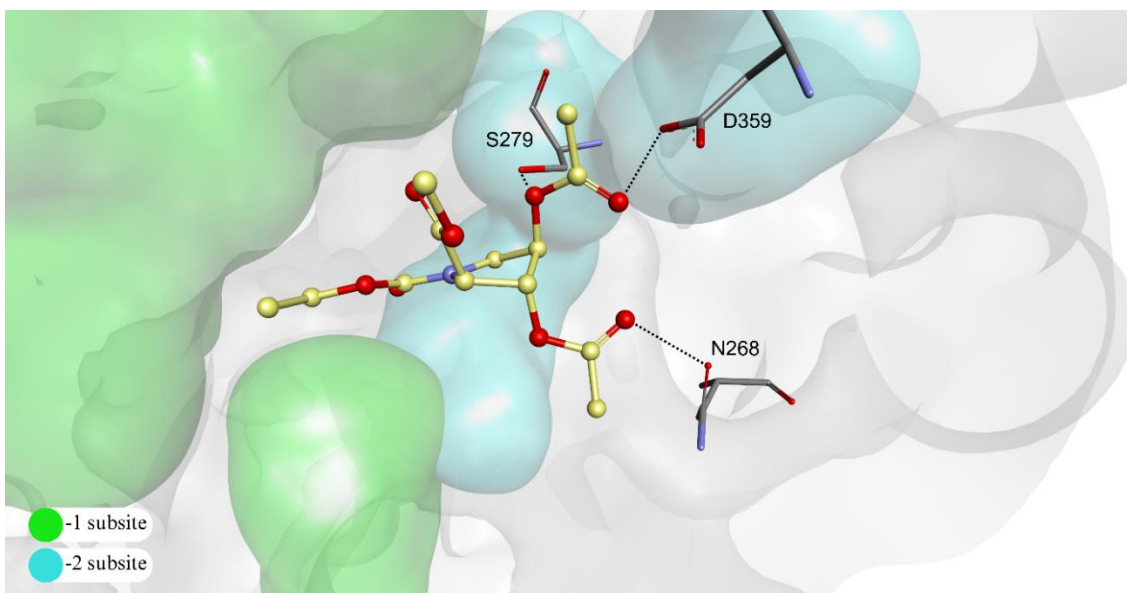


Figura 14. Interações de van der Waals entre A591 e o sítio ativo de GlgE.
 Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Para o composto A592, a Tabela 6 mostra os parâmetros para cada uma das interações entre este ligante e o sítio ativo.

Tabela 6. Interações entre A592 e o sítio ativo de GlgE

Resíduo	Átomo ligante	Átomo resíduo	Distância entre átomos (Å)	Ângulo D-H...A (°)	Ângulo α (°)
Q324	O1	HE21	2,04	160	-
K355	O8	HZ2	3,00	123	-
Y357	O8	HH	2,32	129	-
D480	H2	OD1	2,64	111	-
	H3	OD1	2,53	105	-
K534	O7	HZ1	2,80	121	-
W281	O6	Ct	3,76	-	29
Y357	O1	Ct	4,47	-	8
S279	O3	OG	2,92	-	-
D480	O7	OD1	2,92	-	-
	O6	OD2	2,48	-	-

Identificou-se três ligações de hidrogênio que desempenham um papel importante na ligação de A592 ao subsítio -1. Essas ligações envolvem os resíduos Q324, responsável por estabilizar o substituinte do nitrogênio, e D480, cujas ligações de hidrogênio conectam o anel de cinco membros na cavidade em dois pontos distintos. Além disso, a ligação com K534 é a única entre A592 e o subsítio -2, orientando um dos substituintes do anel de cinco membros em direção à abertura ligada a este subsítio. É importante mencionar que essa função também é desempenhada pelas ligações com os resíduos Y357 e K355. Uma visão detalhada dessas ligações de hidrogênio é apresentada na Figura 15.

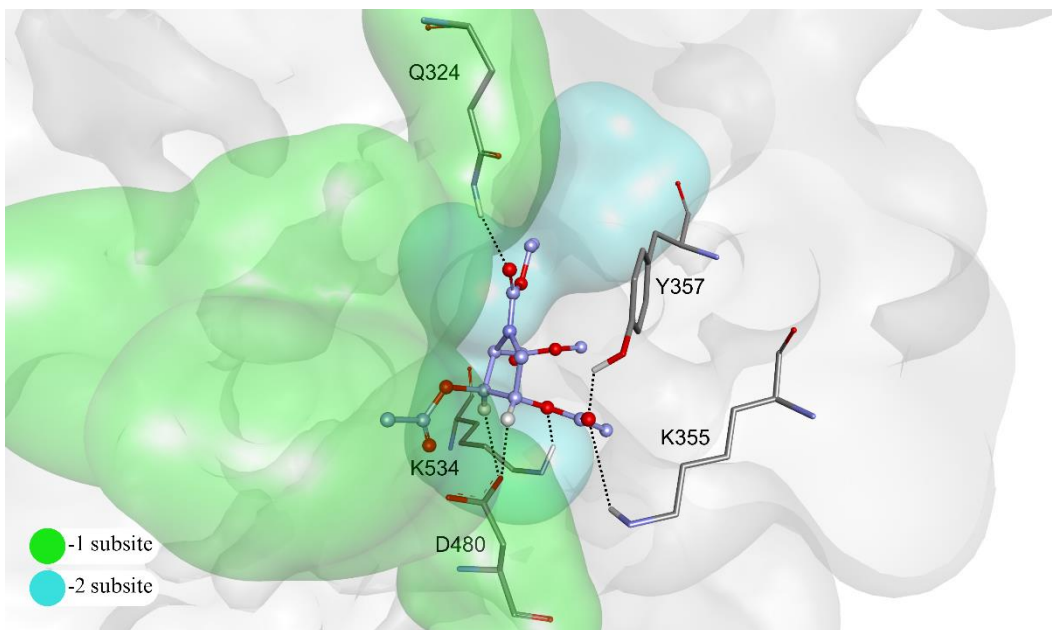


Figura 15. Ligações de hidrogênio entre A592 e o sítio ativo de GlgE.
Fonte: Desenvolvido pelo autor.

No que diz respeito às interações π envolvendo A592, observa-se que a interação com W281 desempenha um papel crucial ao ligar esse composto ao fundo da cavidade, especialmente o substituinte que se dirige a ela. Em contraste, a interação π com Y357 conecta as partes do composto posicionadas no subsítio -2 à porção superior da cavidade. Esses detalhes são ilustrados na Figura 16.

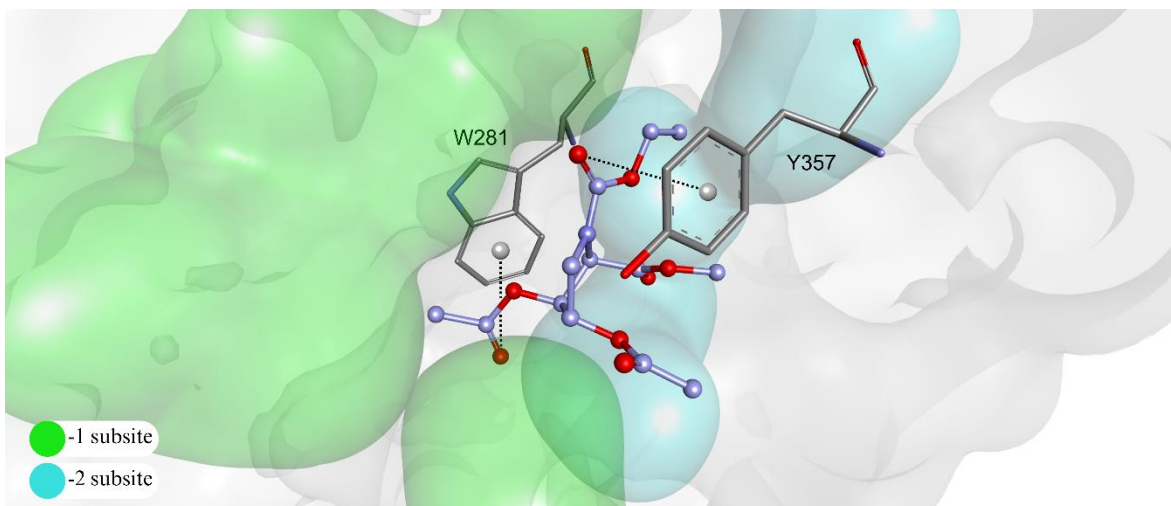


Figura 16. Interações π entre A592 e o sítio ativo de GlgE.
Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Por fim, as interações de van der Waals observadas em A592 são todas do tipo O...O e contribuem para estabilizar os substituintes que se voltam tanto para o subsítio -1, no

caso de D480, quanto para o subsítio -2, no caso de S279. É importante destacar que a interação com S279 e uma das interações com D480 estão diretamente relacionadas à ligação de A592 com as porções superiores da cavidade. Essas interações estão apresentadas na Figura 17.

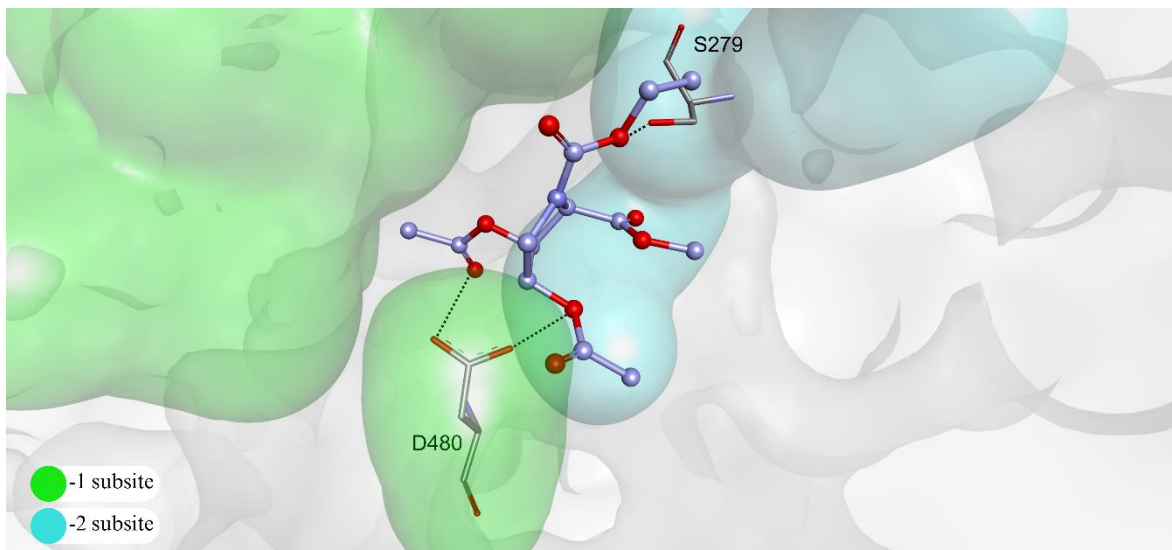


Figura 17. Interações de van der Waals entre A592 e o sítio ativo de GlgE.

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

A comparação entre os ligantes A591 e A592 revela diferenças significativas no número e tipo de interações intermoleculares observadas. Enquanto A591 apresenta apenas três ligações de hidrogênio e três interações de van der Waals, A592 exibe um aumento expressivo no número de ligações de hidrogênio, além de duas interações com sistemas π . Estas interações estão diretamente relacionadas ao posicionamento desses ligantes no sítio ativo de GlgE.

A Figura 18, apresentada abaixo, destaca a comparação entre A591 e A592 em relação à cavidade de ligação e aos subsítios -1 e -2. É evidente um espelhamento na posição dos compostos dentro do sítio ativo, conforme esperado para isômeros. Nesse cenário, a amina do anel de cinco membros de A591 aponta em direção ao subsítio -1, enquanto a de A592 está voltada para o subsítio -2. Como resultado, não há sobreposição de nenhuma das substituições que se originam do anel em termos de posição dentro da cavidade. Apesar disso, é possível identificar uma tendência de posicionamento geral: o fundo da cavidade, principalmente marcado pela presença de W281, acomoda um dos substituintes em ambos os casos. Além disso, um dos substituintes volta-se para o subsítio -1, enquanto o canal do

subsítio -2 acomoda outra substituição. Por fim, há uma inclinação clara para direcionar uma das três substituições para a abertura projetada a partir do subsítio -2 e do *loop* que tampa a cavidade.

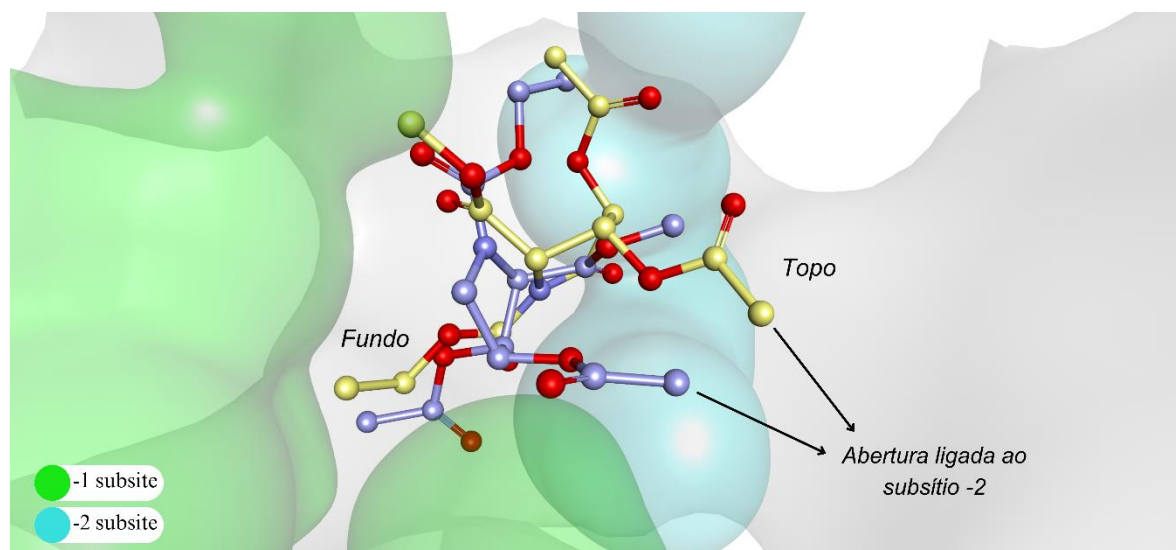


Figura 18. Posicionamento geral de A591 e A592 no sítio ativo de GlgE.

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Avaliando-se a comparação de ligação à cavidade de ambos os ligantes e as interações estabelecidas com os resíduos do sítio ativo em cada um dos casos, é possível observar a predominância de interações envolvendo o subsítio -2 em A591, o que possivelmente explica a maior ocupação dessa região por este ligante. Em contrapartida, em A592 as interações envolvendo o subsítio -1 predominam, o que também pode justificar a ocupação desta região. É sabido que os subsítios -1 e -2 apresentam funções distintas com relação à atividade inibitória de GlgE, estando o último relacionado com a ligação dos compostos na cavidade, enquanto um maior número de interações com o primeiro estaria possivelmente ligado a um efeito inibitório mais expressivo. Sendo assim, quando se compara A591 e A592, é possível que a ocupação do sítio -1 por A592 e a extensa rede de interações que estabelece com ele indiquem um maior potencial inibitório quando comparado ao seu isômero A591. Apesar disso, não é possível quantificar o efeito da perda de interações com o subsítio -2 para a estabilidade do ligante dentro da cavidade.

Ao analisar as tendências de posicionamento geral dos ligantes do tipo A59, podemos identificar as interações responsáveis por essas observações. A primeira semelhança de posicionamento é a orientação de uma das ramificações do anel de cinco

membros para o fundo da cavidade. Em ambos os compostos, o resíduo D480 desempenha um papel crucial nessa ligação, seja por meio de uma ligação de hidrogênio em A591 ou por interações de van der Waals em A592. Além disso, em A592, a interação π com W281 também contribui para posicionar essa ramificação no fundo da cavidade. Portanto, é possível inferir que esta ligação está correlacionada com o resíduo D480 e pode ser reforçada por interações com os resíduos que formam o assoalho do sítio de ligação, como W281.

A segunda semelhança de posicionamento diz respeito às substituições do anel de cinco membros voltadas para o subsítio -1. Em A591, essa orientação é resultado da ligação de hidrogênio entre S279 e o anel principal, gerando uma leve inclinação do anel no centro da cavidade e direcionando essa parte do ligante para tal região. Já em A592, a carboxila de uma das substituições se volta para o subsítio -1 devido à ligação de hidrogênio com Q324 e à ligação π com Y357, enquanto o restante dessa ramificação é projetado em direção ao subsítio -2. Nesse caso, a comparação entre A591 e A592 revela a tendência de posicionar partes desses ligantes em uma região do subsítio -1, mas não é possível afirmar quais resíduos são determinantes para esse fenômeno. Além disso, é importante notar que A592 se liga de maneira mais direta nessa região – já que em A591 ocorre apenas a ligação com o anel principal -, sendo sustentado por uma rede mais complexa de interações em comparação com seu par.

Quanto à terceira semelhança - o posicionamento das ramificações no canal do subsítio -2 - em A591, as interações de van der Waals com os resíduos D359 e N268 são responsáveis pela ligação da ramificação que se origina do anel de cinco membros nessa região. Em A592, a ramificação projetada até o subsítio -2 a partir do subsítio -1 se conecta a essa região por meio de uma interação de van der Waals com S279. Assim como observado no posicionamento das partes do ligante no subsítio -1, não é possível determinar um ou mais resíduos específicos relacionados à ligação dessas partes de A591 e A592 no subsítio -2, sendo então possível postular que são as interações de van der Waals responsáveis por essa ligação.

Por fim, a quarta e última tendência observada nos ligantes do tipo A59 refere-se ao direcionamento das ramificações do anel de cinco membros para a cavidade que parte do subsítio -2. Em A591, uma ligação de hidrogênio com K264 e uma interação de van der Waals com N268 são responsáveis por promover esse posicionamento, ambas envolvendo a mesma carboxila do ligante. Já em A592, uma variedade maior de interações contribui para essa projeção, incluindo ligações de hidrogênio com os resíduos K534, Y357 e K355, além da interação de van der Waals com D480. É importante notar o número significativo de ligações de hidrogênio envolvidas na estabilização da porção de A592 que é projetada pela cavidade do subsítio -2, enquanto essa porção em A591 é sustentada por uma rede de interações menos densa.

Ainda é importante destacar o papel de ligações de hidrogênio com o resíduo D480 que não necessariamente estão relacionadas com algum tipo de posicionamento comum. Apesar de já terem sido mencionadas neste contexto, as ligações de hidrogênio envolvendo este resíduo de aminoácido são vistas em ambos os compostos A59n e são descritas como típicas de ligantes da família de proteínas GH13 à qual pertence a GlgE de Mtb.

Os parâmetros das interações encontradas para A481 encontram-se na Tabela 7. Na análise destas interações, nota-se que as ligações de hidrogênio atuam de forma a garantir, em sua maioria, a interação com o subsítio -1. A Figura 19 mostra como o composto posiciona-se dentro do sítio de ligação com o anel de cinco membros voltado para a o subsítio -1 principalmente devido às ligações de hidrogênio com Q324, N394, N395 e D480. A interação com Y357, por sua vez, envolve o substituinte que se direciona para a abertura formada entre o subsítio -1 e o loop responsável por abrir e fechar a cavidade, evidenciando o papel de Y357 com a estabilização das porções dos compostos que se afastam do fundo dela. Esta última está mostrada em detalhes na Figura 20.

Tabela 7. Detalhamento das interações entre A481 e GlgE

Resíduo	Átomo ligante	Átomo resíduo	Distância entre átomos (Å)	Ângulo D-H...A (°)	Ângulo α (°)
Q324	O7	HE22	1,53	164	-
Y357	O5	HH	2,07	135	-
D394	H16	OD1	2,96	132	-
N395	O2	HD22	2,76	107	-
D480	N1	OD1	3,51	158	-
Y357	O3	Ct	3,52	-	22
S279	O4	OG	3,06	-	-
D480	O6	OD2	2,64	-	-

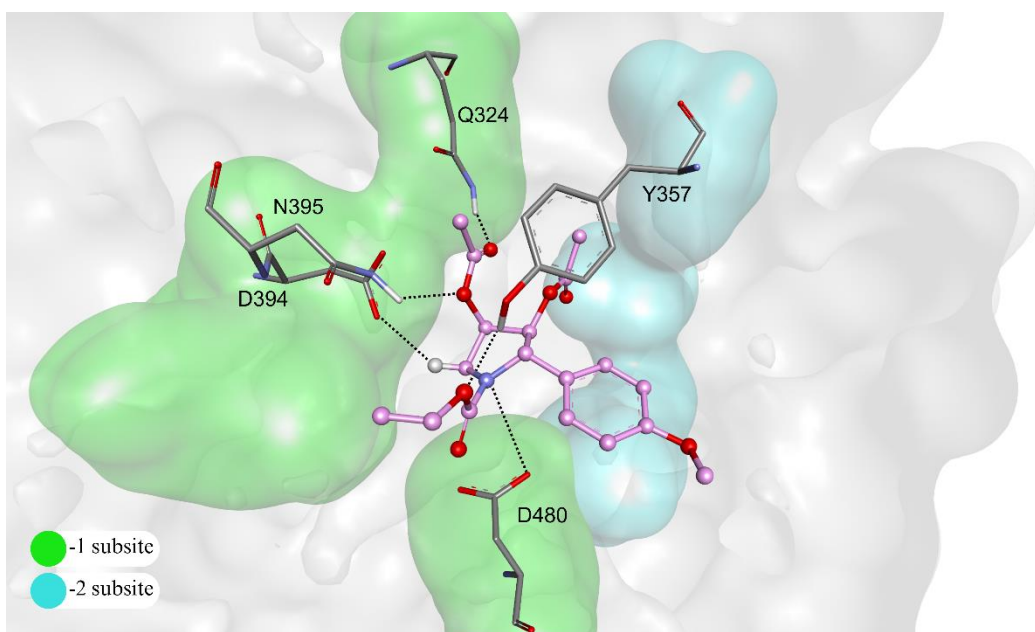


Figura 19. Ligações de hidrogênio para A481 no sítio de ligação de GlgE.
Fonte: Desenvolvido pelo autor.

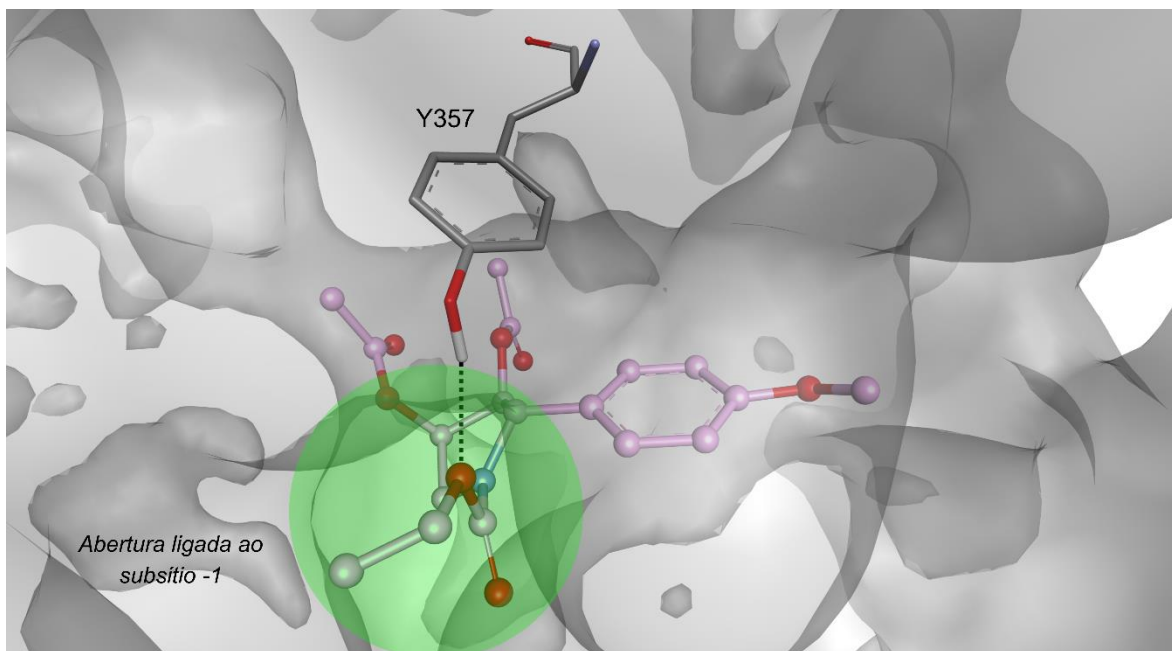


Figura 20. Projeção de A481 na abertura ligada ao subsítio -1 e ligação de hidrogênio com Y357.
 Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Quanto às interações π , foi identificada apenas uma interação entre A481 e Y357, possivelmente relacionada à presença de uma ligação de hidrogênio envolvendo o mesmo resíduo, conforme mencionado anteriormente. É importante observar que essa interação π não está associada à porção de A481 que se projeta na cavidade ligada ao subsítio -1, mas sim à estabilização de um dos substituintes que se direciona para o subsítio -2. Essa interação específica pode ser vista na Figura 21. Mais ainda, na Figura 22, destacam-se as interações de van der Waals para este mesmo composto. Neste contexto, a interação com D480 contribui para a ligação de A481 com o subsítio -1, enquanto a interação com S279 está relacionada à estabilização das porções deste ligante que se projetam em direção ao subsítio -2.

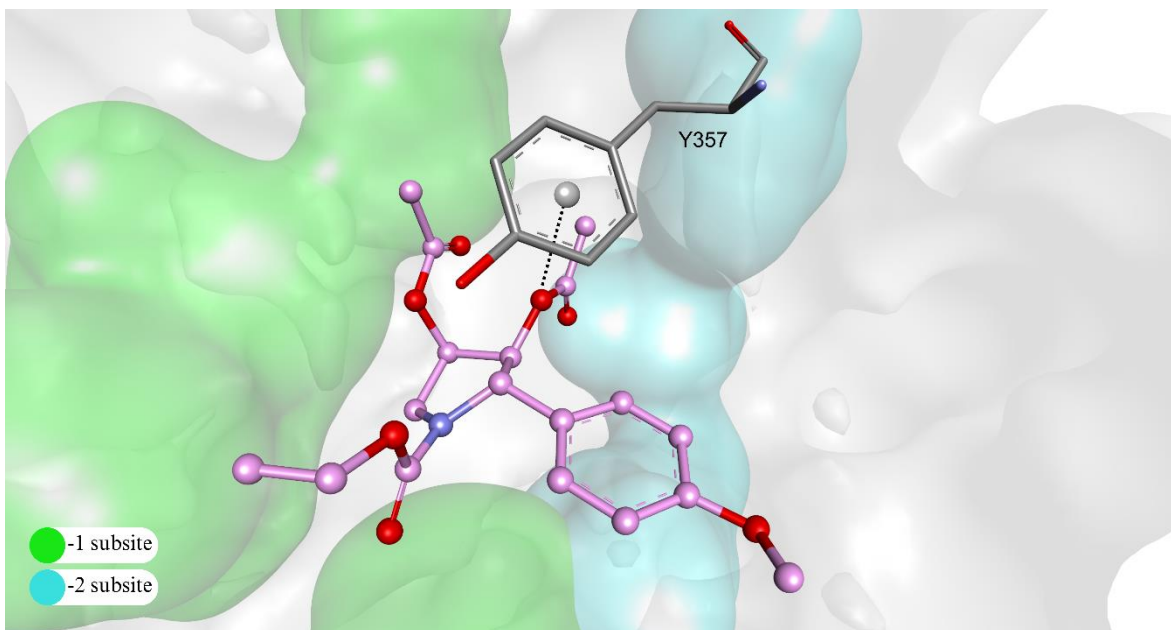


Figura 21. Ligação π para o ligante A481.
 Fonte: Desenvolvido pelo autor.

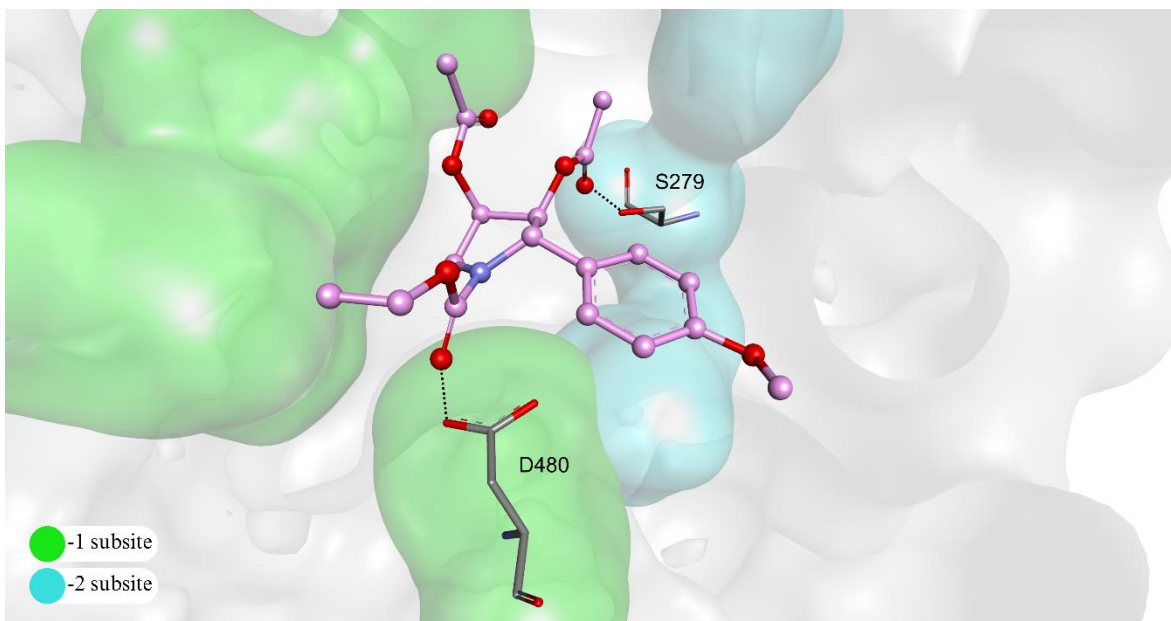


Figura 22. Interações de van der Waals observadas em A481.
 Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Um ponto a ser destacado sobre A481 é o impacto da adição de um anel aromático num substituinte. Ao compararmos o posicionamento deste ligante no sítio ativo com o observado para A591, notamos uma alteração drástica: enquanto A591 estava predominantemente na região do subsítio -2, A481 se desloca em direção ao subsítio -1. Essa mudança na posição resulta em uma orientação completamente diferente do anel de

cinco membros dentro da cavidade. Agora, o nitrogênio está voltado também para o subsítio -2, formando uma ligação de hidrogênio com D480. Vários fatores podem estar contribuindo para essa alteração, incluindo o possível impedimento estérico causado pela presença do anel aromático no canal do subsítio -1.

É interessante notar que essa mudança no posicionamento não apenas introduz novas interações com o subsítio -1, mas também resulta na perda de interações estabelecidas com os resíduos K264, N268 e D359 do subsítio -2, que eram características de A591. Além disso, apesar de induzir alterações significativas no posicionamento geral do ligante, a adição do anel aromático não resultou em interações específicas que justifiquem uma melhor adaptação deste substituinte na abertura do subsítio -2, por onde se projeta. Esse direcionamento do anel para a abertura exposta ao solvente é intrigante, considerando a própria natureza hidrofílica desta região. Esta situação é ilustrada na Figura 23.

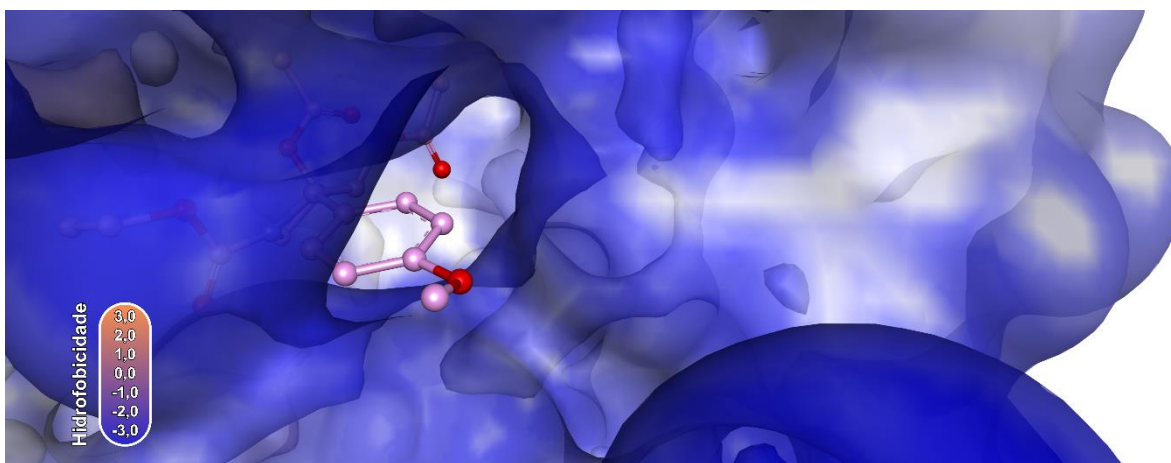


Figura 23. Anel aromático de A481 projetado pela abertura ligada ao subsítio -2 e hidrofobicidade da região. Fonte: Desenvolvido pelo autor.

No caso do composto A482, as interações estão detalhadas na Tabela 8. Nota-se que as ligações de hidrogênio relacionadas ao subsítio -1 ocorrem em menor número para este ligante. Estas incluem interações com os resíduos K355, N395 e D480, sendo esta última responsável pela ligação do nitrogênio do anel. Além dessas interações, há uma ligação com K534, que pertence ao subsítio -2 e está envolvido na estabilização do substituinte do nitrogênio. Além disso, há uma interação com E528, que também contribui para a estabilização deste mesmo substituinte na região próxima ao subsítio -2. Essas ligações de hidrogênio estão apresentadas na Figura 24.

Tabela 8. Detalhamento das interações para A482

Resíduo	Átomo ligante	Átomo resíduo	Distância entre átomos (Å)	Ângulo D-H...A (°)	Ângulo α (°)
K355	O6	HZ2	2,53	162	-
N395	O3	HD22	2,77	123	-
D480	N1	OD1	3,25	156	-
E528	H18A	OE2	2,77	161	-
K534	O5	HZ	2,26	145	-
Y357	O2	Ct	3,71	-	28
S279	O7	OG	2,81	-	-

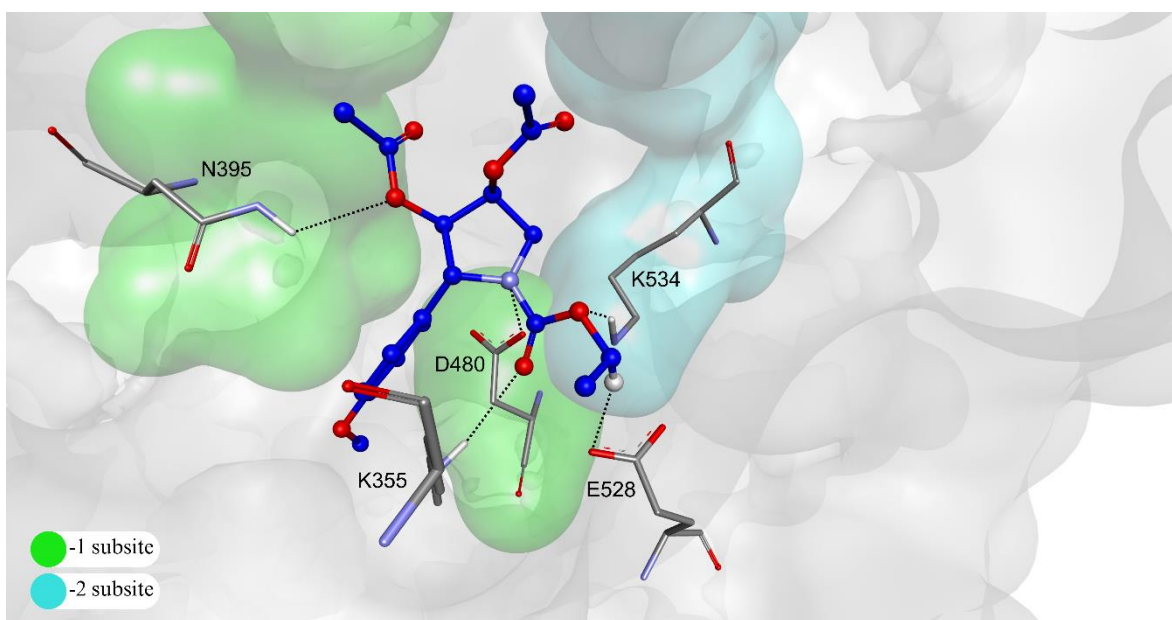


Figura 24. Ligações de hidrogênio entre A482 e o sítio ativo de GlgE.
Fonte: Desenvolvido pelo autor.

No que diz respeito às interações envolvendo sistemas π em A482, os resultados obtidos são bastante semelhantes aos observados para seu par A481; ou seja, apenas uma ligação π envolvendo Y357 foi identificada. Assim como em A481, a presença dessa ligação em A482, como mostrado na Figura 25, está relacionada à estabilização de um dos substituintes que se projeta em direção ao loop que encerra a cavidade, ao qual pertence Y357. Além dessa interação π , foi observada uma interação do tipo van der Waals com S279 durante a análise de A482, conforme ilustrado na Figura 26. Esta interação está relacionada à ligação de um substituinte que está em direção ao subsítio -2.

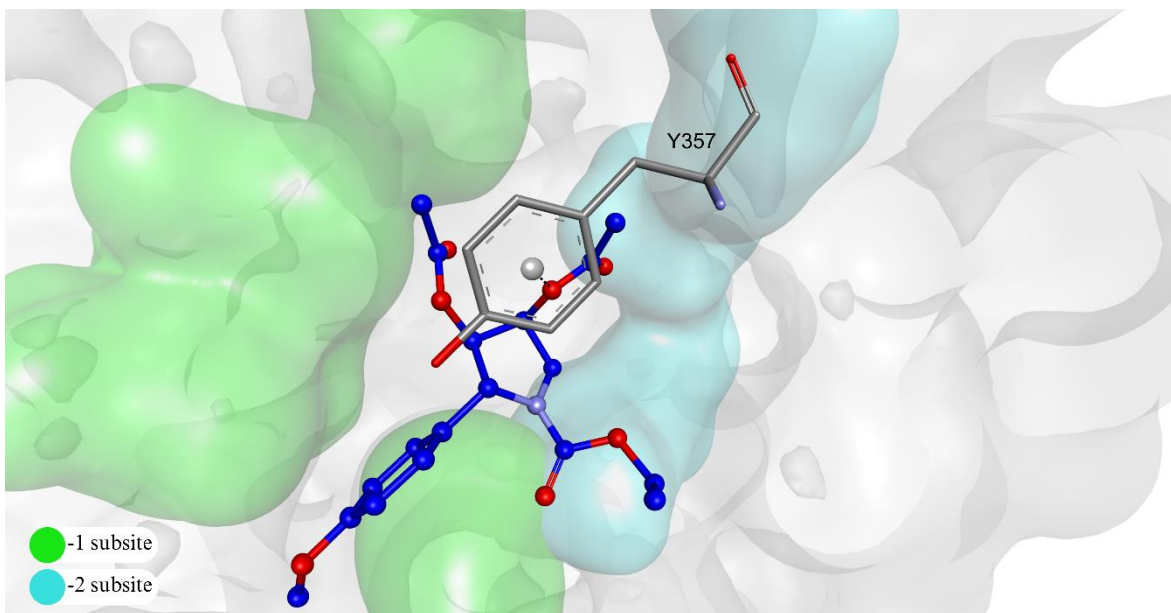


Figura 25. Interação π em A482.
 Fonte: Desenvolvido pelo autor.

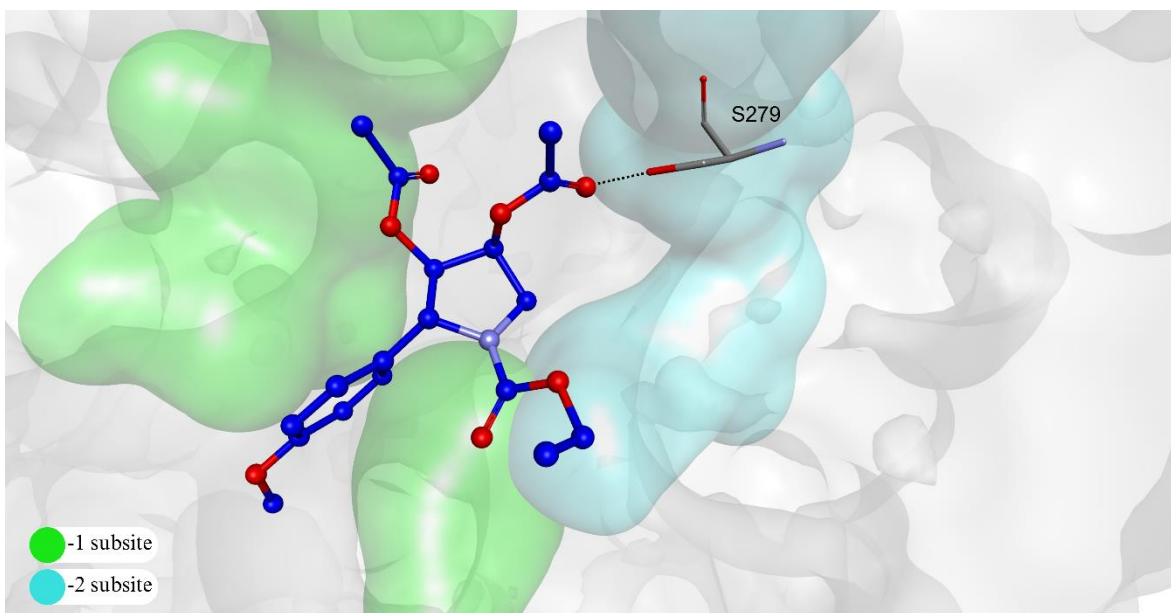


Figura 26. Interação de van der Waals entre A482 e S279.
 Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Da mesma forma que ocorre com A481 e A591, a comparação entre o efeito da adição do anel aromático em A482 em relação a A592 revela uma alteração no posicionamento geral do ligante. Neste caso, ele ocupa regiões mais próximas ao topo da cavidade, ao invés de imergir parte de sua estrutura no fundo, como acontece com A591. No entanto, mesmo após essa mudança de posição, ao comparar A592 e A482, observa-se

que o ligante ainda mantém interações com resíduos cruciais do subsítio -1, como K355, Y357 e D480. O mesmo vale para o subsítio -2, onde as interações com os resíduos K534 e S279 são preservadas.

Um ponto a ser destacado é que, de maneira semelhante ao que ocorre com A481, o anel aromático de A482 que se projeta pela abertura ligada ao subsítio -1 como mostrado na Figura 27.

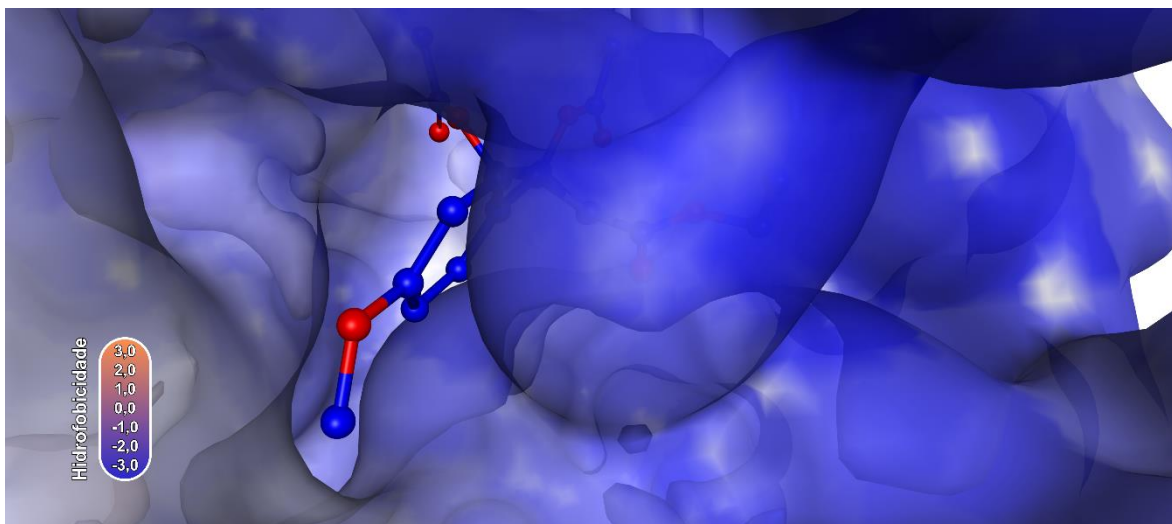


Figura 27. Anel aromático de A482 projetado pela abertura ligada ao subsítio -1 e hidrofobicidade da região. Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Ao comparar o posicionamento de A481 e A482 dentro da cavidade de ligação de GlgE, observa-se que, apesar de ambos os compostos apresentarem o mesmo número de ligações de hidrogênio, em A481 essas ligações formam uma rede capaz de estabilizar diversos substituintes em direção ao subsítio -1. Por outro lado, a porção deste composto que ocupa o subsítio -2 é estabilizada apenas pela interação de van der Waals com S279. Em contraste, em A482, as ligações de hidrogênio com o subsítio -1 são menos numerosas, e observa-se a presença dessas ligações na região do subsítio -2, aumentando assim a interação deste composto com essa parte da cavidade.

Apesar dessas diferenças, ambos compostos se ligam de maneiras muito similares à cavidade, posicionando o anel de cinco membros na interface entre os subsítios -1 e -2. O substituinte ligado ao nitrogênio e o que contém o anel aromático são direcionados para as aberturas formadas pela presença do loop formado pelos resíduos K355-Y357, conforme ilustrado na Figura 28.

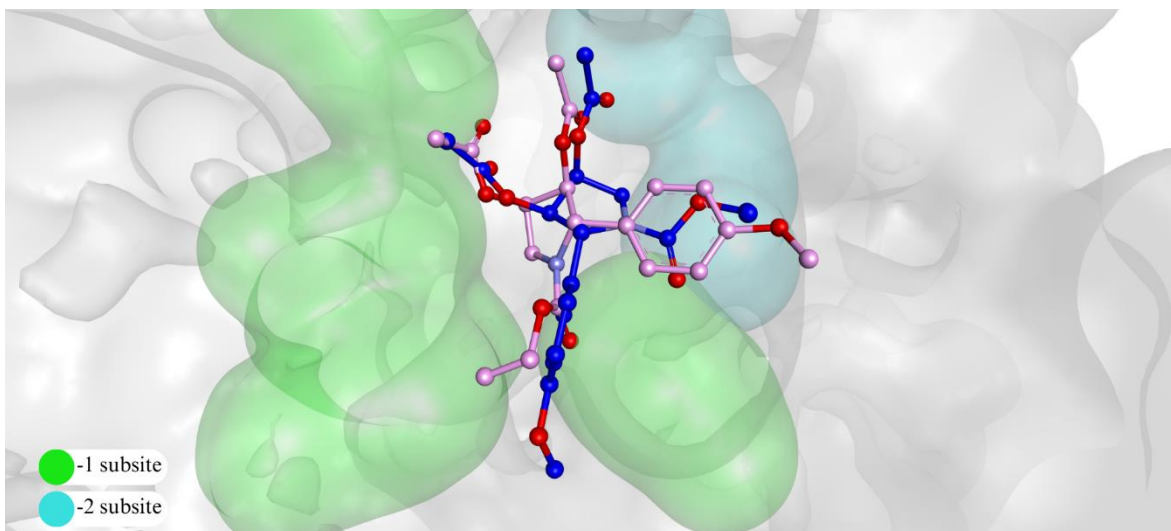


Figura 28. Sobreposição entre os ligantes A481 (em rosa) e A482 (em azul).

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Outro ponto em comum observado para esses ligantes é a orientação do nitrogênio no centro da cavidade, possivelmente devido à ligação de hidrogênio com D480. Por fim, nota-se que, mesmo apresentando orientações espaciais distintas, ambos os ligantes projetam seus substituintes para o topo da cavidade, o que é corroborado pelas interações compartilhadas com Y357 e S279.

Os parâmetros utilizados para determinar as interações de A531 encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9. Interações para A531 em GlgE

Resíduo	Átomo ligante	Átomo resíduo	Distância entre átomos (Å)	Ângulo D-H...A (°)	Ângulo α (°)
S279	O6	HB1	2,43	114	-
Y357	O4	HH	1,90	166	-
E423	H7B	OE1	2,93	105	-
D480	N1	OD1	3,30	166	-
W281	H12A	Ct	3,56	-	26
	H12B	Ct	3,44	-	11
Y357	H14A	Ct	3,65	-	12
E528	O9	OE2	2,17	-	-

As ligações de hidrogênio com os resíduos Y357, E423 e D480 têm como papel a ligação de A531 no subsítio -1. A ligação de hidrogênio com E423 encontrada apenas em A531 - sendo uma interação de van der Waals em A532, como discutido adiante – é de extrema relevância vista a função catalítica deste resíduo no processamento da maltose-1-

fosfato. Sendo assim, a manutenção de ligações tal como a de hidrogênio com este resíduo tem potencial inibitório ao torna-lo inacessível para catálise do substrato natural. A ligação de hidrogênio com D480 é também mantida neste caso e auxilia na ligação do nitrogênio ao subsítio -1 da mesma forma como encontrado anteriormente para outros ligantes. Por fim, a ligação com Y357 tem papel importante no direcionamento do anel aromático único da série A53n para a cavidade que parte do subsítio -1. Estas três ligações de hidrogênio são ilustradas na Figura 29.

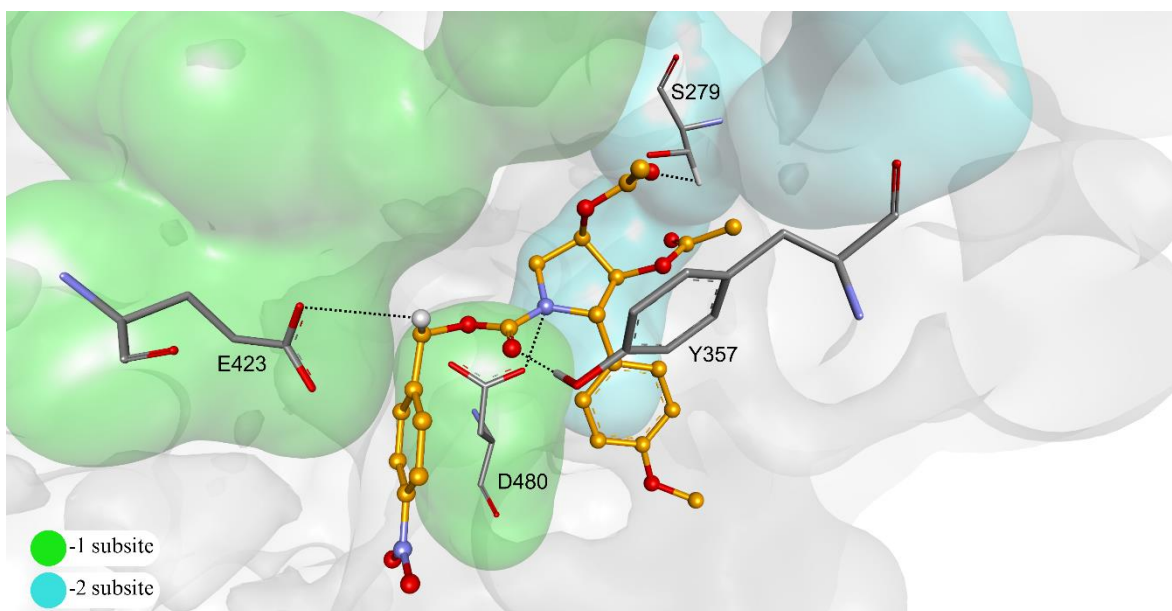


Figura 29. Ligações de hidrogênio para A531.

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Sobre as interações envolvendo sistemas π , as duas interações com W281 atuam de maneira a ligar o anel de cinco membros ao fundo da cavidade, estabilizando-o entre os subsítios -1 e -2. Já a ligação π com Y357 auxilia na ligação de um dos substituintes que está em direção ao subsítio -2. Estas três interações π podem ser vistas na Figura 30. Ainda, um fato interessante a ser destacado sobre este tema é que não se encontrou interações π envolvendo os anéis aromáticos desta estrutura.

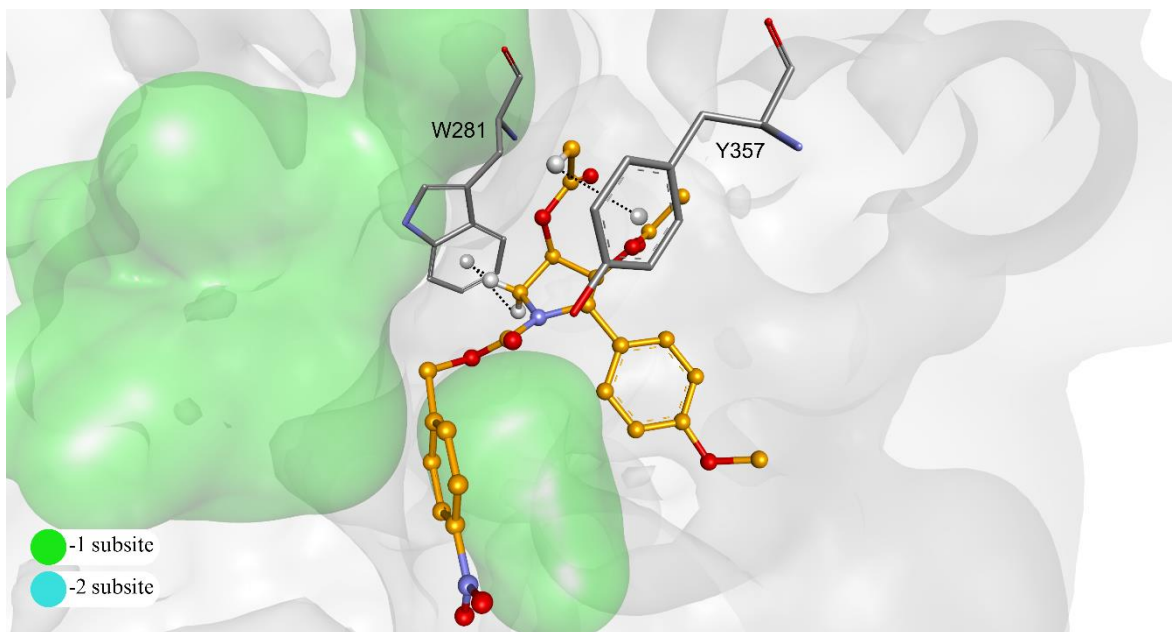


Figura 30. Interações π para A531.
 Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Por fim, a única interação de van der Waals identificada para A531 é do tipo O...O com o resíduo E528 e tem como função estabilizar o anel aromático comum à série A48n que se projeta pela abertura ligada ao subsítio -2. A Figura 31 mostra esta situação.

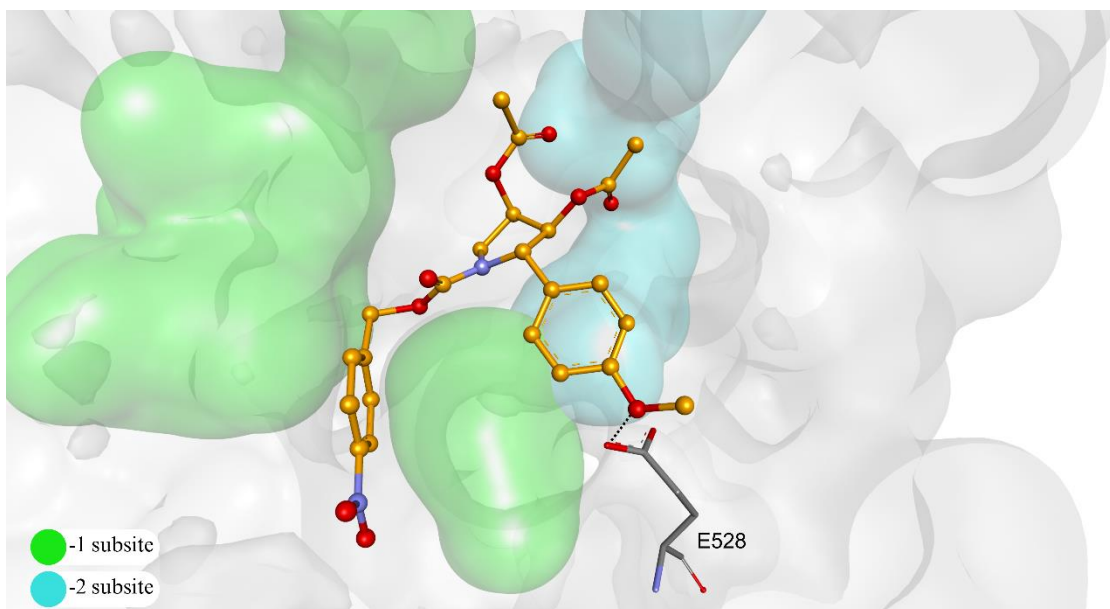


Figura 31. Interação de van der Waals para A531.
 Fonte: Desenvolvido pelo autor.

O ligante A531 se diferencia de A481 pela adição de um anel aromático e um grupo NO₂ ao substituinte do nitrogênio. Da mesma forma como ocorreu na transição de A591 para A481, essa alteração resultou em uma mudança no posicionamento do composto

dentro da cavidade de ligação. No entanto, essa alteração é menos drástica em comparação com a causada pela adição do primeiro anel aromático em A481. Em A531, ocorre uma adaptação do ligante dentro da cavidade devido à ligação do anel aromático exclusivo da série A53n na abertura que parte do subsítio -1. Como resultado, os substituintes não aromáticos deste composto são deslocados em direção ao subsítio -2, sendo estabilizadas por S279 e Y357, como mencionado anteriormente. Um ponto que reforça esse ajuste do ligante diante da adição do novo anel é o fato de que em A531, o anel comum à série A48n posiciona-se da mesma forma que observado em A481. A Figura 32 ilustra a comparação do posicionamento de A531 e A481 dentro do sítio ativo.

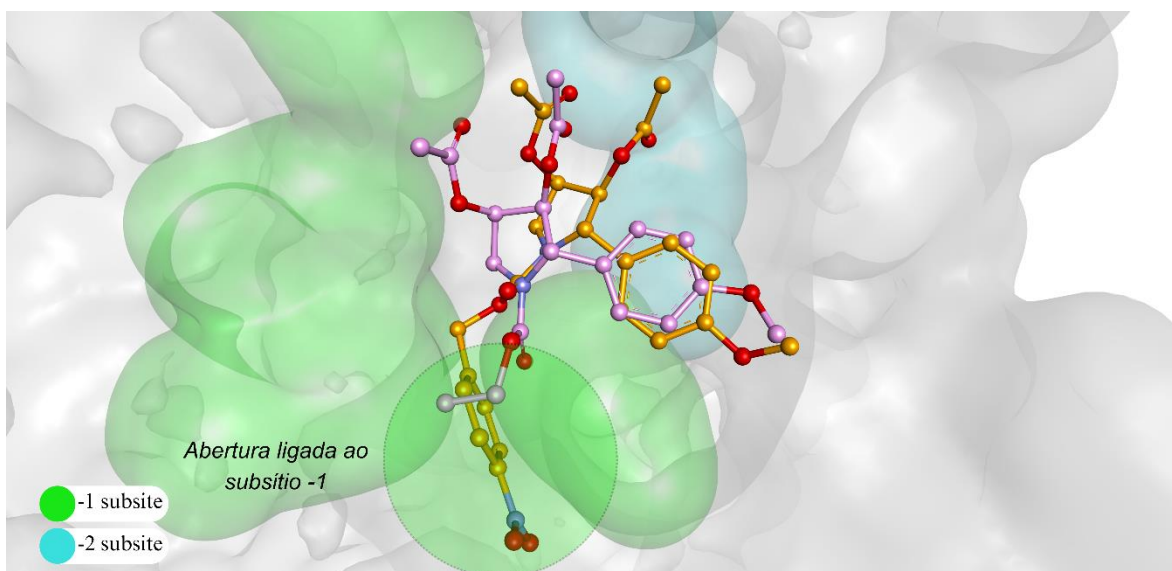


Figura 32. Sobreposição de A481 (em rosa) e A531 (em laranja) no sítio de ligação de GlgE.

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

No caso do ligante A532, na Tabela 10 estão detalhados os parâmetros das interações encontradas.

Tabela 10. Detalhamento das interações para A532

Resíduo	Átomo ligante	Átomo resíduo	Distância entre átomos (Å)	Ângulo D-H...A (°)	Ângulo α (°)
Q324	O6	HE22	1,90	154	-
K356	O2	HN	2,20	155	-
Y357	O5	HH	2,96	111	-
N395	O5	HD22	3,01	115	-
D480	N1	OD1	3,61	146	-
E528	H7A	OE2	2,72	106	-
	H7B	OE2	2,74	105	-
K534	O4	HZ3	1,20	156	-
Y357	O5	Ct	3,67	-	26
	O7	Ct	3,76	-	25
S271	O8	OG	2,72	-	-
E423	O9	OE2	2,82	-	-
Y535	O4	OH	2,75	-	-

A análise da tabela acima mostra o número expressivo de ligações de hidrogênio presentes em A532 quando comparado com qualquer um dos demais ligantes. As ligações de hidrogênio com W281, Y357, N395 e D480 atuam de maneira a ligar A532 ao subsítio -1. Neste contexto, destaca-se que as ligações com os resíduos W281, Q324, Y357 e N395 ocorrem com um único substituinte, enquanto a ligação com D480 é similar ao já observado nos demais ligantes, ou seja, interação com o átomo de nitrogênio no centro da cavidade. A ligação de hidrogênio com K534 é a única que envolve um resíduo do subsítio -2 e, neste caso, tem como função estabilizar o substituinte do átomo de nitrogênio em direção à abertura ligada a este subsítio. Este mesmo substituinte é também estabilizado por mais duas ligações de hidrogênio com E528 e uma ligação entre K356 e um oxigênio do grupo nitro. Estas ligações mencionadas podem ser observadas nas Figuras 33 e 34.

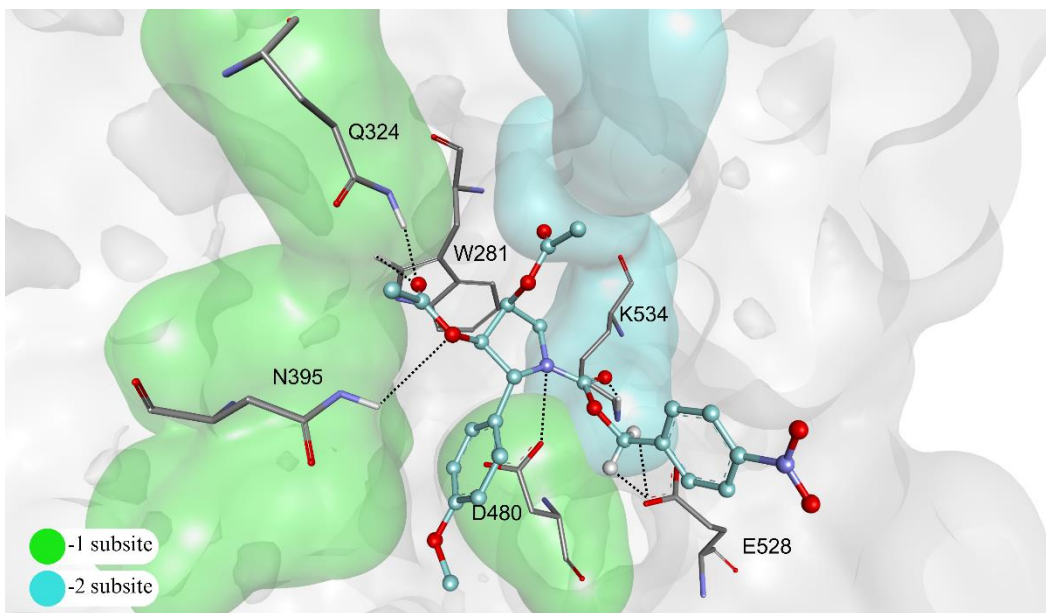


Figura 33. Parte das ligações de hidrogênio para A532.
 Fonte: Desenvolvido pelo autor.

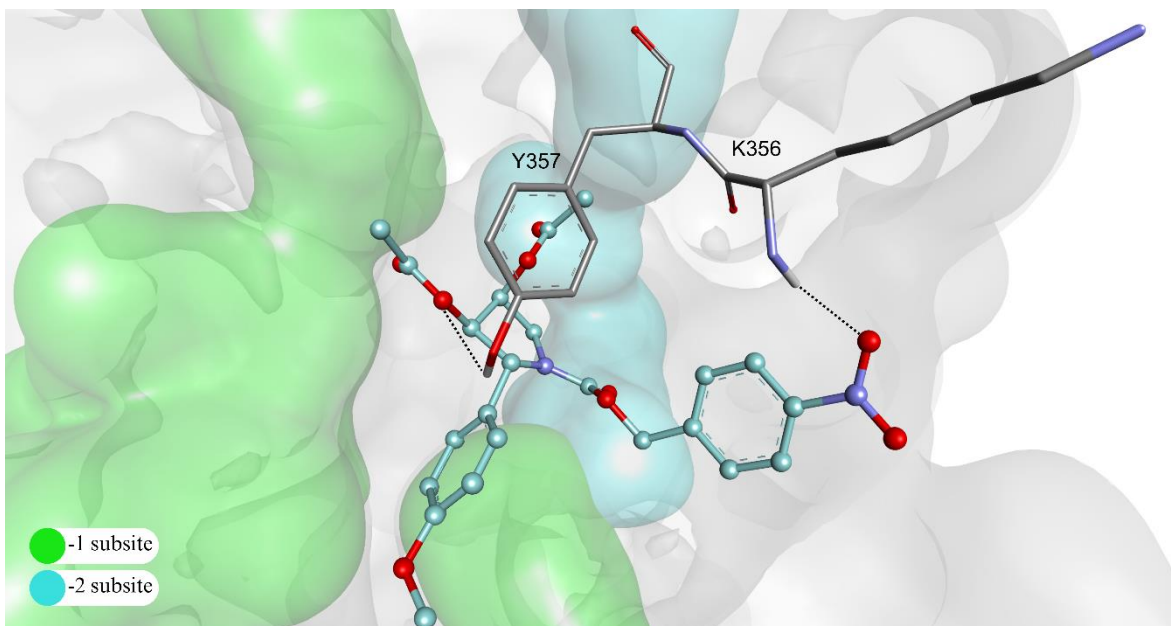


Figura 34. Parte das ligações de hidrogênio para A532.
 Fonte: Desenvolvido pelo autor.

As duas interações π encontradas na análise de A532 ocorrem com o mesmo resíduo, Y357. Estas duas interações envolvem os dois substituintes não aromáticos que se direcionam para os subsítios -1 e -2. Sendo assim, o papel de ambas as interações π é ligar

os substituintes aos seus respectivos sítios, ao passo que projetam o final de suas cadeias alifáticas para o topo da cavidade. A Figura 35 mostra esta situação.

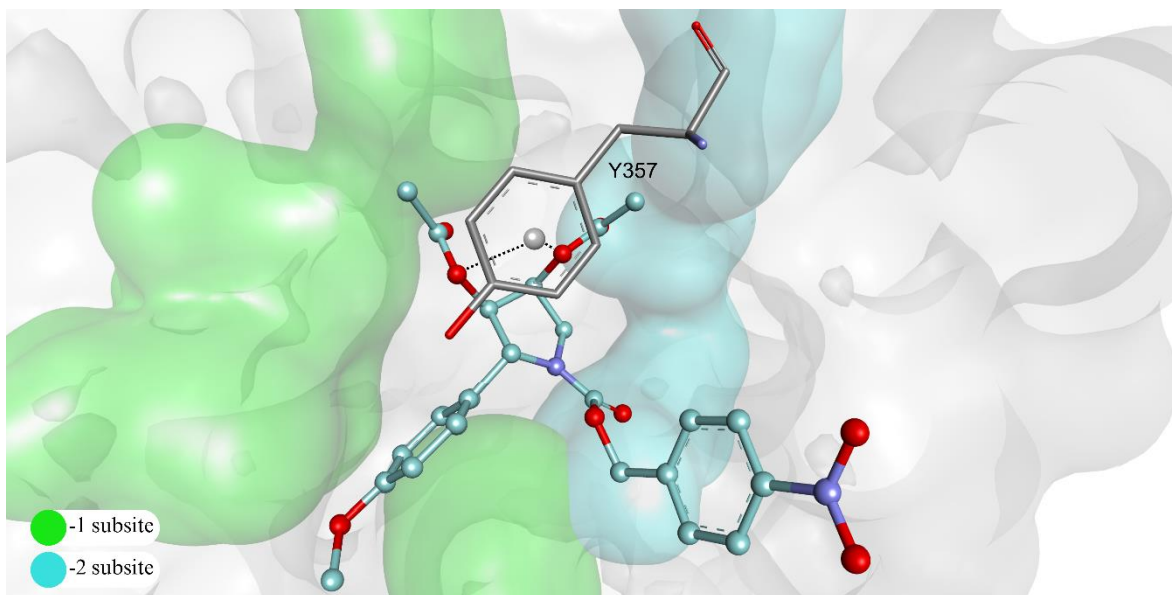


Figura 35. Interações π em A532.
Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Por fim, em A532 foram encontradas três interações de van der Waals, todas elas do tipo O...O. A primeira ocorre com S279 e liga o substituinte alifático no subsítio -2. A segunda interação de van der Waals envolve E423 e auxilia na projeção do anel comum à série A48n pela abertura ligada ao subsítio -1. Por fim, a terceira e última interação ocorre entre A532 e Y535 e está relacionada com a estabilização do substituinte ligado ao nitrogênio e se projeta pela cavidade ligada ao subsítio -2. A Figura 36 ilustra estas interações.

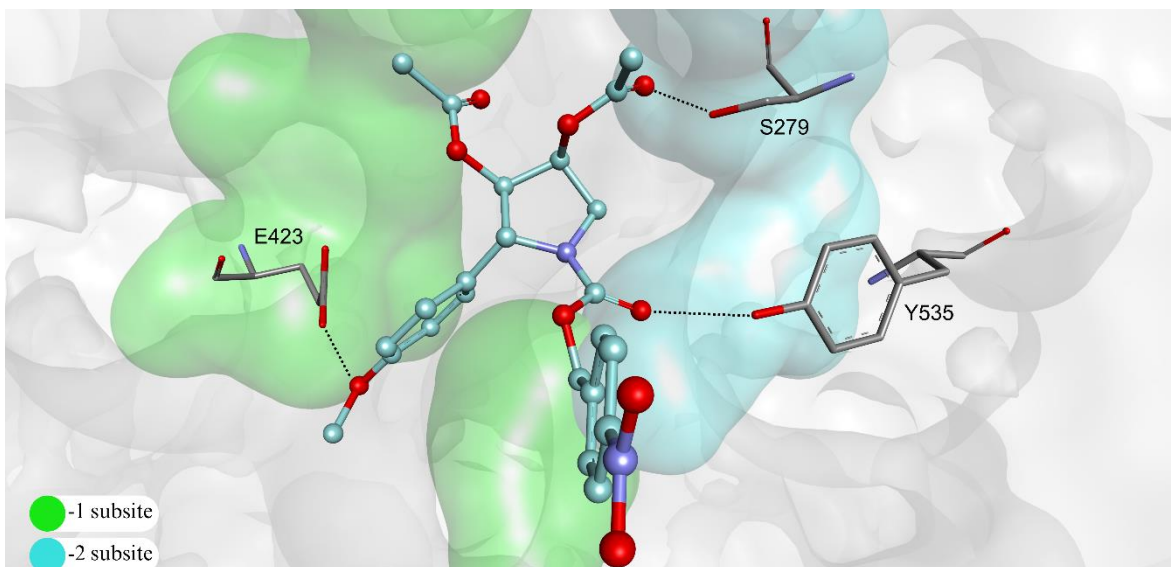


Figura 36. Interações de van der Waals em A532.

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Quando se compara o posicionamento de A532 com A482, é possível observar que, ao contrário do que ocorre com o par A531 e A481, neste caso, a adição do segundo anel aromático tem um impacto ainda menor na acomodação geral do ligante na cavidade. Enquanto para a série 1 houve um leve deslocamento da cadeia de A531 em direção ao subsítio -2 após a adição deste anel, na série 2, ocorre apenas um giro na porção alifática que o precede, permitindo que este se projete para a abertura ligada ao subsítio -2. Esta situação é corroborada pela manutenção da maioria das interações de A482 e A532, como as ligações de hidrogênio com N395 – relacionada com a ligação da cadeia alifática no subsítio -1 -, E528 – que estabiliza porção alifática que precede o anel exclusivo de A53 na cavidade ligada ao subsítio -2 - e D480 – com papel na ligação do anel de cinco membros ao centro da cavidade -, uma das interações π com Y357 – que liga um dos substituintes alifáticos ao subsítio -2 - e a interação de van der Waals com S279 – cujo papel é auxiliar na ligação do substituinte que se aloja no subsítio -2. Destaca-se, ainda, que a ligação de hidrogênio com K534 também ocorre nos dois ligantes, no entanto, com porções diferentes das cadeias que se projetam pelo subsítio -2, mostrando o papel deste resíduo em auxiliar em tal posicionamento. A Figura 37 ilustra esta comparação entre A482 e A532.

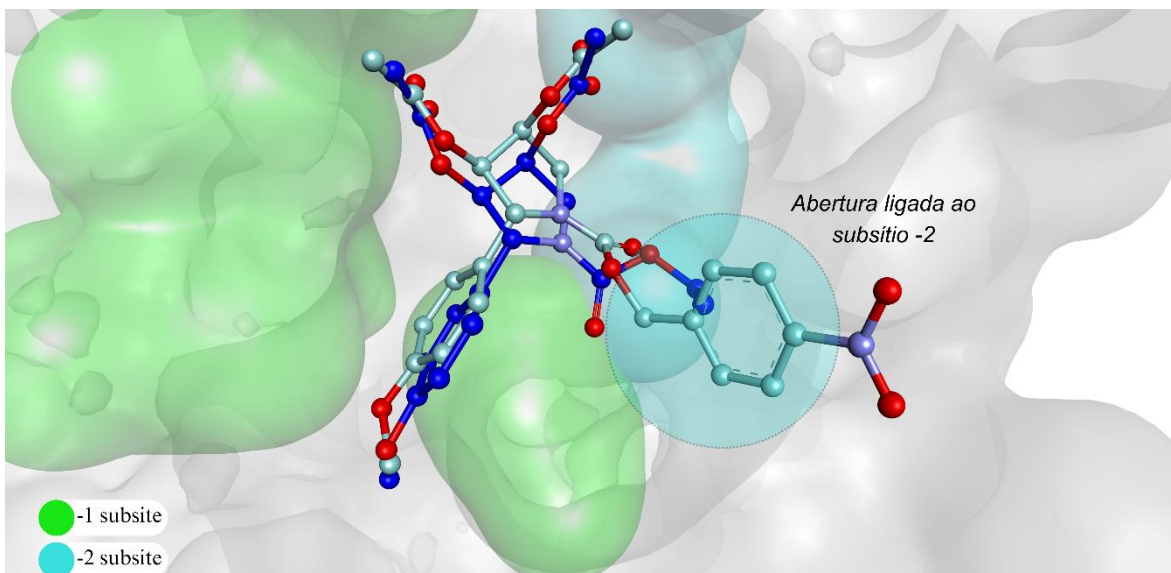


Figura 37. Sobreposição dos ligantes A482 e A532.

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Ao comparar os ligantes A531 e A532, observa-se uma semelhança com o que foi discutido em relação ao par A481 e A482. Ou seja, o posicionamento geral dentro da cavidade é bastante similar: os substituintes alifáticos dirigem-se aos subsítios -1 e -2, enquanto os substituintes que contêm anéis se direcionam para as aberturas ligadas a cada um dos subsítios. Apesar destas similaridades, existem algumas alterações significativas entre A531 e A532 que têm um impacto direto na rede de interações que estabelecem na cavidade. A Figura 38 apresenta o posicionamento destes dois ligantes.

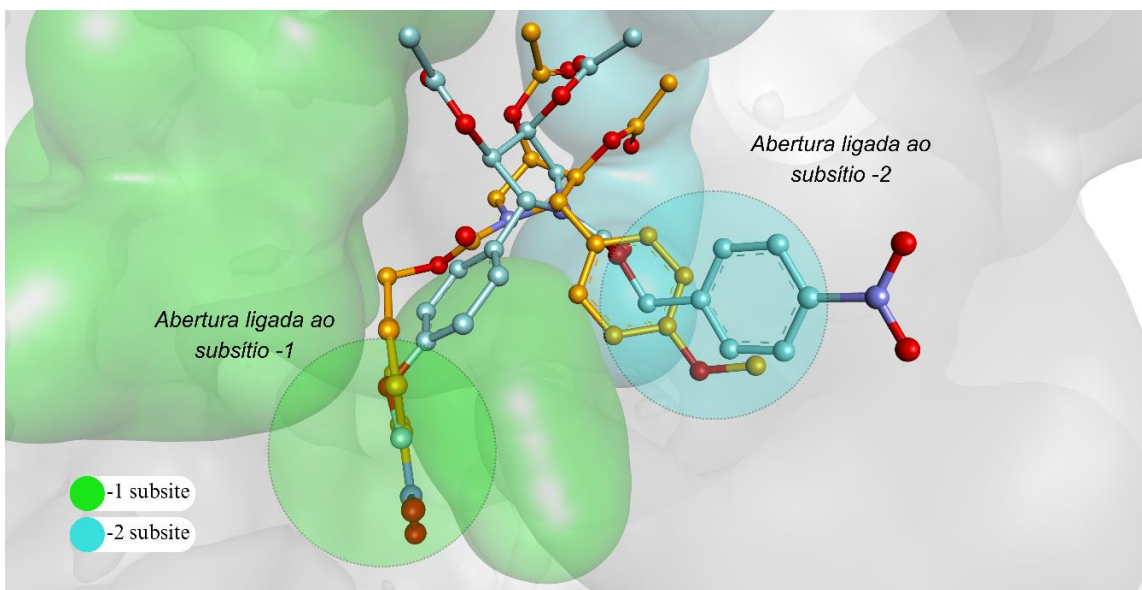


Figura 38. Posicionamento no sítio ativo de GlgE dos ligantes A531 e A532.

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Em primeiro lugar, há o ajuste na posição de A531 possivelmente em decorrência do posicionamento do anel exclusivo à série A53 na abertura ligada ao subsítio -1. Com ele, as porções alifáticas deste ligante distanciam-se do subsítio -1, onde uma parte das interações de hidrogênio está presente em A532. Ainda assim, o posicionamento destes dois substituintes no subsítio -2 é estabilizado apenas por uma ligação de hidrogênio e uma interação π . Logo, é possível que a falta de interações capazes de ligar A531 aos subsítios que formam a cavidade de ligação seja determinante em sua eficiência como inibidor. Em contraste, o que se vê em A532 é a formação de um complexo de interações que suportam a ligação deste composto à cavidade.

A segunda diferença interessante a ser analisada entre os ligantes da série A53n é a posição que cada um dos anéis aromáticos ocupa. Vê-se que a mesma tendência já apresentada na série A48n é mantida, ou seja, em A531 o anel aromático projeta-se pela mesma abertura ligada ao subsítio -1 em que se encontra em A481, enquanto em A532 este mesmo anel direciona-se para a abertura ligada ao subsítio -2 da mesma forma como ocorre em A482. Apesar do posicionamento similar, diferente do que ocorre em A48, os anéis comuns à série A48 estão em ambos os ligantes estabilizados por interações de van der Waals com E528 em A531 e E423 – resíduo catalítico de GlgE – em A532.

Sobre este posicionamento oposto, quando se avalia as interações que suportam a ligação do anel exclusivo à série A53n, a projeção deste substituinte pela cavidade ligada ao subsítio -1 em A531 é estabilizada apenas pela ligação de hidrogênio com E423, enquanto em A532 este mesmo anel é estabilizado por três ligações de hidrogênio envolvendo os resíduos K534 e E528, bem como uma interação de van der Waals com K356. Logo, em A532 este anel encontra-se muito melhor ancorado pela rede de interações para que se mantenha nesta posição quando comparado a A531. Ademais, um último ponto interessante a ser levado em consideração no contexto deste posicionamento oposto dos anéis exclusivos em A531 e A532 é a hidrofobicidade da região em que cada um se projeta. Pelo fato de o anel conter um grupo nitro como substituinte, regiões menos hidrofóbicas favorecem sua exposição pela cavidade, o que é o caso de A532, em que a região que circunda a cavidade ligada ao subsítio -2 por onde esta estrutura se projeta é menos

hidrofóbica do que a região em que se posiciona o grupo nitro ligado ao anel aromático em A531. A Figura 39 ilustra esta situação.

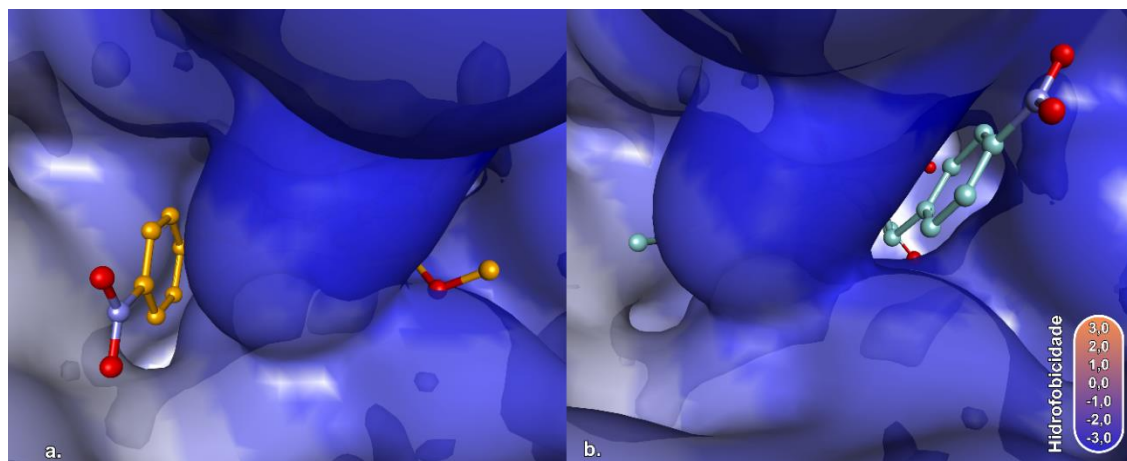


Figura 39. Avaliação da hidrofobicidade da região em que se projetam os anéis exclusivos à série A53 em a. A531 e b. A532.

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Analisando os resultados discutidos, pode-se fazer algumas considerações sobre os ligantes avaliados como possíveis inibidores de GlgE. A primeira delas sobre as modificações progressivas da estrutura. A série A59n, que apresenta todos os substituintes alifáticos, liga-se de maneira muito distinta aos seus derivados com anéis aromáticos. Neste sentido, é possível que a ausência destes anéis permita o posicionamento dos compostos dentro do sítio de ligação de forma a afastarem-se das cavidades e aproximarem-se dos subsítios -1 e -2. Ainda, dada esta ligação com os subsítios -1 e -2, é possível identificar a quais são os resíduos em cada um destes sítios relacionados com a ligação dos compostos. No subsítio -2, as interações com S279 – em sua maioria de van der Waals – estão presentes em todos os compostos e têm função de ligar os substituintes que se projetam para esta região, como mostra a Figura 40. Já no subsítio -1, a interação π com Y357 está presente em todos os ligantes salvo A481 e liga os substituintes que se direcionam para esta porção da cavidade, estas interações estão ilustradas na Figura 41. Outra interação importante é a ligação de hidrogênio com K534 é mantida em todos os compostos da série 2 – a saber A592, A482 e A532 – e tem como função ligar um substituinte ao subsítio -2. Por fim, a ligação de hidrogênio entre D480 e o nitrogênio do anel está presente em todos os ligantes menos em A481, nas séries A48n e A53n sua função é ligar este anel na interface entre os

subsítios -1 e -2, como é mostrado na Figura 42. Esta interação é potencialmente importante para o posicionamento de aza-açúcares tais quais os avaliados no presente trabalho e pode ser pivotal para a ligação destes compostos ao sítio ativo.

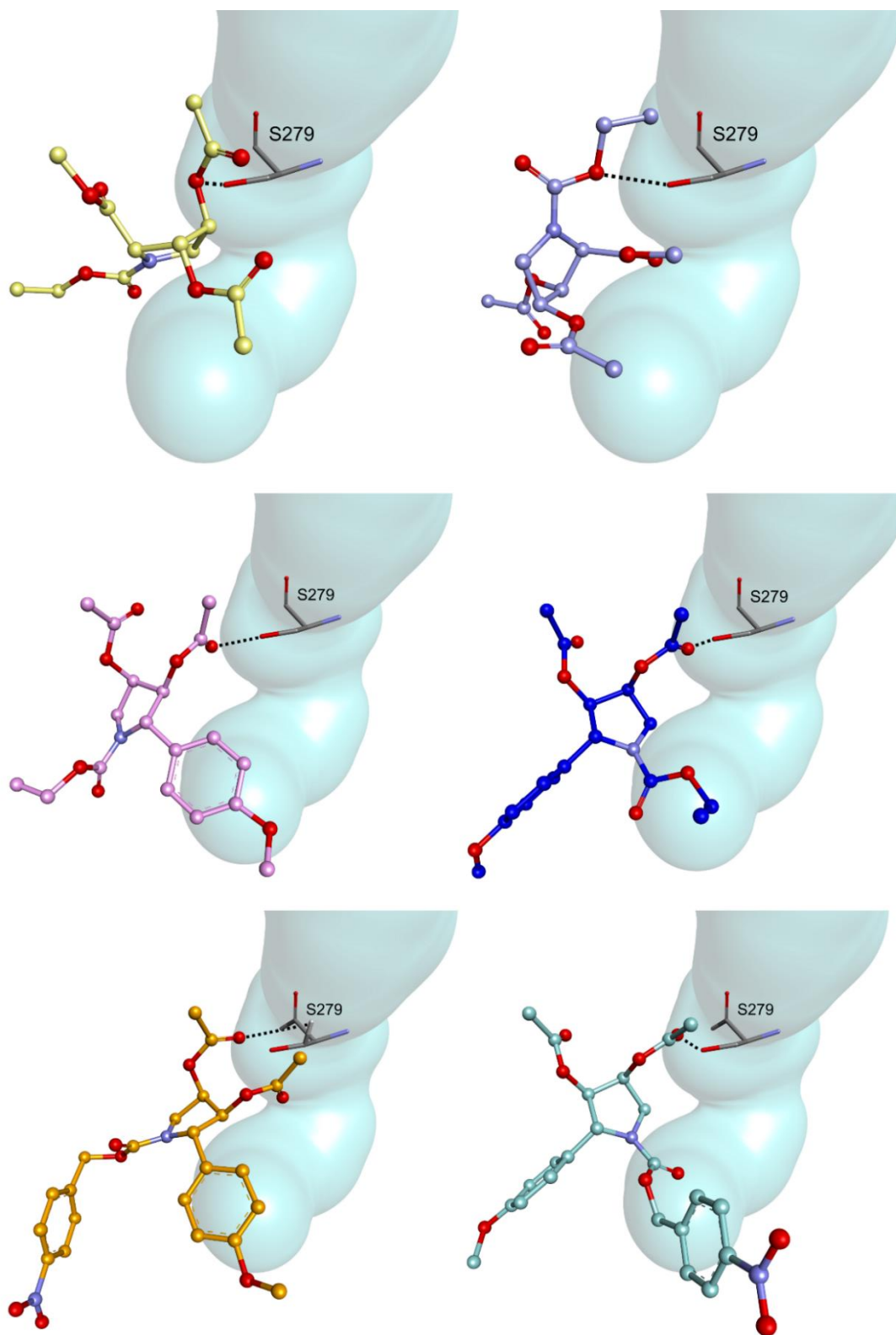


Figura 40. Interações entre S279 e A591 (em amarelo), A592 (em roxo), A481 (em rosa), A482 (em azul), A531 (em laranja) e A532 (em ciano).
 Fonte: Desenvolvido pelo autor.

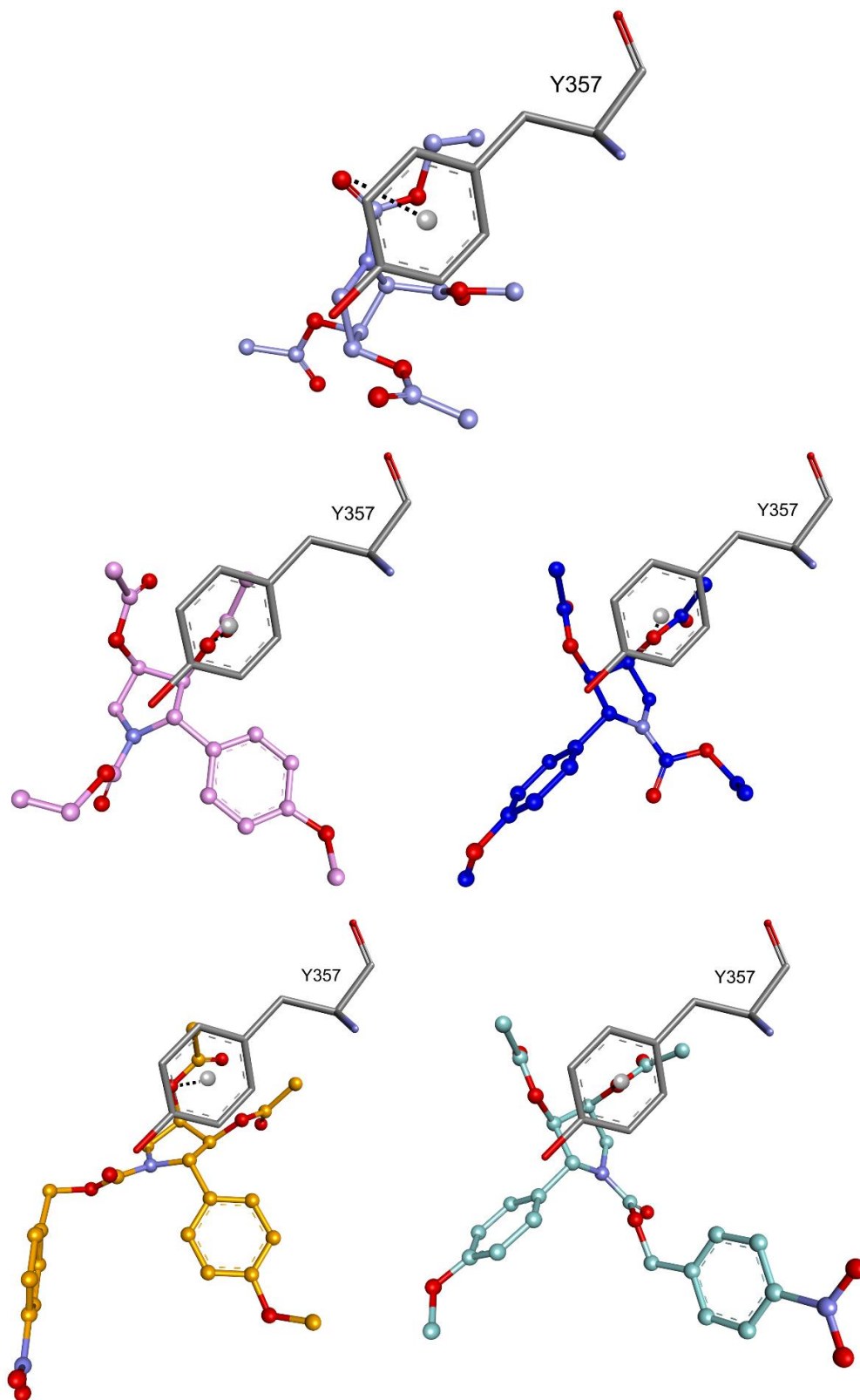


Figura 41. Interações entre Y357 e A591 (em amarelo), A592 (em roxo), A481 (em rosa), A482 (em azul), A531 (em laranja) e A532 (em ciano).
 Fonte: Desenvolvido pelo autor.

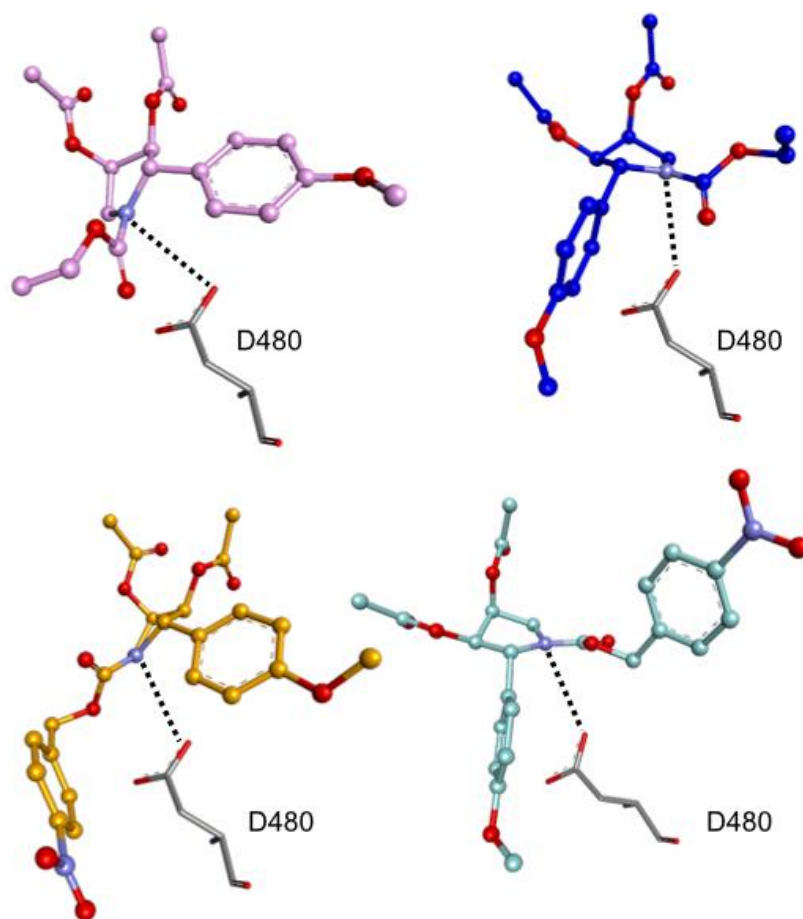


Figura 42. Interação entre D480 e os ligantes A481 (em rosa), A482 (em azul), A531 (em laranja) e A532 (em ciano).

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

A adição do primeiro anel aromático que acontece na série A48, como já mencionado, causa uma alteração global no posicionamento dos ligantes dentro da cavidade, em que os substituintes alifáticos opostos ao nitrogênio se voltam para os subsítios -1 e -2, enquanto os substituintes com o anel aromático e o do nitrogênio projetam-se em direção às aberturas formadas a partir destes subsítios. Isto possivelmente acontece pela incapacidade do sítio em acomodar o anel principal e este novo anel. Neste sentido, um ponto importante a ser destacado é que mesmo após essa alteração de modo de ligação, o anel de cinco membros ainda permanece dentro da cavidade em todos os

casos, indicando que esta configuração é possivelmente favorável para compostos que se ligam em GlgE. Deve-se lembrar que este anel aromático não é estabilizado por nenhuma interação tanto em A481 quanto em A482, indicando que sua projeção pelas aberturas é fruto muito mais do ajuste do anel de cinco membros no centro do que por algum tipo de interação direcionadora.

Na série A53, o anel aromático contendo o grupo nitro causa uma alteração na ligação apenas de A531, como já mencionado. Esta nova alteração na estrutura dos ligantes é importante pois mostra, mais uma vez, a propensão em manter o anel de cinco membros dentro da cavidade. Ademais, as posições de A531 e A532 mostram o mesmo que já se observa na série A48 sobre o direcionamento dos anéis aromáticos para cavidades opostas em cada um dos ligantes, indicando uma possível relação entre a configuração destes compostos com a forma como se ligam na cavidade. Outro ponto importante a ser destacado sobre a série A53n é que nela, ao contrário do que acontece na série A48, observa-se que existem interações auxiliando na ligação dos anéis comuns à série A48, o que sugere que o ajuste de posição causado pela adição do novo anel em A53, mesmo que discreto, é suficiente para garantir uma maior rede de interações capaz de estabilizar o posicionamento dos anéis que se projetam da cavidade. Sobre esta questão, ao observar o número e o tipo de interações da série A53, é possível generalizar a afirmação anterior e dizer que a alteração no posicionamento fruto da adição do novo anel aromático é suficiente para garantir uma rede maior de interações que suportam a ligação destes compostos no sítio ativo.

Tendo estas considerações em mente, avalia-se que a adição progressiva de anéis aromáticos em substituintes do anel de cinco membros é uma modificação interessante para a estrutura de inibidores de GlgE. Assim, é possível afirmar que o melhor modo de ligação na cavidade foi exibido pela série A53n, sugerindo-se, portanto, a adição de dois grupos aromáticos ao invés de apenas um, já que a alteração no número e tipo de interações observadas entre as séries A59n e A48n é discreta. Neste sentido, a estrutura dos ligantes da série A53n é interessante para inibidores de GlgE por ser capaz de manter interações com resíduos dos subsítios -1 e -2, mostradas na literatura como sendo o ponto

crucial de promoção da atividade inibitória (Lindenberger, Kumar Veleti, Wilson, Sucheck, & Ronning, 2015); (Thanna & Sucheck, 2016).

Diferente da maioria dos inibidores descritos na literatura, que apresentam estruturas capazes de maximizar as interações dentro dos subsítios -1 e -2, os azaçúcares apresentados no presente trabalho podem atuar como bons inibidores por um mecanismo distinto de inibição. No caso da série A53, em especial, é possível que a inibição do sítio se dê sim pelas interações com os subsítios, mas não somente: os substituintes aromáticos presentes nestas estruturas formam interações adicionais que auxiliam na ligação dos compostos ao sítio. Sendo assim, estes azaçúcares são capazes de formar uma rede de interações dentro da cavidade estabilizados pela ligação dos anéis aromáticos nas aberturas ligadas aos subsítios.

Neste sentido, dentre os ligantes da série A53n, aquele que teria o melhor potencial inibidor de GlgE seria o A532, uma vez que apresenta um número maior de ligações no sítio ativo. Neste composto, vê-se uma rede complexa de ligações de hidrogênio nos subsítios -1 e -2, estas descritas como fundamentais para garantir a inibição de GlgE. Além disso, as ligações de hidrogênio envolvendo E528 e K356 promovem maior estabilização do anel aromático que ocupa a abertura ligada ao subsítio -2. Por fim, neste composto as interações com resíduos que formam o loop responsável por fechar o topo da cavidade – ligação de hidrogênio com K356 e uma ligação de hidrogênio e duas interações π com Y357 – aumentariam o potencial inibitório de A532 ao impedirem o acesso ao sítio de ligação por outras moléculas.

Capítulo 4 – Conclusões

Os pontos destacados que resultaram da análise dos resultados do *docking* molecular dos seis azaçúcares na GlgE são: melhor entendimento das interações que realizam os resíduos de aminoácidos que compõem o sítio ativo da GlgE com os compostos que se ligam nesta região, análise dos diferentes substituintes nos compostos e o seu modo de ligação em GlgE e assim propor dentre os possíveis inibidores avaliados qual deles seria o primeiro composto a ser utilizado para ensaios posteriores de inibição envolvendo GlgE.

Com relação ao primeiro ponto, os resultados obtidos mostram que os resíduos S279, W281, Q324, Y357, N395, D480, E528 e K534 são os mais importantes para a ligação dos potenciais inibidores ao sítio ativo. No caso do S279 observa-se que as interações de van der Waals e ligações de hidrogênio estão relacionadas com o posicionamento dos ligantes no subsítio -2, em que a manutenção das ligações de hidrogênio é descrita na literatura como importante para a inibição de GlgE (Lindenberger, Kumar Veleti, Wilson, Sucheck, & Ronning, 2015). Por outro lado, W281, Q324, N395 têm como função estabilizar os substituintes do ligante que ocupam o subsítio -1, em particular W281 em ligar os substituintes que se projetam para o fundo da cavidade. No caso de Y357, as interações π com este resíduo são essenciais para ligação dos substituintes no subsítio -2. Além disso, o fato de Y357 fazer parte do *loop* que fecha o sítio de ligação faz com que interações com ele e com os resíduos subjacentes sejam pontos importantes quando se pensa na capacidade de impedirem a abertura da própria cavidade. Os resíduos E528 e K534, por sua vez, direcionam os anéis para a abertura ligada ao subsítio -2. Por fim, a interação com o resíduo D480 é potencialmente a principal interação que garante o posicionamento dos aza-açúcares de estrutura semelhante aos avaliados no presente trabalho dentro do sítio ativo. Seu papel está relacionado com a ligação do anel destes aza-açúcares ao centro da cavidade entre os subsítios -1 e -2, possibilitando a acomodação das substituições em regiões adequadas da cavidade. Isto é o que se observa nas séries A48n e A53n, em que esta interação com D480 é responsável pela ligação do anel principal ao sítio ativo e, possivelmente como consequência disso, ocorre a projeção dos anéis aromáticos pelas aberturas da cavidade.

Com relação aos três compostos estudados, vê-se que A59n com seus substituintes alifáticos ocupa uma posição diferente dos outros, e mais ainda as interações com os subsítios -1 e -2 faz com que os padrões de ligação sejam diferentes entre A591 e A592. Ao adicionar o primeiro anel aromático a um dos substituintes em A48n ocorre uma alteração global no posicionamento dos ligantes dentro do sítio. Neste caso, a principal diferença entre os compostos A59n e A48n está no fato dos A48n dirigir o substituinte aromático para uma das cavidades presentes no sítio. Isso faz com que o anel de cinco membros assumira uma posição muito mais horizontal com relação ao topo da cavidade, além de promover maior contato com o subsítio -1. Já no caso da adição do segundo anel aromático – este contendo um grupo nitro – em A53n, a alteração na posição dos ligantes é bem mais discreta com relação aos que só tem um anel. Neste caso, observa-se a manutenção do padrão de ligação, ou seja, A481 e A531 posicionam-se de maneiras muito similares, o mesmo ocorrendo para A482 e A532. Ainda, destaca-se aqui a importância, já mencionada, da interação do anel dos aza-açúcares com D480, que é ausente na série A59n e pode estar relacionada com essa alteração geral de posicionamento observada nas séries A53n e A48n.

Mais ainda, a presença de mais um anel em A53n é uma fonte adicional de pontos de ligação dos compostos na cavidade, auxiliando em seu posicionamento geral, já que a porção que ocupa a parte de dentro do sítio nas três séries é bem menos volumosa quando comparada a outros tipos de inibidores. Nesse sentido, o padrão de ligação observado para os compostos A48n e A53n mostra uma clara tendência de posicionamento do anel de cinco membros no centro da cavidade, na interface entre os subsítios -1 e -2, com as substituições alifáticas direcionadas para dentro dos mesmos subsítios e as substituições aromáticas voltadas para as aberturas.

Finalmente, dentre os seis compostos analisados, A532 se apresenta como o possível melhor inibidor de GlgE, tendo em vista a vasta rede de interações que realiza no sítio ativo, a boa colocação entre os subsítios que é essencial para atividade inibitória, bem como a existência de interações que garantem a estabilidade das porções aromáticas que são projetadas pelas aberturas ligadas ao subsítios -1 e -2. Ainda deve-se lembrar que há um conjunto de interações com os resíduos do *loop* que fecha o sítio de ligação. Assim os

anéis aromáticos presentes em A532 seriam importantes para seu potencial inibitório. Como etapas futuras para os compostos avaliados, sugere-se uma avaliação quantitativa das energias de ligação, bem como ensaios de dinâmica molecular.

Referências

- Abushaheen, M. A., Fatani, A. J., Alosaimi, M., Mansy, W., George, M., Acharya, S., & Jhugroo, P. (2020). Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. *Disease-a-Month*, p. 100971.
- Al Lawati, R., Al Busaidi, N., Al Umairi, R., Al Busaidy, M., Al Naabi, H. H., & Khamis, F. (2021). COVID-19 and pulmonary Mycobacterium tuberculosis coinfection. *Oman Medical Journal*, p. e298.
- Aliashkevich, A., & Cava, F. (2022). LD-transpeptidases: the great unknown among the peptidoglycan cross-linkers. *The FEBS journal*, pp. 4718-4730.
- Bynum, H. (2012). *Spitting blood: the history of tuberculosis*. OUP Oxford.
- Cáceres, G., Calderon, R., & Ugarte-Gil, C. (2022). Tuberculosis and comorbidities: treatment challenges in patients with comorbid diabetes mellitus and depression. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*.
- Clark, M. C. (1989). Validation of the general purpose Tripos 5.2 force field. *Journal of Computational Chemistry*, pp. 982-1012.
- Colpaert, M., Kadouche, D., Ducatez, M., Pillonel, T., Kebbi-Beghdadi, C., Cenci, U., & Christophe, C. (2020). Substitution of nucleotide-sugar by trehalose-dependent glycogen synthesis pathways in Chlamydiales underlines an unusual requirement for storage polysaccharides within obligate intracellular bacteria. *BioRxiv*, p. 06.
- d'Andrea, F. B., Poulton, N. C., Froom, R., Tam, K., Campbell, E. A., & Rock, J. M. (2022). The essential M. tuberculosis Clp protease is functionally asymmetric in vivo. *Science Advances*, p. eabn7943.
- Dam, S., Tangara, S., Hamela, C., Hattabi, T., Faïon, L., Carre, P., & Hartkoorn, R. C. (2022). Tricyclic SpiroLactams Kill Mycobacteria In Vitro and In Vivo by Inhibiting Type II NADH Dehydrogenases. *Journal of Medicinal Chemistry*, pp. 16651-16664.
- Dartois, V. A., & Rubin, E. J. (2022). Anti-tuberculosis treatment strategies and drug development: challenges and priorities. *Nature Reviews Microbiology*, pp. 685-701.
- Das, N., Jena, P. K., & Pradhan, S. K. (2020). Arabinosyltransferase C enzyme of Mycobacterium tuberculosis, a potential drug target: An insight from molecular docking study. *Heliyon*, p. 6.
- Feuerriegel, S., Kohl, T. A., Utpatel, C., Andres, S., Maurer, F. P., Heyckendorf, J., & Niemann, S. (2021). Rapid genomic first-and second-line drug resistance prediction from clinical Mycobacterium tuberculosis specimens using Deeplex-MycTB. *European Respiratory Journal*, p. 57.
- Garcia, A. L. (2008). Reação de arilação de Heck com sais de arenodiazonio: aplicações nas sínteses totais de prolinas e pirrolidinas poliidroxiladas, rolipram e análogos do baclofeno, e na síntese formal de prepolicitrina A e policitrina A. *Doctoral dissertation, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)*.
- Gopalswamy, R., Shanmugam, S., Mondal, R., & Subbian, S. (2020). Of tuberculosis and non-tuberculous mycobacterial infections—a comparative analysis of epidemiology, diagnosis and treatment. *Journal of biomedical science*, pp. 1-17.
- Guo, H., Courbon, G. M., Bueler, S. A., Mai, J., Liu, J., & Rubinstein, J. L. (2021). Structure of mycobacterial ATP synthase bound to the tuberculosis drug bedaquiline. *Nature*, pp. 143-147.
- Gupta, A., Singla, R., Caminero, J. A., Singla, N., Mrigpuri, P., & Mohan, A. (2020). Impact of COVID-19 on tuberculosis services in India. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, pp. 637-639.
- Gygli, S. M., Loiseau, C., Jugheli, L., Adamia, N., Trauner, A., Reinhard, M., & Gagneux, S. (2021). Prisons as ecological drivers of fitness-compensated multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis. *Nature medicine*, pp. 1171-1177.
- Han, J., Liu, X., Zhang, L., Quinn, R. J., & Feng, Y. (2022). Anti-mycobacterial natural products and mechanisms of action. *Natural product reports*, pp. 77-89.
- Hwang, H., Kang, H., Kwon, Y. S., Jeon, D., Shim, T. S., & Yim, J. J. (2021). Outcomes of multidrug-resistant tuberculosis treated with bedaquiline or delamanid. *Clinical Infectious Diseases*, pp. 1362-1369.
- Imai, Y., Hauk, G., Quigley, J., Liang, L., Son, S., Ghiglieri, M., & Lewis, K. (2022). Evybactin is a DNA gyrase inhibitor that selectively kills Mycobacterium tuberculosis. *Nature chemical biology*, pp. 1236-1244.
- Inoyama, D., Awasthi, D., Capodagli, G. C., Tsotetsi, K., Sukheja, P., Zimmerman, M., & Freundlich, J. S. (2020). A preclinical candidate targeting Mycobacterium tuberculosis KasA. *Cell chemical biology*, pp. 560-570.

- Jones, G. P. (1995a). A Genetic Algorithm for Flexible Molecular Overlay and Pharmacophore Elucidation. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, pp. 532-549.
- Jones, G. P. (1995b). Molecular Recognition of Receptor-Sites Using a Genetic Algorithm with a Description of Desolvation. *Journal of Molecular Biology*, pp. 43-53.
- Jones, G. P. (1997). Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking. *Journal of Molecular Biology*, pp. 727-748.
- Jones, G., & Willett, P. (1995). Docking Small-Molecule Ligands into Active-Sites. *Current Opinion in Biotechnology*, pp. 652-56.
- Kalscheuer, R., Syson, K., Veeraraghavan, U., Weinrick, B., Biermann, K. E., Liu, Z., & Jacobs Jr, W. R. (2010). Self-poisoning of Mycobacterium tuberculosis by targeting GlgE in an α -glucan pathway. *Nature chemical biology*, pp. 376-384.
- Kermani, A. A., Roy, R., Gopalasingam, C., Kocurek, K. I., Patel, T. R., Alderwick, L. J., & Fütterer, K. (2019). Crystal structure of the TreS: Pep2 complex, initiating α -glucan synthesis in the GlgE pathway of mycobacteria. *Journal of Biological Chemistry*, pp. 7348-7359.
- Korte, J., Alber, M., Trujillo, C. M., Syson, K., Koliwer-Brandl, H., Deenen, R., & Kalscheuer, R. (2016). Trehalose-6-phosphate-mediated toxicity determines essentiality of OtsB2 in Mycobacterium tuberculosis in vitro and in mice. *PLoS pathogens*, p. e1006043.
- Kouidmi, I., Levesque, R. C., & Paradis-Bleau, C. (2014). The biology of Mur ligases as an antibacterial target. *Molecular microbiology*, pp. 242-253.
- Kuang, W., Zhang, H., Wang, X., & Yang, P. (2020). Overcoming Mycobacterium tuberculosis through small molecule inhibitors to break down cell wall synthesis. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, pp. 3201-3214.
- Kumar, N., Sharma, S., & Kaushal, P. S. (2021). Protein synthesis in Mycobacterium tuberculosis as a potential target for therapeutic interventions. *Molecular Aspects of Medicine*, p. 101002.
- Leiba, J., Syson, K., Baronian, G., Zanella-Cléon, I., Kalscheuer, R., Kremer, L., & Molle, V. (2013). Mycobacterium tuberculosis maltosyltransferase GlgE, a genetically validated antituberculosis target, is negatively regulated by Ser/Thr phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, pp. 16546-16556.
- Li, K., LA, S.-B., X, F., A, U., V, P., B, L., . . . A., G. (2014). Multitarget drug discovery for tuberculosis and other infectious diseases. *Journal of medicinal chemistry*, pp. 3126-39.
- Lilic, M., Chen, J., Boyaci, H., Braffman, N., Hubin, E. A., Herrmann, J., & Campbell, E. A. (2020). The antibiotic sorangicin A inhibits promoter DNA unwinding in a Mycobacterium tuberculosis rifampicin-resistant RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, pp. 30423-30432.
- Lindenberger, J. J. (2015). Structural and enzymatic studies of essential enzymes in mycobacterium tuberculosis. *Doctoral dissertation, University of Toledo*.
- Lindenberger, J. J., Kumar Veleti, S., Wilson, B. N., Sucheck, S. J., & Ronning, D. R. (2015). Crystal structures of Mycobacterium tuberculosis GlgE and complexes with non-covalent inhibitors. *Scientific reports*, p. 12830.
- Liu, L., Kong, C., Fumagalli, M., Savkova, K., Xu, Y., Huszar, S., & Qiao, C. (2020). Design, synthesis and evaluation of covalent inhibitors of DprE1 as antitubercular agents. *European journal of medicinal chemistry*, p. 112773.
- Lunge, A., Gupta, R., Choudhary, E., & Agarwal, N. (2020). The unfoldase ClpC1 of Mycobacterium tuberculosis regulates the expression of a distinct subset of proteins having intrinsically disordered termini. *Journal of Biological Chemistry*, pp. 9455-9473.
- Maitra, A., Munshi, T., Healy, J., Martin, L. T., Vollmer, W., Keep, N. H., & Bhakta, S. (2019). Cell wall peptidoglycan in Mycobacterium tuberculosis: An Achilles' heel for the TB-causing pathogen. *FEMS Microbiology Reviews*, pp. 548-575.
- Maitra, A., Nukala, S., Dickman, R., Martin, L. T., Munshi, T., Gupta, A., & Bhakta, S. (2021). Characterization of the MurT/GatD complex in Mycobacterium tuberculosis towards validating a novel anti-tubercular drug target. *JAC-Antimicrobial Resistance*, p. dlab028.
- Michalska, K., Chang, C., Maltseva, N. I., Jedrzejczak, R., Robertson, G. T., Gusovsky, F., & Joachimiak, A. (2020). Allosteric inhibitors of Mycobacterium tuberculosis tryptophan synthase. *Protein Science*, pp. 779-788.
- Muthukrishnan, L. (2021). Multidrug resistant tuberculosis—Diagnostic challenges and its conquering by nanotechnology approach—An overview. *Chemico-biological interactions*, p. 109397.

- Nezenega, Z. S., Perimal-Lewis, L., & Maeder, A. J. (2020). Factors influencing patient adherence to tuberculosis treatment in Ethiopia: a literature review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, p. 5626.
- Nocentini. (2024). D-Alanine-d-alanine ligase. Em C. T. Donald, *Metalloenzymes: from bench to bedside* (pp. 83-91). Elsevier.
- Noor, S., Ismail, M., & Khan, F. (2021). Drug safety in hospitalized patients with tuberculosis: Drug interactions and adverse drug effects. *The Clinical Respiratory Journal*, pp. 97-108.
- Pakamwong, B., Thongdee, P., Kamsri, B., Phusi, N., Kamsri, P., Punkvang, A., & Pungpo, P. (2022). Identification of potent DNA gyrase inhibitors active against *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Chemical Information and Modeling*, pp. 1680-1690.
- PDBsum*. (s.d.). Fonte: PDBsum: A summary of macromolecular structure data: <http://www.pdbsum.org>
- Pezzella, A. T. (2019). History of pulmonary tuberculosis. *Thoracic surgery clinics*, pp. 1-17.
- Pietersen, E., Anderson, K., Cox, H., Dheda, K., Bian, A., Shepherd, B. E., & van der Heijden, Y. F. (2023). Variation in missed doses and reasons for discontinuation of anti-tuberculosis drugs during hospital treatment for drug-resistant tuberculosis in South Africa. *Plos One*, p. e0281097.
- Pontali, E., Raviglione, M. C., & Migliori, G. B. (2019). Regimens to treat multidrug-resistant tuberculosis: past, present and future perspectives. *European Respiratory Review*, p. 152.
- Portugal, B., Motta, F. N., Correa, A. F., Nolasco, D. O., De Almeida, H., Magalhães, K. G., & Santana, J. M. (2017). *Mycobacterium tuberculosis* prolyl oligopeptidase induces in vitro secretion of proinflammatory cytokines by peritoneal macrophages. *Frontiers in Microbiology*, p. 155.
- Prasad, M. S., Bhole, R. P., Khedekar, P. B., & Chikhale, R. V. (2021). *Mycobacterium enoyl acyl carrier protein reductase (InhA)*: A key target for antitubercular drug discovery. *Bioorganic Chemistry*, p. 105242.
- Protein Data Bank*. (s.d.). Fonte: Protein Data Bank: <http://www.pdb.org>
- PubMed*. (s.d.). Fonte: PubMed: Database of biomedical literature.: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
- Pujari, V., Rozman, K., Dhiman, R. K., Aldrich, C. C., & Crick, D. C. (2022). *Mycobacterial MenG*: Partial Purification, Characterization, and Inhibition. *ACS Infectious Diseases*, pp. 2430-2440.
- Q, S., X, L., LM, P., W, S., Y, Z., & JC., S. (2020). The molecular basis of pyrazinamide activity on *Mycobacterium tuberculosis* PanD. *Nature communications*, p. 339.
- Ragunathan, P., Cole, M., Latka, C., Aragaw, W. W., Hegde, P., Shin, J., & Gruber, G. (2021). *Mycobacterium tuberculosis* PanD structure–function analysis and identification of a potent pyrazinoic acid-derived enzyme inhibitor. *ACS chemical biology*, pp. 1030-1039.
- Rai, D., & Mehra, S. (2021). The mycobacterial efflux pump EfpA can induce high drug tolerance to many antituberculosis drugs, including moxifloxacin, in *mycobacterium smegmatis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, pp. 10-1128.
- Riccardi, N., Canetti, D., Rodari, P., Besozzi, G., Saderi, L., Dettori, M., & Sotgiu, G. (2021). Tuberculosis and pharmacological interactions: a narrative review. *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery*, p. 100007.
- Robertson, G. T., Ramey, M. E., Massoudi, L. M., Carter, C. L., Zimmerman, M., Kaya, F., & Lenaerts, A. J. (2021). Comparative analysis of pharmacodynamics in the C3HeB/FeJ mouse tuberculosis model for DprE1 inhibitors TBA-7371, PBTZ169, and OPC-167832. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, pp. 10-1128.
- Sacco, A. C., Morais de Souza, L., Caracelli, I., & Zukerman-Schpector, J. .. (2019). *Brasil Patente Nº AINPC2017/004*.
- Saliba, R. C., & Pohl, N. L. (2016). Designing sugar mimetics: non-natural pyranosides as innovative chemical tools. *Current opinion in chemical biology*, pp. 127-134.
- Sethiya, J. P., Sowards, M. A., Jackson, M., & North, E. J. (2020). MmpL3 inhibition: A new approach to treat nontuberculous mycobacterial infections. *International journal of molecular sciences*, p. 6202.
- Shah, T., Shah, Z., Yasmeen, N., Baloch, Z., & Xia, X. (2022). Pathogenesis of SARS-CoV-2 and *Mycobacterium tuberculosis* coinfection. *Frontiers in immunology*, p. 909011.
- Shinde, Y., Ahmad, I., Surana, S., & Patel, H. (2021). The mur enzymes chink in the armour of *Mycobacterium tuberculosis* cell wall. *European Journal of Medicinal Chemistry*, p. 113568.
- Sindhu, T., & Debnath, P. (2022). Cytochrome bc1-aa3 oxidase supercomplex as emerging and potential drug target against tuberculosis. *Current Molecular Pharmacology*, pp. 380-392.

- Syson, K., Stevenson, C. E., Rashid, A. M., Saalbach, G., Tang, M., Tuukkanen, A., & Bornemann, S. (2014). Structural insight into how *Streptomyces coelicolor* maltosyl transferase GlgE binds α -maltose 1-phosphate and forms a maltosyl-enzyme intermediate. *Biochemistry*, pp. 2494-2504.
- Thanna, S., & Suheck, S. J. (2016). Targeting the trehalose utilization pathways of *Mycobacterium tuberculosis*. *MedChemComm*, pp. 69-85.
- Tran, W., Kusay, A. S., Hawkins, P. M., Cheung, C. Y., Nagalingam, G., Pujari, V., & Payne, R. J. (2021). Synthetic sansanmycin analogues as potent *Mycobacterium tuberculosis* translocase I inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, pp. 17326-17345.
- Umare, M. D., Khedekar, P. B., & Chikhale, R. V. (2021). Mycobacterial membrane protein large 3 (MmpL3) inhibitors: a promising approach to combat tuberculosis. *ChemMedChem*, pp. 3136-3148.
- Urban, M., Šlachtová, V., & Brulikova, L. (2021). Small organic molecules targeting the energy metabolism of *Mycobacterium tuberculosis*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, p. 113139.
- Veleti, S. K., Lindenberger, J. J., Ronning, D. R., & Suheck, S. J. (2014). Synthesis of a C-phosphonate mimic of maltose-1-phosphate and inhibition studies on *Mycobacterium tuberculosis* GlgE. *Bioorganic & medicinal chemistry*, pp. 1404-1411.
- Wellington, S., PP, N., K, M., SE, J., RP, J., VK, K., . . . NI, M. (2017). A small-molecule allosteric inhibitor of *Mycobacterium tuberculosis* tryptophan synthase. *Nature chemical biology*, pp. 943-50.
- WHO. (2023). *Global tuberculosis report 2023*.
- Wong, K., Nguyen, J., Blair, L., Banjanin, M., Grewal, B., Bowman, S., & Venketaraman, V. (2020). Pathogenesis of human immunodeficiency virus-*Mycobacterium tuberculosis* co-infection. *Journal of Clinical Medicine*, p. 3575.