UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Triagem virtual de inibidores da enzima di-hidrofolato redutase de
Schistosoma mansoni (SmDHFR)

João Paulo Machado Martins

Dissertação para a obtenção do Título de Mestre
Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini

São Paulo
2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Triagem virtual de inibidores da enzima di-hidrofolato redutase de
Schistosoma mansoni (SmDHFR)

João Paulo Machado Martins

Versão Original

Dissertação para a obtenção do Título de Mestre
Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini

São Paulo
2017

João Paulo Machado Martins

Triagem virtual de inibidores da enzima di-hidrofolato redutase de
Schistosoma mansoni (SmDHFR)

Comissão Julgadora
da
Tese para a obtenção do Título de Mestre

Orientador Prof. Dr.
Gustavo Henrique Goulart Trossini

1º. Examinador

2º. Examinador

3º. Examinador

4º. Examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2017

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

M149t Machado Martins, João Paulo
Triagem virtual de inibidores da enzima di-
hidrofolato redutase de *Schistosoma mansoni*
(SmDHFR) / João Paulo Machado Martins. - São Paulo,
2017.
92 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Farmácia.
Orientador: Goulart Trossini, Gutstavo Henrique

1. Química Farmacêutica. 2. Doenças
negligenciadas. 3. Esquistossomose. 4. Di-
hidrofolato redutase. 5. Triagem virtual. I. T. II.
Goulart Trossini, Gutstavo Henrique, orientador.

**Dedico esse trabalho
a Deus, meu Criador
a Jesus Cristo, seu Amado Filho
à Santíssima Virgem Maria, minha Mãe.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, fonte de toda Sabedoria.

Agradeço à minha noiva Mariana, que permaneceu ao meu lado em todos os momentos com seu apoio, carinho e amor.

Agradeço a meus pais, Paulo e Isabel, sem os quais, nada disso teria se tornado realidade.

Agradeço ao Prof. Dr. Gustavo Trossini, por toda orientação e paciência.

Agradeço a todos os colegas do LITEC, por toda solicitude que sempre tiveram comigo.

Agradeço à Faculdade de Ciências Farmacêuticas, por ter concedido essa oportunidade

Agradeço a CAPES, pelo bolsa, sem a qual, a dedicação exclusiva a esse trabalho não teria sido possível.

Resumo

MARTINS, J. P. M. **Triagem virtual de inibidores da enzima di-hidrofolato redutase de *Schistosoma mansoni* (SmDHFR)**. 2017. 92f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017

A esquistossomose é uma das principais causas de morbidade em países Tropicais e Subtropicais, gerando graves consequências socioeconômicas. Atualmente, os fármacos disponíveis para o tratamento desta doença são praziquantel e oxamniquina, porém relatos de baixa susceptibilidade do parasita a esses medicamentos sugerem a necessidade de novas estratégias terapêuticas para o tratamento da doença. Todavia, existe pouco interesse da indústria farmacêutica no desenvolvimento de fármacos contra doenças tropicais e negligenciadas, entre as quais se encontra a esquistossomose. Devido a estes fatores, o presente trabalho teve por objetivo geral utilizar ferramentas computacionais para identificar inibidores da SmDHFR candidatos a novos fármacos. Avaliou-se as características exclusivas para a proteína de *S. mansoni* por meio de uma análise das sequências FASTA em comparação com a DHFR de outros organismos. A fim de garantir a ação seletiva dessas moléculas frente a enzima do parasita, os campos moleculares de interação seletivos para SmDHFR foram calculados e empregados na construção do modelo farmacofórico, o qual foi utilizado na triagem virtual de inibidores de SmDHFR. Os estudos computacionais realizados nos permitiram a seleção de 20 moléculas com uma boa complementariedade com o modelo farmacofórico gerado e com potencial para serem inibidores de SmDHFR.

Palavras chaves: *Planejamento de Fármacos Baseado na Estrutura do Receptor (SBDD); GRID/PCA; Acoplamento Molecular; Di-hidrofolato Redutase; Schistosoma mansoni.*

ABSTRACT

MARTINS, J. P. M. **Virtual screening of dihydrofolate reductase *Schistosoma mansoni* (SmDHFR) enzyme inhibitors**. 2017. 92f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017

Schistosomiasis is one of morbidity's main causes in tropical and subtropical countries, which leads to serious socioeconomic consequences. Praziquantel and oxamniquina are the drugs currently available for treating this disease, but reports points that the parasite has been resistant to both drugs, which suggests the need for new therapeutic strategies for the treatment of this disease. However, there is little interest in the pharmaceutical industry in developing drugs against neglected tropical diseases, including schistosomiasis. Due to these factors, the present work has the general objective to use computational tools to identify *SmDHFR* inhibitors which could be good candidates for developing new drugs. Evaluation of the exclusive characteristics of the *S. mansoni* protein were performed by FASTA sequence analyses in comparison to DHFR from other organisms. In order to guarantee the selective action of these molecules against the parasite enzyme, the molecular interaction fields selective for *SmDHFR* were calculated and used in the construction of the pharmacophoric model, which was further used in the virtual screening of *SmDHFR* inhibitors. Computational studies were performed and those led us to 20 molecules with a good complementarity with the pharmacophoric model that was previously generated and with potential to be *SmDHFR* inhibitors.

Key Words: Structure Based Drug Design (SBDD); GRID / PCA; Molecular coupling; Dihydrofolate Reductase; *Schistosoma mansoni*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição mundial da esquistossomose e suas características de acordo com a espécie do parasita.	3
Figura 2	<i>Biomphalaria glabrata</i> , molusco hospedeiro intermediário do <i>S. mansoni</i>	4
Figura 3	Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i>	5
Figura 4	Praziquantel, principal opção terapêutica para o tratamento da esquistossomose	9
Figura 5	Oxaminiquina, segunda opção terapêutica para o tratamento da esquistossomose causada por <i>S. mansoni</i> .	10
Figura 6	Artemisinina, princípio ativo extraído das folhas de <i>Artemisia annua</i> .	11
Figura 7	Artemeter, opção terapêutica para o tratamento da esquistossomose, derivado da artemisinina.	12
Figura 8	Esquema de conversão do ácido fólico para seus derivados. (A) Ácido Fólico; (B) Di-hidrofolato; (C) Tetra-hidrofolato	15
Figura 9	Alinhamento entre o anel diaminopirimidina do substrato e o anel piridínico do cofator	16
Figura 10	Papel da di-hidrofolato redutase na conversão do folato em tetra-hidrofolato. Quando inibida, não há a formação do DNA da bactéria, ocasionando a morte celular.	17
Figura 11	Estratégia de Triagem Virtual	30
Figura 12	Sequência FASTA da enzima humana 2W3A, com a qual foi realizado o BLAST	34
Figura 13	Alinhamento das estruturas primárias baseada na estrutura 2W3A. Em letras vermelhas os resíduos correspondentes ao sítio ativo do <i>Schistosoma mansoni</i> . E nos retângulos vermelhos os resíduos correspondentes às outras espécies.	36

Figura 14	Agrupamentos conformacionais (2 Å) observados durante a fase produtiva da dinâmica molecular. O agrupamento 1 está presente em 46,7% do tempo; o agrupamento 2, 29,4% e o agrupamento 3, em 9,6%	39
Figura 15	Alinhamento da estrutura primária da enzima parasitária (SmDHFR, PDB: 3VCO) e humana (HsDHFR, PDB: 2W3A). Em <i>itálico</i> , aminoácidos da SmDHFR; em cinza aminoácidos da HsDHFR, em negrito , aminoácidos coincidentes	40
Figura 16	Representação dos campos de interação molecular provenientes da sonda C3; A) estrutura da SmDHFR (verde) e campos C3 em roxo; B) estrutura da HsDHFR (vermelho) e campos C3 em azul.	43
Figura 17	Estrutura SmDHFR com os pontos de seletividade hidrofóbica em relação a HsDHFR (em amarelo).	44
Figura 18	Representação dos campos de interação molecular provenientes da sonda N+; A) estrutura da SmDHFR (verde) e campos N+ em roxo; B) estrutura da HsDHFR (vermelho) e campos N+ em azul	46
Figura 19	Estrutura SmDHFR com os pontos de seletividade hidrofóbica em relação a HsDHFR (em azul).	47
Figura 20	Representação dos campos de interação molecular provenientes da sonda N1; A) estrutura da SmDHFR (verde) e campos N1 em roxo; B) estrutura da HsDHFR (vermelho) e campos N1 em azul.	49
Figura 21	Estrutura SmDHFR com os pontos de seletividade hidrofóbica em relação a HsDHFR (em vermelho).	50
Figura 22	Alinhamento da estrutura primária da enzima parasitária (SmDHFR) e humana (HsDHFR). Em vermelho os aminoácidos levados em consideração para a construção do modelo farmacofórico e seu correspondente humano destacado em cinza e vermelho	51
Figura 23	Modelo farmacofórico final contendo dois pontos favoráveis ligações hidrofóbicas (amarelo), dois pontos favoráveis à doadores de ligação de hidrogênio (vermelho), e um ponto favorável a ser acceptor de ligação de hidrogênio (azul), e as respectivas distâncias entre eles	52
Figura 24	Protocolo de triagem virtual realizado e o número de compostos obtido em cada etapa de filtragem	54

Figura 25	Esquema da triagem virtual: realizada de maneira gradual, elevando, de 5 em 5 unidades o valor do QFIT até a análise consensual que nos levou a 20 compostos	55
Figura 26	Validação por <i>cross-docking</i> . Em verde a enzima do parasita com a TOP docada em azul tendo por referência o ASP-28. Em vermelho a enzima do parasita com a TOP em magenta com a qual está cristalizada	56
Figura 27	Estruturas obtidas da triagem virtual que pós análise visual, podem interagir com a DHFR	57
Figura 28	Estrutura ZINC00868919	59
Figura 29	Estrutura ZINC00868919	59

LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS

Gráfico 1	Levantamento dos cristais de di-hidrofolato redutase presentes no banco de dados do PDB de acordo com o seu ano de depósito e taxonomia	34
Tabela 1	Coordenadas utilizadas para caixa GRID nos eixos X, Y e Z. BOT – ponto inferior do eixo; TOP – ponto superior do eixo	29
Tabela 2	Cristais escolhidos para o alinhamento das sequências primárias	35
Tabela 3	Tabela ilustrando os aminoácidos do sítio ativo de <i>S. mansoni</i> e seus respectivos aminoácidos alinhados nas demais espécies	36
Tabela 4	Aminoácidos do sítio ativo de <i>S. mansoni</i> comparados com o correspondente humano pelo alinhamento	40
Tabela 5	Estruturas que pós análise visual, podem interagir com a DHFR	58

LISTA DE ABREVIATURAS

AF	- Ácido Fólico
BLAST	- Basic Local Alignment Search Tool
DHF	- Di-hidrofolato / Ácido Di-hidrofólico
DHFR	- Di-hidrofolato Redutase
DM	- Dinâmica Molecular
DN	- Doenças Negligenciadas
GOLD	- Genetic Optimisation for Ligand Docking
HsDHFR	- Di-hidrofolato Redutase humana
MIFs	- Molecular Interactions Fields
MTX	- Metotrexato
PCE	- Programa de Controle de Esquistossomose
PDB	- Protein Data Bank
PYR	- Pirimetamina
SBDD	- Structure Based Drug Design
SmDHFR	- Di-hidrofolato Redutase de <i>Schistosoma mansoni</i>
THF	- Tetra-hidrofolato / Ácido Tetra-hidrofólico
TOP	- Trimetoprima

ÍNDICE

1. Introdução	1
1.1. Esquistossomose	2
1.1.1. Fases da esquistossomose	7
1.1.1.1. Esquistossomose aguda	7
1.1.1.2 Esquistossomose crônica	7
1.2. Arsenal Terapêutico	8
1.3. Alvos terapêuticos	13
1.3.1.Di-hidrofolato redutase	14
1.4. Planejamento de Fármacos	17
1.4.1 Química computacional e Modelagem Molecular	18
1.4.2 Planejamento de fármacos	19
1.4.3 Docking	20
1.4. 4 Inspeção do sítio: de seletividade e construção do modelo farmacofórico	21
2. Objetivos	25
2.1 Objetivo Geral	25
2.2 Objetivos específicos	25
3. Materiais e métodos	27
3.1. Polimorfismo enzimático	27
3.2. Estudos de seletividade <i>in silico</i> utilizando campos de interação molecular	27
3.3. Construção do Modelo Farmacofórico	29
3.4. Triagem Virtual e Docking Molecular	29

4. Resultados e Discussão	33
4.1. Polimorfismo Enzimático	33
4.2 Campos de Interação Molecular – Mif	38
4.2.1. Sonda C3	42
4.2.2. Sonda N+	45
4.2.3 Sonda N1	48
4.3. Triagem Virtual	52
5. Conclusões	61
6. Referências	63

As armas e os barões assinalados,
Que da ocidental praia Lusitana,
Por mares nunca de antes navegados,
Passaram ainda além da Taprobana,
Em perigos e guerras esforçados,
Mais do que prometia a força humana,
E entre gente remota edificaram
Novo Reino, que tanto sublimaram
(OS LVSÍADAS, Camões, 1572)

1. Introdução

1. Introdução

As Doenças Negligenciadas (DN) são aquelas cuja relevância médica é de extrema importância, porém não possuem a devida atenção dos governos e indústrias farmacêuticas. Dentre as doenças que possuem perfil de DN se encontram a esquistossomose, as leishmanioses, a malária, entre outras. Estas doenças, denominadas negligenciadas, acometem milhões de pessoas no mundo, chegando a 11,4% da carga global de doenças, elas recebem quase nenhum investimento em inovação por parte das indústrias farmacêuticas. Isso se dá porque ao afetar camadas mais pobres da população de países em subdesenvolvidos e em desenvolvimento (FRANCO-PAREDES et al., 2007; KAPPAGODA, IOANNIDIS, 2012), isso acaba diminuindo o retorno financeiro e inviabilizando a pesquisa (WILLYARD, 2013, DNDi, 2015). O descaso da indústria farmacêutica pode ser observado por apenas 1,3% dos fármacos introduzidos na terapêutica entre 1975 e 2004 foram direcionados a essas doenças, exatamente 21 dos 1.556 novos medicamentos registrados (DNDi, 2015).

Em se tratando do Brasil, uma alta prevalência das DN pode ser observada, particularmente a esquistossomose, doença de chagas e as leishmanioses. (MS, 2017).

A esquistossomose foi descoberta no ano de 1852 Theodor Bilharz (1825-1862), um dos idealizadores da medicina tropical (ABOU-EL-NAGA, 2013). A descrição da patologia e identificação dos vermes e seus ovos na bexiga e no fígado de indivíduos contaminados se deu 1853, pelo próprio Bilharz. Assim, em 1856, a doença foi nomeada bilharzia em sua homenagem. (ELTAWIL, PLASSMANN, 2011).

Sabe-se que os egípcios (1.500 A.C.) já eram acometidos por esse mal. (SANDBACH - 1976). Isso foi confirmado quando o caso mais antigo de esquistossomose humana de que se tem notícia foi identificado por imunodiagnose (Elisa) na múmia de um adolescente egípcio, infectado pelo *S. haematobium*, há mais de cinco mil anos (DEELDER, 1990).

Diante deste panorama, faz-se urgente a necessidade de novos fármacos e de novos alvos terapêuticos para o tratamento das DN. (DNDi, 2015).

Deste modo, a identificação e caracterização de vias metabólicas essenciais à sobrevivência de parasitas são bases fundamentais para o planejamento racional de

novos agentes quimioterápicos (GUIDO, OLIVA, ANDRICOPULO, 2010). Por esse motivo, as enzimas se apresentam como alvos de grande interesse, uma vez que desempenham papel fundamental como responsáveis por vias metabólicas importantes para os parasitas (COPELAND, 2013), tornando inibidores enzimáticos promissores para o tratamento das DN (GUIDO, OLIVA, ANDRICOPULO, 2012).

Um método bastante utilizado na identificação e otimização de inibidores enzimáticos é o planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor (*Structure Based Drug Design* - SBDD) (FERREIRA et al., 2014). Entre as técnicas modernas de SBDD, destacamos a triagem virtual, que possibilita identificar e selecionar candidatos a inibidores, a partir de grandes bases de dados de compostos. Portanto, utilizando técnicas do planejamento de fármacos, é possível realizar um estudo a fim de identificar novos inibidores que possam atuar nesses alvos e que possam ser novos candidatos a fármacos ou possíveis protótipos. (GUIDO, OLIVA, ANDRICOPULO, 2010).

1.1. Esquistossomose

A esquistossomose é uma doença parasitária causada por trematódeos do gênero *Schistosoma*, que se caracterizam por serem vermes dioicos. Sua transmissão se dá em 78 países ao redor do mundo, entre eles o Brasil. Mesmo sendo alta a incidência da doença, o tratamento preventivo somente acontece em 52 países endêmicos (WHO, 2015). Cinco espécies do gênero *Schistosoma spp.* são reportadas como causadoras das diversas formas de esquistossomose, sendo elas: *S. mansoni*, *S. mekongi*, *S. japonicum*, *S. haematobium*, e *S. intercalatum*. As particularidades características de cada infecção podem ser observadas na figura 1, a qual também ilustra a sua prevalência mundial. (SIQUEIRA-BATISTA et al 1998). No Brasil há a predominância do gênero *mansoni*. (MILAN E. P., KEIM L. S., 2007 e PRATA A. 2007).

Figura 1. Distribuição mundial da esquistossomose e suas características de acordo com a espécie do parasita. Adaptado de: Red Book, 2015.

Como a maioria das doenças causadas por parasitas, a esquistossomose pode se apresentar na forma aguda e evoluir para a forma crônica. A doença normalmente se cronifica após 6 meses da infecção e sua evolução perdura por longa data o que acarreta em anos de tratamento. (DE SOUZA et al., 2011)

A esquistossomose necessita de um hospedeiro intermediário para ser transmitida ao homem e, no território brasileiro, os caramujos da família *Planorbidae*, que são gastrópodes pulmonados, fazem o papel de vetores naturais para o *S. mansoni*. No entanto, nessa família de gastrópodes, apenas um gênero, o *Biomphalaria* possui importância epidemiológica por serem encontrados naturalmente infectados por *S. mansoni*, são elas: *B. glabrata*; *B. tenagophila*; *B. straminea*. Existem outras nove espécies, que são consideradas hospedeiros potenciais porque não foram encontrados contaminados naturalmente, mas apenas foram capazes de hospedar o parasita depois de serem infectados de maneira experimental. (MS, 2014).

Em 16 dos 27 estados brasileiros o vetor que prevalece é o *Biomphalaria glabrata* (Figura 2). Dos exemplares dessa espécie analisados, altos níveis de infecção por

Schistosoma mansoni foram confirmadas, sendo que a concentração destes moluscos fica localizada na região litorânea do país, que no caso do Brasil é muito extensa, a possível contaminação de indivíduos também preocupa. (MILAN E. P., KEIM L. S., 2007 e PRATA A. 2007). As outras espécies encontradas naturalmente infectadas são bem menos susceptíveis ao parasita, razão pela qual o *B. glabrata* é o considerado o principal vetor, e às vezes, por alguns autores, o único vetor presente no país. (MS, 2014).

Figura 2: *Biomphalaria glabrata*, molusco hospedeiro intermediário do *S. mansoni*.

Há registros no controle da esquistossomose no Brasil desde 1975. De 1975 a 2012, passamos por diferentes índices de contaminação no país, chegando ao auge em 1995 com mais de 300 mil pessoas infectadas. (MS, 2014)

A partir de 2004, foram implantadas diversas políticas de melhorias estruturais de saneamento básico o que fez com que esse número decrescesse gradativamente. No período de 2008 a 2011 constatou-se no Brasil que a média de pessoas portadoras de *S. mansoni* foi de aproximadamente 72 mil casos por ano. Com tais políticas passamos a ter, em 2012, cerca de 26 mil pessoas portadoras. PCE (Programa de Controle de Esquistossomose) (MS, 2014).

O ciclo de vida do parasita (Figura 3) apresenta fases sexuadas e assexuadas. Este é um parasita heteroxênico, ou seja, tem a necessidade de mais de um hospedeiro para que seu ciclo de vida se complete (MILAN, KEIM, 2007).

Figura 3. Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni* (DE SOUZA, 2011).

Os ovos que se encontram nas fezes do indivíduo contaminado com os parasitas (Figura 3 - 1) entram em contato com a água, que lhes propiciará as condições necessárias (temperatura, luminosidade e oxigenação) para que possam completar sua maturação.

Desde o primeiro contato com a água, os ovos levam entre seis e sete dias para eclodirem (SIQUEIRA-BATISTA et al 1998). Após a eclosão dos ovos, os miracídeos (Figura 3 - 2) buscam um novo hospedeiro para seguir com o seu ciclo de vida. Os miracídeos, formados após a eclosão dos ovos, podem penetrar indistintamente em qualquer molusco vetor (Figura 3 - 3), porém apenas nos que são susceptíveis poderão concluir o seu ciclo para passar para a nova fase. No caso do Brasil, é o gênero *Biomphalaria spp.* que é o hospedeiro intermediário com maior prevalência.

Dentro do molusco, os miracídeos, se desenvolvem e se tornam esporocistos

(Figura 3 - 4), estes, por sua vez continuando o seu ciclo, tornam-se cercárias (Figura 3 - 5). Cada miracídio gera em torno de 100.000 cercárias. As cercárias são as formas que deixam o interior do molusco e são capazes de penetrar na pele e nas mucosas humanas, proporcionando a contaminação. Essas formas parasitárias podem penetrar, também, em outros mamíferos e aves que entram em contato com a água contaminada (DE SOUZA, 2011).

A contaminação do indivíduo pode se dar por duas maneiras: penetração das cercárias pela pele ou pelas mucosas. Pela pele, a contaminação ocorre quando o hospedeiro entrar em contato com a água de lagoas, lagos e etc. que estejam contaminados com ovos e que não estejam devidamente tratadas. Ao entrarem em contato com a água para nadarem, as cercárias fixam-se na pele e penetram causando um pequeno prurido (Figura 3 - 6). Pelas mucosas, penetrarão quando água usada para ingestão não está devidamente tratada ou fervida. (DE SOUZA, 2011)

Durante a penetração, as cercárias perdem a cauda e se transformam em esquistossômulos (Figura 3 - 7). Os esquistossômulos atingem a circulação (Figura 3 - 8) e migram até o sistema porta-hepático, coração e pulmões. No sistema porta ficarão até se tornarem adultos (Figura 3 - 9). No hospedeiro definitivo, o homem, é onde o *S. mansoni* evolui para sua forma adulta e macho e fêmea copulam. As fêmeas fecundadas migram contra a corrente sanguínea e depositam os ovos na submucosa dos vasos de menor calibre da parede intestinal. Dessa forma, alguns ovos são lançados na corrente sanguínea; outros, chegam à luz intestinal. (PESSOA, MARTINS, 1988). (Figura 3 - 10). Os ovos que chegam à luz intestinal serão eliminados nas fezes entrando em contato com a água (Figura 3 - 1). (PRATA, 2207; MILAN, KEIM, 2007). A quantidade de ovos gira em torno de 400 por dia. (PESSOA, MARTINS, 1988).

Embora esses sejam os locais mais comuns para a presença do parasita, podem também ser encontrados em outros órgãos – como pulmões, baço, pâncreas e bexiga. (PRATA, 2007).

Após a penetração do parasita no sistema linfático do indivíduo infectado, a esquistossomose pode se apresentar de maneira aguda, considerada a fase inicial da doença, e se não tratada corretamente, após aproximadamente 6 meses, pode se tornar crônica. Nesta fase surgem as manifestações mais graves da doença, tais como:

esquistossomose intestinal e hepatointestinal e a esquistossomose hepatoesplênica. (MS, 2014, DE SOUZA, 2011 e LAMBERTUCCI et al, 2005).

1.1.1. Fases da esquistossomose

1.1.1.1. Esquistossomose aguda

Os sintomas referentes à fase aguda da doença variam muito de indivíduo para indivíduo, de acordo com as características fisiológicas e de acordo com o número de cercárias presentes na infecção de cada pessoa. (MS, 2014, DE SOUZA, 2011 e LAMBERTUCCI et al, 2005). Um dos primeiros sintomas apresentados pelos indivíduos acometidos é a dermatite cercariana, causada pela penetração das cercárias na pele. Em regiões endêmicas, existe inclusive um ditado popular referente que diz: “Se nadou e depois coçou, é porque pegou”. Nestas mesmas regiões, onde sabe-se que existem águas contaminadas, essas águas são chamadas de “lagoas de coceira”. Se apresenta como manifestações pruriginosas na pele, de características transitórias que geralmente cedem sem a necessidade de outro tipo de intervenção (MS, 2014, DE SOUZA, 2011 e LAMBERTUCCI et al, 2005).

1.1.1.2 Esquistossomose crônica

A esquistossomose em sua fase crônica pode se apresentar de diferentes formas, sendo elas: a forma hepatointestinal, forma hepatoesplênica, os distúrbios vasculares e pulmonares, as formas pseudoneoplásicas, a nefropatia esquistossomótica e as lesões ectópicas (MS, 2014, DE SOUZA, 2011 e LAMBERTUCCI et al, 2005).

A forma intestinal e hepatointestinal diferenciam-se apenas pela hepatomegalia e é a forma intermediária para a hepatoesplênica. A hepatomegalia é o sintoma mais aparente e característico da esquistossomose no qual há o aumento do tamanho do fígado e do baço. Nessa primeira fase os sintomas não são aparentes, podendo ser confundido com outras parasitoses de sintomas comuns como diarreia, vômitos, febre e fadiga. Há um pequeno aumento do fígado e emagrecimento, o que pode levar a

suposição de esquistossomose. No entanto, geralmente o diagnóstico é acidental e não proposital. (MS, 2014, DE SOUZA, 2011 e LAMBERTUCCI et al, 2005).

A forma hepatoesplênica é a forma mais conhecida e aparente. É uma evolução da forma hepatointestinal, isso acontece por diferentes fatores, dentre eles podemos destacar como principais: etnia (negros são mais susceptíveis); múltiplas e frequentes infecções; carga parasitária; outros estados mórbidos, como por exemplo hepatites; estado nutricional; estado imunológico, entre outros. (MS, 2014, DE SOUZA, 2011 e LAMBERTUCCI et al, 2005).

A nefropatia esquistossomótica é mais frequente na forma hepatoesplênica da doença. Serão acometidas cerca de 12% a 15% das pessoas infectadas pelo *S. mansoni*. O provável mecanismo patogênico da doença se dá pela ação imunológica mediada pela formação de imunocomplexos depositados nos glomérulos. Independentemente de tratamento, a lesão renal se mostra progressiva e a doença evolui à insuficiência renal. (MS, 2014, DE SOUZA, 2011 e LAMBERTUCCI et al, 2005).

As formas ectópicas são aquelas formas nas quais o parasita se encontra fora do seu habitat natural, sistema porta-hepático. A forma ectópica mais grave é a chamada neuroesquistossomose, na qual há a presença dos ovos dos helmintos no sistema nervoso. Outros exemplos de ectopia na esquistossomose mansônica pode ocorrer em muitos outros lugares como por exemplo a apendicular, vesicular, pancreática, peritoneal, geniturinária, miocárdica, cutânea, esofágica, gástrica, tireoidiana e suprarrenal. (MS, 2014, DE SOUZA, 2011 e LAMBERTUCCI et al, 2005).

1.2. Arsenal Terapêutico

O arsenal terapêutico disponível atualmente para o tratamento específico de esquistossomose é limitado, sendo o praziquantel a principal escolha (Figura 4).

Praziquantel

Figura 4. Praziquantel, principal opção terapêutica para o tratamento da esquistossomose.

O praziquantel é ativo a todas as formas de esquistossomose humana. (CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, 2002). Esse fármaco tem como alvo os canais de cálcio do parasita. Sua ação se dá por desregular as passagens de cátions das membranas plasmáticas dos parasitas, causando seu descolamento das paredes dos vasos onde se localizam fazendo com que sejam eliminados do corpo. (DOENHOFF et al., 2008)

Devido à falta de alternativas terapêuticas e visto que a vacina eficaz contra a esquistossomose se encontra em fase de desenvolvimento, a distribuição massiva de praziquantel em áreas endêmicas se apresenta, ainda, como a única alternativa para a redução da morbidade dos portadores de *Schistosoma spp.* (CIOLI, D et al, 2014). No entanto essa distribuição, além de deficitária, posto que 35% dos países endêmicos não possuem correta assistência e tratamento preventivo (WHO, 2015), desencadeou problemas de resistência ao fármaco.

Outro motivo que justifica resistência é que o praziquantel vem sendo utilizado desde a década de 1970 sem inovação e modificações, visto que os trematódeos do gênero *Schistosoma* expostos tanto tempo ao mesmo agente quimioterápico lhes permitiu desenvolver mecanismos de defesa por parte de seus sistemas bioquímicos, o que conferiu essa resistência (FENWICK e WEBSTER, 2006, CIOLI, D. e PICA-MATTOCCIA, 2002). De acordo com estudos realizados foi comprovado que no Senegal e Egito, há parasitas resistentes ao praziquantel (DeMARCO e VERJOVSKI-ALMEIDA, 2009).

Devido aos graves efeitos colaterais do praziquantel, buscava-se uma alternativa para o tratamento da esquistossomose. Pesquisadores da Pfizer, descreveram uma nova série de derivados 2-amino-metiltetrahydroquinolínicos que apresentaram uma ação significativa diante da esquistossomose. Dos mais de 50 derivados ensaiados, foi escolhido como dos mais promissores o UK3883. Esse composto apresentou ação curativa em dose oral única, e, também, uma característica até então não alcançada, a atividade profilática contra todos os estágios imaturos dos parasitas, em testes realizados em camundongos. No intuito de otimizar a atividade do composto UK3883, modificações moleculares foram realizadas, por meio da hidroxilação do grupo 6-metil, dando origem ao composto UK 4271, que foi denominado oxamniquina (figura 5) (KATZ, 2005). Este fármaco é utilizado até os dias de hoje na terapêutica, apesar de ser ativo somente contra *S. Mansoni*. Ademais, cepas resistentes a oxamniquina, também já foram isoladas em estudos clínicos. (CIOLI et al, 1992)

Figura 5. Oxamniquina, segunda opção terapêutica para o tratamento da esquistossomose causada por *S. mansoni*.

Devido ao surgimento de resistência ao praziquantel e à oxamniquina, buscou-se alternativas terapêuticas.

Neste sentido, uma alternativa foi a utilização do artemeter, um derivado de artemisinina, em conjunto com o praziquantel, visando a atuação por duas vias bioquímicas e buscou-se com isso evitar a resistência. O praziquantel atua nos canais de cálcio, enquanto que o artemeter atuará como inibidor da enzima bifuncional específica do schistossoma, a tiorredoxina-glutationa redutase. (DOENHOFF, 2008).

A artemisinina (Figura 6) é o princípio ativo extraído das folhas de *Artemisia annua* (Figura 6). É importante ressaltar que essa planta vem sendo utilizada para tratamento de febre na China há mais de 2 mil anos. (KATZ, 2005)

Figura 6. Artemisinina, princípio ativo extraído das folhas de *Artemisia annua*.

Com os problemas sociais e altos índices de mortalidade causados pela malária, durante os anos 70 a artemisinina e seus derivados, dentre eles o artemeter (Figura 7), foram estudados para seu tratamento. A atividade antiparasitária destes compostos levou a curiosidade para ensaiá-los contra outros microrganismos. Assim, sua ação contra *Scistossomas sp* foi descoberta. Primeiramente em *S. japonicum* e depois tal atividade foi vista também em *S. mansoni* e *S. haematobium* (KATZ, 2005). Esses compostos são bem tolerados e apresentam apenas alguns suaves efeitos colaterais; no entanto, o seu mecanismo de ação ainda não é totalmente compreendido. Artemisininas são de especial interesse para os pesquisadores pois são mais ativos contra parasitas imaturos quando comparados aos demais (KATZ, 2005).

Figura 7. Artemeter, opção terapêutica para o tratamento da esquistossomose, derivado da artemisinina.

O uso de derivados de artemisinina pode ser utilizado no combate à esquistossomose, porém isso é desaconselhado devido ao risco de desenvolvimento de resistência cruzada com a malária, principalmente nas áreas endêmicas para ambas as patologias (ABDUL-GHANI et al., 2009).

Assim, para contornar o problema da resistência buscou-se uma nova alternativa terapêutica para o tratamento. Como se sabia que o praziquantel é capaz de matar o verme adulto e o artemeter é capaz de matar esquistossômulos nas primeiras três semanas de infecção, tentou-se uma ação sinérgica de ambos. Os dois fármacos, em combinação, têm um melhor desempenho na prevenção do que a monoterapia tradicional com cada um individualmente. Por esse motivo seu uso sinérgico é aconselhado apenas às pessoas com contato frequente com a água infectada. (LIU et al. 2011).

Esse cenário torna clara a necessidade de se buscar alternativas terapêuticas para o tratamento da esquistossomose. Assim, para alcançar tal objetivo é necessário a exploração de alvos terapêuticos exclusivos do parasita, ou que pelo menos sejam suficientemente diferentes para garantir a inibição seletiva. (RENSLO e MCKERROW, 2006).

1.3. Alvos terapêuticos

A análise do genoma de *S. mansoni* revela que das 13.283 enzimas disponíveis na base de dados de alvos macromoleculares da TDR (<http://tdrtargets.org>) para *S. mansoni*, apenas 38 são consideradas como alvos validados (parâmetros de busca: “*pathogen species*” = *S. mansoni*; “*validation data*”= “*any form*”). Esse dado sugere que poucos estudos foram realizados até o momento para identificar alvos macromoleculares que sejam essenciais para *S. mansoni* e possam ser modulados por micromoléculas. (CAFFREY et al. 2009)

No contexto de alvos bioquímicos em *S. mansoni*, vale a pena destacar o trabalho pioneiro de Caffrey e colaboradores em 2009, no qual identificaram um conjunto de 35 macromoléculas que podem ser modulados por micromoléculas e são essenciais para a sobrevivência de *S. mansoni* no hospedeiro. Chama a atenção o fato da enzima di-hidrofolato redutase (DHFR) (código Smp_175230) não aparecer nessa lista mesmo tendo um papel fundamental para sobrevivência do parasita. No entanto isso é compreensível uma vez que o autor se valeu de estruturas cristalizadas para justificar o potencial farmacológico desses alvos e no caso da di-hidrofolato redutase de *S. mansoni*, não há estrutura cristalizada com ligante, (CAFFREY et al. 2009) posto que esta só foi cristalografada recentemente, no ano de 2013 sob o código do PDB: 3VCO.

Assim, visando a busca de um novo fármaco contra a esquistossomose, escolhemos como alvo enzimático a DHFR. Essa escolha justifica-se por ser uma enzima essencial à sobrevivência do parasita causador da esquistossomose e por isso se apresenta como um alvo bioquímico extremamente interessante a ser utilizado para a descoberta de novos fármacos (GANGJEE, 2007). Sua importância como alvo deve-se ao fato de ser a responsável pela metabolização do folato em tetra-hidrofolato, um metabólito essencial para a síntese de purinas e pirimidinas, responsáveis pela multiplicação celular do parasita (VOLPATO et al. 2009).

1.3.1. Di-hidrofolato redutase

De acordo com a classificação enzimática, a di-hidrofolato redutase se enquadra como EC 1.5.1.3 (Enzyme Nomenclature - 1976). Sendo:

- EC 1.: Oxidorredutases
- EC 1.5.: Agindo sobre o grupo CH-NH de doadores
- EC 1.5.1.: Com NAD⁺ ou NADP⁺ como acceptor
- EC 1.5.1.3: Di-hidrofolato redutase

A Di-hidrofolato redutase é a enzima, com massa de 21.600Da.

Na escala enzimática ele procede à Di-hidropteroato sintetase que é a enzima responsável por reduzir o ácido fólico (AF) a ácido dihidrofólico (DHF).

A DHFR catalisa a redução do DHF em ácido tetrahidrofólico (THF). Esses são cofatores essenciais para a biossíntese de timidato, purinas e glicina (CODY, 2005). (Figura 8).

Figura 8: Esquema de conversão do ácido fólico para seus derivados. (A) Ácido Fólico; (B) Di-hidrofolato; (C) Tetra-hidrofolato

Estudos realizados em 2003 por Rod e Brooks, visaram compreender como a DHFR de *Escherichia coli* facilita a protonação do DHF para que a reação possa ocorrer. Nesses mesmos estudos, foi relatado que durante a catálise, essa enzima se apresenta

em diferentes conformações, sendo elas aberta, oclusa e fechada. Essas mudanças conformacionais ocorrem devido ao loop M20 da proteína. Na conformação oclusa, o resíduo do loop Met16 impede que o anel nicotinamida do cofator se aproxime do sítio ativo contendo o DHF. Na conformação fechada o cofator fica alinhado adequadamente para doar um hidreto ao DHF e finalizar a catálise com o THF (figura 9). Sendo assim, por meio desses estudos foi possível observar que na forma “aberta” a enzima está apta para se ligar ao NADPH e o DHF, na forma “fechada”, ambos, cofator e substrato estão sendo catalisados, e na forma “oclusa” já houve a catálise e a enzima está pronta para uma nova catálise. Assim, para sua ação é necessário que esteja na conformação bioativa, aberta. (ROD e BROOKS, 2003)

Figura 9: Alinhamento entre o anel diaminopirimidina do substrato e o anel piridínico do cofator (adaptado de ROD e BROOKS, 2003)

A diminuição dos níveis de THF leva a uma redução da conversão de glicina em serina, na síntese de metionina e dos níveis de timidilato, resultando na diminuição da replicação do DNA (HASSAN, 2013). Por conta dessa importância na replicação do DNA do parasita, a DHFR se mostra um alvo farmacológico promissor, que apresenta no seu sítio ativo diferenças relevantes em relação a outras espécies e deste modo pode ser estudada para a busca de ligantes com potência e seletividade. Podemos citar como exemplo inibidores clássicos, como a trimetoprima (TOP), o metotrexato (MTX), um inibidor antitumoral, e a pirimetamina (PYR), um inibidor anti-protozoário irão atuar impedindo a formação do tetra-hidrofolato (COCCO et al, 1983) (Figura 10).

Figura 10: Papel da di-hidrofolato redutase na conversão do folato em tetra-hidrofolato. Quando inibida, não há a formação do DNA da bactéria, ocasionando a morte celular.

1.4. Planejamento de Fármacos

A introdução de um fármaco na terapêutica se modificou de maneira expressiva nas últimas décadas, principalmente devido a conhecimentos adquiridos nas diversas áreas do conhecimento e a multidisciplinaridade. Antigamente, os fármacos eram introduzidos na terapêutica de maneira empírica e principalmente oriundos de conhecimentos populares a respeito do uso de plantas medicinais. Hoje em dia, cada vez mais instrumentos tecnológicos, tais como computadores e robôs, são empregados para tal fim. (BARREIRO; FRAGA, 2008; VIEGAS; BOLZANI, 2006).

O planejamento de fármacos é um processo que reúne métodos experimentais e computacionais, com o intuito de identificar e desenvolver moléculas ativas. (BARREIRO; FRAGA, 2008; GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010). Nesse método há a aplicação

das bases moleculares da ação já conhecida de um composto em relação ao seu alvo farmacológico. Uma característica comum desse método é a utilização da química computacional, que ao aplicar a química teórica em conjunto com cálculos físicos e a computação gráfica tornará possível a visualização 3D, o estudo de interações ligante-receptor, cálculo de propriedades entre outros. Todos esses fatores em conjunto favorecerão o desenvolvimento de um novo fármaco (WERMUTH, 2008).

Com o planejamento de fármacos com base na estrutura do ligante ou do receptor busca-se obter estruturas que tenham um efeito biológico conhecido já que ela foi desenvolvida “sob medida”. (SANTOS, 2016).

1.4.1 Química computacional e Modelagem Molecular

Química computacional é um conjunto de técnicas que irão utilizar-se de métodos computacionais na resolução de problemas químicos. Essas técnicas foram desenvolvidas em maior intensidade a partir dos anos de 1980 e são de suma importância para diversas áreas da química (GASTEIGER, 2006). Na química computacional, todos os cálculos realizados são processados por computadores para uma posterior visualização e tratamento de dados. (GASTEIGER, 2006; OLSSON; OPREA, 2001).

A Modelagem Molecular se constitui de um conjunto de ferramentas de química computacional utilizadas para construir, manipular, visualizar e analisar as estruturas moleculares que são obtidas através de química computacional (BARREIRO et al., 1997; ITAI et al., 1996; SILVA, 2003). Com ela pode-se estudar sistemas moleculares complexos, que são capazes de auxiliar no planejamento de novos fármacos, bem como de contribuir para a interpretação e a elucidação das relações entre estrutura química e atividade biológica (BARREIRO; FRAGA, 2008). A modelagem molecular pode ser realizada de duas maneiras. A primeira é quando se conhece a estrutura tridimensional do alvo biológico e se constroem ligantes para que se liguem naquelas regiões conhecidas; tal estratégia também é chamada de planejamento de fármaco baseado na estrutura do receptor (do inglês, *Structure-Based Drug Design* - SBDD). Já a segunda se dá quando a estrutura do alvo biológico não é conhecida. Nesse caso tem-se

conhecimento apenas das estruturas químicas de compostos e suas atividades biológicas. Com base nessas informações tenta-se obter parâmetros que elucidem as relações entre estrutura química e atividade biológica. Tal abordagem é baseada no ligante, também chamada de planejamento de fármaco baseado na estrutura do ligante (do inglês, *Ligand-Based Drug Design*) (GUIDO; OLIVA; ANDRICOPULO, 2008; GUIDO; OLIVA; ANDRICOPULO, 2012; ITAI et al., 1996; SILVA, 2003).

1.4.2 Triagem Virtual

Entre as abordagens computacionais utilizadas na busca de compostos bioativos à triagem virtual, uma busca *in silico* de ligantes que apresentem características favoráveis a ação biológica por meio de parâmetros determinados, se destaca por ser um método rápido e mais barato que as triagens biológicas. Esta é uma ferramenta por meio da qual podemos selecionar compostos que sejam promissores para atuarem no nosso alvo. Nesta estratégia a busca por *hits* ou *leads* é feito a partir de banco de dados que contem milhares de compostos com uma enorme diversidade química, os quais são “filtrados” de maneira que respeitem a características topológicas e físico-químicas as quais devem ser adequadas para ter o efeito biológica desejado. (FERREIRA, 2011).

Essa estratégia de pode ser feita de dois modos: uma triagem virtual direta, na qual os compostos são primeiramente filtrados e depois são triados no modelos, e a triagem virtual reversa, na qual os compostos são triados no modelo, e depois são filtrados (KLEBE, 2006).

Os métodos de triagem virtual empregados se baseiam em duas formas, ou com base no conhecimento da estrutura do receptor, ou com base no conhecimento de ligantes e suas atividades biológicas (KLEBE, 2006).

A SBDD que levará em consideração a estrutura tridimensional do alvo. Essa abordagem é a mais robusta pois capaz de auxiliar em todo o processo, que vai desde a análise 3D do alvo até a otimização das interações moleculares e propriedades farmacocinéticas (RODRIGUES, 2012)

A LBDD que leva em consideração moléculas com atividade biológica conhecida. Essas serão utilizadas como moldes para que novas moléculas sejam filtradas e

possuam algum nível de similaridade com estes moldes, e assim espera-se que tenham a mesma atividade biológica. (RODRIGUES, 2012)

No entanto, embora as abordagens de triagem virtual tenham descoberto com sucesso inibidores para uma série de enzimas diversas, há uma limitação, posto que os alvos são tratados como estruturas estáticas não levando em conta a flexibilidade proteica (OCHOA, 2016).

1.4.3 Docking

Docking é uma ferramenta que foi desenvolvida nos anos 1980 e é até hoje um artifício importante no desenvolvimento de novos fármacos. Tal ferramenta nos permite prever a posição mais favorável (também chamada de pose) de um ligante no sítio de ligação de uma proteína, sendo possível assim analisar de uma maneira bastante favorável as interações entre proteínas e ligantes (LAPE 2010).

Os programas de docking molecular, utilizam mecanismos de análise conformacional para gerar as geometrias do (provável) ligante em conjunto com funções de avaliação para avaliar, dentre as conformações geradas, a provável conformação bioativa.

As funções de avaliação utilizadas pelos programas de acoplamento são divididas em três classes principais: funções baseada em campo de força, funções semi-empírica e empírica; e funções baseada em conhecimento. Funções baseadas em campos de força utilizam a energia de interação entre o receptor e o ligante e a energia interna do ligante descrita por interações de van de Waals, determinada pelo potencial Lennard-Jones, e interações eletrostáticas, determinada pelo potencial de Coulomb. Os métodos semi-empíricos e empíricos, para o cálculo da energia livre de ligação, utilizam uma função com coeficientes pré-otimizados tomando-se como base resultados experimentais de estruturas receptor-ligante e suas energias de ligação. As funções baseadas no conhecimento são obtidas por meio da observação da frequência das energias de ligação entre pares de átomos do complexo proteína-ligante que possuem estrutura conhecida (MAGALHÃES, 2006).

Como exemplos de programas utilizados na triagem virtual têm-se os módulos SURFLEX-DOCK e SURFLEX-SIM (PHAM e JAIN, 2006) da plataforma SYBYL. Ambos

os programas utilizam o conceito de similaridade morfológica para gerar as conformações de uma molécula no sítio de ligação (SURFLEX -DOCK), ou o alinhamento molecular dos prováveis ligantes com a molécula referência (SURFLEX-SIM), que são então avaliadas de acordo com uma função de pontuação empírica, no caso do acoplamento molecular ou com base na diferença entre as superfícies das moléculas que estão sendo comparadas (JAIN, 2007).

Outro exemplo que podemos citar, é o programa GOLD (Genetic Optimisation for Ligand Docking) que foi o utilizado nesse trabalho e o programa AutoDock. Esses dois programas permitem a flexibilidade conformacional completa dos resíduos que definem o sítio de ligação. Acredita-se que este recurso seja uma melhoria em relação à estratégia comumente empregada de imitar um sítio de ligação conformacionalmente flexível, criando conjuntos de várias conformações de proteínas (rígidas) nas quais o ligante é encaixado. (LAPE 2010)

Dessa forma, os métodos computacionais nos permitem considerar e avaliar afinidade, potência e seletividade de inibidores em estudo e seus alvos moleculares devidamente validados (GUIDO, ANDRICOPULO, OLIVA, 2010). Quando se investiga um alvo terapêutico que também está presente no hospedeiro, deve-se analisar cuidadosamente diferenças bioquímicas e estruturais que permitam o desenvolvimento de inibidores seletivos (VERLINDE *et al.*, 2001). Uma das formas de priorizar a identificação de moléculas com elevado grau de seletividade é por meio da caracterização de campos de interação moleculares (MIF, do inglês *Molecular Interactions Fields*) que destaquem propriedades exclusivas do alvo terapêutico desejado.

1.4. 4 Inspeção do sítio: de seletividade e construção do modelo farmacofórico

A complementaridade com o receptor é fundamental para a ação de um fármaco estruturalmente específico. Deste modo, o sucesso das pesquisas em química medicinal depende, muitas vezes, da compreensão do reconhecimento molecular (ROCHA et al. 2010). Diante do paradigma da avaliação da real interação entre ligante-receptor a elucidação das propriedades eletrostáticas, topologias, volumes moleculares, forças de

ligação, entre outras envolvidas, é essencial para a predição da afinidade de um ligante por um receptor. O cálculo e análise dos campos de interação molecular (MIF- *Molecular Interaction Fields*) é uma das várias ferramentas computacionais desenvolvidas a fim gerar informações sobre o complexo fármaco-receptor (ROCHA et al. 2010). Um dos programas mais utilizados para cálculo dos MIFs é o GRID da *Molecular Discovery*, que estima a energia entre *probes* (sondas virtuais) e a macromolécula de propriedades estéricas e eletrônicas (CAROSATI, SCIABOLA, CRUCIANI, 2004; Molecular Discovery, 1998, GOODFORT, 2005).

Nesse programa, uma grade tridimensional (GRID) é construída na região de interesse. Sondas denominadas *probes*, que representam grupos funcionais com diferentes propriedades físico-químicas, são movidas ponto a ponto, em cada um dos vértices da grade. Em cada um dos pontos uma energia: *probe* é gerada e é computada a partir de um campo de força. (GOODFORT, 2005)

Esse campo de força está baseado no potencial de Lennard-Jones, que representa a força de repulsão e atração entre um par de átomos ou moléculas. A união de todos esses pontos é que dará a origem aos MIFs. Esses representam a capacidade de interação entre a região da proteína e o grupo químico representado pela sonda. (KASTENHOLZ, PASOR, 2000)

A exploração dos MIFs como ferramenta no planejamento de fármacos nos permite a análise de pontos essenciais para a interação de um ligante com seu alvo macromolecular, deste modo esses campos podem ser utilizados na avaliação da complementaridade molecular (MARTIN, et al. 2012).

Outra estratégia bastante utilizada no planejamento de fármacos, particularmente em SBDD, é a geração de modelos farmacofóricos a partir de informações oriundas dos MIFs, ou seja, as características dos pontos de interação indicados pelos campos moleculares são exploradas na construção de modelos os quais permitem a seleção de compostos promissores a partir de buscas virtuais (SANDER, et al. 2012).

Com base nas informações fornecidas pelos MIFs, após serem analisados no programa PyMol utilizou-se do programa Sybyl no seu módulo UNITY para a construção do modelo. O modelo construído foi utilizado depois para a triagem virtual.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar possíveis inibidores da enzima DHFR de *S. mansoni* (*SmDHFR*) candidatos a fármacos esquistossomicidas.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar diferenças estruturais gerais entre a enzima de DHFR e de outras espécies
- Identificar as principais diferenças entre o sítio ativo da DHFR humana e do parasita para garantir seletividade
- Desenvolver modelos farmacofóricos específicos baseados em campos de interação molecular seletivos para *SmDHFR*;
- Identificar, por meio de triagem virtual, moléculas compostos líderes (lead-like) e/ou a fragmentos moleculares (fragment-like) que tenham possível atividade inibitória sobre *SmDHFR*;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Polimorfismo enzimático

Os estudos de polimorfismo da enzima da di-hidrofolato redutase, foi realizado com o intuito de obter um panorama geral das mutações presentes nesta enzima em diferentes parasitas em relação à humana (HACIA, 1999, SHARPE, 2016). Esses estudos foram feitos de modo comparativo entre as diferentes DHFR de diferentes espécies, as quais apresentavam estrutura depositada no site de hospedagem de cristais o banco de dados *Protein Data Bank* (PDB) (<http://www.rcsb.org>).

A sequência FASTA da DHFR humana foi obtida a partir do PDB (2W3A), a partir dela realizou-se um BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool* - <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) de proteína. Com tal ferramenta foi possível verificar, a partir da sequência primária escolhida, no caso a DHFR humana, a semelhança dela com outras de diferentes espécies. Foram selecionadas sequências FASTA dos seguintes organismos: *Schistosoma mansoni*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Plasmodium falciparum*.

Após a seleção das sequências, as mesmas foram alinhadas no programa BioEdit, e foram analisadas a identidade das mutações. O intuito dessa etapa é verificar as principais diferenças estruturais entre os aminoácidos do sítio ativo da enzima alvo, a DHFR de *Schistosoma mansoni* e dos demais organismos selecionados nessa etapa.

3.2. Estudos de seletividade *in silico* utilizando campos de interação molecular

Os estudos de MIFs foram realizados de maneira comparativa entre a DHFR de *S. mansoni* e humana. Para tanto, utilizamos uma a DHFR de *Schistosoma mansoni* (PDB: 3VCO) e a estrutura de DHFR humana (PDB: 2W3A e 1U72). As estruturas da enzima humana foram escolhidas com base em sua resolução (1,5Å e 1,9Å), por não apresentar mutações e por estarem complexadas com o cofator NADPH e com os inibidores TOP e MTX respectivamente.

Os cálculos de MIFs foi realizado no programa GRID v. 22.0.3c, utilizando como ponto central da caixa (GRID) os resíduos integrantes do sítio ativo da enzima do parasita: (V-6, V-7, A-8, P-22, W-23, K-24, D-28, M-29, F-31, F-32, T-53 e P-58). O ponto central da caixa, também coincide com o local, que após o alinhamento com as enzimas humanas, estão os inibidores.

Para a geração dos MIFs foram utilizadas as seguintes sondas:

- ✓ H₂O – Hidrofílica
- ✓ Dry – Hidrofóbica
- ✓ C1 - Carbono vinílico e/ou aromático
- ✓ H – Doador de ligação de hidrogênio
- ✓ C3 - Carbono sp³
- ✓ N: - Nitrogênio aceptor de ligação de hidrogênio
- ✓ N1 – Nitrogênio doador de ligação de hidrogênio
- ✓ O – Oxigênio sp² (aceptor de ligação de hidrogênio)
- ✓ COO⁻ - Carboxilato alifático
- ✓ Ar. COO⁻ - Carboxilato aromático

Essas sondas simulam a interação de átomos ou grupos de átomos com a porção da proteína demarcada, gerando assim os campos de interação molecular, que mostram os locais mais prováveis de se ter interação com esse tipo de átomo ou conjunto de átomos, ajudando no reconhecimento estéreo-eletrônico do sítio enzimático. (PIRARD, MATTER, 2006; GOODFORT, 1985).

As coordenadas de posicionamento da mesma foram definidas nos eixos x, y e z de acordo com a tabela 1.

Tabela 1: Coordenadas utilizadas para caixa GRID nos eixos X, Y e Z. BOT – ponto inferior do eixo; TOP – ponto superior do eixo.

BOTX: 4.48	TOPX: 29.94
BOTY: -10.90	TOPY: 9.60
BOTZ: -5.86	TOPZ: 21.01

3.3. Construção do Modelo Farmacofórico

Após a cálculo dos MIFs, procedeu-se análise visual no programa PyMol 0.99rc6. Os MIFs obtidos das estruturas da DHFR humana foram comparados com os campos das estruturas da SmDHFR na busca de pontos de restrição, ou seja, pontos em que haja grande probabilidade de haver interação com a enzima do parasita e não com a humana.

Para a geração do modelo farmacofórico, os pontos de interação favoráveis obtidos por meio da análise visual dos campos moleculares foram transpostos para o módulo UNITY do programa Sybyl X 2.0. Procedeu-se assim a construção do modelo farmacofórico por meio de pontos de restrição (TROSSINI, 2008).

3.4. Triagem Virtual e Docking Molecular

Como estratégia de triagem molecular, nos baseamos no esquema representado abaixo pela figura 11

Figura 11. Estratégia de Triagem Virtual

A triagem virtual foi realizada utilizando o módulo UNITY do programa Sybyl X 2.0, por meio do modelo farmacofórico previamente construído. Utilizou-se como banco de dados de compostos dos subconjuntos *all purchasable* e *boutique* do banco de dados ZINC (IRWIN, J. J. et al. 2012 e STERLING, T.; IRWIN, J. J, 2015) contendo aproximadamente 35 milhões de compostos (34.942.457 compostos). Nesta estratégia, inicialmente uma filtragem dos compostos presentes nesta base de dados foi realizada utilizando um filtro de propriedades físico-químicas que representasse o espaço drug-like (número de HBD entre 0 e 5, número de HBA entre 0 e 10 e logaritmo do coeficiente de partição octanol/água (logP) entre 1 e 5) (LIPINSKI, C. A., 2000, 2004, 2016) mantendo no máximo 1 grupo nitro e carga formal entre -2 e 2 e massa molecular acima de 500 Da. O segundo filtro foi o modelo farmacofórico, para avaliar a complementariedade com os pontos de restrição estabelecidos (TROSSINI, 2008; SANDERS et al. 2012).

Outro filtro aplicado foi a docagem molecular, visando avaliar a complementariedade entre ligante e receptor e, também, utilizar um ranking para classificação de possíveis inibidores. Assim, no programa GOLD 5.0 primeiramente fez-se uma metodologia de *cross-docking* como validação do modelo. Na etapa de validação variou-se o ponto central da caixa de docagem entre os resíduos escolhidos do modelo farmacofórico com três diferentes tamanhos de raio, 5, 8 e 10Å. Assim, a trimetoprima co-cristalizada na enzima humana foi docada enzima do parasita, para ver se sede modo a avaliar o encaixe de maneira adequada no sítio ativo. Dessa maneira, pudemos selecionar o resíduo que será utilizado para a realização do Docking e o tamanho do raio a ser utilizado.

Com o modelo validado foi utilizada a plataforma UNITY, baseado no valor de QFIT que fornece a informação sobre quantos átomos do ligante se encaixam no modelo farmacofórico (UNITY MANUAL, 2011). As estruturas com abalho melhor valor de QFIT são selecionadas e novamente filtradas com um valor QFIT reduzido.

Ao obter-se um número aproximadamente 120 estrutrass, realizou-se o Docking das mesmas. A análise dos resultados para classificação, a mais prevalente de cada ligante foi escolhida e selecionada por meio da função GOLDScore.

Vista as diferentes funções de ranqueamento implementadas nos programas utilizados, estabeleceu-se uma metodologia de análise por consenso para seleção dos compostos. Assim, avaliou-se em conjunto cada pose selecionada de cada ligante e uma inspeção visual de complementaridade com tanto com o sítio ativo da proteína, como, também, com o modelo farmacofórico no programa PyMol 0.99rc6, a fim de selecionar as moléculas mais promissoras.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. Resultados e Discussão

4.1. Polimorfismo Enzimático

O polimorfismo teve sua definição apresentada por FORD em 1955: “ocorrência simultânea em um mesmo local, de duas ou mais formas descontínuas de uma espécie. Isso ocorre em tal proporção, que a mais incomum dentre elas não possa ser mantida” (FORD, 1955).

Os estudos de polimorfismo são bastante importantes para o desenvolvimento de novos fármacos. Por meio deles podemos obter informações estruturais valiosas de pequenas diferenças nas sequências de aminoácidos. Esses dados podem explicar porque, por exemplo, algumas espécies são susceptíveis a um composto X que atua em uma enzima, enquanto outras espécies não o são, sendo que o mecanismo de ação é o mesmo. Tais informações podem ajudar no desenvolvimento de fármacos específicos. (BAILLIE, 2011)

Um levantamento de sobre a as estruturas de DHFR depositadas no *Protein Data Bank* (PDB) foi realizado para avaliar o quanto é estudada essa enzima, e consequentemente sua importância no panorama científico atual. Para que fossem contabilizadas as estruturas da enzima DHFR foi feita uma busca no banco de dados com a palavra-chave “dihydrofolate reductase” (PDB, 2017). Neste estudo verificou-se que existem 432 estruturas depositadas no PDB, sendo a maioria delas obtidas por cristalografia de raio-X (96,5%). O que chama a atenção é que mais de 50% das estruturas depositadas, são posteriores ao ano de 2010, o que demonstra a atualidade e importância dos estudos dessa enzima (BERMAN, 2000).

Com os dados obtidos no próprio banco de dados, buscou-se entender a periodicidade dos depósitos. (Gráfico 1). Assim, observou-se que o período entre 2010-2105 foram depositadas 42% das estruturas de DHFR no PDB, se destacando entre os outros períodos. Outra prevalência nítida observada, foi quando os grupos taxonômicos, tendo o Reino Bactéria com uma prevalência de 59% e o Eucariota com 40% e somente 1% para os vírus.

Gráfico 1. Levantamento dos cristais de di-hidrofolato redutase presentes no banco de dados do PDB de acordo com o seu ano de depósito e taxonomia.

Das 432 estruturas presentes no PDB, apenas 28 são provenientes (6.5%), mesmo que expressadas em outros organismos, sendo prevalente a DHFR de *Plasmodium sp.* (18 estruturas) e apenas uma estrutura é de *S. mansoni*, o que sugere a inovação em buscar moléculas seletivas para esse alvo.

Após a obtenção da sequência FASTA da enzima DHFR humana (figura 12) PDB: 2W3A, a mesma foi utilizada para a realização do BLAST que nos forneceu as estruturas semelhantes a mesma.

```
>2W3A:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE
MVGSLNCIVAVSQNMIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSREL
KEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLL
PEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND
```

Figura 12. Sequência FASTA da enzima humana 2W3A, com a qual foi realizado o BLAST.

Dentre as enzimas indicadas como semelhantes, confirmamos a presença do nosso alvo a DHFR de *S. mansoni*, com 39% de semelhança com a enzima humana, e também de outros parasitas (Tabela 2). De modo a avaliar os pontos de polimorfismo estrutural da DFRH em diversos organismos, as sequências FASTA foram alinhadas no

programa BioEdit. Visto o quando número de estruturas a serem comparadas, selecionamos estruturas com identidade a partir de 30% (SACCONNAY, 2014) e dentre as estruturas encontradas, alinhemos estruturas de 6 espécies diferentes (figura 13).

Tabela 2. Cristais escolhidos para o alinhamento das sequências primárias

PDB	Resolução	Organismo	Identidade
2W3A	1,5Å	<i>Homo sapiens</i>	100%
3VCO	1,95Å	<i>Schistosoma mansoni</i>	39%
4ECK	3,52Å	<i>Toxoplasma gondii</i>	34%
3INV	2,37Å	<i>Trypanosoma cruzi</i>	32%
3RG9	2,0Å	<i>Trypanosoma brucei</i>	32%
4M2X	2,26Å	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	31%
3QGT	2,3Å	<i>Plasmodium falciparum</i>	30%

			
		10 20 30 40 50	
2W3A:A	PDB	-----M VG-----SLN C I V A V S Q N M G I G K N G D L P W P	
3VCO:A	PDB	-----M G S S H H H H H S S G L V P R G S H M R L N V V A S E N W G I G K G G G P W K	
4ECK:A	PDB	-M Q K P V C L V V A M T P K-----R G I G I N N G L P W P	
3INV:A	PDB	-M S L F K I R---M P E T V A E G T R L A L R A F S V V A V D E H G G I G D G R S I P W N	
3RG9:A	PDB	M L S L T R I L R K K I P V H E L A G K I S R P P L R P F S V V A S D E K G G I G D G G T I P W E	
4M2X:A	PDB	-----G S H M V G I W A Q A T S G V I G R G G D I P W R	
3QGT:A	PDB	-M M E Q V C D V F D I Y A I C A C C K V E S K N E G K K N V F N N Y T F R G L G N K G V L P W K	
			
		60 70 80 90 100	
2W3A:A	PDB	PL R I E F I Y F Q R M T T S S V E-----G K Q	
3VCO:A	PDB	-I K I D M I F F K T V T K A H P-----G L K	
4ECK:A	PDB	H L T I D F I H F S R V T K T P E E A S R L N G W L P R K F A--K T G D S G L P S P S V G K R F	
3INV:A	PDB	-V P I D M I F F R D L T T K L R G K N V K-----P S P A K R	
3RG9:A	PDB	-I P I D M O Y F R R V T T N L R G K N V K-----P S P S K R	
4M2X:A	PDB	-L P I D Q A H F R E I T-----M G	
3QGT:A	PDB	C N S I D M I Y F C A V T T Y V N E S K Y E K L Y K R C K Y L N K E T V D N V N D M P N S K K L Q	
			
		110 120 130 140 150	
2W3A:A	PDB	N L V I M G K I T V F S I P K N R P L K G R I N L V L S R E L K E P P Q G A H-----	
3VCO:A	PDB	N A V V M G R I T V E S I P S F K P L K D R I N I V V S S T L S H A P S F V Q-----	
4ECK:A	PDB	N A V V M G R I T V E S M P K F R P L V D R L N I V V S S S L K E E D I A A E K P Q A-----E	
3INV:A	PDB	N A V V M G R I T V D S I P K F R P L P G R L N V V L S S T L T T Q H L L D G L P D E E K R N L H	
3RG9:A	PDB	N A V V M G R I T V D S L P K F R P L S N R L N V V L S R S A T K E Q L L A G I P D P I K R A E A	
4M2X:A	PDB	H T I V M G R I T V D S L P K V R P L P G R R N V V L S R Q A D F M A S G A E-----	
3QGT:A	PDB	N V V V M G R I S V E S I P K F K P L S N R I N V I L S R T L K K E D F D E D-----	

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      160      170      180      190      200
2W3A:A|PDB  ----FLSRS LDDALKLTEQ PELANKVDMV WIVGGSSVYI EAMNHPGH-L
3VCO:A|PDB  ----VVP-S LNAAIDLLYN EEFSSIVDEV FIIIGYRIYI EALKQSIYPV
4ECK:A|PDB  GQQRVRVCAS LPAALSLLEE -EYKDSVDQI FVVGAGIYI AALSLGVA-S
3INV:A|PDB  ADSIVAVNGG LEQALRLLAS PNYTPSIETV YCIIGGSVYI EALRPPCVHL
3RG9:A|PDB  ANDVAVNGG LEDALRMLVS KEHTSSIETV FCIIGGTIYI QALCAPCVNV
4M2X:A|PDB  ----VVGSL LEEAL----- --TSPET WVIIGGQVYI LALP-----
3QGT:A|PDB  ----VYIINK VEDLIVLLG- ---KLNYYKC FIIIGSVYI EFLEKKLI-K

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      210      220      230      240      250
2W3A:A|PDB  KLFVTRIMQ- --DFESDTFF PEIDLEKYKL LP-----
3VCO:A|PDB  RIYCTHILS- --EVDCDTYF PKVDWDKLLK V-----
4ECK:A|PDB  HLYITRVAR- --EFPCDVFF PAFPGDDILS NKSTAAQAAA PAESVFPVFC
3INV:A|PDB  LQAIYRTTIR ASESSCSVFF RVPESGTEAA AG-----
3RG9:A|PDB  LQAIHRTVVR PASNSCSVFF DIPAAGTKTP EG-----
4M2X:A|PDB  --YATRCEV- ---TEVDIGL PREAGDALAP VLD-----
3QGT:A|PDB  KIYFTRINS- --TYECDVFF PEINENEYQI ISVSDVYTSN NTTLDFIY-

```

Figura 13. Alinhamento das estruturas primárias baseada na estrutura 2W3A. Em letras vermelhas os resíduos correspondentes ao sítio ativo do *Schistosoma mansoni*. E nos retângulos vermelhos os resíduos correspondentes às outras espécies.

Com base nessas informações pode-se verificar as principais diferenças entre as estruturas, e que quando levamos em consideração o sítio ativo, esse se conserva em quase todas as sequências estudadas, como se pode ver de maneira mais sucinta na tabela 3 abaixo:

Tabela 3: Tabela ilustrando os aminoácidos do sítio ativo de *S. mansoni* e seus respectivos aminoácidos alinhados nas demais espécies

2W3A	I-7	V-8	A-9	P-23	W-24	P-25	E-30	F-31	Y-33	F-34	T-56	I-60	P-61
3VCO	V-6	V-7	A-8	P-22	W-23	K-24	D-28	M-29	F-31	F-32	T-53	I-57	P-58
4ECK	-	-	-	P-24	W-25	P-26	D-31	F-32	H-34	F-35	T-83	M-87	P-88
3INV	V-26	V-27	A-28	P-42	W-43	N-44	D-48	M-49	F-51	F-52	T-80	I-84	P-85
3RG9	V-32	V-33	A-34	P-48	W-49	E-50	D-54	M-55	Y-57	F-58	T-86	L-90	P-91
4M2X	I-5	W-6	A-7	P-21	W-22	R-23	D-27	Q-28	H-30	F-31	T-46	L-50	P-51
3QGT	V-31	F-32	N-33	P-47	W-48	K-49	D-54	M-55	Y-57	F-58	S-108	I-112	P-113

Essa análise nos proporcionou obter informações específicas para os resíduos de aminoácido do sítio ativo, assim verificou-se que os polimorfismos referentes à enzima do *S. mansoni*, nos permite buscar seletividade na busca de inibidores.

Uma observação interessante é que o aminoácido valina (V-6) de *S. mansonii*, que é um aminoácido de cadeia lateral hidrofóbica, tem características físico-químicas semelhantes nas demais espécies. Para esse resíduo a variação se dá apenas variação para enzima humana (2W3A) e de *Mycobacterium tuberculosis* (4M2X) que no caso para ambos é uma isoleucina. Para o aminoácido V-7 do *S. mansonii*, as variações são observadas para *Mycobacterium tuberculosis* (4M2X), que é um triptofano, e da enzima de *Plasmodium falciparum* (3QGT), que no caso é uma fenilalanina. O resíduo aminoácido A-8 de *S. mansonii*, a característica físico-química é conservada em quase todas as espécies, sendo alanina para todos os organismos com exceção do *Plasmodium falciparum* (3QGT) apresenta uma asparagina, um aminoácido com uma cadeia lateral polar não carregada.

Para o resíduo de aminoácido K-24 de *S. mansonii*, que é um aminoácido de cadeia lateral polar carregada positivamente, temos essa característica físico-química conservada apenas em *Plasmodium falciparum* (3QGT), que também apresenta um K. Já na sua estrutura e em *Mycobacterium tuberculosis* (4M2X) no qual temos uma arginina, na enzima humana (2W3A) e em *Toxoplasma gondii* (4ECK) prolina; em *Trypanosoma cruzi* (3INV) asparagina; em *Trypanosoma brucei* (3RG9), ácido glutâmico, demonstrando que neste ponto temos uma grande variação entre os organismos.

O resíduo D-28 de *S. mansonii*, que é um aminoácido de cadeia lateral carregada negativamente, a variação foi observada apenas para a enzima humana (2W3A) que apresenta é um ácido glutâmico.

Para o aminoácido M-29 de *S. mansonii*, que é um aminoácido de cadeia lateral hidrofóbica, a característica físico-química é conservada em quase todas as espécies a única exceção é o da enzima de *Mycobacterium tuberculosis* (4M2X) no qual temos uma glutamina, um aminoácido de cadeia lateral polar não carregada. Nas demais espécies há a conservação da característica físico química, mudando apenas o tamanho dos aminoácidos, como foi o caso da fenilalanina na enzima humana (2W3A) e em *Toxoplasma gondii* (4ECK).

Um resíduo que não se conserva, juntamente com suas características físico-químicas é o aminoácido F-31 de *S. mansonii*, sendo conservada apenas em *Trypanosoma cruzi* (3INV). Na enzima humana (2W3A), *Trypanosoma brucei* (3RG9) e

em *Plasmodium falciparum* (3QGT) temos a presença da tirosina um aminoácido de cadeia lateral polar não carregada. E na enzima *Toxoplasma gondii* (4ECK) e *Mycobacterium tuberculosis* (4M2X) temos a presença da histidina, um aminoácido de cadeia lateral polar carregada positivamente.

Para T-53 de *S. mansoni*, que é um aminoácido de cadeia lateral polar não carregada, não há variação na característica físico-química nas demais espécies, mas sim apenas variação no tamanho do aminoácido da enzima de *Plasmodium falciparum* (3QGT), que no caso é uma serina. Já para o aminoácido I-57 de *S. mansoni*, que é um aminoácido de cadeia lateral hidrofóbica, não há variação na característica físico-química nas demais espécies, mas sim apenas variação no tamanho do aminoácido da enzima de *Mycobacterium tuberculosis* (4M2X) e *Trypanosoma brucei* (3RG9), que é uma leucina, e da enzima de *Toxoplasma gondii* (4ECK), que no caso é uma metionina.

Tais análises corroboraram com estudos de campos de interação moleculares realizados para a obtenção do modelo farmacofórico.

4.2 Campos de Interação Molecular – MIF

A determinação dos campos de interação molecular (do inglês, *MIF - Molecular Interactions Fields*) é de suma importância para a avaliação e entendimento das características físico-químicas, indicando regiões favoráveis ou desfavoráveis para certas propriedades e inferindo, assim, as diferenças consideráveis entre enzimas homologas em diferentes espécies. A partir das informações obtidas por meio destes campos, pode-se sugerir pontos de complementariedade entre a enzima alvo e um ligante, ou mesmo seletividade em relação a outra enzima homologa. Deste modo, os MIFs podem ser utilizadas na busca inibidores com complementaridade molecular, os quais devem apresentar características farmacodinâmicas adequadas para inibição da enzima alvo, e neste contexto serem explorados no desenvolvimento de um novo fármaco (SANDERS, et al. 2012).

Assim, o cálculo e análise do MIF se apresenta como uma ferramenta poderosa na geração de informações valiosas sobre esse complexo, ligante-receptor (ROCHA et al. 2010; FERREIRA, 2011). Essa análise, permite a identificação de possíveis pontos

favoráveis à interação ligante-receptor de acordo com a propriedade específica avaliada, tais como hidrofiliicidade, hidrofobicidade, doadores e aceptores de ligação de hidrogênio (ROCHA et al. 2010; FERREIRA, 2011; FREITAS, 2010).

Dessa forma foram realizadas análises de MIFs com base em estudo preliminar de dinâmica molecular (DM), realizado em colaboração com o Professor Marcelo Castilho (UFBA). Os estudos de DM geraram três clusters para o posicionamento dos resíduos do sítio ativo da SmDHFR. É importante ressaltar que os cluster foram definidos por apresentarem maior densidade populacional de posicionamento dos resíduos (MARTINS, 2016).

Para a geração e estudo dos MIF utilizamos os campos gerados para a enzima humana (2W3A), em comparação os campos gerados nos três clusters. No entanto, dentre os três clusters, o cluster 1 foi o que apresentou maior relevância visto sua densidade populacional, como ilustra a figura cedida pelo professor Marcelo Castilho (figura 14), e por esse motivo foi o que foi utilizado para a apresentação dos mapas.

Figura 14. Agrupamentos conformacionais (2 Å) observados durante a fase produtiva da dinâmica molecular. O agrupamento 1 está presente em 46,7% do tempo; o agrupamento 2, 29,4% e o agrupamento 3, em 9,6%. Imagem realizada e cedida pelo professor Marcelo Castilho.

De modo fidedigno, foi feito uma comparação entre a DHFR humana e a DHFR do *S. mansoni* e o cluster mais representativo da DM da DHFR do *S. mansoni*, cluster 1, a fim de se obter um modelo farmacofórico com pontos mais específicos possíveis para

a enzima parasitária, assim podem buscar compostos mais seletivos na etapa de Triagem Virtual.

Antes de realizarmos a análise dos MIF, e com base na análise de polimorfismo realizada previamente realizou-se uma análise comparativa apenas da estrutura primária (sequencia FASTA) da DHFR humana e parasitária, no programa de alinhamento o BioEdit (figura 15) para que fosse possível ver os aminoácidos coincidentes em ambas estruturas. E, desses aminoácidos coincidentes podemos ressaltar os que são específicos do sítio ativo (Tabela 4). Essa identidade sequencial da enzima do parasita com a enzima humana nos irá nortear em relação a escolha, quando possível, de aminoácidos específicos para o parasita.

```

SmDHFR      LNVVVASENWGIGKGGGLPWK-IKKDMEFFKTVTTKAH-PGLKNAVVMGRVTWESIPES
LN  VAVS N GIGK G LPW          F  TT      G  N V MG  TW SIPE
HsDHFR      LNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEK

SmDHFR      FKPLKDRINIVVSSTLSHAPSFVQVVP-SLNAAIDLLYNEEFSSIVDEVFIIGGYRLYKE
      PLK RIN V S  L  P          SL  A  L  E  VD V I GG  YKE
HsDHFR      NRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSVYKE

HsDHFR      ALKQSIYPVRIYCTHILSEVDCDTYFPKVDWDKLKKV-DLPDIPADTFTENGFTFKFCVY
      A          T I      DT FP D K K      P  D  E G  KF VY
HsDHFR      AMNHPGH-LKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVY

```

Figura 15. Alinhamento da estrutura primária da enzima parasitária (*SmDHFR*, PDB: 3VCO) e humana (*HsDHFR*, PDB: 2W3A). Em *itálico*, aminoácidos da *SmDHFR*; em cinza aminoácidos da *HsDHFR*, em **negrito**, aminoácidos coincidentes.

Tabela 4: Aminoácidos do sítio ativo de *S. mansoni* comparados com o correspondente humano pelo alinhamento.

3VCO	V-6	V-7	A-8	P-22	W-23	K-24	D-28	M-29	F-31	F-32	T-53	I-57	P-58
2W3A	I-7	V-8	A- 9	P- 23	W-24	P-25	E-30	F-31	Y-33	F-34	T-56	I-60	P-61

A análise dos MIF foi realizada utilizando o programa GRID, no qual várias sondas com diferentes características foram utilizadas. Tais sondas são divididas de acordo com suas características físico-químicas a saber: (PASTOR et al., 2000):

- H₂O: hidrofílica

- Dry: hidrofóbica
- C3: hidrofóbica
- N+: acceptor
- N1: doador
- O:: acceptor
- COO-Ar.: doador e acceptor
- COO-: doador e acceptor
- H: acceptor

Após a geração dos campos de interação molecular, realizou-se análise visual para determinação de quais sondas apresentavam maior ou menor influências nas características estruturais da *SmDHFR* em relação a enzima humana. Observou-se que apenas três das nove sondas calculadas eram representativas para comparação entre as duas enzimas, sendo elas C3, N+ e N1. Estas sondas foram selecionadas por sugerirem diferenças significativas entre as características físico-químicas e complementaridade com os resíduos presentes na proteína de *S. mansoni* em relação a humana, o que nos proporciona condições para busca de ligantes seletivos. Para essas sondas realizou-se uma análise minuciosa, a fim de melhor entendimento da complementaridade entre as regiões do sítio ativo e um possível ligante.

4.2.1. Sonda C3

A sonda C3 é a sonda metil carbono sp^3 que busca regiões susceptíveis à ligação hidrofóbicas. A figura 16 apresenta as estruturas das proteínas de *S. mansoni* (verde) e humana (vermelho) e os campos de interação referentes a sonda C3 em roxo e azul, respectivamente. Podemos observar, a intensidade de campos em roxo na região dos resíduos ALA-8, LEU-21, MET-29, PHE-61 e TYR-114, sugerindo hidrofobicidade, e possíveis interações deste tipo. As demais regiões hidrofóbicas sugeridas, não são exclusivas para a enzima do parasita, ou se encontram distantes do local de interação de um possível inibidor que atue por mecanismo competitivo pelo substrato, não apresentando relevância na para interação de possíveis ligantes.

Figura 16. Representação dos campos de interação molecular provenientes da sonda C3; A) estrutura da SmDHFR (verde) e campos C3 em roxo; B) estrutura da HsDHFR (vermelho) e campos C3 em azul.

A partir dessa análise, foi possível determinar as regiões as quais sugerimos como pontos importantes para o nosso modelo farmacofórico, ressaltadas na figura 17 com duas esferas amarelas.

Sonda utilizada: C3

Figura 17. Estrutura *SmDHFR* com os pontos de seletividade hidrofóbica em relação a *HsDHFR* (em amarelo).

4.2.2. Sonda N+

A sonda N+ é a sonda Nitrogênio do grupo amina com par de elétrons livre que busca regiões aceptoras a ligações de hidrogênios. A figura 18 apresentas as estruturas das proteínas de *S. mansoni* (verde) e humana (vermelho) e os campos de interação referentes a sonda N+ em roxo e azul, respectivamente. Podemos observar, a intensidade de campos em roxo na região do resíduo ASP-28, sugerindo acepção de ligação de hidrogênio, e possíveis interações deste tipo. As demais regiões aceptoras sugeridas, não são exclusivas para a enzima do parasita, ou se encontram distantes do local de interação de um possível inibidor que atue por mecanismo competitivo pelo substrato, não apresentando relevância na para interação de possíveis ligantes.

Figura 18. Representação dos campos de interação molecular provenientes da sonda N⁺; A) estrutura da *SmDHFR* (verde) e campos N⁺ em roxo; B) estrutura da *HsDHFR* (vermelho) e campos N⁺ em azul.

A partir dessa análise, foi possível determinar as regiões as quais sugerimos como pontos importantes para o nosso modelo farmacofórico, ressaltadas na figura 19 com uma esfera azul.

Sonda utilizada: N⁺

Figura 19. Estrutura *SmDHFR* com os pontos de seletividade hidrofóbica em relação a *HsDHFR* (em azul).

4.2.3 Sonda N1

A sonda N1 que é uma sonda de Nitrogênio do grupo amida que busca regiões doadoras de ligações de hidrogênio. A figura 20 apresenta as estruturas das proteínas de *S. mansoni* (verde) e humana (vermelho) e os campos de interação referentes a sonda N1 em roxo e azul, respectivamente. Podemos observar, a intensidade de campos em roxo na região dos resíduos LYS-33, THR36 e TYR-114, sugerindo doação de ligação de hidrogênio, e possíveis interações deste tipo. As demais regiões doadoras sugeridas, não são exclusivas para a enzima do parasita, ou se encontram distantes do local de interação de um possível inibidor que atue por mecanismo competitivo pelo substrato, não apresentando relevância na para interação de possíveis ligantes.

Figura 20. Representação dos campos de interação molecular provenientes da sonda N1; A) estrutura da *SmDHFR* (verde) e campos N1 em roxo; B) estrutura da *HsDHFR* (vermelho) e campos N1 em azul.

A partir dessa análise, foi possível determinar as regiões as quais sugerimos como pontos importantes para o nosso modelo farmacofórico, ressaltadas na figura 21 com duas esferas vermelhas.

Sonda utilizada: N1

Figura 21. Estrutura SmDHFR com os pontos de seletividade hidrofóbica em relação a HsDHFR (em vermelho).

Sabendo que a construção de um modelo farmacofórico deve ser realizada utilizando informações confiáveis, de modo a conferir segurança e robustez na busca de ligantes candidatos a inibidores da enzima alvo (GUIDO, OLIVA, ANDRICOPULO, 2012). Assim, para a escolha de cada um dos pontos a serem utilizados na construção do modelo farmacofórico, além de nos basear nos MIF's fornecidos pelo programa GRID, buscamos equacionar regiões nas quais, na medida do possível, os resíduos de aminoácidos sejam diferentes. Além de levar em consideração a os MIFs, a análise de polimorfismo também nos ajudou a determinar os pontos a serem empregados no modelo farmacofórico. A união de mais de uma estratégia computacional para a construção do modelo, nos permite aferir mais consistência e robustez na determinação dos pontos do modelo farmacofórico, favorecendo a busca de ligantes promissores. Essas estruturas, depois de alinhadas, nos permitiram, com maior clareza, ver qual aminoácido da enzima do parasita escolhido como referência corresponde na enzima humana. Figura 22.

SmDHFR	LN V V V A V S E N W G I G K G G L P W K - I K K D M E F F K T V T K A H - P G L K N A V V M G R V T W E S I P E S
	LN + V A V S + N G I G K G L P W ++ + + F + + T T + G + N V + M G + T W S I P E
HsDHFR	L N C I V A V S Q N M G I G K N G D L P W P P L R N E F R Y F Q R M T T S S V E G K Q N L V I M G K K T W F S I P E K
SmDHFR	F K P L K D R I N I V S S T L S H A P S F V Q V V P - S L N A A I D L L Y N E E F S S I V D E V F I I G G Y R L Y K E
	+ P L K R I N + V + S L P + S L + A + L E + + V D V + I + G G + Y K E
HsDHFR	N R P L K G R I N L V L S R E L K E P P Q G A H F L S R S L D D A L K L T E Q P E L A N K V D M V W I V G G S V Y K E
HsDHFR	A L K Q S I Y P V R I Y C T H I L S E V D C D T Y F P K V D W D K L K K V - D L P D I P A D T F T E N G F T F K F C V Y
	A + + + + + T I + + + D T + F P + + D + K K + + P + + D E G + K F V Y
HsDHFR	A M N H P G H - L K L F V T R I M Q D F E S D T F F P E I D L E K Y K L L P E Y P G V L S D V Q E E K G I K Y K F E V Y

Figura 22. Alinhamento da estrutura primária da enzima parasitária (*SmDHFR*) e humana (*HsDHFR*). Em vermelho os aminoácidos levados em consideração para a construção do modelo farmacofórico e seu correspondente humano destacado em cinza e vermelho.

Assim, determinamos os pontos de nosso modelo farmacofórico final o qual é constituído por dois pontos favoráveis a ligações hidrofóbicas, dois pontos favoráveis à doação de ligações de hidrogênio, e um ponto favorável a ser acceptor de ligação de hidrogênio, conforme a figura 23.

- Sondas utilizadas:

- C3
- N+
- N1

Figura 23. Modelo farmacofórico final contendo dois pontos favoráveis ligações hidrofóbicas (amarelo), dois pontos favoráveis à doadores de ligação de hidrogênio (vermelho), e um ponto favorável a serceptor de ligação de hidrogênio (azul), e as respectivas distâncias entre eles.

4.3. Triagem Virtual

Na busca de inibidores potentes e seletivos para a DHFR de *Schistosoma mansoni*, efetuou-se a triagem virtual. Como dito anteriormente, essa é uma ferramenta computacional poderosa capaz de auxiliar na identificação de novos *hits* de grandes bibliotecas de compostos químicos (EKINS, 2016). A triagem virtual em cinco etapas, como descrito na metodologia, sendo elas: preparação do banco de dados de compostos; filtro 1: filtro baseado nas propriedades físico-químicas; filtro 2 – filtro farmacofórico; docagem molecular; e análise de consenso entre as funções de ranqueamento e a análise visual.

A banco de dados utilizado foi o ZINC, em seus subconjuntos *all purchasable*, *all boutique* do banco de dados ZINC (IRWIN et al, 2012; STERLING, 2015), os quais contem aproximadamente 35 milhões de compostos (34.942.457 compostos). Após

obter as estruturas do banco de dados e realizar a conversão para o formato tridimensional, o mesmo foi empregado na triagem virtual.

O primeiro filtro, físico-químico, foi empregado de modo que propriedades físico-químicas representassem o espaço *drug-like* do banco de dados (número de HBD entre 0 e 5, número de HBA entre 0 e 10 e logaritmo do coeficiente de partição octanol/água (logP) entre 1 e 5) (LIPINSKI, 2000, 2004 e 2016), mantendo no máximo 1 grupo nitro para evitar toxicidade dos compostos e carga formal entre -2 e 2 para evitar grandes problemas de permeabilidade celular e massa molecular acima de 500 Da. Em relação à massa molecular adequada para a cavidade dos possíveis ligantes, nos baseamos nas massas moleculares de TOP (290,32 Da), MTX (454,44 Da) e PYR (248,71 Da), inibidores já conhecidos da DHFR e na massa molecular do seu ligante natural o DHF (443.414 Da). Após a aplicação do primeiro filtro no banco de 35 milhões de compostos, foram obtidos 9916 compostos que correspondiam às características desejadas.

O filtro farmacofórico, foi o segundo a ser empregado. Nesta etapa utilizados o modelo farmacofórico construído no programa UNITY implementado no pacote computacional SYBYL X 2.1 (LEACH et al. 2000). Assim, os 9916 compostos previamente selecionados, foram novamente filtrados avaliando sua complementariedade com o modelo farmacofórico. No entanto nesta filtragem, o UNITY não encontrou nenhum composto. (Figura 24).

Optou-se, então, por fazer uma nova triagem virtual. Desta vez foi aplicado o filtro físico-químico, pois assumimos que essas propriedades poderiam ser avaliadas após a seleção dos ligantes. Assim, foi aplicado diretamente ao banco de dados de 35 milhões de compostos no modelo farmacofórico no programa UNITY implementado no pacote computacional SYBYL X 2.1. Ao final desta triagem, foram selecionados 6834 compostos (Figura 24), os quais seguiram para as próximas etapas.

Figura 24: Protocolo de triagem virtual realizado e o número de compostos obtido em cada etapa de filtragem.

A função matemática de ranqueamento do programa UNITY, é o QFIT, que pode ser utilizada para qualificar os compostos encontrados, quanto a sua afinidade pelo modelo farmacofórico. O QFIT fornece a informação sobre quantos átomos do ligante se encaixam no modelo farmacofórico. Sendo assim, quanto maior o QFIT, maior a probabilidade do ligante se ligar. (UNITY MANUAL, 2011)

A partir desses 6834 compostos encontrados, com o próprio programa UNITY, baseando-se no QFIT, uma filtragem gradativa foi feita para reduzir o número de possíveis ligantes. A triagem foi feita de maneira gradual, elevando, de 5 em 5 unidades o valor do QFIT, de $10 < \text{QFIT} > 100$ até $30 < \text{QFIT} > 100$. A cada etapa foi realizada uma triagem virtual das estruturas. Assim, chegamos a 120 moléculas promissoras, as quais foram submetidas a estudos de docking e posterior inspeção visual. (Figura 25).

Figura 25: Esquema da triagem virtual: realizada de maneira gradual, elevando, de 5 em 5 unidades o valor do QFIT até a análise consensual que nos levou a 20 compostos

Ressaltamos que a triagem por modelo farmacofórico foi realizada utilizando a busca flexível dos ligantes e tendo por base o aminoácido ASP-28.

O ASP-28 foi escolhido pois corresponde, na enzima humana a um ponto de interação importante com o ligante. Após esta etapa, simulações de acoplamento molecular foram realizadas utilizando o programa GOLD 5.2, sendo realizado a metodologia de *cross-docking* como validação do modelo. Este foi realizado com a trimetoprima (TOP), retirada do cristal da enzima humana 2W3A e posteriormente docada em relação a cada um dos resíduos escolhidos do modelo farmacofórico com três diferentes tamanhos de raio, 5, 8 e 10Å. Dos resíduos, o que mostrou melhor sobreposição da trimetoprima no sítio ativo da enzima humana foi ele, com um raio de 8Å. (figura 26)

Figura 26: Validação por *cross-docking*. Em verde a enzima do parasita com a TOP docada em azul tendo por referência o ASP-28. Em vermelho a enzima do parasita com a TOP em magenta com a qual está cristalizada

Baseado na validação foram realizadas 30 rodadas independentes de algoritmo genético para cada um dos 120 ligantes. Essa simulação nos permitiu, a partir do ranqueamento de GoldScore selecionar as 50 melhores estruturas pontuadas. Posteriormente por meio de uma análise visual da interação das estruturas com o modelo farmacofórico, pudemos selecionar as 20 melhores estruturas (Figura 27 e Tabela 5) as quais foram selecionadas e serão adquiridas para posterior teste biológico contra a enzima dihidrofolato redutase de *Schistosoma mansoni*.

Figura 27. Estruturas obtidas da triagem virtual que pós análise visual, podem interagir com a DHFR

Tabela 5. Estruturas que pós análise visual, podem interagir com a DHFR

ZINC2664277	ZINC2617118	ZINC2416356	ZINC3266417
ZINC02397902	ZINC00868951	ZINC00868919	ZINC03220260
ZINC2662602	ZINC00871230	ZINC06903123	ZINC02636656
ZINC02888532	ZINC08441580	ZINC02968603	ZINC03234187
ZINC00868895	ZINC02968435	ZINC00861009	ZINC02438059

Dentre as estruturas, merece especial menção a estrutura ZINC00868895 (Figura 28) e a estrutura ZINC00868919 (Figura 29), que foram as melhores ranqueadas. Tais estruturas ilustram os resultados obtidos.

Figura 28 Estrutura ZINC00868919

Figura 29: Estrutura ZINC00868919

5. CONCLUSÕES

5. Conclusões

Os estudos realizados nos permitiram analisar a enzima di-hidrofolato redutase de *Schistosoma mansoni*, em relação a enzima humana e de outros organismos, determinando que é possível utilizar características exclusivas da SmDHFR para a busca de ligantes seletivos.

Foram realizados os cálculos de campos de interação molecular (MIFs), os quais sugeriram informações importantes para determinar regiões favoráveis para seletividade para a SmDHFR em relação à HsDHF.

O modelo farmacofórico foi construído com base nas regiões seletivas para a SmDHFR, o qual foi composto por dois pontos favoráveis ligações hidrofóbicas, dois pontos favoráveis à doadores de ligação de hidrogênio, e um ponto favorável a ser acceptor de ligação de hidrogênio.

Em um primeiro momento a estratégia de triagem virtual não resultou na seleção de compostos, provavelmente devido ao grande corte realizado pelo filtro físico-químico.

Ao excluir o filtro físico-químico, utilizando apenas o filtro farmacofórico e o docking, foi possível selecionar 20 estruturas com características desejadas para atividade inibitório da SmDHFR e candidatos a esquistossomicidas.

Os compostos selecionados serão adquiridos para posterior teste biológico contra a enzima di-hidrofolato redutase de *Schistosoma mansoni*

6. REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABDUL-GHANI, R.; LOUTFY, N.; SAHN, A. E.; HASSAN, A. Current chemotherapy arsenal for *Schistosomiasis mansoni*: alternatives and challenges. **Parasitol Res**, v. 104, p. 955-965, 2009.

ABOU-EL-NAGA, I., F. Biomphalaria alexandrina in Egypt: Past, present and future – 2013

BAILLIE, A., T. e RETTIE, A. E. Role of biotransformation in drug-induced toxicity: Influence of intra – and inter-species differences in drug metabolism. **Drug Metab. Pharmacokinet**, 26 (1) 15-29, 2011

BARREIRO, E. J. et al. Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. **Química Nova**, v. 20, p. 1-11, 1997.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: as bases moleculares da terapêutica**. Porto Alegre: Artmed, 2008.

BERMAN, H., M., WESTBROOK, J., FENG, Z., GILLILAND, G., BHAT, T. N., WEISSIG, H., SHINDYALOV, I., N., BOURNE, P., E. **The Protein Data Bank** Nucleic Acids Research, 28: 235-242. www.rcsb.org, 2000

CAFFREY, C. R, ROHWER, A, OELLIEN, F, MARHÖFER R. J., BRASCHI, S., OLIVEIRA, G., eT al. (2009) A Comparative Chemogenomics Strategy to Predict Potential Drug Targets in the Metazoan Pathogen, *Schistosoma mansoni*. **PLoS ONE** 4(2): e4413.

CAROSATI, E.; SCIABOLA, S.; CRUCIANI, G. Hydrogen Bonding Interactions of Covalently Bonded Fluorine Atoms: from crystallographic data to a new angular function in the GRID force field. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, p. 5114-5125, 2004.

CIOLI, D, PICA-MATTOCCIA, L. Praziquantel. **Parasitol Res.** Jun;90 Supp 1: S3-9. Epub 2002

CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L., BASSO, A., GUIDI, A.; Schistosomiasis control: praziquantel forever? **Molecular and Biochemical Parasitology**. Pages 23–29, 2014

CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L., MORONI R.; Schistosomiasis control: praziquantel forever? **Experimental Parasitology** Volume 75, Issue 4 Pages 425-432, 1992

COCCO, L., ROTH, B., TEMPLE, C. JR., MONTGOMERY, J. A., LONDON, R. E., BLAKLEY, R. L. Protonated state of methotrexate, trimethoprim, and pyrimethamine bound to dihydrofolate reductase. **ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS**. Vol. 226, No. 2, October 15, pp. 567-577, 1983

CODY, V., LUFT, J. R., PANGBORN, W. Understanding the role of Leu22 variants in methotrexate resistance: comparison of wild-type and Leu22Arg variant mouse and human dihydrofolate reductase ternary Crystal complexes with methotrexate and NADPH. **Acta Crystallographica** Section D STRUCTURAL BIOLOGY, 2005. Pages: 147-155

COPELAND, R. A. Why enzymes as drug targets? In: COPELAND, R. A. (Ed) **Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists**. 2. ed. New Jersey:John Wiley & Sons, Inc., 2013. p. 1-5.

DE SOUZA, F. P. C.; VITORINO R. R.; COSTA, A. P.; JÚNIOR, F. C. F.; SANTANA, L. A.; GOMES, A. P. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural **Rev Bras Clin Med**. São Paulo, 2011 jul-ago;9(4):300-7.

DEELDER, A. M., MILLER, R. L., DE JONGE, N. e KRIJGER, F. W. Detection of

schistosome antigen in mummies. **The Lancet** pag. 724 - 725 1990.

DeMARCO, R.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. *Schistosomes* — proteomics studies for potential novel vaccines and drug targets. **Drug Discov. Today**, v. 14, n. 9/10, p. 472-478, 2009.

DNDI. **Drugs for Neglected Diseases initiative** 2015.

DOENHOFF, M., J.; CIOLI, D.; UTZINGER, J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**: December 2008 - Volume 21 - Issue 6 - p 659–667.

Drug Discovery. **Journal of Modern Medicinal Chemistry**, v. 2, p. 20-31, 2014.

EKINS, S.; LIEBLER, J.; NEVES, B. J.; LEWIS, W. G.; COFFEE, M.; BIENSTOCK, R.; SOUTHAN, C.; ANDRADE, C. H. Illustrating and Homology Modeling the Proteins of the Zika Virus. **F1000Research – Open for Science**, 2016

ELTAWIL, K. M., PLASSMANN, M. Theodor Maximillian Bilharz (1825-1862): the discoverer of schistosomiasis. **International Journal of Parasitology Research** pag: 17 - 25; 2011

FENWICK, A.; WEBSTER, J. P.; Schistosomiasis: challenges for control, treatment and drug resistance. **Current Opinion in Infectious Diseases**: December 2006 - Volume 19 - Issue 6 - p 577–582

FERREIRA, S., R., OLIVA, G., ANDRICOPULO, A. D. Integração das técnicas de triagem virtual e triagem biológica automatizada em alta escala: oportunidades e desafios em P&D de fármacos. **Quím. Nova** vol.34 no.10 São Paulo 2011

FERREIRA, L. G. et al. Comparative molecular field analysis of a series of inhibitors of

HIV-1 protease. **Med Chem**, v. 7, n. 2, p. 71-9, Mar 2011. ISSN 1875-6638

FERREIRA, L. G.; ANDRICOPULO, A. D. Medicinal Chemistry Approaches to Neglected Diseases, 2014

FORD, E. B., Polymorphism and taxonomy, **Heredity** v. 9, 255–264, 1955

FRANCO-PAREDES, C.; VON, A.; HIDRON, A.; RODRÍGUEZ-MORALES, A. J.; TELLEZ, I.; BARRAGÁN, M.; JONES, D.; NÁQUIRA, C. G.; MENDEZ, J. Chagas disease: an impediment in achieving the Millennium Development Goals in Latin America. **BMC Int. Health. Hum. Rights** v. 7, n. 7, 2007.

FREITAS, R. F.; BAUAB, R. L.; MONTANARI, C. A. Novel application of 2D and 3D-similarity searches to identify substrates among cytochrome P450 2C9, 2D6, and 3A4. **J Chem Inf Model**, v. 50, n. 1, p. 97-109, Jan 2010. ISSN 1549-960X.

GANGJEE, A.; JAIN, H. D.; KURUP, S. Anticancer Agents **Med. Chem.** 2007, 7, 524.

GASTEIGER, J. Chemoinformatics: a new field with a long tradition. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 384, p. 57-64, 2006.

GOODFORT, P. J. A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules, **J. Med. Chem.**, v. 28, p. 849-857, 1985.

GOODFORD, P. The Basic Principles of GRID, in Molecular Interaction Fields: Applications in Drug Discovery and ADME Prediction, **Volume 27 (ed G. Cruciani)**, **Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, FRG**, 2005

GRID. v22c. Molecular Discovery Ltd. 1998

GUIDO, R. V.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Planejamento de fármacos, biotecnologia, e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Química Nova**, v. 24, p. 81-98, 2010.

GUIDO, R. V.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Structure- and Ligand-based drug approaches for neglected tropical disease. **Pure and Applied Chemistry**, v. 84, p. 1857-1866, 2012.

HACIA, J. G., FAN, J. B., RYDER, O., JIN, L., EDGEMON, K., GHANDOUR, G., E BRODY, L. C. Determination of ancestral alleles for human single-nucleotide polymorphisms using high-density oligonucleotide arrays. **Nature genetics**, 22(2), 164-167, 1999.

HASSAN G. S., EL-MESSERY S. M., AL-OMARY F. A., AL-RASHOOD S. T., SHABAYEK M. I., ABULFADL Y. S., HABIB EL-SE, EL-HALLOUTY S. M., FAYAD W., MOHAMED K. M., EL-MENSHAWI B. S., EL-SUBBAGH H. I. (2013) Nonclassical antifolates, Part 4. 5-(2-aminothiazol-4-yl)-4-phenyl-4H-1,2,4-Triazole -3-thiols as a new class of DHFR inhibitors: synthesis, biological evaluation and molecular modeling study. **Eur J Med Chem** 66:135–145

INCT-IDN – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Inovação em Doenças Negligenciadas. Doenças Negligenciadas. Disponível em: <https://www.cdts.fiocruz.br/inct-idn/doencasNegligenciadas.php>

IRWIN, J. J. et al. ZINC: a free tool to discover chemistry for biology. **J Chem Inf Model**, v. 52, n. 7, p. 1757-68, Jul 2012. ISSN 1549-960X.

ITAI, A. et al. Computer-assisted new lead design In: COHEN, N. C. (ED.). **Guidebook on molecular modeling drug design**. San Diego: Academic Press, 1996. p. 100-101.

IUBMB Enzyme Nomenclature: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/5/1/3.html>

JAIN, A.N. Surflex-Dock 2.1: Robust performance from ligand energetic modeling, ring flexibility, and knowledge-based search. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, Volume 21, Issue 5, pp 281-306. 2007

KAPPAGODA, S. IONNIDIS, J. P. A. Neglected tropical diseases: survey and geometry of randomized evidences, **BJM: British Medical Journal**, v. 345, e6512, 2012.

KASTENHOLZ, M. A.; PASTOR, M.; ET AL. "GRID/CPCA: A new computational tool to design selective ligands". **J Med Chem**, 2000. 43(16): p. 3033-3034

KATZ, N. - Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde – FIOCRUZ, 2005

LAMBERTUCCI J. R., SILVA L. C. S., VOIETA I. Esquistossomose Mansônica. 44. In: Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**; 2005. p. 931-46.

LAPE M, ELAM C, PAULA S. Comparison of current docking tools for the simulation of inhibitor binding by the transmembrane domain of the sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase. **Biophysical chemistry**.;150(1-3):88-97, 2010.

LEACH, A. R.; BRYCE, R. A.; ROBINSON, A. J. Synergy between combinatorial chemistry and de novo design. **J Mol Graph Model**, v. 18, n. 4-5, p. 358-67, 526, 2000 Aug-Oct 2000. ISSN 1093-3263.

LIPINSKI, C. A. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor

permeability. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v. 44, n. 1, p. 235-49, 2000 Jul-Aug 2000. ISSN 1056-8719.

LIPINSKI, C. A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. **Drug Discov Today Technol**, v. 1, n. 4, p. 337-41, Dec 2004. ISSN 1740-6749.

LIPINSKI, C. A. Rule of five in 2015 and beyond: Target and ligand structural limitations, ligand chemistry structure and drug discovery project decisions. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 101, p. 34-41, Jun 2016. ISSN 1872-8294.

LIU, R., DONG, H., GUO, Y., ZHAO, Q., E JIANG, M.; Efficacy of praziquantel and artemisinin derivatives for the treatment and prevention of human schistosomiasis: a systematic review and meta-analysis. **Parasites & Vectors** 2011.

MAGALHÃES, S., C. Algoritmos genéticos para o problema de Docking Proteína-Ligante. 2006. 243f. **Tese (Doutorado em Modelagem Computacional)** – Laboratório Nacional de Computação Científica, Rio de Janeiro, 2006.

MARTIN, R. L.; GARDINER, E. J.; SENGHER, S.; GILLET, V. J., Compression of Molecular Interaction Fields Using Wavelet Thumbnails: Application to Molecular Alignment, **J. Chem. Inf. Model.** v. 52, p. 757-769, 2012.

MARTINS, J. P. M.; FERREIRA, G.M.; CASTILHO, M. S., TELES, A. L. B., TROSSINI, G.H.G.. Construção do Farmacóforo da enzima Di-hidrofolato redutase de *Schistosoma mansoni*. **Poster, 39a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química: Criar e Empreender**, 2016

MILAN E. P., KEIM L. S., Esquistossomíase mansônica. Rotinas de diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias. 2a ed. São Paulo: **Atheneu**; 2007. p. 345-50.

MS - MINISTÉRIO DA SAÚDE Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de

Vigilância das Doenças Transmissíveis - Vigilância da Esquistossomose Mansoní,
Diretrizes Técnicas, 4a Edição, 2014

MS – Ministério da Saúde. Disponível em:
<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/oministerio/principal/secretarias/svs/esquistossomose>

NC-IUBMB - Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and
Molecular Biology disponível em:
<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/05.html#0103>

OCHOA, R, WATOWICH S., J., FLOREZ, A., MESA, C. V., ROBLEDO, S. M, MUSKUS,
C. Drug search for leishmaniasis: a virtual screening approach by grid computing. **J
Comput Aided Mol Des.** 2016

OLSSON, T.; OPREA, T. I. Cheminformatics: a tool for decision-makers in drug
discovery. **Current Opinion in Drug Discovery and Development**, v. 4, p. 308-313,
2001.

PASTOR, M., CRUCIANI, G., MCLAY, I., PICKETT, S., CLEMENTI, S. GRid-
INdependent Descriptors (GRIND): A Novel Class of Alignment-Independent Three-
Dimensional Molecular Descriptors. **J. Med. Chem.** 2000, 43, 3233-3243

PDB – Protein Data Bank [https://www.rcsb.org/pdb/results/results.do?
tabtoshow=Current&qrid=20F9A2B5](https://www.rcsb.org/pdb/results/results.do?tabtoshow=Current&qrid=20F9A2B5)

PESSOA S. B., MARTINS A V. **Parasitologia médica**. 11a ed. Rio de Janei- ro:
Guanabara Koogan; 1988. p. 868.

PIRARD, B.; MATTER, H. Matrix Metalloproteinase Target Family Landscape: a

chemometrical approach to ligand selectivity based on protein binding site analysis. **J. Med. Chem.**, v. 49, p. 51-69, 2006.

PHAM, T. A.; JAIN, A.N. Parameter Estimation for Scoring Protein–Ligand Interactions Using Negative Training Data. **J. Med. Chem**, 49 (20), pp 5856–5868, 2006

PRATA A. Esquistossomose Manson. **Tratado de infectologia**. 3a ed. São Paulo: Atheneu; 2007. p. 1695-1720.

RAUTIO, J. et al. Prodrugs: design and clinical applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, p. 255-270, 2008.

RED BOOK 2015 report of the committee on infectious disease. **American Academy of Pediatrics**. 30th edition. Section 3: Summaries of Infectious Diseases – Schistosomiasis.

RENSLO A. R. e MCKERROW, J. H. Drug discovery and development for neglected parasitic diseases. **Nature Chemical Biology** 2, 701 - 710 (2006).

ROCHA, J. R.; FREITAS, R. F.; MONTANARI, C. A. The GRID/CPCA approach in drug discovery. **Expert Opin Drug Discov**, v. 5, n. 4, p. 333-46, Apr 2010. ISSN 1746-0441.

ROD T., H., BROOKS, C., L. How dihydrofolate reductase facilitates protonation of dihydrofolate. **J Am Chem Soc**. Jul 23;125(29):8718-9 2003.

RODRIGUES, R. P., MANTOANI, S. P., DE ALMEIDA, J. R., PINSETTA, F. R., SEMIGHINI, E. P., DA SILVA, V. B., & DA SILVA, C. H. T. Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos. **Revista Virtual de Química**, 4(6), 739-776. 2012.

SACCONNAY, L., ANGLEVIEL, M., RANDAZZO, G. M., MARÇAL FERREIRA QUEIROZ, M., FERREIRA QUEIROZ, E., WOLFENDER J. L., et al. Computational Studies on Sirtuins from *Trypanosoma cruzi*: Structures, Conformations and Interactions

with Phytochemicals. **PLoS Negl Trop Dis** 8(2): e2689. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002689>, 2014

SANDBACH, F. R. The history of schistosomiasis research and policy for its control. - 1976

SANDERS, M. P. A.; BARBOSA, A. J. M.; ZARZYCKA, B.; NICOLAES, G. A. F.; KLOMP, J. P. G.; VLIEG, J.; Del-RIO, A. Comparative analysis of pharmacophore screening tools. **J. Chem. Inf. Model.** v. 52, p. 1607-1620, 2012.

SANTOS, L. H. S. dos. Planejamento racional de fármacos aplicado à busca e otimização de inibidores do HIV-1 e Doença de Chagas. 2016. 159f. **Tese (Doutorado em Biologia Computacional e Sistemas) - Fundação Oswaldo Cruz**, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 2016

SILVA, T. H. A. Modelagem molecular. In: ANDREI, C. C.; FERREIRA, T. D.; FACCIONE, M.; FARIA, J. T. (EDS.). **Da química medicinal à química combinatória e modelagem molecular, um curso prático**. Barueri: Malone, 2003. p. 111-139.

SIQUEIRA-BATISTA R, RAMOS JÚNIOR AN, FARINAZZO RJM, et al. O *Schistosoma mansoni*. Esquistossomose mansoni. São Paulo: Grupo Editorial Moreira Jr; 1998. p. 26-32.

SHARPE R., M, KOEPKE T., HARPER A., GRIMES J., GALLI M., SATOH-CRUZ M. CisSERS: Customizable *In Silico* Sequence Evaluation for Restriction Sites. **PLoS ONE** 11(4): e0152404., 2016

STERLING, T.; IRWIN, J. J. ZINC 15--Ligand Discovery for Everyone. **J Chem Inf Model**, v. 55, n. 11, p. 2324-37, Nov 2015. ISSN 1549-960X.

TROSSINI, G. H. **Antichagásicos potenciais**: busca racional de compostos com ação seletiva pela cruzaina. 2008: 321 f. Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

UNITY MANUAL, **Tripod Bookshelf**, A Certara company, USA, Inc., pag. 56, 2011.

VERLINDE, C. L. M. J., HANNAERT V., BLONSKI C, WILLSON M, PÉRIÉ J. J., FOTHERGILL-GILMORE L. A., OPPERDOES F. R., GELB M. H., HOL W. G. J., MICHELS, P. A.M. Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs. Drug Resistance Updates, Volume 4, Issue 1, February 2001, Pages 50–65

VIEGAS, C. J.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, p. 326-337, 2006.

VOLPATO, J. P.; YACHNIN, B. J.; BLANCHET, J.; GUERRERO, V.; POULIN, L.; FOSSATI, E.; BERGHUIS, A. M.; PELLETIER, J. E. Multiple Conformers in Active Site of Human Dihydrofolate Reductase F31R/Q35E Double Mutant Suggest Structural Basis for Methotrexate Resistance. **J. Bio. Chem.** v. 284, n. 30, p. 20079–20089, 2009.

WER - Weekly epidemiological record - WHO - Schistosomiasis: number of people treated worldwide in 2014. WORLD HEALTH ORGANIZATION Geneva, 2016

WERMUTH, C.G. **The practice of medicinal chemistry**. 3. ed. London: Academic Press, 2008.

WHO Disponível em: http://www.who.int/topics/tropical_diseases/en/

WHO, disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>

WILLYARD, C. Neglected diseases see few new drugs despite upped investment. **Nature Medicine**, v. 19, p. 2, 2013.

ANEXOS:

18/07/2017

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9138 - 8853841/1 - João Paulo Machado Martins

Email: jpmachadomartins@usp.br
Data de Nascimento: 06/06/1987
Cédula de Identidade: RG - 34.236.280-X - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Bacharelado em Farmácia e Bioquímica - Universidade Nove de Julho - São Paulo - Brasil - 2013

Curso: Mestrado
Programa: Fármaco e Medicamentos
Área: Insumos Farmacêuticos
Data de Matrícula: 20/01/2015
Início da Contagem de Prazo: 20/01/2015
Data Limite para o Depósito: 20/07/2017
Orientador: Prof(a). Dr(a). Gustavo Henrique Goulart Trossini - 20/01/2015 até o presente. Email: trossini@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 20/01/2015
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 08/03/2016
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 20/01/2015

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 06/02/2017

Impresso em: 18/07/2017 20:58:37

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9138 - 8853841/1 - João Paulo Machado Martins

1/2

18/07/2017

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5777-3/4	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos I	12/03/2015	24/06/2015	45	3	93	A	N	Concluída
FBF5818-1/1	Tópicos Avançados em Fármacos e Medicamentos – Fundamentos e Aplicações de Análises Multivariadas no Planejamento de Fármacos	15/06/2015	21/06/2015	30	2	100	A	N	Concluída
ICB5747-1/1	Proteômica: Um Link entre Biologia, Química, Farmácia e Medicina (Parte I) (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	27/07/2015	09/08/2015	60	4	100	A	N	Concluída
FBF5822-1/1	Tópicos Avançados em Fármaco e Medicamentos (Calorimetria e Termodinâmica no Desenho de Novos Fármacos)	02/09/2015	08/09/2015	30	2	100	A	N	Concluída
FBF5805-2/2	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	10/03/2016	19/05/2016	90	6	100	A	N	Concluída
QFL5925-6/1	Prática de Ensino de Química (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	14/03/2016	26/06/2016	45	3	90	A	N	Concluída
FBF5824-1/1	Introdução à Modelagem Molecular como Ferramenta no Estudo e Desenvolvimento de Moléculas Bioativas	04/07/2016	24/07/2016	90	6	100	B	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	26
Estágios:			
Total:	0	25	26

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 06/02/2017

Impresso em: 18/07/2017 20:58:37

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9138 - 8853841/1 - João Paulo Machado Martins

Comissão julgadora da dissertação de mestrado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função
3578907	Gustavo Henrique Goulart Trossini	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 06/02/2017

Impresso em: 18/07/2017 20:58:37

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1. Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1. Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2. Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 05 de maio de 2017.

Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento
Presidente da CPG/FCF/USP