



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



FRANCO HENRIQUE ANDRADE LEITE

**PLANEJAMENTO E AVALIAÇÃO DE NOVOS INIBIDORES DE PTERIDINA
REDUTASE 1 (PTR1) DE *Leishmania major***

Feira de Santana, BA
2015

FRANCO HENRIQUE ANDRADE LEITE

**PLANEJAMENTO E AVALIAÇÃO DE NOVOS INIBIDORES DE PTERIDINA
REDUTASE 1 (PTR1) DE *Leishmania major***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia,
da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial
para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Santos Castilho

Feira de Santana, BA
2015

Dedico este trabalho a minha mãe, Idete Baldoino Andrade, minha esposa Lorena Silva Matos, minha avó Maria Angélica Souza (in memorian) e meu tio Idelmir Baldoino Andrade (in memorian).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à **DEUS**, por ter me dado força e sabedoria para concluir o doutorado.

À minha mãe, **Idete Andrade** que sempre me apoiou e que com muito carinho acreditou que esse momento seria possível, com certeza o meu **maior exemplo de vida**. Aos familiares, em especial a minha vó **Maria Angélica** e meu tio **Idelmir Andrade**, que infelizmente partiram dessa vida e não poderão ver a realização desse sonho.

À minha esposa, **Lorena Andrade** pelo companheirismo, dedicação, atenção e por ter suportado durante esses longos quatro anos, inúmeros momentos de ausência.

Ao meu orientador, Prof. **Marcelo S. Castilho** pela disponibilidade e atenção nos momentos em que foi solicitado (e não foram poucos !). Agradeço por todas as discussões científicas e por mostrar a **importância dos ensaios biológicos**. Com certeza, é um exemplo de profissional que levarei para a minha vida acadêmica. Aproveito para agradecer o Prof. **Samuel Pita**, por ter apresentado parte desse “mundo” denominado Dinâmica Molecular, o qual estou literalmente “encantado” !!

Aos meus **AMIGOS** que diretamente ou indiretamente participaram da construção desse trabalho. Tenho a sorte de ter conhecido pessoas maravilhosas que me ensinaram muito além de técnicas, reações e análises, mas como ser um pessoa melhor. Gostaria de agradecer especialmente aos meus amigos de “longa data”, **Manoelito Coelho, Hugo Brandão, Edimar Caetité, André Lacerda, Vínicius Andrade, Antônio Anderson e Maíra Mercês** além dos amigos que o “Doutorado” propiciou conhecer/aproximar, **Pedro Lacerda** (o “cara” do grep !) **Odailson Paz, Gean Marcelo (Macedônia), Dandara, Humberto Freitas, Lara Maria** e todos os amigos do **LABIMM/LACRIMA** pelos momentos únicos de desabafos, lamentações e acima de tudo, muitas risadas !!

Ào grupo do Laboratório de Modelagem Molecular da UEFS, em especial aos meus (ex) alunos de IC, **Janay Araujo, Larissa Matos e David Bacelar**.

Gostaria de agradecer com muito afincio, **Thamires Quadros Froes**, por ter auxiliado nas etapas de expressão e purificação da PTR1 durante o mestrado na USP-RP e principalmente por todo o carinho, companheirismo e as palavras de incentivo.

Gostaria também de agradecer imensamente a aluna de Iniciação Científica, **Suellen Gonçalves** por ter ajudado de forma direta na conclusão desse trabalho.

Durante o doutorado, vários pesquisadores “externos” participaram efetivamente para a conclusão do trabalho. Assim, gostaria de agradecer à Dra **Aldina Barral**, Dra **Camila Indiani** e Dra. **Valéria Borges** além de todos os pesquisadores, estudantes e funcionários do LIP/LIMI (CPqGM-Fiocruz/BA). Em especial, gostaria de agradecer ao meu grande amigo **Peter Entringer** que “abriu” as portas dos laboratórios na FIOCRUZ e dedicou o seu tempo para me orientar.

Ao Prof. **Sérgio Carvalho** (EMPRAPA) por toda colaboração na parte de estatística desse trabalho.

Ao Prof. **Gustavo Trossini** (USP) e sua aluna de doutorado **Drielli Gomes** pelos dados de Fluorimetria.

Ao Prof. **Paulo Carvalho** da Universidade de Notre Dame (EUA), o qual tive o privilégio de conhecer e passar um dos momentos mais felizes da minha vida (primeira viagem internacional !!). Além disso, a concepção desse trabalho foi resultado de inúmeras discussões com o Prof. Paulo Carvalho que me apresentou à PTR1!!

Por fim, gostaria de agradecer à todos aqueles, que por ventura, não foram citados mas que de alguma forma participaram na construção do trabalho, bem como, os **órgãos de fomento** (FAPESB/CNPq) e UEFS (**PPGBiotec**) pelo apoio institucional.

“If we were to name the most powerful assumption of all, which leads one on and on in an attempt to understand life, it is that all things are made of atoms, and that everything that living things do can be understood in terms of the jiggings and wiggings of atoms”

Richard Feynman,
Prêmio Nobel de Física (1965)

RESUMO

A leishmaniose tem sido indicada pela OMS como a segunda protozoose mais importante em termos de mortalidade e prevalência. Entretanto, o repertório de fármacos disponíveis é limitado e apresenta, na maioria dos casos, baixos índices de eficácia e segurança. Embora os protozoários do gênero *Leishmania* sejam auxotróficos para folatos, inibidores da Diidrofolato Redutase-Timidilato Sintase (DHFR-TS) são pouco eficazes contra esse parasito. A baixa suscetibilidade se explica pela presença da Pteridina Redutase 1 (PTR1) que atua como via alternativa para a redução de ácido fólico ou de pteridinas não conjugadas, quando DHFR-TS está inibida. Diante desse cenário, moléculas que atuam sobre PTR1 e DHFR-TS de *Leishmania* ssp. parecem ser promissoras para o desenvolvimento de fármacos contra a leishmaniose. Por essa razão, o objetivo desse trabalho foi identificar, por triagem *in silico* (modelo farmacofórico), potenciais inibidores de PTR1 que apresentem os requisitos estruturais mínimos para inibir também DHFR de *L. major*. Os modelos farmacofóricos 10 e 20, baseados em inibidores de PTR1 (2 doadores de lig. H, 4 aceitadores de lig. H e 3 centros hidrofóbicos) e DHFR-TS (2 aceitadores de lig. H e 2 centros hidrofóbicos) respectivamente, mostraram desempenho satisfatório em discriminar inibidores verdadeiros de falsos positivos ($AUC_{PTR1}=0,90$; $AUC_{DHFR-TS}=0,86$), além de explicarem a relação entre a estrutura química e a atividade biológica. Esses modelos foram usados sequencialmente para selecionar 10 moléculas que tiveram seu efeito sobre a estabilidade térmica de LmPTR1 investigado por ThermoFluor®. Nesse ensaio foram identificadas duas moléculas que estabilizaram LmPTR1: Z80393 ($\Delta T_m = 1,02^\circ\text{C}$) e Z33165 ($\Delta T_m = 0,9^\circ\text{C}$). Ensaio de deslocamento com biopterina ou NADPH mostraram que Z80393 compete com o substrato, enquanto Z33165 interage no sítio do cofator. O efeito de Z80393 sobre a atividade catalítica de LmPTR1 foi investigado por fluorimetria, permitindo determinar a potência desse inibidor ($IC_{50}=32,31 \pm 1,18 \mu\text{M}$). Por fim, um modelo de interação para esse inibidor foi gerado por acoplamento molecular e a pose obtida foi analisada através de uma Dinâmica Molecular com fase produtiva de 15 ns. Os resultados obtidos mostram que durante 70% da simulação, Z80393 faz ligações de H com os resíduos Ser-111 e Arg-17. Portanto, o presente trabalho não só levou a identificação de uma nova classe de inibidores de LmPTR1, mas também permitiu caracterizar sua potência, modalidade de inibição e perfil de interação com seu alvo terapêutico.

Palavras-chave: Dinâmica Molecular. DHFR-TS. Fluorimetria. Modelos Farmacofóricos. PTR1. ThermoFluor®.

ABSTRACT

According to WHO, Leishmaniasis is the second most important disease caused by protozoans. However, the available therapeutic arsenal for its treatment is limited and has low efficacy and safety profile. Once *Leishmania* spp. are pteridine auxotrophs key enzymes of the folate metabolism have been targeted to circumvent this dilemma. However, Dihydrofolate Reductase-Thymidylate Synthase (DHFR-TS) inhibitors are ineffective against *Leishmania major* due to an alternative folate pathway regulated by Pteridine Reductase 1 (PTR1). Thus, identifying molecules that act on both enzymes is crucial to develop new leishmanicidal drugs. For that reason, the main goal of this study is to identify, through in silico approaches, (pharmacophore models), putative PTR1 inhibitors that also show structural requirements for *L. major* DHFR-TS inhibition. The pharmacophore models 10 and 20, PTR1 (2 H-bond donors, 4 H-bond acceptors and 3 hydrophobic centers) and DHFR-TS inhibitors (2 H-bond acceptors and 2 hydrophobic centers) respectively, show high performance to differentiate true-binders from decoys ($AUC_{PTR1}=0.90$; $AUC_{DHFR-TS}=0.86$) and to explain the structure-activity relationships for the inhibitors under study. Thus, these models were employed sequentially to select 10 molecules whose effect over the thermal stability of LmPTR1 was investigated by ThermoFluor®. According to this assay, two molecules stabilize LmPTR1: Z80393 ($\Delta T_m = 1.02^\circ\text{C}$) and Z33165 ($\Delta T_m = 0.9^\circ\text{C}$). Binding displacement assays with biopterin or NADPH showed that Z80393 binds within the substrate binding site, whereas Z33165 binds in the cofactor binding site. Z80393 effect over the catalytic activity of PTR1 was investigated by fluorimetry. This approach allowed us to determine the inhibitor's potency ($IC_{50}=32.31 \pm 1.18 \mu\text{M}$). Finally, Z80393 putative binding profile was generated by molecular docking and analyzed by Molecular Dynamics (productive phase= 15 ns). The results show that during 70% of the simulation, Z80393 H-bonds to Ser-111 and Arg-17 residues. Therefore, this study not only led to identification of a new class of LmPTR1 inhibitors, but also allowed us to determine its potency, mode of inhibition and binding profile towards its therapeutic target.

Keywords: Molecular Dynamics. DHFR-TS. Fluorometry. Pharmacophore Models. PTR1. ThermoFluor®.

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 -	Fórmula da segunda lei de Newton.	46
Equação 2 -	Cálculo do fator de enriquecimento (EF).	54
Equação 3 -	Cálculo da variação do fator de enriquecimento (ΔEF).	55
Equação 4 -	Cálculo do valor do T_m .	60
Equação 5 -	Cálculo da porcentagem de inibição com base nos dados de fluorescência.	62

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 -	Etapas utilizadas para a geração, avaliação e seleção dos modelos farmacofóricos de inibidores frente a LmPTR1 e LmDHFR-TS.	51
Esquema 2 -	Triagem virtual por modelo farmacofórico de potenciais inibidores de LmPTR1 presentes no banco de moléculas similares a líderes (<i>Lead-like</i>).	56
Esquema 3 -	Etapas realizadas para padronização, avaliação biológica e investigação da modalidade de inibição por ThermoFluor®.	59
Esquema 4 -	Etapas utilizadas para o acoplamento molecular e simulação de Dinâmica Molecular.	63

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Modelo tridimensional da DHFR-TS de *Leishmania major*. A estrutura está representada em *cartoon*. Os domínios DHFR e TS estão representados em rosa e verde, respectivamente. 23
- Figura 2 -** Distribuição das NCE por doença no ano de 2000 a 2011. DNT, doenças negligenciadas tropicais. 25
- Figura 3 -** Distribuição da Leishmaniose cutânea no mundo no ano de 2013. 26
- Figura 4 -** Número de casos de Leishmaniose Cutânea nos países da América do Sul no ano de 2011. 27
- Figura 5 -** Alinhamento sequencial múltiplo da PTR1 de *L. major* (LmPTR1), *L. amanozensis* (LaPTR1) e *L. braziliensis* (LbPTR1). O alinhamento múltiplo foi gerado no servidor *on-line* Clustal Omega (SIEVERS et al., 2011). Os retângulos delimitam os resíduos presentes no sítio ativo. (Identidade sequencial global: LmPTR1 vs LaPTR1 = 92%, LmPTR1 vs LbPTR1 = 73%, LbPTR1 vs LaPTR1 = 74%; Identidade sequencial local (sítio ativo): LmPTR1 vs LaPTR1 = 100%, LmPTR1 vs LbPTR1 = 100%, LbPTR1 vs LaPTR1 = 100%). (“*” = Idêntico, “:” = Similar, “.” = Não conservado, “-” = ausente). 28
- Figura 6 -** Representação esquemática do metabolismo das pteridinas livres (Biopterina) e conjugadas (Folato) em *Leishmania sp.* Abreviaturas: PTR1, Pteridina Redutase (E.C 1.5.1.33); DHPR, Diidropteridina Redutase (E.C 1.5.1.34); DHFR, Diidrofolato Redutase (E.C 1.5.1.3); SHMT, Serina Hidroximetil transferase (EC 2.1.2.1); TS, Timidilato Sintase (E.C 2.1.1.45); dUMP, deoxi Uridina monofosfato; dTMP, deoxi Timidina monofosfato. A largura das setas indica a contribuição relativa de cada enzima nos passos em que mais de uma enzima está envolvida. O ponto de interrogação representa a enzima desconhecida que utiliza tetraidrobiopterina, levando-a a diidrobiopterina quinonóide. 33
- Figura 7 -** Representação da estrutura tetramérica de PTR1 de *L. major* (PDB: 1E92) (A) com destaque para as interações do substrato (diidrobiopterina) (B) e cofator (NADP+) (C) no sítio ativo. As linhas tracejadas em vermelho representam as ligações de hidrogênio. Os átomos de oxigênio e nitrogênio estão indicados em vermelho e azul, respectivamente, e os carbonos estão em cinza (diidrobiopterina) ou verde (NADP+). Os aminoácidos estão representados em bastões com os carbonos em amarelo. 35

Figura 8 -	Mecanismo catalítico proposto para PTR1 de <i>L. major</i> . Resíduos que participam da redução da biopterina para diidrobiopterina (A) e, posteriormente, para tetraidrobiopterina (B) estão destacados.	36
Figura 9 -	Estágios envolvidos no processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos (ADME = Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção; NCE = nova entidade química).	37
Figura 10 -	Representação do espaço químico de todas as moléculas possíveis (cubo) com a área de moléculas bioativas (círculo roxo) e aquelas com propriedades físico químicas para uso terapêutico (círculo verde).	39
Figura 11 -	Estrutura das moléculas moldes e moléculas selecionadas com auxílio do modelo farmacofórico proposto por Dube e colaboradores (2012).	42
Figura 12 -	Etapas envolvidas no acoplamento molecular, desde a delimitação do espaço de procura no alvo molecular (sítio de ligação) (A), amostragem conformacional (B), posicionamento e pontuação (C) das diferentes conformações geradas.	43
Figura 13 -	Representação esquemática dos potenciais componentes de um campo de força.	46
Figura 14 -	Estrutura química dos principais fluoróforos utilizados no ThermoFluor® (n = 3-4; m=2-10).	48
Figura 15 -	Representação esquemática da curva de fluorescência <i>versus</i> temperatura obtida nos ensaios de ThermoFluor®. LI, limite inferior; LS, limite superior; T_m = temperatura média do equilíbrio entre o estado enovelado e desenovelado.	49
Figura 16 -	Representação do efeito sobre a estabilidade térmica de uma proteína frente a três diferentes tipos de inibidores (1 , competitivo; 2 , incompetivo e 3 , não competitivo) na presença de duas concentrações de substrato.	50
Figura 17 -	Estrutura química dos inibidores de LmPTR1 selecionados para a geração dos modelos farmacofóricos, com os respectivos valores de atividade biológica.	52
Figura 18 -	Estrutura química dos inibidores de LmDHFR-TS selecionados para a geração dos modelos farmacofóricos, com os respectivos valores de atividade biológica.	53

Figura 19 -	Representação gráfica da distribuição de inibidores de PTR1 no espaço químico, definido a partir de componentes principais (PC), calculadas com auxílio do servidor ChemGPS-NP Web. Os pontos vermelhos referem-se às moléculas selecionadas para a geração dos modelos farmacofóricos.	68
Figura 20 -	Curvas ROC obtidas para os modelos farmacofóricos gerados a partir de inibidores de LmPTR1. AUC, área sob a curva.	73
Figura 21 -	Relação entre os valores de potência (pK_i) e o encaixe de inibidores conhecidos (MOL_QRY) nos modelos farmacofóricos para inibidores de LmPTR1.	74
Figura 22 -	Sobreposição de um inibidor potente de PTR1 (A, $K_i = 27\text{nM}$) e um inibidor fraco (B, $K_i = 27\mu\text{M}$) no modelo 10. As distâncias e raios estão representadas em angstroms. Azul: centros hidrofóbicos, verde: pontos aceitadores de ligação de H, rosa: pontos doadores de ligação de H. O raio das esferas varia de acordo ao raio de tolerância calculado pelo GALAHAD™. Os átomos de carbono, nitrogênio e oxigênio estão representados pelas cores cinza, azul e vermelho, respectivamente.	75
Figura 23 -	Representação do modelo farmacofórico 10* (simplificado). O esquema de cores é o mesmo apresentado na figura 22.	78
Figura 24 -	Curvas ROC obtidas para os modelos farmacofóricos 10 e 10*.	79
Figura 25 -	Representação gráfica da distribuição de inibidores de DHFR-TS no espaço químico, definido a partir de componentes principais (PC), calculadas com auxílio do servidor ChemGPS-NP Web. Os pontos vermelhos referem-se às moléculas selecionadas para a geração dos modelos farmacofóricos.	80
Figura 26 -	Curvas ROC obtidas para os modelos farmacofóricos gerados a partir de inibidores de LmDHFR-TS.	82
Figura 27 -	Relação entre os valores de potência (pK_i) e o encaixe de inibidores conhecidos (MOL_QRY) nos modelos farmacofóricos para inibidores de LmDHFR-TS.	83
Figura 28 -	Sobreposição de um inibidor de DHFR-TS potente (A, $K_i = 90\text{nM}$) e um inibidor fraco (B, $K_i = 4\mu\text{M}$) no modelo 20. O esquema de cores é idêntico ao apresentado na figura 22.	84
Figura 29 -	Distribuição das moléculas selecionadas (n=10418) pelos modelos farmacofóricos 10 e 20 para inibidores de LmPTR1 e LmDHFR-TS, respectivamente, em relação ao valor de QFIT.	87

Figura 30 -	Representação gráfica do espaço químico tridimensional com destaque para as 10 moléculas selecionadas para testes de atividade <i>in vitro</i> .	88
Figura 31 -	Representação gráfica do espaço químico tridimensional para as 10 moléculas selecionadas para testes de atividade <i>in vitro</i> e inibidores conhecidos de <i>L. major</i> PTR1 e DHFR-TS.	90
Figura 32 -	Teste de expressão da proteína LmPTR1 utilizando diferentes concentrações de IPTG (0,1; 0,5 e 1mM) a 18°C e 16 horas de indução. A análise foi realizada em gel SDS-PAGE a 12% .1) sobrenadante 1,0mM IPTG; 2) precipitado 1,0mM IPTG; 3) sobrenadante 0,5mM IPTG; 4) precipitado 0,5mM IPTG; 5) sobrenadante 0,1mM IPTG; 6) precipitado 0,1mM IPTG; 7) sobrenadante 0,0mM IPTG; 8) precipitado 0,0mM IPTG; 9) padrão de peso molecular (LMW-SDS GE®). A seta indica a região esperada para a banda de expressão de PTR1.	91
Figura 33 -	Purificação da LmPTR1 por cromatografia de afinidade em coluna de sefarose Ni ⁺² -NTA. A análise foi realizada em gel SDS-PAGE a 12%. 1) padrão de peso molecular (LMW-SDS GE®); 2) precipitado; 3) sobrenadante; 4) efluente; 5-6) eluatos com 100mM de imidazol; 7-8) eluatos com 200mM de imidazol; 9-10) eluatos com 400mM de imidazol. A seta indica a região esperada para a PTR1.	92
Figura 34 -	Estabilidade térmica de LmPTR1 em diferentes tampões e pH. O valor de <i>T_m</i> representa o ponto de inflexão da curva de transição entre os estados enovelados e desenovelados da proteína. Os valores estão expressos em mediana e amplitude interquartil (AIQ) (N=3). A caixa representa o primeiro quartil (Q1), mediana e terceiro quartil (Q3), o comprimento da caixa descreve a AIQ e as linhas em cada extremidade correspondem aos valores extremos de <i>T_m</i> (Q1-1,5 x AIQ e Q3+ 1,5 x AIQ).	94
Figura 35 -	Curva de fluorescência <i>versus</i> tempo para diferentes concentrações de proteína. Valores representam a mediana e amplitude interquartil (N=3).	96
Figura 36 -	Estabilidade térmica de PTR1 (<i>T_m</i>) frente a diferentes concentrações (5, 10 e 20%; v/v) de DMSO. Os valores estão expressos em mediana e amplitude interquartil (N=3). A caixa representa o primeiro quartil (Q1), mediana e terceiro quartil (Q3), o comprimento da caixa descreve a AIQ e as linhas em cada extremidade correspondem aos valores extremos de <i>T_m</i> (Q1-1,5 x AIQ e Q3+ 1,5 x AIQ). * = p < 0,05 (<i>versus</i> controle). (Teste de Krushal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn).	97

Figura 37 -	Estabilidade térmica de PTR1 na presença de potenciais inibidores selecionados na triagem virtual. Valores representam a mediana e amplitude interquartil da variação de T_m (ΔT_m) quando comparada ao controle (DMSO 5%) (N=3). * = $p \leq 0,05$ (<i>versus</i> controle). (Teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn).	98
Figura 38 -	Estabilidade térmica de PTR1 frente a três diferentes concentrações de Z80393 e Z33165. Os valores estão expressos em mediana e amplitude interquartil da variação de T_m (ΔT_m) (N=3).	99
Figura 39 -	Estabilidade térmica de PTR1 frente ao metotrexato na presença de concentrações quatro vezes superior ao K_m do NADPH ou biopterina (50 μ M). Valores representam a mediana e amplitude interquartil da variação de T_m (ΔT_m) quando comparada ao controle (DMSO 5%). * = $p \leq 0,05$ (<i>versus</i> controle). (Teste de Mann-Whitney).	101
Figura 40 -	Estabilidade térmica de PTR1 frente a Z80393 na presença de três diferentes concentrações de Biopterina (A) ou NADPH (B). Valores representam mediana e amplitude interquartil da variação de T_m (ΔT_m) quando comparada ao controle (DMSO 5%) (N=3). ** = $p \leq 0,01$ (<i>versus</i> controle). (Teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn).	102
Figura 41 -	Estabilidade térmica de PTR1 frente a Z33165 na presença de três diferentes concentrações de Biopterina (A) ou NADPH (B). Valores representam mediana e amplitude interquartil da variação de T_m (ΔT_m) quando comparada ao controle (DMSO 5%) (N=3). *** = $p \leq 0,001$ (<i>versus</i> controle). (Teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn).	103
Figura 42 -	Espectro de emissão para NADPH (100 μ M) e seu controle (NaOH 0,02M) (A) e Z80393 (100 μ M) juntamente com o seu controle (DMSO 5%), utilizando o comprimento de onda de excitação de 340nm (B). A análise foi realizada em triplicata à 30°C.	105
Figura 43 -	Curva de fluorescência <i>versus</i> tempo para PTR1 na presença de NADPH (20 μ M), Biopterina (20 μ M) e Z80393 (50 μ M). Valores representam mediana e amplitude interquartil da fluorescência quando comparada ao controle (DMSO 5%) (N=3). (Teste de Mann-Whitney).	106

Figura 44 -	Porcentagem de inibição em função do logaritmo da concentração de Z80393. Valores representam mediana e amplitude interquartil da fluorescência quando comparada ao controle (DMSO 5%) (N=3). *** = $p \leq 0,001$; ** = $p \leq 0,01$; * = $p \leq 0,05$ (<i>versus</i> controle) (Teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn).	107
Figura 45 -	A representação do <i>protomol (surface)</i> utilizado para definição do espaço de busca. A estrutura 3D da PTR1 (PDB: 1E92) está representada em <i>cartoon</i> .	108
Figura 46 -	Sobreposição do ligante cristalográfico (vermelho) em relação à pose melhor pontuada obtida pelo acoplamento molecular (azul). A representação da estrutura de PTR1 (PDB: 1E92) foi omitida para facilitar a visualização.	109
Figura 47 -	A melhor pose da molécula Z80393 no sítio de ligação do substrato na PTR1 (PDB: 1E92). As linhas tracejadas em vermelho representam as ligações de H. Os aminoácidos importantes para a catálise estão representados em bastões com os carbonos em amarelo, nitrogênios em azul, oxigênio em vermelho e hidrogênios em cinza. A molécula está representada em bastões com os carbonos em cinza, nitrogênios em azul e enxofre na cor laranja. As esferas verdes representam os centroides dos anéis aromáticos envolvidos na interação de empilhamento <i>pi</i> . As distâncias estão expressas em angstroms.	110
Figura 48 -	Valores de RMSD (nm) para a cadeia principal (<i>backbone</i>) na forma APO da PTR1 e complexo PTR1-Z80393 durante toda a trajetória de DM. A média \pm desvio padrão dos sistemas está mostrada no gráfico.	111
Figura 49 -	Flutuação (RMSF) calculada para cada resíduo (<i>backbone</i>) da proteína durante a fase produtiva da DM. As regiões pontilhadas descrevem áreas com maiores flutuações atômicas entre os sistemas, enquanto que a área em destaque refere-se a resíduos que compõem o sítio de ligação do substrato (A e D).	112
Figura 50 -	Representação 3D da flutuação de RMS para a cadeia principal da estrutura média do complexo PTR1-Z80393 (A) e forma APO (B) durante a fase produtiva. A proteína está representada em <i>cartoon</i> com coloração de acordo com os valores de flutuação. As flutuações estão representadas por uma escala de cores, em que as regiões coloridas de azul a verde variam entre 0 e 0,5 nm e as regiões coloridas de amarelo a vermelho, 0,5 a 1,0 nm.	113

Figura 51 -	Representação 3D da flutuação de RMS para Z80393 durante a fase produtiva. A representação da estrutura de PTR1 foi omitida para facilitar a visualização.	114
Figura 52 -	Matrizes de RMSD do complexo (<i>backbone</i>) durante a fase produtiva da DM. A metade superior esquerda representa os valores de RMSD durante a trajetória, enquanto a outra metade representa os agrupamentos com base no raio de corte de 0,10 (A); 0,15 (B); 0,20 (C); 0,25 (D); 0,30 (E) e 0,35 (F). O esquema de cores reflete o RMSD médio das estruturas em cada agrupamento. A escala embaixo das matrizes representa a variação de RMSD durante a fase produtiva.	116
Figura 53 -	Agrupamentos das estruturas do complexo PTR1-Z80393 obtidos a partir da trajetória da fase produtiva, revelando três agrupamentos principais. A estrutura média do primeiro agrupamento está representada na figura em <i>cartoon</i> . O número de estruturas e o RMSD médio de cada agrupamento estão descritos na figura.	118
Figura 54 -	Interações de Z80393 no sítio de ligação da diidrobiopterina em PTR1 obtidas a partir da estrutura média durante a fase produtiva. O esquema de cores é idêntico ao descrito na figura 47. A figura foi rotacionada em 180° em relação a figura 47 para facilitar a visualização.	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Terapia atual e custos para o tratamento das Leishmanioses.	29
Tabela 2 -	Parâmetros estatísticos de modelos farmacofóricos para inibidores de LmPTR1.	70
Tabela 3 -	Desempenho dos modelos farmacofóricos para inibidores de PTR1 quanto a taxa de enriquecimento para 1 e 2% da base de dados.	71
Tabela 4 -	Raio de tolerância (Å) para as características farmacofóricas do modelo farmacofórico 10.	76
Tabela 5 -	Parâmetros estatísticos de modelos farmacofóricos para inibidores de LmDHFR-TS.	81
Tabela 6 -	Raio de tolerância (Å) para as características farmacofóricas do modelo farmacofórico 20.	85
Tabela 7 -	Moléculas adquiridas para os ensaios <i>in vitro</i> .	89
Tabela 8 -	Discriminação dos pares envolvidos na ligação de hidrogênio entre Z80393 e os resíduos do sítio de ligação do substrato ($d \leq 3,5\text{Å}$; $\alpha \leq 60^\circ$) durante a fase produtiva da DM, juntamente com o tempo de permanência (%).	115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADMET	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade
AG	Algoritmo Genético
AUC	Área sob a curva
BPT	Biopterina
CG	Conjugate Gradient
DHFR-TS	Diidrofolato Redutase Timidilato Sintase
DM	Dinâmica Molecular
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNT	Doenças Negligenciadas Tropicais
dUMP	Deoxiuridina monofostato
dTMP	Deoxitimidina monofostato
EF	Fator de enriquecimento
GC	Gradiente Conjugado
H2B	Diidrobiopterina
H4B	Tetraidrobiopterina
H4F	Tetraidrofolato
HTS	High Throughput Screening
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
LBVS	Ligand based Virtual Screening
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LmDHFR-TS	<i>Leishmania major</i> Diidrofolato Redutase Timidilato Sintase

LmPTR1	<i>Leishmania major</i> Pteridina Redutase
LV	Leishmaniose Visceral
MOL_QRY	Molecular Query
MTX	Metotrexato
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fostato
NCE	New chemical Entity
PC	Principal Component
PTR1	Pteridina Redutase 1
QFIT	Query Fit
REA	Relação Estrutura Atividade
RMSD	Root Mean Square Deviation
RMSF	Root Mean Square Fluctutation
ROC	Receiver Operating Characteristic
SBVS	Structure based Virtual Screening
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SPC	Simple Point Charge
<i>T_m</i>	Temperatura de desnaturação
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	OBJETIVOS	24
2.1	OBJETIVO GERAL	24
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3	REFERENCIAL TEÓRICO	25
3.1	DOENÇAS NEGLIGENCIADAS TROPICAIS	25
3.2	LEISHMANIOSE CUTÂNEA	26
3.3	TRATAMENTO FARMACOLÓGICO	28
3.4	ALVOS TERAPÊUTICOS PARA A LEISHMANIOSE – VIA METABÓLICA DE FOLATOS	32
3.4.1	Pteridina Redutase 1 (PTR1)	34
3.5	QUÍMICA MEDICINAL E A DESCOBERTA DE FÁRMACOS	36
3.5.1	Estratégias para a identificação de moléculas bioativas	38
3.5.1.1	Triagem Virtual	40
3.5.1.1.1	Modelos Farmacofóricos	41
3.5.1.1.2	Acoplamento Molecular	43
3.5.1.2	Dinâmica Molecular	46
3.6	ThermoFluor®	47
4	MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA A CONSTRUÇÃO, AVALIAÇÃO E SELEÇÃO DE MODELOS FARMACOFÓRICOS	51
4.1.1	Seleção dos inibidores	52
4.1.2	Geração dos modelos farmacofóricos	53
4.1.3	Avaliação dos modelos farmacofóricos	54
4.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA A TRIAGEM VIRTUAL POR MODELO FARMACOFÓRICO E SELEÇÃO DE MOLÉCULAS PARA OS ENSAIOS <i>in vitro</i>	55
4.2.1	Triagem virtual por modelo farmacofórico	57
4.3	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE <i>L. major</i> PTR1	57
4.3.1	Expressão da PTR1 de <i>L. major</i>	57
4.3.2	Purificação da PTR1 de <i>L. major</i>	58
4.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA OS ENSAIOS POR ThermoFluor®	59
4.4.1	Ensaio <i>in vitro</i> por ThermoFluor®	60
4.4.1.1	Padronização do ensaio	61
4.4.1.2	Ensaio de concentração única	61
4.4.1.3	Ensaio de concentração-resposta	61
4.4.1.4	Modalidade de inibição	62

4.5	ENSAIOS <i>in vitro</i> POR ESPECTROFLUORIMETRIA	62
4.5.1	Ensaio de concentração-resposta	62
4.6	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA ACOPLAMENTO MOLECULAR E SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR	63
4.6.1	Preparo do receptor	64
4.6.2	Acoplamento molecular	64
4.6.3	Parametrização do ligante	65
4.6.4	Simulações de Dinâmica Molecular	65
4.6.4.1	Agrupamento de conformações e análise de interações	66
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.1	MODELOS FARMACOFÓRICOS	68
5.1.1	Pteridina Redutase 1 (PTR1)	68
5.1.2	Diidrofolato Redutase-Timidilato Sintase (DHFR-TS)	79
5.1.3	Triagem virtual por modelo farmacofórico e seleção de moléculas para os ensaios <i>in vitro</i>	86
5.2	ENSAIOS BIOLÓGICOS COM POTENCIAIS INIBIDORES DE <i>L. major</i> PTR1	91
5.2.1	Expressão e Purificação da PTR1 de <i>L. major</i>	91
5.2.2	Ensaio <i>in vitro</i> para identificação de inibidores de PTR1	93
5.2.2.1	Padronização do ensaio <i>in vitro</i> por ThermoFluor®	93
5.2.2.2	Ensaio de concentração única	98
5.2.2.3	Ensaio de concentração resposta	99
5.2.2.4	Modalidade de inibição	100
5.2.2.5	Ensaio <i>in vitro</i> por espectrofluorimetria	104
5.3	AVALIAÇÃO DAS INTERAÇÕES INTERMOLECULARES POR DINÂMICA MOLECULAR	108
6	CONCLUSÃO	120
	REFERÊNCIAS	122
	APÊNDICE A	138
	APÊNDICE B	145
	APÊNDICE C	153
	APÊNDICE D	154
	APÊNDICE E	155

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, é uma doença endêmica em mais de 98 países, distribuídos pela África, Ásia e América Latina. Esta doença apresenta prevalência estimada de 12 milhões de casos, incidência anual de 2 a 2,5 milhões de casos e causa aproximadamente 50 mil mortes por ano. Além disso, estima-se que 350 milhões de pessoas estão em risco de contrair leishmaniose (EJOV; DAGNE, 2014).

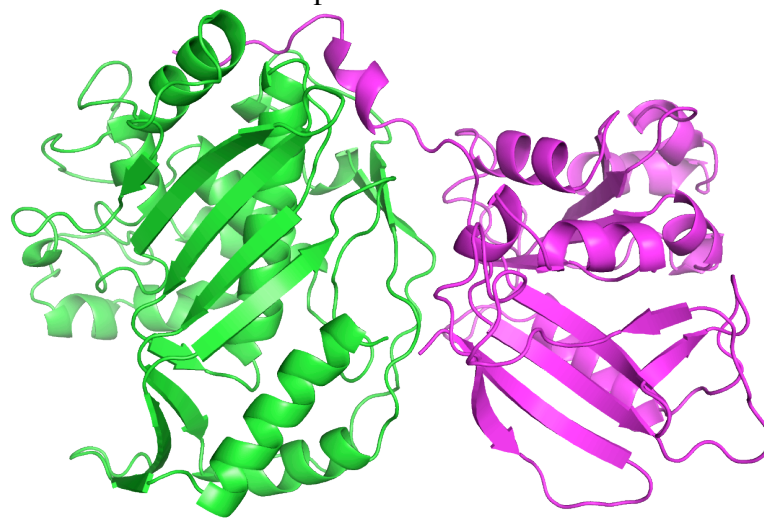
A depender da espécie envolvida e do estado imune do hospedeiro, a doença pode se manifestar de quatro formas clínicas: Leishmaniose cutânea (LC), Leishmaniose mucocutânea (LMC), Leishmaniose cutânea difusa (LCD) e Leishmaniose visceral (LV). A LV, também conhecida como calazar, é a forma mais severa da doença, podendo ser fatal em 85-90% dos pacientes não tratados. As demais manifestações, embora não sejam letais, frequentemente causam desfigurações e estigmatização social (VAN DER AUWERA; DUJARDIN, 2015). Dentre elas, LC, causada por *L. major* merece destaque por atingir mais de 1 milhão de pessoas por ano (BENNIS et al., 2015).

Embora sejam observadas diferenças de suscetibilidade entre as espécies de *Leishmania*, os mesmos medicamentos são usados para o tratamento de todas as formas clínicas da doença (LEPROHON et al., 2015). Outro ponto negativo é que esses medicamentos apresentam eficácia reduzida contra cepas endêmicas no Nepal, Brasil, Índia e África (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2010), causam nefrotoxicidade, cardiotoxicidade, hepatotoxicidade e tem índice terapêutico reduzido. Outros fatores complicadores para o prognóstico são o longo período de tratamento e a baixa adesão terapêutica, pois a maioria dos fármacos é administrada por via parenteral (ex.: antimoniato de meglumina, pentamidina). Esses fatores tornam clara a necessidade de se buscar novas alternativas terapêuticas para o tratamento da leishmaniose (TIUMAN et al., 2011).

Uma maneira de alcançar tal objetivo é explorar alvos terapêuticos essenciais e/ou exclusivos do parasito, ou que pelo menos sejam suficientemente diferentes para garantir a inibição seletiva (AZEVEDO; SOARES, 2009). Uma vez que o gênero *Leishmania* é auxotrófico para pteridinas, livres ou conjugadas, esses parasitos possuem uma via bioquímica que lhes permite utilizar pteridinas presentes no organismo do hospedeiro (KUMAR et al., 2008). Portanto, enzimas que participam dessa via bioquímica de recuperação de folatos são alvos promissores para o desenvolvimento de leishmanicidas.

Nesse sentido, a enzima Diidrofolato Redutase (DHFR) (E.C 1.5.1.3), responsável pela conversão sequencial de ácido fólico em diidrofolato e, posteriormente, em tetrahydrofolato é um alvo validado para o desenvolvimento de antitumorais, antiprotozoários e antibióticos (CUNNINGHAM; BEVERLEY, 2001; ONG et al., 2011). Em *Leishmania* e outros protozoários, DHFR está fusionada com a Timidilato Sintase (TS) (E.C 2.1.1.45) formando uma proteína bifuncional (DHFR-TS) (SIENKIEWICZ et al., 2008) (Figura 1).

Figura 1 - Modelo tridimensional da DHFR-TS de *Leishmania major*. A estrutura está representada em *cartoon*. Os domínios DHFR e TS estão representados em rosa e verde, respectivamente.



Fonte: O próprio autor

De fato, a deleção do gene que codifica DHFR-TS é letal para *Leishmania*, (CUNNINGHAM; BEVERLEY, 2001). Apesar disso, inibidores dessa enzima não são eficazes no tratamento da leishmaniose (NARE et al., 1997). A explicação para a baixa eficiência de inibidores de DHFR-TS está associada à presença de uma desidrogenase de cadeia curta, expressa em todas as fases do ciclo de vida de *Leishmania* ssp (HARDY et al., 1997), denominada Pteridina Redutase 1 (PTR1) (E.C 1.5.1.33) que catalisa a redução de biopterina para 7,8-dihidrobiopterina e, a seguir, para 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina. Além disso, esta enzima pode catalisar a redução de folato para tetrahydrofolato (NARE; HARDY; BEVERLEY, 1997). Paralelamente, PTR1 tem um papel importante na metaciclologênese do parasito (CUNNINGHAM; BEVERLEY, 2001) e nos mecanismos de resistência a espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em *Leishmania* (MOREIRA et al., 2014).

Diante do exposto, pode-se inferir que a PTR1 é um alvo promissor para o desenvolvimento de fármacos contra leishmaniose.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar inibidores da enzima PTR1 de *Leishmania major* e propor modelos de interação que auxiliem no planejamento de moléculas mais potentes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

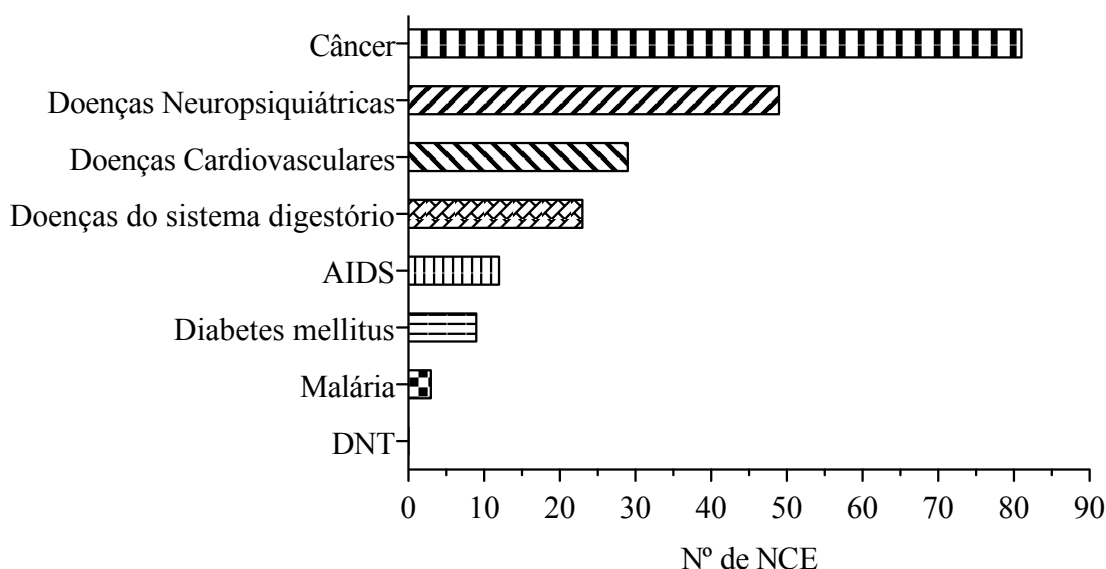
- Desenvolver um modelo farmacofórico que permita identificar inibidores de PTR1 com os requisitos estruturais mínimos para inibir também DHFR de *L. major*;
- Avaliar a atividade biológica de pelo menos 10 potenciais inibidores, selecionados por triagem virtual, frente a enzima PTR1 de *L. major*;
- Determinar a modalidade de inibição das moléculas bioativas;
- Desenvolver modelos de interação ligante-macromolécula, que considerem a flexibilidade conformacional do ligante e da proteína.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 DOENÇAS NEGLIGENCIADAS TROPICAIS

Doenças negligenciadas tropicais (DNT) afetam principalmente as regiões mais pobres do mundo (MARTIN-PLAZA; CHATELAIN, 2014; CHATELAIN; IOSET, 2011). Por exemplo, estima-se que 17% de todas as mortes notificadas em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento sejam decorrentes de DNT, enquanto essa taxa é de 5,5% em países desenvolvidos (RAMAMOORTHY et al., 2014). Apesar do seu impacto para saúde, nenhuma das 336 novas entidades químicas (NCE, do inglês *New Chemical Entity*) aprovadas para o tratamento de pacientes com diversas patologias entre 2000 a 2011 foram destinadas as DNT (Figura 2) (PEDRIQUE et al., 2013).

Figura 2 - Distribuição das NCE por doença no ano de 2000 a 2011. DNT, doenças negligenciadas tropicais.



Fonte: Adaptado de PEDRIQUE et al., 2013.

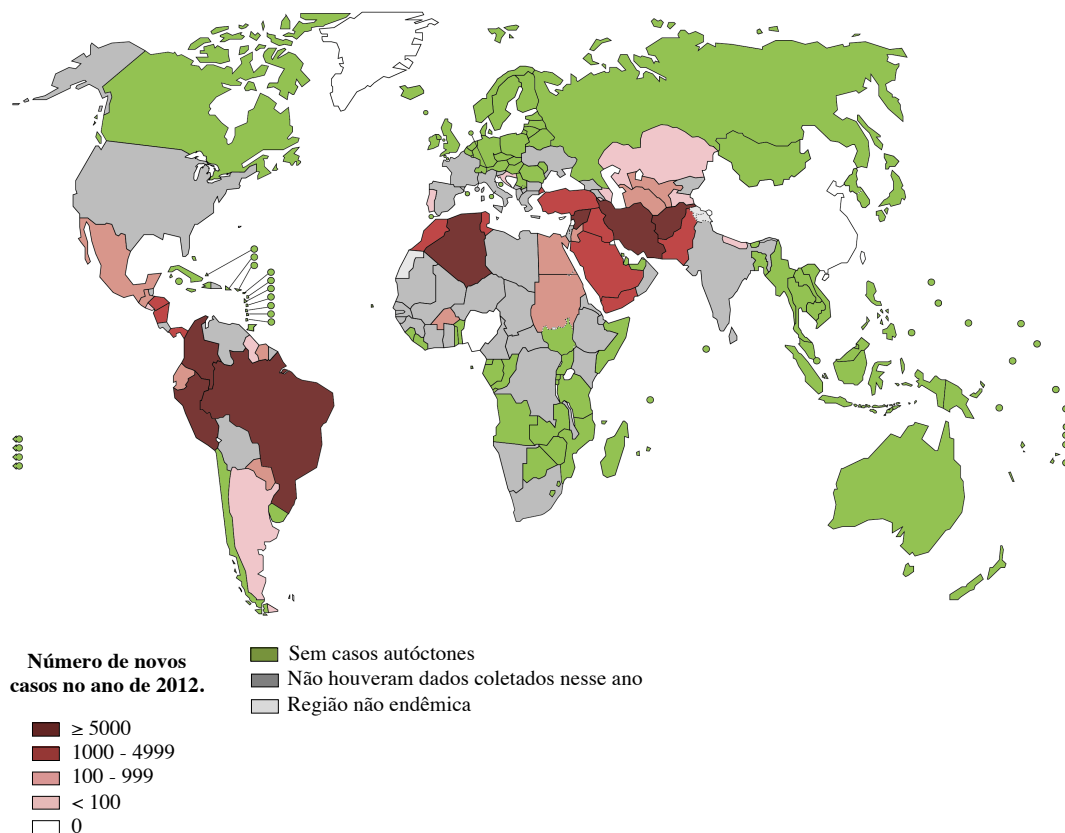
Esses números corroboram estudos do Fundo Global de Inovação para Doenças Negligenciadas segundo os quais menos de 5% da verba de P&D da indústria farmacêutica foram direcionadas às DNT no ano de 2007 (MORAN et al., 2009). Apesar disso, parcerias público-privadas têm desempenhado papel crucial no desenvolvimento de novas formulações, por exemplo: artesunato/amodiaquina; artesunato/mefloquina; nifurtimox/eflornitina; benzonidazol pediátrico; estilbogluconato de sódio/paramomicina e anfotericina B/milefosina/paramomicina, que estão em fase pré-clínica ou clínica de estudo (IOSET; CHANG, 2011).

3.2 LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Dentre as DNT causadas por protozoários, a Leishmaniose merece destaque em função da sua distribuição mundial, por estar entre as seis infecções parasitárias mais frequentes e por ser considerada como doença emergente e sem controle efetivo (JAIN; JAIN, 2015).

A Leishmaniose cutânea (LC) é a forma clínica de maior importância epidemiológica no mundo (VAN DER AUWERA; DUJARDIN, 2015; BENNIS et al., 2015). Entretanto, cerca de 90% de todos os casos estão concentrados em apenas 10 países (Afeganistão, Argélia, Brasil, Irã, Iraque, Etiópia, Sudão, Peru, Arábia Saudita e Síria) (Figura 3) (DE VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015).

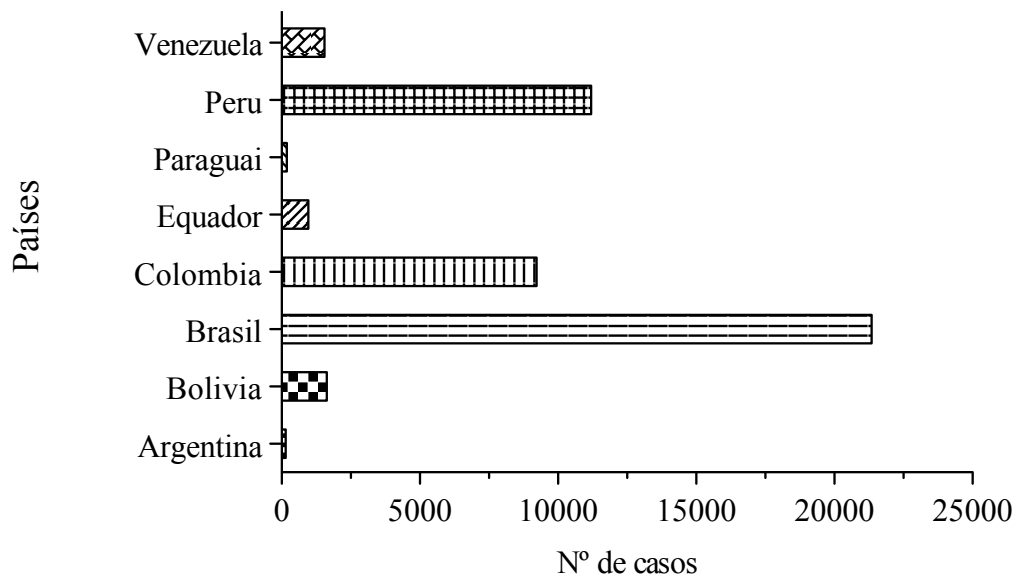
Figura 3 - Distribuição da Leishmaniose cutânea no mundo no ano de 2012.



Fonte: Adaptado de WHO, 2013.

Nas Américas, aproximadamente 57 mil casos clínicos de LC foram reportados no ano de 2011 e mais de 40 milhões de pessoas estão sob risco de contrair a doença (ALVAR et al., 2012). Nesse continente, o Brasil é o país mais afetado por essa doença (Figura 4).

Figura 4 - Número de casos de Leishmaniose Cutânea nos países da América do Sul no ano de 2011.



Fonte: Adaptado de ALVAR et al., 2012.

Dentre os Estados Brasileiros, a Bahia foi o que mais registrou casos da doença em 2012: 4.249, o que representa quase 20% de todos os casos registrados no país nesse mesmo período (DATASUS, 2012).

Apesar de *L. major* não ser endêmica nas Américas, a PTR1 de espécies autóctones (*L. braziliensis* e *L. amazonensis*) tem elevada identidade sequencial (Figura 5), sugerindo que moléculas ativas contra a enzima de uma espécie, também podem inibir a PTR1 das outras espécies.

Figura 5 - Alinhamento sequencial múltiplo da PTR1 de *L. major* (LmPTR1), *L. amanozensis* (LaPTR1) e *L. braziliensis* (LbPTR1). O alinhamento múltiplo foi gerado no servidor *on-line* Clustal Omega (SIEVERS et al., 2011). Os retângulos delimitam os resíduos presentes no sítio ativo. (Identidade sequencial global: LmPTR1 vs LaPTR1 = 92%, LmPTR1 vs LbPTR1 = 73%, LbPTR1 vs LaPTR1 = 74%; Identidade sequencial local (sítio ativo): LmPTR1 vs LaPTR1 = 100%, LmPTR1 vs LbPTR1 = 100%, LbPTR1 vs LaPTR1 = 100%). (“*” = Idêntico, “:” = Similar, “.” = Não conservado, “-” = ausente).

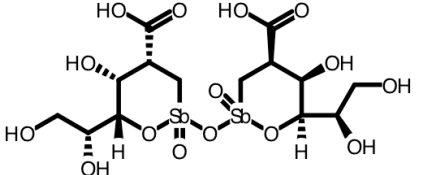
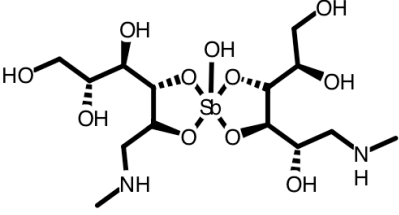
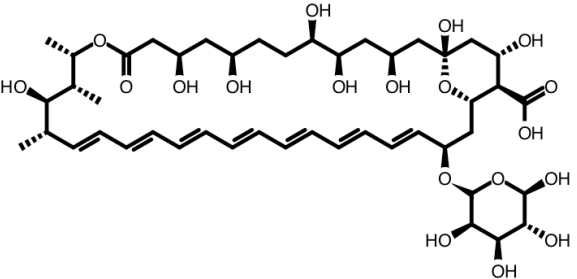
LbPTR1	MTSVATVPVALVTAAAKRLGCGIAEILHAQGYAVCIHYHRS	AEDANTLTATLNSRRPNSA	60
LmPTR1	-MTAPTVPVALVTGAAKRLGRSIAEGLHAEGYAVCIHYHRS	AEEANALSATLNARRPNSA	59
LaPTR1	-MTAPTVPVALVTGAAKRLGSSIAEGLHAEGYAVCIHYHRS	AEEANTLSATLNARRPNSA	59
	:. *****.*****.*** **:*:*****.*****.***:***:*****:*****		
LbPTR1	IAVQADLSAVATASVSSAHDAAPISLVQRCAGLVDCYNHWGRCDVIVNNAS	AYYPTPLL	120
LmPTR1	ITVQADLSNVATAPVSGADGSAPVTLFTRCAELVAACYTHWGRCDVIVNNAS	SFYPTPLL	119
LaPTR1	ITVQADLSNVAKAPVSGADGSAPVTLFTRCAALVAACYTHWGRCDVIVNNAS	SFYPTPLL	119
	*:***:***** **.* **.*. :*:*:*. *** ** ***.*****:*****:*****		
LbPTR1	NKVEEGHEPSMNEET-EAAAAADLFGTNALAPFFLIKAFARVADIPAEQRSDNYSIVNI		179
LmPTR1	RNDEEGHEPCVGDREAMETATADLFGSNAIAPYFLIKAFARFAGTPAKHRGTNYSIINM		179
LaPTR1	RSDEEGHEPCVGDREAMEAAAAADLFGSNAIAPYFLIKAFARSR-HPSRAARTNYSIVNM		178
	.. *:****.: :. *:*****:***:***:*****:* *.: *****:*		
LbPTR1	IDAMTNQPLLGFMTYTMMAKEALEGLTRSAALELAPLQVRVNGVSPGLS	LFPADMPSAVQA	239
LmPTR1	VDAMTNQPLLGYTYTMKAGALEGLTRSAALELAPLQIRVNGVGPGLS	VLVDDMPPAVWE	239
LaPTR1	VDAMTNRPLLGYTYTMKAGALEGLTRSAALELAPLQVRVNGIGPGLS	VLADDMPPAVRE	238
	:*****:*****:***** *****:*****:*****:*****:*****:*****		
LbPTR1	DYRSKVPLYQRESTAEVAAAVFFLCSSSAKYITGTCVKVDGGYSLTRA		288
LmPTR1	GHRSKVPLYQRDSSAAEVSDVVIFFLCSSKAKYITGTCVKVDGGYSLTR-		287
LaPTR1	DYRSKVPLYQRDSSAAEVSDVVIFFLCSSKAKYITGTCVKVDGGYSLTRA		287
	:*****:*** **.*. *:*****.*****:*****:*****		

Fonte: O próprio autor.

3.3 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO

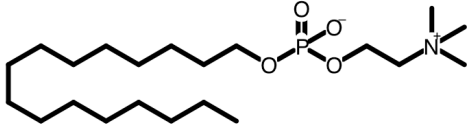
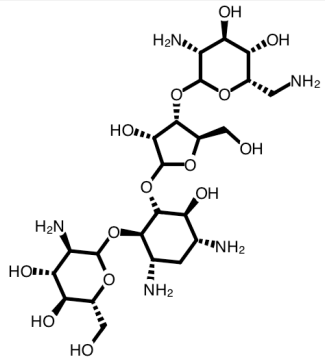
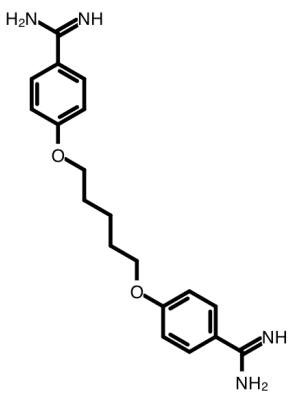
Apesar da sua importância para a saúde pública, não existem vacinas para o combate da Leishmaniose, razão pela qual quimioterápicos são a única estratégia terapêutica disponível para o tratamento de pacientes com leishmaniose (Tabela 1) (HODIAMONT et al., 2014; NAGLE et al., 2014; GOTO; LINDOSO, 2010).

Tabela 1 - Terapia atual e custos para o tratamento das Leishmanioses. (continua)

FÁRMACO/ FORMULAÇÃO	DOSAGEM	VIA DE ADMINISTRAÇÃO	CUSTO (US\$)	ESTRUTURA
Estibogluconato de sódio	20mg/Kg/dia por 30 dias	Intravenoso/ Intramuscular	70 -100 (ampola 100mL)	
Antimoniato de N-metil glucamina				
Anfotericina B	1mg/Kg/dia por 15 dias	Intravenoso	7,5 (frasco com 50mg – pó liofilizado)	
Anfotericina B (lipossomal)			18 (frasco com 50mg – pó liofilizado)	

Fonte: Adaptado de WHO, 2013.

Tabela 1 - Terapia atual e custos para o tratamento das Leishmanioses. (conclusão)

FÁRMACO/ FORMULAÇÃO	DOSAGEM	VIA DE ADMINISTRAÇÃO	CUSTO (US\$)	ESTRUTURA
Miltefosina	2,5mg/dia por 28 dias	Oral	70 (56 cápsulas)	
Paromomicina	15mg/Kg/dia por 21 dias	Intramuscular	15 (por tratamento)	
Pentamidina	2-4mg/Kg/dia por 15 dias	Intramuscular	45,31 (frasco com 300mg)	

Fonte: Adaptado de WHO, 2013.

Os antimoniais, estibogluconato de sódio (Pentosan®) e antimoniato de *N*-metil glucamina (Glucantime®), introduzidos em 1945, ainda são considerados como tratamento padrão para pacientes com diferentes manifestações clínicas de Leishmaniose (AMEEN, 2010; FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009). Esses fármacos possuem taxa de cura parasitológica superior a 90% frente a LV e LC (HALDAR; SEN; ROY, 2011) e são recomendados como tratamento de primeira linha (REITHINGER et al., 2007; SANGSHETTI et al., 2015). Contudo, o uso de antimoniais para o tratamento das leishmanioses é considerado insatisfatório em decorrência de fatores como o longo tempo de tratamento e incidência de efeitos adversos graves (ex. pancreatite, pancitopenia, neuropatias, elevação de aminotransferases séricas, insuficiência renal, hepática e cardiotoxicidade, inclusive com relatos de morte súbita) (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2010). Aliado a isso, erros de dosagem, frequência, intervalo entre doses, além do descontinuação da terapia têm contribuído para o desenvolvimento de resistência em regiões endêmicas, como a Índia e África (HALDAR; SEN; ROY, 2011).

Pacientes que não respondem aos fármacos de primeira linha, podem ser tratados com anfotericina B (Fungisone®), um antifúngico poliênico macrocíclico (SOARES-BEZERRA; LEON; GENESTRA, 2004). Apesar da eficácia clínica comprovada, esse fármaco causa nefrotoxicidade, anorexia, dispneia, entre outros efeitos colaterais. Além disso, sua utilização requer um tempo de hospitalização prolongado para contornar problemas de resistência (ROJAS DE ARIAS et al., 2013).

A paromomicina (Humatin®), por sua vez, é um antibiótico aminoglicosídeo, isolado de *Streptomyces rimosus* na década de 50, utilizado somente no tratamento de LV e LC. Da mesma forma que outros aminoglicosídeos, esse fármaco pode causar nefro e ototoxicidade (SUNDAR; SINGH; SINGH, 2014).

A miltefosina (Impavido®), originalmente desenvolvida como um agente antineoplásico, passou a ser empregada contra leishmaniose em 1990, quando se tornou o primeiro fármaco disponível por via oral (ANDRADE et al., 2011). Além de apresentar eficácia variável (taxa de cura de 91% frente a *L. panamensis* (CROFT; SEIFERT, DUCHENE, 2003) e de 53% para *L. braziliensis* (MACHADO et al., 2010)), esse fármaco apresenta efeitos adversos graves como hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, distúrbios gastrointestinais e teratogenicidade (SANGSHETTI et al., 2015).

A pentamidina (Pentacarinat®) é uma diamidina aromática que inibe enzimas como a Ornitina Descarboxilase (E.C 4.1.1.17) e a Espermidina Sintetase (E.C 2.5.1.16). Além disso, esse fármaco se liga à regiões ricas em A-T na fita de DNA, interferindo no processo de duplicação celular. Desde a década de 50, a pentamidina tem sido utilizada como tratamento de segunda escolha devido ao longo período de tratamento e aos seus efeitos colaterais (hipoglicemia, diabetes, taquicardia, etc.) (CARRANZA-RODRÍGUEZ et al., 2010).

3.4 ALVOS TERAPÊUTICOS PARA A LEISHMANIOSE – VIA METABÓLICA DE FOLATOS

As características descritas anteriormente indicam que os fármacos disponíveis para o tratamento de pacientes com leishmaniose apresentam muitos efeitos adversos, eficácia espécie-dependente e relatos de resistência, o que torna emergencial a busca de novas alternativas terapêuticas para o combate dessa doença.

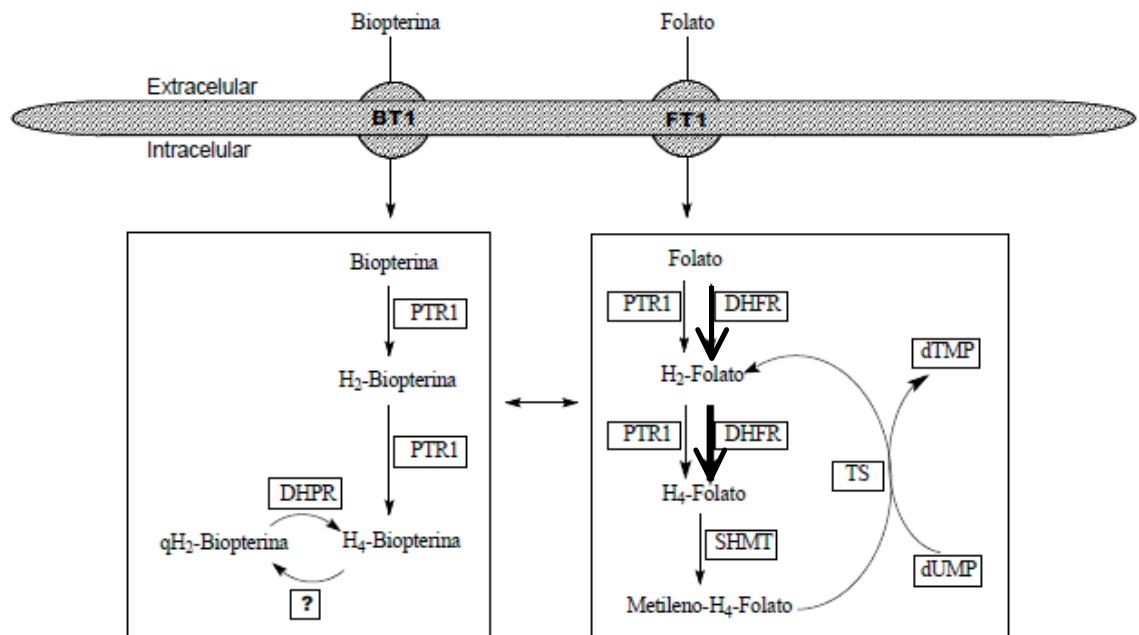
O primeiro passo para alcançar esse objetivo é selecionar um alvo terapêutico essencial para o parasito e que possa ser modulado de forma seletiva. Todavia, essa tarefa é dificultada pela biologia complexa dos parasitos e a escassez de alvos validados (WYATT et al., 2011). A validação do alvo molecular é fundamental, por estabelecer sua relevância para o processo fisiopatológico, ou seja, qual será a resposta farmacológica esperada quando o alvo é bloqueado/inibido.

A validação de alvos é realizada através de estratégias genéticas e/ou químicas. No primeiro caso, ocorre a inativação do gene que codifica uma determinada proteína ou se faz a deleção desse gene, enquanto que na segunda, moléculas bioativas são utilizadas para inibir/modular o alvo terapêutico e assim avaliar o efeito no parasito (HUGHES et al., 2011).

Devido à natureza auxotrófica desses parasitos para pteridinas, essas moléculas são acumuladas através de transportadores presentes na membrana plasmática (BT1 e FT1), os quais são responsáveis por captá-las do hospedeiro (JAIN et al., 2007; RICHARD et al., 2004). A abundância das pteridinas nos mamíferos por exemplo é explicada pela sua importância bioquímica. A função mais conhecida da tetraidrobiopterina no ser humano é de cofator para a tirosina-3-hidroxilase (E.C 1.14.16.2) e triptofano-5-hidroxilase (E.C 1.14.16.4), as quais são essenciais na biossíntese de amins biogênicas (SCRIVER et al., 1994).

Após a captação, essas moléculas são reduzidas (DHFR-TS/PTR1) e utilizadas no metabolismo parasitário, servindo para uma série de funções biológicas, como síntese de DNA e metacicloênese. Diante do exposto, as enzimas dessa via metabólica são alvos potenciais para o desenvolvimento de novos fármacos contra leishmaniose (Figura 6).

Figura 6 - Representação esquemática do metabolismo das pteridinas livres (Biopterina) e conjugadas (Folato) em *Leishmania sp.* Abreviaturas: PTR1, Pteridina Redutase (E.C 1.5.1.33) ; DHPR, Diidropteridina Redutase (E.C 1.5.1.34); DHFR, Diidrofolato Redutase (E.C 1.5.1.3); SHMT, Serina Hidroximetil transferase (EC 2.1.2.1); TS, Timidilato Sintase (E.C 2.1.1.45); dUMP, deoxi Uridina monofosfato; dTMP, deoxi Timidina monofosfato. A largura das setas indica a contribuição relativa de cada enzima nos passos em que mais de uma enzima está envolvida. O ponto de interrogação representa a enzima desconhecida que utiliza tetraidrobiopterina, levando-a diidrobiopterina quinonóide.



Fonte: CARVALHO, 2001.

De fato, a deleção do gene que codifica DHFR-TS é letal para o parasito a não ser que o meio de cultura seja suplementado com deoxi Timidina monofosfato (CUNNINGHAM; BEVERLEY, 2001; HARDY et al., 1997). A natureza bifuncional da DHFR-TS em *Leishmania*, juntamente com os estudos de validação genética apontam esta enzima como um alvo promissor para o desenvolvimento de agentes antiparasitários. Porém, estudos bioquímicos com antifolatos clássicos (ex.: dapsona, trimetopima e metotrexato) contradizem esse achado (IVANETICH; SANTI, 1990). Esse aparente paradoxo, decorre da ação de uma

redutase de cadeia curta, chamada Pteridina Redutase 1 (PTR1) que age como um desvio metabólico quando a DHFR-TS é inibida.

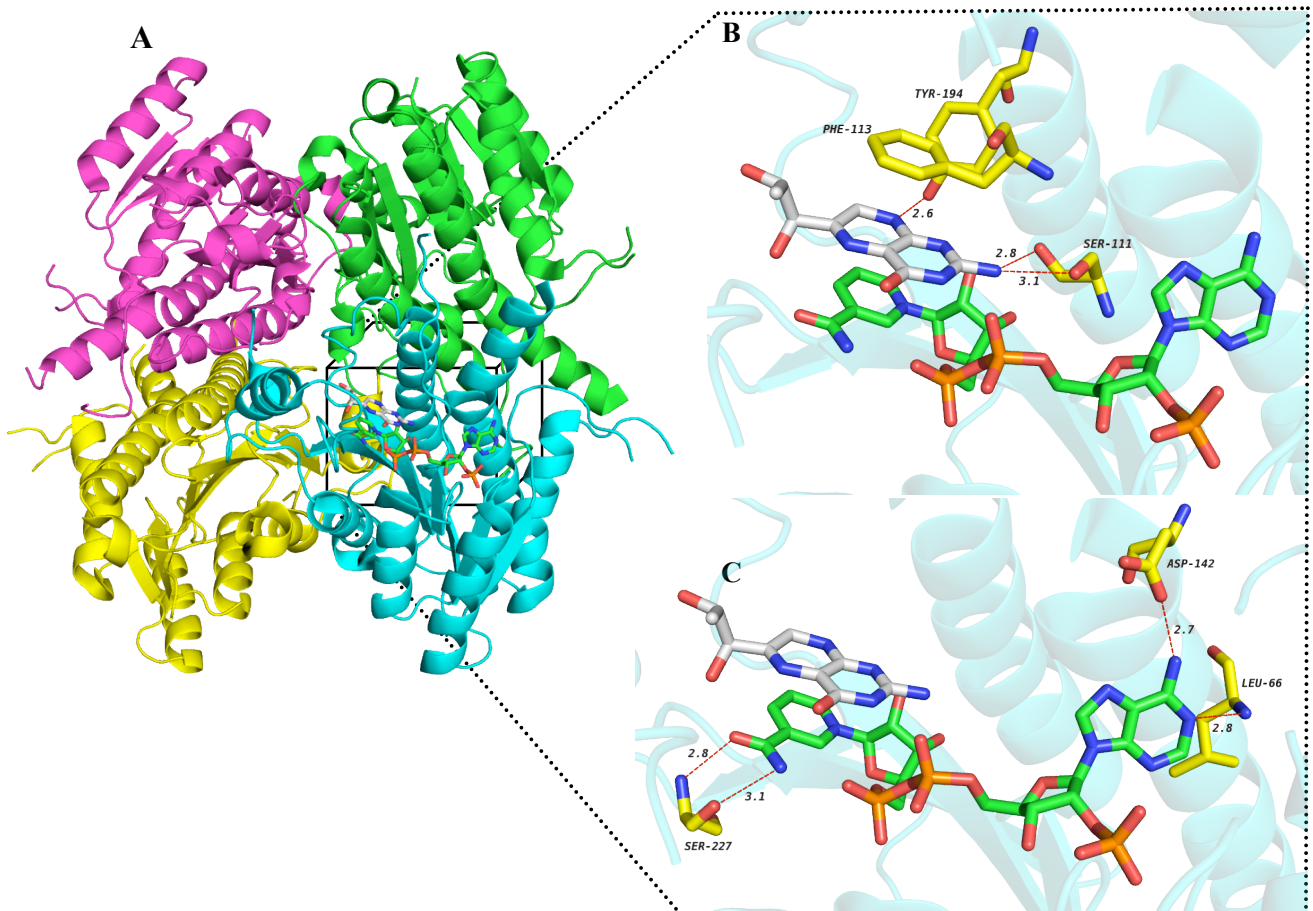
A deleção do gene que codifica PTR1 também é letal para o parasito, exceto quando o meio é suplementado por tetrahidrobiopterina. A ausência de PTR1 acarreta em modificações morfológicas drásticas, resultando em células com múltiplos núcleos, cinetoplastos e flagelos. Apesar da identificação de inibidores com afinidade frente a PTR1 (CAVAZZUTI et al., 2008), estudos de validação química ainda não foram relatados na literatura.

Esses fatores apontam a PTR1 como um alvo promissor para o desenvolvimento de novos fármacos contra leishmaniose (KUMAR; SUNDAR; SINGH, 2007). Adicionalmente, essa enzima apresenta a vantagem adicional de ser exclusiva de tripanossomatídeos, favorecendo assim o desenvolvimento de inibidores seletivos (SIENKIEWICZ; ONG; FAIRLAMB, 2010). Apesar da essencialidade da PTR1 para o parasito, estudos têm demonstrado que a inibição da DHFR-TS e PTR1 deve ser mais efetiva (VICKERS; BEVERLEY, 2011).

3.4.1 Pteridina Redutase 1 (PTR1)

PTR1 é uma enzima tetramérica com massa molecular de 120kDa (GOURLEY et al., 1999). A análise do complexo cristalográfico de PTR1 (PDB:1E92) com diidrobiopterina (H2B) e NADP⁺ (Figura 7) indica que o anel 2,4-diaminopteridina da H2B está envolvido em interações dipolo-dipolo com o anel da Phe-113 e ligações de hidrogênio com os resíduos Ser-111 e Tyr-194 (Figura 7-B). A conformação estendida do NADPH/NADP⁺, por sua vez, é estabilizada por uma série de ligações de hidrogênio com os resíduos Ser-227, Asp-142 e Leu-66 (GOURLEY et al., 2001) (Figura 7-C).

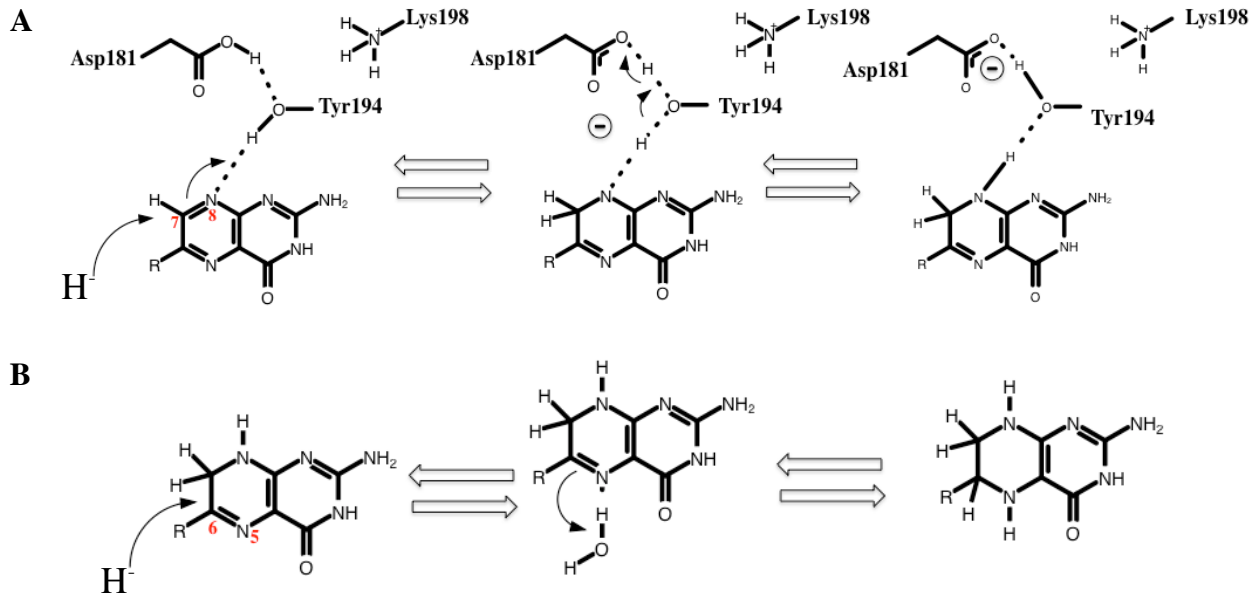
Figura 7 - Representação da estrutura tetramérica de PTR1 de *L. major* (PDB: 1E92) (A) com destaque para as interações do substrato (dihidrobiopterina) (B) e cofator (NADP+) (C) no sítio ativo. As linhas tracejadas em vermelho representam as ligações de hidrogênio. Os átomos de oxigênio e nitrogênio estão indicados em vermelho e azul, respectivamente, e os carbonos estão em cinza (dihidrobiopterina) ou verde (NADP+). Os aminoácidos estão representados em bastões com os carbonos em amarelo.



Fonte: O próprio autor.

O mecanismo catalítico da PTR1 se processa em duas etapas: Inicialmente, o hidreto (H^-) do NADPH é transferido para o carbono eletrofílico (C7) presente no anel pteridina. A seguir, o resíduo Asp-181 interage com a Tyr-194 promovendo a doação de um próton ao átomo N8 ligado ao C7 e a formação da dihidrobiopterina (H2B) (Figura 8-A). A Lys-198 participa da reação, estabilizando a espécie intermediária, “tirosinato”, através de uma interação eletrostática. Na segunda etapa, de forma semelhante, ocorre a transferência de um hidreto (H^-) do NADPH ao carbono eletrofílico C6, porém ao invés do resíduo Tyr-194, uma molécula de água atua como doador de próton ao átomo N5, resultando na formação de tetrahydrobiopterina (H4B) (Figura 8-B).

Figura 8 - Mecanismo catalítico proposto para PTR1 de *L. major*. Resíduos que participam da redução da biopterina para diidrobiopterina (A) e, posteriormente, para tetraidrobiopterina (B) estão destacados.



Fonte: Adaptado de Gourley et al., 2001.

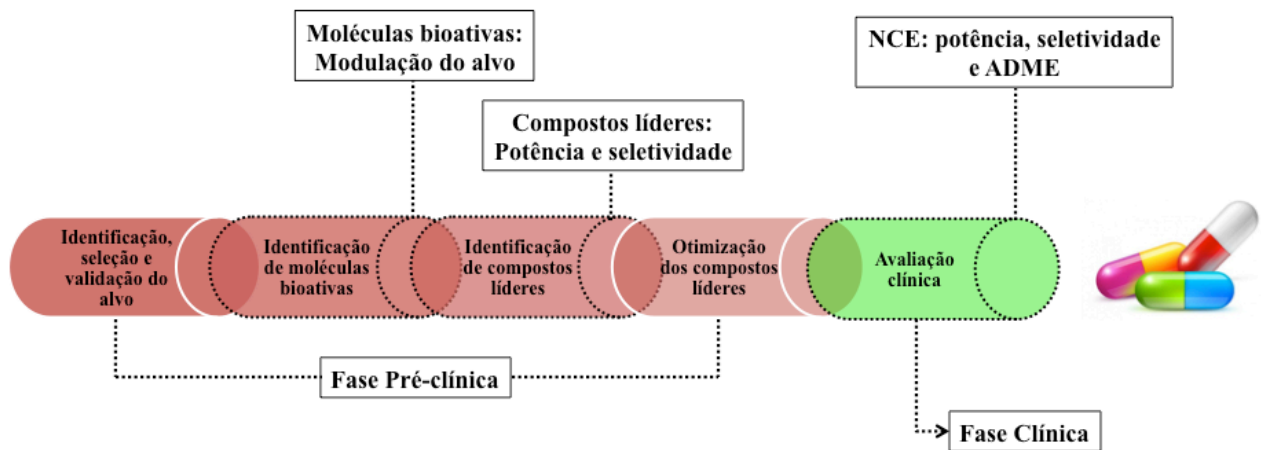
A compreensão do mecanismo catalítico foi essencial para guiar o planejamento de inibidores capazes de mimetizar as interações do substrato e/ou cofator com PTR1. Por exemplo, estudos anteriores sugerem que o núcleo 2,4 diaminopteridina é essencial para a inibição de PTR1, pois ele é capaz de realizar as mesmas interações que o substrato (CORONA et al., 2012; FERRARI et al., 2011; HARDY et al., 1997; CAVAZZUTI et al., 2008; SCHÜTTELKOPF et al., 2005). Entretanto, análogos do substrato/produto têm apresentado toxicidade em linhagens de células humanas (CORONA et al., 2012). Para contornar esse problema, estratégias químico-medicinais modernas podem ser utilizadas para identificar e/ou planejar novas classes de inibidores de PTR1 de *L. major*.

3.5 QUÍMICA MEDICINAL E A DESCOBERTA DE FÁRMACOS

O processo de desenvolvimento de novos fármacos é dividido em duas grandes fases (Figura 9): Nos estágios iniciais, as pesquisas se concentram na identificação e otimização de moléculas capazes de modular a atividade do alvo macromolecular (DAHLIN; INGLESE; WALTERS, 2015). Dessa forma, o desenvolvimento de fármacos se inicia com a descoberta de uma molécula que apresente atividade biológica *in vitro* (JORGENSEN, 2012). Na

indústria farmacêutica, geralmente, os testes iniciais são realizados com proteínas recombinantes, com o intuito de avaliar a atividade biológica de cada molécula frente ao alvo isolado. A seleção e padronização dos testes levam em consideração, não só sua relevância farmacológica, mas também a reprodutibilidade, custo e sensibilidade do método (HUGHES et al., 2011).

Figura 9 - Estágios envolvidos no processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos (ADME = Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção; NCE = nova entidade química).



Fonte: O próprio autor.

Nessa etapa, geralmente, são identificadas moléculas com baixa potência, que necessitam ser otimizadas em relação a uma série de propriedades (potência, afinidade, seletividade, biodisponibilidade, etc.) antes de serem testadas em modelos animais (WALTERS; NAMCHUK, 2003). Os resultados obtidos durante a otimização permitem o estabelecimento e análise das relações entre a estrutura química e a atividade biológica (REA) das moléculas testadas.

Estudos de REA auxiliam no planejamento de novas moléculas com propriedades otimizadas, minimizando o universo de compostos a serem considerados nos programas de triagem biológica. Idealmente, propriedades farmacodinâmicas como potência, afinidade e seletividade, além de propriedades farmacocinéticas de Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção (ADME) devem ser consideradas conjuntamente, facilitando a eliminação de candidatos com propriedades inadequadas (LOMBARDINO; LOWE, 2004).

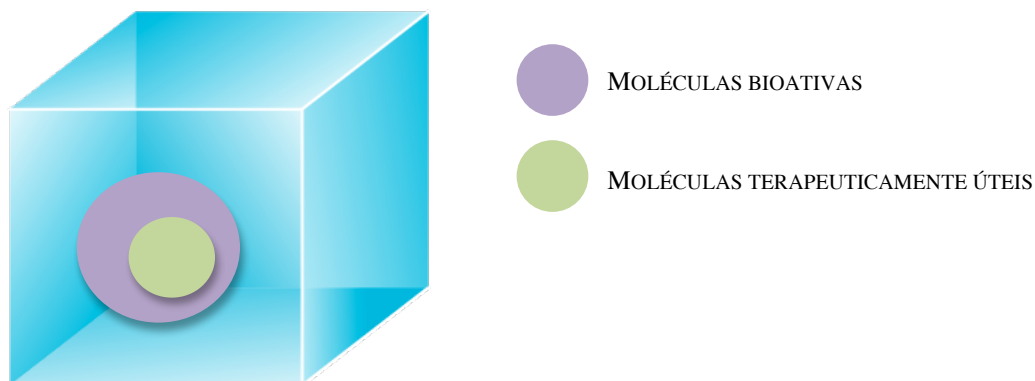
As moléculas candidatas à NCE são avaliadas quanto à sua toxicidade em modelo animal e, posteriormente, se aprovadas em todos os testes, são direcionadas para transposição de escala para viabilizar os estudos de fase clínica, que se dividem em 4 estágios. Na fase clínica I são realizados testes de dosagem dos princípios ativos em um grupo de voluntários saudáveis (20-100 indivíduos) para avaliação da toxidez. Na fase clínica II iniciam os testes em pacientes que apresentam a doença (100-500 indivíduos) para a avaliação da dosagem, eficácia e segurança. Na fase clínica III são realizados testes farmacológicos em um número maior de pacientes (1.000-5.000 indivíduos) distribuídos em regiões geográficas representativas, para uma melhor avaliação das propriedades farmacocinéticas, além de eficácia e segurança. Ao término da fase III, todos os dados clínicos obtidos são organizados e submetidos às agências regulatórias para solicitação da aprovação. No último estágio (Fase IV) é realizado o monitoramento pós-comercialização a longo prazo do novo fármaco (MCGEE, 2006).

Como consequência de todas as etapas e exigências discutidas acima, o planejamento de um novo fármaco é um processo longo, complexo e de custo elevado (DICKSON; GAGNON, 2004). Estima-se que são necessários em média 15 anos para que uma nova entidade química chegue ao mercado, ao custo de até 2,6 bilhões de dólares (MULLIN, 2014).

3.5.1 Estratégias para a identificação de moléculas bioativas

Uma das dificuldades encontradas para a identificação de um composto bioativo é que o espaço químico disponível para moléculas com até 500 Da (10^{40}) (PETIT-ZEMAN, 2004) é muito maior que aquele presente nos bancos de moléculas comerciais (aproximadamente 10^7), ou seja, existe a possibilidade real de que o espaço das moléculas com atividade biológica para um determinado alvo terapêutico, seja distinto daquele disponível atualmente. Em virtude disso, um dos maiores desafios da química medicinal é encontrar maneiras racionais de maximizar a sobreposição do espaço químico com os espaços de moléculas biologicamente ativas e terapeuticamente úteis (Figura 10) (LIPINSKI; HOPKINS, 2004).

Figura 10 - Representação do espaço químico de todas as moléculas possíveis (cubo) com a área de moléculas bioativas (círculo roxo) e aquelas com propriedades físico químicas para uso terapêutico (círculo verde).



Fonte: Adaptado de LIPINSKI; HOPKINS, 2004.

Uma das formas para priorizar o estudo do espaço químico de moléculas bioativas é a compreensão do mecanismo fisiopatológico. Essa abordagem parte do princípio que uma doença pode ser resultado de uma alteração em uma via bioquímica relacionada a um determinado alvo ou gene, que resultará no aparecimento de uma determinada manifestação clínica (SAMS-DODD, 2006). Nesse processo, a descoberta de fármacos pode ser conduzida baseada no aspecto fisiológico ou através do conhecimento do mecanismo de ação e/ou estrutura tridimensional (3D) do alvo.

A abordagem fisiológica busca alcançar um efeito terapêutico através da redução de um determinado sintoma ou condição clínica. O primeiro passo para a triagem de moléculas nessa abordagem é desenvolver um modelo da doença, que mimetiza determinados sinais clínicos, que pode ser utilizado para descrever o potencial biológico das moléculas teste. Uma das limitações dessa técnica é o número reduzido de moléculas que são avaliadas devido a necessidade de um modelo de doença apropriado (SAMS-DODD, 2005).

A abordagem baseada no mecanismo de ação fundamenta-se no conhecimento prévio do processo fisiopatológico envolvido e na escolha do alvo terapêutico (BARREIRO, 2002). A seguir, a informação da estrutura 3D do alvo biológico é utilizada na identificação das principais características estereo-eletrônicas responsáveis pelo reconhecimento do ligante frente ao alvo. Estudos tem mostrado que os métodos baseados no alvo são superiores a abordagem fisiológica quando se têm informações sobre a essencialidade do receptor em um determinado processo bioquímico (SAMS-DODD, 2006).

Na ausência da informação 3D do alvo molecular, estratégias baseadas no conhecimento da estrutura de moléculas ativas, que possuem o mesmo mecanismo de ação, podem auxiliar no reconhecimento de requisitos estruturas essenciais para a atividade biológica (KELLICI et al., 2015).

3.5.1.1 Triagem Virtual

Métodos computacionais têm exercido um importante papel nas etapas de identificação de moléculas ativas (SLIWOSKI et al., 2014). Dentre esses métodos destaca-se a Triagem Virtual (TV) que tem como objetivo identificar moléculas promissoras em uma biblioteca de compostos que apresentam complementariedade com o sítio ativo/alostérico do alvo ou características físico-químicas presentes em ligantes conhecidos. Essa estratégia possibilita priorizar moléculas com elevado potencial de interagir com a proteína alvo, para posterior avaliação bioquímica. A TV surgiu como uma alternativa para a descoberta de novas moléculas com potencial terapêutico, haja vista que a identificação por técnicas tradicionais como HTS, possuem elevado custo, tempo e na grande maioria das vezes com baixa taxa de sucesso (identificação de inibidores verdadeiros) (FERREIRA; OLIVA; ANDRICOPULO, 2011).

A TV pode ser realizada com base em informações do ligante (LBVS, do inglês *Ligand based Virtual Screening*) ou da estrutura 3D do alvo (SBVS, do inglês *Structure based Virtual Screening*) (RIPPHAUSEN et al., 2010). Os métodos LBVS utilizam moléculas com atividade biológica conhecida e que dividem o mesmo mecanismo de ação, as quais servem como moldes para a busca de novas moléculas com padrão similar. Esses métodos podem ser classificados em três categorias: (i) Similaridade química, que utilizam padrões moleculares para identificar e classificar moléculas como similares ou diferentes de um ligante (ii) Relação estrutura atividade quantitativa, que busca identificar e quantificar as relações entre a estrutura química e atividade biológica e (iii) Farmacóforo, que tem como objetivo identificar características estereo-eletrônicas presentes em moléculas ativas que são essenciais para a atividade biológica e que portanto podem ser empregadas para a identificação de novas moléculas bioativas (SUN, 2008; RELLA et al., 2006).

O SBVS é uma abordagem baseada no conhecimento do arranjo topológico de alvos moleculares, ou seja, depende da disponibilidade da estrutura 3D da macromolécula. Nessa abordagem, o objetivo é explorar o reconhecimento molecular entre o ligante e o alvo para

priorizar a seleção de moléculas com maior probabilidade de terem afinidade pelo sítio de ligação. No SBVS, o acoplamento molecular é a técnica central que busca predizer a melhor orientação de um ligante no sítio e classificá-la com base nas interações intermoleculares através de funções de pontuação. A aplicação dessa técnica permite priorizar moléculas candidatas a ensaios biológicos com base na sua pontuação (LAVECCHIA; DI GIOVANNI, 2013; MITTAL et al., 2005).

Dentre as estratégias de TV, os modelos farmacofóricos têm apresentado uma taxa de sucesso até 1000 vezes maior que de ensaios randômicos (SHOICHET, 2004) e cinco vezes maior que o acoplamento molecular (CHEN, 2015; CHEN et al., 2009).

3.5.1.1.1 Modelos Farmacofóricos

O modelo farmacofórico descreve as características presentes em um conjunto de moléculas ativas que são essenciais para a interação frente ao alvo, como grupos doadores e aceptadores de ligação de hidrogênio, centros hidrofóbicos, grupos aromáticos, grupos carregados positivamente ou negativamente (LANGER; HOFFMAN, 2006; LIAO et al., 2011; XIANG; HOU; ZHANG, 2012). Assim, a determinação dessas características podem auxiliar o planejamento de moléculas mais seletivas. Adicionalmente, o modelo farmacofórico pode ser utilizado como molde para a busca e seleção de moléculas que satisfaçam os principais requisitos moleculares responsáveis pela atividade biológica (KOTHANDAN et al., 2013).

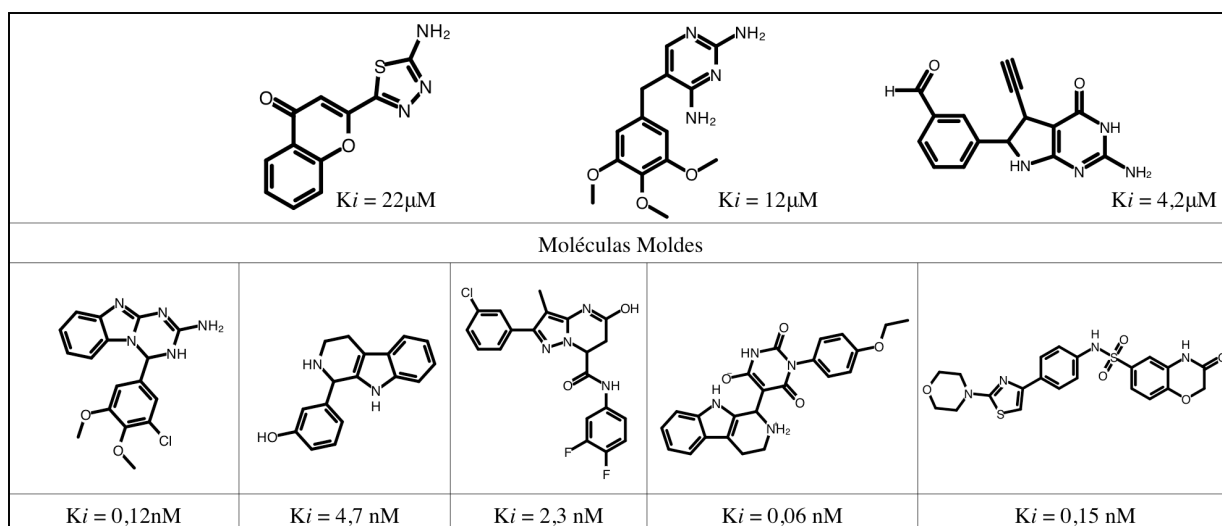
Os programas para a geração de modelos farmacofóricos diferem basicamente quanto a estratégia de alinhamento e tipo de característica utilizada na construção dos modelos (YANG, 2010). O programa GALAHAD™, por exemplo, utiliza algoritmo genético para a amostragem conformacional e alinhamento dos confôrmeros e posteriormente emprega as seguintes características: nitrogênios carregados positivamente, nitrogênios carregados negativamente, centros hidrofóbicos, átomos doadores e aceptadores de ligação de hidrogênio, para a construção dos modelos farmacofóricos (SHEPPHARD; CLARK, 2006).

A geração dos modelos farmacofóricos no programa GALAHAD™ é realizada em dois estágios: No primeiro, as conformações dos ligantes são geradas através do algoritmo genético (AG). No segundo, as conformações são alinhadas entre si e avaliadas quanto ao grau de sobreposição molecular (STERICS), grau de sobreposição das características farmacofóricas nos confôrmeros (HBOND) e energia total dos confôrmeros (ENERGY)

(LONG et al., 2008). A seguir, os alinhamentos que apresentam menores valores de energia, geralmente inferior a 100kcal/mol e maiores valores de STERICS e HBOND são utilizados para a construção de uma representação tridimensional, denominada hipermolécula, que reúne as características farmacofóricas comuns entre os confôrmeros (RICHMOND et al., 2006). Após essa etapa, as hipermoléculas são avaliadas quanto ao ajuste das características presentes nos ligantes utilizados para a geração dos modelos em relação aos pontos farmacofóricos (MOL_QRY). Por fim, os quatro componentes de avaliação descritos acima são utilizados para a obtenção da pontuação de Pareto, na qual um valor igual a zero indica que nenhum modelo é estatisticamente superior aos demais (CABALLERO, 2010).

Uma vez que grupamentos químicos distintos podem apresentar características físico químicas semelhantes e, por conseguinte, desempenhar a mesma função biológica (PATANI; LAVOIE, 1996), modelos farmacofóricos podem ser usados como moldes para identificação de quimiotipos diferentes daqueles utilizados para construção do modelo farmacofórico, facilitando assim a descoberta de novas classes de moléculas com a atividade biológica desejada (WAUGH et al., 2014). Dube e colaboradores (2012), por exemplo, utilizaram um modelo farmacofórico construído com inibidores de PTR1 de *L. major* (dois grupos doadores e dois centros hidrofóbicos) para identificar moléculas ativas, mas com quimiotipos diferentes das estruturas moldes utilizadas na construção do modelo (Figura 11).

Figura 11 - Estrutura das moléculas moldes e moléculas selecionadas com auxílio do modelo farmacofórico proposto por Dube e colaboradores (2012).



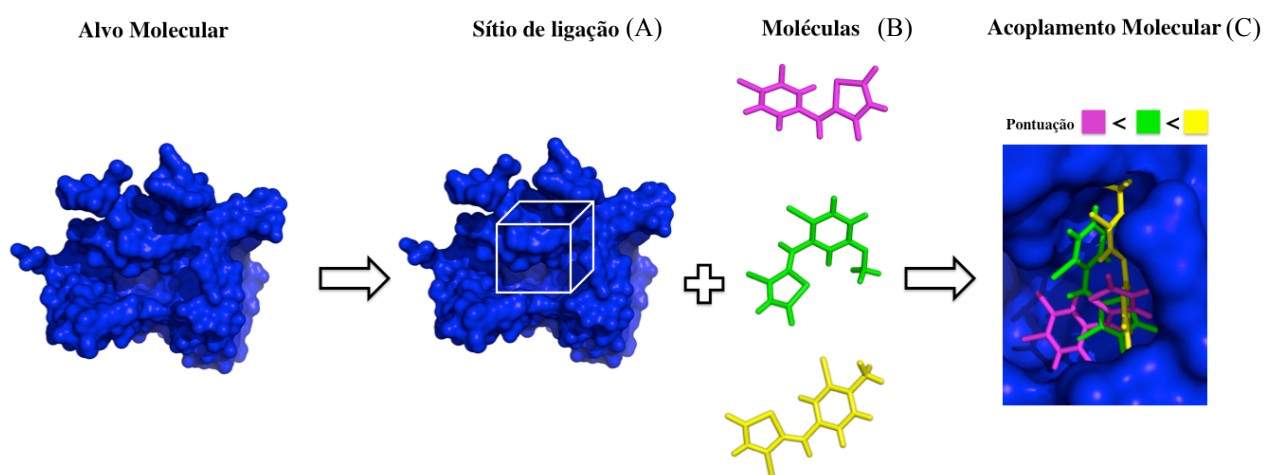
Fonte: O próprio autor.

Apesar das vantagens dos modelos farmacofóricos na etapa de triagem virtual, algumas limitações são inerentes à técnica, como dificuldade no alinhamento de moléculas flexíveis e a ausência de restrições estéreas impostas pelo sítio alvo. Assim, quando a estrutura 3D do alvo macromolecular está disponível, a aplicação do acoplamento molecular pode ser uma alternativa para auxiliar na priorização de moléculas candidatas a ensaios biológicos (KUMAR; ZHANG, 2014).

3.5.1.1.2 Acoplamento Molecular

O acoplamento molecular é uma técnica computacional que permite avaliar os diferentes modos de ligação de uma molécula no sítio alvo e indicar aqueles com maior probabilidade de interação. Essa técnica é aplicada em diferentes estágios do processo de desenvolvimento de fármacos com o objetivo de cumprir três propostas: prever o modo de ligação de uma molécula conhecida, identificar moléculas promissoras para ensaios biológicos e prever a afinidade de ligação relativa de moléculas congêneras (Figura 12) (TANG; MARSHALL, 2011; FERREIRA et al., 2010).

Figura 12 - Etapas envolvidas no acoplamento molecular, desde a delimitação do espaço de procura no alvo molecular (sítio de ligação) (A), amostragem conformacional (B), posicionamento e pontuação (C) das diferentes conformações geradas.



Fonte: O próprio autor.

O processo de acoplamento molecular pode ser dividido em duas etapas: a busca conformacional e predição da afinidade do ligante pelo sítio. Na primeira etapa, os programas utilizam diferentes algoritmos de busca que podem ser classificados em três categorias: (i) métodos sistemáticos (construção incremental, amostragem conformacional, etc.); (ii)

métodos aleatórios ou estocásticos (método de Monte Carlo, Algoritmo Genético, etc.); (iii) métodos de simulação (Dinâmica Molecular e Minimização de Energia). Esses algoritmos permitem atribuir flexibilidade à molécula e assegurar a geração de diferentes conformações no sítio de ligação (HUANG; GRINTER; ZOU, 2010).

Os métodos sistemáticos utilizam os graus de liberdade das estruturas para promover uma fragmentação e posterior construção incremental. A simulação se inicia com o posicionamento de um fragmento âncora no sítio ativo/alostérico e posteriormente os fragmentos remanescentes são adicionados sucessivamente até alcançar a reconstrução total. Esse método está baseado no fato de que toda a molécula possui pelo menos um grupo rígido capaz de interagir em vários locais de forma favorável. Assim, os fragmentos remanescentes são adicionados a esses grupos possibilitando uma exploração do espaço conformacional. O programa Surfex-Dock (JAIN, 2003) adota uma estratégia semelhante, mas que utiliza similaridade morfológica para a orientação de conformações dos fragmentos.

Os métodos estocásticos realizam mudanças aleatórias na estrutura, geralmente alterando o ângulo diédrico das ligações rotacionáveis, permitindo explorar diversas conformações. Por exemplo, no método de Monte Carlo, as mudanças geram alterações nos ângulos translacionais, rotacionais e torcionais da molécula para obtenção de novos confôrmeros. Outro método estocástico implementado em programas de acoplamento molecular (ex.: GOLD, AutoDock) é o algoritmo genético no qual operadores evolutivos, como mutação e cruzamento, promovem modificações em ângulos torcionais. De forma prática, todas as informações de ângulos de torção de uma molécula são armazenadas como uma sequência numérica, que irá corresponder ao “cromossomo”. Dentro deste “cromossomo”, cada “gene” corresponde a um ângulo de torção (RODRIGUES et al., 2012).

Nos métodos de simulação, todos os aspectos de flexibilidade, envolvidos nas interações proteína-ligante são contabilizados. Devido à demanda computacional, essa estratégia é pouco utilizada nas etapas de triagem virtual (GUIDO; OLIVA; ANDRICOPULO, 2008).

Na segunda etapa, os diferentes confôrmeros gerados são avaliados através de uma função de pontuação (BROOIJMANS; KUNTZ, 2003; WARREN et al., 2006). Essas funções são algoritmos que permitem estimar a afinidade das moléculas através das forças de interação intermoleculares. Há basicamente 3 classes de função de pontuação: (i) baseada em campo de força; (ii) empíricas e (iii) baseada no conhecimento (KITCHEN et al., 2004).

Na função de pontuação baseada em campo de força, a energia de interação é estimada pela soma das forças de interações intermoleculares através da definição do campo de força que é um conjunto dos potenciais de interação entre as partículas, que descrevem aspectos do comportamento molecular entre átomos ligados como o estiramento de ligações químicas, distorção de um ângulo de ligação e átomos não ligados como forças eletrostáticas, ligação de hidrogênio e forças de van der Waals (DURRANT; MCCAMMON, 2011). Alguns programas implementam esse tipo de função de pontuação, como o AutoDock4, EADock e GOLD (HUANG; GRINTER; ZOU, 2010).

As funções empíricas representam a afinidade de um ligante também como um somatório de potenciais de interação, mas que agora são ajustados para reproduzir dados experimentais (K_i) de um conjunto de treinamento (SOUZA; FERNANDES, RAMOS, 2006). Essas funções estão implementadas nos programas GOLD e SURFLEX-DOCK (KELLENBERGER et al., 2004)

As funções de pontuação baseadas no conhecimento levam em consideração dados estatísticos de frequência de contatos entre átomos presentes em complexos proteína-ligante para criar potenciais que são utilizados para ranquear as poses. Essas funções estão disponíveis em programas como o DrugScore, DOCK e GOLD (CHEN, 2015).

No processo de interação fármaco-receptor, a energia livre de ligação é estimada através das contribuições entálpicas e entrópicas. As funções de pontuação avaliam de maneira aproximada essas forças, uma vez que o componente entálpico está razoavelmente caracterizado e descrito, entretanto, as contribuições entrópicas são difíceis de descrever, pois dependem de um número significativo de fatores, como por exemplo, a liberação de moléculas de água ligadas à cavidade de ligação. Portanto, as funções de pontuação implementadas nos programas de acoplamento molecular são simplificadas e portanto, aproximadas. Além disso, essas funções de pontuação não consideram a flexibilidade total do complexo proteína-ligante, limitando-se em alguns casos apenas à flexibilidade das cadeias laterais (HUANG; GRINTER; ZOU, 2010).

A limitação dos programas de acoplamento em contabilizar a flexibilidade, pode acarretar em erros nas predições dos modos de ligação e por conseguinte na estimativa da afinidade. Uma estratégia para contornar esse problema é a aplicação das leis newtonianas para avaliar a flexibilidade total do complexo ligante-macromolécula, como implementado no método de Dinâmica Molecular (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008).

3.5.1.2 Dinâmica Molecular

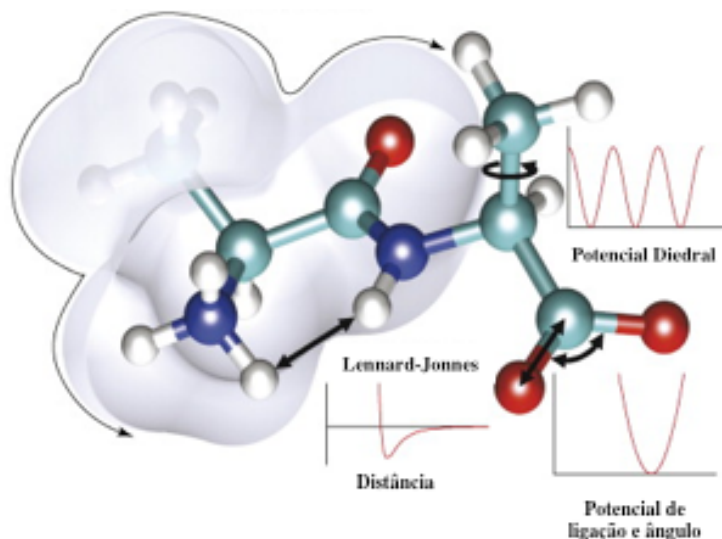
Dinâmica Molecular (DM) é uma técnica de simulação que calcula o movimento dos átomos em uma molécula ou de átomos individuais ou moléculas em sólidos, líquidos e gases, de acordo com as leis do movimento de Newton (VERLI, 2014). A DM permite avaliar o padrão de flexibilidade conformacional de um determinado sistema em função do tempo, o que traz uma aproximação mais realista dos fenômenos biológicos (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008).

Na DM, as moléculas são tratadas como uma coleção de átomos que podem ser descritas por forças newtonianas, ou seja, são tratadas como um conjunto de partículas unidas por forças harmônicas ou elásticas que se movem sob a influência da mecânica clássica (MAGINN; ELLIOTT, 2010). A simulação de DM consiste na solução numérica da segunda lei de Newton (Equação 1):

$$F_i(t) = m_i \cdot a_i \quad (1)$$

em que F_i representa a força que atua sobre cada partícula do sistema em um instante de tempo t , e a_i é a aceleração do átomo i de massa m_i . Para a resolução dessa equação é necessário o cálculo das forças interatômicas e intermoleculares através das componentes descritas nos campos de força (Figura 13).

Figura 13 - Representação esquemática dos potenciais componentes de um campo de força.



Fonte: Adaptado de BOAS; HARBURY, 2007.

Os programas disponíveis para a realização de simulações de DM diferem basicamente quanto a disponibilidade (gratuito ou pago), custo computacional e tipos de campos de força disponíveis. Por exemplo, GROMACS (VAN DER SPOEL et al., 2005) é um programa de acesso livre que utiliza o campo de força GROMOS de átomos unidos, no qual átomos de hidrogênio ligados a átomos de carbono são unidos a este elemento. Entretanto, hidrogênios presentes em anéis aromáticos são descritos explicitamente. Esta simplificação permite um menor custo computacional do cálculo e, por conseguinte, um melhor desempenho nas simulações de DM em relação a outros programas (LOEFFLER, WINN, 2012).

Como o processo de reconhecimento de um ligante frente a um alvo macromolecular é dinâmico, a utilização da DM têm contribuído de forma significativa para o planejamento de fármacos mais seletivos e potentes (ALONSO; BLIZNYUK; GREASY, 2006), pois permite estimar a estabilidade das interações intermoleculares durante a simulação. Além disso, esta técnica permite avaliar a função da água e seus efeitos sobre a estabilidade de complexos proteína-inibidor (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008).

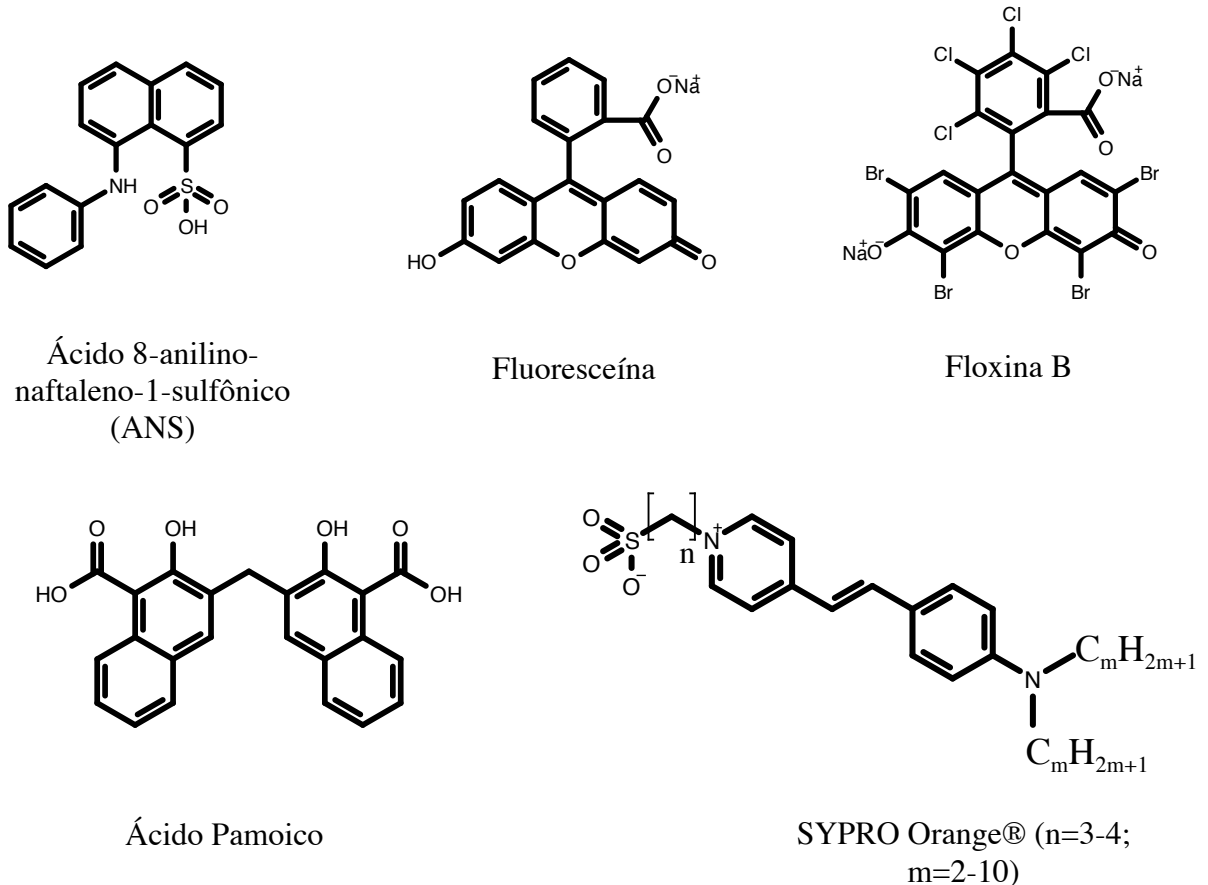
Apesar das vantagens dessa técnica, o custo computacional limita a utilização da DM para avaliar grandes bibliotecas de moléculas. Assim, é necessário empregar outras estratégias como modelos farmacofóricos e/ou acoplamento molecular para priorizar um conjunto pequeno de moléculas (10-20) que serão estudadas por DM (ALONSO; BLIZNYUK; GREASY, 2006; MORTIER et al., 2015). Mesmo com essas características, dinâmica molecular não permite considerar todos os fatores relacionados à atividade biológica. Portanto, é necessário confirmar a ação biológica das moléculas por meio de ensaios automatizados (ex.: ThermoFluor®) que possibilitem a integração com a etapa de triagem virtual.

3.6 ThermoFluor®

ThermoFluor® é uma técnica baseada em deslocamento térmico útil para identificar tampões, aditivos (sais, íons e etc.) e moléculas responsáveis pela estabilização ou desestabilização da estrutura nativa de uma proteína (PANTOLIANO et al., 2001; GRØFTEHAUGE et al., 2015). Essa técnica permite avaliar o efeito de ligantes sobre a estabilidade térmica da proteína através da fluorescência emitida quando o fluoróforo interage com sítios hidrofóbicos da proteína em decorrência do desenovelamento relacionado ao

aumento da temperatura (CUMMINGS; FARNUM; NELEN, 2006). Diferentes fluoróforos podem ser empregados para esse propósito (Figura 14).

Figura 14 - Estrutura química dos principais fluoróforos utilizados no ThermoFluor®.



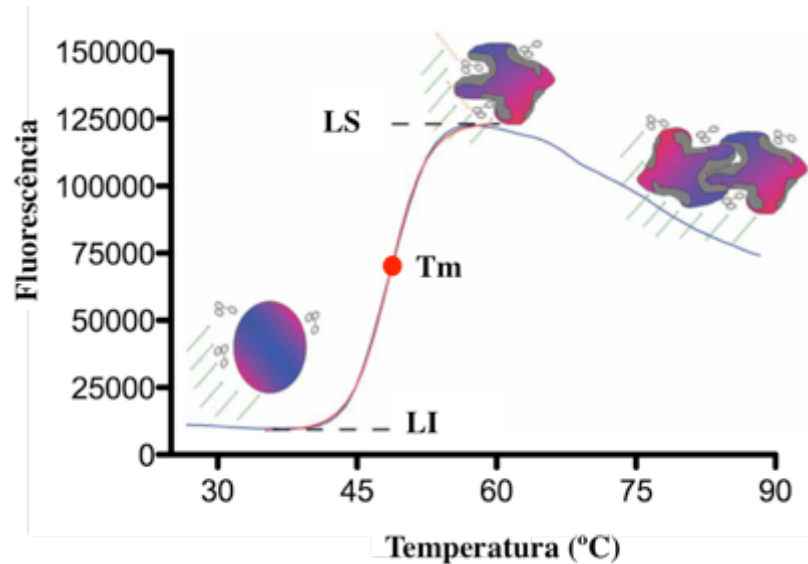
Fonte: O próprio autor.

Embora ANS seja o fluoróforo mais utilizado nos ensaios de ThermoFluor®, devido à sua resistência à fotodegradação, solubilidade em meio aquoso e sua estabilidade química (CIMPERMAN; MATULIS, 2011), SYPRO® Orange oferece a vantagem de ter excitação/emissão em comprimentos de onda equivalentes aos dos filtros FAM™ (492 nm) e ROX™ (610 nm), o que permite a utilização de aparelhos RT-PCR para mensurar a estabilidade térmica das proteínas.

Em um experimento típico de ThermoFluor®, se observa aumento da fluorescência à medida que a temperatura aumenta, ou seja, em função do desenovelamento proteico. Após o pico de fluorescência há um decréscimo do sinal devido a agregação e precipitação da proteína diminuindo a exposição de sítios hidrofóbicos (Figura 15) (CUMMINGS; FARNUM; NELEN, 2006; ZHANG; MONSMA, 2010). A curva entre o limite inferior e

superior apresenta um formato sigmoidal, que permite o cálculo da temperatura média (T_m) da transição entre as conformações nativa e não nativa.

Figura 15 - Representação esquemática da curva de fluorescência *versus* temperatura obtida nos ensaios de ThermoFluor®. LI, limite inferior; LS, limite superior; T_m = temperatura média do equilíbrio entre o estado enovelado e desenovelado.



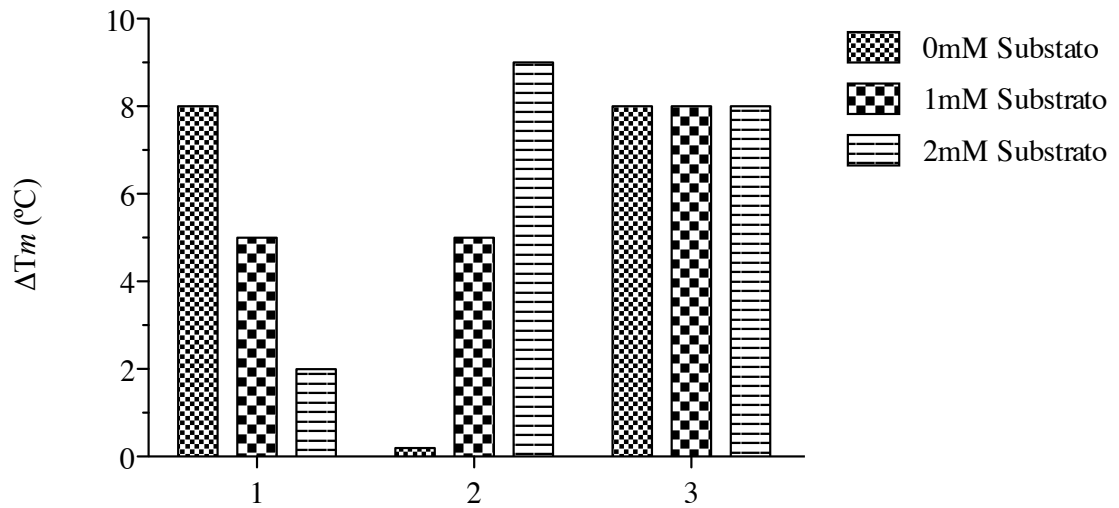
Fonte: Adaptado de NIESEN; BERGLUND; VEDADI, 2007.

Moléculas que têm afinidade pelo estado nativo da proteína estabilizam essa forma e, portanto, aumentam o valor de T_m , gerando um deslocamento térmico (ΔT_m) positivo quando comparado ao valor de T_m da proteína sozinha (KOPEC; SCHNEIDER, 2011; ERICSSON et al., 2006).

Mais recentemente, essa técnica tem sido explorada também para investigar a modalidade de inibição de moléculas bioativas (HOLDGATE et al., 2010; LEA; SIMEONOV, 2012; VENKATRAMAN et al., 2012). Por exemplo, quando o experimento de ThermoFluor® é realizado na presença de um ligante endógeno (ex.: substrato/cofator) o efeito da molécula de interesse sobre a estabilidade térmica pode sofrer decréscimo, aumentar ou permanecer inalterado. A diminuição no efeito sobre o deslocamento térmico pode ser resultado da competição com o ligante endógeno pelo mesmo sítio de ligação, enquanto que o aumento pode estar relacionado a alteração conformacional da proteína na presença do ligante endógeno que possibilita uma maior afinidade da molécula de interesse ao sítio de ligação. Quando a molécula se liga em outro sítio não relacionado ao ligante endógeno, o valor de T_m

deve permanecer inalterado. Em função do resultado obtido, o inibidor pode então ser classificado como competitivo, incompetitivo ou não competitivo (Figura 16).

Figura 16 - Representação do efeito sobre a estabilidade térmica de uma proteína frente a três diferentes tipos de inibidores (**1**, competitivo; **2**, incompetitivo e **3**, não competitivo) na presença de duas concentrações de substrato.



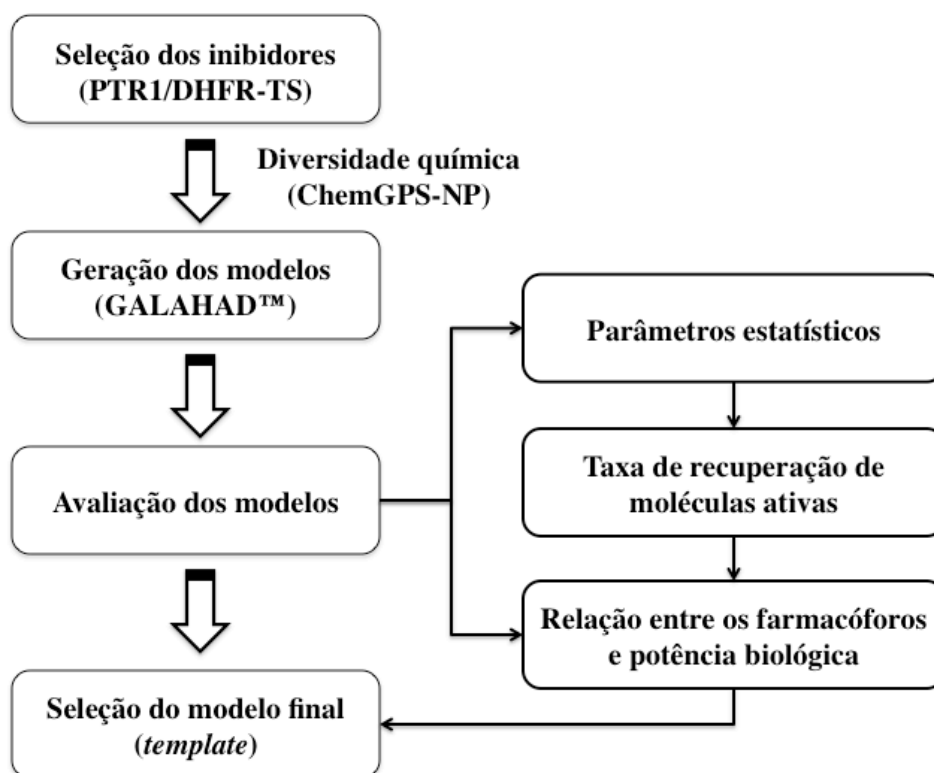
Fonte: Adaptado de VENKATRAMAN et al., 2012.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA A CONSTRUÇÃO, AVALIAÇÃO E SELECÇÃO DE MODELOS FARMACOFÓRICOS

Os modelos farmacofóricos para inibidores de LmPTR1 e LmDHFR-TS foram construídos conforme as etapas descritas no esquema 1 e avaliados com base em parâmetros estatísticos do programa GALAHAD™. A seguir, os modelos adequados foram testados quanto a sua capacidade de discriminar inibidores verdadeiros de falsos positivos. Após essa etapa, os modelos com bom poder discriminatório foram avaliados quanto a capacidade de explicar a potência biológica de moléculas não usadas na construção dos modelos.

Esquema 1 - Etapas utilizadas para a geração, avaliação e seleção dos modelos farmacofóricos de inibidores frente a LmPTR1 e LmDHFR-TS.



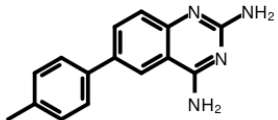
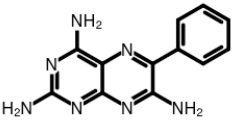
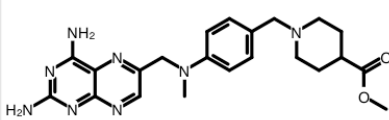
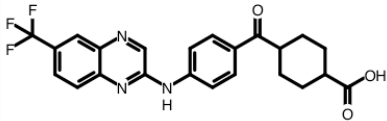
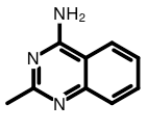
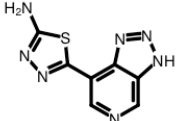
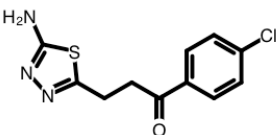
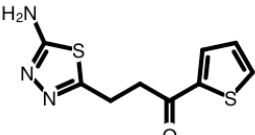
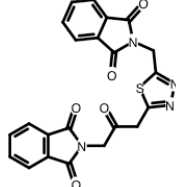
Fonte: O próprio autor.

Maiores detalhes sobre cada etapa serão descritos a seguir.

4.1.1 Seleção dos inibidores

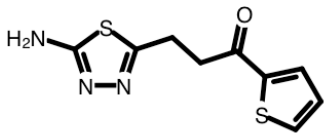
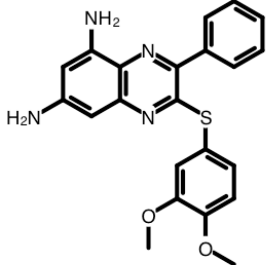
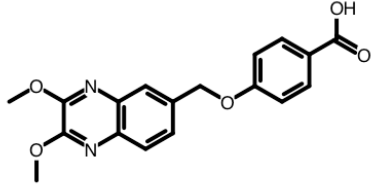
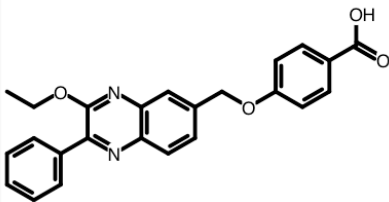
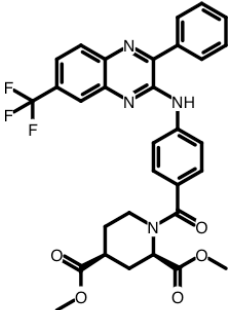
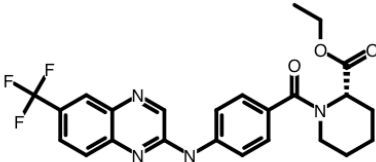
Um conjunto de nove inibidores da Pteridina Redutase de *L. major* (LmPTR1) (DUBE et al., 2012) (Figura 17) e seis inibidores de Diidrofolato Redutase-Timidilato Sintase de *L. major* (LmDHFR-TS) (Figura 18) previamente descritos na literatura (CAVAZZUTI et al., 2008; FERRARI et al., 2011) foram utilizados para construção dos modelos farmacofóricos para cada classe de inibidores. Esses compostos foram selecionados de acordo com a diversidade química, estimada com auxílio do servidor on-line CHEMGPS-NP (LARSSON et al., 2007; ROSÉN et al., 2009, <http://chemgps.bmc.uu.se/batchelor/>), como descrito resumidamente a seguir: Os três primeiros componentes principais foram utilizadas para construir um gráfico de escores (3D) para os inibidores de LmPTR1 e de LmDHFR-TS. A seguir, pontos (compostos) distribuídos nesse espaço foram aleatoriamente selecionados, de forma a garantir que toda a faixa de potência dos inibidores estivessem representada. O gráfico 3D utilizado para visualizar o espaço químico foi construído com o auxílio do programa SigmaPlot™ versão 12.0 (SYSTAT, 2014).

Figura 17 - Estrutura química dos inibidores de LmPTR1 selecionados para a geração dos modelos farmacofóricos, com os respectivos valores de atividade biológica.

		
1, Ki = 0,10µM	2, Ki = 3,40µM	3, Ki = 0,04µM
		
4, Ki = 7,0µM	5, Ki = 390,0µM	6, Ki = 309,0µM
		
7, Ki = 89,0µM	8, Ki = 29,0µM	9, Ki = 116,0µM

Fonte: Adaptado de DUBE et al., 2012.

Figura 18 - Estrutura química dos inibidores de LmdHFR-TS selecionados para a geração dos modelos farmacofóricos, com os respectivos valores de atividade biológica.

		
1, $K_i = 139,0\mu\text{M}$	2, $K_i = 10,0\mu\text{M}$	3, $K_i = 3,0\mu\text{M}$
		
4, $K_i = 4,0\mu\text{M}$	5, $K_i = 88,0\mu\text{M}$	6, $K_i = 27,0\mu\text{M}$

Fonte: Adaptado de CAVAZUTTI et al., 2008; FERRARI et al., 2011.

A estrutura química 2D dos inibidores foi gerada no programa Marvin® Sketch 15.4.20 (CHEMAXON, 2015, <https://www.chemaxon.com/>) e posteriormente convertida para o formato 3D com o auxílio do módulo CONCORD, utilizando parâmetros padrão disponíveis na ferramenta “*translate molecular file*” da plataforma SYBYL®-X 2.0 (TRIPOS, 2010). A seguir, as estruturas foram minimizadas por Gradiente Conjugado (CG - do inglês, *Conjugate Gradient*) com um critério de convergência de 0,001 Kcal/mol, utilizando campo de força Tripos (CLARK; CRAMER; VAN OPDENBOSCH, 1989) ($\epsilon=80,4$; máximo de iterações = 50.000). A seguir, cargas parciais foram calculadas pelo método Gasteiger-Hückel (GASTEIGER; MARSILI, 1980), conforme disponível na plataforma SYBYL®-X 2.0.

4.1.2 Geração dos modelos farmacofóricos

Os modelos farmacofóricos foram gerados em duas etapas: Inicialmente, as conformações dos inibidores foram obtidas através de Algoritmo Genético (AG), no qual o

tamanho da população e o número máximo de gerações para os inibidores de LmPTR1 foram ajustados para 55 e 40¹ enquanto que para LmDHFR-TS foram de 40 e 70, respectivamente. Os demais parâmetros (CRUZAMENTO = 1,0 e MUTAÇÃO = 1,0) foram mantidos nos seus valores padrão. Posteriormente, os confôrmeros foram alinhados entre si para a construção dos modelos farmacofóricos.

4.1.3 Avaliação dos modelos farmacofóricos

Modelos farmacofóricos que apresentaram valor de ENERGY superior a duas ordens de magnitude em relação aos demais foram descartados. Os modelos remanescentes foram avaliados quanto à pontuação de Pareto. Aqueles com Pareto igual a zero foram testados quanto à habilidade para diferenciar inibidores verdadeiros de falsos positivos, os quais foram construídos com auxílio do servidor DUD-E (MYSINGER et al., 2012, <http://dude.docking.org>), na proporção de 1 composto ativo para 50 falso positivos. Todos os compostos foram então reunidos em um banco de dados único, construído com a ferramenta “create database” disponível no módulo UNITY® 3D, da plataforma SYBYL®-X 2.0 (TRIPOS, 2010).

A seguir, o banco contendo todos os compostos (ativos + falso positivos) foi alinhado de forma flexível aos modelos farmacofóricos remanescentes, com o auxílio do módulo UNITY® 3D e o seu encaixe avaliado com a função de pontuação QFIT (do inglês, *QueryFit*).

Os valores de QFIT, para inibidores conhecidos e falsos positivos obtidos foram utilizados para construir curvas ROC (do inglês, *Receiver Operating Characteristic*) (GIGLIARANO; FIGINI; MULIERE, 2014; VANAGAS, 2004) e calcular a área sob cada curva (AUC do inglês, *Area under the curve*) para fins de comparação dos modelos entre si.

Os modelos farmacofóricos também foram avaliados quanto ao fator de enriquecimento (EF, do inglês *Enrichment Factor*) para 1 e 2% da base de dados, conforme equação 2.

$$EF(x\%) = \frac{n(\text{ativos em } x\% \text{ da base de dados})/n(x\% \text{ da base de dados})}{n(\text{total de ativos})/n(\text{total da base de dados})} \quad (2)$$

¹ O **tamanho da população** geralmente é estimado como (nº de estruturas x 5) + 10, enquanto o **número máximo de gerações** é igual a média ou mediana (maior valor) do número de ligações rotacionáveis (de todos os inibidores) x 10.

em que, n corresponde ao número de moléculas e $x\%$, representa a fração da base de dados selecionada.

Os modelos foram então comparados com o enriquecimento máximo possível para 1 e 2% da base de dados ($EF_{\text{máximo}}(x\%)$), como mostrado a seguir (Equação 3):

$$\Delta EF_{x\%} = EF_{\text{máximo}}(x\%) - EF(x\%) \quad (3)$$

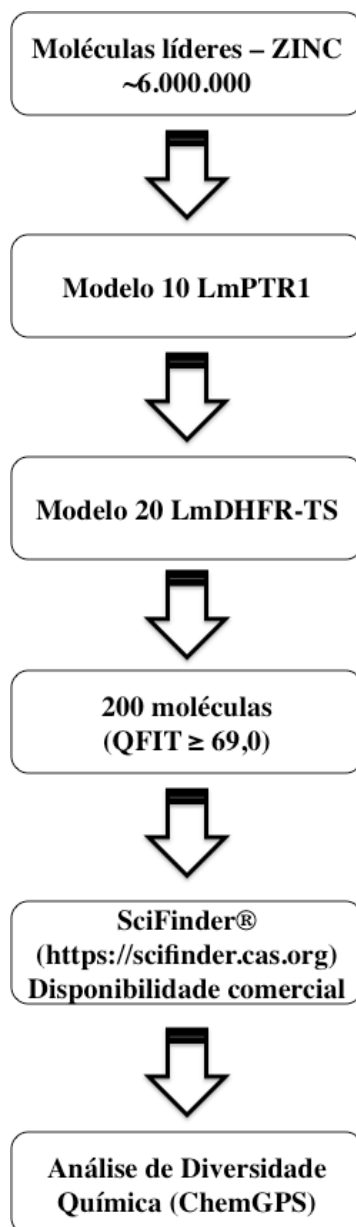
Segundo essa métrica, quanto menor o valor obtido, mais próximo do desempenho máximo.

A seguir, os modelos farmacofóricos de LmPTR1 e LmDHFR-TS com $AUC > 0,8$ foram testados quanto à capacidade de relacionar o encaixe dos compostos no farmacóforo com sua respectiva atividade biológica ($pKi = \log 1/Ki$). Nessa etapa foram utilizados 41 inibidores de LmPTR1 previamente descritos na literatura (Ki : 0,02 - 436,0 μ M) (Apêndice A) (CORONA et al., 2012; FERRARI et al., 2011; TULLOCH et al., 2010) e 45 inibidores de LmDHFR-TS (Ki : 0,02 - 363,08 μ M) (Apêndice B) (BOOTH, 1987), não empregados na construção dos modelos farmacofóricos. Esses compostos foram submetidos ao mesmo protocolo de minimização empregado para os inibidores utilizados na geração dos modelos farmacofóricos (seção 4.1.1) e, em seguida, eles foram alinhados individualmente, de forma flexível, aos modelos farmacofóricos (*templates*), como disponível no programa GALAHAD™ (opção: *Align individually to a template*) disponível na plataforma SYBYL®-X 2.0. A pontuação obtida, diretamente relacionada com o ajuste dos compostos nos modelos farmacofóricos (MOL_QRY), foi comparada com os valores de atividade biológica, classificadas em três faixas de potência (forte, moderado e fraco).

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA A TRIAGEM VIRTUAL POR MODELO FARMACOFÓRICO E SELEÇÃO DE MOLÉCULAS PARA OS ENSAIOS *in vitro*

Os melhores modelos farmacofóricos de LmPTR1 e LmDHFR-TS foram utilizados para filtragens sucessivas de compostos semelhantes a moléculas líderes (TEAGUE et al., 1999), disponíveis no banco de dados ZINC (IRWIN et al., 2012, <http://zinc.docking.org>). As 200 moléculas com maior QFIT foram selecionadas para avaliação da diversidade química e aquisição (esquema 2).

Esquema 2 - Triagem virtual por modelo farmacofórico de potenciais inibidores de LmPTR1 presentes no banco de moléculas similares a líderes (*Lead-like*).



Fonte: O próprio autor.

Maiores detalhes sobre cada etapa serão descritos a seguir.

4.2.1 Triagem virtual por modelo farmacofórico

O modelo farmacofórico 10 foi utilizado como primeiro filtro para a triagem virtual de aproximadamente seis milhões de compostos com propriedades de moléculas líderes, disponíveis na base de dados ZINC (IRWIN et al., 2012, <http://zinc.docking.org>), acessada em 01/07/2013. Essa etapa foi implementada por meio da opção “alinhamento flexível 3D”, disponível no módulo UNITY® 3D. A qualidade do alinhamento de cada molécula foi expressa pelo valor de QFIT que varia de 0 a 100.

Compostos com $QFIT > 0$ foram submetidos ao alinhamento sobre o modelo 20 (inibidores de LmDHFR-TS) e aqueles com valor de QFIT maior que a média mais duas vezes o desvio padrão foram investigados quanto ao registro de atividade biológica frente a PTR1 (termos de busca: “Pteridine Reductase” AND “Inhibitors” no servidor SciFinder®, <https://scifinder.cas.org>). Compostos sem registros nesse banco tiveram sua disponibilidade comercial verificada (<https://www.enaminestore.com>; <http://www.chembridge.com>; <http://www.chemdiv.com>; <http://www.otavachemicals.com>; <http://www.lifechemicals.com>; <http://www.vitasmlab.com>; <http://www.princetonbio.com>; <http://www.zelinsky.com>; <http://www.maybridge.com>; <http://www.keyorganics.net>). Aqueles disponíveis, em Julho de 2013, foram submetidos a uma análise de diversidade química, empregando a mesma estratégia descrita na seção 4.1.1.

4.3 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE *L. major* PTR1

4.3.1 Expressão da PTR1 de *L. major*

O plasmídeo pET15b contendo o gene que codifica a LmPTR1, cedido pelo Prof. Dr. Willian N. Hunter (*University of Dundee*– Dundee, Reino Unido), foi inserido em células de *E. coli* BL21-DE3 e os transformantes positivos foram selecionados por cultivo em meio sólido contendo 50µg/ml de ampicilina (Sigma-Aldrich®). Uma unidade formadora de colônia (UFC) foi submetida a extração de DNA plasmidial, utilizando o kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega®, #A1222). O material obtido foi utilizado para confirmação da sequência gênica em um sequenciador automático MegaBace 1000® Flex (GE Healthcare), localizado no Instituto de Física de São Carlos (IFSC- USP). O produto do sequenciamento foi comparado com a sequência de PTR1 de *L. major* depositada no Uniprot

(Q01782) (UNIPROT, 2015, <http://www.uniprot.org>), com o auxílio do servidor BLAST nucleotídeos (algoritmo *blastn*).

Uma vez confirmada a integridade do inserto, a expressão e purificação de LmPTR1 foi realizada por meio de modificações no protocolo descrito por Gourley e colaboradores (1999). Resumidamente, uma UFC de *E. coli* BL21(DE3) foi inoculada em meio de cultura Luria-Bertani (LB, Acumedia®) suplementado com 50µg/ml de ampicilina, o qual foi mantido sob agitação (180 rpm), a 37°C, até a cultura atingir densidade ótica entre 0,6-0,8 u.a a 600nm. Nesse momento, foi adicionada, à suspensão, diferentes concentrações de isopropil β-d-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG, Sigma-Aldrich®) (0,1; 0,5 e 1mM). A cada 30 minutos, alíquotas de 2ml foram extraídas e as células recuperadas por centrifugação (2800g por 30 minutos a 4°C). Após ressuspensão em tampão Tris-HCl 50mM pH 7,5 contendo 250mM de NaCl e 1mM de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF, Sigma-Aldrich®), as células foram rompidas por sonicação (10 ciclos de 15 segundos com intervalo de 30 segundos, em gelo) utilizando o sonicador Sonics VibraCell™ CV18, (amplitude de 80%, frequência de 16kHz e potência de 10 Watts).

A suspensão resultante foi clarificada por centrifugação (16000g, 30 minutos a 4°C). Amostras da fase solúvel e dos restos celulares foram aplicadas em gel desnaturante de poliacrilamida 12% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) para verificação dos níveis de expressão proteica. Após otimização da concentração de IPTG, o procedimento acima foi repetido e a fase solúvel (sobrenadante) empregada na etapa de purificação.

4.3.2 Purificação da PTR1 de *L. major*

Primeiramente, uma coluna Poly-Prep® empacotada com 1 mL de resina de sefarose com íons níquel (Ni⁺²) imobilizados (GE) foi equilibrada com 10 volumes de coluna de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5, contendo NaCl 250 mM. Após esta etapa, o sobrenadante clarificado foi filtrado em uma membrana de 0,45 µm (Milipore®) e adicionado na coluna. A resina foi então eluída com 20 volumes de coluna de Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 250 mM contendo 20 mM de imizadol (Sigma-Aldrich®). A seguir, a resina foi lavada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 250 mM contendo concentrações crescentes de imidazol (100, 200 e 400 mM). As frações recolhidas foram avaliadas por SDS-PAGE a 12%.

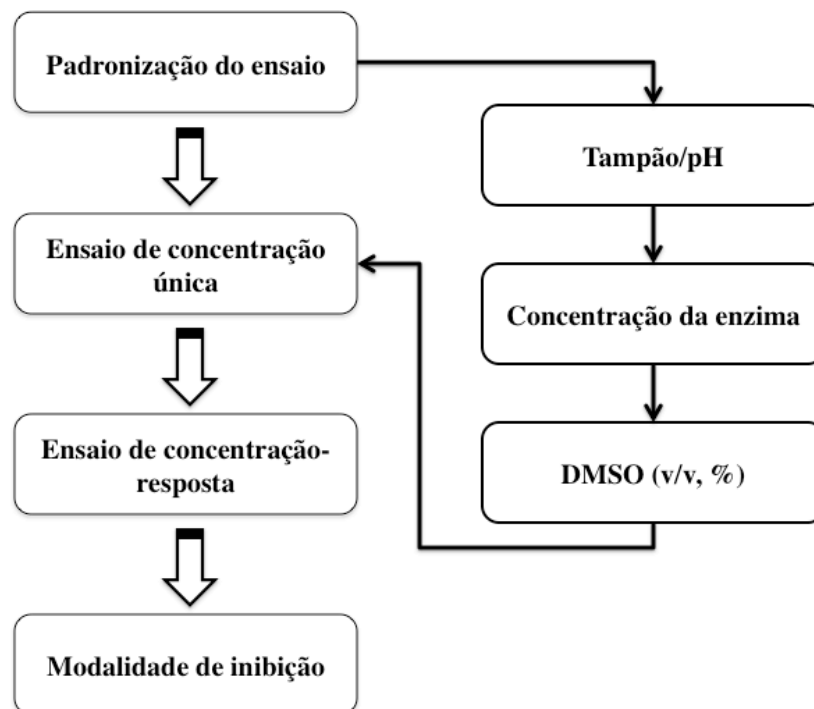
As frações contendo a proteína foram reunidas e dosadas através de método espectrofotométrico (ZAIA; ZAIA; LICHTIG, 1998), utilizando o coeficiente de extinção

molar teórico da proteína a 280nm ($27390 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), o qual foi calculado com o auxílio da ferramenta *ProtParam* disponível no servidor ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>) (GASTEIGER et al., 2005). Após a dosagem, a proteína foi dialisada em tampão Tris-HCl 50mM pH 7,5, NaCl 250mM com o auxílio de um filtro Amicon® 10kDa (Milipore) e concentrada para 1mg/mL, por centrifugação a 3500g, 10 minutos e 4°C. Por fim, alíquotas de 500µL foram estocadas a -80°C com 30% de glicerol (v/v).

4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA OS ENSAIOS POR ThermoFluor®

Os compostos selecionados na etapa de triagem *in silico* foram avaliados quanto à sua capacidade de se ligar a PTR1 de *L. major*. Inicialmente, ensaios em concentração única possibilitaram a seleção de ligantes com $\Delta T_m \geq 1,0^\circ\text{C}$ em relação ao controle. A seguir, esse inibidores foram confirmados nos ensaios de concentração-resposta. Após essa etapa, os compostos tiveram sua modalidade de inibição investigada por ThermoFluor® (Esquema 3).

Esquema 3 - Etapas realizadas para padronização, avaliação biológica e investigação da modalidade de inibição por ThermoFluor®.



Fonte: O próprio autor.

Maiores detalhes sobre cada etapa serão descritos a seguir.

4.4.1 Ensaios *in vitro* por ThermoFluor®

Os experimentos de ThermoFluor® foram realizados em um termociclador em tempo real (Applied Biosystems 7500). A variação na intensidade de fluorescência foi monitorada, a cada minuto, utilizando os filtros FAM™ (494 nm) e ROX™ (602nm), para excitação e emissão, respectivamente, utilizando um gradiente de temperatura de 25 a 85 °C (1°C/min).

A triagem de inibidores e ensaios para investigação da modalidade de inibição foram realizados em placas de 96 poços (*PCR plates 96 well* BioRad®) selados com tampas de plástico transparente (*Flatcap strips* BioRad®). Antes de iniciar a leitura da fluorescência, as placas foram centrifugadas (1500g) por 2 minutos a 25°C.

A temperatura de desnaturação (T_m) foi determinada a partir dos dados de intensidade de fluorescência em função do tempo que foram exportados para uma planilha Excel 2007, pré-organizada (disponível em <ftp://ftp.sgc.ox.ac.uk/pub/biophysics>) que auxilia na identificação do valor mínimo (pré-transicional) e máximo (pós-transicional) de fluorescência de cada curva. Os valores de intensidade de fluorescência nesse intervalo foram então ajustados a uma função sigmoideal de Boltzmann (intensidade de fluorescência *versus* temperatura), utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA, www.graphpad.com) conforme descrito na equação 4 (ROGEZ-FLORENT et al., 2014):

$$I = \left(A + \frac{(B - A)}{1 + e^{\frac{T_m - T}{c}}} \right) \quad (4)$$

em que, I é a intensidade de fluorescência a uma determinada temperatura T , A e B referem-se a intensidade de fluorescência pré-transicional e pós-transicional e C é um fator de inclinação da curva. Dados de fluorescência antes do ponto pré-transicional e depois do ponto máximo não foram considerados para o cálculo do T_m .

Todas as medidas foram realizadas em triplicata e os valores expressos como mediana e amplitude interquartil. Nos ensaios de afinidade foi utilizada uma solução contendo: 4µL de PTR1 (concentração inicial: 25µM), 14 µL de tampão, 1µL de SYPRO® Orange (Invitrogen™) (5X) e 1µL do inibidor ou DMSO. Nesses ensaios foi utilizado como controle negativo a mistura reacional acrescida de 5% de DMSO e como controle positivo a solução inicial incluindo 1 µL de Metotrexato² (concentração final de 50 µM).

² O metotrexato possui baixa afinidade por PTR1 (IC₅₀= 1,10 µM) (GOURLEY et al., 2001).

4.4.1.1 Padronização do ensaio

A estabilidade de LmPTR1 nos tampões Citrato de sódio 50 mM (pH: 4,0, 5,0 e 5,6); Acetato de sódio 50 mM pH 4,5; Acetato de sódio 20 mM pH 4,7; Fosfato de sódio 50 mM pH 6,0; Bis Tris Propano 50 mM pH 6,5; MOPS 50 mM pH 7,0; Hepes 50 mM (pH: 7,0 e 8,0); Tris HCl 50 mM (pH: 7,5; 8,0 e 8,5) e CHES 50 mM pH 9,0 foi investigada.

A seguir, a influência da concentração da proteína (1, 2 e 5 μ M) sobre a intensidade de fluorescência emitida (razão sinal/ruído) foi avaliada. Para o controle experimental foi avaliado o sinal de fluorescência em um poço contendo água e fluoróforo na mesma proporção utilizada nos ensaios. Adicionalmente, o efeito de diferentes proporções de DMSO (v/v, %) (5; 10 e 20%) sobre a estabilidade da proteína foi comparado ao controle negativo (0,1% de DMSO).

4.4.1.2 Ensaio de concentração única

Os compostos provenientes da triagem *in silico* foram testados na concentração final de 50 μ M. Em cada poço foi adicionado uma solução contendo 4 μ L de PTR1 (25 μ M), 14 μ L de tampão acetato de sódio 20 mM pH 4,7, 1 μ L de SYPRO® Orange (Invitrogen™) (5X) e 1 μ L de cada composto. Os valores de T_m obtidos foram comparados ao valor da solução referência com o acréscimo de DMSO ao invés do inibidor.

A significância estatística da variação na temperatura de desnaturação da proteína ($\Delta T_m = T_m$ (composto) - T_m (referência)) decorrente da presença dos compostos foi avaliada através do teste de Kruskal-Wallis seguido do pós teste de Dunn para comparações múltiplas. A análise de significância entre o valor de ΔT_m para o controle negativo e inibidor foi realizada através do teste de Mann Whitney. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. Toda a análise estatística foi realizada com o auxílio do programa GraphPad Prism versão 5.0.

4.4.1.3 Ensaio de concentração-resposta

A influência de diferentes concentrações dos compostos que apresentaram efeito significativo sobre a termoestabilidade de PTR1 (200; 50 e 12,5 μ M) foi investigada. O ensaio seguiu o mesmo protocolo descrito na seção 4.4.1.2. Os dados experimentais coletados foram analisados graficamente com o auxílio do programa GraphPad Prism versão 5.0.

4.4.1.4 Modalidade de inibição

Os compostos que apresentaram $\Delta T_m \geq 1,0$ °C foram reavaliados na presença de diferentes concentrações de NADPH (50; 25 e 12,5 μM) ou de Biopterina (50; 25 e 12,5 μM), mantendo-se a concentração do inibidor fixa (50 μM). Metotrexato (50 μM) foi utilizado como controle positivo. O protocolo adotado foi semelhante ao apresentado na seção 4.4.1.2.

4.5 ENSAIOS *in vitro* POR ESPECTROFLUORIMETRIA

Os compostos que demonstram $\Delta T_m \geq 1,0$ °C foram submetidos a ensaios de inibição enzimática através da leitura em espectrofluorímetro de microplaca (Molecular Devices, FlexStation®) ($\lambda_{\text{excitação}} = 340$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} = 470$ nm). A mistura reacional contendo: 200 μL Acetato de sódio 20 mM pH 4,7, 20 μM de Biopterina e 20 μM de NADPH foi adicionada nos poços. As reações foram iniciadas com a adição de 1,6 μL de PTR1 (concentração final: 0,2 μM). A reação foi acompanhada durante 240 segundos e as leituras foram realizadas em triplicata à temperatura de 30°C. As curvas de fluorescência para o controle e inibidor foram obtidas com a adição de 1,6 μL da enzima na presença de 5% de DMSO ou 10 μL do inibidor a 1mM, respectivamente. A atividade do inibidor foi medida pela fluorescência remanescente em relação ao controle (DMSO 5%, v/v), conforme equação 5:

$$\% \text{ Inibição} = 100 - (F_i / F_c) \times 100 \quad (5)$$

em que F_i é a fluorescência medida na presença do inibidor e F_c é a fluorescência medida do controle (DMSO 5%, v/v).

4.5.1 Ensaios de concentração-resposta

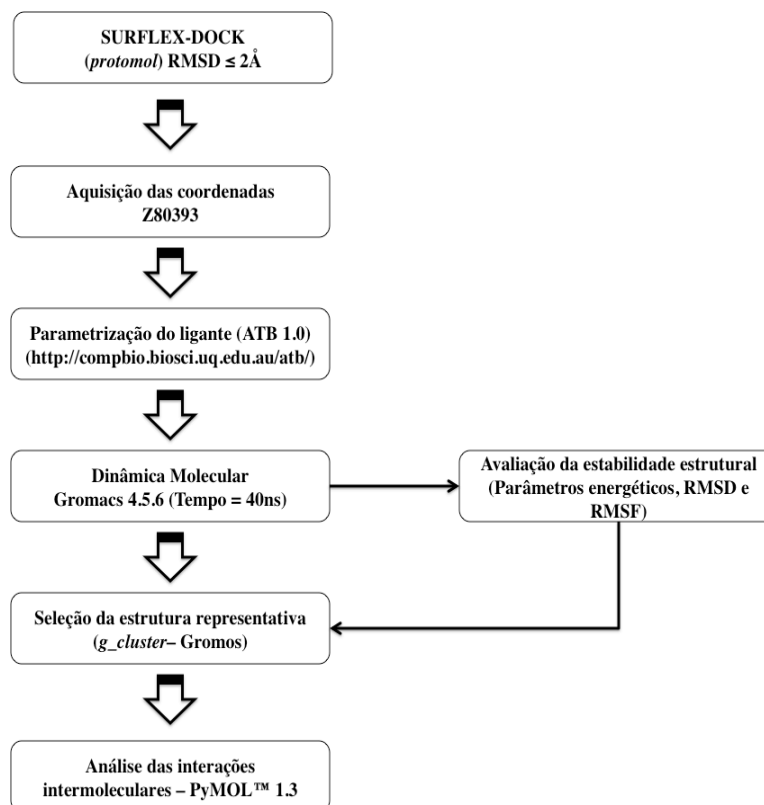
As moléculas com porcentagem de inibição $\geq 50\%$ nos ensaios de concentração única foram submetidas aos ensaios de concentração-resposta. Para esse ensaio também utilizou-se o fluorímetro de placa (96 poços), e as mesmas condições descritas anteriormente, apenas modificando a concentração do inibidor. Foi utilizada as seguintes concentrações de 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40; 80; 120 μM em triplicata.

As porcentagens de inibição em cada concentração foram determinadas utilizando a equação 5. Um gráfico de logaritmo da concentração do inibidor *versus* porcentagem de inibição foi traçado para determinação do IC₅₀. O cálculo para a obtenção do valor de IC₅₀ foi efetuado, utilizando-se regressão não linear no programa GraphPad Prism® versão 5.0.

4.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA ACOPLAMENTO MOLECULAR E SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR

Inicialmente, os compostos que apresentaram $\Delta Tm \geq 1,0$ °C foram selecionados para o acoplamento molecular com o auxílio do programa Surfex-Dock implementado na plataforma SYBYL®-X 2.0 (TRIPOS, 2010). Após esta etapa, as coordenadas 3D da pose de maior pontuação foi analisada visualmente no programa PyMOL™ 1.3 (SCHRÖDINGER, 2009). A seguir, a topologia do composto foi gerada com o auxílio do servidor ATB 1.0 (<http://compbio.biosci.uq.edu.au/atb/>). Após essa etapa, o complexo gerado foi submetido a rotina de Dinâmica Molecular com o auxílio do programa GROMACS 4.5.6 (VAN DER SPOEL et al., 2005) e a estabilidade do sistema avaliada pelos parâmetros energéticos (energia total, cinética e potencial), valor do desvio médio quadrático (RMSD, do inglês *Root Mean Square Deviation*) e flutuação quadrática média (RMSF, do inglês *Root Mean Square Fluctuation*). A estrutura representativa do complexo foi selecionada para a avaliação das interações intermoleculares (Esquema 4).

Esquema 4 - Etapas utilizadas para o acoplamento molecular e simulação de Dinâmica Molecular.



Fonte: O próprio autor.

Maiores detalhes sobre cada etapa serão descritos a seguir.

4.6.1 Preparo do receptor

A estrutura 3D de PTR1 de *L. major* foi obtida do banco de estruturas macromoleculares (<http://www.rcsb.org/pdb/>) (PDB: 1E92) e preparada com auxílio do módulo Biopolymer disponível na plataforma SYBYL®-X 2.0 (TRIPOS, 2010). As moléculas de água foram removidas e átomos de hidrogênio foram adicionados às estruturas de forma a otimizar suas ligações de hidrogênio. A seguir, os resíduos de histidinas (His-38 e His-241), asparaginas (Asn-109 e Asn-147) e aspartatos (Asp-181 e Asp-251) presentes na cavidade de ligação tiveram seus pKa calculados, com o auxílio do programa PROPKA 3.1 (SONDERGAARD et al., 2011), o qual se baseia no ambiente químico de cada resíduo (efeito de dessolvatação, ligação de hidrogênio e interação com grupos carregados) (ROSTKOWSKI et al., 2011). O estado de protonação foi definido de acordo com o pH ótimo de catálise (pH = 4,7) (DAWSON et al., 2006). Assim, os ácidos aspárticos foram mantidos deprotonados enquanto histidinas e asparaginas permaneceram protonadas. Finalmente, as cargas atômicas parciais Gasteiger-Hückel (GASTEIGER; MARSILI, 1980) foram atribuídas aos resíduos da proteína com o auxílio do módulo Biopolymer.

4.6.2 Acoplamento molecular

As etapas de busca conformacional e avaliação das poses foram realizadas com o programa Surflex-Dock (JAIN, 2003; 2007) implementado na plataforma SYBYL®-X 2.0 (TRIPOS, 2010). O espaço de busca foi definido com base no *protomol*, o qual foi centrado nos resíduos que interagem com o substrato (diidrobiopterina) e teve seu volume e limites definidos através dos parâmetros padrão *bloat=0* e *threshold=0,5*. A seguir, os parâmetros de busca foram ajustados para reproduzir as coordenadas cristalográficas do substrato. O desvio médio quadrático (do inglês, *Root Mean Square Deviation*) entre as conformações foi obtido para comparar as poses com as coordenadas cristalográficas do ligante.

A estrutura 2D de Z80393 foi gerada no programa Marvin® Sketch 15.4.20 (CHEMAXON, 2015, <https://www.chemaxon.com/>) e posteriormente convertida para o formato 3D com o auxílio do módulo CONCORD utilizando parâmetros padrão disponíveis na ferramenta “*translate molecular file*” do programa SYBYL®-X 2.0 (TRIPOS, 2010). A seguir, a estrutura 3D foi minimizada através do método de Gradiente Conjugado (GC) empregando um critério de convergência de 0,001 Kcal/mol utilizando o campo de força

Tripos (CLARK; CRAMER; VAN OPDENBOSCH, 1989) ($\epsilon=80,4$; máximo de interações = 50.000). As cargas atômicas parciais foram então atribuídas usando o método Gasteiger-Huckel (GASTEIGER; MARSILI, 1980), como disponível na plataforma SYBYL®-X 2.0 (TRIPOS, 2010).

Após o acoplamento, a pose melhor pontuada foi analisada visualmente com o auxílio do programa PyMOL™ 1.3 (SCHRÖDINGER, 2009).

4.6.3 Parametrização do ligante

As coordenadas 3D da pose melhor pontuada foram submetidas ao servidor ATB 1.0 (MALDE et al., 2011, <http://compbio.biosci.uq.edu.au/atb/>) para a geração da sua topologia. Os parâmetros de carga atômica, comprimento de ligação, ângulos torsionais e diedros foram obtidos usando o campo de força GROMOS96 53a6 (LINDAHL; HESS; VAN DER SPOEL, 2001; VAN DER SPOEL et al., 2005).

4.6.4 Simulações de Dinâmica Molecular

As simulações de DM foram executadas no pacote GROMACS 4.6.5 (VAN DER SPOEL et al., 2005), com os seguintes parâmetros: campo de força GROMOS 53a6; T= 303,15K; pH 4,7 e pressão de 1 bar. A estrutura 3D da proteína foi obtida através do protocolo de preparo descrito no item 4.6.1. Posteriormente, ciclos de minimização energética (1000 ciclos de *Steepest Descent* e GC, com critério de convergência de força de 1 Kcal/mol/Å), dinâmica de restrição (tempo= 1ns) e dinâmica de aquisição de dados (tempo=40 ns) foram executados para o complexo PTR1-Z80393.

Inicialmente, o sistema foi solvatado em caixa dodecaédrica com modelo de água SPC (BERENDSEN et al., 1987) com o complexo proteína-ligante posicionado no centro da caixa com a distância 1,4 nm da borda da caixa. Contra-íons (Na^+ ou Cl^-) foram adicionados para neutralização dos sistemas. O método Lincs (HESS et al., 1997) foi aplicado na restrição de ligações covalentes de forma a permitir um passo de integração a cada 2 femtosegundos (fs). As coordenadas da simulação foram salvas a cada 2 ps.

Os dados de DM foram obtidos durante uma simulação de 40 nanosegundos (ns) no *ensemble* isotérmico-isobárico - NPT (número de partículas, temperatura e pressão constante), usando condições de contorno periódicas. As interações eletrostáticas e hidrofóbicas foram

descritas pelo método PME (do inglês, *Particle Mesh Ewald*) (DARDEN, YORK, PEDERSEN, 1993) com raio de corte igual a 0,9 nm.

Inicialmente, a estabilidade estrutural do complexo foi investigada através da análise da variação de energia total, cinética e potencial durante a dinâmica com o auxílio do módulo *g_energy* disponível no pacote GROMACS 4.6.5 (VAN DER SPOEL et al., 2005). A seguir, a forma APO da PTR1 de *L. major* foi utilizada como controle para as seguintes análises: cálculo do RMSD e RMSF com o auxílio dos módulos *g_rms* e *g_rmsf*, respectivamente, disponíveis no pacote GROMACS 4.6.5 (VAN DER SPOEL et al., 2005).

O número e permanência das ligações de hidrogênio (H) foram calculadas com o auxílio do módulo *g_hbond* disponíveis no pacote GROMACS 4.6.5 (VAN DER SPOEL et al., 2005) e o programa HbMap2Grace (<http://lmdm.biof.ufrj.br/software/hbmap2grace>) desenvolvido por Gomes e colaboradores. Os critérios utilizados para a identificação das ligações de hidrogênio foram: distância entre doador e acceptor $\leq 3,5$ Å e ângulo (α) entre doador/acceptor/átomo H $\leq 60^\circ$. As ligações de H que permaneceram por menos de 10% do tempo de simulação foram desconsideradas.

4.6.4.1 Agrupamento de conformações e análise de interações

A estrutura representativa do complexo PTR1-Z80393 durante a fase produtiva da DM foi calculada a partir do agrupamento das conformações semelhantes com auxílio do módulo *g_cluster* disponível no pacote GROMACS 4.6.5 (VAN DER SPOEL et al., 2005). Para tal foi utilizado o método de união GROMOS (DAURA; VAN GUNSTEREN; MARK, 1999) com valores de RMSD de 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3 e 0,35 nm, para a definição do ponto de corte. A seguir, a estrutura média no agrupamento mais populado foi selecionada e utilizada para a avaliação das principais interações intermoleculares de Z80393 com PTR1 utilizando o programa PyMOL™ 1.3 (SCHRÖDINGER, 2009).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Devido a rota alternativa para redução de folatos, quando a via preferencial é inibida, a inibição de *L. major* DHFR-TS e PTR1 parece ser necessária para o tratamento de pacientes com Leishmaniose (GOURLEY et al., 2001; VICKERS; BEVERLEY, 2011). Entretanto, a utilização de um fármaco para cada alvo ou a combinação deles possui algumas desvantagens como diferentes perfis farmacocinéticos e taxas de metabolismo, o que torna difícil alcançar níveis terapêuticos de ambos os fármacos ao mesmo tempo. Além disso, essa estratégia apresenta maiores chances de efeitos adversos, interação medicamentosa, baixa adesão terapêutica e maior custo para os ensaios pré-clínicos e clínicos (AROOJ et al., 2013; BANSAL; SILAKARI, 2014, SIKAZWE, 2012). Em contrapartida, fármacos com ação multialvo têm sido uma abordagem moderna para superar essas limitações bem como para reduzir possíveis mecanismos compensatórios (LU et al., 2012; SHANG et al., 2014).

Contudo o desenvolvimento de fármacos que agem em múltiplos alvos não é um processo trivial (LU et al., 2012). A hibridação de moléculas/fragmentos que se ligam a alvos diferentes tem possibilitado a identificação de inibidores duais (MORPHY; RANKOVIC, 2009; SHANG et al., 2014). Porém, esses híbridos, geralmente, possuem alto peso molecular, o que dificulta as etapas de otimização farmacodinâmica e/ou farmacocinética (HORNBERG, 2012; MOSER et al., 2012).

Diante desse obstáculo, esforços têm sido feitos na tentativa de aplicar métodos *in silico* (JENWITHEESUK et al., 2008) que sejam capazes de identificar características essenciais para a inibição de diferentes alvos (COSTANTINO; BARLOCCO, 2012; BARBOSA, 2015; DIAS et al., 2015).

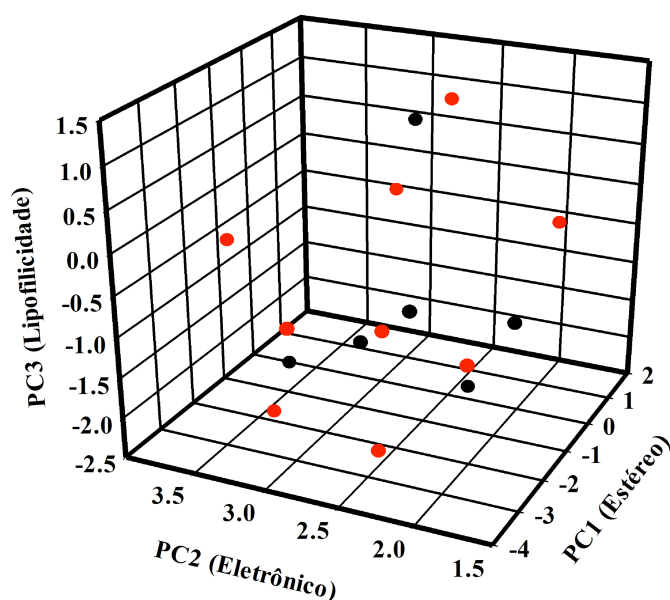
Dentre esses métodos, o modelo farmacofórico é uma alternativa promissora devido à possibilidade de se combinar os farmacóforos para alvos diferentes. Adicionalmente, a aplicação dessa estratégia na etapa de triagem virtual tem apresentado um fator de enriquecimento maior do que o acoplamento molecular (CHEN et al., 2009). Conseqüentemente, essa abordagem foi empregada nesse trabalho para identificar inibidores de LmPTR1 que também contemplassem os requisitos farmacofóricos de inibidores de LmDHFR-TS.

5.1 MODELOS FARMACOFÓRICOS

5.1.1 Pteridina Redutase 1 (PTR1)

A qualidade dos modelos farmacofóricos depende diretamente do conjunto de moléculas utilizadas para sua construção. Portanto, selecionar inibidores de *L. major* PTR1 que apresentem diversidade estrutural é fundamental para que o modelo farmacofórico possa ter a capacidade de identificar moléculas bioativas com diferentes quimiotipos (ZHAO et al., 2010). Assim, 15 inibidores com diferentes esqueletos químicos (quinazolina, pteridina, quinoxalina, tiodiazol e isoindol) (DUBE et al., 2012), foram avaliados quanto à distribuição no espaço químico, com o auxílio do servidor *online* ChemGPS-NP Web (Figura 19), que utiliza análise de componentes principais (PC) para descrever características físico químicas e topológicas (por exemplo: tamanho, forma, polarizabilidade, flexibilidade, polaridade, etc.) dos compostos (ROSÉN et al., 2009).

Figura 19 - Representação gráfica da distribuição de inibidores de PTR1 no espaço químico, definido a partir de componentes principais (PC), calculadas com auxílio do servidor ChemGPS-NP Web. Os pontos vermelhos referem-se às moléculas selecionadas para a geração dos modelos farmacofóricos.



Fonte: O próprio autor.

A dispersão das moléculas representa sua distribuição no espaço químico e portanto, a diversidade química dos inibidores de PTR1, o que torna esta ferramenta útil para seleção de

moléculas representativas do espaço amostral. Essa estratégia resultou na seleção de nove inibidores de PTR1 (Figura 17, seção 4.1.1) para construção dos modelos farmacofóricos.

Uma das principais limitações na geração dos modelos farmacofóricos está relacionada a identificação da conformação bioativa, principalmente para moléculas flexíveis. Essa etapa é fundamental para determinar o arranjo conformacional responsável pelo reconhecimento da estrutura no sítio de ligação. Para contornar esse problema, empregamos o programa GALAHAD™, que gera confôrmeros de baixa energia por meio de um algoritmo genético (AG). Essa estratégia leva em consideração o pressuposto que, na biofase, conformações termodinamicamente estáveis é que devem interagir com o receptor (YANG, 2010). Ao final, os confôrmeros de menor energia são alinhados entre si com a finalidade de maximizar a sobreposição de suas características farmacofóricas.

Outra vantagem do programa GALAHAD™ em relação a programas como GASP (JONES; WILLET, 2000), CATALYST (VAN DER WATERBEEMD; TESTA; FOLKERS, 1997) e DISCO (MARTIN, 2000) está no uso de um termo de pontuação relacionado a sobreposição estérea dos ligantes, que permite descartar confôrmeros com alta energia potencial (POPTODOROV; LUU; HOFFMANN, 2006).

Adicionalmente, o programa GALAHAD™ permite identificar moléculas com sobreposição parcial nas características do modelo farmacofórico (CLARK; ABRAHAMIAN, 2009; COTRELL et al., 2004), ou seja, moléculas que devem ser otimizadas (LIU; SUN; HU, 2012). Por essa razão, esse programa garante maior flexibilidade na identificação de moléculas potencialmente ativas (RICHMOND et al., 2006).

Com base nas vantagens apresentadas acima, o programa GALAHAD™ foi empregado na construção de modelos farmacofóricos para inibidores de LmPTR1. Devido à natureza estocástica do algoritmo genético, 10 modelos farmacofóricos foram gerados (Tabela 2).

Tabela 2 - Parâmetros estatísticos de modelos farmacofóricos para inibidores de LmPTR1.

MODELOS	PARETO	ENERGY ³	STERICS	HBOND	MOL_QRY
01	0	9,03	192,20	61,90	14,40
02	0	7,00	182,50	59,00	11,55
03	0	8,64	168,90	62,30	15,41
04	0	11,07	172,20	64,60	13,10
05	0	7,99	118,40	65,40	13,55
06	0	6,13	125,50	61,00	9,43
07	0	13,57	204,50	59,80	10,34
08	0	9,11	204,50	58,10	7,57
09	0	7,55	159,20	59,00	6,78
10	0	14,35	127,60	67,00	12,31

Fonte: O próprio autor.

No intuito de selecionar um modelo farmacofórico que possa ser utilizado na etapa de triagem virtual de inibidores de PTR1 e útil para explicar a REA da classe de inibidores, uma série de critérios baseados nos parâmetros estatísticos do programa, habilidade para reconhecer inibidores verdadeiros de falsos positivos e à capacidade de relacionar o encaixe no farmacofóro com a potência biológica foram adotados (seção 4.1.3).

Entretanto, a análise dos valores de ENERGY (>100Kcal/mol) mostra que nenhum dos modelos contém moléculas com ângulos torcionais distorcidos. A comparação estatística dos modelos (valor de PARETO) também não foi útil para reduzir o número de modelos. Dessa forma, a análise apenas dos parâmetros estatísticos do programa não permite descartar qualquer um dos modelos gerados. Por essa razão, outras estratégias de avaliação foram adotadas. Por exemplo, um modelo adequado para a etapa de triagem virtual deve possuir a habilidade de diferenciar inibidores verdadeiros de falsos positivos.

Dentre as métricas capazes de mensurar essa propriedade, fator de enriquecimento (EF), curva ROC e área sob a curva ROC (AUC) são as mais utilizadas devido a facilidade na interpretação dos dados e por possibilitar uma análise direta do desempenho entre diferentes modelos (SHEPPHIRD; CLARK, 2006; MARTINEZ; LOUZADA-NETO; PEREIRA, 2003),

³Unidade expressa em Kcal/mol.

portanto, os modelos foram avaliados primeiramente com base no fator de enriquecimento, ou seja no número de moléculas ativas recuperadas em relação ao número de moléculas ativas que seriam recuperadas por uma busca aleatória numa fração da base de dados (TRIBALLEAU et al., 2005).

Entretanto, não existem dados experimentais de moléculas inativas contra PTR1. A fim de superar essa limitação, utilizamos o servidor DUD-E para gerar moléculas com características físico-químicas (carga, peso molecular, número de ligações rotacionáveis, número de doadores e aceptadores de ligação de H e log P) semelhantes a inibidores verdadeiros, porém suficientemente diferentes do ponto de vista topológico para serem consideradas como falsos positivos (MYSINGER et al., 2012).

Utilizando-se um conjunto de seis inibidores verdadeiros e 300 falsos positivos (1:50) foi possível verificar que os modelos 2 e 5 apresentam melhor desempenho nas fases iniciais da triagem (1 e 2%), embora eles estejam bem abaixo das taxas de enriquecimento máxima (Tabela 3).

Tabela 3 - Desempenho dos modelos farmacofóricos para inibidores de PTR1 quanto a taxa de enriquecimento para 1 e 2% da base de dados.

MODELOS	$\Delta EF (EF_{\max} = 100/1\%)$	$\Delta EF (EF_{\max} = 50/2\%)$
1	86,67	36,67
2	73,33	33,33
3	86,67	36,67
4	80,00	36,67
5	66,67	30,00
6	93,33	46,67
7	86,67	43,33
8	86,67	36,67
9	93,33	46,67
10	86,67	36,67

Fonte: O próprio autor.

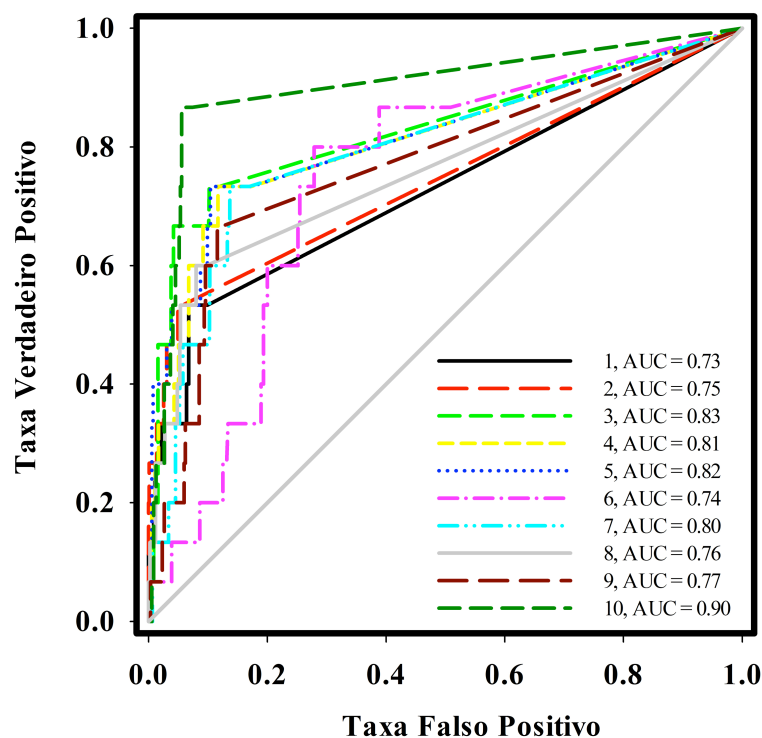
Embora esse resultado sugira que os modelos farmacofóricos possuem baixa capacidade de priorizar moléculas ativas, há uma variação grande do fator de enriquecimento para diferentes porcentagens da base de dados. Isso ocorre porque o fator de enriquecimento

não é uma métrica contínua, ou seja ele depende da quantidade de moléculas ativas em relação ao número total de moléculas contidas numa determinada base de dados (SHERIDAN et al., 2001; DILLER; LI, 2003).

Geralmente, se calcula o fator de enriquecimento para 0,01% da base de dados utilizada na triagem virtual (BRAGA; ANDRADE, 2013). Contudo, o tamanho reduzido de nossa base (306 moléculas) inviabiliza essa medida. Alternativamente, utilizou-se uma métrica contínua (curva ROC) que independe da razão de inibidores verdadeiros e falsos positivos. Nesta análise, o eixo y representa a sensibilidade (taxa de inibidores verdadeiros) enquanto o eixo x representa 1 - especificidade (taxa de falsos positivos) dos modelos farmacofóricos.

Os inibidores verdadeiros devem ter pontuação maior que os falsos positivos e portanto serem ranqueados nas primeiras posições. Assim, um modelo ideal deve apresentar alta sensibilidade (valor =1, no eixo y) e especificidade (valor zero no eixo x), ou seja deve-se observar uma linha que sai da origem e seguir verticalmente até o canto superior esquerdo (SEIDEL et al., 2010; WU, FLACH, 2005). Ao atingir este ponto, a curva deve continuar horizontalmente até o canto superior direito, indicando que todos os inibidores verdadeiros foram identificados antes que qualquer falso positivo seja selecionado. Modelos que apresentaram desempenho superior a uma seleção aleatória (linha diagonal) têm $AUC > 0,5$. Embora todos os modelos apresentem esse comportamento (Figura 20), apenas os modelos com $AUC > 0,8$ (3, 4 5 e 10) foram selecionados para avaliações subsequentes.

Figura 20 - Curvas ROC obtidas para os modelos farmacofóricos gerados a partir de inibidores de LmPTR1. AUC, área sob a curva.

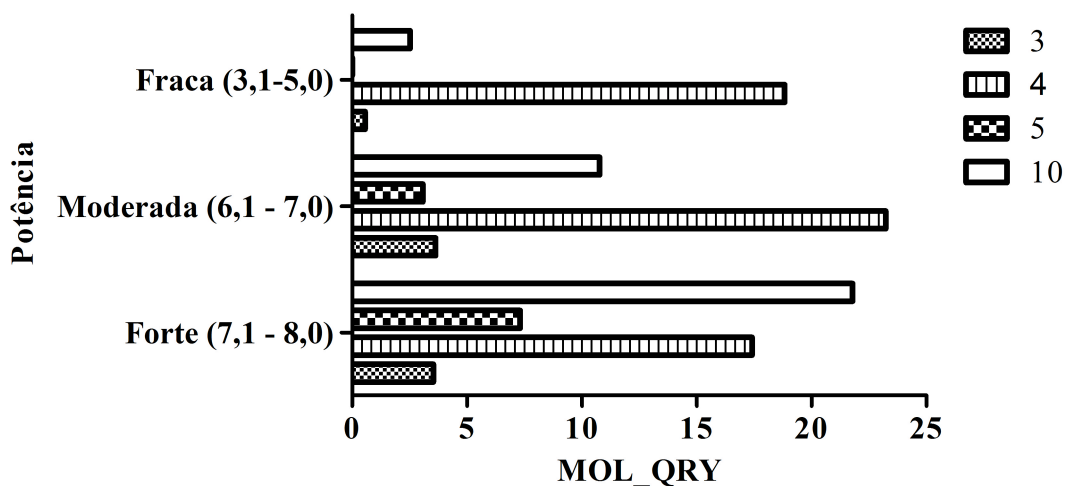


Fonte: O próprio autor.

Embora uma AUC elevada seja essencial, essa propriedade não é suficiente para garantir a utilidade do modelo farmacofórico, pois as métricas de avaliação utilizadas até esse ponto não garantem que os modelos farmacofóricos, de fato, auxiliem na compreensão das relações entre a estrutura química e a atividade biológica. Essa propriedade é crucial para otimizar a potência dos inibidores e, em princípio, está diretamente relacionada com o ajuste de moléculas ativas no modelo farmacofórico (LEACH et al., 2010). Espera-se que inibidores potentes tenham bom ajuste, ao passo que inibidores fracos devem apresentar um menor encaixe nesses pontos farmacofóricos.

Na prática, os valores de MOL_QRY e QFIT poderiam ser utilizados para estimar o ajuste das moléculas bioativas nos modelos farmacofóricos. Entretanto, estudos anteriores sugerem que não há correlação entre o valor de QFIT e potência biológica ($r^2 = 0,05$) (CHEN; MYINT, 2012), enquanto para MOL_QRY, a correlação chega a $r^2 = 0,7$ (LIU; SUN; HU, 2012). Esse resultado nos levou a investigar a correlação da potência de 41 inibidores de PTR1 (Apêndice A), divididos em potentes, moderados e fracos cuja potência (K_i) varia de 0,02 a 436,0 μM , com os valores de MOL_QRY obtidos com os modelos farmacofóricos 3, 4, 5 e 10 (Figura 21).

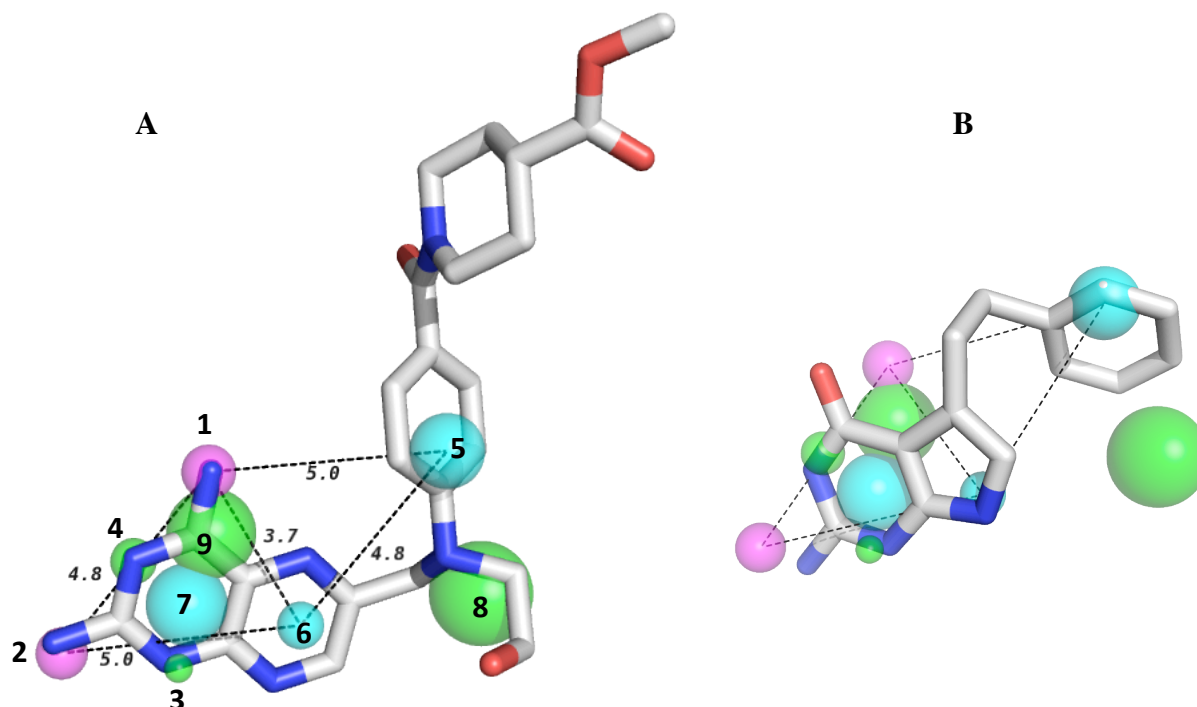
Figura 21 - Relação entre os valores de potência (pK_i) e o encaixe de inibidores conhecidos (MOL_QRY) nos modelos farmacofóricos para inibidores de LmPTR1.



Fonte: O próprio autor.

Apenas os modelos 5 e 10 apresentam relação entre potência e o valor de MOL_QRY (Figura 21). Porém, a diferença de pontuação entre as moléculas que apresentaram maior e menor valor de MOL_QRY é mais pronunciada no modelo 10 ($\Delta=38,26$) que no modelo 5 ($\Delta=9,97$). Entretanto, pode-se argumentar, corretamente, que os resultados apresentados acima não mostram como o modelo 10 poderia ser útil para explicar as relações entre a estrutura química e a atividade biológica dentro da série de moléculas avaliadas. A fim de ilustrar essa propriedade, a sobreposição de um inibidor potente e um fraco de PTR1 no modelo 10 foi analisada (Figura 22).

Figura 22 - Sobreposição de um inibidor potente de PTR1 (A, $K_i = 27\text{nM}$) e um inibidor fraco (B, $K_i = 27\mu\text{M}$) no modelo 10. As distâncias e raios estão representadas em angstroms. Azul: centros hidrofóbicos, verde: pontos aceitadores de ligação de H, rosa: pontos doadores de ligação de H. O raio das esferas varia de acordo ao raio de tolerância calculado pelo GALAHAD™. Os átomos de carbono, nitrogênio e oxigênio estão representados pelas cores cinza, azul e vermelho, respectivamente.



Fonte: O próprio autor.

A fim de interpretar de forma correta o resultado obtido, é necessário fazer uma breve caracterização do modelo farmacofórico. O modelo 10 possui quatro grupos aceitadores de ligação de H, sendo que dois deles estão centrados nos nitrogênios sp^2 presentes no anel pteridina, um centrado no grupo amino primário ligado ao anel pteridina e o último centrado no heteroátomo distal a esse anel das moléculas moldes (Figura 17). Além desses pontos farmacofóricos, esse modelo também apresentou três centros hidrofóbicos, sendo que dois deles estão localizados no anel pteridina (pirazina e pirimidina) e o outro em um substituinte aril na cadeia lateral e por fim, dois doadores de ligação de H que estão centrados no grupo 2,4 diamino, ligado ao anel pteridina. As esferas e os respectivos raios de tolerância (Tabela 4) descrevem o volume disponível para um grupo que tenha características idênticas à apresentada por aquele ponto farmacofórico (EYUNNI; GANGAPURAN; REDDA, 2014).

Tabela 4 - Raio de tolerância (Å) para as características farmacofóricas do modelo farmacofórico10.

Características farmacofóricas	Raio de tolerância (Å)
Doador de ligação de H (1)	0,57
Doador de ligação de H (2)	0,54
Aceitador de ligação de H (3)	0,30
Aceitador de ligação de H (4)	0,48
Aceitador de ligação de H (8)	1,10
Aceitador de ligação de H (9)	0,94
Centro hidrofóbico (5)	0,77
Centro hidrofóbico (6)	0,49
Centro hidrofóbico (7)	0,85

Fonte: O próprio autor.

As características farmacofóricas centradas nos átomos presentes no anel pteridina já foram relatadas na literatura (CAVAZZUTI et al., 2008; FERRARI et al., 2011; TULLOCH et al., 2010) como essenciais para inibição frente a PTR1, pois eles são compatíveis com aquelas que o substrato/cofator realizam com PTR1 (MCLUSKEY et al., 2004). Por exemplo, empilhamento *pi* com o resíduo Phe-113 poderia ser representado pelos centros hidrofóbicos (6 ou 7; Figura 22) centrados no anel pteridina, enquanto as ligações de H com Ser-111 e Tyr-194 poderiam ser representadas pelos centros doadores/aceitadores (1-4; Figura 22). Em contrapartida, as demais características centradas na cadeia lateral ainda não foram relatadas como essenciais para a inibição. Entretanto, estudos de REA têm demonstrado aumento de atividade biológica devido a inserção de substituintes hidrofóbicos e/ou polares no anel pteridina (HARDY et al., 1997). A estrutura de antifolatos clássicos com afinidade frente a PTR1 como metotrexato, trimetoprima e pirimetamina corrobora as características presentes no modelo farmacofórico 10, devido a presença do núcleo 2,4 diaminopteridina substituído com grupos hidrofóbicos e aceitadores de ligação de H. Além disso, Ferrari e colaboradores (2011) têm identificado inibidores potentes que possuem o anel 2,4 diaminopteridina com a inserção de substituintes hidrofóbicos ou polares na posição 6 desse anel. Esses dados corroboram os achados que as características que estão centradas na cadeia lateral são importantes para a potência de inibidores de PTR1.

Nesse contexto, o alinhamento do inibidor potente no modelo 10 (Figura 22-A) mostra que os anéis pirimidina e pirazina (núcleo pteridina) alinham-se aos centros hidrofóbicos enquanto que as amins primárias estão superpostas aos centros doadores de ligação de H. Os nitrogênios sp² do anel pirimidina, por sua vez, correspondem aos centros aceitadores de ligação de H. Em outras palavras, as interações com Phe-113 por empilhamento *pi* e ligação de hidrogênio entre o grupo amino com Ser-111 são compatíveis com àquelas apresentadas no modelo farmacofórico.

De forma oposta, o inibidor fraco não se alinhou às características externas ao núcleo 2,4 diaminopteridina (Figura 22-B), ao passo que apenas os átomos presentes no anel pirimidina se alinharam aos pontos farmacofóricos. Este resultado demonstra que a presença de um centro hidrofóbico e dois centros aceitadores de ligação de H são requisitos mínimos para a atividade biológica, enquanto que as características presentes na cadeia lateral são determinantes para a potência.

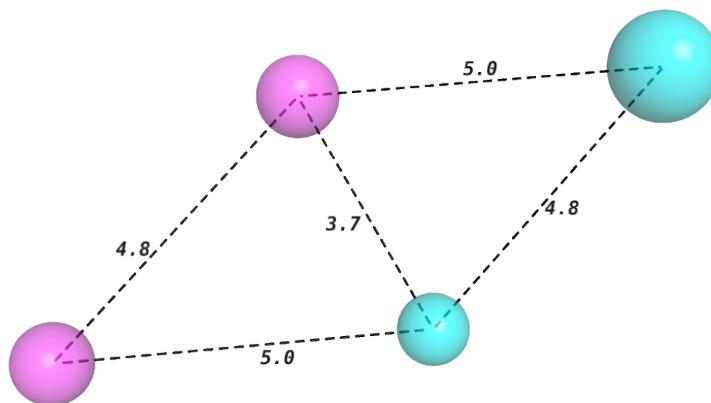
A comparação entre o modelo farmacofórico 10 e o modelo proposto por Dube e colaboradores (2012) (dois grupos doadores de ligação de H centrados nos átomos 2,4 diamino, um centro hidrofóbico localizado no anel pirazina e um centro hidrofóbico localizado em um substituinte aril da cadeia lateral) mostra que esse último é um subconjunto do primeiro (Figura 22). Essa diferença pode estar relacionada com tamanho e diversidade química do conjunto treino, algoritmo utilizado na geração dos confôrmeros, etc. (YANG, 2010). De fato, outros autores chegaram a modelos farmacofóricos completamente diferentes utilizando o mesmo programa porém com diferentes conjuntos treinos (HECKER et al., 2002; TOBA et al., 2006).

Cenário semelhante pode ser descrito nesse trabalho, uma vez que Dube e colaboradores (2012) utilizaram 28 inibidores para a geração dos modelos com o auxílio do programa CATALYST, enquanto o modelo 10 foi desenvolvido com apenas nove inibidores (todos eles utilizados também por Dube e colaboradores (2012)) utilizando o programa GALAHAD™. Apesar do número reduzido de moléculas, os nove inibidores previamente selecionados possuem uma diversidade química comparável ao conjunto utilizado por Dube e colaboradores (2012).

Em princípio, a utilização de um modelo simplificado pode explicar de forma mais clara as relações entre estrutura e atividade biológica, além disso, a literatura tem mostrado que modelos com até sete pontos farmacofóricos são mais preditivos e apropriados para a etapa de triagem virtual (YANG et al., 2010). Por essas razões, decidimos avaliar se o modelo 10 poderia ser simplificado sem perda da especificidade e seletividade. Para tanto, tomou-se

por base um modelo que já foi utilizado para a triagem virtual (Figura 23) (DUBE et al., 2012).

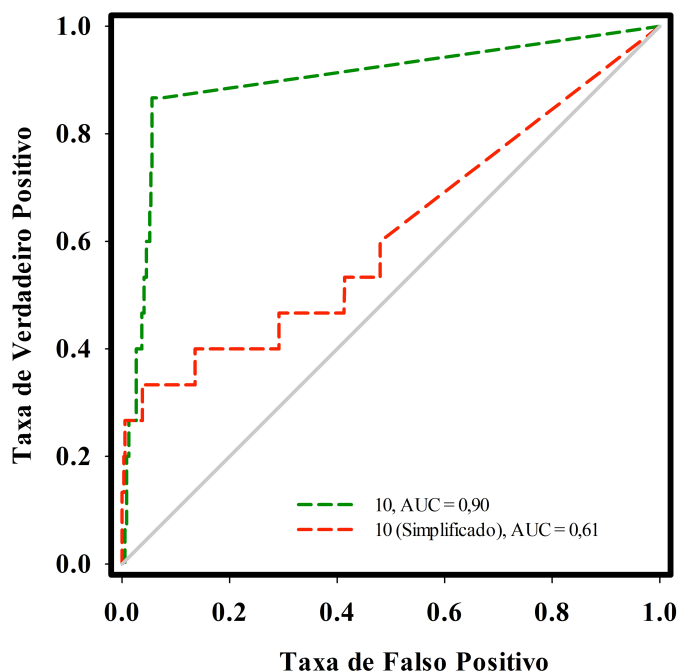
Figura 23 - Representação do modelo farmacofórico 10* (simplificado). O esquema de cores é o mesmo apresentado na figura 22.



Fonte: O próprio autor.

Essa estratégia deu origem a um modelo comparável ao modelo proposto por Dube e colaboradores (2012), considerando as distâncias entre os pontos farmacofóricos e seus respectivos raios de tolerância, exceto pela localização de um ponto doador de ligação de H acima de 1\AA do raio de tolerância para esta característica (ponto 1 = $0,57\text{\AA}$ /Tabela 4). A diferença observada entre os modelos pode ser explicada pelo fato do conjunto treinamento utilizado na construção dos modelos ser diferente, o que pode gerar diferentes alinhamentos. O modelo simplificado apresentou um valor de $AUC = 0,61$ (Figura 24), ou seja, superior a uma seleção aleatória porém, inferior ao apresentado pelo modelo original, o que corrobora a importância de características externas ao núcleo 2,4 diaminopteridina para a identificação de inibidores verdadeiros de PTR1.

Figura 24 - Curvas ROC obtidas para os modelos farmacofóricos 10 e 10*.



Fonte: O próprio autor.

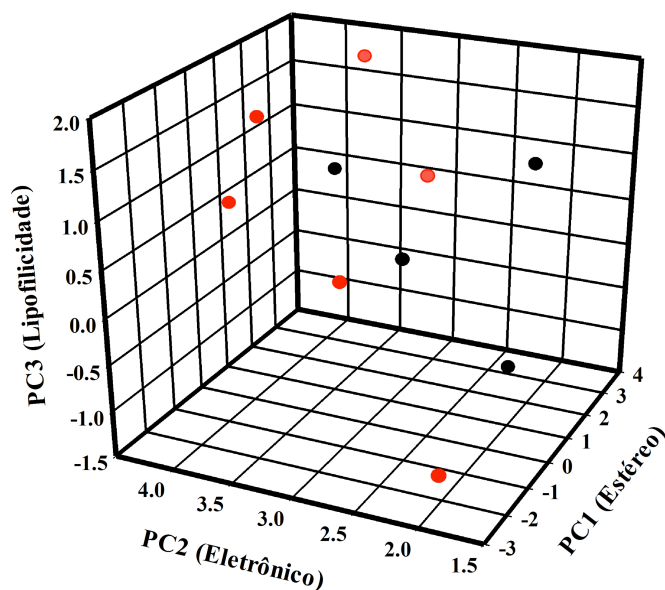
Diante desse resultado, o modelo farmacofórico 10 foi selecionado como o mais apropriado para a etapa de triagem virtual.

5.1.2 Diidrofolato Redutase-Timidilato Sintase (DHFR-TS)

Como PTR1 garante ao parasito uma via bioquímica alternativa, quando DHFR-TS está inibida, a inibição das duas enzimas parece ser essencial para uma terapia efetiva. Uma estratégia para alcançar esse objetivo é identificar as moléculas que contenham os requisitos farmacofóricos para inibirem ambos os alvos moleculares. Uma vez que modelos farmacofóricos validados para inibidores de PTR1 já haviam sido construídos, passamos à construção de modelos farmacofóricos para inibidores de DHFR-TS, visando com isso implementar uma segunda etapa de triagem virtual.

Seguindo o mesmo protocolo descrito anteriormente, 10 inibidores de DHFR-TS foram selecionados com base na diversidade química (Figura 25).

Figura 25 - Representação gráfica da distribuição de inibidores de DHFR-TS no espaço químico, definido a partir de componentes principais (PC), calculadas com auxílio do servidor ChemGPS-NP Web. Os pontos vermelhos referem-se às moléculas selecionadas para a geração dos modelos farmacofóricos.



Fonte: O próprio autor.

Essa estratégia resultou na seleção de seis inibidores (Figura 18, seção 4.1.1) com diferentes quimiotipos que foram empregados na construção de 10 modelos farmacofóricos para inibidores de DHFR-TS (Tabela 5).

Tabela 5 - Parâmetros estatísticos de modelos farmacofóricos para inibidores de LmDHFR-TS.

MODELOS	PARETO	ENERGY	STERICS	HBOND	MOL_QRY
11	0	14,42	1063,60	184,00	3,71
12	0	3104,15	976,10	187,10	5,39
13	0	8,82	832,10	187,40	5,34
14	0	4,62 x 10 ⁸	988,40	191,30	4,56
15	0	9,79	946,30	173,50	4,10
16	0	4,12 x 10 ⁵	990,40	185,50	2,08
17	0	12,41	1004,70	174,00	2,08
18	0	10,94	894,00	185,70	0,91
19	0	11,63	855,90	181,80	2,08
20	0	7,72	847,60	163,60	2,61

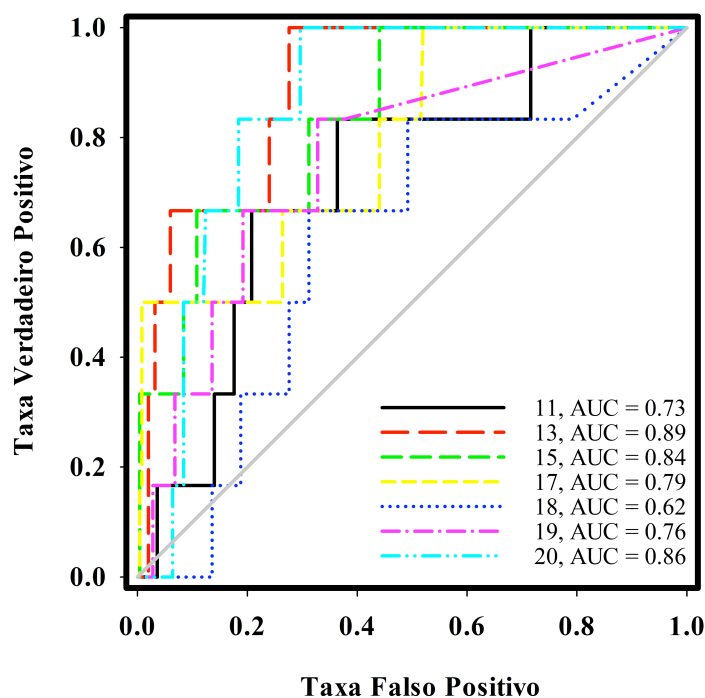
Fonte: O próprio autor.

Seguindo a estratégia adotada para a seleção de modelos farmacofóricos de inibidores de PTR1, três modelos farmacofóricos (12, 14 e 16) foram excluídos por apresentarem valor de ENERGY superior a 100 kcal/mol.

Os modelos farmacofóricos remanescentes apresentaram valores de MOL_QRY inferiores aos apresentados para os modelos de PTR1, sugerindo que o ajuste dos inibidores nesses modelos é inferior. Entretanto, não existe um valor mínimo que preconize a exclusão de modelos baseada nesse parâmetro (ATHRI et al., 2010; LIU; WU; HU, 2011; LIU; SUN; HU, 2012). Portanto, a utilização desse critério estatístico não assegura por si a qualidade dos modelos gerados bem como a comparação com outros modelos, haja vista que o valor do MOL_QRY é dependente do conjunto treino utilizado.

Considerando a equivalência estatística dos modelos (PARETO =0), aqueles com parâmetros internos adequados foram avaliados quanto à habilidade de priorizar inibidores verdadeiros em relação a falsos positivos (Figura 26).

Figura 26 - Curvas ROC obtidas para os modelos farmacofóricos gerados a partir de inibidores de LmDHFR-TS.

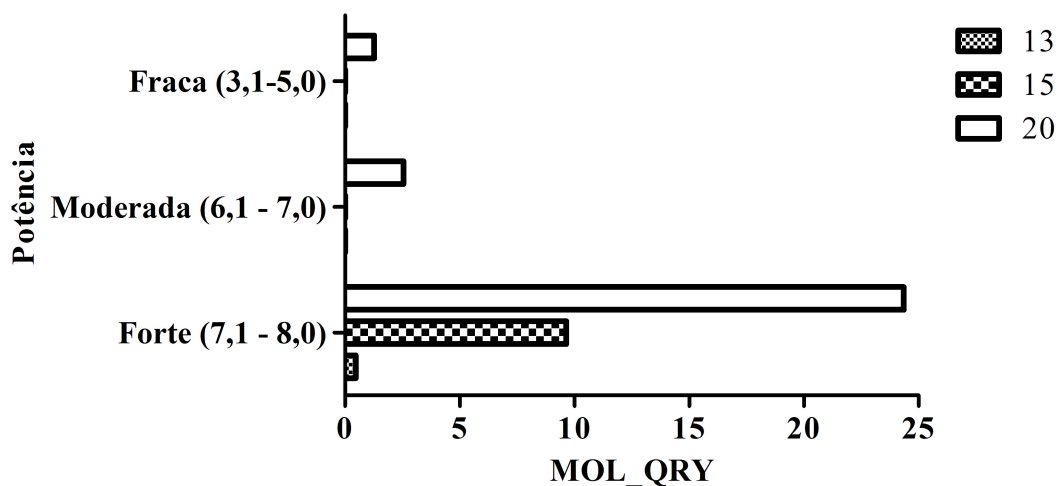


Fonte: O próprio autor.

Essa análise demonstrou que todos os modelos possuem desempenho superior a uma seleção aleatória ($AUC > 0,5$). Todavia, a análise visual do início da curva ($< 5\%$ do banco) revela um desempenho pior do que a seleção aleatória, ou seja, algumas moléculas falso-positivas tem pontuação superior aos verdadeiros positivos, o que reflete o deslocamento da curva no eixo x (maior taxa de falsos positivos) nas fases iniciais da base de dados.

Entretanto, cabe destacar que o modelo de DHFR-TS selecionado foi utilizado para selecionar entre as moléculas que já haviam sido filtradas com o modelo 10, ou seja, o número de falsos positivos deveria ser pequeno e o uso desse segundo filtro traria o benefício de selecionar moléculas que também contemplam os requisitos farmacofóricos de inibidores de DHFR-TS. Nessa perspectiva, modelos capazes de explicar a contribuição dos fármacos para a atividade biológica dos inibidores poderiam ser úteis também para otimizar a potência de inibidores de PTR1, frente a DHFR-TS. A fim de investigar se algum dos modelos farmacofóricos com $AUC > 0,8$ tem essa capacidade, utilizou-se um conjunto de 45 inibidores de DHFR-TS (Apêndice B), divididos em forte, moderado e fraco cuja potência (K_i) varia de 0,02 a 363,08 μ M, com os valores de MOL_QRY obtidos com os modelos farmacofóricos 13, 15 e 20 (Figura 27).

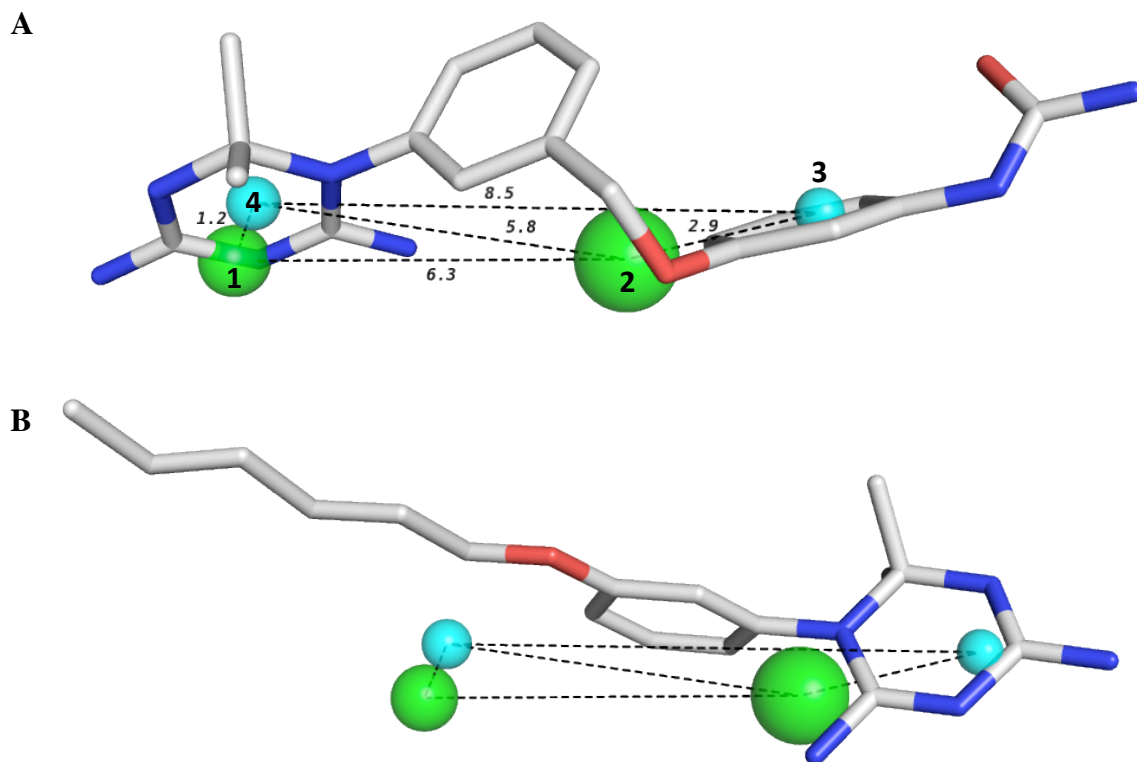
Figura 27 - Relação entre os valores de potência (pK_i) e o encaixe de inibidores conhecidos (MOL_QRY) nos modelos farmacofóricos para inibidores de LmDHFR-TS.



Fonte: O próprio autor

Essa análise sugere que apenas o modelo 20 apresenta alguma relação entre o encaixe nos pontos farmacofóricos e a atividade biológica. Na tentativa de compreender a contribuição de cada ponto farmacofórico e explicar as relações entre estrutura química e atividade biológica de inibidores de DHFR-TS, um inibidor potente e um fraco de DHFR-TS foram sobrepostos nas características farmacofóricas do modelo 20 (Figura 28).

Figura 28 - Sobreposição de um inibidor de DHFR-TS potente (A, $K_i = 90\text{nM}$) e um inibidor fraco (B, $K_i = 4\mu\text{M}$) no modelo 20. O esquema de cores é idêntico ao apresentado na figura 22.



Fonte: O próprio autor.

A fim de facilitar a compreensão dos resultados, segue uma breve descrição do modelo 20, que apresenta um grupo aceitador de ligação de H e um centro hidrofóbico localizados no anel pirimidina das moléculas moldes (Figura 18) e dois outros pontos farmacofóricos (um grupo aceitador de ligação de H e um centro hidrofóbico) localizados na cadeia lateral desse anel (Figura 28). Essas características já foram demonstradas na literatura (HARDY et al., 1997) como essenciais para a inibição frente a DHFR-TS, o que corrobora a capacidade do modelo em priorizar inibidores verdadeiros. As esferas e os respectivos raios de tolerância (Tabela 6) descrevem o volume disponível para um grupo que tenha características idênticas à apresentada por aquele ponto farmacofórico (EYUNNI; GANGAPURAN; REDDA, 2014).

Tabela 6 - Raio de tolerância (Å) para as características farmacofóricas do modelo farmacofórico 20.

Características farmacofóricas	Raio de tolerância (Å)
Aceitador de ligação de H (1)	0,56
Aceitador de ligação de H (2)	0,77
Centro hidrofóbico (3)	0,36
Centro hidrofóbico (4)	0,41

Fonte: O próprio autor.

A análise visual da sobreposição do inibidor potente no modelo 20 (Figura 28-A) indica que os centros hidrofóbicos e aceitadores de ligação de H estão centrados no anel pirimidina e o nitrogênio sp² nesse mesmo anel, respectivamente. Os dois outros pontos farmacofóricos, alinharam-se a grupos presentes na cadeia lateral, com um grupo aceitador de ligação de H centrado no oxigênio éter e um centro hidrofóbico localizado no substituinte aril próximo ao grupo carbamato. Hardy e colaboradores (1997) demonstraram que o anel 2,4 diaminopirimidina é essencial para a inibição de DHFR-TS de *L. major*. Adicionalmente, estudos de REA sugerem que substituintes aromáticos e/ou polares na posição 5 ou 6 do anel pirimidina aumentam a atividade biológica de inibidores de DHFR-TS (SCOTT; COOMBS; SANDERSON, 1987).

De forma oposta, o inibidor fraco (Figura 28-B) apresentou apenas o alinhamento do anel pirimidina sobre o centro hidrofóbico, porém com uma disposição espacial diferente da apresentada pelo inibidor potente. Esse alinhamento sugere que uma interação hidrofóbica e uma ligação de H são importantes para explicar a diferença de potência entre inibidores de DHFR-TS.

Diferentemente dos modelos farmacofóricos de LmPTR1, nenhum modelo de LmDHFR-TS foi descrito na literatura (portal de periódicos da CAPES, termos de busca: “Leishmania major” AND “DHFR” AND “Pharmacophore”). Entretanto, modelos farmacofóricos descritos na literatura para outros organismos (*P. carinii*, Kiani, Kalsoom e Riaz (2013); *T. cruzi*, Schormann et al., 2008) sugerem que dois grupos aceitadores de ligação de H centrados no nitrogênio sp² do anel pirimidina, dois grupos doadores de ligação de H centrados no grupo 2,4 diamino e um centro hidrofóbico localizado no anel pirimidina são essenciais para inibição de DHFR-TS.

O modelo farmacofórico 20 difere desses modelos em relação à presença dos grupos doadores de ligação de H centrados nos grupos aminos ligados ao anel pteridina. Esse

resultado corrobora estudos que mostraram que esses grupos não interferem na atividade frente a DHFR-TS de *L. major* (RAJASEKARAN; CHEN, 2012).

A divergência apresentada entre os modelos farmacofóricos descritos nesse trabalho e aqueles previamente descritos provavelmente está relacionada com a baixa identidade sequencial de LmDHFR-TS com DHFR de *P. carinii* (33 %) e DHFR-TS de *T. cruzi* (66%). Proteínas com baixa identidade sequencial entre si, em geral, possuem diferentes aspectos moleculares (requisitos estereo-eletrônicos) responsáveis pelo reconhecimento de um ligante no sítio alvo. Além disso, o conjunto treino e os programas empregados (GALAHAD™/LigandScout) na geração dos modelos foram diferentes. Como já relatado, estes fatores influenciam de forma direta na construção dos modelos devido as diferenças na flexibilidade conformacional dos ligantes, os algoritmos de busca e as métricas de avaliação implementados nos programas (HECKER et al., 2002; TOBA et al., 2006).

Os resultados obtidos sugerem que o modelo farmacofórico 20 é adequado para a priorização de moléculas com possível atividade biológica frente a DHFR-TS. Porém, esse modelo deve ser utilizado para priorizar potenciais inibidores de PTR1 previamente selecionados com base nas características farmacofóricas do modelo 10. Assim, esse modelo foi utilizado como filtro adicional para as moléculas previamente selecionadas como potenciais inibidores de PTR1.

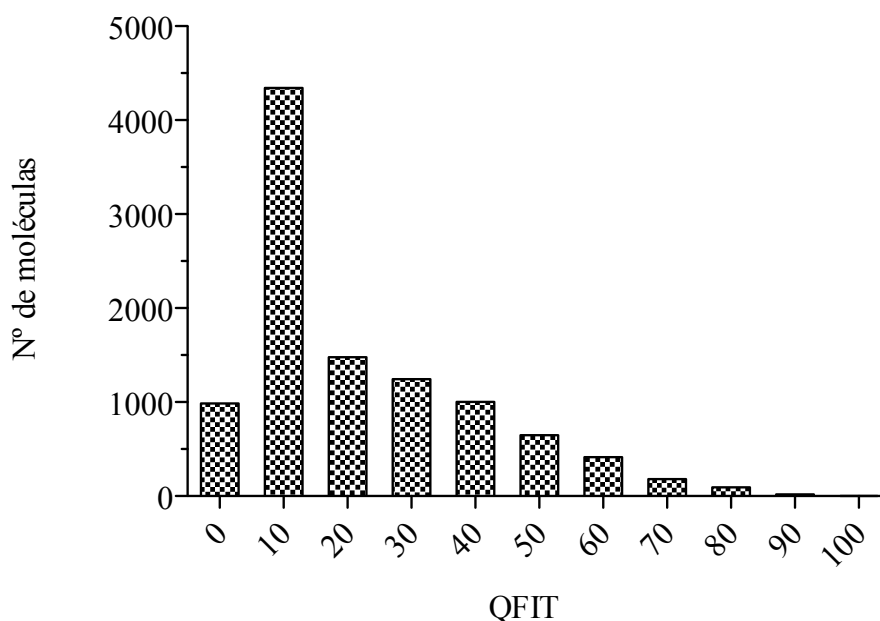
5.1.3 Triagem virtual por modelo farmacofórico e seleção de moléculas para os ensaios *in vitro*

Geralmente, moléculas bioativas identificadas na etapa de triagem apresentam potência na ordem de micromolar, e precisam sofrer modificações moleculares no intuito de otimizar potência e seletividade. Essas alterações resultam em aumento de peso molecular e/ou lipofilicidade. Por essa razão, realizamos a triagem virtual de moléculas com propriedades semelhantes às de compostos líderes ($\text{Log } P \leq 3,5$, Peso Molecular ≤ 350 Da, Número de doadores de ligação de H < 4 , Número de aceptores de ligação de H < 8) (TEAGUE et al., 1999).

Após a filtragem com o modelo 10, 11530 moléculas apresentaram QFIT diferente de zero (99,36 a 1,95). A seguir, essas moléculas foram alinhadas ao modelo 20, como estratégia de excluir aquelas (1112) que não apresentam os requisitos físico-químicos estruturais mínimos para inibir LmDHFR-TS (QFIT = 0). Embora não exista relação entre o valor de QFIT e potência, grande parte das moléculas apresentam valor de QFIT inferior à 50. De fato,

a análise da distribuição dos valores de QFIT (Figura 29) revela que apenas 200 das moléculas tem QFIT > 69,0. Esse valor de corte foi definido a partir da média e desvio padrão dos valores de todas as moléculas do banco (10418).

Figura 29 – Distribuição das moléculas selecionadas (n=10418) pelos modelos farmacofóricos 10 e 20 para inibidores de LmPTR1 e LmDHFR-TS, respectivamente, em relação ao valor de QFIT.



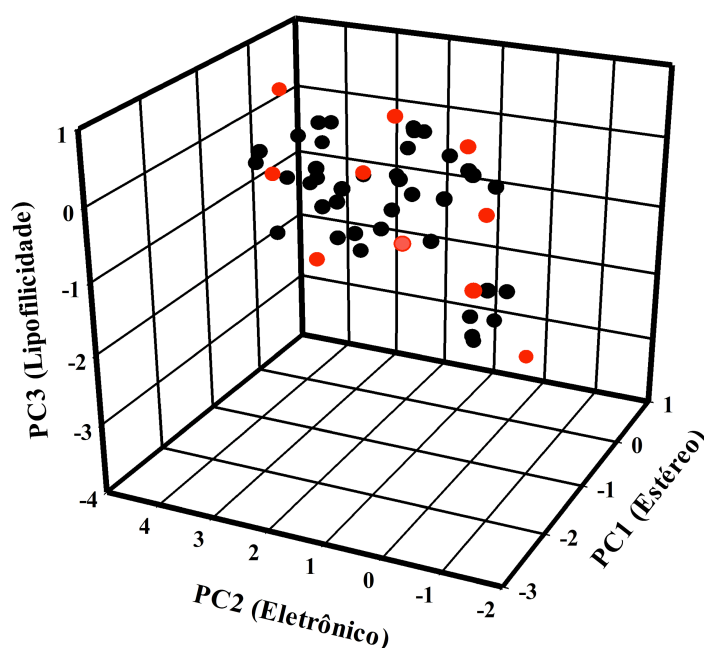
Fonte: O próprio autor.

Apesar da abordagem descrita acima ter reduzido significativamente o número de moléculas que deveriam ser adquiridas para posterior avaliação da atividade biológica, restrições orçamentárias inviabilizaram a aquisição de todas elas. A fim de contornar essa limitação, os seguintes critérios sequenciais foram empregados para priorizar quais moléculas seriam adquiridas inicialmente: 1) ausência de informações sobre ensaio biológico frente a PTR1 depositada no servidor SciFinder® (<https://scifinder.cas.org/>); 2) disponibilidade comercial e 3) diversidade química.

Primeiramente, não foi identificado qualquer registro de ensaio biológico ou informação acerca dessas moléculas no banco do SciFinder®. Embora esse resultado seja indicativo do ineditismo das moléculas selecionadas como leishmanicidas, ele não auxiliou a restringir o número de moléculas a serem adquiridas. O segundo critério revelou que cerca de

40% das moléculas (80) estavam disponíveis para aquisição⁴. Ainda no quesito disponibilidade, o custo médio (US\$ 65,0 por molécula (10mg)) foi considerado para definir o número de substâncias a serem adquiridas, o que resultou na seleção de 49 moléculas. Por fim, essas moléculas foram analisadas quanto à sua distribuição no espaço químico, visando identificar estruturas representativas do conjunto total e que amostrassem de forma eficiente os diferentes quimiotipos e, por conseguinte, as características físico-químicas encontradas nas 49 moléculas (Figura 30).

Figura 30 - Representação gráfica do espaço químico tridimensional com destaque para as 10 moléculas selecionadas para testes de atividade *in vitro*.

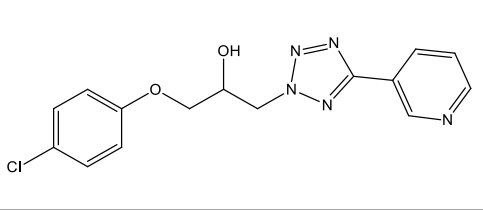
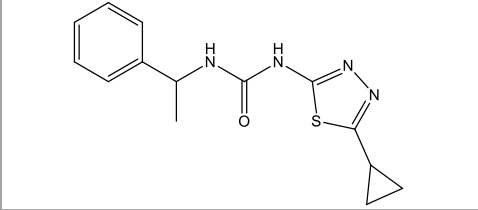
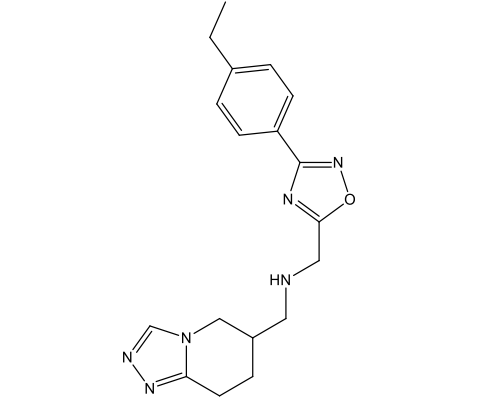
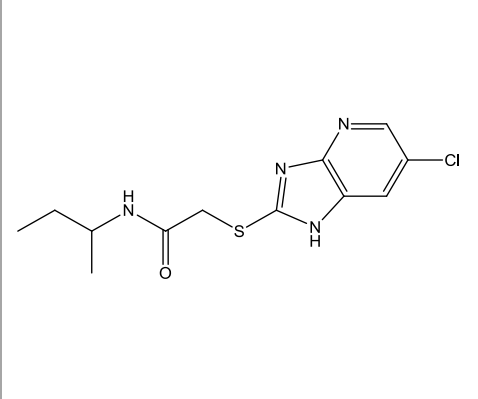
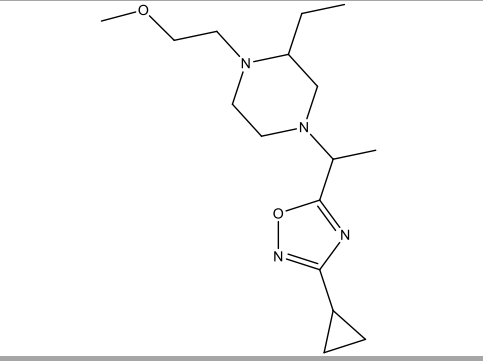
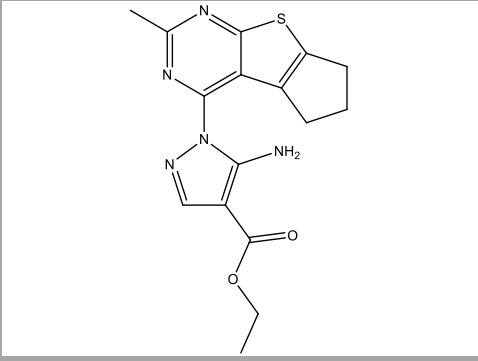
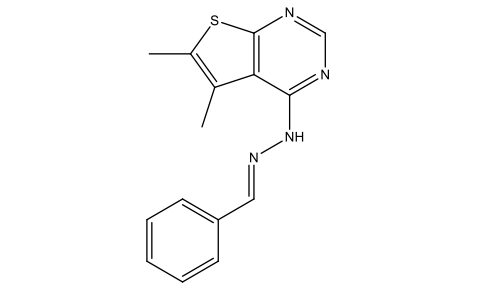
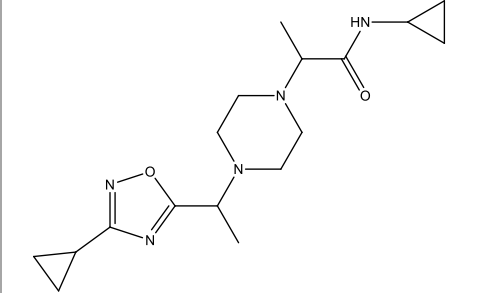
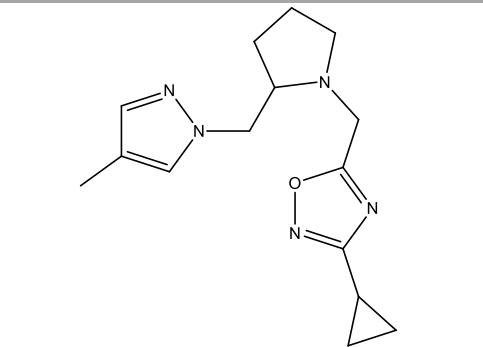
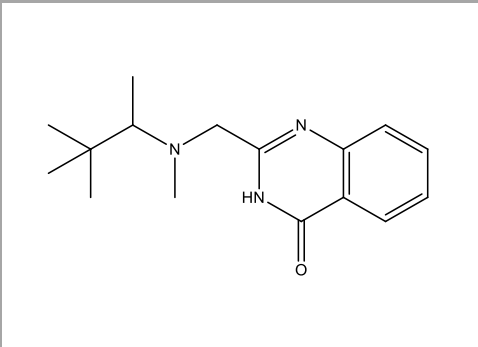


Fonte: O próprio autor.

Essa estratégia resultou na aquisição de 10 moléculas com diferentes quimiotipos que são representativas do espaço amostral (Tabela 7).

⁴ Embora, a base de dados original seja de moléculas comercialmente disponíveis, variações de estoque, interrupção do fornecimento, entre outros fatores, resultam na indisponibilidade de uma quantidade significativa de moléculas. No período do estudo, apenas uma empresa fornecia substâncias para o Brasil.

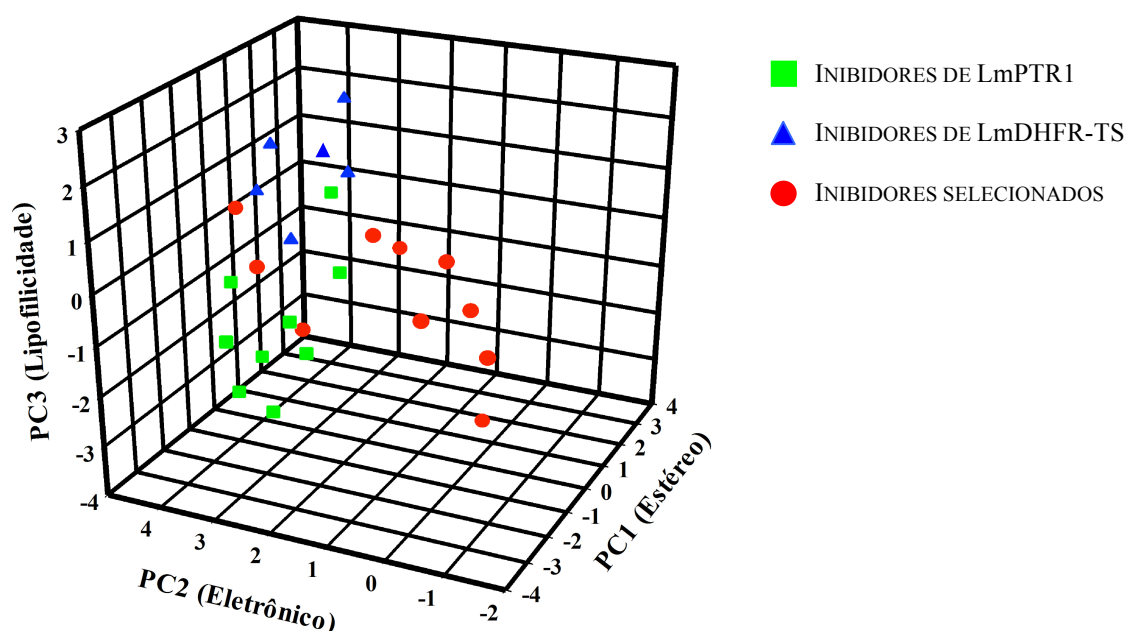
Tabela 7 - Moléculas adquiridas para os ensaios *in vitro*.

Moléculas	Estrutura química	Moléculas	Estrutura química
Z70434		Z60434	
Z52902		Z95807	
Z42256		Z90126	
Z80393		Z74326	
Z39457		Z33165	

Fonte: O próprio autor.

Para avaliar a diversidade química das moléculas adquiridas em relação a inibidores conhecidos de *L. major* PTR1 e DHFR-TS, foi realizada a análise do espaço multidimensional dessas moléculas em relação ao conjunto treinamento de ambas classes de inibidores (Figura 31).

Figura 31 - Representação gráfica do espaço químico tridimensional para as 10 moléculas selecionadas para testes de atividade *in vitro* e inibidores conhecidos de *L. major* PTR1 e DHFR-TS.



Fonte: O próprio autor.

O resultado mostra que a maioria das moléculas selecionadas estão posicionadas em uma região do espaço químico diferente daquela encontrada para os inibidores conhecidos, o que demonstra a habilidade dos modelos farmacofóricos em identificar moléculas não relacionadas ao conjunto treinamento, mas que devem ser avaliadas para identificar o potencial biológico. Portanto, essas moléculas foram submetidas aos ensaios *in vitro* para avaliar a inibição frente a *L. major* PTR1.

Uma estratégia rápida para avaliar essas moléculas é aplicar testes de inibição baseado na reação catalisada pela PTR1, ou seja monitorar a influência delas na redução NADPH-dependente de biopterina para diidrobiopterina e/ou tetraidrobiopterina. Porém, a realização desses ensaios requerem quantidades suficientes de PTR1. A fim de obter PTR1 em quantidades adequadas para todos os ensaios de inibição, expressão e purificação de PTR1 recombinante foi realizada anterior aos ensaios *in vitro*.

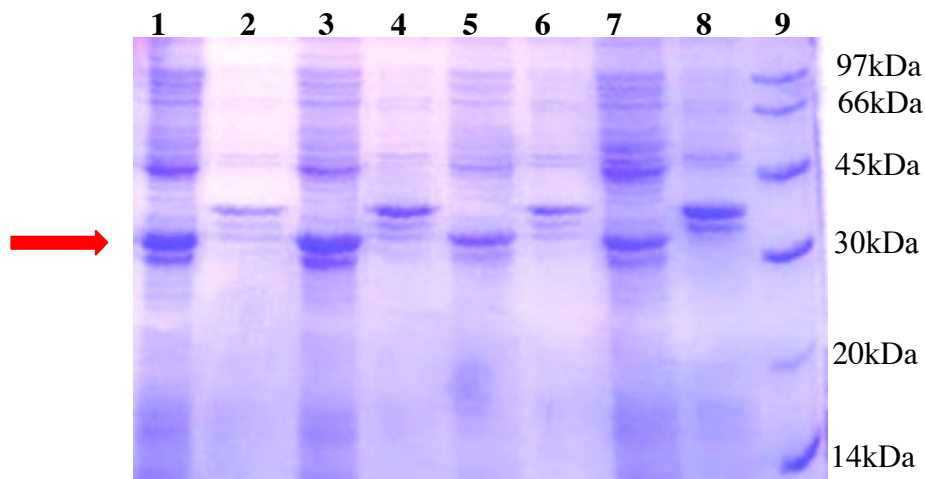
5.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS COM POTENCIAIS INIBIDORES DE *L. major* PTR1

5.2.1 Expressão e Purificação da PTR1 de *L. major*

As etapas de clonagem, expressão e purificação de LmPTR1 já foram descritas na literatura anteriormente (GOURLEY et al., 1999). Apesar do plasmídeo contendo o gene que codifica a LmPTR1 ter sido cedido (seção 4.3.1), a clonagem anterior não garante que o transformante tenha a mesma sequência. Assim foi realizado um sequenciamento do inserto presente em clones para verificação da sua integridade. O produto de sequenciamento quando alinhado à sequência depositada no banco de dados (Uniprot, Q01782), mostrou uma identidade sequencial de 100%, o que descarta a possibilidade de uma eventual mutação (Apêndice C). Portanto, a partir de uma UFC de *E. coli* (BL21-DE3) contendo o plasmídeo que codifica a enzima LmPTR1, prosseguiu-se para a etapa de expressão.

Embora, Gourley e colaboradores (1999) já tenham descrito condições para expressão de PTR1 de *L. major* (18°C, 16 horas de indução com a adição de 1mM de IPTG), optou-se por investigar o efeito da concentração de IPTG nos níveis de expressão proteica visando otimizar as condições e reduzir o custo de cada experimento (Figura 32).

Figura 32 - Teste de expressão da proteína LmPTR1 utilizando diferentes concentrações de IPTG (0,1; 0,5 e 1mM) a 18°C e 16 horas de indução. A análise foi realizada em gel SDS-PAGE a 12% .1) sobrenadante 1,0mM IPTG; 2) precipitado 1,0mM IPTG; 3) sobrenadante 0,5mM IPTG; 4) precipitado 0,5mM IPTG; 5) sobrenadante 0,1mM IPTG; 6) precipitado 0,1mM IPTG; 7) sobrenadante 0,0mM IPTG; 8) precipitado 0,0mM IPTG; 9) padrão de peso molecular (LMW-SDS GE®). A seta indica a região esperada para a banda de expressão de PTR1.

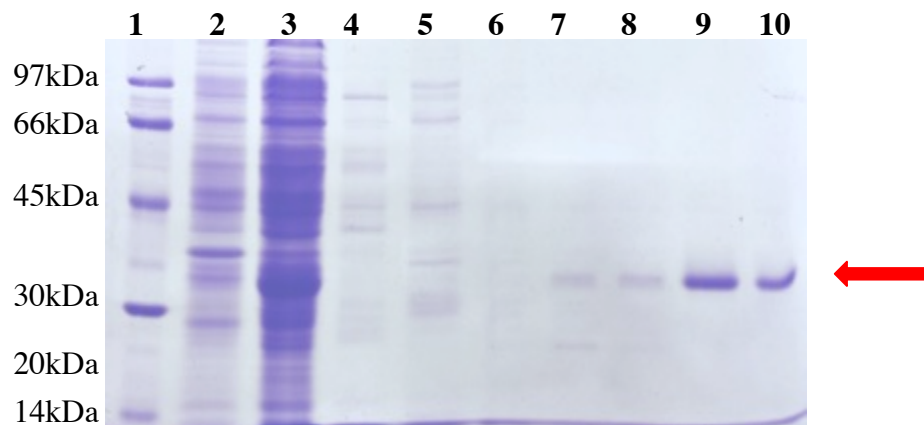


Fonte: O próprio autor.

Os experimentos realizados indicam que 0,5mM de IPTG é suficiente para obter quantidades adequadas (15mg/mL) de PTR1 de forma solúvel, mantendo as outras condições descritas por Gourley e colaboradores (1999).

A purificação da enzima de interesse foi realizada por cromatografia de afinidade utilizando uma resina de sefarose com íons Ni²⁺ imobilizados (Figura 33). A escolha dessa estratégia deve-se ao processo de subclonagem do gene que codifica a proteína no vetor de expressão pET-15b, no qual foram inseridos seis resíduos de histidina na porção N-terminal da proteína.

Figura 33 - Purificação da LmPTR1 por cromatografia de afinidade em coluna de sefarose Ni²⁺-NTA. A análise foi realizada em gel SDS-PAGE a 12%. 1) padrão de peso molecular (LMW-SDS GE®); 2) precipitado; 3) sobrenadante; 4) efluente; 5-6) eluatos com 100mM de imidazol; 7-8) eluatos com 200mM de imidazol; 9-10) eluatos com 400mM de imidazol. A seta indica a região esperada para a PTR1.



Fonte: O próprio autor.

A análise do gel de poliacrilamida mostrou que a proteína foi expressa na fase solúvel (canaleta 3) e ligou-se majoritariamente na coluna de níquel (efluente - canaleta 4). Após a lavagem com 20 mM de imidazol, toda a proteína foi eluída da coluna na presença de 400 mM de imidazol (canaletas 9 e 10). A pureza das frações coletadas (eluatos) foi confirmada por SDS-PAGE, na qual observa-se uma única banda de aproximadamente 30kDa, nas frações eluídas com 400mM de imidazol.

5.2.2 Ensaios *in vitro* para identificação de inibidores de PTR1

Após a obtenção da proteína solúvel foi preciso confirmar a sua atividade catalítica, antes de iniciar a triagem dos potenciais inibidores. Essa etapa foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Dawson e colaboradores (2006). Resumidamente, a reação enzimática inicia-se com a adição da enzima (0,2 μ M) ao meio reacional constituído de solução tampão acetato de sódio 20mM pH 4,7, NADPH (20 μ M) e biopterina (20 μ M). A reação espectrofotométrica é monitorada (340nm) através da oxidação de NADPH para NADP⁺.

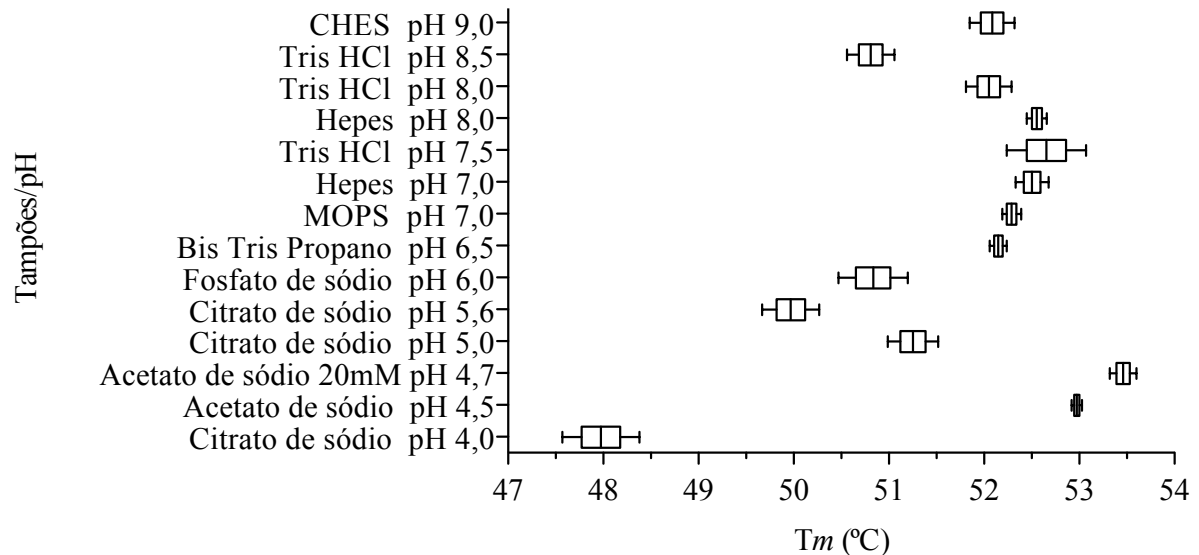
Preliminarmente aos ensaios é fundamental a análise do perfil de absorção das moléculas à serem investigadas para evitar interferências. Por esse motivo, a primeira etapa na triagem dos inibidores consistiu na aquisição de um espectro de varredura na faixa entre 300 e 400 nm, no intuito de identificar possível interferência dos candidatos a inibidor no comprimento de onda do ensaio. Os resultados obtidos mostram que 20% das moléculas absorvem no mesmo comprimento de onda do teste cinético ($\lambda=340$ nm) (Apêndice D). Assim, para que fosse possível a avaliação e comparação de todas essas moléculas, foi executado um estudo do efeito dos potenciais inibidores selecionados na triagem *in silico* sobre a estabilidade térmica da PTR1 por ThermoFluor®.

5.2.2.1 Padronização do ensaio *in vitro* por ThermoFluor®

Dentre os vários fatores que afetam a estabilidade da proteína, o pH e o tampão merecem destaque por interferir diretamente no enovelamento proteico e por conseguinte na solubilidade (DUPEUX et al., 2011). Adicionalmente, o dimetilsulfóxido (DMSO) possui um efeito de desnaturação térmica e a detecção do limite a ser utilizado garante uma maior concentração de proteína enovelada e acurácia na determinação da temperatura de desnaturação. Por fim, a intensidade do sinal de fluorescência nos experimentos de ThermoFluor® é concentração-dependente, porém altas concentrações de proteína pode resultar em uma maior taxa de agregação (CIMPERMAN; MATULIS, 2011). Portanto, essas variáveis foram investigadas antes de iniciar os ensaios de deslocamento térmico na presença dos potenciais inibidores.

As condições testadas foram semelhantes as descritas por Reinhard e colaboradores (2013) juntamente com aquela utilizada para o ensaio da atividade cinética de LmPTR1 (tampão acetato de sódio 20mM pH 4,7) (Figura 34).

Figura 34 - Estabilidade térmica de LmPTR1 em diferentes tampões e pH. O valor de T_m representa o ponto de inflexão da curva de transição entre os estados enovelados e desenovelados da proteína. Os valores estão expressos em mediana e amplitude interquartil (AIQ) (N=3). A caixa representa o primeiro quartil (Q1), mediana e terceiro quartil (Q3), o comprimento da caixa descreve a AIQ e as linhas em cada extremidade correspondem aos valores extremos de T_m ($Q1-1,5 \times AIQ$ e $Q3+1,5 \times AIQ$).



Fonte: O próprio autor.

Os resultados mostram que o maior valor de T_m da PTR1 foi obtida na presença do tampão acetato de sódio 20mM pH 4,7 (53,46 °C), enquanto que o menor valor (47,97 °C) foi observado para o tampão citrato de sódio 50mM pH 4,0. A análise dos demais tampões mostram que, de uma forma geral, a PTR1 tende a ser mais estável em pH básico, exceto na presença do tampão acetato de sódio. Uma hipótese para o efeito desse tampão sobre a termoestabilidade de PTR1 é que o íon acetato esteja se ligando a um sítio específico da PTR1 que gera uma estabilização à forma nativa da proteína, a qual não ocorre com o íon citrato, e portanto, poderia sustentar a diferença significativa entre esses tampões ($\Delta T_m = 5,48^\circ\text{C}$, $p < 0,01$ (teste de Mann-Whitney)).

De uma forma geral, o tampão Tris HCl 50mM pH 7,5 tem sido descrito como um tampão apropriado nas etapas de purificação por cromatografia de afinidade e vem sendo empregado para a purificação da PTR1 de *L. major* (GOURLEY et al., 1999), enquanto que o tampão acetato de sódio 20 mM e pH 4,7 tem sido utilizado para os ensaios de atividade enzimática (DAWSON et al., 2006). Por esse motivo, investigamos a termoestabilidade de PTR1 nesses tampões.

Os dados mostram que não houve diferença significativa entre os tampões acetato de sódio 20mM pH 4,7 e Tris HCl 50mM pH 7,5 ($\Delta T_m = 0,32^\circ\text{C}$, $p = 0,10$), sugerindo que nessa

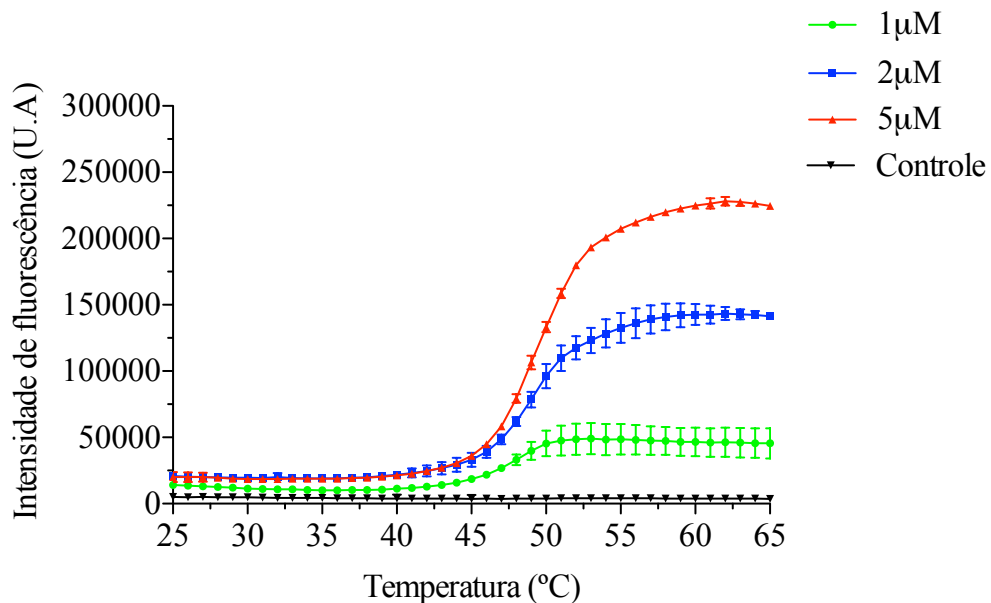
faixa de pH, a estabilidade térmica não muda de forma pronunciada. Estudos têm mostrado que a *Leishmania* spp. sobrevive em ambientes com diferentes pHs a depender da fase evolutiva e por conseguinte do hospedeiro (ZILBESTEIN; SHAPIRA, 1994). No inseto, a forma promastigota vive em ambientes com $\text{pH} \approx 7,0$, enquanto que a amastigota vive em um compartimento celular dentro do macrófago humano, denominado de vacúolo parasitóforo em $\text{pH} \approx 5,0$ (ANTOINE et al., 1990), o que pode explicar a termoestabilidade em ambas as faixas de pH. Outra hipótese é que no hospedeiro invertebrado há uma maior disponibilidade de pteridinas que são fundamentais para manter as taxas de replicação da forma promastigota, ou seja nesse ambiente haveria uma menor atividade da PTR1 (RICHARD et al., 2004). Em contrapartida, devido a forma amastigota estar presente no vacúolo parasitóforo, há uma decréscimo da disponibilidade dessas pteridinas e por conseguinte, uma maior atividade da PTR1 para suprir a demanda metabólica (SIENKIEWICZ et al., 2008).

PTR1 apresenta maior eficiência catalítica em $\text{pH} 4,7$ (GOURLEY et al., 2001; LUBA et al., 1998). Esta característica deve-se ao fato que a primeira etapa de redução acontece através da interação da hidroxila fenólica da Tyr-194, como doador de ligação de H, com o nitrogênio terciário do anel pteridina (N8) (Figura 8). Posteriormente, o Asp-181 interage com esse resíduo através de ligação de H, também como doador, ou seja, a interação só acontece se este resíduo estiver protonado.

A termoestabilidade de PTR1 nessa faixa de pH, abre a oportunidade para a realização de diversos experimentos com inibidores já descritos na literatura (CAVAZZUTI et al., 2008; CORONA et al., 2012; FERRARI et al., 2011), mas que só foram avaliados em $\text{pH} 4,7$. Porém, no intuito de realizar futuras comparações com os ensaios cinéticos/fluorimétricos o tampão acetato de sódio 20 mM $\text{pH} 4,7$ foi escolhido nesse estudo para os próximos ensaios.

O cálculo de T_m depende da inclinação e dos limites inferior e superior da curva (CROWTHER et al., 2009). Por esse motivo, investigamos qual a menor concentração de proteína que garante um sinal adequado para os experimentos no ThermoFluor®. Para este propósito, o valor da razão entre o sinal de fluorescência e o ruído foi calculado em diferentes concentrações de PTR1 (1, 2 e 5 μM) (Figura 35).

Figura 35 – Curva de fluorescência *versus* tempo para diferentes concentrações de proteína. Valores representam a mediana e amplitude interquartil (N=3).



Fonte: O próprio autor.

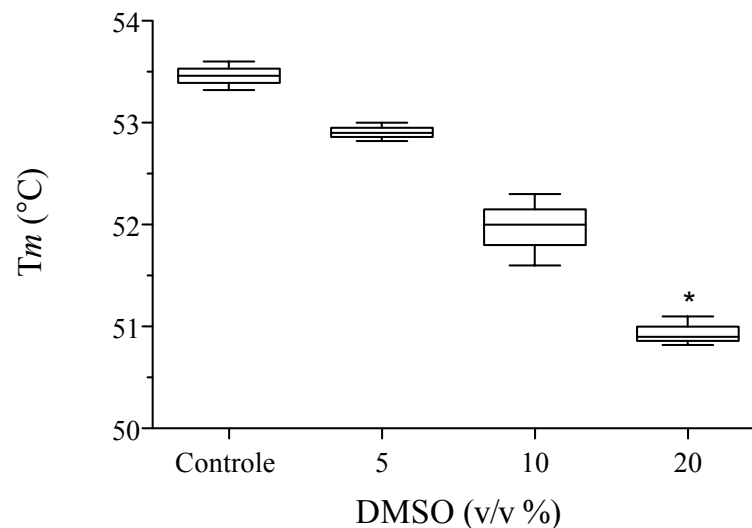
Os resultados mostram que a enzima na concentração de 5µM deu origem a um sinal de fluorescência 12 vezes superior ao controle experimental (5000 U.A.), enquanto para as concentrações de 1 µM e 2 µM, essa razão foi de 4 e 7 vezes, respectivamente.

Vários autores (NIESEN; BERGLUND; VEDANI, 2007; MATULIS et al., 2005; SORREL et al., 2010) realizam experimentos de ThermoFluor® com concentrações de 2µM de proteína. Nossos resultados mostram que nessa concentração, o sinal de fluorescência é 7X superior ao do controle experimental. Embora essa razão seja suficiente para investigar o efeito de tampões e aditivos sobre a termoestabilidade de PTR1, o uso de concentrações elevadas de ligantes pode causar uma redução da intensidade máxima de fluorescência, o que dificultaria a definição da fase pós-transição. A literatura tem mostrado que esse efeito é devido a diminuição da taxa de desenovelamento em detrimento da presença do inibidor (MATULIS et al., 2005). Adicionalmente, tem se especulado que o inibidor possa deslocar o fluoróforo do sítio de ligação (SORRELL et al., 2010). Por essa razão, decidimos utilizar a concentração de 5µM.

Após a padronização do tampão/pH e concentração da proteína, a última variável analisada foi à proporção do dimetilsulfóxido (DMSO) nos ensaios. É sabido que o DMSO gera um efeito desestabilizador para a forma nativa da proteína, geralmente devido ao rompimento de interações intramoleculares presentes nas estruturas secundárias

(ARAKAWA; KITA; TIMASHEFF, 2007; JÓHANNESSEN; DENISOV; HALLE, 1997), por isso a avaliação do efeito de diferentes proporções desse solvente sobre a estabilidade térmica da proteína é crucial para a acurácia na determinação dos valores de T_m . Portanto, o efeito de diferentes proporções de DMSO (5, 10 e 20%) sobre a termoestabilidade da PTR1 foi investigada (Figura 36). Além disso, esse experimento serviu para definir a concentração máxima de DMSO à ser utilizada na solubilização das moléculas para os ensaios de ThermoFluor®.

Figura 36 - Estabilidade térmica de PTR1 (T_m) frente a diferentes concentrações (5, 10 e 20%; v/v) de DMSO. Os valores estão expressos em mediana e amplitude interquartil (N=3). A caixa representa o primeiro quartil (Q1), mediana e terceiro quartil (Q3), o comprimento da caixa descreve a AIQ e as linhas em cada extremidade correspondem aos valores extremos de T_m ($Q1 - 1,5 \times AIQ$ e $Q3 + 1,5 \times AIQ$). * = $p < 0,05$ (*versus* controle). (Teste de Krushal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn).



Fonte: O próprio autor.

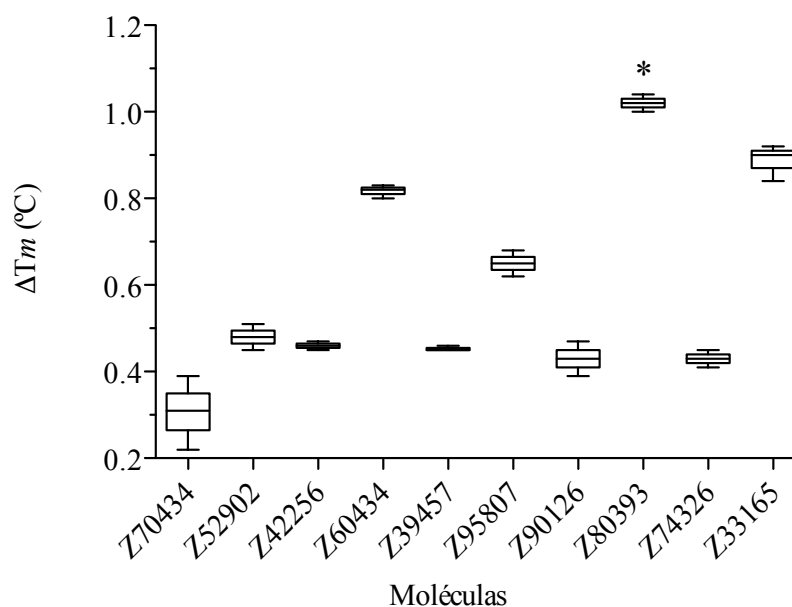
Os resultados indicam que a utilização de 20% de DMSO gerou um efeito negativo e significativo ($\Delta T_m = -2,5$ °C, $p < 0,05$). Apesar do efeito de desestabilização ser significativo apenas nessa proporção, a utilização de até 5% de DMSO foi escolhida por possibilitar a solubilização dos potenciais inibidores.

Após a seleção das melhores condições de estabilidade da PTR1, as 10 moléculas selecionadas por triagem *in silico* foram submetidas ao ensaio de termoestabilidade.

5.2.2.2 Ensaios de concentração única

No processo de triagem de substâncias químicas, um teste de inibição em uma concentração única é geralmente empregado para eliminar moléculas pouco promissoras. Tipicamente, esses experimentos são realizados em concentrações de 1 a 50 μM . A seguir, àquelas com porcentagem de inibição igual ou superior a 30% são novamente avaliadas/confirmadas por outros ensaios bioquímicos ou através de ensaios de concentração-resposta (KESERU; MAKARA, 2006; ZHU et al., 2008). Assim, ensaios de inibição iniciais foram realizados na concentração de 50 μM (Figura 37).

Figura 37 - Estabilidade térmica de PTR1 na presença de potenciais inibidores selecionados na triagem virtual. Valores representam a mediana e amplitude interquartil da variação de T_m (ΔT_m) quando comparada ao controle (DMSO 5%) (N=3). * = $p \leq 0,05$ (versus controle). (Teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn).



Fonte: O próprio autor.

Os resultados mostram que todas as moléculas possuem uma tendência em estabilizar a proteína ($\Delta T_m > 0$), ou seja deslocar o equilíbrio para a forma nativa. No entanto, apenas Z80393 gerou um deslocamento significativo ($\Delta T_m = 1,02^\circ\text{C}$, $p = 0,012$) quando comparado ao controle e aos demais ligantes.

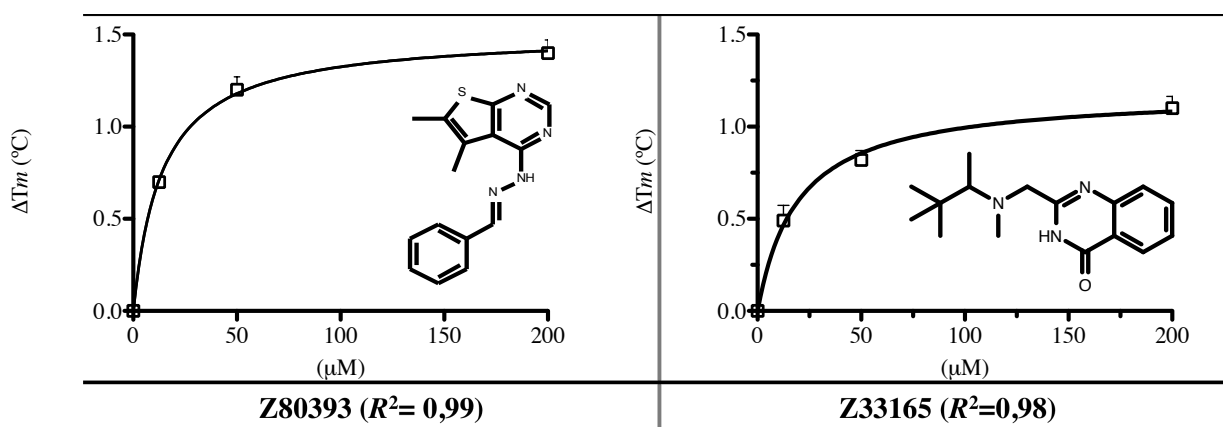
Embora Z33165 não tenha apresentado um ΔT_m significativo quando comparado ao controle/ligantes, estudos sugerem que um ΔT_m maior que três vezes o valor do desvio

padrão experimental são promissoras (HOLDGATE et al., 2010; ZHANG; MONSMA, 2010; KRISHNA et al., 2013). Nesse estudo, o desvio padrão encontrado foi de 0,3 e por essa razão, decidimos incluir, pelo menos Z33165 nos estudos subsequentes⁵.

5.2.2.3 Ensaio de concentração-resposta

Apesar dos resultados nos ensaios de concentração única, esses dados não são suficientes para garantir a afinidade de Z80393 e Z33165 frente a PTR1, ou seja ensaios com diferentes concentrações dos inibidores são necessários para avaliar se elas estabilizam a proteína de uma maneira dependente da concentração e não decorrente de uma interação inespecífica (NIESEN; BERGLUND; VEDADI, 2007). Diante do exposto, a termoestabilidade da PTR1 foi avaliada na presença de diferentes concentrações (200, 50 e 12,5 μ M) dos inibidores Z80393 e Z33165 (Figura 38).

Figura 38 - Estabilidade térmica de PTR1 frente a três diferentes concentrações de Z80393 e Z33165. Os valores estão expressos em mediana e amplitude interquartil da variação de T_m (ΔT_m) (N=3).



Fonte: O próprio autor.

Os dados sugerem que Z80393 e Z33165 possuem uma relação de dependência entre concentração e ΔT_m , confirmando a interação dessas moléculas frente a PTR1.

Matulis e colaboradores (2005) demonstraram o uso da curva dose-resposta, obtida dos experimentos de ThermoFluor®, para extrair as constantes de ligação. Porém, a determinação desses parâmetros requer o conhecimento de propriedade termodinâmicas como a entalpia de desenovelamento da estrutura ($\Delta H_{unfolding}$) e os dados de capacidade térmica

⁵ As moléculas com $\Delta T_m > 0,3$ estão sendo investigadas por outros alunos.

($\Delta C_{punfolding}$), normalmente obtidos por titulação calorimétrica isotérmica (ITC – do inglês *Isothermal Titration Calorimetry*).

Apesar da possibilidade de estimar $\Delta H_{unfolding}$ através da curva de fluorescência *versus* temperatura (LO et al., 2004; MATULIS et al., 2005) e $\Delta C_{punfolding}$ através do peso molecular da proteína (ROBERTSON; MURPHY, 1997), estes valores podem resultar em um erro de até duas ordens de grandeza do valor de K_d (ZHANG; MONSMA, 2010).

Por outro lado, o ThermoFluor® pode ser utilizado para investigar a modalidade de interação, por meio da adição de cofator, substrato e outros aditivos que possam competir com o ligante a assim alterar seu efeito sobre a termoestabilidade (LEA; SIMEONOV, 2012; VENKATRAMAN et al., 2012).

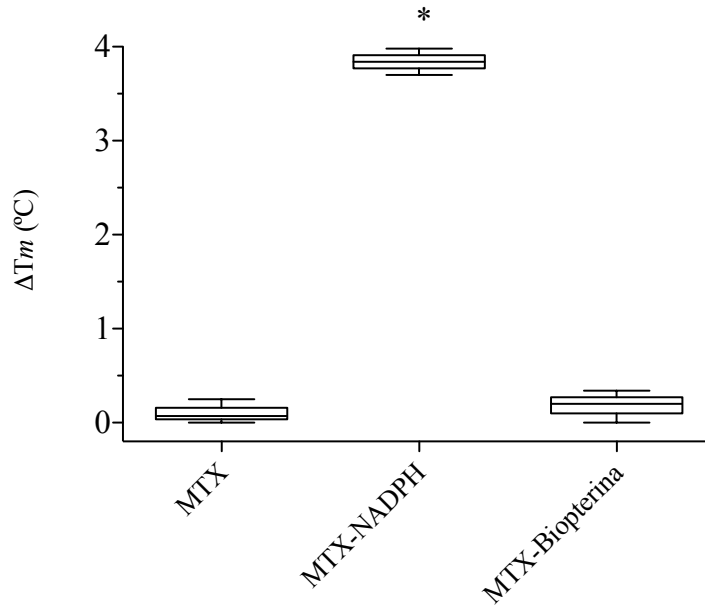
5.2.2.4 Modalidade de inibição

A informação do tipo de modalidade de inibição é fundamental para guiar o planejamento de moléculas mais potentes baseado no tipo de interação com o receptor (STRELOW et al., 2012). Estudos têm mostrado a possibilidade da utilização do ThermoFluor® para a determinação da modalidade de inibição com resultados satisfatórios quando comparado a ensaios como cinética enzimática (VENKATRAMAN et al., 2012; HOLDGATE et al., 2010; LEA; SIMEONOV, 2012). Porém, a determinação da modalidade de inibição por ensaio cinético requer a informação de parâmetros cinéticos/termodinâmicos enquanto o método do ThermoFluor® permite determinar qualitativamente, qual a modalidade de inibição. Assim, a perspectiva de utilizar uma plataforma de alto rendimento como o ThermoFluor® pode tornar a determinação da modalidade de inibição mais ágil e por conseguinte aumentar o número de moléculas avaliadas (PANTOLIANO et al., 2001).

No intuito de padronizar o método para investigar a modalidade de inibição, inicialmente foi avaliada a concentração de cofator e do substrato suficientes para gerar uma diferença significativa do ΔT_m na presença do metotrexato (MTX) que é descrito na literatura (KAUR et al., 2010; 2012) como inibidor incompetitivo com o NADPH frente à PTR1 de *L. major* (controle).

Devido a baixa potência deste inibidor frente a PTR1 ($IC_{50}=1,10 \mu M$) (GOURLEY et al., 2001), foi necessário empregar uma concentração 50 vezes superior ao IC_{50} nos ensaios com ThermoFluor®. Adicionalmente, uma concentração correspondendo à aproximadamente quatro vezes o valor do K_m do NADPH ($13,2 \mu M$) ou Biopterina ($12,2 \mu M$) (NARE; HARDY; BEVERLEY, 1997) foi empregada para a detecção do deslocamento térmico (Figura 39).

Figura 39 - Estabilidade térmica de PTR1 frente ao metotrexato na presença de concentrações quatro vezes superior ao K_m do NADPH ou biopterina ($50 \mu\text{M}$). Valores representam a mediana e amplitude interquartil da variação de T_m (ΔT_m) quando comparada ao controle (DMSO 5%). * = $p \leq 0,05$ (*versus* controle). (Teste de Mann-Whitney).

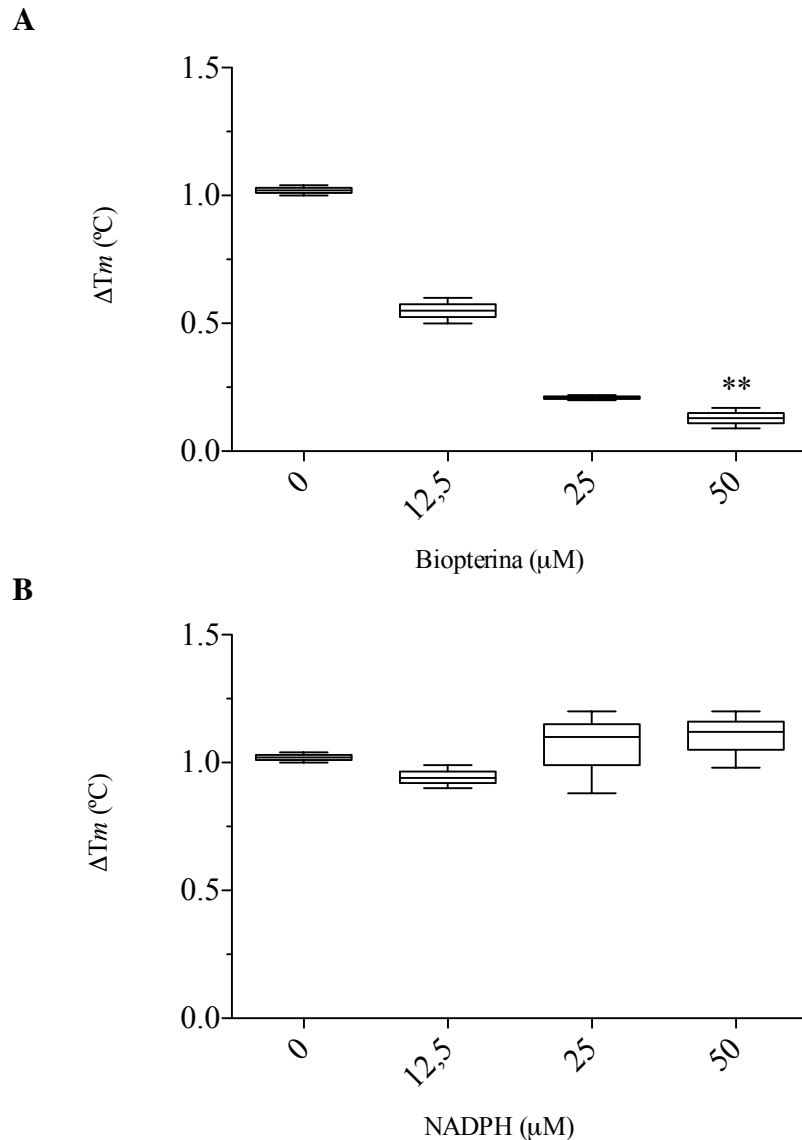


Fonte: O próprio autor.

O resultado indicou que metotrexato não tem efeito significativo na temperatura de desnaturação da PTR1 na forma APO ($p=0,35$), ou na presença de biopterina ($p=0,50$). Porém, houve efeito positivo e significativo para o complexo PTR1-NADPH acarretando em um $\Delta T_m = 3,84 \text{ }^\circ\text{C}$ ($p=0,05$).

Esses dados mostram que essas mesmas concentrações de NADPH/Biopterina podem ser usadas para investigar a modalidade de inibição de Z80393 e Z33165. Entretanto, mais duas concentrações ($12,5 \mu\text{M}$ e $25 \mu\text{M}$) foram utilizadas para avaliar a dependência da termoestabilidade em relação a concentração e assegurar a determinação da modalidade de inibição frente a PTR1 (Figura 40).

Figura 40 - Estabilidade térmica de PTR1 frente a Z80393 na presença de três diferentes concentrações de Biopterina (A) ou NADPH (B). Valores representam mediana e amplitude interquartil da variação de T_m (ΔT_m) quando comparada ao controle (DMSO 5%) (N=3). ** = $p \leq 0,01$ (*versus* controle). (Teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn).

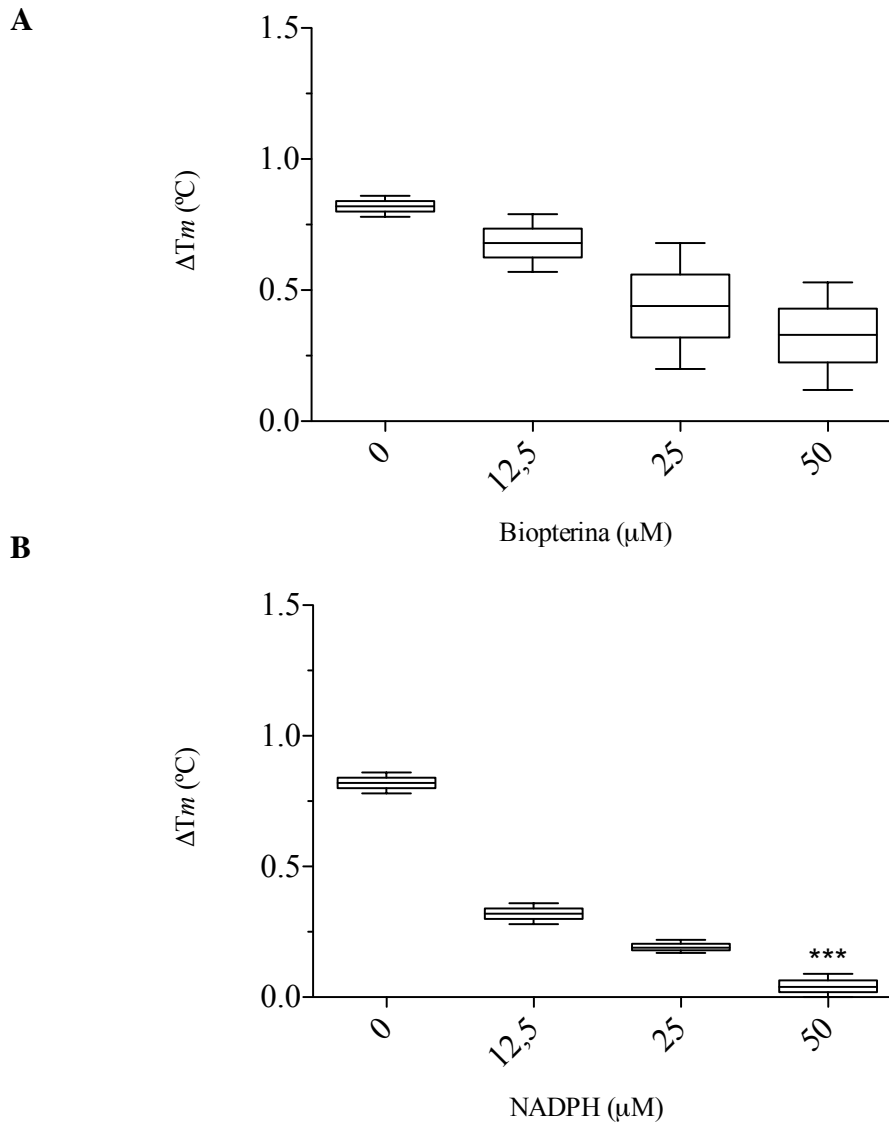


Fonte: O próprio autor.

Os dados mostram uma tendência da diminuição do valor de ΔT_m nas concentrações 12,5 e 25 μM que se torna significativa após a adição de 50 μM de biopterina ($\Delta T_m = 0,13$ °C, $p = 0,014$). Esse resultado sugere que Z80393 compete com biopterina para se ligar com PTR1 (Figura 40-A). Em relação a forma APO com NADPH (Figura 40-B), não houve diferença significativa sobre a estabilidade térmica de PTR1. Estes dados permitem inferir que este inibidor pode agir de forma competitiva apenas com o substrato.

A mesma estratégia foi empregada para avaliar o efeito da adição de NADPH ou Biopterina na termoestabilidade de PTR1 na presença de Z33165 (Figura 41).

Figura 41 - Estabilidade térmica de PTR1 frente a Z33165 na presença de três diferentes concentrações de Biopterina (A) ou NADPH (B). Valores representam mediana e amplitude interquartil da variação de T_m (ΔT_m) quando comparada ao controle (DMSO 5%) (N=3). *** = $p \leq 0,001$ (*versus* controle). (Teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn).



Fonte: O próprio autor.

Os dados apontam uma tendência da diminuição do valor de ΔT_m com o aumento da concentração de biopterina, porem não houve diferença significativa no efeito sobre a estabilidade térmica de PTR1 frente a Z33165 em comparação aos controles (Figura 41-A). De forma semelhante ao observado com a biopterina, existe uma tendência para diminuição do deslocamento térmico de Z33165 com a adição de NADPH, que se tornou significativa

após a adição de 50 μM do cofator ($\Delta T_m = 0,04$ $^{\circ}\text{C}$, $p = 0,0003$), o que demonstra que Z80393 pode agir de forma competitiva com o NADPH (Figura 41-B). Estes dados permitem inferir que esta molécula pode agir de forma competitiva apenas com o cofator.

Do ponto de vista químico, os resultados acima podem ser justificados da seguinte forma: O anel tiemo-2,3 pirimidina de Z80393 (Tabela 7) pode realizar as mesmas interações que o anel pteridina do substrato, razão pela qual eles competem entre si pela interação com PTR1. De forma análoga, o anel quinazolina em Z33165 (Tabela 7) pode ser considerado um bioisótero do grupo adenina presente no cofator.

Embora os resultados obtidos comprovem a modalidade de interação, eles não permitem avaliar as etapas subsequentes à formação do complexo enzima-ligante. Adicionalmente, a potência de Z80393/Z33165 não puderam ser determinadas nos experimentos de ThermoFluor®. Outro fator importante é que moléculas com atividade em mais de um ensaio biológico possuem maiores chances de se tornar uma molécula promissora em etapas futuras. Portanto, Z80393 que apresentou efeito positivo e significativo sobre a estabilidade térmica de PTR1, foi direcionada para ensaios fluorimétricos, em colaboração com o Dr. Gustavo Trossini (FCF-USP).

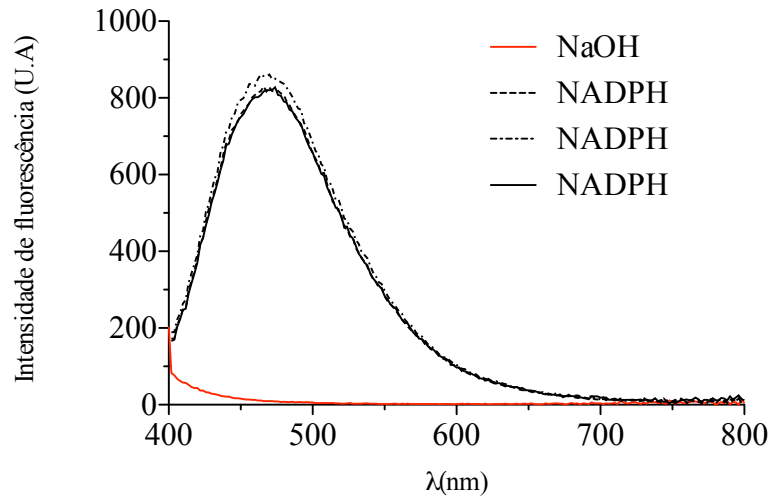
5.2.2.5 Ensaio *in vitro* por espectrofluorimetria

A fluorimetria tem como vantagens elevada sensibilidade (cerca de 100 vezes maior do que a espectroscopia de ultravioleta visível (UV-vis)), maior seletividade, pois poucos compostos que absorvem radiação eletromagnética são capazes de emitir fluorescência e baixo limite de detecção (GIL et al., 2009; VILASBOAS E SANTOS; GIL, 2010).

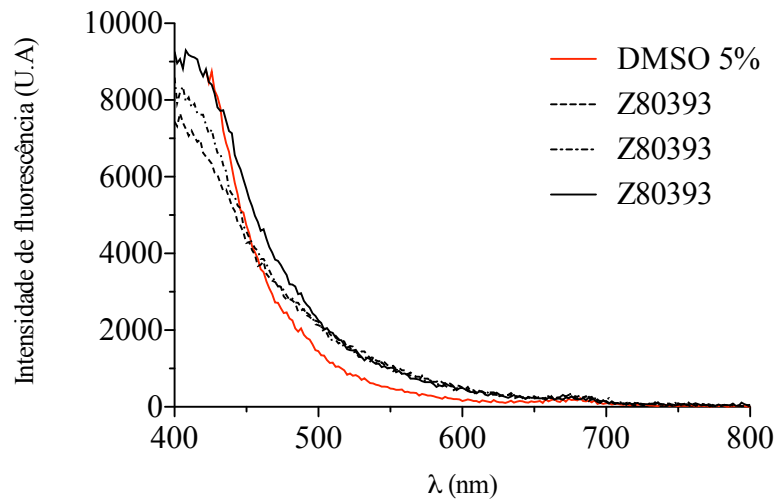
Uma vez que moléculas absorvem em comprimentos de onda semelhantes, eles podem emitir em comprimentos de onda diferentes. Por esse motivo, uma varredura de fluorescência foi realizada entre 400 a 800nm para investigar o comprimento de onda de emissão de Z80393 e NADPH, utilizando o mesmo comprimento de onda (λ excitação= 340nm) (Figura 42).

Figura 42 - Espectro de emissão para NADPH (100 μ M) e seu controle (NaOH 0,02M) (A) e Z80393 (100 μ M) juntamente com o seu controle (DMSO 5%), utilizando o comprimento de onda de excitação de 340nm (B). A análise foi realizada em triplicata à 30°C.

A



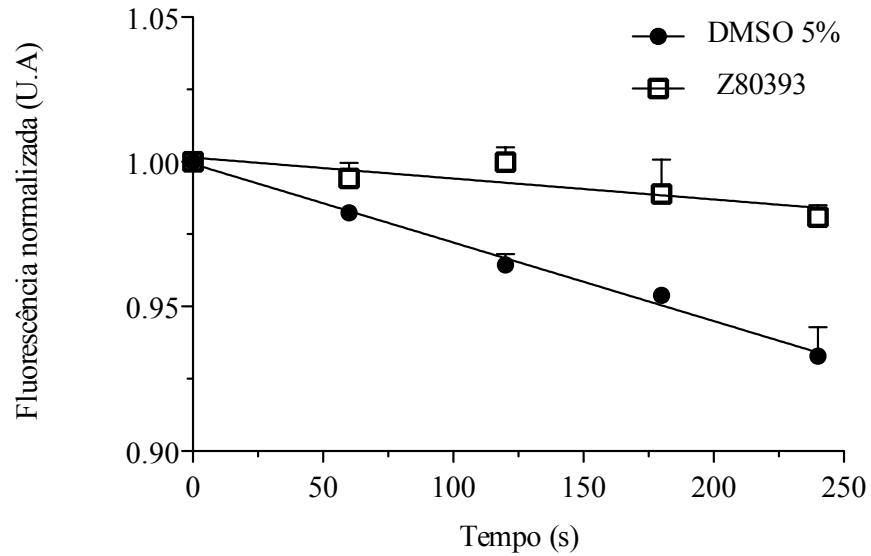
B



Fonte: O próprio autor.

O resultado mostra que, o NADPH possui um comprimento de onda de máxima emissão em 470 nm, enquanto Z80393, apresenta um pico de emissão em 410nm. Esse dado demonstra que é possível avaliar a atividade de Z80393 sem interferência nas medidas de fluorescência. Após essa etapa, um ensaio de dose única de 50 μ M de Z80393 foi executado utilizando os comprimentos de onda de excitação e emissão de 340 e 470nm, respectivamente (Figura 43).

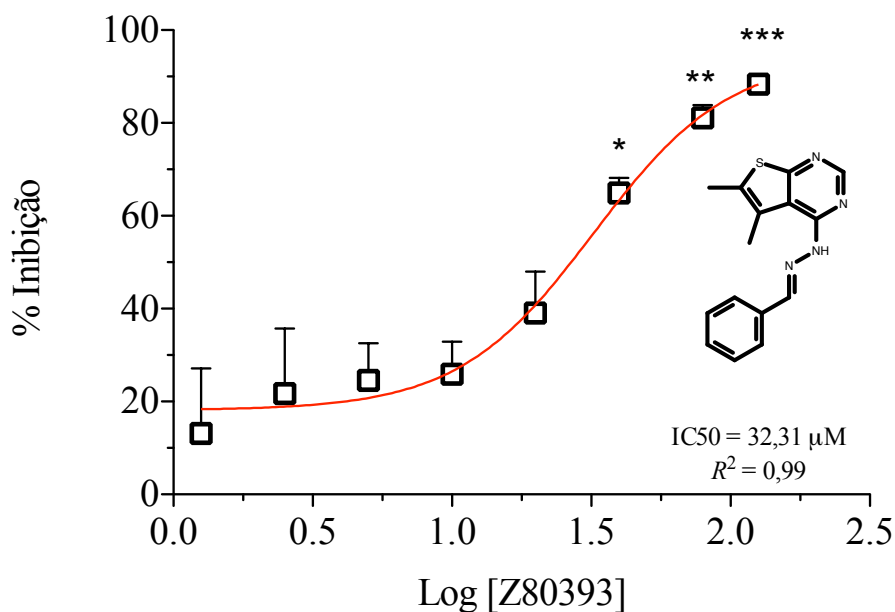
Figura 43 - Curva de fluorescência *versus* tempo para PTR1 na presença de NADPH (20 μ M), Biopterina (20 μ M) e Z80393 (50 μ M). Valores representam mediana e amplitude interquartil da fluorescência quando comparada ao controle (DMSO 5%) (N=3). (Teste de Mann-Whitney).



Fonte: O próprio autor.

Os resultados demonstram que a presença de Z80393 provocou uma diminuição da inclinação da curva de fluorescência de forma significativa ($p=0,079$), quando comparada ao controle, a qual corresponde a uma inibição de 90,50%. Após esse ensaio preliminar foi possível determinar quais concentrações seriam usadas para determinar o IC50. Deste modo, diferentes concentrações de Z80393 (1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40; 80; 120 μ M) foram avaliadas (Figura 44).

Figura 44 - Porcentagem de inibição em função do logaritmo da concentração de Z80393. Valores representam mediana e amplitude interquartil da fluorescência quando comparada ao controle (DMSO 5%) (N=3). *** = $p \leq 0,001$; ** = $p \leq 0,01$; * = $p \leq 0,05$ (*versus* controle) (Teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn).



Fonte: O próprio autor.

O ensaio de concentração-resposta permitiu determinar que Z80393 possui um $IC_{50} = 32,31 \pm 1,18 \mu M$, com efeito significativo ($p < 0,05$) a partir de $40 \mu M$, o que demonstra que essa molécula é um potencial inibidor da PTR1 de *L. major*, mas que deve ser otimizada para aumentar a afinidade frente ao alvo. Uma forma de alcançar esse objetivo é através da construção de modelos ligante-macromolécula que considerem a flexibilidade conformacional do ligante e da proteína e permitam visualizar as interações intermoleculares responsáveis pela estabilização e a proposição de modificações moleculares.

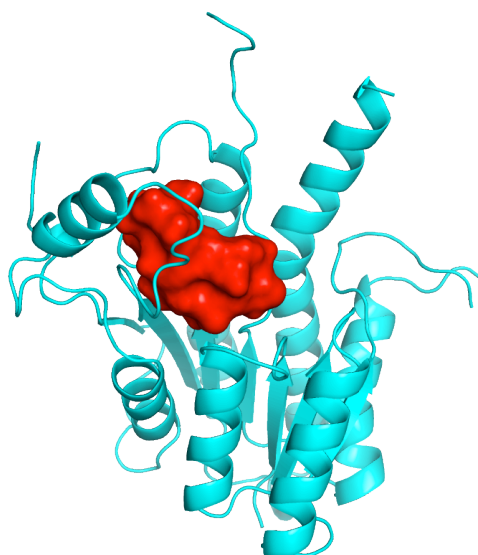
Portanto, no intuito de explicar atomisticamente o efeito de Z80393 na estabilidade térmica de PTR1 e por conseguinte identificar o modo de ligação no sítio do substrato, conforme os achados experimentais, estudos de acoplamento molecular seguido de simulações de DM foram realizados.

5.3 AVALIAÇÃO DAS INTERAÇÕES INTERMOLECULARES POR DINÂMICA MOLECULAR

Diversos estudos têm demonstrado a aplicação da DM para avaliar a estabilidade da proteína frente a ligantes e estudar seu modo de ligação (KANNAN et al., 2015; CAVALLARI et al., 2006; PITA; PASCUTTI, 2012; LI et al., 2014). De forma semelhante, a dinâmica molecular foi empregada nesse estudo com o intuito de propor um modo de interação para Z80393. A escolha dessa molécula deveu-se ao perfil de deslocamento térmico superior às demais moléculas avaliadas, além de ter sido a única com efeito significativo ($\Delta T_m = 1,02$ °C, $p < 0,05$) quando comparada ao controle.

Considerando que, Z80393 interage no mesmo sítio que biopterina, os estudos de acoplamento foram realizados no sítio de ligação do substrato. Após o preparo do receptor, o espaço de procura (*protomol*) foi definido com base nos resíduos presentes no sítio do substrato no intuito de posicionar Z80393 para a busca conformacional e pontuação (Figura 45).

Figura 45 - A representação do *protomol* (*surface*) utilizado para definição do espaço de busca. A estrutura 3D da PTR1 (PDB: 1E92) está representada em *cartoon*.

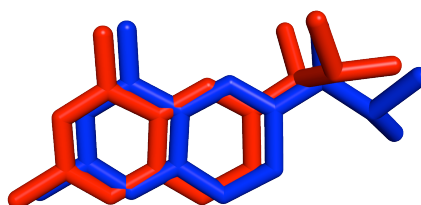


Fonte: O próprio autor.

Uma das principais formas para avaliar a eficiência do acoplamento molecular se dá pela comparação da pose obtida por meio do programa e a conformação observada cristalograficamente. Quando o RMSD entre elas é inferior a 2Å, costuma-se julgar que a solução encontrada pelo programa é satisfatória (MIZUTANI et al., 2006). Além de ser rápida

e de fácil interpretação, essa abordagem demonstra a habilidade dos programas (busca conformacional e a função de pontuação) em identificar uma orientação correta. A pose de maior pontuação, encontrada com auxílio do programa Surflex-Dock apresenta RMSD= 0,8 Å (Figura 46).

Figura 46 - Sobreposição do ligante cristalográfico (vermelho) em relação à pose melhor pontuada obtida pelo acoplamento molecular (azul). A representação da estrutura de PTR1 (PDB: 1E92) foi omitida para facilitar a visualização.



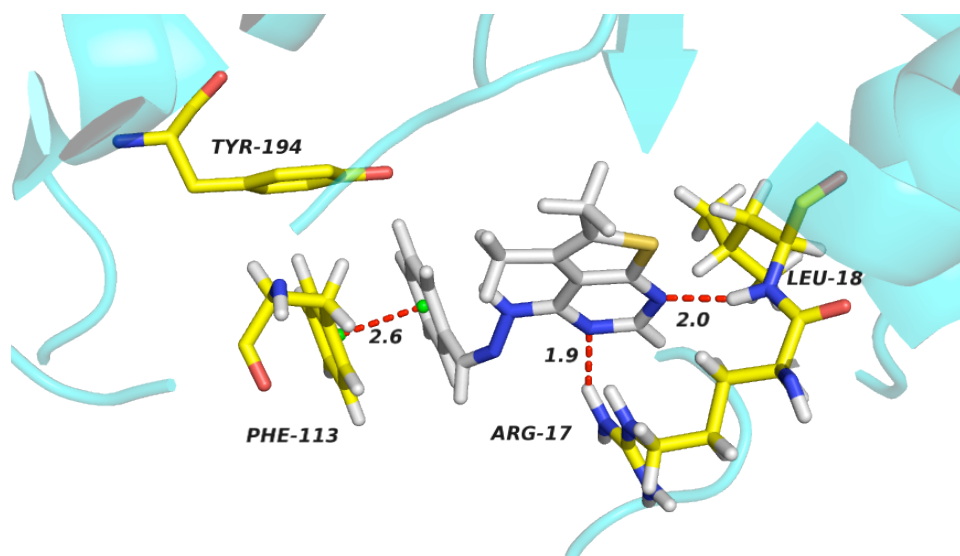
Fonte: O próprio autor.

Os resultados obtidos sugerem que a utilização de parâmetros padrão de busca é suficiente para produzir poses confiáveis, pelo menos quando a flexibilidade conformacional é limitada (< 3 ligações rotacionáveis).

Uma vez que Z80393 também tem poucas ligações rotacionáveis, os mesmos parâmetros de busca foram utilizados para investigação do seu modo de interação. A pose com melhor pontuação (2,85kcal/mol⁶) (Figura 47) sugere que interações de empilhamento *pi* entre o grupo aril da molécula com o resíduo Phe-113, interações hidrofóbicas com a Tyr-194 e ligações de H entre o anel pirimidina e os resíduos Arg-17 e Leu-18 são responsáveis pela afinidade dessa molécula por PTR1 de *L. major*. Dois desses resíduos (Arg-17 e Tyr-194) participam da catálise enquanto os demais são responsáveis por estabilizar o substrato no sítio de ligação. Portanto, essa pose está de acordo com a modalidade de interação proposta por ThermoFluor®.

⁶ Calculado a partir do “score total” do Surflex-dock e considerando RT= 0,59Kcal/mol (temperatura de 30° C).

Figura 47 - A melhor pose da molécula Z80393 no sítio de ligação do substrato na PTR1 (PDB: 1E92). As linhas tracejadas em vermelho representam as ligações de H. Os aminoácidos importantes para a catálise estão representados em bastões com os carbonos em amarelo, nitrogênios em azul, oxigênio em vermelho e hidrogênios em cinza. A molécula está representada em bastões com os carbonos em cinza, nitrogênios em azul e enxofre na cor laranja. As esferas verdes representam os centroides dos anéis aromáticos envolvidos na interação de empilhamento *pi*. As distâncias estão expressas em angstroms.



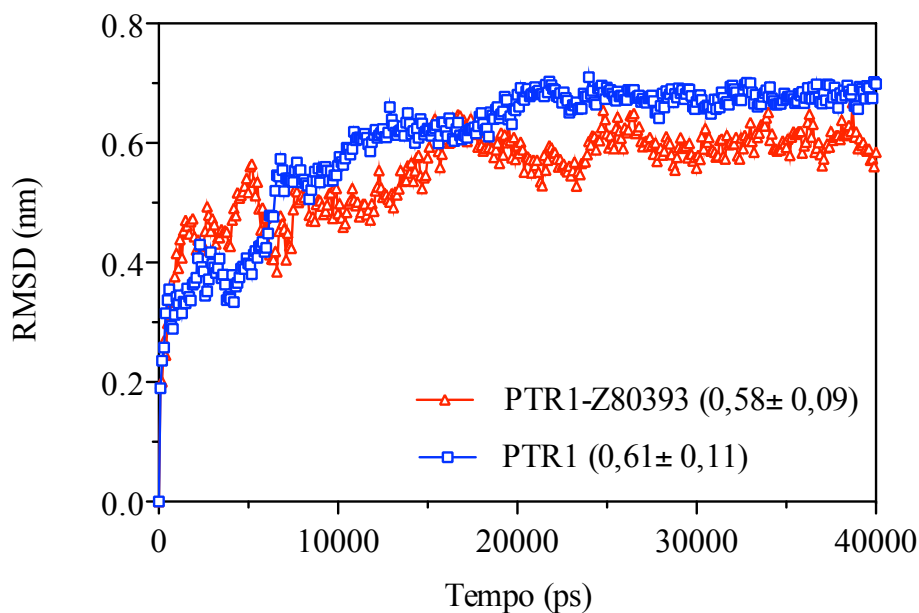
Fonte: O próprio autor.

Todavia, os experimentos de acoplamento molecular desconsideram a flexibilidade conformacional da proteína e não descrevem de forma adequada o papel de moléculas de água no perfil de interação ligante-proteína. A fim de contornar tais limitações, a estabilidade estrutural do complexo PTR1-Z80393 foi avaliada por dinâmica molecular.

A análise da estabilidade estrutural iniciou-se pela avaliação da energia total, cinética e potencial (Apêndice E), a qual confirmou a estabilidade do complexo, ou seja, os valores energéticos descritos pelo campo de força GROMOS96 53a6 encontram-se em patamares numéricos que permitem a confiabilidade em seus valores.

Posteriormente, a estabilidade estrutural foi avaliada pela variação das posições atômicas através do cálculo de RMSD em relação à estrutura inicial da dinâmica. Dados de RMSD para a cadeia principal (*backbone*) foram obtidos para a proteína APO e em complexo com Z80393 ao longo da trajetória de 40 ns (Figura 48).

Figura 48 - Valores de RMSD (nm) para a cadeia principal (*backbone*) na forma APO da PTR1 e complexo PTR1-Z80393 durante toda a trajetória de DM. A média \pm desvio padrão dos sistemas está mostrada no gráfico.

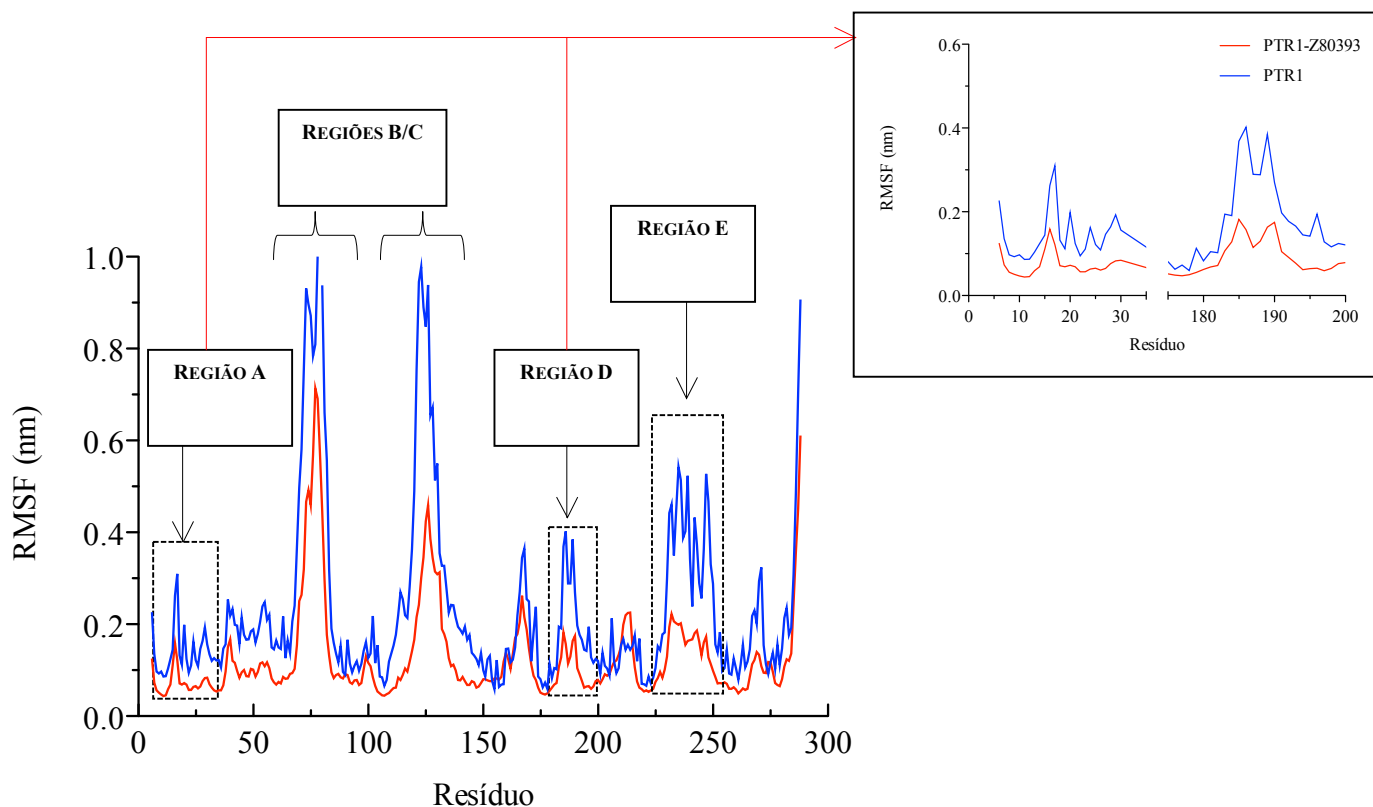


Fonte: O próprio autor.

Os dados mostram que ambos os sistemas estabilizam a partir de 25 ns, ou seja, a partir desse tempo de simulação há pouca variação estrutural, razão pela qual a fase produtiva da DM, na qual é realizada aquisição de dados para análise, foi considerada como de 25 a 40 ns. Nesse período, a forma APO mostra um desvio superior quando comparado ao complexo PTR1-Z80393, o que pode ser decorrente de interações intermoleculares, realizadas no sítio do substrato, que afetam diretamente na variação das posições atômicas.

Apesar dos resultados de RMSD demonstrarem a estabilidade dos sistemas, a utilização apenas desse parâmetro não possibilita avaliar a contribuição de determinadas regiões da proteína para a estabilidade estrutural da PTR1, por exemplo, o sítio de ligação do substrato. Além disso, como o RMSD representa uma medida média de um conjunto de átomos selecionados, os valores observados trazem consigo influências de diferentes regiões da proteína. Desta forma, a flutuação dos átomos de cada resíduo pode auxiliar na compreensão do efeito de Z80393 na estabilização da estrutura com foco na região do sítio ativo bem como auxiliar na proposição de um modo de interação. Para este propósito, gráficos de flutuação dos resíduos para a forma APO foram gerados e comparados com as do complexo através dos valores de RMSF, durante a fase produtiva (Figura 49).

Figura 49 - Flutuação (RMSF) calculada para cada resíduo (*backbone*) da proteína durante a fase produtiva da DM. As regiões pontilhadas descrevem áreas com maiores flutuações atômicas entre os sistemas, enquanto que a área em destaque refere-se a resíduos que compõem o sítio de ligação do substrato (A e D).



Fonte: O próprio autor.

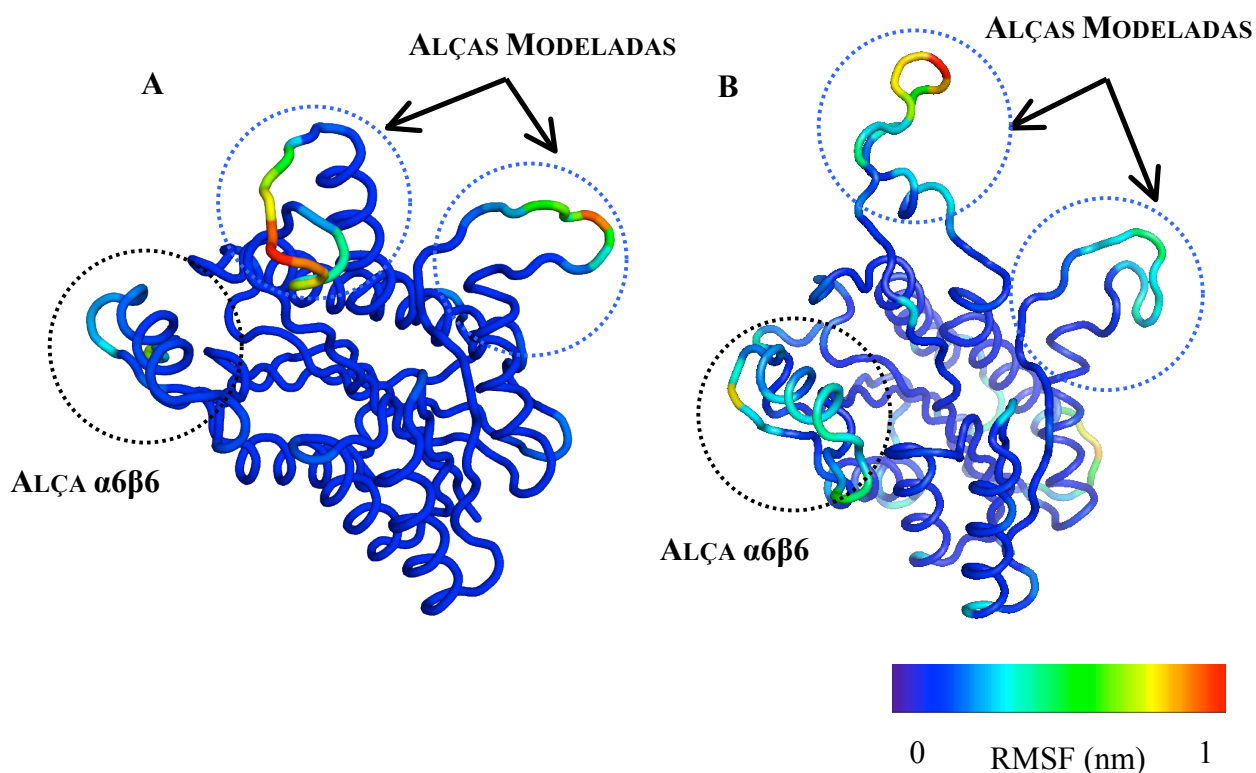
As regiões com maiores flutuações atômicas (B e C) correspondem as alças (V74-S80 e D231-E239) que foram previamente construídas com auxílio do programa HyperChem™ 7.5 (Hypercube, Inc.)⁷, pois a estrutura cristalográfica de PTR1 não tem densidade eletrônica para essas alças. As regiões de alças são conhecidas por sua alta flexibilidade conformacional e, portanto tendem a apresentar os maiores valores de flutuação. De fato, esse comportamento também é observado para a alça $\alpha 6$ - $\beta 6$ (R227-A254). Embora a literatura não aponte a participação de nenhum dos resíduos presentes nessas regiões na catálise, a mobilidade conformacional parece estar envolvida no acesso do substrato e cofator ao sítio (GOURLEY et al., 2001).

⁷ A sequência de aminoácidos presente nessas alças foram conectadas às regiões correspondentes na proteína. A seguir, elas foram minimizadas por *Steepest Descent* com um critério de convergência de 0,5 Kcal/mol em até 10000 passos.

As regiões A e D possuem resíduos presentes no sítio de ligação do substrato como Arg-17, Leu-18, Asp-181 e Tyr-194. Os dados mostram que a região do sítio ativo no complexo PTR1-Z80393, possuem uma menor flutuação quando comparado a forma APO da PTR1. Esse resultado demonstra que Z80393 é capaz de realizar interações com os resíduos presentes no sítio de ligação do substrato, o que leva a uma menor flutuação.

Para facilitar a visualização das regiões com maior flutuação na estrutura da proteína durante a trajetória, uma representação 3D do gráfico da flutuação foi gerada para o complexo e forma APO da PTR1 (Figura 50).

Figura 50 - Representação 3D da flutuação de RMS para a cadeia principal da estrutura média do complexo PTR1-Z80393 (A) e forma APO (B) durante a fase produtiva. A proteína está representada em *cartoon* com coloração de acordo com os valores de flutuação. As flutuações estão representadas por uma escala de cores, em que as regiões coloridas de azul a verde variam entre 0 e 0,5 nm e as regiões coloridas de amarelo a vermelho, 0,5 a 1,0 nm.

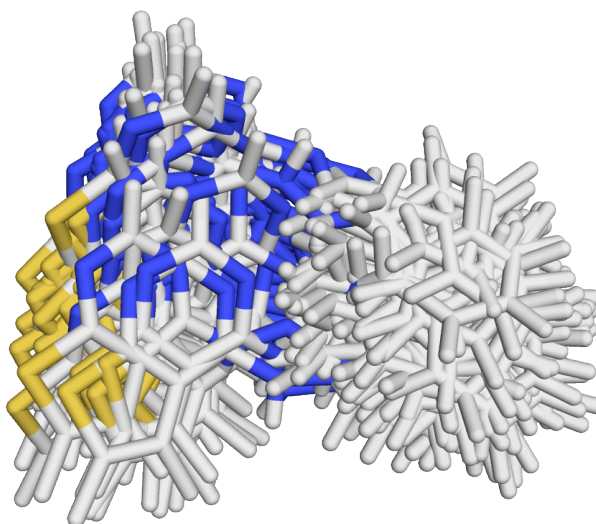


Fonte: O próprio autor.

A partir da análise 3D dos dados de flutuação, nota-se que as regiões em azul escuro são as mais estáveis, ou seja, aquelas sujeitas às menores flutuações. Conforme descrito no gráfico de RMSF, a estrutura PTR1-Z80393 apresentou menor flutuação quando comparada à forma APO da proteína.

A análise da flutuação de Z80393 durante a fase produtiva da dinâmica molecular evidencia que ele se manteve estável dentro do sítio (RMSF: $0,10 \pm 0,04$ nm), o que pode corroborar com o perfil de flutuação encontrado para os aminoácidos do sítio de ligação do substrato (Figura 51).

Figura 51 - Representação 3D da flutuação de RMS para Z80393 durante a fase produtiva. A representação da estrutura de PTR1 foi omitida para facilitar a visualização.



Fonte: O próprio autor.

Tomados em conjunto, os parâmetros energéticos (energia total, cinética e potencial) RMSD e RMSF revelam a estabilidade do complexo durante a DM e a possibilidade de uma aquisição de dados confiáveis para o planejamento de fármacos mais potentes e seletivos. Uma forma de alcançar esse objetivo compreende a identificação das interações intermoleculares responsáveis pela estabilização de Z80393 no sítio de ligação do substrato bem como a frequência que essas interações ocorrem.

A inspeção visual do complexo cristalográfico (PDB: 1E92) mostrou que as principais interações responsáveis pelo reconhecimento da diidrobioterina no sítio ativo da PTR1 decorrem de ligações de H com resíduos de Ser-111 e Tyr-194. Desta forma, no intuito de avaliar se a estabilidade da molécula Z80393 decorre de interações semelhantes às apresentadas pelo substrato, as interações de ligação de H foram investigadas durante a fase produtiva (Tabela 8).

Tabela 8 - Discriminação dos pares envolvidos na ligação de hidrogênio entre Z80393 e os resíduos do sítio de ligação do substrato ($d \leq 3,5 \text{ \AA}$; $\alpha \leq 60^\circ$) durante a fase produtiva da DM, juntamente com o tempo de permanência (%).

Resíduo	PTR1	Z80393	Permanência (%)	Total (%)
ALA14	N	N1	0,33	0,33
ARG17	NE	N4	0,66	30,56
	NH1	N2	7,64	
	NH1	N3	1,66	
	NH1	N4	4,32	
	NH2	N2	5,98	
	NH2	N3	1,66	
LEU18	NH2	N4	8,64	1,33
	N	N1	1,33	
HIS38	N	N1	1,99	5,31
	NE2	N2	1,00	
	NE2	N1	0,66	
	NE2	N4	1,66	
ASN109	ND2	N1	1,99	1,99
SER111	N	N1	0,33	40,19
	OG	N1	0,33	
	O	N3	39,53	
PHE113	N	N3	0,66	1,32
	N	N4	0,66	

Fonte: O próprio autor.

As interações por ligação hidrogênio por serem transientes e direcionadas podem ser analisadas pela sua duração no tempo de simulação (permanência) e pelos pares de átomos que interagem entre si. Conforme os dados obtidos, apenas os resíduos Arg-17 e Ser-111 interagem com Z80393 mais de 10% do tempo de simulação da fase produtiva com 30,56% e 40,19%, respectivamente. A interação com Ser-111 ocorre majoritariamente com a hidroxila presente na cadeia lateral enquanto que a interação com a Arg-17 ocorre com os grupos aminos da guanidina presentes na cadeia lateral desse resíduo (NH1 – 13,62%, NH2 – 16,28%) (Tabela 8). Esses resíduos juntos contabilizam mais de 70% do tempo de simulação, ou seja, durante mais de 10ns dessa trajetória, esses dois resíduos estão em contato com Z80393.

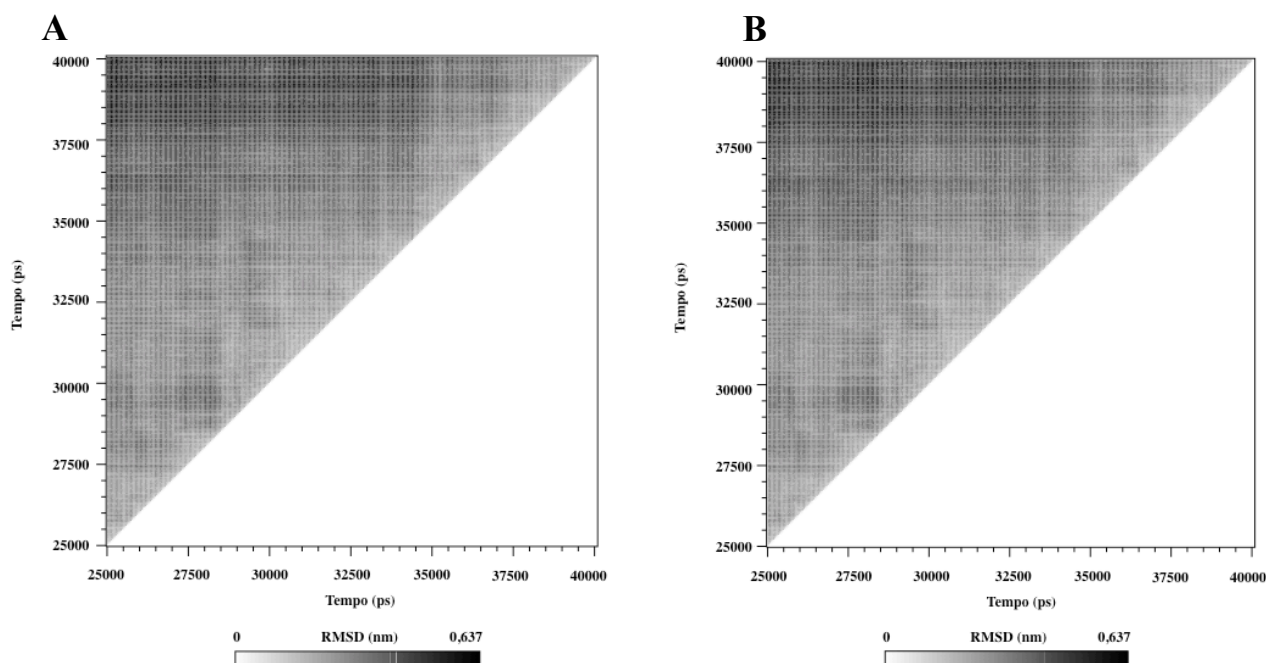
Como descrito anteriormente, a Ser-111 realiza uma ligação de H com o grupo amino presente no anel pteridina do substrato, enquanto que a Arg-17 participa diretamente da segunda etapa de redução, interagindo com o oxigênio carbonílico no mesmo anel, ou seja,

essas interações são fundamentais para estabilizar o substrato no sítio. Portanto, as interações apresentadas nesse estudo corroboram os dados que Z80393 age de forma competitiva com o substrato.

A representação gráfica desse perfil de interação seria importante para o planejamento de inibidores. Uma estratégia para alcançar esse objetivo compreende a seleção de uma estrutura representativa que possibilite a determinação dos grupos que justifiquem a atividade biológica de Z80393. Para este propósito, uma estrutura representativa da fase produtiva foi selecionada utilizando agrupamentos entre conformações semelhantes com base no valor de RMSD.

Inicialmente para selecionar um ponto de corte adequado que represente a diversidade conformacional do complexo durante a simulação foi necessário o emprego de diferentes valores de RMSD. De um modo geral, quanto mais agrupamentos estiverem presentes em uma DM, maior é a variedade conformacional durante a simulação. Assim, análises de agrupamentos com diferentes pontos de corte (valor máximo de RMSD entre as estruturas) foram realizadas durante a fase produtiva (Figura 52).

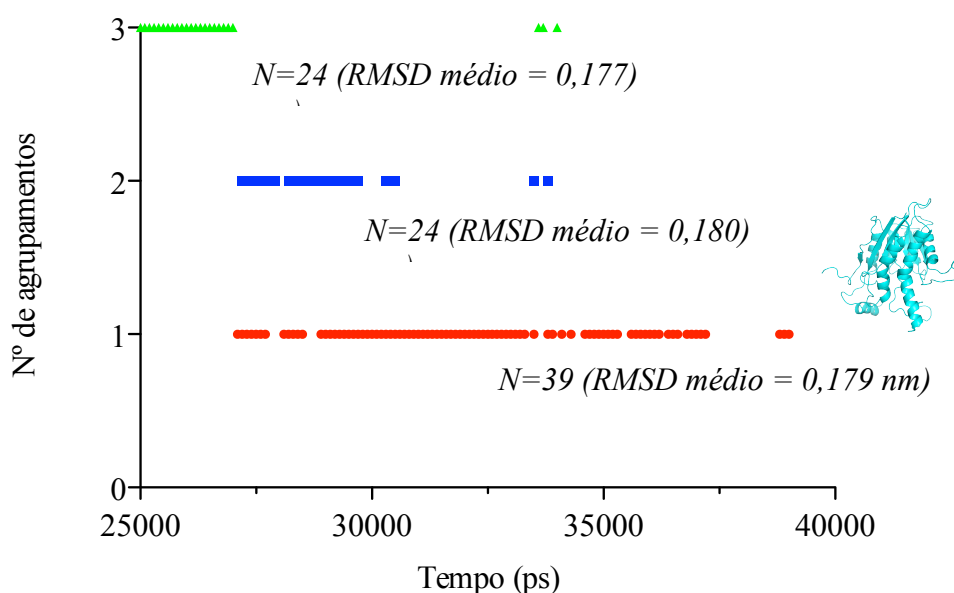
Figura 52 - Matrizes de RMSD do complexo (*backbone*) durante a fase produtiva da DM. A metade superior esquerda representa os valores de RMSD durante a trajetória, enquanto a outra metade representa os agrupamentos com base no raio de corte de 0,10 (A); 0,15 (B); 0,20 (C); 0,25 (D); 0,30 (E) e 0,35 (F). O esquema de cores reflete o RMSD médio das estruturas em cada agrupamento. A escala embaixo das matrizes representa a variação de RMSD durante a fase produtiva.



agrupamento foi selecionado e a estrutura representativa identificada (TORDA; VAN GUNSTEREN, 1994).

Diante do exposto, o raio de corte de 0,2 nm (Figura 52-C) possibilitou o maior número de agrupamentos ($n=12$) com no mínimo 10 estruturas. A população dos três maiores agrupamentos nesse ponto de corte continha 39, 24 e 24 estruturas, o que representa mais de 50% do total de conformações ($n=150$) do sistema durante a fase produtiva. Assim, foi possível obter as coordenadas da estrutura central (tempo = 31300ps) que é representativa do agrupamento mais populado. Além disso, esse agrupamento foi o mais prevalente durante a trajetória da fase produtiva (Figura 53).

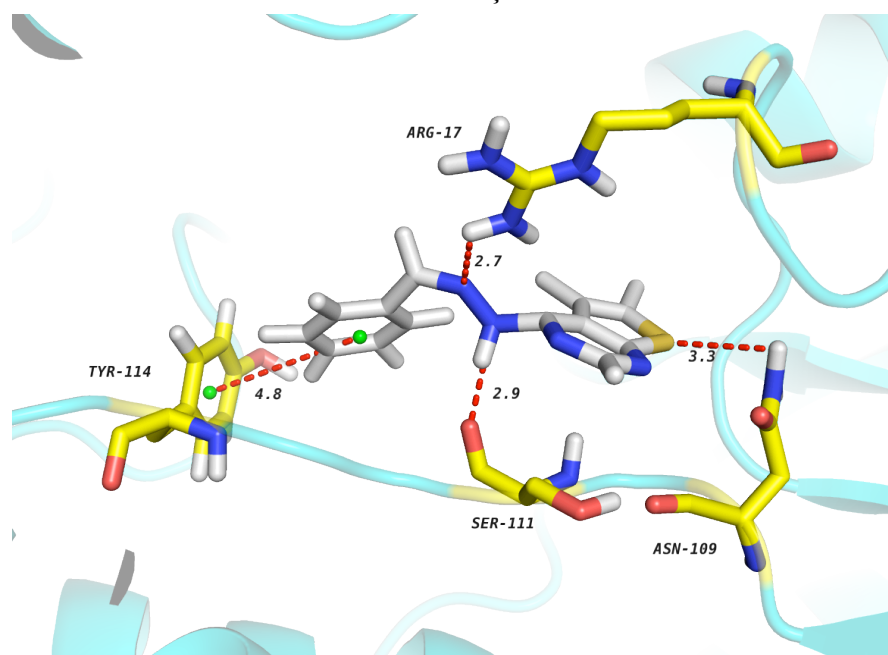
Figura 53 - Agrupamentos das estruturas do complexo PTR1-Z80393 obtidos a partir da trajetória da fase produtiva, revelando três agrupamentos principais. A estrutura média do primeiro agrupamento está representada na figura em *cartoon*. O número de estruturas e o RMSD médio de cada agrupamento estão descritos na figura.



Fonte: O próprio autor.

A análise das ligações de H não contempla todas as interações que o ligante pode fazer no sítio (ex.: transferência de carga, van der waals, etc.). Por esse motivo, após a identificação da conformação representativa desse complexo foi possível representar graficamente todas as interações intermoleculares bem como a orientação de Z80393 no sítio de ligação do substrato (Figura 54).

Figura 54 - Interações de Z80393 no sítio de ligação da diidrobiopterina em PTR1 obtidas a partir da estrutura média durante a fase produtiva. O esquema de cores é idêntico ao descrito na figura 47. A figura foi rotacionada em 180° em relação a figura 47 para facilitar a visualização.



Fonte: O próprio autor.

Os dados obtidos mostram que Z80303 interage com a cadeia lateral dos resíduos Arg-17 e Ser-111 através de ligações de hidrogênio com o grupo hidrazina, contribuindo para a acomodação desta molécula no ambiente do sítio ativo. Além disso, foi possível identificar uma interação de empilhamento *pi* entre os anéis aromáticos da Tyr-114 e Z80393, dispostos de forma perpendicular entre si. Na pose obtida por acoplamento molecular, uma interação de empilhamento *pi* também foi descrita para esse mesmo anel de Z80393, porém com o grupo aril da Phe-113 e com esses anéis dispostos paralelamente entre si. Adicionalmente, uma ligação de H entre o grupo tioéter e amida da Asn-109 descrita na estrutura representativa, não foi identificada na pose obtida por acoplamento molecular. Outro fato divergente em relação à pose por acoplamento foi a interação do anel pirimidina de Z80393 com o grupo guanidina da Arg-17, enquanto que na estrutura representativa da fase produtiva, a interação com esse resíduo ocorreu com o grupo hidrazina. Esse fato demonstra que a flexibilidade proteica interfere no arranjo conformacional do ligante e deve ser contabilizada para a identificação de uma pose adequada que possa auxiliar no entendimento da participação dos grupos na estabilização.

6 CONCLUSÃO

A utilização do programa GALAHAD™ permitiu a geração e avaliação de modelos farmacofóricos para inibidores de *L. major* PTR1 e DHFR-TS. Após a seleção de modelos farmacofóricos com parâmetros estatísticos internos aceitáveis, eles foram avaliados quanto a taxa de recuperação de inibidores verdadeiros em relação a falsos positivos. Essa estratégia resultou na seleção de modelos farmacofóricos com bom poder discriminatório ($AUC > 0,8$). Os modelos remanescentes foram testados quanto a habilidade de explicar a relação entre o farmacóforo e atividade biológica. Essa etapa possibilitou a seleção dos modelos 10 e 20 para inibidores de LmPTR1 e DHFR-TS, respectivamente, que são adequados para a utilização na etapa de triagem virtual e capazes de contribuir para explicar a REA de ambas as classes de inibidores.

O modelo farmacofórico 10 para inibidores de LmPTR1 possui quatro grupos aceitadores de ligação de hidrogênio, dois grupos doadores de ligação de H e três centros hidrofóbicos que são essenciais para a atividade de inibidores frente a LmPTR1 e importantes para a potência dessa classe. Enquanto que o modelo 20 para inibidores de LmDHFR-TS possui dois grupos aceitadores de ligação de hidrogênio e dois centros hidrofóbicos que podem explicar a atividade de inibidores frente a LmDHFR-TS.

A seleção de um modelo farmacofórico aceitável para inibidores de *L. major* PTR1 e DHFR-TS e posterior aplicação em triagem sucessivas resultou na identificação de 10418 moléculas que possuem os requisitos mínimos presentes em ambos os modelos farmacofóricos. A seleção das 200 melhores moléculas pontuadas ($QFIT \geq 69,0$) através da análise de disponibilidade comercial e diversidade química permitiu a aquisição de 10 moléculas com diferentes quimiotipos para avaliação de afinidade frente a LmPTR1 por ThermoFluor®.

Ensaio *in vitro* por ThermoFluor® têm evidenciado que as moléculas possuem uma tendência em estabilizar a proteína ($\Delta T_m > 0$), no entanto apenas a molécula Z80393 deslocou o valor de T_m de forma significativa ($\Delta T_m = 1,02^\circ\text{C}$, $p = 0,012$). Apesar da molécula Z33165 não ter demonstrado um efeito significativo, o valor de $\Delta T_m = 0,9^\circ\text{C}$ demonstra que ela pode apresentar atividade antileishmania e portanto foi avaliada no ensaio de concentração-resposta.

Os dados obtidos nos ensaios de concentração-resposta mostram que Z80393 e Z33165 possuem uma relação de dependência entre concentração e ΔT_m , confirmando a interação dessas moléculas frente a PTR1. A seguir, essas moléculas foram direcionadas para

o ensaio de determinação da modalidade de inibição. Nesse ensaio, Z80393 demonstrou agir de forma competitiva com o substrato enquanto que Z33165 compete com o NADPH pelo mesmo sítio de ligação em PTR1..

Como o ensaio por ThermoFluor® não possibilita calcular de forma adequada os parâmetros biológicos, a inibição de Z80393 foi avaliada por Fluorimetria, a qual confirmou o potencial biológico e permitiu determinar o IC50 de 40,24µM. Estes dados apontam um novo quimiotipo com o anel tienopirimidina capaz de inibir a PTR1 de *L. major*. Apesar de outros inibidores de PTR1 na faixa de micromolar já terem sido descritos (FERRARI et al., 2011; CORONA et al., 2012; HARDY et al., 1997; CAVAZZUTI et al. 2008), pela primeira vez foi identificado um quimiotipo com o anel tienopirimidina capaz de inibir a PTR1 de *L. major*. Esse dado abre a possibilidade para a descoberta de novos inibidores congêneros a Z80393, bem como, o emprego de técnicas de modificação molecular com o intuito de aumentar sua potência biológica. Para alcançar esse objetivo, um modelo de Z80393 no sítio do substrato foi obtido por acoplamento molecular e posteriormente avaliado por Dinâmica Molecular.

Os ensaios por Dinâmica Molecular mostraram que essa molécula se orienta de forma semelhante ao substrato mimetizando interações importantes como ligação de hidrogênio com a Ser-111 e Arg-17. A comparação com o esqueleto químico da diidrobiopterina e o perfil de interação identificado permitem inferir que o anel tienopirimidina pode ser um bioisómero do anel pteridina, o que explica parcialmente a ligação desta molécula ao sítio do substrato e o seu mecanismo de competição.

Os ensaios *in vitro* por ThermoFluor®, Fluorimetria juntamente com as simulações de Dinâmica Molecular indicam Z80393 como um novo inibidor frente a PTR1. Entretanto, este estudo conseguiu não só identificar um novo quimiotipo com afinidade frente a PTR1, mas também permitiu caracterizar sua potência, identificar a modalidade de inibição e o perfil de interação com o alvo terapêutico. Os resultados obtidos nesse estudo poderão auxiliar na identificação e planejamento de novos inibidores mais potentes e seletivos frente a PTR1 de *L. major*.

REFERÊNCIAS

- ALONSO, H.; BLIZNYUK, A. A.; GREASY, J. E. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. **Medicinal Research Reviews**, v. 26, n. 5, p. 531–568, 2006.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 1-12, 2012.
- AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 35, n. 7, p. 699–705, 2010.
- ANDRADE, H. M. et al. Evaluation of miltefosine for the treatment of dogs naturally infected with *L. infantum* (= *L. chagasi*) in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 181, n. 2-4, p. 83–90, 2011.
- ANTOINE, J. C. et al. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 3, p. 779–787, 1990.
- ARAKAWA, T.; KITA, Y.; TIMASHEFF, S. N. Protein precipitation and denaturation by dimethyl sulfoxide. **Biophysical Chemistry**, v. 131, p. 62-70, 2007.
- AROOJ, M. et al. An innovative strategy for dual inhibitor design and its application in dual inhibition of human thymidylate synthase and dihydrofolate reductase enzymes. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 1-15, 2013.
- ATHRI, P. et al. European Journal of Medicinal Chemistry Pharmacophore model for pentamidine analogs active against *Plasmodium falciparum*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 6147–6151, 2010.
- AZEVEDO, W. F.; SOARES, M. B. P. Selection of targets for drug development against protozoan parasites. **Current Drug Targets**, v. 10, n. 3, p. 193–201, 2009.
- BANSAL, Y.; SILAKARI, O. Multifunctional compounds: Smart molecules for multifactorial diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 76, p. 31–42, 2014.
- BARBOSA, M. L. D. C. Doenças multifatoriais e os desafios no planejamento de fármacos multialvos: A contribuição do laboratório de avaliação e síntese de substâncias bioativas - LASSBio®. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 2, p. 576–593, 2015.
- BARREIRO, E. J. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: A descoberta de novo agente cardioativo. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 1172–1180, 2002.

BENNIS, I. et al. Control of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* in Southeastern Morocco. **Tropical Medicine & International Health**, v. 20, n. 10, p. 1297-1305, 2015.

BERENDSEN, H. J. C.; GRIGERA, J. R.; STRAATSMA, T. P.: The missing term in effective pair potentials. **Journal of Physical Chemistry**, v. 91, p. 6269-6271, 1987.

BOAS, F. E.; HARBURY, P. B. Potential energy functions for protein design. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 17, n. 2, p. 199–204, 2007.

BOOTH, G. Quantitative structure-activity relationship of triazine-antifolate inhibition. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 30, n. 9, p. 1218–1224, 1987.

BRAGA, R. C.; ANDRADE, C. H. Assessing the performance of 3D pharmacophore models in virtual screening: how good are they? **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 9, p. 1127–38, 2013.

BROOIJMANS, N.; KUNTZ, I. D. Molecular recognition and docking algorithms. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 32, p. 335-373, 2003.

CABALLERO, J. 3D-QSAR (CoMFA and CoMSIA) and pharmacophore (GALAHAD) studies on the differential inhibition of aldose reductase by flavonoid compounds. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**. v. 29, p. 363–371, 2010.

CARRANZA-RODRÍGUEZ, C. et al. Tratamiento antiparasitario. **Medicine**, v. 10, n. 54, p. 3664–3672, 2010.

CARVALHO, P. B. **Leishmanicidas potenciais: síntese de fármacos dirigidos derivados de inibidores de diidrofolato redutase e pteridina redutase, de ação seletiva em macrófagos**. 2001. 296 f. Tese. Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos Área de Insumos Farmacêuticos, Universidade de São Paulo, São Paulo.

CAVALLARI, M. et al. Partially folded states of HIV-1 protease: Molecular dynamics simulations and ligand binding. **Journal of Molecular Structure**, v. 769, n.1, p. 111-121, 2006.

CAVAZZUTI, A. et al. Discovery of potent pteridine reductase inhibitors to guide antiparasite drug development. **PNAS**, v. 105, n. 5, p. 1448-1453, 2008.

CHATELAIN, E.; IOSET, J. R. Drug discovery and development for neglected diseases: The DNDi model. **Drug Design, Development and Therapy**, n. 5, p. 175–181, 2011.

CHEMAXON. **Marvin Sketch** version 15.4.20: ChemAxon, 2015.

CHEN, J.; MYINT, K. New QSAR prediction models derived from GPCR CB2-antagonistic triaryl bis-sulfone analogues by a combined molecular morphological and pharmacophoric approach. **SAR and QSAR in Environmental Research**, v. 22, n. 5-6, p. 525-544, 2012.

CHEN, Y.C. Beware of docking! **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 36, n. 2, p. 78–95, 2015.

CHEN, Z. et al. Pharmacophore-based virtual screening versus docking-based virtual screening: a benchmark comparison against eight targets. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 30, n. 12, p. 1694–1708, 2009.

CIMPERMAN, P.; MATULIS, D. Protein thermal denaturation measurements via a fluorescent dye. In: PODJARNY, A.; DEJAEGERE, A. P.; KIEFFER, B. **Biophysical Approaches Determining Ligand Binding to Biomolecular Targets: Detection, Measurement and Modelling**, cap. 8, RSC, p. 247–273, 2011.

CLARK, R. D.; ABRAHAMIAN, Æ. E. Using a staged multi-objective optimization approach to find selective pharmacophore models, **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v.23, p. 765–771, 2009.

CLARK, M.; CRAMER, R. D.; VAN OPDENBOSCH, N.. Validation of the general purpose tripos 5.2 force field. **Journal of Computational Chemistry**. v. 10, n. 8, p. 982-1012, 1989.

CORONA, P. et al. Structure-based selectivity optimization of piperidine – pteridine derivatives as potent Leishmania Pteridine Reductase inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 8318-8329, 2012.

COSTANTINO, L.; BARLOCCO, D. Designed multiple ligands: Basic research vs clinical outcomes. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 20, p. 3353–3387, 2012.

CROFT, S.L.; SEIFERT, K.; DUCHENE, M. Antiprotozoal activities of phospholipid analogues. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 126, n. 2, p. 165-172, 2003.

CROWTHER, G. J. et al. Proteins for detection of small-molecule ligands. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 14, n. 6, p. 700–707, 2009.

COTRELL, S.J.; et al. Generation of multiple pharmacophore hypotheses using multi objective optimisation techniques. **Journal of Computer Aided Drug Design**, v.18, p. 665-682, 2004.

CUMMINGS, M. D.; FARNUM, M. A; NELEN, M. I. Universal screening methods and applications of ThermoFluor. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 11, n. 7, p. 854–863, 2006.

CUNNINGHAM, M. L.; BEVERLEY, S. M. Pteridine salvage throughout the Leishmania infectious cycle: implications for antifolate chemotherapy. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 113, n. 2, p. 199–213, 2001.

DAHLIN, J. L.; INGLESE, J.; WALTERS, M. A. Mitigating risk in academic preclinical drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 4, p. 279–294, 2015.

DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle mesh Ewald: An N·log(N) method for Ewald sums in large systems. **The Journal of Chemical Physics**, v. 98, n. 12, p. 10089-10092, 1993.

DATASUS. Informações de Saúde. **Taxa de incidência da leishmaniose tegumentar americana, 2012**. Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br/idb>>. Acesso em: 02 de abril de 2015.

DAURA, X.; VAN GUNSTEREN, W. F.; MARK, A. E. Folding-unfolding thermodynamics of a β -heptapeptide from equilibrium simulations. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 34, n. 3, p. 269–280, 1999.

DAWSON, A. et al. Structure and reactivity of *Trypanosoma brucei* pteridine reductase: inhibition by the archetypal antifolate methotrexate. **Molecular Microbiology**, v. 61, n. 6, p. 1457–1468, 2006.

DE VRIES, H. J. C.; REEDIJK, S. H.; SCHALLIG, H. D. F. H. Cutaneous Leishmaniasis: Recent developments in diagnosis and management. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 16, p. 99–109, 2015.

DIAS, K. S. T. et al. Aplicações recentes da abordagem de fármacos multialvos para o tratamento da doença de alzheimer. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 2, p. 609-648, 2015.

DICKSON, M.; GAGNON, J. P. Key factors in the rising cost of new drug discovery and development. **Drug Discovery**, v. 3, n. 5, p. 417–429, 2004.

DILLER, D. J.; LI, R. Kinases, homology models, and high throughput docking. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 46, p. 4638-4647, 2003.

DUBE, D. et al. 3D-QSAR based pharmacophore modeling and virtual screening for identification of novel pteridine reductase inhibitors. **Molecular Informatics**, v. 18, p. 1701–1711, 2012.

DUPEUX, F. et al. A thermal stability assay can help to estimate the crystallization likelihood of biological samples. **Acta Crystallographic**. v. 67, p. 915-919, 2011.

DURRANT, J. D.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations and drug discovery. **BMC Biology**, v. 9, n. 1, p. 71, 2011.

EJOV, M.; DAGNE, D. Strategic framework for leishmaniasis control in the WHO European Region 2014-2020. **WHO**. p. 1-17, 2014.

ERICSSON, U. B. et al. Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. **Analytical Biochemistry**. v. 357, p. 289-298, 2006.

EYUNNI, S. K. V. K.; GANGAPURAN, M.; REDDA, K. K. In-vitro antiproliferative activity of new tetrahydroisoquinolines (THIQs) on Ishikawa cells and their 3D pharmacophore models. **Letters in Drug Design and Discovery**, v. 11, n. 4, p. 428-436, 2014.

- FERRARI, S. et al. Virtual screening identification of nonfolate compounds, including a CNS drug as antiparasitic agents inhibiting Pteridine Reductase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 211–221, 2011.
- FERREIRA, R. S.; 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. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1770–1778, 2011.
- FERREIRA, R. S. et al. Complementarity between a docking and a high-throughput screen in discovering new cruzain inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 13, p. 4891–4905, 2010.
- FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R. R. Pentavalent antimonials: New perspectives for old drugs. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2317–2336, 2009.
- GASTEIGER, E. et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server. In: WALKER, J. M. **The Proteomics Protocols Handbook**, Humana Press, p. 571-607, 2005.
- GASTEIGER, J.; MARSILI, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity—a rapid access to atomic charges. **Tetrahedron**, v. 36, n. 22, p. 3219-3228, 1980.
- GIGLIARANO, C.; FIGINI, S.; MULIERE, P. Making classifier performance comparisons when ROC curves intersect. **Computational Statistics & Data Analysis**, v. 77, p. 300-312, 2014.
- GIL, E. S. et al. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. São Paulo-SP, Pharmabooks, 2009.
- GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review Anti-infective Therapy**, v. 8, p. 419-433, 2010.
- GOURLEY, D. G. et al. Crystallization of recombinant *Leishmania major* pteridine reductase 1 (PTR1). **Acta Crystallographic Section D**, v. D55, p. 1608–1610, 1999.
- GOURLEY, D. G. et al. Pteridine reductase mechanism correlates pterin metabolism with drug resistance in trypanosomatid parasites. **Nature Structural Biology**, v. 8, n. 6, p. 521–525, 2001.
- GRØFTEHAUGE, M. K. et al. Protein–ligand interactions investigated by thermal shift assays (TSA) and dual polarization interferometry (DPI). **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 71, p. 36–44, 2015.
- GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Virtual screening and its integration with modern drug design technologies. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 1, p. 37–46, 2008.

- HALDAR, A. K.; SEN, P.; ROY, S. Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions. **Molecular Biology International**, v. 2011, p. 1-23, 2011.
- HARDY, L. W. et al. Biochemical and genetic tests for inhibitors of Leishmania pteridine pathways. **Experimental Parasitology**, v. 87, n. 3, p. 157–169, 1997.
- HECKER, E. A et al. Use of catalyst pharmacophore models for screening of large combinatorial libraries. **Journal of Chemical Information and Computer Science**, v. 42, p. 1204- 1211, 2002.
- HESS, B. et al. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 18, n. 12, p. 1463–1472, 1997.
- HyperChem(TM) Professional 7.5, **Hypercube**, Inc., 1115 NW 4th Street, Gainesville, Florida 32601, USA.
- HODIAMONT, C. J. et al. Species-directed therapy for leishmaniasis in returning travellers: A comprehensive guide. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 5, p. 1-16, 2014.
- HOLDGATE, G. A. et al. Affinity-based, biophysical methods to detect and analyze ligand binding to recombinant proteins: Matching high information content with high throughput. **Journal of Structural Biology**, v. 172, n. 1, p. 142–157, 2010.
- HORNBERG, J. J. Simple drugs do not cure complex diseases: The need for multi-targeted drugs. In: MORPHY, J. R.; HARRIS, C. J. **Designing Multi-Target Drugs**, cap.1, RSC, v. 21, n. 1, p. 1–13, 2012.
- HUANG, S.; GRINTER, S. Z.; ZOU, X. Scoring functions and their evaluation methods for protein – ligand docking : recent advances and future directions. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 12, p. 12899–12908, 2010.
- HUGHES, J. P. et al. Principles of early drug discovery. **British Journal of Pharmacology**, v. 162, n. 6, p. 1239–1249, 2011.
- IOSET, J.-R.; CHANG, S. Drugs for neglected diseases initiative model of drug development for neglected diseases: current status and future challenges. **Future Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 11, p. 1361–1371, 2011.
- IRWIN, J. J. et al. ZINC: a free tool to discover chemistry for biology. **Journal Chemical Information and Modeling**, v. 52, n. 7, p. 1757-1768, 2012.
- IVANETICH, K. M.; SANTI, D. V. Bifunctional thymidylate synthase-dihydrofolate reductase in protozoa. **American Societies for Experimental Biology**, v. 4, n. 6, p. 1591–1597, 1990.
- JAIN, A. N. Surflex: Fully automatic flexible molecular docking using a molecular similarity-based search engine. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 46, p. 499-511, 2003.

JAIN, A. N. Surflex-Dock 2.1: Robust performance from ligand energetic modeling, ring flexibility and knowledge-based search. **Journal Computational Aided Molecular Design**, v. 21, p. 281-306, 2007.

JAIN, K.; JAIN, N. K. Vaccines for visceral leishmaniasis : A review. **Journal of Immunological Methods**, v. 412, p. 1-12, 2015.

JAIN, M. et al. Role of biopterin transporter (BT1) gene on growth and infectivity of Leishmania. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 199–206, 2007.

JENWITHEESUK, E. et al. Novel paradigms for drug discovery: computational multitarget screening. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 29, n. 2, p. 62–71, 2008.

JÓHANNESSEN, H.; DENISOV, V. P.; HALLE, B. Dimethyl sulfoxide binding to globular proteins: a nuclear magnetic relaxation dispersion study. **Protein Science**, v. 6, n. 8, p. 1756–1763, 1997.

JONES, G.; WILLET, P. GASP: genetic algorithm superimposition program. In: GUNNER, O. F. (Org). **Pharmacophore perception, development, and use in drug design**, International University Line, p. 85–106, 2000.

JORGENSEN, W. L. Challenges for academic drug discovery. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 51, n. 47, p. 11680–11684, 2012.

KANNAN, S. et al. Probing the binding mechanism of Mnk inhibitors by docking and molecular dynamics simulations. **Biochemistry**, v. 54, n.1, p. 32-46, 2015.

KAUR, J. et al. *Leishmania donovani*: oral therapy with glycosyl 1,4-dihydropyridine analogue showing apoptosis like phenotypes targeting pteridine reductase 1 in intracellular amastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 125, n. 3, p. 310–314, 2010.

KAUR, J. et al. Thianthrene is a novel inhibitor of *Leishmania donovani* pteridine reductase 1 (PTR1). **Journal of Molecular Biochemistry**, v. 1, p. 68-75, 2012.

KELLENBERGER, E. et al. Comparative evaluation of eight docking tools for docking and virtual screening accuracy. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 57, n. 2, p. 225–242, 2004.

KELLICI, T. et al. Rational drug design paradigms: the odyssey for designing better drugs. **Combinational Chemistry and High Throughput Screening**, v. 18, p. 238–256, 2015.

KESERU, G. M.; MAKARA, G. M. Hit discovery and hit-to-lead approaches. **Drug Discovery Today**, v. 11, n. 15-16, p. 741–748, 2006.

KIANI, Y. S., KALSOOM, S., RIAZ, N. In silico ligand-based pharmacophore model generation for the identification of novel *Pneumocystis carinii* DHFR inhibitors. **Medicinal Chemical Research**, v. 22, p. 949–963, 2013.

KITCHEN, D. B. et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews**, v. 3, p. 935-949, 2004.

KOPEC, J.; SCHNEIDER, G. Comparison of fluorescence and light scattering based methods to assess formation and stability of protein-protein complexes. **Journal of Structural Biology**, v. 175, n. 2, p. 216–223, 2011.

KOTHANDAN, G. et al. A combined 3D QSAR and pharmacophore-based virtual screening for the identification of potent p38 MAP kinase inhibitors : an in silico approach. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, p. 1773–1787, 2013.

KRISHNA, S. N. et al. A fluorescence-based thermal shift assay identifies inhibitors of mitogen activated protein kinase kinase 4. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1- 11, 2013.

KUMAR, P.; SUNDAR, S.; SINGH, N. Degradation of pteridine reductase 1 (PTR1) enzyme during growth phase in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. **Experimental Parasitology**, v. 116, p. 182–189, 2007.

KUMAR, A.; ZHANG, K. Y. J. Hierarchical virtual screening approaches in small molecule drug discovery. **Methods**, v. 71, n. 1, p. 26-37, 2014.

KUMAR, P. et al. *Leishmania donovani* pteridine reductase 1: biochemical properties and structure-modeling studies. **Experimental Parasitology**, v. 120, n. 1, p. 73–79, 2008.

LANGER, T.; HOFFMAN, R. D. **Pharmacophores and Pharmacophore Searches**. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, FRG, p. 395, 2006.

LARSSON, J. et al. ChemGPS-NP: Tuned for navigation in biologically relevant chemical space. **Journal of Natural Products**. v. 70, n. 5, p. 789-794, 2007.

LAVECHIA, A; DI GIOVANNI, C. Virtual screening strategies in drug discovery: A critical review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 23, p. 2839–2860, 2013.

LEA, W. A.; SIMEONOV, A. Differential scanning fluorometry signatures as indicators of enzyme inhibitor mode of action: Case study of glutathione *S*-transferase. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. 1-10, 2012.

LEACH, A. R. et al. Three-dimensional pharmacophore methods in drug discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 2, p. 539-548, 2010.

LEPROHON, P. et al. Drug resistance analysis by next generation sequencing in *Leishmania*. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 5, n. 1, p. 26–35, 2015.

LIAO, C. et al. Software and resources for computational medicinal chemistry. **Future Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 8, p. 1057–1085, 2011.

LI, Z. et al. Molecular dynamics-based discovery of novel phosphodiesterase-9A inhibitors with. **Molecular BioSystems**, v. 11, p. 115–125, 2014.

- LINDAHL, E.; HESS, B. VAN DER SPOEL, D. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. **Journal of Molecular Modeling**, v. 7, n. 8, p. 306-317, 2001.
- LIPINSKI, C.; HOPKINS, A. Navigating chemical space for biology and medicine. **Nature**, v. 432, p. 855–861, 2004.
- LIU, M.; WU, Q.; HU, W. Pharmacophore screening on piperidinecarboxamides derivatives based on GALAHAD and CoMFA models. **Chinese Journal of Chemistry**, v.29, p. 1075-1083, 2011.
- LIU, M.; SUN, Z.; HU, W. Three-dimensional pharmacophore screening for fentanyl derivatives. **Neural Regeneration Research**, v. 7, n. 18, p. 1398–1405, 2012.
- LO, M. C. et al. Evaluation of fluorescence-based thermal shift assays for hit identification in drug discovery. **Analytical Biochemistry**, v. 332, p. 153–159, 2004.
- LOEFFLER, H. H.; WINN, M. D. Large biomolecular simulation on HPC platforms. **Technical reports**, 2012.
- LOMBARDINO, J. G.; LOWE, J. A. The role of the medicinal chemist in drug discovery-then and now. **Drug Discovery**, v. 3, n. 10, p. 853–862, 2004.
- LONG, W. et al. 3D-QSAR studies on a class of IKK-2 inhibitors with GALAHAD used to develop molecular alignment models. **QSAR and Combinatorial Science**, v. 27, n. 9, p. 1113–1119, 2008.
- LU, J. J. et al. Multi-target drugs: The trend of drug research and development. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. 1-6, 2012.
- LUBA, J. et al. *Leishmania major* pteridine reductase 1 belongs to the short chain dehydrogenase family: stereochemical and kinetic evidence. **Biochemistry**, v. 37, n. 12, p. 4093–4104, 1998.
- MACHADO, P. R. et al. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: A randomized and controlled trial. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 12, p. 1–6, 2010.
- MAGINN, E. J.; ELLIOTT, J. R. Historical perspective and current outlook for Molecular Dynamics as a chemical engineering tool. **Industrial Engineering Chemistry Research**, v. 49, n. 7, p. 3059–3078, 2010.
- MALDE, A. K. et al. An automated force field topology builder (ATB) and repository: version 1.0. **Journal of Chemical Theory and Computation**. v. 7, n. 12, p. 4026-4037, 2011.
- MARTIN, Y. C. DISCO: what we did right and what we missed. In: GUNNER, O. F. (Org). **Pharmacophore perception, development, and use in drug design**, International University Line, p. 85–106, 2000.

- MARTIN-PLAZA, J.; CHATELAIN, E. Novel therapeutic approaches for neglected infectious diseases. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 20, n. 1, p. 3–5, 2015.
- MARTINEZ, E. Z.; LOUZADA-NETO, F.; PEREIRA, B. D. B. A curva ROC para testes diagnósticos. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 11, n. 1, p. 7-31, 2003.
- MATULIS, D. et al. Thermodynamic stability of carbonic anhydrase: Measurements of binding affinity and stoichiometry using thermofluor. **Biochemistry**, v. 44, n. 13, p. 5258–5266, 2005.
- MCLUSKEY, K. et al. Inhibition of *Leishmania major* pteridine reductase by 2,4,6-triaminoquinazoline: structure of the NADPH ternary complex. **Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography**, v. 60, n. 10, p. 1780–1785, 2004.
- MCGEE, P. Clinical trials on the move. **Drug Discovery Development**, v. 9, p. 16-22, 2006.
- MITTAL, M. K. et al. Expression, purification, and characterization of *Leishmania donovani* trypanothione reductase in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 40, n. 2, p. 279–286, 2005.
- MIZUTANI, M. Y. et al. Effective handling of induced-fit motion in flexible docking. **Proteins**, v. 63, n. 4, p. 878-891, 2006.
- MORAN, M. et al. Neglected disease research and development: How much are we really spending? **PLoS Medicine**, v. 6, n. 2, p. 137–146, 2009.
- MOREIRA, W. et al. Proteomic analysis of metacyclogenesis in *Leishmania infantum* wild-type and PTR1 null mutant. **EUPROT**, v. 4, p. 171–183, 2014.
- MORPHY, R.; RANKOVIC, Z. Designing multiple ligands - medicinal chemistry strategies and challenges. **Current Pharmaceutical Design**, v. 15, n. 6, p. 587–600, 2009.
- MORTIER, J. et al. The impact of molecular dynamics on drug design: applications for the characterization of ligand–macromolecule complexes. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 6, p. 686–702, 2015.
- MOSER, D. et al. Dual-target virtual screening by pharmacophore elucidation and molecular shape filtering. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 3, n. 2, p. 155–158, 2012.
- MULLIN, R. Cost to Develop New Pharmaceutical Drug Now Exceeds \$2.5B. **Chemical and Engineering News**. 2014.
- MYSINGER, M. M. et al. DUD-Enhanced – better ligands and decoys for better benchmarking. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 6582–6594, 2012.
- NAGLE, A. S. et al. Recent Developments in Drug Discovery for Leishmaniasis and Human African Trypanosomiasis. **Chemical Reviews**, v. 114, p. 11305-11347, 2014.

- NAMBA, A. M.; SILVA, V. B.; SILVA, C. H. T. P. Dinâmica molecular: Teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Ecletica Química**, v. 33, n. 4, p. 13–24, 2008.
- NARE, B.; HARDY, L. W.; BEVERLEY, S. M. The roles of pteridine reductase 1 and synthase in pteridine metabolism in the protozoan parasite *Leishmania major*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 21, p. 13883–13891, 1997.
- NARE, B. et al.. New approaches to *Leishmania* chemotherapy: pteridine reductase 1 (PTR1) as a target and modulator of antifolate sensitivity. **Parasitology**, v. 114 p. 101–110, 1997.
- NIESEN, F. H.; BERGLUND, H.; VEDADI, M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. **Nature Protocols**, v. 2, n. 9, p. 2212–2221, 2007.
- ONG, H. B. et al. Dissecting the metabolic roles of pteridine reductase 1 in *Trypanosoma brucei* and *Leishmania major*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 10429–10438, 2011.
- PANTOLIANO, M. W. et al. High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 6, n. 6, p. 429–440, 2001.
- PATANI, G. A; LAVOIE, E. J. Bioisosterism: A rational approach in drug design. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 8, p. 3147–3176, 1996.
- PEDRIQUE, B. et al. The drug and vaccine landscape for neglected diseases (2000-11): A systematic assessment. **The Lancet Global Health**, v. 1, n. 6, p. 371–379, 2013.
- PETIT-ZEMAN, S. Exploring biological space. **Nature Communications**, p. 1–3, 2004.
- PITA, S. S. R.; PASCUTTI, P. G. Pharmacophore analysis of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase (TR) complexed with peptide mimetic inhibitors. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, p. 788-804, 2012.
- POPTODOROV, K.; LUU, T.; HOFFMANN, R. D. Pharmacophore model generation software tools. In: LANGER, T.; HOFFMAN, R.D. (Org.). **Pharmacophores and pharmacophore searches**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, v. 32, 2006.
- RAJASEKARAN, R.; CHEN, Y. P. P. Probing the structure of *Leishmania major* DHFR-TS and structure based virtual screening of peptide library for the identification of anti-Leishmanial leads. **Journal of Molecular Modeling**, v. 18, n. 9, p. 4089–4100, 2012.
- RAMAMOORTHY, R. et al. WIPO Re:Search: catalyzing collaborations to accelerate product development for diseases of poverty. **Chemical Review**, v. 114, p. 11272-11279, 2014.
- REINHARD, L. et al. Optimization of protein buffer cocktails using Thermofluor. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 69, p. 209–214, 2013.

- REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 9, p. 581–596, 2007.
- RELLA, M. et al. Structure-based pharmacophore design and virtual screening for novel angiotensin converting enzyme 2 inhibitors. **Journal of Chemical Information Modelling**, v. 46, n. 2, p.708-716, 2006.
- RICHARD, D. et al. Growth phase regulation of the main folate transporter of *Leishmania infantum* and its role in methotrexate resistance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 52, p. 54494–54501, 2004.
- RICHMOND, N. J. et al. GALAHAD : 1. Pharmacophore identification by hypermolecular alignment of ligands in 3D. **Journal of Computer Aided Molecular Design**, v. 20, p. 567–587, 2006.
- RIPPHAUSEN, P. et al. Quo vadis, virtual screening? A comprehensive survey of prospective applications. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 24, p. 8461–8467, 2010.
- ROBERTSON, A D.; MURPHY, K. P. Protein structure and the energetics of protein stability. **Chemical Reviews**, v. 97, p. 1251–1267, 1997.
- RODRIGUES, R.P. et al. Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, p. 739–776, 2012.
- ROGEZ-FLORENT, T. et al. Label-free characterization of carbonic anhydrase - Novel inhibitor interactions using surface plasmon resonance, isothermal titration calorimetry and fluorescence-based thermal shift assays. **Journal of Molecular Recognition**, v. 27, n. 1, p. 46–56, 2014.
- ROJAS DE ARIAS, A. et al. Selected natural and synthetic phenolic compounds with antileishmanial activity: A five-year review. **Current Bioactive Compounds**, v. 8, n. 4, p. 307–333, 2013.
- ROSTKOWSKI, M. et al. Graphical analysis of pH-dependent properties of proteins predicted using PROPKA. **BMC Structural Biology**, v. 11, n. 6, p. 1-6, 2011.
- ROSÉN, J. et al. ChemGPS-NPWeb: Chemical space navigation online. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 23, n. 4, p. 253–259, 2009.
- SAMS-DODD, F. Target-based drug discovery: Is something wrong? **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 2, p. 139–147, 2005.
- SAMS-DODD, F. Drug discovery : selecting the optimal approach. **Drug Discovery Today**, v. 11, n. 9-10, p. 465-472, 2006.
- SANGSHETTI, J. N. et al. Antileishmanial drug discovery: comprehensive review of the last 10 years. **RSC Advances**, v. 5, n. 41, p. 32376–32415, 2015.

- SCHORMANN, N. et al. Structure-based approach to pharmacophore identification, in silico screening, and three-dimensional quantitative structure-activity relationship studies for inhibitors of *Trypanosoma cruzi* dihydrofolate reductase function. **Proteins**, v. 73, n. 4, p. 889–901, 2008.
- SCHRÖDINGER. **The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3**, 2009.
- SCHÜTTELKOPF, A. W. et al. Structures of *Leishmania major* pteridine reductase complexes reveal the active site features important for ligand binding and to guide inhibitor design. **Journal of Molecular Biology**, v. 352, n. 1, p. 105–116, 2005.
- SCOTT, D. A.; COOMBS, G. H.; SANDERSON, B. E. Effects of methotrexate and other antifolates on the growth and dihydrofolate reductase activity of *Leishmania* promastigotes. **Biochemical Pharmacology**, v. 36, n. 12, p. 2043–2045, 1987.
- SCRIVER, C. R. et al. The hyperphenylalaninemias of man and mouse. **Annual Review of Genetics**, v. 28, p. 141-165, 1994.
- SEIDEL, T. et al. Strategies for 3D pharmacophore-based virtual screening. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 7, n. 4, p. 221-228, 2010.
- SHANG, E. et al. De novo design of multitarget ligands with an iterative fragment-growing strategy. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 54, n. 4, p. 1235–1241, 2014.
- SHEPPHIRD, J. K.; CLARK, Æ. R. D. A marriage made in torsional space : using GALAHAD models to drive pharmacophore multiplet searches. **Journal of Computer Aided Drug and Design**, v. 20, p. 763–771, 2006.
- SHERIDAN, R.P et al. Protocols for bridging the peptide to nonpeptide gap in topological similarity searches. **Journal of Chemical Information and Computer Science**. v. 41, p. 1395-1406, 2001.
- SHOICHET, B. K. Virtual screening of chemical libraries. **Nature**, v. 432, n. 7019, p. 862–865, 2004.
- SIENKIEWICZ, N. et al. Chemical and genetic validation of dihydrofolate reductase-thymidylate synthase as a drug target in African trypanosomes. **Molecular Microbiology**, v. 69, n. 2, p. 520–533, 2008.
- SIENKIEWICZ, N.; ONG, H. B.; FAIRLAMB, A. H. *Trypanosoma brucei* pteridine reductase 1 is essential for survival in vitro and for virulence in mice. **Molecular Microbiology**, v. 77, n. 3, p. 658–671, 2010.
- SIEVERS, F. et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**, v. 7, n. 539, p. 1-6, 2011.
- SIKAZWE, D. M. N. The multi-target drug design era is here, consider it. **Drug Designing**, v. 1, n. 1, p. 1–2, 2012.

- SLIWOSKI, G. et al. Computational methods in drug discovery. **Pharmacological Reviews**, v. 66, n. 1, p. 334–395, 2014.
- SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses : moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, p. 139–149, 2004.
- SORRELL, F. J. et al. Development of a differential scanning fluorimetry based high throughput screening assay for the discovery of affinity binders against an anthrax protein. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, n. 5, p. 802–808, 2010.
- SONDERGAARD, C. R. et al. Improved treatment of ligands and coupling effects in empirical calculation and rationalization of pKa Values. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 7, n. 7, p. 2284–2295, 2011.
- SOUZA, S. F.; FERNANDES, P.A.; RAMOS, M. J. Protein-ligand docking: Current status and future challenges. **Proteins**. v. 65, n. 1, p. 15–26, 2006.
- STRELOW, J. et al. Mechanism of action assays for enzymes assay guidance manual. **Assay Guidance Manual**, p. 1–27, 2012.
- SUN, H. Pharmacophore-based virtual screening. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 973, p. 1018–1024, 2008.
- SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Antimony toxicity. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 12, p. 4267–4277, 2010.
- SUNDAR, S.; SINGH, A.; SINGH, O. P. Strategies to overcome antileishmanial drugs unresponsiveness. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2014, p. 1-7, 2014.
- SIGMA PLOT 12.0.version 12.0, San Jose: Systat Software, 2014.
- TANG, Y.T.; MARSHAL, G. R. Virtual screening for lead discovery. **Drug Design and Discovery**. v. 716, p. 1-22, 2011.
- TEAGUE, S. J. et al. The design of leadlike combinatorial libraries. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 38, n. 24, p. 3743–3748, 1999.
- TIUMAN, T. S. et al. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 8, p. 525–32, 2011.
- TOBA, S. et al. Using pharmacophore models to gain insight into structural binding and virtual screening: an application study with CDK2 and human DHFR. **Journal Chemical Information and Modelling**, v. 46, n. 2, p.728-735, 2006.
- TORDA, A. E.; VAN GUSTEREN, W. F. Algorithms for clustering molecular dynamics configurations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 15, n. 12, p. 1331–1340, 1994.

TRIBALLEAU, N. et al. Virtual screening workflow development guided by the “receiver operating characteristic” curve approach. Application to high-throughput docking on metabotropic glutamate receptor subtype 4. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 7, p. 2534-2547, 2005.

TRIPOS. **SYBYL-X 2.0**, St Louis, MO, USA, p. 1-90, 2010.

TULLOCH, L. B. et al. Structure-based design of pteridine reductase inhibitors targeting african sleeping sickness. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 1, p. 221–229, 2010.

UNIPROT. UniProt: a hub for protein information. **Nucleic Acids Research**, v. 43, p. 204-212, 2015.

VANAGAS, G. Receiver operating characteristic curves and comparison of cardiac surgery risk stratification systems. **Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery**, v. 3, n. 2, p. 319–322, 2004.

VAN DER AUWERA, G.; DUJARDIN, J. C. Species typing in dermal leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 2, p. 265–294, 2015.

VAN DER SPOEL, D. et al. GROMACS: Fast, flexible, and free. **Journal of Computational Chemistry**, v.26, n. 16, p.1701-1718, 2005.

VAN DER WATERBEEMD, H.; TESTA, B.; FOLKERS, G. CATALYST pharmacophore models and their utility as queries for searching 3D databases. In:

SPRAGUE, P. W.; HOFFMANN, R (Org.). **Computer-Assisted lead finding and optimization: current tools for medicinal chemistry**. Verlag Helvetica Chimica Acta, Postfach, CH-8042 Zürich, Switzerland, 1997.

VENKATRAMAN, J. et al. Characterization of mechanistically diverse inhibitors of the *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 17, n. 3, p. 293–302, 2012.

VERLI, H. Dinâmica Molecular. In: **Bioinformática da Biologia à Flexibilidade Molecular**. 1. ed. Porto Alegre: [s.n.]. p. 1–282. 2014.

VICKERS, T. J.; BEVERLEY, S. M. Folate metabolic pathways in Leishmania. **Essays Biochemistry**, v. 51, p. 63–80, 2011.

VILABOAS E SANTOS, D. I.; GIL, E. Fluorimetria na análise farmacêutica: uma revisão. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 7, n. 1, p. 24–38, 2010.

WALTERS, W. P.; NAMCHUK, M. Designing screens: how to make your hits a hit. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 4, p. 259–266, 2003.

WARREN, G. L. et al. A critical assessment of docking programs and scoring functions. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 20, p. 5912-5931, 2006.

WAUGH, B. et al. In silico work flow for scaffold hopping in Leishmania. **BMC Research Notes**, v. 7, n. 802, p. 1-21, 2014.

WYATT, P. G. et al. Target validation: Linking target and chemical properties to desired product profile. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 10, p. 1275-1283, 2011.

WHO Technical Report Series. WHO Leishmaniasis control programme. Annual country reports. Geneva, 2013.

WU, S.; FLACH, P. A scored AUC metric for classifier evaluation and selection. **Proceedings of the ICML 2005 Workshop on ROC Analysis in Machine Learning**, 2005.

XIANG, Y.; HOU, Z.; ZHANG, Z. Pharmacophore and QSAR studies to design novel histone deacetylase 2 inhibitors. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 79, n. 5, p. 760-770, 2012.

YANG, S. Pharmacophore modeling and applications in drug discovery : challenges and recent advances. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 11/12, p. 444-450, 2010.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C.T.B.V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v.21, n. 6, p. 787-793, 1998.

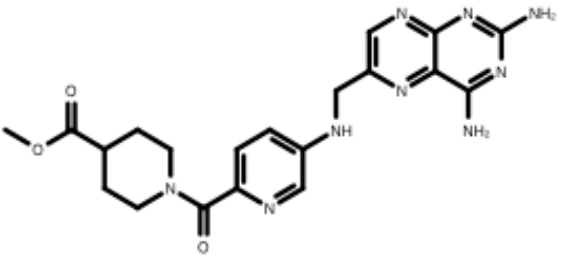
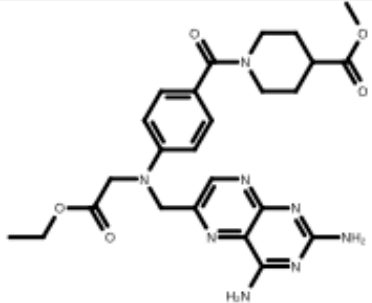
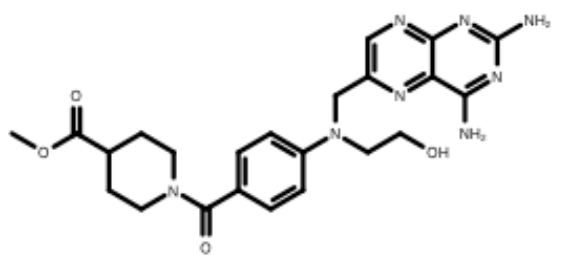
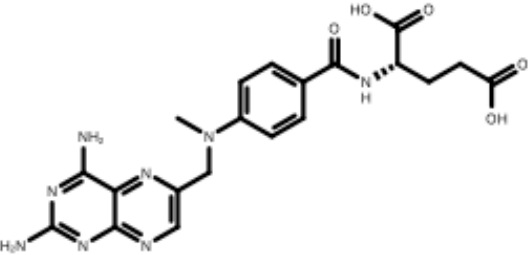
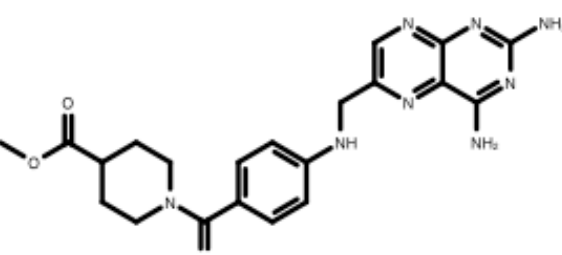
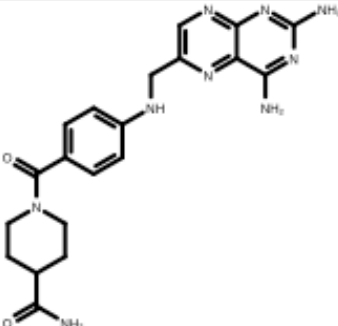
ZHANG, R.; MONSMA, F. Fluorescence-based thermal shift assays. **Current Opinion in Drug Discovery & Development**, v. 13, n. 4, p. 389-402, 2010.

ZHAO, X. et al. Ligand-based pharmacophore model of n-Aryl and n-Heteroaryl piperazine α_{1A} -adrenoceptors antagonists using GALAHAD. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 29, n. 2, p. 126-136, 2010.

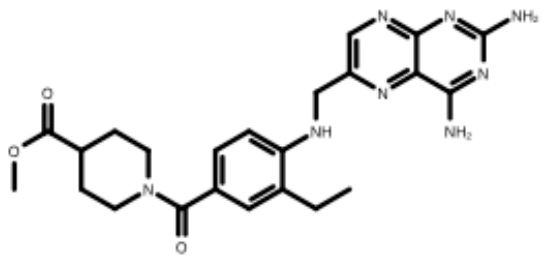
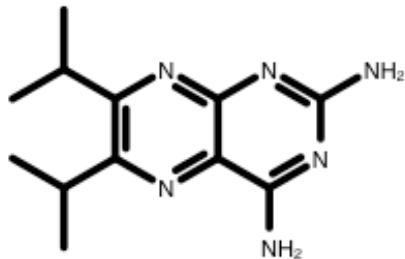
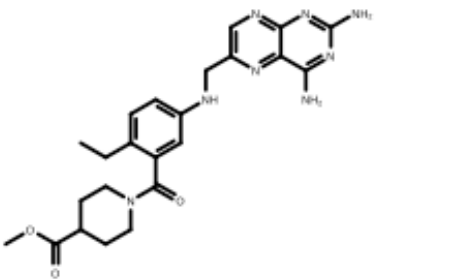
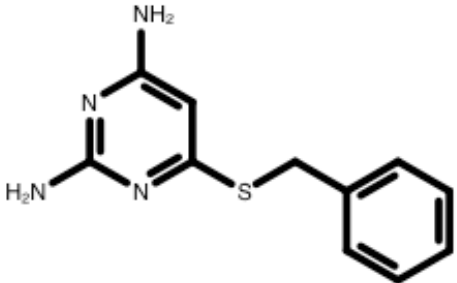
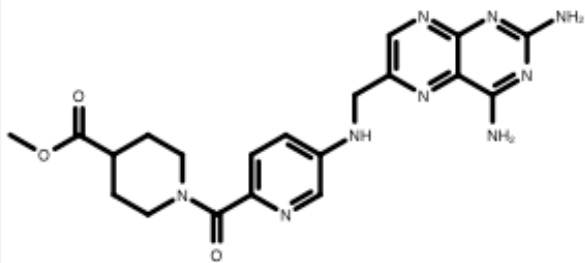
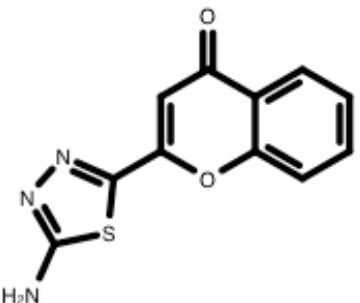
ZHU, T. et al. Hit identification and optimization in virtual screening: Practical recommendations based upon a critical literature analysis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 2, p. 157-162, 2008.

ZILBESTEIN, D.; SHAPIRA, M. The role of pH and temperature in the development of Leishmania parasites. **Annual Review Microbiology**, v. 48, p. 449-470, 1994.

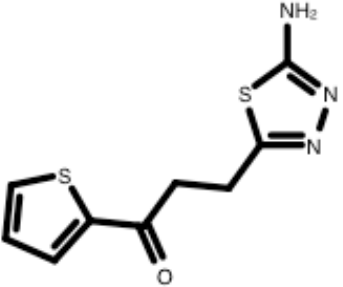
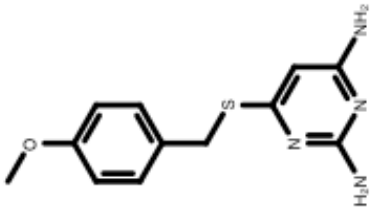
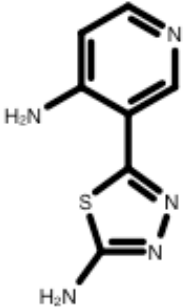
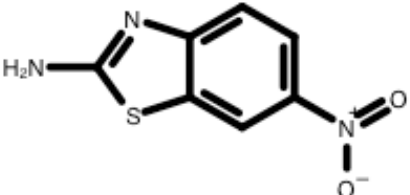
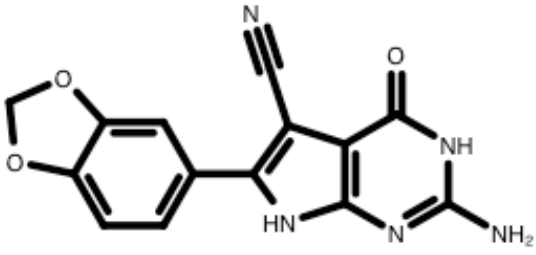
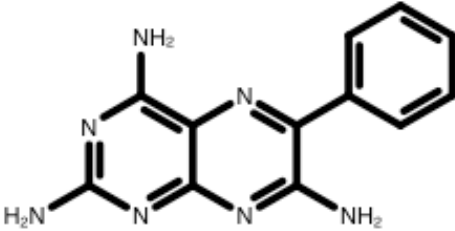
APÊNDICE A – Estrutura química e atividade biológica dos inibidores utilizados na avaliação dos modelos farmacofóricos para inibidores de LmPTR1. (continua)

N ^o	Estrutura química	Ki (µM)	N ^o	Estrutura química	Ki (µM)
1		0,02	4		0,04
2		0,03	5		0,04
3		0,03	6		0,05

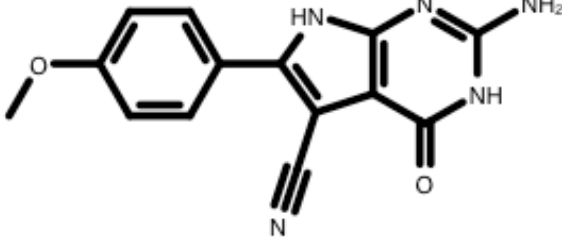
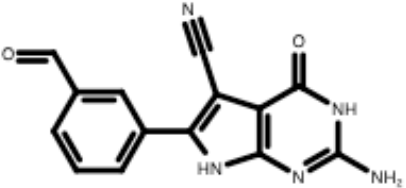
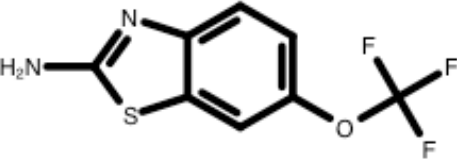
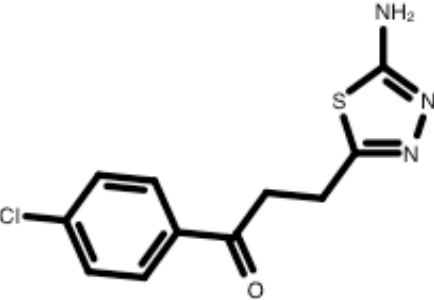
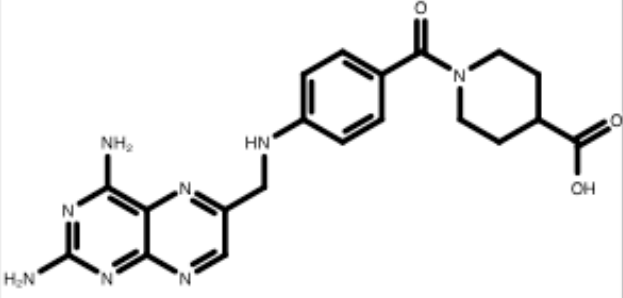
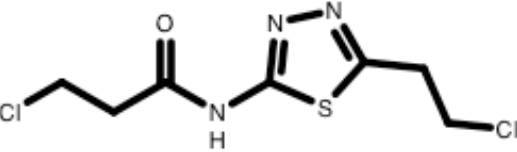
APÊNDICE A – Estrutura química e atividade biológica dos inibidores utilizados na avaliação dos modelos farmacofóricos para inibidores de LmPTR1. (continuação)

Nº	Estrutura química	Ki (µM)	Nº	Estrutura química	Ki (µM)
7		0,06	10		0,24
8		0,08	11		0,60
9		0,21	12		2,00

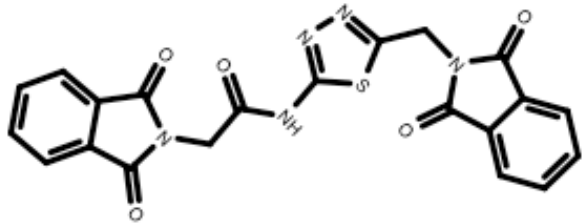
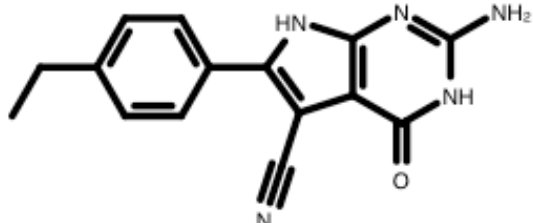
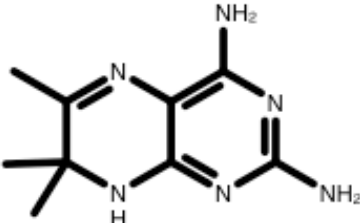
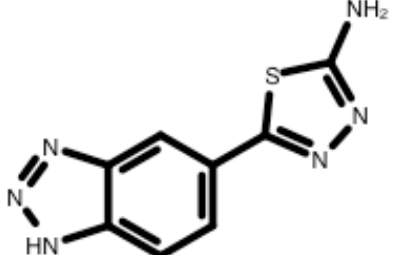
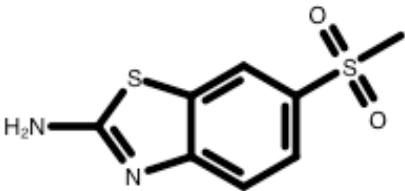
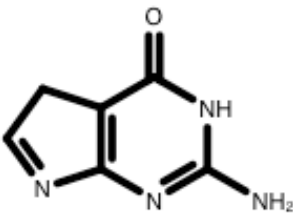
APÊNDICE A – Estrutura química e atividade biológica dos inibidores utilizados na avaliação dos modelos farmacofóricos para inibidores de LmPTR1. (continuação)

Nº	Estrutura química	Ki (µM)	Nº	Estrutura química	Ki (µM)
13		2,00	16		2,70
14		2,00	17		3,00
15		2,60	18		3,40

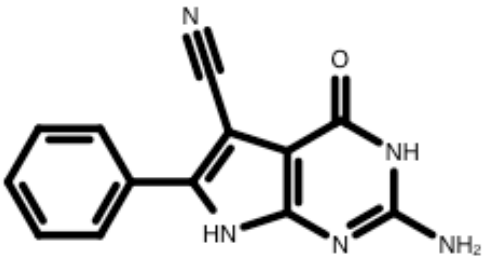
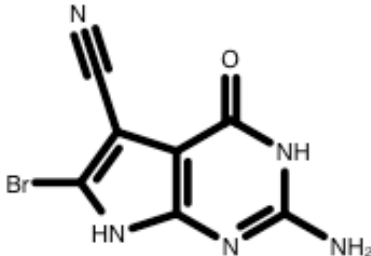
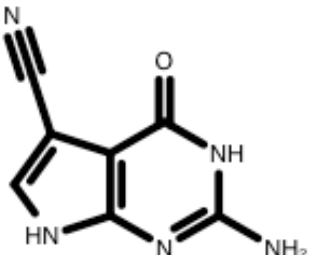
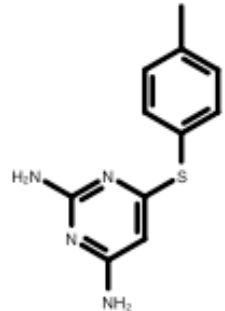
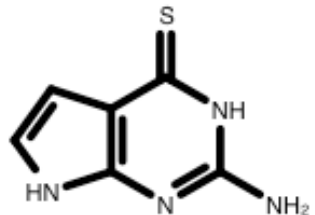
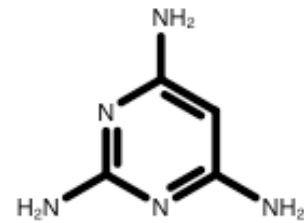
APÊNDICE A – Estrutura química e atividade biológica dos inibidores utilizados na avaliação dos modelos farmacofóricos para inibidores de LmPTR1. (continuação)

Nº	Estrutura química	Ki (µM)	Nº	Estrutura química	Ki (µM)
19		3,40	22		4,20
20		4,00	23		7,00
21		4,17	24		7,00

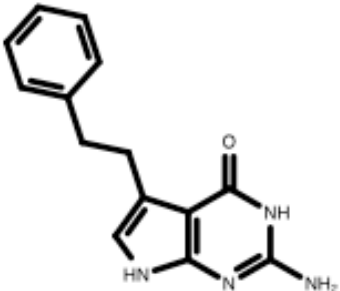
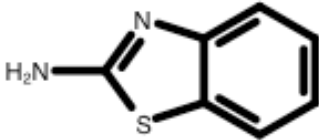
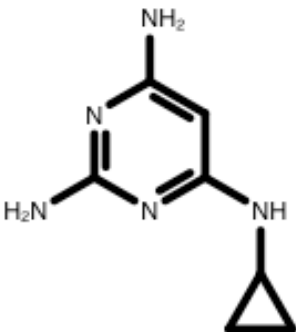
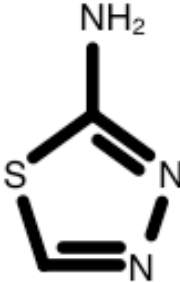
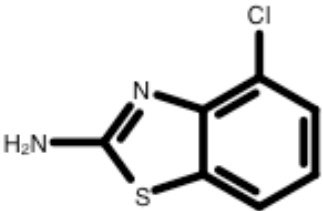
APÊNDICE A – Estrutura química e atividade biológica dos inibidores utilizados na avaliação dos modelos farmacofóricos para inibidores de LmPTR1. (continuação)

Nº	Estrutura química	Ki (µM)	Nº	Estrutura química	Ki (µM)
25		9,00	28		16,40
26		12,00	29		24,00
27		16,00	30		27,00

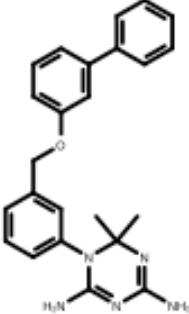
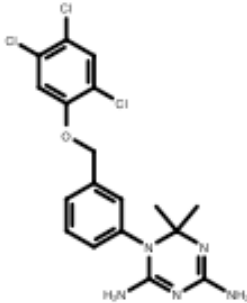
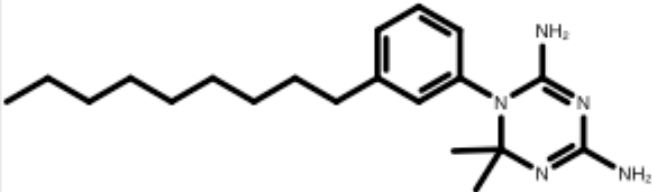
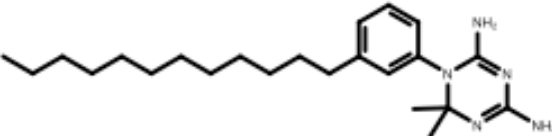
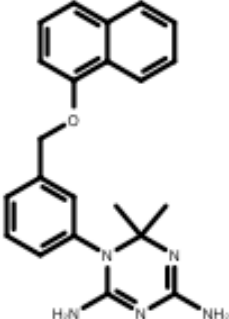
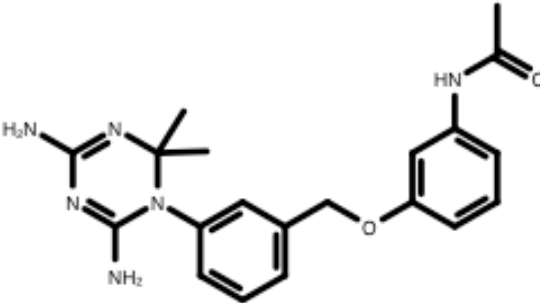
APÊNDICE A – Estrutura química e atividade biológica dos inibidores utilizados na avaliação dos modelos farmacofóricos para inibidores de LmPTR1. (continuação)

Nº	Estrutura química	Ki (µM)	Nº	Estrutura química	Ki (µM)
31		27,00	34		27,00
32		27,00	35		27,00
33		27,00	36		27,00

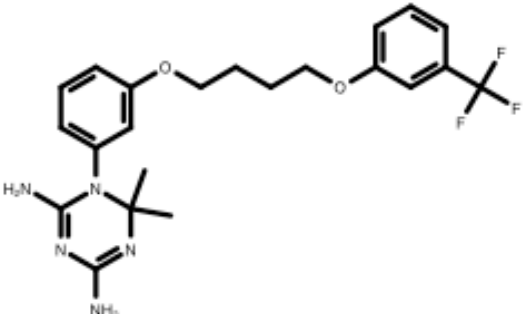
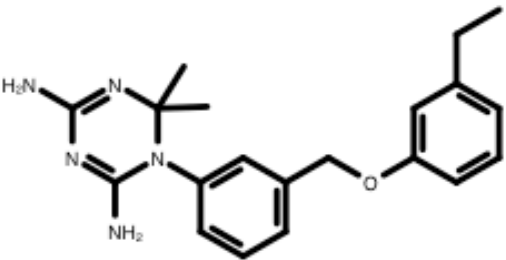
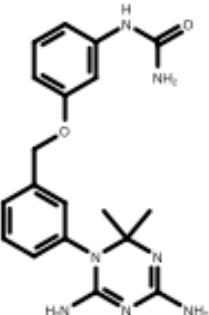
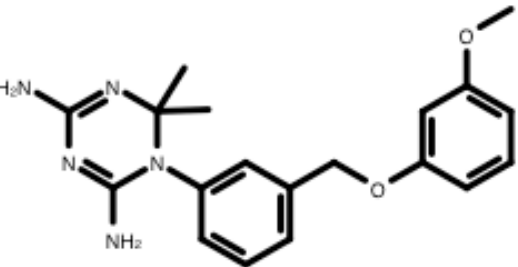
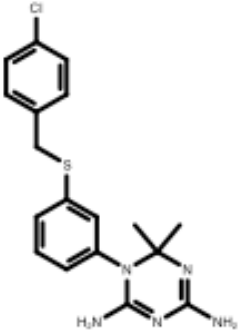
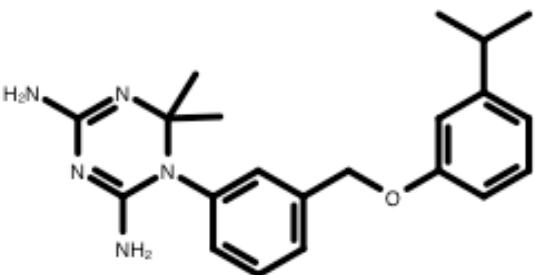
APÊNDICE A – Estrutura química e atividade biológica dos inibidores utilizados na avaliação dos modelos farmacofóricos para inibidores de LmPTR1. (conclusão)

Nº	Estrutura química	Ki (µM)	Nº	Estrutura química	Ki (µM)
37		27,00	40		143,00
38		27,00	41		436,00
39		79,00			

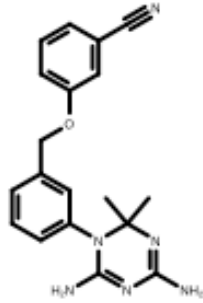
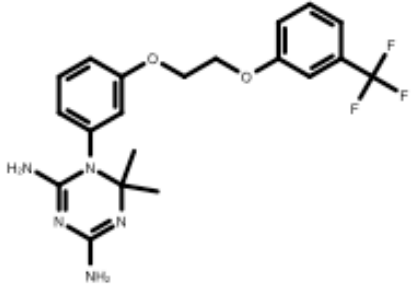
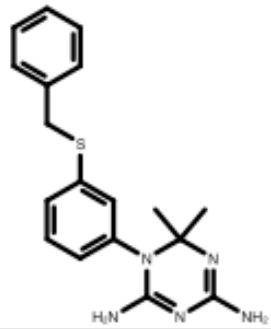
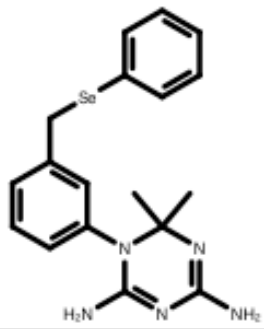
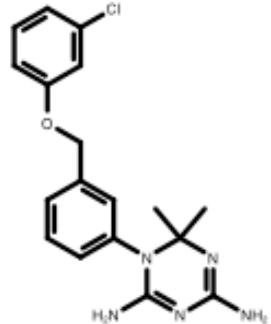
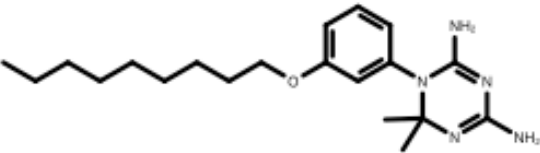
APÊNDICE B – Estrutura química e atividade biológica dos inibidores utilizados na avaliação dos modelos farmacofóricos para inibidores de LmDHFR-TS. (continua)

Nº	Estrutura química	Ki (µM)	Nº	Estrutura química	Ki (µM)
1		0,02	4		0,07
2		0,02	5		0,07
3		0.04	6		0,08

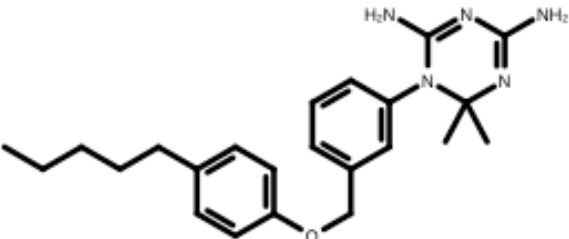
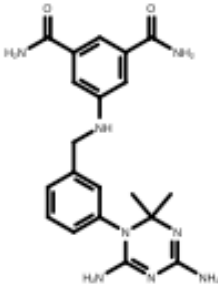
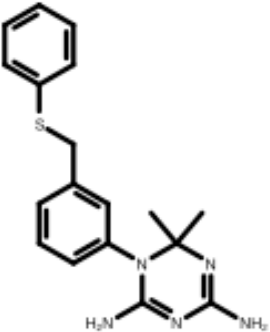
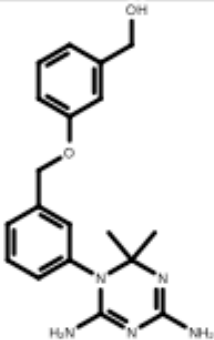
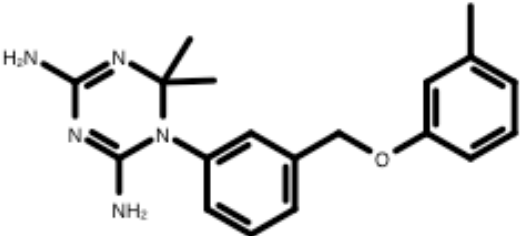
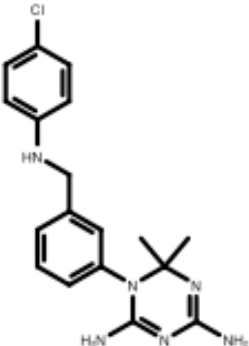
APÊNDICE B – Estrutura química e atividade biológica dos inibidores utilizados na avaliação dos modelos farmacofóricos para inibidores de LmDHFR-TS. (continuação)

Nº	Estrutura química	Ki (µM)	Nº	Estrutura química	Ki (µM)
7		0,08	10		0,13
8		0,09	11		0,15
9		0.11	12		0,17

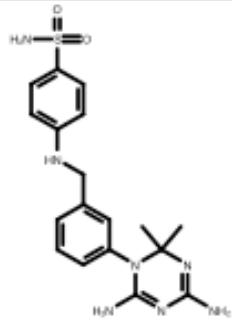
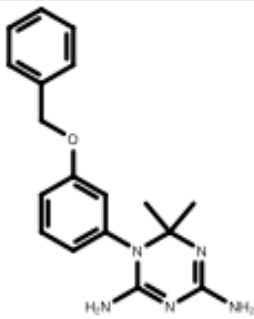
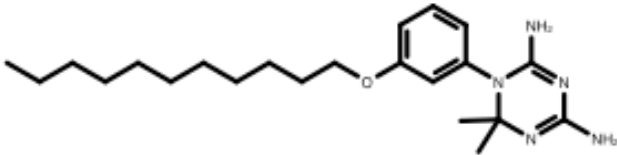
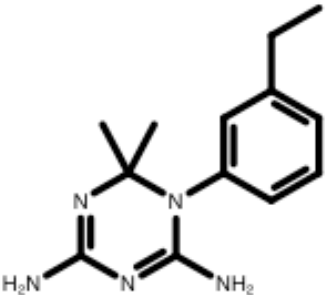
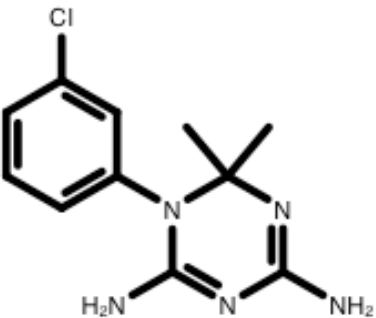
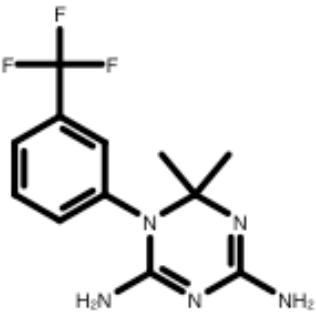
APÊNDICE B – Estrutura química e atividade biológica dos inibidores utilizados na avaliação dos modelos farmacofóricos para inibidores de LmDHFR-TS. (continuação)

Nº	Estrutura química	Ki (µM)	Nº	Estrutura química	Ki (µM)
13		0,18	16		0,25
14		0,22	17		0,28
15		0,22	18		0,30

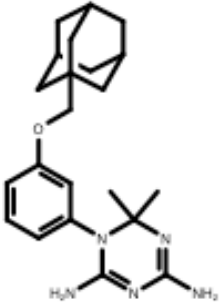
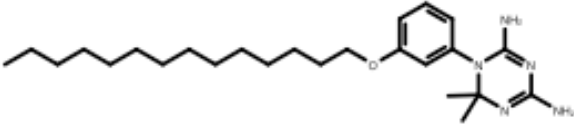
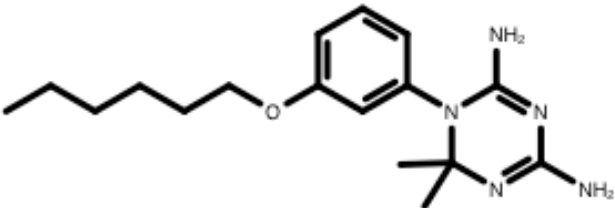
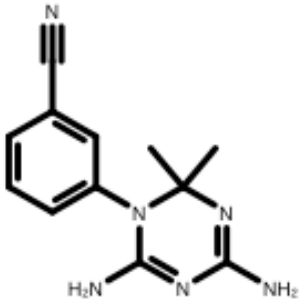
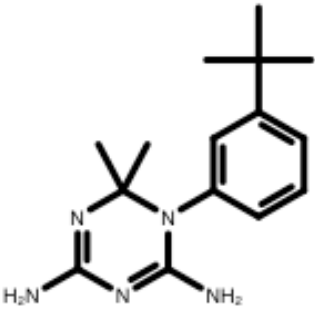
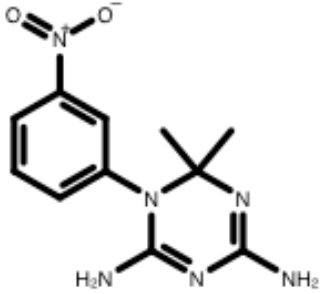
APÊNDICE B – Estrutura química e atividade biológica dos inibidores utilizados na avaliação dos modelos farmacofóricos para inibidores de LmDHFR-TS. (continuação)

Nº	Estrutura química	Ki (µM)	Nº	Estrutura química	Ki (µM)
19		0,34	22		0,52
20		0,41	23		0,65
21		0.43	24		0,66

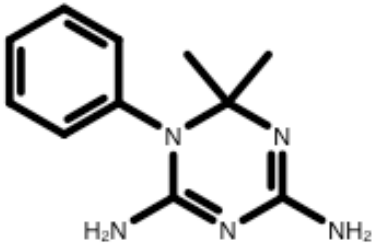
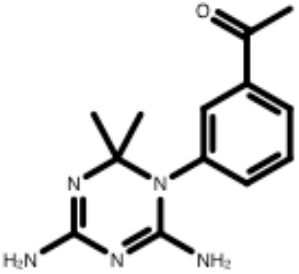
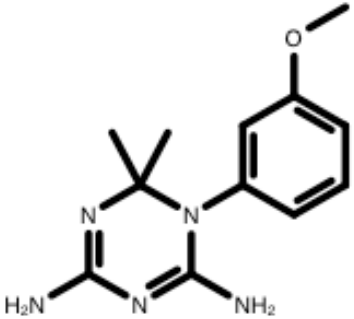
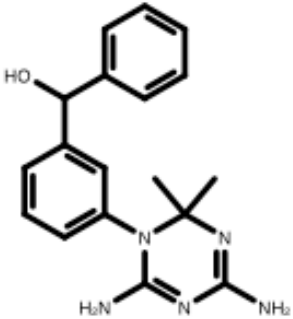
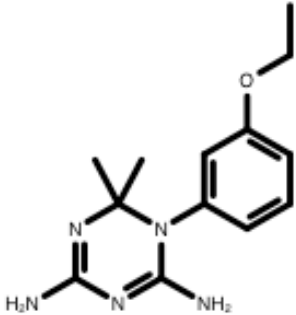
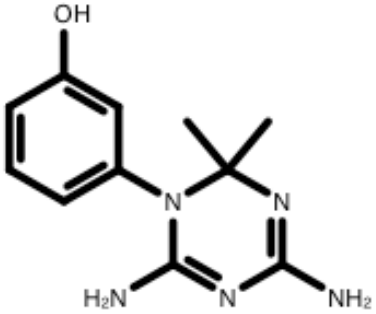
APÊNDICE B – Estrutura química e atividade biológica dos inibidores utilizados na avaliação dos modelos farmacofóricos para inibidores de LmDHFR-TS. (continuação)

Nº	Estrutura química	Ki (µM)	Nº	Estrutura química	Ki (µM)
25		0,76	28		1,91
26		0,98	29		1,95
27		1,20	30		2,19

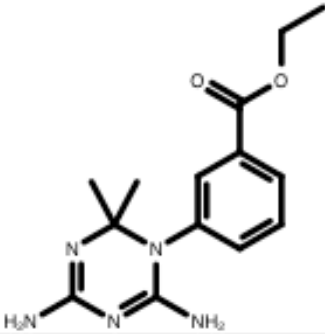
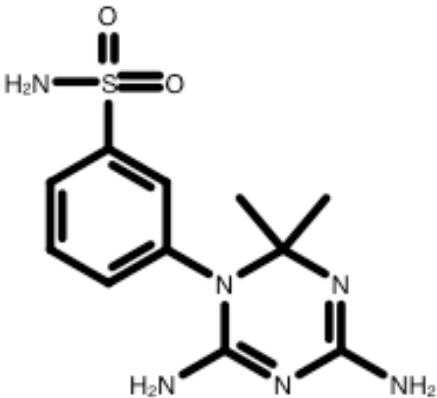
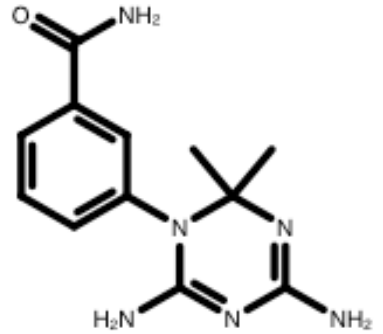
APÊNDICE B – Estrutura química e atividade biológica dos inibidores utilizados na avaliação dos modelos farmacofóricos para inibidores de LmDHFR-TS. (continuação)

Nº	Estrutura química	Ki (µM)	Nº	Estrutura química	Ki (µM)
31		3,09	34		5,89
32		4,00	35		6,03
33		5,75	36		10,00

APÊNDICE B – Estrutura química e atividade biológica dos inibidores utilizados na avaliação dos modelos farmacofóricos para inibidores de LmDHFR-TS. (continuação)

Nº	Estrutura química	Ki (µM)	Nº	Estrutura química	Ki (µM)
37		12,59	40		39,81
38		22,91	41		42,66
39		38,02	42		53,70

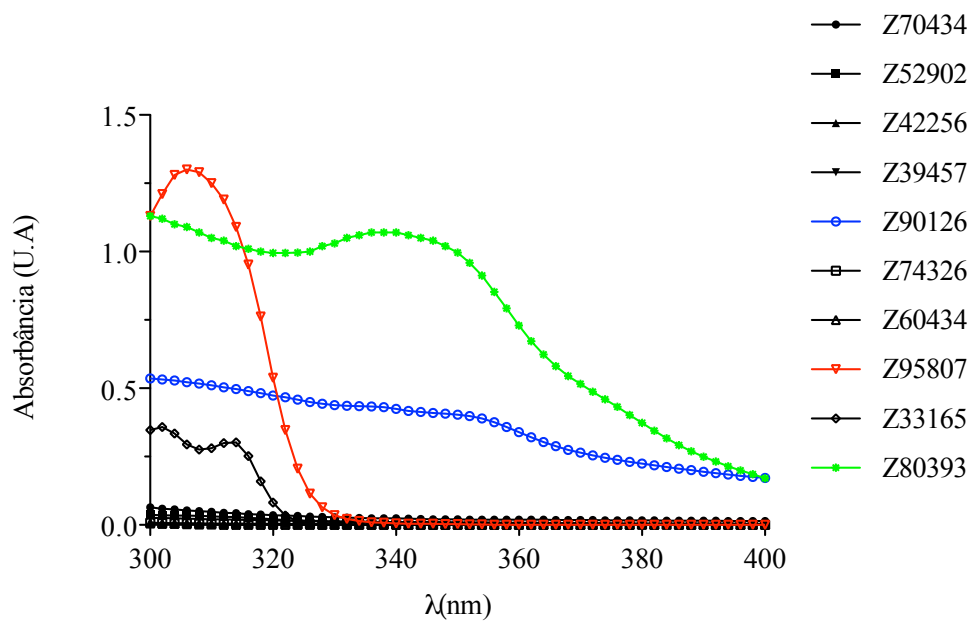
APÊNDICE B – Estrutura química e atividade biológica dos inibidores utilizados na avaliação dos modelos farmacofóricos para inibidores de LmDHFR-TS. (conclusão)

Nº	Estrutura química	Ki (µM)	Nº	Estrutura química	Ki (µM)
43		112,20	45		363,08
44		117,49			

APÊNDICE C – Alinhamento sequencial do produto de amplificação de DNA utilizando os *primers* externos T7 (Addgene, #69348-3) (1) com a sequência de LmPTR1 disponível no banco de dados UniProt (Nº Q01782) (2).

1 →	1	ATGACTGCTCCGACCGTGCCGGTGGCGTTGGTAACAGGCGCCGCGAAGCGTCTTGGCCGC	60
2 →	135	ATGACTGCTCCGACCGTGCCGGTGGCGTTGGTAACAGGCGCCGCGAAGCGTCTTGGCCGC	194
	61	AGTATCGCTGAGGGACTCCACGCGGAGGGGTACGCTGTCTGCTTGCACTATCATCGCTCT	120
	195	AGTATCGCTGAGGGACTCCACGCGGAGGGGTACGCTGTCTGCTTGCACTATCATCGCTCT	254
	121	GCTGCAGAAGCGAACGCACTATCCGCGACGCTCAACGCAAGGCGACCGAACAGCGCCATC	180
	255	GCTGCAGAAGCGAACGCACTATCCGCGACGCTCAACGCAAGGCGACCGAACAGCGCCATC	314
	181	ACGGTGCAGGCGGATCTGAGCAACGTTGCCACAGCCCCGGTCAGCGGCGCTGATGGCTCT	240
	315	ACGGTGCAGGCGGATCTGAGCAACGTTGCCACAGCCCCGGTCAGCGGCGCTGATGGCTCT	374
	241	GCACCTGTTACCCTCTTCACGCGCTGTGCTGAGTTGGTGGCTGCGTGCTACACCCACTGG	300
	375	GCACCTGTTACCCTCTTCACGCGCTGTGCTGAGTTGGTGGCTGCGTGCTACACCCACTGG	434
	301	GGACGCTGCGACGTGCTAGTGAACAACGCCCTCTTCTTTCTACCCACGCCGCTGCTGAGG	360
	435	GGACGCTGCGACGTGCTAGTGAACAACGCCCTCTTCTTTCTACCCACGCCGCTGCTGAGG	494
	361	AATGACGAGGATGGACACGAGCCCTGTGTCCGAGATAGAGAGGCAATGGAGACGGCCACC	420
	495	AATGACGAGGATGGACACGAGCCCTGTGTCCGAGATAGAGAGGCAATGGAGACGGCCACC	554
	421	GCTGACCTCTTCGGCTCCAACGCGATAGCGCCCTACTTCTTGATTAAGGCGTTCGCGCAT	480
	555	GCTGACCTCTTCGGCTCCAACGCGATAGCGCCCTACTTCTTGATTAAGGCGTTCGCGCAT	614
	481	CGCGTCGCGGGCACCCAGCCAAGCATCGCGGCACCAACTACTCCATCATCAACATGGTC	540
	615	CGCGTCGCGGGCACCCAGCCAAGCATCGCGGCACCAACTACTCCATCATCAACATGGTC	674
	541	GACGCCATGACGAACCAGCCTCTTCTCGGGTACACCATATATACCATGGCCAAAGGGGCG	600
	675	GACGCCATGACGAACCAGCCTCTTCTCGGGTACACCATATATACCATGGCCAAAGGGGCG	734
	601	TTGGAGGGGCTGACACGGTCTGCCGCGCTGGAGCTTGCGCCGCTGCAGATTCGAGTGAAC	660
	735	TTGGAGGGGCTGACACGGTCTGCCGCGCTGGAGCTTGCGCCGCTGCAGATTCGAGTGAAC	794
	661	GGCGTTGGTCCGGGTTTGTCCGGTGCCTCGTCGATGACATGCCCCCTGCTGTGTGGGAGGGC	720
	795	GGCGTTGGTCCGGGTTTGTCCGGTGCCTCGTCGATGACATGCCCCCTGCTGTGTGGGAGGGC	854
	721	CACCGCAGCAAGGTGCCTCTGTACCAGCGGATTCTCCGCCGCAGAGGTGAGCGACGTT	780
	855	CACCGCAGCAAGGTGCCTCTGTACCAGCGGATTCTCCGCCGCAGAGGTGAGCGACGTT	914
	781	GTTATCTTTCTGTGCTCCTCCAAGGCCAAGTACATCACC-GGCACCTGTGTCAAAGTGGAA	839
	915	GTTATCTTTCTGTGCTCCTCCAAGGCCAAGTACATCACCGGGCACCTGTGTCAAAGTGGAA	974
	840	TGGTGGCTACAGCCTTACCCGGGCCTGA	867
	975	TGGTGGCTACAGCCTTACCCGGGCCTGA	1002

APÊNDICE D – Espectros de absorvância das moléculas adquiridas para os ensaios *in vitro*, na faixa de 300 a 400 nm. Em destaque, os espectros das moléculas que absorvem no mesmo comprimento de onda do ensaio ($\lambda=340\text{nm}$).



APÊNDICE E - Valores de energia potencial, cinética e total para o complexo PTR1-Z80393 durante a trajetória de DM. Os valores das energias foram coletadas a cada 100 ps da simulação.

