



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

DENIS DA SILVA CORRÊA

***DOCKING DE COMPOSTOS DA FAMÍLIA DAS ARILOXAZINAS EM
ENZIMAS RELACIONADAS COM A MALÁRIA***



**São Carlos
2010**

Denis da Silva Corrêa

***DOCKING DE COMPOSTOS DA FAMÍLIA DAS ARILOXAZINAS EM
ENZIMAS RELACIONADAS COM A MALÁRIA***

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

Processo FAPESP 2007/06125-9

Prof^a. Dr^a. Ignez Caracelli
Prof. Dr. Julio Zukerman Schpector

Orientadores

São Carlos
2010

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

C824dc

Corrêa, Denis da Silva.

Docking de compostos da família das ariloxazinas em enzimas relacionadas com a malária / Denis da Silva Corrêa. -- São Carlos : UFSCar, 2010.
155 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Biotecnologia. 2. Glutathione redutase. 3. Bioinformática.
4. Biologia molecular. I. Título.

CDD: 660.6 (20^a)

Denis da Silva Corrêa

Dissertação de Mestrado submetida
à Coordenação do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia,
da Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia

Aprovado em: 06/08/2010

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Ignez Caracelli (Orientadora)
UFSCar - DF



Profa. Dra. Lucia Maria Xavier Lopes
IQ - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. Fernando Luis Barroso da Silva
USP - Ribeirão Preto

*Dedico este trabalho aos meus pais Alaor e
Elaine e meus irmãos Daniel e Danilo.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente aos meus pais, Alaor e Elaine, meus irmãos, Daniel e Danilo, e demais familiares, pessoas especiais e que sempre me apoiaram, sem os quais não chegaria até aqui.

Aos meus orientadores, Prof^{ta}. Dr^{ta}. Ignez Caracelli e Prof. Dr. Julio Zukerman Schpector, que sempre me ajudaram, com presença fundamental e dedicação em todo o trabalho desenvolvido.

Aos professores Prof. Dr. Euclides Matheucci Junior, Prof. Dr. Fernando Manuel Araújo Moreira e Prof^{ta}. Dr^{ta}. Rosana Rossi Ferreira, componentes da banca examinadora na qualificação, e Prof^{ta}. Dr^{ta}. Lúcia Maria Xavier Lopes e Prof. Dr. Fernando Luis Barroso da Silva, componentes da banca examinadora na defesa. Seus conselhos e sugestões vieram a enriquecer o trabalho.

À Carol, que teve paciência e compreensão durante os anos de estudo.

À FAPESP, pela concessão da bolsa de Mestrado.

A todos os meus professores, desde os de Educação Básica até os de Pós-Graduação, que tiveram papel fundamental em minha formação.

Aos companheiros do BioMat e do LaCrEMM, que me auxiliaram sempre que solicitados.

Aos amigos conquistados neste período, dos quais jamais esquecerei.

Meus agradecimentos...

Trabalho desenvolvido durante o Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia/UFSCar, com bolsa FAPESP – processo número 2007/06125-9.

CORRÊA, D. S. **Docking de compostos da família das ariloxazinas em enzimas relacionadas com a malária.** 2010. 155f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

RESUMO

A malária, causada principalmente pelo *Plasmodium falciparum*, atinge cerca de 500 milhões de pessoas e causa aproximadamente um milhão de mortes todos os anos. Para o desenvolvimento de novos fármacos contra esta doença, uma das abordagens possível é identificar uma enzima que desempenhe papel vital no desenvolvimento do *P. falciparum* e apresente propriedades significativamente diferentes das enzimas humanas correspondentes, de modo que tais diferenças possam ser exploradas no *design* de inibidores específicos à proteína do parasita. Existem evidências sugerindo que aumentar o estresse oxidativo pode inibir eficientemente o crescimento do parasita causador da malária e, portanto, a enzima Glutaciona Redutase do *P. falciparum* (GRPf), responsável por sua defesa antioxidante, tornou-se um alvo em potencial para o desenvolvimento de inibidores. Também, o bloqueio da ação da Diidrofolato Redutase-Timidilato Sintase do *P. falciparum* (DHFR-TSPf) interrompe a produção de dTMP e a síntese de DNA no parasita. Ainda, espera-se que a inibição da Lactato Desidrogenase do *P. falciparum* (LDHPf) interrompa a produção de ATP no parasita e, conseqüentemente, cause sua morte. Portanto, estudou-se o comportamento de compostos da família das ariloxazinas, da cloroquina e do azul de metileno nos sítios de ligação destas enzimas, além das enzimas humanas correspondentes para fins de comparação, por meio de cálculos de *docking*. As estruturas tridimensionais das enzimas foram obtidas no *Protein Data Bank* (PDB). As estruturas dos inibidores da família das ariloxazinas, por sua vez, foram obtidas por meio de modelagem molecular, utilizando os programas HyperChem 6.01 e MOPAC2009, a partir de estruturas cristalográficas semelhantes obtidas no *Cambridge Structural Database*; já as estruturas da cloroquina e do azul de metileno foram obtidas também no PDB. Os cálculos de *docking* destes compostos nos sítios de ligação das enzimas estudadas foram realizados utilizando o programa GOLD 4.0.1. Com base nos resultados de *docking*, sugere-se que as enzimas GRPf e DHFR-TSPf não são alvos preferenciais da cloroquina. Também, pôde-se elucidar o possível modo de ligação do azul de metileno nas enzimas GRh e GRPf. No geral, foi possível sugerir ainda que as ariloxazinas devam apresentar maior afinidade pela GRh, seguida por GRPf, DHFRh, DHFR-TSPf, LDHPf e LDHh, nesta ordem. Nas GRs, o sítio da interface foi o sítio preferencial de ligação. Para se buscar inibidores da família das ariloxazinas com maior afinidade pela GRPf, sugere-se considerar um pentafluorfenil como substituinte na posição N10, como no composto **2e**. Ainda, na busca por ariloxazinas com maior afinidade pela LDHPf, sugere-se considerar um carboximetil na posição N3 (como o de **5b**) e um pentafluorfenil na posição N10 (como em **2e**). Por fim, foi obtido que as ariloxazinas estudadas possivelmente apresentarão, em geral, uma maior afinidade pela DHFRh do que pela DHFR-TSPf. Estes dados podem ser tomados como ponto de partida para o *design* de novos compostos da família das ariloxazinas, a fim de que possam atuar como compostos líderes na busca por novos fármacos contra a malária.

Palavras-chave: *Docking*. Ariloxazinas. Glutaciona Redutase. Diidrofolato Redutase-Timidilato Sintase. Lactato Desidrogenase. *Plasmodium falciparum*. Malária.

CORRÊA, D. S. **Docking of arilloxazines in enzymes related to malaria.** 2010. 155f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

ABSTRACT

Malaria disease, caused mainly by *Plasmodium falciparum* parasite, afflicts about 500 million people and causes nearly one million deaths every year. For the development of new drugs against this disease, one possible approach is to identify an enzyme that plays a key role in *P. falciparum* development and presents significantly different properties from the corresponding human one. These differences can be exploited in the design of specific inhibitors of the parasite's protein, thus, three different enzymes were selected as possible targets. As there are evidences suggesting that increasing oxidative stress can effectively inhibit the growth of the malarial parasite the enzyme Glutathione Reductase of *P. falciparum* (*PfGR*), responsible for the parasite's antioxidant defense, has become a potential target for the design and development of inhibitors. The second target was the *P. falciparum* Dihydrofolate Reductase-Thymidylate Synthase (*PfDHFR-TS*), and in this case blocking its action stops the dTMP production and DNA synthesis in the parasite. The third chosen target was the *P. falciparum* Lactate Dehydrogenase (*PfLDH*), whose inhibition interrupts the ATP formation and thus causing the death of the parasite. So that a family of arilloxazines compounds, together with chloroquine and methylene blue, were studied by means of docking simulations in the binding sites of these enzymes and also in the corresponding human enzymes for comparison. The three-dimensional structures of the enzymes and of chloroquine and methylene blue were obtained from the Protein Data Bank (PDB). The structures of the arilloxazines compounds, in turn, were obtained by molecular modeling with HyperChem 6.01 and MOPAC2009 programs, using as starting models similar crystallographic structures deposited in the Cambridge Structural Database. Docking simulations were performed using GOLD 4.0.1. The docking results showed that the enzymes *PfGR* and *PfDHFR-TS* are not the preferential targets of chloroquine. For the methylene blue it was possible to elucidate its binding mode in hGR and *PfGR*. Regarding the arilloxazines it was possible to show that they present their higher affinity for hGR, followed by *PfGR*, hDHFR, *PfDHFR-TS*, *PfLDH* and hLDH. In the case of GRs, the interface site was the preferred binding site. The results suggest that if arilloxazines compounds with higher affinity for *PfGR* are desirable then a pentafluorophenyl should be attached at the N10 position, as in the **2e** compound. When searching for arilloxazines with higher affinity for *PfLDH*, it seems to be desirable a carboxymethyl group at the N3 position (as in **5b**) and a pentafluorophenyl group at N10 (as in **2e**). Finally, the results suggest that in general the studied arilloxazines probably will present a higher affinity for hDHFR than *PfDHFR-TS*. All these results are an important starting point for the design of new arilloxazines ligands so that they can be used as lead compounds in the search for new drugs against malaria.

Keywords: Docking. Arilloxazines. Glutathione Reductase. Dihydrofolate Reductase-Thymidylate Synthase. Lactate Dehydrogenase. *Plasmodium falciparum*. Malaria.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Distribuição global da malária nas últimas décadas. Adaptado de Sachs e Malaney (2002).....	19
Figura 2 -	Ciclo de vida do parasita <i>P. falciparum</i> . Adaptado de Miller et al. (2002)	21
Figura 3 -	Esquema mostrando o resultado do <i>docking</i> de um ligante com uma macromolécula. O ligante é um inibidor da família das ariloxazinas e está representada a superfície do monômero A da macromolécula glutationa redutase humana, que é o alvo.....	26
Figura 4 -	Esquema de ação dos operadores genéticos cruzamento e mutação. O operador cruzamento combina partes de dois cromossomos parentais, produzindo dois cromossomos filhos, enquanto que o mutação introduz uma nova informação no cromossomo parental, gerando um novo cromossomo filho.....	28
Figura 5 -	Método da Roleta. Este método é análogo ao giro de uma roleta. Observe que cada “fatia” é proporcional à aptidão do indivíduo. Portanto, ao “girar” a roleta, quanto maior a aptidão do indivíduo, maior a probabilidade de este parar no “ponto de seleção”. Neste exemplo, o <i>indivíduo 1</i> , com um <i>fitness</i> de 87, é o que tem maior probabilidade de ser selecionado.....	29
Figura 6 -	Esquema da operação de um algoritmo genético em um cálculo de <i>docking</i>	30
Figura 7 -	Estrutura tridimensional da glutationa. Em A , temos a glutationa reduzida (2 GSH); em B , a glutationa oxidada (GSSG). Note que na GSSG ocorre uma ligação dissulfeto (seta) entre os grupos sulfidríla dos resíduos de cisteína. Figuras feitas com o programa DS Visualizer 2.0 (DS Visualizer 2.0, 2007).....	36
Figura 8 -	Interconversão da glutationa em suas formas reduzida e oxidada. Adaptado de Rover Júnior et al. (2001).....	36
Figura 9 -	Representação esquemática da estrutura tridimensional da enzima GRP <i>f</i> (obtida sob o código <i>Ionf</i> no PDB). Em vermelho estão as hélices- α e em verde as folhas- β . Em <i>stick</i> aparece o FAD (um em cada monômero). As setas cheias apontam para a região do sítio ativo, enquanto que a seta pontilhada aponta para a região do sítio da interface. Figura feita com o programa DS Visualizer 2.0 (DS Visualizer 2.0, 2007).....	37
Figura 10 -	Reações sequenciais do ciclo da síntese de dTMP, com as respectivas enzimas envolvidas (adaptado de IVANETICH e SANTI, 1990).....	40

Figura 11 -	Inibidor WR99210 no sítio ativo do domínio diidrofolato redutase da DHFR-TSPf. Os resíduos de aminoácido nas posições onde surgiram mutações que conferiram resistência aos antifolatos aparecem em destaque, com exceção do Asp54 que aparece na figura por ser um resíduo crucial para a catálise.....	41
Figura 12 -	Representação esquemática da estrutura quaternária do tetrâmero LDHPf (código <i>Icet</i> no PDB), onde cada monômero aparece em uma cor diferente.....	42
Figura 13 -	Estrutura geral dos compostos da família das ariloxazinas. Adaptado de Sarma et al. (2003).....	43
Figura 14 -	Cloroquina. Adaptado de Ridley (2002).....	44
Figura 15 -	Azul de metileno. Adaptado de Krauth-Siegel, Schirmer e Bauer (2005)..	45
Figura 16 -	Esquema da metodologia utilizada no trabalho.....	47
Figura 17 -	A. Estrutura tridimensional da GRh (<i>Igra</i>), com destaque para o FAD (em laranja), o NADPH (em azul) e o substrato GSSG complexado no sítio ativo (seta). B. Estrutura tridimensional também da GRh (<i>Ixan</i>), mas com o inibidor XAN complexado no sítio da interface (seta).....	49
Figura 18 -	Em A , temos uma visão geral da enzima DHFR-TSPf. Em verde e em dourado está o domínio diidrofolato redutase, enquanto que em roxo e em azul aparece o domínio timidilato sintase. Em vermelho aparece o inibidor WR99210 (setas), em azul o cofator NADPH e em laranja o dUMP. Em B , aparece em destaque o inibidor WR99210 no sítio de ligação do domínio diidrofolato redutase, com suas principais interações com resíduos de aminoácido da enzima (ao fundo, em laranja, o NADPH).....	50
Figura 19 -	A. Esquema geral do tetrâmero LDHPf (cada monômero aparece com uma cor diferente), com destaque para o inibidor cloroquina complexado no sítio de ligação do cofator NADH (seta). B. Orientação da cloroquina no sítio do NADH, com destaque para a interação com o resíduo Glu122.....	50
Figura 20 -	A. Estrutura básica geral dos inibidores da família das ariloxazinas, obtida por modelagem molecular. B. Estrutura tridimensional da cloroquina, obtida do PDB (<i>Icet</i>). Figuras feitas com o programa Mercury 2.2 (MACRAE et al., 2006).....	52
Figura 21 -	A. Estrutura da isoaloxazina, utilizada para a busca por compostos semelhantes no CSD. B. 3-metil-10-(2-hidroxifenil)isoaloxazina (SHINKAI et al., 1988), estrutura obtida no CSD e escolhida para servir como ponto de partida para a modelagem dos compostos desejados.....	52
Figura 22 -	Estrutura tridimensional do azul de metileno, obtida a partir da estrutura <i>2yve</i>	53

Figura 23 -	Resultado da busca no CSD. Em A , aparece a isoaloxazina utilizada para se fazer a busca. Em B , C , D e E , temos os compostos semelhantes obtidos. O composto D (código CSD SAKKOE) foi o escolhido para servir como ponto de partida na modelagem molecular.....	62
Figura 24 -	Estrutura tridimensional dos compostos da família das ariloxazinas modelados segundo indicado na Tabela 1. O código de cores utilizado é: C = cinza; H = branco; O = vermelho; N = azul; Cl = verde; F = amarelo	63
Figura 25 -	Alinhamento sequencial <i>pairwise</i> entre as sequências primárias (FASTA) de aminoácidos da GRh (<i>Igra</i>) e da GRPf (<i>Ionf</i>). Em vermelho, aparecem os resíduos catalíticos, conservados entre as enzimas; note como a região ao redor das cisteínas catalíticas é bastante conservada. Dentro das caixas, aparecem alguns dos resíduos que compõem o sítio da interface das enzimas.....	65
Figura 26 -	Sobreposição das estruturas tridimensionais das enzimas GRh (azul) e GRPf (dourado). Note como até mesmo a posição do FAD (setas; um em cada monômero) é conservada entre elas.....	66
Figura 27 -	Sítio da interface da GRh (linha grossa e azul) e da GRPf (linha fina e vermelha) sobrepostos. Os nomes dos resíduos de aminoácidos da enzima humana aparecem em negrito e da enzima do parasita em itálico (somente em um monômero de cada enzima para facilitar a visualização).....	66
Figura 28 -	Alinhamento das sequências de aminoácidos da cadeia A de M-LDHh (<i>Ii10</i>), H-LDHh (<i>Ii0z</i>) e LDHPf (<i>Icet</i>). Em vermelho aparecem os resíduos que ficam próximos à cloroquina na estrutura da LDHPf e seus correspondentes nas enzimas humanas.....	67
Figura 29 -	Resultado da sobreposição das enzimas M-LDHh (linha grossa e azul) e LDHPf (linha fina e vermelha). Estão mostrados somente os resíduos mais próximos à cloroquina (<i>CQH</i> – ligante cristalográfico da LDHPf). Os nomes dos resíduos da enzima humana aparecem em negrito, enquanto os da enzima do <i>P. falciparum</i> aparecem em itálico.....	68
Figura 30 -	A. <i>Redocking</i> do substrato GSSG cristalográfico no SA da GRh. As linhas pontilhadas indicam as ligações de hidrogênio (não são mostrados os átomos de hidrogênio). Note como as soluções obtidas na simulação (em <i>line</i> , azul) se sobrepuseram à orientação cristalográfica (em <i>stick</i> , colorido). B. Em <i>line</i> e azul, o <i>redocking</i> do XAN no SI da GRh. Em <i>stick</i> e colorido, o ligante cristalográfico.....	70
Figura 31 -	A. <i>Redocking</i> do ligante cristalográfico WR99210 na DHFR-TSPf, indicando as ligações de hidrogênio com a enzima (soluções em <i>line</i> e WR99210 cristalográfico em <i>stick</i>). B. Em azul, uma das soluções obtidas no <i>redocking</i> e, em colorido, o ligante cristalográfico (RMSD de 0,167 Å).....	71

- Figura 32 -** **A.** Saídas obtidas no *redocking* da pirimetamina na DHFR-TSPf duplo mutante; em *line* (azul) as saídas e em *stick* (colorido) o ligante cristalográfico. **B.** Em azul, uma das soluções obtidas no *redocking* e, em colorido, o ligante cristalográfico na DHFR-TSPf quádruplo mutante 71
- Figura 33 -** **A.** *Redocking* da CQH na LDHPf. Em *line* (azul) estão as soluções obtidas e em *stick* (colorido) aparece a cloroquina cristalográfica. **B.** Em azul, uma das soluções obtidas no *redocking* e, em colorido, o ligante cristalográfico (RMSD de 0,328 Å)..... 72
- Figura 34 -** **A.** Representação de todos os átomos (sem contar os hidrogênios) da GRh. **B.** Representação das estruturas secundárias da GRh: hélices α em vermelho, folhas β em ciano e *loops* em verde. **C.** Esquema mostrando as regiões do sítio da interface, que contém os resíduos His75/His75' e Phe78/Phe78', e do sítio ativo da GRh, próximo à Cys58/Cys63, interligadas por meio de uma hélice α (em vermelho)..... 75
- Figura 35 -** **A.** Modo de ligação padrão das ariloxazinas no SI da GRh. Estão representados os compostos **2a, 2b, 2c, 2e, 3a, 3b, 3c, 3e, 4a, 4b, 4c, 4d, 5a, 5b, 5c, 5d, 6, 6a, 7, 7a, 12, 14 e 18** e alguns resíduos da GRh (não são mostrados os átomos de H). **B.** Representação da superfície de alguns dos resíduos que compõem o SI da GRh (mostrados em **A**), com destaque para a cavidade em forma de “T” que estes delimitam..... 78
- Figura 36 -** **A.** Interações entre a porção isoaloxazina de **2a, 2b, 2c e 2e** e alguns resíduos da GRh. Os átomos de carbono dos ligantes estão representados em verde e os da proteína em cinza. As linhas contínuas representam as interações de van der Waals (ou π - π e C-H... π) entre os ligantes e a enzima e as linhas tracejadas representam ligações de H. São mostradas as distâncias em angstroms (Å). **B.** Sobreposição do XAN cristalográfico (em verde e em *stick*) e das soluções obtidas para as ariloxazinas (em *line*) no SI da GRh..... 78
- Figura 37 -** **A.** Interações entre o substituinte metila da posição N3 de **3a, 3b, 3c, 3e, 6, 6a, 7, 7a, 12, 14 e 18** e alguns resíduos da GRh (além das ligações de H entre os compostos e a enzima). **B.** Interações entre os substituintes azida de **12** e flúor de **14** e a enzima (ligação de H com o flúor)..... 79
- Figura 38 -** **A.** Algumas das interações entre o (etoxicarbonil)metil da posição N3 de **4a, 4b, 4c e 4d** e o SI da GRh. **B.** Interações de van der Waals entre o carboximetil de **5a, 5b, 5c e 5d** e o SI da GRh, além das interações π - π com a Phe78, C-H... π com a Val74' e ligações de H com a Tyr407' e com uma molécula de água, características para toda a família das ariloxazinas..... 81
- Figura 39 -** Comparação das conformações de mínima energia (esquerda), obtidas por meio de modelagem molecular, com as conformações geradas durante o *docking* (direita). Em **A** para o composto **4b** e, em **B**, para o **5b** 81

Figura 40 -	Algumas das interações de van der Waals entre o substituinte fenila da posição N10 do composto 18 e resíduos da enzima. Também aparecem interações N–H... π com a His75 e His75'. Estas interações foram obtidas para todos os substituintes aromáticos desta posição nas ariloxazinas estudadas.....	82
Figura 41 -	A. Interações entre o 4'-clorofenil de 2a , 3a , 4a , 5a , 12 e 14 e o SI da GRh. B. Interações entre o 3',5'-diclorofenil de 2b , 3b , 4b e 5b e a mesma enzima. Ocorrem duas ligações de H (linhas tracejadas).....	83
Figura 42 -	A. Interações entre o 3'-trifluormetilfenil de 2c , 3c , 4c e 5c e o SI da GRh. Ocorre uma ligação de H entre um dos átomos de flúor e a His75'. B. Interações entre o pentafluorfenil de 2e e 3e e a GRh.....	84
Figura 43 -	A. Interações entre o metilpiridínio-4'-il de 6 (verde) e metilpiridínio-3'-il de 7 (ciano) e o SI da GRh. B. Interações entre o 4'-piridil de 6a (verde) e 3'-piridil de 7a (ciano) e o SI da GRh.....	85
Figura 44 -	Algumas das interações que ocorrem entre 2d (verde) e 3d (amarelo) e resíduos do SI da GRh. Ligações de H estão representadas como linhas tracejadas.....	86
Figura 45 -	A. Interações entre 19 e resíduos do SI da GRh. B. Interações entre 20 e a mesma enzima.....	87
Figura 46 -	A. Modo de ligação obtido para o AM no SI da GRh. São mostradas as principais interações que faz com a enzima. B. Interações entre a CQH e o SI da GRh.....	89
Figura 47 -	Modo de ligação padrão obtido para as ariloxazinas no SI da <i>GRPf</i>	91
Figura 48 -	A. Compostos 2a , 2b , 2c , 2d e 2e no SI da <i>GRPf</i> . É dado destaque para as interações que a porção isoaloxazina e o substituinte da posição N3 fazem com a enzima. As linhas tracejadas representam ligações de H. B. Principais interações entre a porção isoaloxazina e metila da posição N3 de 3a , 3b , 3c , 3d , 3e , 6 , 6a , 7 , 7a , 12 , 14 , 18 , 19 e 20 e o SI da <i>GRPf</i>	92
Figura 49 -	Principais interações que a azida de 12 (verde) e o flúor de 14 (amarelo) fazem com a enzima. Também são mostradas as ligações de H que a porção isoaloxazina destes inibidores faz.....	93
Figura 50 -	A. Principais interações entre o (etoxicarbonil)metil de 4a , 4b , 4c e 4d e o SI da <i>GRPf</i> . B. Principais interações entre o (etoxicarbonil)metil de 5a , 5b , 5c e 5d e o SI da mesma enzima.....	94
Figura 51 -	Principais interações entre o substituinte fenil da posição N10 de 18 e o SI da <i>GRPf</i> . Estas interações foram encontradas para todos os substituintes aromáticos das ariloxazinas.....	95

Figura 52 -	Em A , temos as principais interações entre o 4'-clorofenil de 2a , 3a , 4a , 5a , 12 e 14 e o SI da <i>GRPf</i> . Em B , as interações entre o 3',5'-diclorofenil de 2b , 3b , 4b e 5b e a mesma enzima.....	96
Figura 53 -	A. Algumas das interações entre o substituinte 3'-trifluormetilfenil de 2c , 3c , 4c e 5c e o SI da <i>GRPf</i> . B. Interações entre o 3',5'-ditrifluormetilfenil de 2d , 3d , 4d e 5d e a <i>GRPf</i>	97
Figura 54 -	Principais interações entre o substituinte pentafluorfenil de 2e e 3e e o SI da <i>GRPf</i>	97
Figura 55 -	A. Principais interações entre o metilpiridínio-4'-il e metilpiridínio-3'-il de 6 (verde) e 7 (amarelo), respectivamente, e o SI da <i>GRPf</i> . B. Interações entre o 4'-piridil de 6a (amarelo) e 3'-piridil de 7a (amarelo) e o mesmo sítio.....	98
Figura 56 -	A. Principais interações entre o substituinte 1'-naftil da posição N10 de 19 e o SI da <i>GRPf</i> . B. Interações entre o 1'-antril de 20 e a mesma enzima. Note como este substituinte volumoso não mais se orienta de forma perpendicular ao par Phe420/Phe420'	99
Figura 57 -	Modo de ligação obtido para o inibidor AM no SI da <i>GRPf</i>	100
Figura 58 -	A. Orientação cristalográfica do substrato GSSG no SA da GRh (código <i>Igra</i> no PDB). B. Orientação da GSSG no SA da <i>GRPf</i> , obtida por meio de <i>docking</i> . São destacadas algumas das principais ligações de H (linhas tracejadas) recriadas no <i>docking</i> . Note como neste sítio somente o resíduo Met406' da GRh não é conservado na enzima do parasita (substituída por Leu419').....	102
Figura 59 -	Modo de ligação obtido para as ariloxazinas no SA da GRh (A) e no SA da <i>GRPf</i> (B). As interações que estes compostos fazem são, basicamente, as mesmas para as duas enzimas. São mostradas diversas saídas do <i>docking</i> das ariloxazinas neste sítio.....	104
Figura 60 -	Modo de ligação obtido para as ariloxazinas no sítio ativo do domínio diidrofolato redutase das enzimas DHFR- <i>TSPf</i> nativa (A), duplo (B) e quádruplo (C) mutantes. Os resíduos que sofreram mutação aparecem em destaque.....	106
Figura 61 -	A. Modo de ligação obtido para os compostos da família das ariloxazinas no sítio de ligação do domínio DHFR <i>Pf</i> da enzima nativa. Não são mostrados os átomos de hidrogênio. A linha pontilhada indica ligação de hidrogênio. B. Mesma visão que em A , mas sem a representação da estrutura secundária da proteína e com mais resíduos de aminoácido representados. O mesmo modo de ligação e, em geral, as mesmas interações foram obtidas também para as enzimas mutantes.....	108

Figura 62 -	Modo de ligação obtido para as ariloxazinas na DHFRh. São mostradas algumas saídas obtidas nos cálculos de <i>docking</i> para estes ligantes nesta enzima, com destaque para a ligação de H que os compostos fazem com a Ser59 (correspondente à Ser111 na DHFR <i>Pf</i>).....	109
Figura 63 -	Orientação de 2e (verde) e 2a (ciano) no sítio de ligação da DHFR <i>Pf</i> nativa, com destaque para as ligações de H com a Ser111. O mesmo resultado foi obtido para as enzimas mutantes.....	109
Figura 64 -	A. Uma das orientações possíveis dos compostos 6 , 6a , 12 , 14 , 19 e 20 na DHFR <i>Pf</i> nativa. B. Segunda orientação possível para os mesmos compostos na enzima.....	110
Figura 65 -	Ligações de H obtidas entre os substituintes azida de 12 (ciano) e flúor de 14 (verde) e a hidroxila da Ser111 das enzimas DHFR <i>Pf</i>	111
Figura 66 -	Interações entre o 4'-clorofenil de 2a , 12 e 14 e a DHFR <i>Pf</i>	112
Figura 67 -	Em A temos a orientação de 2e no sítio de ligação do domínio DHFR <i>Pf</i> da enzima nativa, enquanto que em B aparece o mesmo 2e , mas no sítio de ligação da enzima quádruplo mutante. Note como na enzima nativa a Ser108 fica distante (seta) e não faz ligações de H com o composto, enquanto que na enzima mutante aparece uma Asn108 na mesma posição, através da qual faz uma ligação de H com 2e ; pode-se notar também que, mesmo ocorrendo a substituição da Ile164 por Leu164, ainda ocorre a ligação de H com o composto na enzima mutante.....	113
Figura 68 -	A. Potenciais ligações de H C-H...O e interação π - π entre o substituinte metilpiridínio-4'-il de 6 e a DHFR <i>Pf</i> . B. Orientação de 6a no sítio de ligação da DHFR <i>Pf</i>	114
Figura 69 -	Em A estão representadas as principais interações entre o substituinte 1'-naftil de 19 e a DHFR <i>Pf</i> e, em B , interações do 1'-antril de 20 com a mesma enzima.....	115
Figura 70 -	Orientação obtida para os compostos 4b , 4c e 5b (além da segunda orientação possível de 6a) na DHFR <i>Pf</i> duplo mutante. Este mesmo modo de ligação destes compostos também foi obtido para as formas nativa e quádruplo mutante da enzima.....	116
Figura 71 -	A. Modo de ligação padrão obtido para os compostos da família das ariloxazinas no sítio do NADH da LDH <i>Pf</i> . B. Orientação de 2e e 2a (cinza) em relação aos demais compostos da família (verde). A seta cheia mostra a região onde se orientam os substituintes da posição N3 de 2e e 2a , enquanto que a seta pontilhada mostra a região dos substituintes da posição N3 dos demais compostos.....	119

Figura 72 -	Algumas das saídas de <i>docking</i> obtidas para as ariloxazinas no sítio do NADH da M-LDHH. Note como a porção isoaloxazina dos compostos orienta-se entre Val52 e Ala95/Ile115, mas o substituinte aromático da posição N10 pode apontar para diferentes regiões do sítio. Resultados semelhantes foram obtidos na H-LDHH.....	119
Figura 73 -	A. 2e (verde) e 2a (amarelo) no sítio do NADH da LDHPf, com destaque para as ligações de H (linhas tracejadas) e outras interações com a enzima (linha contínua). B. 4b, 4c, 5b, 6, 6a, 12 e 14 e a LDHPf...	121
Figura 74 -	Saídas de <i>docking</i> obtidas para 4b e 4c . Note como o substituinte (etoxicarbonil)metil da posição N3 pode assumir diferentes orientações (setas), sempre em direção à superfície da enzima. O contorno da superfície da enzima está representado na figura, colorido de acordo com o potencial eletrostático.....	122
Figura 75 -	A. Orientação de 5b na LDHPf, com destaque para a ligação de H entre seu substituinte (etoxicarbonil)metil da posição N3 e o resíduo Glu122. B. Comparação entre a conformação do 5b obtida por modelagem molecular (acima) e a gerada nos cálculos de <i>docking</i> (abaixo).....	122
Figura 76 -	A. Compostos 6, 6a, 12 e 14 e a LDHPf; a seta aponta para o substituinte metila da posição N3, o qual faz interações de van der Waals com Lys118 e Ile119. B. Compostos 12 (verde) e 14 (amarelo) no sítio de ligação da LDHPf.....	124
Figura 77 -	A. Principais interações entre o substituinte 4'-clorofenil de 2a (amarelo), 12 (verde) e 14 (ciano) e resíduos do sítio da LDHPf. B. Interações entre o 3,5'-diclorofenil de 4b (verde) e 5b (amarelo) e a LDHPf.....	124
Figura 78 -	A. Principais interações entre o substituinte aromático da posição N10 de 6 (amarelo) e 6a (verde) e a enzima LDHPf. B. Interações entre o 3'-trifluorometilfenil de 4c e a LDHPf.....	125
Figura 79 -	Principais interações entre o pentafluorfenil de 2e e resíduos da enzima LDHPf. Ligações de H são representadas como linhas pontilhadas.....	126
Figura 80 -	A. Orientação de 19 (verde) no sítio do NADH da LDHPf, em comparação com 2a (amarelo) que representa o modo de ligação padrão obtido para as ariloxazinas neste sítio. B. Orientação de 20 (verde) neste mesmo sítio, em comparação com 2a (amarelo). Note que, neste caso, o substituinte 1'-antril se orienta na mesma região que a porção isoaloxazina de 2a	127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Inibidores da família das ariloxazinas (adaptado de SARMA et al., 2003)	61
Tabela 2 -	Dados de atividade dos inibidores da família das ariloxazinas nas enzimas GRh e GRPf (adaptado de Sarma et al., 2003 e Schönleben-Janans et al., 1996).....	74
Tabela 3 -	Escores e $\Delta G_{\text{binding}}$ obtidos para os complexos formados entre o SI da GRh e GRPf e compostos da família das ariloxazinas, AM e CQH.....	77
Tabela 4 -	Escores e $\Delta G_{\text{binding}}$ obtidos para os complexos formados entre o SA da GRh e GRPf e compostos da família das ariloxazinas e CQH.....	103
Tabela 5 -	Escores e $\Delta G_{\text{binding}}$ obtidos para os complexos formados entre o domínio diidrofolato redutase da DHFR-TSPf nativa, mutantes e DHFRh e compostos da família das ariloxazinas/CQH.....	107
Tabela 6 -	Escores e $\Delta G_{\text{binding}}$ obtidos para os complexos formados entre os sítios de ligação do NADH da LDHPf, M-LDhh e H-LDhh e compostos da família das ariloxazinas.....	117
Tabela 7 -	Influência dos substituintes das ariloxazinas na formação de complexos com as enzimas estudadas.....	130

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AM	Azul de metileno
CQH	Cloroquina
CSD	<i>Cambridge Structural Database</i>
DHFR	Diidrofolato Redutase
DHFRh	Diidrofolato Redutase humana
DHFRPf	Domínio Diidrofolato Redutase da enzima Diidrofolato Redutase-Timidilato Sintase do <i>Plasmodium falciparum</i>
DHFR-TS	Diidrofolato Redutase-Timidilato Sintase
DHFR-TSPf	Diidrofolato Redutase-Timidilato Sintase do <i>Plasmodium falciparum</i>
GR	Glutaciona Redutase
GRh	Glutaciona Redutase humana
GRPf	Glutaciona Redutase do <i>Plasmodium falciparum</i>
H-LDHh	Lactato Desidrogenase humana de coração
LDH	Lactato Desidrogenase
LDHh	Lactato Desidrogenase humana
LDHPf	Lactato Desidrogenase do <i>Plasmodium falciparum</i>
M-LDHh	Lactato Desidrogenase humana de músculo estriado esquelético
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
RMSD	<i>root-mean-square deviation</i>
SA	Sítio ativo
SI	Sítio da interface

SUMÁRIO

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E INTRODUÇÃO AO PROBLEMA	19
1.1 A Malária.....	19
1.2 Mudança de Paradigma – Bioinformática Estrutural	23
1.2.1 O <i>Docking</i> Molecular	24
1.2.1.1 Algoritmos Genéticos Aplicados ao <i>Docking</i> Molecular	25
1.2.1.2 GOLD – <i>Genetic Optimisation for Ligand Docking</i>	31
1.3 A Escolha das Macromoléculas Alvo	34
1.3.1 A Glutaciona Redutase.....	34
1.3.2 A Diidrofolato Redutase-Timidilato Sintase	39
1.3.3 A Lactato Desidrogenase.....	40
1.4 Os Inibidores – Ariloxazinas, Cloroquina e Azul de Metileno	43
2 OBJETIVOS	46
3 MATERIAIS E MÉTODOS	47
3.1 Obtenção das Estruturas Tridimensionais dos Receptores.....	48
3.2 Obtenção das Estruturas Tridimensionais e Modelagem Molecular dos Ligantes	51
3.3 Alinhamentos Sequenciais e Estruturais	53
3.4 <i>Docking</i> Molecular.....	55
3.5 Visualização Molecular – Análise em Tela Gráfica	60
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1 Modelagem Molecular dos Compostos da Família das Ariloxazinas ...	61
4.2 A Escolha dos Sítios de Ligação.....	63
4.3 <i>Docking</i>	68
4.3.1 <i>Redocking</i>	69
4.3.1.1 Glutaciona Redutase	69
4.3.1.2 Diidrofolato Redutase-Timidilato Sintase	70
4.3.1.3 Lactato Desidrogenase.....	72
4.3.2 Glutaciona Redutase	73
4.3.2.1 Sítio da Interface da Glutaciona Redutase Humana	74
4.3.2.2 Sítio da Interface da Glutaciona Redutase do <i>P. falciparum</i>	89
4.3.2.3 Sítio Ativo da Glutaciona Redutase Humana e do <i>P. falciparum</i> .	101
4.3.3 Diidrofolato Redutase.....	104

4.3.4 Lactato Desidrogenase.....	117
5 CONCLUSÕES.....	128
5.1 SI da enzima GRh	128
5.2 SI da enzima GRPf.....	131
5.3 SA das enzimas GRh e GRPf	132
5.4 Enzimas DHFRPf e DHFRh.....	133
5.5 Enzimas LDHPf e LDHh.....	135
5.6 Comparando as enzimas e compostos.....	136
REFERÊNCIAS.....	139
APÊNDICE.....	147

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E INTRODUÇÃO AO PROBLEMA

1.1 A Malária

A malária tropical representa uma ameaça crescente à saúde humana, afetando anualmente de 200 a 500 milhões de pessoas ao redor do mundo e causando a morte de aproximadamente um milhão de indivíduos, na grande maioria crianças (FIOCRUZ – www.fiocruz.br; BREMAN, 2001; BRAGA e FONTES, 2002; GREENWOOD e MUTABINGWA, 2002; SACHS e MALANEY, 2002). Esta doença aparece em mais de 100 países, apesar de estar confinada principalmente em áreas tropicais pobres da África, Ásia e América Latina; cerca de 40% da população mundial convivem sob o risco de contágio. Na América Latina, o maior número de casos é verificado na Amazônia brasileira, com registro de cerca de 500 mil casos/ano (BRAGA e FONTES, 2002). A Figura 1 apresenta a distribuição desta moléstia no mundo nas últimas décadas (SACHS e MALANEY, 2002); apesar de muito antiga, a malária continua sendo um dos principais problemas de saúde pública no mundo (BRAGA e FONTES, 2002). Esta é, de longe, a doença tropical e parasitária que mais causa problemas sociais e econômicos no mundo, sendo superada em número de mortes apenas pela AIDS (FIOCRUZ – www.fiocruz.br; WHO – www.who.int/en).

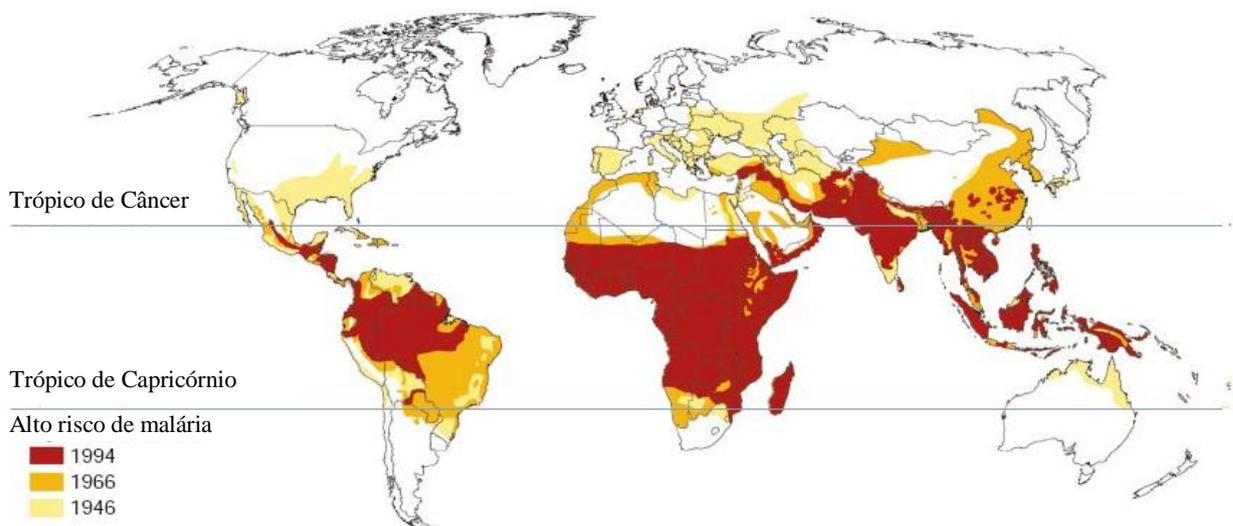


Figura 1 – Distribuição global da malária nas últimas décadas. Adaptado de Sachs e Malaney (2002).

Os parasitas causadores da malária pertencem ao filo Apicomplexa, família Plasmodiidae e gênero *Plasmodium* (BRAGA e FONTES, 2002). A infecção malárica inicia-se quando esporozoítos infectantes dos parasitas são inoculados no tecido subcutâneo ou, menos frequentemente, diretamente na corrente sanguínea do homem por meio da picada de seu inseto vetor, os mosquitos do gênero *Anopheles*. Estas formas saem da circulação sanguínea do indivíduo infectado dentro de 30 a 60 minutos e alcançam os hepatócitos, onde evoluem. Evidências mostram que os esporozoítos atravessam diversos hepatócitos antes de continuarem seu desenvolvimento normal (MILLER et al., 2002). Uma vez invadido o hepatócito, os esporozoítos se diferenciam em trofozoítos pré-eritrocíticos, os quais se multiplicam por reprodução assexuada (esquizogonia) e originam os esquizontes teciduais e, posteriormente, se desenvolvem em milhares de merozoítos, os quais invadirão os eritrócitos ao saírem do fígado. Esta primeira fase do ciclo é denominada exo-eritrocítica, pré-eritrocítica ou tissular e, portanto, precede o ciclo sanguíneo do parasita. A malária só se inicia uma vez que os parasitas assexuados se multipliquem nos eritrócitos humanos (BRAGA e FONTES, 2002; MILLER et al., 2002). Um esquema do ciclo de vida do parasita *Plasmodium falciparum* causador da malária aparece na Figura 2.

O chamado ciclo eritrocítico inicia-se quando os merozoítos tissulares invadem os glóbulos vermelhos do indivíduo infectado. Inicialmente, o desenvolvimento intra-eritrocítico do parasita se dá por reprodução assexuada, com conseqüente formação de novos merozoítos que invadirão outros eritrócitos. O parasita *P. falciparum* se desenvolve em 48 horas produzindo cerca de 20 novos merozoítos por parasita maduro, capazes de invadir novos eritrócitos. Depois de algumas gerações de merozoítos sanguíneos, uma pequena proporção destes parasitas assexuados se diferencia em gametócitos, que são estágios sexuados de desenvolvimento e que não mais se dividem. Estes gametócitos são importantes na transmissão da doença, uma vez que seguem seu desenvolvimento somente no mosquito vetor, dando origem novamente aos esporozoítos (Fig. 2). O ciclo sanguíneo se repete sucessivas vezes, a cada 48 horas, nas infecções pelo *P. falciparum*, o principal causador da malária no homem (BRAGA e FONTES, 2002; MILLER et al., 2002).

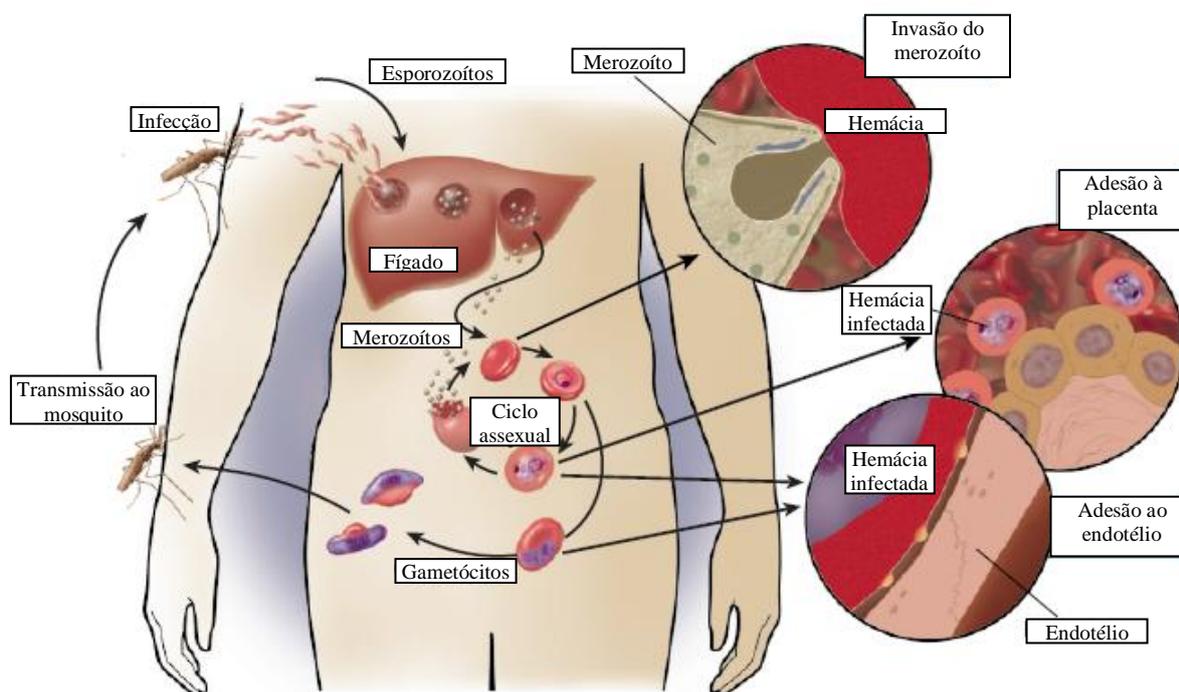


Figura 2 – Ciclo de vida do parasita *P. falciparum*. Adaptado de Miller et al. (2002).

Os trofozoítos e esquizontes sanguíneos se nutrem da hemoglobina do indivíduo parasitado. A digestão desta molécula ocorre dentro de um vacúolo digestivo, formando-se o pigmento malárico ou hemozoína, que consiste em monômeros ou dímeros de ferriprotoporfirina IX (grupo heme), metemoglobina e proteínas plasmodiais. Após o término da reprodução assexuada e consequente rompimento da membrana celular dos eritrócitos parasitados, esta hemozoína que se acumulou no citoplasma do eritrócito é então liberada no plasma e, posteriormente, fagocitada pelas células de Kupffer no fígado ou pelos macrófagos do baço e outros órgãos (BRAGA e FONTES, 2002).

Enquanto se alimenta do sangue do indivíduo infectado, a fêmea do mosquito anofelino ingere as formas sanguíneas do parasita (Fig. 2). Entretanto, somente os gametócitos serão capazes de evoluir no interior do inseto, dando origem ao ciclo sexuado ou esporogônico. Os esporozoítos, que são liberados após a ruptura da parede do oocisto, se disseminam por todo o corpo do inseto, por meio da hemolinfa, até atingirem as células das glândulas salivares, onde podem, então, atingir o canal central destas e, assim, ingressarem no ducto salivar para serem injetados no hospedeiro vertebrado, juntamente com a saliva, durante o repasto sanguíneo infectante (BRAGA e FONTES, 2002; MILLER et al., 2002).

Assim, a transmissão natural e mais comum da malária ao homem se dá quando fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles*, parasitadas com esporozoítos em suas

glândulas salivares, inoculam estas formas infectantes durante a picada (BRAGA e FONTES, 2002; WHO – www.who.int/en). Apesar de menos comum, a infecção malárica pode ser transmitida de outras maneiras, acidentalmente, como resultado de transfusão sanguínea, compartilhamento de seringas contaminadas e acidentes em laboratório. A infecção congênita tem sido raramente descrita (BRAGA e FONTES, 2002).

Apenas o ciclo eritrocítico assexuado é responsável pelas manifestações clínicas e patológicas da malária. A destruição dos eritrócitos e consequente liberação dos parasitas e de seus metabólitos na circulação provocam uma resposta do hospedeiro, determinando alterações morfológicas e funcionais observadas no indivíduo com malária. Embora a malária seja uma doença complexa e que provavelmente os mecanismos determinantes das diferentes formas clínicas da doença não possam ser representados por um único esquema, os conhecimentos atuais de como os muitos processos patogênicos se combinam para provocar a doença nos levam às interações entre os seguintes fenômenos: rápida expansão da massa de eritrócitos infectados, destruição tanto de hemácias parasitadas quanto não-parasitadas, toxicidade resultante da liberação de citocinas no processo inflamatório e sequestro dos eritrócitos parasitados na rede capilar com consequente obstrução microvascular (no caso específico do *P. falciparum*), fenômenos estes que se combinam e levam a uma redução da irrigação sanguínea e da oxigenação dos tecidos (BRAGA e FONTES, 2002; MILLER et al., 2002). Uma das características principais da biologia do *P. falciparum* é sua capacidade de causar a aderência dos eritrócitos infectados ao revestimento interno de pequenos vasos sanguíneos (Fig. 2), o que leva à considerável obstrução da irrigação de tecidos. A destruição de eritrócitos é também inevitável na malária e, desta maneira, a anemia causada compromete o transporte de oxigênio. Estes processos gerais, que afetam muitos tecidos, podem também se concentrarem em órgãos específicos em algumas situações, como, por exemplo, na placenta durante a gravidez, uma vez que as hemácias infectadas podem se aderir à placenta (MILLER et al., 2002) (Fig. 2).

Uma fase sintomática inicial caracterizada por mal-estar, dores de cabeça, cansaço e dores musculares geralmente precede a clássica febre malárica. Esta febre coincide com a ruptura das hemácias ao final da reprodução assexuada dos parasitas e é geralmente acompanhada de calafrio e sudorese; a temperatura corpórea pode atingir 41°C ou mais. Após um período de duas a seis horas, a febre começa a diminuir e o indivíduo passa a apresentar sudorese profunda e fraqueza intensa. Passadas algumas horas, os sintomas desaparecem e o paciente sente-se melhor (BRAGA e FONTES, 2002).

O tratamento adequado da doença é hoje a necessidade fundamental para o controle efetivo da malária. Sabe-se que o principal causador das infecções mais severas e mortes por malária é o parasita *P. falciparum* e que o problema é agravado pelo surgimento de resistência aos fármacos antimaláricos atualmente disponíveis (como a cloroquina, um composto barato e amplamente utilizado, e a sulfadoxina/pirimetamina) e pelo aumento de sua distribuição geográfica, como consequência das mutações exibidas pelo protozoário (MÜLLER et al., 1995; SAVVIDES e KARPLUS, 1996; BRAGA e FONTES, 2002; MILLER et al., 2002; YUVANIYAMA et al., 2003; KRAUTH-SIEGEL, SCHIRMER e BAUER, 2005). Isto enfatiza a necessidade do desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos, com novos mecanismos de ação (SARMA et al., 2003). Para isso, uma das abordagens possível é identificar uma enzima que desempenhe um papel vital no desenvolvimento do *P. falciparum* e apresente propriedades significativamente diferentes das enzimas que desempenhem papel semelhante no hospedeiro humano, de modo que tais diferenças possam ser exploradas no *design* de inibidores específicos à proteína do parasita, a fim de se desenvolver agentes terapêuticos seletivos contra a doença (SESSIONS et al., 1997).

1.2 Mudança de Paradigma – Bioinformática Estrutural

Nos últimos anos, a pesquisa de novos fármacos vem sofrendo uma mudança radical. Inicialmente, a busca por novos compostos e alvos era desenvolvida através da disponibilidade de obtenção experimental de dados biológicos, sendo um processo interdisciplinar, caro e demorado. Nesta nova era de descobrimento de fármacos, o impasse não é mais a geração de dados, mas a sua interpretação. Os avanços científicos alteraram o modo como as pesquisas farmacêuticas produzem novas moléculas bioativas: atualmente, ferramentas computacionais possibilitam métodos *in silico*, como *screening* virtual, modelagem por homologia e *docking* molecular, aplicados tanto para facilitar as várias etapas da pesquisa, aumentando a velocidade na identificação e otimização de compostos líderes, como para criar modelos para explicar dados experimentais; o *docking* molecular é uma metodologia computacional que tem sido utilizada com sucesso para ambas as finalidades (MOUSTAKAS et al., 2006; RESTER, 2006). O sucesso destes métodos *in silico* dependem do entendimento a fundo do sistema estudado e do uso correto das ferramentas

computacionais (RESTER, 2006). Assim, a modelagem molecular através da bioinformática, que utiliza dados das mais diversas áreas da ciência e as mais modernas e úteis ferramentas computacionais, é também uma arte e, quando utilizada por especialistas, tem alcançado sucesso em detectar compostos que possam atuar como fármacos.

O reconhecimento molecular é uma questão fundamental na biologia estrutural. A interação entre moléculas é um pré-requisito para quase todos os eventos biológicos, sendo o fator responsável pela ligação seletiva de um composto de baixo peso molecular a uma biomolécula específica. Sendo assim, para termos um acesso mais rápido a agentes terapêuticos devemos não só entender, mas, também, sermos capazes de prever os detalhes estruturais de eventos de reconhecimento molecular (GSCHWEND, GOOD e KUNTZ, 1996).

Com o advento da cristalografia de Raio X de alta resolução e NMR (ressonância magnética nuclear), físicos, químicos e biólogos estruturais puderam estudar estas interações moleculares em detalhes atômicos. Estas novas informações, combinadas com ferramentas computacionais e de visualização molecular, ajudaram a criar o campo do planejamento racional de fármacos (EWING e KUNTZ, 1997). A simulação computacional, utilizada no estudo do reconhecimento molecular, é um importante componente do planejamento racional de fármacos (EWING et al., 2001). Neste tipo de planejamento, utiliza-se a informação contida na estrutura tridimensional de uma macromolécula-alvo e dos complexos ligante-macromolécula na tentativa de se otimizar a ligação de uma molécula ou série de moléculas, a fim de se desenvolverem novos fármacos contra importantes doenças. Os métodos computacionais são necessários para extrair todas as informações relevantes de estruturas tridimensionais disponíveis e utilizá-las de maneira inteligente e eficiente no *design* de potenciais ligantes para alvos determinados (McCARTHY, 1999; MOUSTAKAS et al., 2006).

1.2.1 O *Docking* Molecular

Uma importante etapa no planejamento racional de fármacos é o processo de *docking* molecular, o qual utiliza o conhecimento da estrutura tridimensional de um receptor complexado com um composto líder para entender o mecanismo (ou modo) de interação entre eles. Estes conhecimentos serão então utilizados para propor novos ligantes de

forma a otimizar a interação com o sítio estudado da macromolécula alvo (KONTOYIANNI, McCLELLAN e SOKOL, 2004). Isto porque o *docking* permite prever a(s) orientação(ões) e/ou conformação (ões) de um ligante ou família de ligantes no alvo (EWING e KUNTZ, 1997; EWING et al., 2001; MOUSTAKAS et al., 2006). Assim será possível planejar um composto que interaja de forma mais eficaz, reduzindo a dosagem e então provavelmente com menos efeitos colaterais; em suma, um fármaco melhor (EWING et al., 2001).

Por estes motivos, o método de *docking* tem sido largamente utilizado na indústria de desenvolvimento racional de novos fármacos. *Docking* é um termo utilizado para métodos computacionais que tentam encontrar o melhor “encaixe” entre duas moléculas (um receptor e um ligante): dadas as coordenadas atômicas de duas moléculas, tenta-se prever a associação entre elas (Fig. 3). Um dos principais objetivos deste método é prever a orientação e a conformação do ligante no sítio escolhido na macromolécula alvo (uma enzima, proteína ou DNA, por exemplo), apontando resíduos de aminoácidos cruciais para a interação entre ambas (KUNTZ et al., 1982). Resumidamente, *docking* é a identificação do modo de ligação de uma pequena molécula, ou ligante, em um sítio de ligação de uma macromolécula, ou receptor, cuja estrutura é conhecida ou foi modelada (EWING et al., 2001). A utilidade deste método, e em particular aquele que será utilizado nesta dissertação, pode ser apreciada pelo fato de permitir reconstruir complexos experimentais (JONES, WILLETT e GLEN, 1995; JONES et al., 1997).

1.2.1.1 Algoritmos Genéticos Aplicados ao *Docking* Molecular

Os diversos programas computacionais de *docking* molecular atualmente disponíveis utilizam em seus cálculos diferentes algoritmos, os quais podem ser diferenciados entre si pelo mecanismo de busca utilizado para se determinar as posições dos ligantes no interior dos sítios de ligação e pela função score utilizada para se prever o melhor modo de ligação destas moléculas. Um destes algoritmos é o algoritmo genético (AG), que tem sido aplicado no *docking* de ligantes flexíveis em sítios de ligação de proteínas (JONES e WILLETT, 1995; WILLETT, 1995).

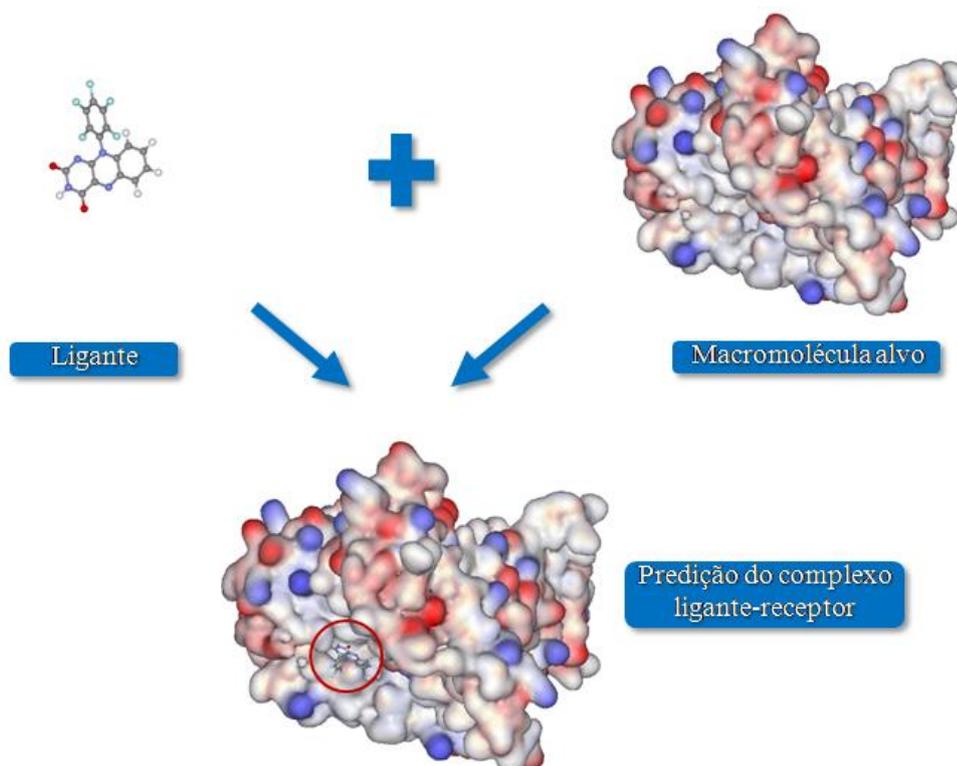


Figura 3 – Esquema mostrando o resultado do *docking* de um ligante com uma macromolécula. O ligante é um inibidor da família das ariloxazinas e está representada a superfície do monômero A da macromolécula glutationa redutase humana, que é o alvo.

AGs são uma classe de algoritmos que mimetizam algumas das características principais da evolução Darwiniana, utilizando ideias baseadas na linguagem da genética natural e evolução biológica. É um procedimento de busca não-determinístico que procura fornecer rapidamente boas, mas não necessariamente ótimas, soluções para problemas de otimização combinatorial que demandam recursos computacionais pesados demais para serem investigados utilizando algoritmos convencionais. Existe atualmente um grande interesse no uso de AGs para aplicações no reconhecimento molecular e *design* de novas moléculas, visto que estes são, por natureza, problemas inerentemente combinatoriais (JONES e WILLETT, 1995; JONES, WILLETT e GLEN, 1995; WILLETT, 1995; MORRIS et al., 1998).

Em AGs, um “cromossomo” é o nome dado a uma estrutura de dados computacionais que representa uma possível solução ao problema sob investigação (no caso do *docking*, uma possível orientação e conformação do ligante no sítio de ligação da proteína) e o AG manipula uma população (grupo de soluções) contendo, tipicamente, algumas dezenas de tais cromossomos. Na execução de um AG, uma população inicial é normalmente gerada designando valores aleatórios para cada um dos elementos de cada cromossomo. Cada um dos

cromossomos resultantes é, então, checado para verificar sua “aptidão” (*fitness*), que é uma medida de o quão “boa” é a solução que determinado cromossomo representa. Assim, cada cromossomo pode ser associado a um valor de aptidão, calculado a partir de uma “função *fitness*”, baseado no mérito relativo daquela solução. Estes valores de aptidão são também utilizados na seleção de indivíduos para atuarem como cromossomos “parentais” na criação de gerações subsequentes.

O cromossomo mais “apto” é manipulado, por meio de operadores genéticos, para formar novos cromossomos (criação de populações subsequentes) que são, então, novamente avaliados. Alguns dos principais operadores genéticos são: “cruzamento” (ou “*crossover*”), o qual combina partes dos cromossomos mais aptos da geração anterior para produzir novos cromossomos, e “mutação”, a qual introduz novas informações aleatoriamente (introduz perturbações aleatórias) em um cromossomo (Fig. 4). O operador cruzamento necessita, portanto, de dois cromossomos parentais (“cruzados” aleatoriamente) e produz dois cromossomos filhos (que herdam os “genes” dos pais), enquanto que a mutação necessita apenas de um cromossomo pai e produz um filho (JONES, WILLETT e GLEN, 1995; WILLETT, 1995; MORRIS et al., 1998).

Além disso, melhor do que manipular uma grande população de cromossomos, pode-se utilizar um ambiente distribuído conhecido como modelo de ilhas. Este envolve muitas subpopulações e a migração de cromossomos individuais entre estas. Foi observado que este modelo de ilhas melhora a eficiência do AG. Aparece aqui, então, mais um operador genético: migração. Este operador migração copia um indivíduo de uma ilha para uma ilha vizinha (JONES et al., 1997).

O AG aplica repetidamente os operadores genéticos, resultando em cromossomos que substituem os membros menos aptos da população até que uma condição de término seja alcançada. Esta condição de término pode ser, por exemplo, a criação de algum número máximo de populações (JONES, WILLETT e GLEN, 1995; WILLETT, 1995; MORRIS et al., 1998).

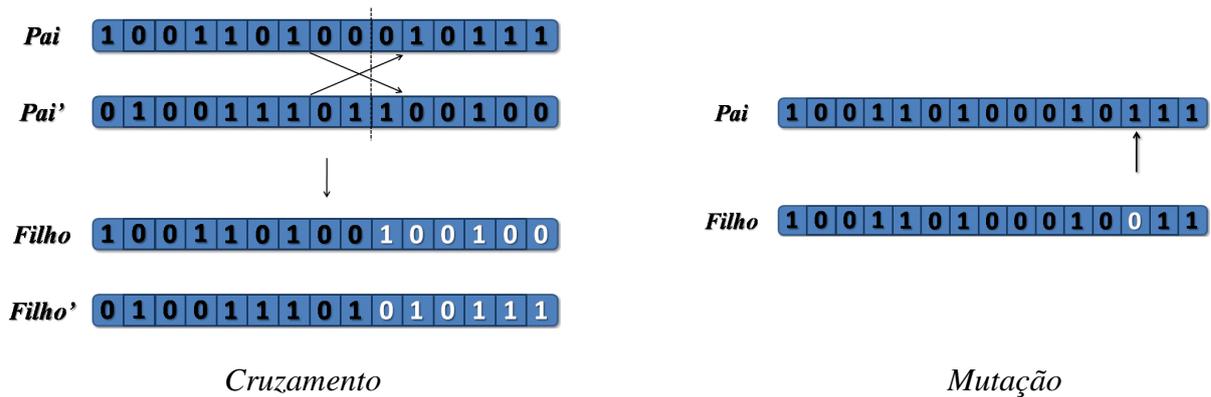


Figura 4 – Esquema de ação dos operadores genéticos cruzamento e mutação. O operador cruzamento combina partes de dois cromossomos parentais, produzindo dois cromossomos filhos, enquanto que o mutação introduz uma nova informação no cromossomo parental, gerando um novo cromossomo filho.

Os cromossomos parentais são selecionados para o processamento por um operador genético por meio de um método que dá mais chance de reprodução a membros da atual população que apresentem os valores de aptidão maiores, isto é, a membros que representem uma melhor solução para o problema sob investigação. O modo mais comum de seleção é através do Método da Roleta, no qual a probabilidade de um cromossomo em particular ser escolhido para atuar como “pai” é diretamente proporcional à sua aptidão; este processo é análogo ao giro de uma roleta, onde cada membro da população representa uma fatia da roleta que é proporcional à sua aptidão (*fitness*), o que introduz uma pressão evolutiva no algoritmo (Fig. 5). Esta ênfase na sobrevivência do mais apto assegura que, ao longo do tempo, a população deve se mover em direção a uma solução ótima, isto é, ao melhor modo de ligação, desde que a função *fitness* seja eficiente em predizer afinidades de ligação. Este mesmo Método da Roleta é utilizado para escolher qual operador genético deve ser aplicado durante a execução do algoritmo; aqui, a probabilidade de um operador em particular ser selecionado é diretamente proporcional ao seu peso, definido pelo usuário, o qual reflete o grau de importância relativa que o usuário associa a cada um dos operadores disponíveis para uma aplicação específica (JONES, WILLETT e GLEN, 1995; WILLETT, 1995; MORRIS et al., 1998).

A formação de nichos também é uma técnica comumente utilizada em AGs, e cujo objetivo é preservar a diversidade da população. Quando se adiciona um novo indivíduo na população, a técnica de nicho envolve comparar este indivíduo com todos os membros da população para determinar se algum membro habita o mesmo “nicho” que o novo indivíduo. No *docking*, isto corresponde a examinar as soluções e verificar se existem

soluções semelhantes: se o RMSD (*root-mean-square deviation*) entre as coordenadas tridimensionais de seus átomos forem menores do que um determinado valor – definido pelo usuário –, pode-se dizer que os indivíduos (soluções) compartilham o mesmo nicho. Assim, o novo indivíduo substitui o membro menos apto do nicho, e não o membro menos apto da população total, preservando, desta maneira, a diversidade na população (JONES et al., 1997).

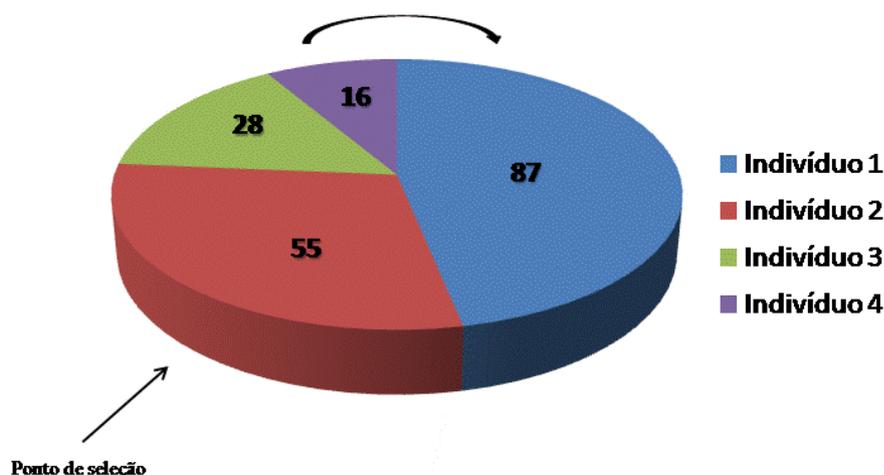


Figura 5 – Método da Roleta. Este método é análogo ao giro de uma roleta. Observe que cada “fatia” é proporcional à aptidão do indivíduo. Portanto, ao “girar” a roleta, quanto maior a aptidão do indivíduo, maior a probabilidade de este parar no “ponto de seleção”. Neste exemplo, o *indivíduo 1*, com um *fitness* de 87, é o que tem maior probabilidade de ser selecionado.

Deste modo, pode-se resumir a operação de um AG da seguinte maneira (um esquema aparece na Figura 6):

- 1 – um grupo de operadores genéticos (cruzamento, mutação, migração, etc) é escolhido. Para cada operador é assinalado um peso;
- 2 – uma população inicial é criada aleatoriamente e a aptidão de seus membros é determinada;
- 3 – um operador genético é escolhido utilizando o Método da Roleta, baseado nos pesos dados aos operadores;
- 4 – os cromossomos parentais solicitados pelos operadores são escolhidos através do Método da Roleta, baseado em suas aptidões (seleção proporcional à aptidão dos indivíduos);
- 5 – o operador é aplicado, cromossomos filhos são produzidos e suas aptidões são avaliadas;
- 6 – se ainda não estiverem presentes na população, os cromossomos filhos substituem os membros menos aptos da população (ou de seus nichos);

7 – se uma solução aceitável foi encontrada, o algoritmo para; se não, volta para o passo 3 (WILLETT, 1995; JONES et al., 1997).

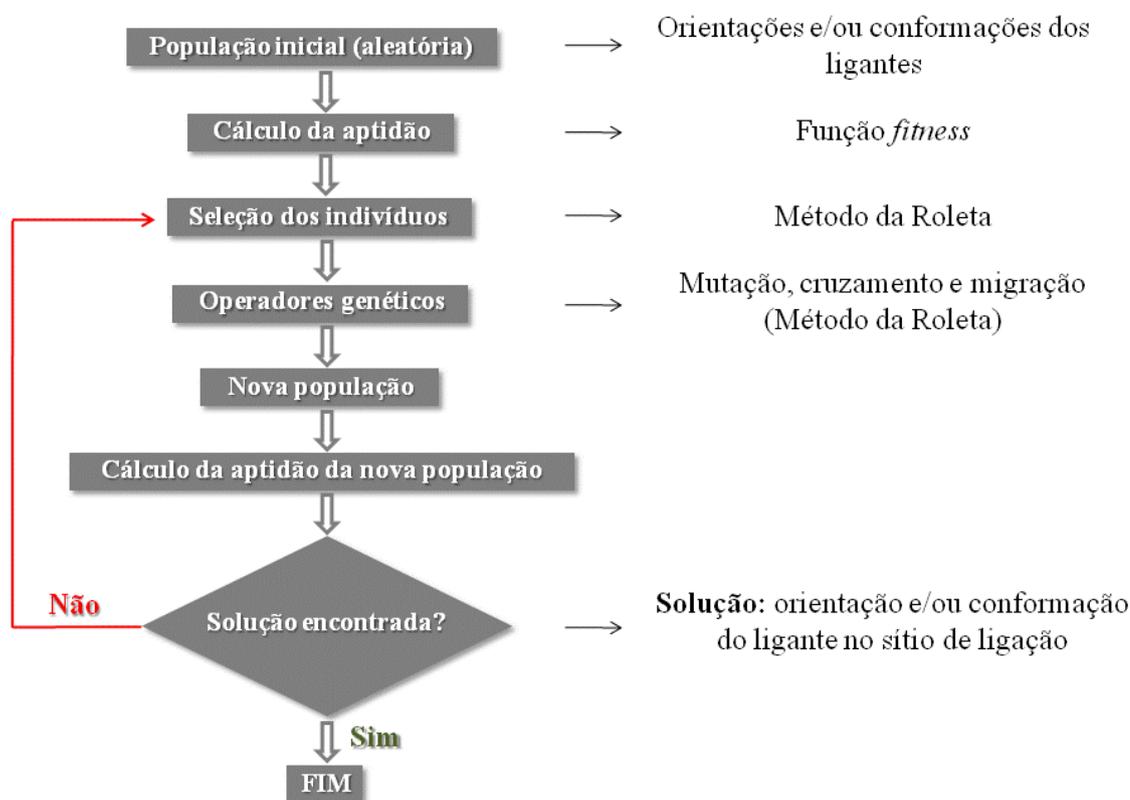


Figura 6 – Esquema da operação de um algoritmo genético em um cálculo de *docking*. Adaptado de Miranda, 2000.

Na operação de um AG, assim como na natureza, a única informação disponível durante a execução do programa é aquela contida na atual população de cromossomos. As repetidas aplicações de operadores genéticos aos cromossomos mais aptos resultam em um aumento na aptidão (*fitness*) média da população ao longo do tempo e, desta maneira, na identificação de soluções cada vez melhores ao problema sob investigação; portanto, soluções mais adaptadas ao seu meio “reproduzem”, enquanto as menos adaptadas tendem a desaparecer. Em um caso ideal, a aptidão dos cromossomos converge a um valor constante que corresponde à solução ótima do problema; entretanto, não é possível garantir que isto vá acontecer, de modo que tal valor convergido geralmente corresponde a uma boa, mas não ótima, solução. Os AGs têm mostrado serem capazes de descrever comportamentos extremamente complexos em um grande espectro de aplicações, incluindo reconhecimento

molecular e *design* de novos compostos (JONES, WILLETT e GLEN, 1995; WILLETT, 1995; MORRIS et al, 1998).

1.2.1.2 GOLD – *Genetic Optimisation for Ligand Docking*

Os estudos de estruturas cristalográficas por difração de raio X de proteínas complexadas com ligantes de alta afinidade revelaram que estes parecem adequar-se à forma da cavidade do receptor, de forma a maximizar a contribuição hidrofóbica à ligação, além de interagirem em diversos sítios onde é possível formar ligações de hidrogênio. Desta maneira, o principal requerimento para uma ligação de alta afinidade parece ser a complementaridade da forma tridimensional do ligante e da proteína, além da habilidade do ligante em formar ligações de hidrogênio em pontos-chave quando associado ao sítio de ligação. Para entender como e por que os inibidores se ligam a uma enzima, por exemplo, este conceito de forma complementar entre as superfícies das moléculas é tratado como uma ferramenta de grande utilidade. As contribuições mais significativas desta complementaridade de forma são provavelmente as interações dispersivas entre os átomos da proteína e do ligante, juntamente com uma contribuição entrópica que surge a partir do deslocamento de águas ordenadas do sítio receptor para o solvente. Assim, uma simulação suficientemente precisa de muitas destas interações pode ser o suficiente para explicar e prever o modo de ligação da maioria dos ligantes de alta afinidade (JONES, WILLETT e GLEN, 1995; JONES et al., 1997).

Por conta disto, o AG utiliza uma nova representação do processo de *docking*. O algoritmo genético presente no programa GOLD (*Genetic Optimisation for Ligand Docking*), por exemplo, leva em conta o mapeamento entre átomos doadores para ligações de hidrogênio e pares de elétrons isolados no ligante e na proteína, além dos ângulos torcionais das moléculas (considera a variabilidade conformacional do ligante e da proteína); em cada cromossomo está codificada uma conformação interna das moléculas e inclui um “mapa” dos aceptores e doadores de ligações de hidrogênio no ligante e na proteína. O programa GOLD adota um AG que utiliza uma estratégia evolucionária na exploração da flexibilidade conformacional total do ligante, com uma flexibilidade parcial da proteína na região do sítio de ligação (JONES e WILLETT, 1995; JONES, WILLETT e GLEN, 1995; JONES et al., 1997).

Na execução de um cálculo de *docking* no programa GOLD, primeiramente uma população de potenciais soluções (possíveis orientações e conformações do ligante no sítio estudado) é criada aleatoriamente. Cada membro da população está codificado como um cromossomo, o qual contém informações conformacionais e os ângulos de torção que podem ser modificados (do ligante e de algumas cadeias laterais de aminoácidos do sítio receptor), além do mapeamento de pares de elétrons isolados (de potenciais átomos aceptores de ligação de hidrogênio) e hidrogênios (de potenciais átomos doadores para ligações de hidrogênio) no ligante e na proteína – complementaridade entre doadores e aceptores de ligação de hidrogênio. O cromossomo contém, ainda, informações sobre mapeamento dos pontos hidrofóbicos do ligante com pontos hidrofóbicos da proteína.

Para posicionar o ligante no interior do sítio de ligação, na decodificação do cromossomo o AG utiliza uma rotina de mínimos quadrados, em uma tentativa de se formar tantas ligações de hidrogênio quanto forem possíveis (sugeridas no mapeamento dos aceptores e doadores de ligação de hidrogênio presente nos cromossomos), definindo, desta maneira, uma orientação do ligante no sítio estudado. Assim, as conformações do ligante e do sítio ativo resultantes da rotação torcional são examinadas para se determinar a extensão do encaixe entre átomos de hidrogênio e pares isolados e, portanto, a possibilidade de uma ligação de hidrogênio ser formada entre cada possível par doador-aceptor (JONES, WILLETT e GLEN, 1995; WILLETT, 1995; JONES et al., 1997).

No *docking* molecular que utiliza AG, a aptidão é representada pela energia de interação total do ligante com a proteína e é avaliada utilizando-se uma função de energia (MORRIS et al., 1998). Para cada cromossomo é assinalado um escore *fitness* baseado na predição de sua afinidade de ligação e esta função escore é utilizada para ordenar (“ranquear”) os modos de ligação gerados nos cálculos de *docking* (JONES et al., 1997). A função escore do programa GOLD é uma combinação da energia de van der Waals para a interação ligante-proteína (capaz de descrever uma contribuição significativa da energia hidrofóbica da ligação), a energia interna da conformação do ligante (descrita através de mecânica molecular) e a energia de ligação de hidrogênio para o complexo (JONES e WILLETT, 1995; JONES, WILLETT e GLEN, 1995; JONES et al., 1997).

A função *fitness*, portanto, é avaliada em seis estágios: (1) uma conformação do ligante e do sítio receptor da proteína é gerada; (2) o ligante é posicionado no interior deste sítio utilizando um procedimento de mínimos quadrados; (3) a energia de ligação de hidrogênio é obtida para o complexo; (4) a energia de van der Waals é obtida para a interação ligante-proteína; (5) expressões de mecânica molecular são utilizadas para gerar uma medida

da energia interna do ligante; (6) a soma destes termos de energia (com seus respectivos pesos) é realizada para dar um escore *fitness* final. Os diferentes pesos dos componentes de energia da função escore do programa GOLD foram determinados através de ajustes empíricos para melhor reproduzir estruturas conhecidas de ligantes complexados a macromoléculas (JONES, WILLETT e GLEN, 1995; JONES et al., 1997).

Após a formação aleatória de uma população inicial e o cálculo da aptidão de seus indivíduos, a população de cromossomos é, então, otimizada iterativamente. A cada passo são aplicados os operadores genéticos descritos acima: mutação pontual do cromossomo, cruzamento de dois cromossomos e migração de um membro da população de uma ilha para outra. A seleção dos cromossomos parentais é sempre tendenciosa no sentido dos membros mais aptos da população (soluções com melhores escores *fitness*), utilizando-se o Método da Roleta para esta seleção. Cada um dos operadores genéticos retira informações dos cromossomos parentais e reúne estas informações nos cromossomos filhos. Os cromossomos filhos então substituem os membros menos aptos de seu nicho (ou, se for o caso, da população total). Os pesos dados a estes operadores governam as frequências relativas dos três tipos de operações que podem ocorrer durante a otimização geométrica (mutação, cruzamento e migração). Assim, cada vez que o algoritmo genético seleciona um operador, ele o faz de modo aleatório, mas tendencioso, novamente utilizando o Método da Roleta.

No GOLD as entradas para o AG são a localização e o tamanho do sítio receptor, indicados pelo usuário, além do ligante que será complexado neste sítio. As saídas, por sua vez, são as conformações do ligante e da proteína associadas ao cromossomo mais apto na população final quando as condições de término do algoritmo são satisfeitas (embora outros cromossomos, com escores *fitness* piores, possam ter melhores encaixes ao receptor). Este programa tem se mostrado eficiente na predição dos modos de ligação de um grande número de ligantes flexíveis (JONES, WILLETT e GLEN, 1995; WILLETT, 1995; JONES et al., 1997).

Após a análise dos resultados dos cálculos de *docking* em tela gráfica, o complexo receptor-ligante (ou os possíveis complexos) pode(m) então ser selecionado(s), obtendo-se um possível posicionamento para os ligantes no sítio de ligação dos receptores alvo (KUNTZ et al., 1982; SHOICHET e KUNTZ, 1991; SHOICHET, BODIAN e KUNTZ, 1992).

1.3 A Escolha das Macromoléculas Alvo

A identificação de novos alvos para o desenvolvimento de fármacos antimaláricos mais eficientes foi um dos objetivos principais do projeto genoma dos parasitas do gênero *Plasmodium*. Entretanto, decidir quais produtos dos genes são alvos ideais para o desenvolvimento de quimioterápicos continua ainda uma questão difícil (YEH et al., 2004).

Nesta questão, uma das possíveis abordagens é identificar uma enzima que desempenhe um papel vital no desenvolvimento do parasita causador da malária, o *P. falciparum*, e, ao mesmo tempo, apresente propriedades significativamente diferentes das enzimas que desempenhem papel semelhante no hospedeiro humano. Desta forma, estas diferenças podem ser exploradas no *design* de inibidores que sejam específicos à proteína do parasita, sem causar grandes distúrbios no metabolismo normal do hospedeiro, a fim de se desenvolver agentes terapêuticos seletivos contra a doença (SESSIONS et al., 1997).

1.3.1 A Glutaciona Redutase

A vida aeróbica requer a manutenção de um meio redox intracelular adequado, que minimize a geração de espécies reativas do metabolismo do oxigênio (“ERMOS”), como os ânions superóxidos (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila (OH), as quais afetam ácidos nucleicos, proteínas, lipídios e membranas, prejudicando, desta maneira, funções metabólicas essenciais. As ERMOS, ou radicais livres, referem-se, de maneira simples, a átomos ou moléculas altamente reativos que contêm número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica; é este não-emparelhamento de elétrons da última camada que confere alta reatividade a estes átomos ou moléculas (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; ROVER JÚNIOR et al., 2001).

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das ERMOS. Sendo assim, em sistemas aeróbicos é essencial o equilíbrio entre agentes óxido-redutores (como os radicais livres) e o sistema de defesa antioxidante (FERREIRA e MATSUBARA, 1997): em condições normais, a concentração destes agentes óxido-redutores dentro das células é extremamente baixa pelo fato de existirem moléculas antioxidantes que as removem ou impedem sua formação (ROVER JÚNIOR et al., 2001). A célula, então, possui um sistema de

defesa antioxidante que pode atuar em duas linhas: uma é a ação detoxificadora do agente antes que ele cause lesão, levada a cabo, por exemplo, pela glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase, glutathiona peroxidase (GSH-Px) e vitamina E; a outra linha de defesa, por sua vez, tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pela enzima Glutathiona Redutase, pelo ácido ascórbico, entre outros (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

A Glutathiona Redutase (GR) é uma flavoenzima ubíqua cuja função é manter a alta concentração celular da forma reduzida do peptídeo GSH (o agente detoxificador) e a baixa concentração de sua forma oxidada (GSSG), sendo uma enzima chave no mecanismo de defesa celular contra o estresse oxidativo de diversos organismos. A GR é um dímero funcional, o que significa que resíduos de aminoácido dos dois monômeros participam do sítio ativo da enzima (PAI e SCHULZ, 1983; SCHÖNLEBEN-JANAS et al., 1996).

Uma das principais funções da GSH é a de eliminar redutivamente o H_2O_2 e os hidroperóxidos orgânicos, os quais podem danificar irreversivelmente a hemoglobina e as membranas celulares; o acúmulo descontrolado de peróxidos resulta no rompimento prematuro da célula. Estes peróxidos são eliminados por meio da reação com a GSH, catalisada pela enzima GSH-Px. Após a reação da GSH com os radicais livres esta se oxida, formando GSSG (duas moléculas de GSH unidas por uma ligação dissulfeto entre seus grupos sulfidríla – Figura 7 e Figura 8). Assim, a GSSG precisa voltar à forma reduzida GSH; isto ocorre por meio da redução da GSSG pelo NADPH, catalisada pela enzima GR (Fig. 8), uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular. Esta enzima, portanto, não age diretamente na remoção de espécies radicalares, mas é responsável pela regeneração da glutathiona à sua forma reduzida, tendo como objetivo impedir a paralisação do ciclo metabólico da GSH. Existe uma importante correlação entre os níveis de glutathiona em sua forma reduzida e os mecanismos enzimáticos de defesa (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; VOET, VOET e PRATT, 2000; ROVER JÚNIOR et al., 2001).

Pode-se descrever a atuação da enzima GR da seguinte forma (SCHÖNLEBEN-JANAS et al., 1996):



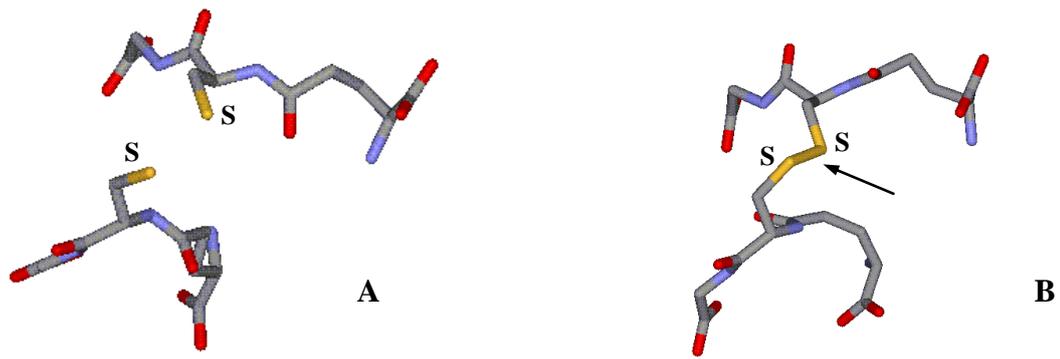


Figura 7 – Estrutura tridimensional da glutatona. Em **A**, temos a glutatona reduzida (2 GSH); em **B**, a glutatona oxidada (GSSG). Note que na GSSG ocorre uma ligação dissulfeto (seta) entre os grupos sulfidrílica dos resíduos de cisteína. Figuras feitas com o programa DS Visualizer 2.0 (DS Visualizer 2.0, 2007).

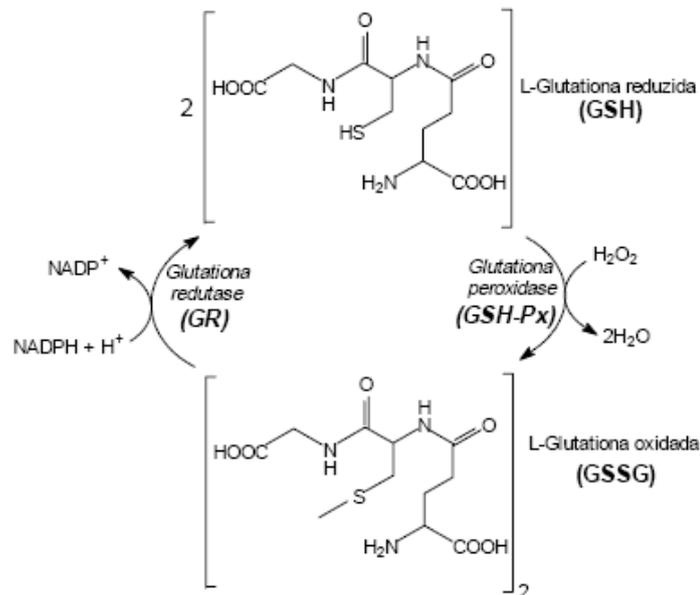


Figura 8 – Interconversão da glutatona em suas formas reduzida e oxidada. Adaptado de Rover Júnior et al. (2001).

Um pronunciado distúrbio no equilíbrio entre os agentes oxidantes presentes no meio e a capacidade antioxidante do *P. falciparum* resulta em danos irreversíveis ao parasita (MÜLLER et al., 1995). O *P. falciparum* é sensível ao estresse oxidativo e, durante seu estágio eritrocítico, fica exposto a esta condição. A partir destas informações, o estudo do aumento deste estresse se tornou uma via atrativa para o *design* de novos fármacos, com diversas evidências sugerindo que este aumento pode inibir o crescimento do parasita eficientemente (KRAUTH-SIEGEL et al., 1996; SARMA et al., 2003; MÜLLER, 2004).

Também, sabe-se que uma elevação do conteúdo de GSH, produto da enzima GR, nos parasitas leva a um aumento na resistência a alguns fármacos, como a cloroquina, enquanto que a depleção desta mesma GSH em linhagens de *P. falciparum* resistentes pode devolver a sensibilidade a este fármaco tão utilizado (OLLIARO, 2001; GINSBURG, 2002). Assim, um modo de suprimir a tolerância à cloroquina, por exemplo, seria um tratamento contendo a própria cloroquina em combinação com um composto cloroquina-sensibilizador e, na busca por possíveis sensibilizadores a este fármaco, importantes candidatos são os inibidores da enzima Glutathione Redutase do *P. falciparum* (GRPf – Figura 9), pois desestabilizam o *pool* de GSH intra-parasítica (DAVIOUD-CHARVET et al., 2001).

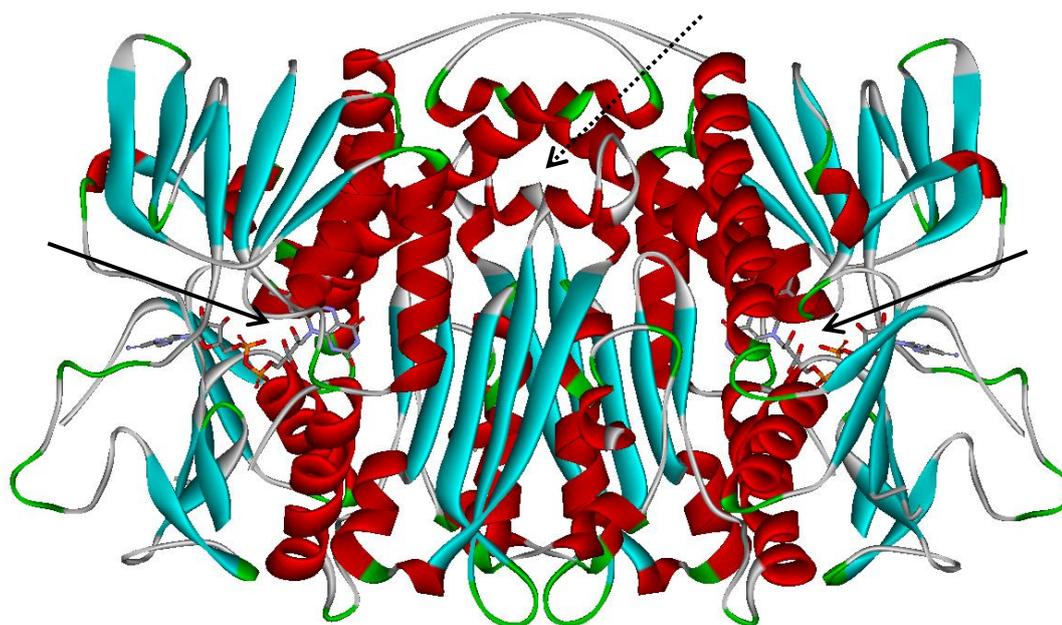


Figura 9 – Representação esquemática da estrutura tridimensional da enzima GRPf (obtida sob o código *1onf* no PDB). Em vermelho estão as hélices- α e em verde as folhas- β . Em *stick* aparece o FAD (um em cada monômero). As setas cheias apontam para a região do sítio ativo, enquanto que a seta pontilhada aponta para a região do sítio da interface. Figura feita com o programa DS Visualizer 2.0 (DS Visualizer 2.0, 2007).

Desta maneira, a enzima antioxidante GRPf do parasita malarial pode ser considerada um alvo importante para o desenvolvimento de inibidores que possam atuar como fármacos contra a malária (KRAUTH-SIEGEL et al., 1996; SARMA et al., 2003; MÜLLER, 2004) pois, além de ser essencial para a defesa antioxidante e mecanismos de reparos do

parasita (MÜLLER et al., 1995), ainda está envolvida no desenvolvimento de resistência aos fármacos antimaláricos atuais (DAVIOUD-CHARVET et al., 2001; OLLIARO, 2001; GINSBURG, 2002; SARMA et al., 2003). Além disso, a GR humana (GRh) e a *GRPf* apresentam algumas diferenças fundamentais, o que pode ser desejável para o caso de se querer inibir seletivamente a enzima do parasita, sem causar um distúrbio no metabolismo do hospedeiro (SARMA et al., 2003).

Os compostos candidatos a fármacos para atuarem na *GRPf* geralmente são também estudados na GRh, observando as similaridades e diferenças nos complexos formados, a fim de atuarem seletivamente na enzima do parasita. Foram descritos dois sítios principais de ligação de inibidores nestas enzimas (Fig. 9): o sítio ativo, que inclui os resíduos envolvidos na ligação do substrato GSSG, e o sítio da interface, que se refere a uma cavidade formada na região da junção dos dois monômeros que constituem estas GRs (SARMA et al., 2003; KRAUTH-SIEGEL, SCHIRMER e BAUER, 2005).

Na *GRPf*, o sítio da interface é particularmente um sítio de interesse para o *design* de inibidores, uma vez que somente nove, dos 21 resíduos de aminoácidos, são conservados entre a enzima humana e a do parasita. Ainda, suas formas e características químicas variam entre as duas enzimas: a parte “superior” da cavidade da enzima do parasita (próxima ao par de resíduos de aminoácidos Asn456/Asn456’) é muito menor do que a região correspondente na GRh e, além disso, esta cavidade é neutra na *GRPf* e negativamente carregada na GRh (SARMA et al., 2003). Sabe-se, também, que esta reentrância é o sítio de ligação de heteroarenos volumosos, como o ácido 6-hidroxi-3-oxo-3H-xantona-9-propiónico (**XAN**) e compostos da família das ariloxazinas (KRAUTH-SIEGEL, SCHIRMER e BAUER, 2005). Uma hipótese que explica como a ligação a este sítio interfere na atividade da enzima é a de que os inibidores, quando ligados a este sítio, deslocam as hélices 37-62 e 37’-62’, as quais fazem parte da parede desta cavidade mas também carregam consigo as cisteínas catalíticas do sítio de ligação da GSSG das duas subunidades da enzima, alterando a distribuição eletrônica no sítio ativo, já que estas hélices funcionam como um dipolo e permitem o transporte de cargas entre os sítios (SAVVIDES e KARPLUS, 1996; SCHÖNLEBEN-JANAS et al., 1996; VEGA-TEIJIDO, CARACELLI e ZUKERMAN-SCHPECTOR, 2006).

1.3.2 A Diidrofolato Redutase-Timidilato Sintase

Diferentemente do que ocorre em bactérias e eucariontes superiores, que possuem enzimas Diidrofolato Redutase (DHFR) e Timidilato Sintase (TS) separadas, nos protozoários as enzimas correspondentes aparecem juntas, como uma proteína bifuncional – a Diidrofolato Redutase-Timidilato Sintase (DHFR-TS) (IVANETICH e SANTI, 1990; YUVANIYAMA et al., 2003). O domínio diidrofolato redutase da enzima DHFR-TS do *P. falciparum* (DHFR*Pf*) é um dos poucos alvos bem definidos para o *design* de fármacos antimaláricos (RASTELLI et al., 2000). Antifolatos antimaláricos, tais como a pirimetamina e o proguanil, têm sido utilizados há muito tempo no tratamento da malária, inibindo a atividade diidrofolato redutase da enzima Diidrofolato Redutase-Timidilato Sintase do *P. falciparum* (DHFR-TS*Pf*). A eficácia dos inibidores desta enzima, entretanto, está atualmente comprometida devido às mutações ocorridas no sítio ativo da DHFR*Pf* (YUVANIYAMA et al., 2003).

A DHFR-TS*Pf* catalisa reações sequenciais no ciclo do timidilato, produzindo um importante cofator utilizado neste ciclo (FERONE, 1977; IVANETICH e SANTI, 1990). O domínio timidilato sintase catalisa a conversão de desoxiuridina monofosfato (dUMP) e 5,10-metilenotetraidrofolato (CH₂H₄folato) à desoxitimidina monofosfato (dTMP) e diidrofolato (H₂folato). O domínio diidrofolato redutase, por sua vez, catalisa a redução subsequente do diidrofolato, utilizando o NADPH como cofator, para regenerar o tetraidrofolato (H₄folato) necessário para transferência de carbonos. A enzima serino transidroximetilase (STH) regenera, então, o CH₂H₄folato necessário para continuar a síntese de dTMP (IVANETICH e SANTI, 1990) (Fig. 10). Deste modo, a interrupção do funcionamento da DHFR por inibidores desta enzima leva a baixos níveis de tetraidrofolato reduzido, um cofator necessário nas importantes reações de transferência de um carbono na biossíntese de purinas, pirimidinas e aminoácidos (GREGSON e PLOWE, 2005), interrompendo, portanto, a produção de dTMP e a síntese de DNA (FERONE, 1977; IVANETICH e SANTI, 1990; YUVANIYAMA et al., 2003).

A fim de se desenvolver novos antifolatos mais eficientes, é importante conhecer a estrutura molecular da DHFR-TS*Pf*, como ela interage com seu substrato e inibidores, bem como conhecer como as mutações afetam as interações com estes compostos. O domínio DHFR*Pf* apresenta similaridade sequencial e estrutural com enzimas DHFR de outras espécies, inclusive com a humana (DHFRh), mas com diferenças suficientes para uma

inibição preferencial, o que faz desta um importante alvo para quimioterápicos (LEMCKE, CHRISTENSEN e JORGENSEN, 1999; YUVANIYAMA et al., 2003). A reentrância hidrofóbica do sítio ativo da DHFR*Pf* apresenta em uma extremidade a Ser108 e, na outra, o grupo carboxílico do Asp54 (Fig. 11) (WARHURST, 1998). O sistema aromático heterocíclico do substrato e de muitos inibidores conhecidos se encaixa entre estes resíduos de aminoácidos (GREGSON e PLOWE, 2005).

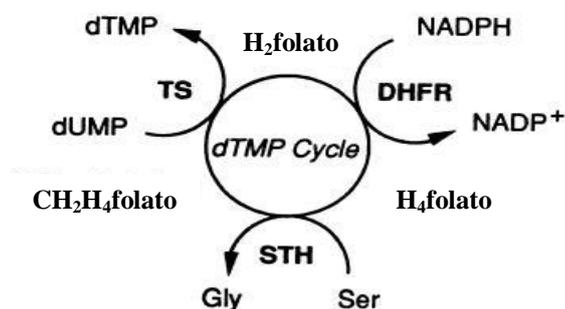


Figura 10 – Reações sequenciais do ciclo da síntese de dTMP, com as respectivas enzimas envolvidas (adaptado de IVANETICH e SANTI, 1990).

A base molecular do surgimento da resistência a antifolatos foi amplamente elucidada recentemente: sabe-se que esta resistência surge a partir de mutações pontuais que levam a mudanças nos aminoácidos de certas posições da enzima; a primeira mudança ocorre no resíduo da posição 108 (S108N) e subsequentemente em outros resíduos, como os das posições 16 (A16V), 51 (N51I), 59 (C59R) e 164 (I164L) da DHFR-TSP*Pf* (Fig. 11) (RASTELLI et al., 2000; YUVANIYAMA et al., 2003). Devido ao surgimento da resistência a antifolatos como consequência destas mutações, torna-se importante o estudo de novos compostos que possam atuar como inibidores da DHFR-TSP*Pf*.

1.3.3 A Lactato Desidrogenase

Durante seu ciclo assexuado intraeritrocítico, os parasitas malariais dependem extensivamente do metabolismo anaeróbico da glicose para a produção de ATP, pois necessitam de um alto nível de produção de energia para manter sua rápida taxa de

multiplicação, de modo que a fermentação anaeróbia da glicose constitui a maior fonte metabólica de ATP nesta fase (SHERMAN, 1979; BROWN et al., 2004; CHOI et al., 2007). Desta maneira, todas as enzimas participantes do metabolismo da glicose do *P. falciparum* representam alvos em potencial para o *design* de novos fármacos na luta contra a malária (BROWN et al., 2004).

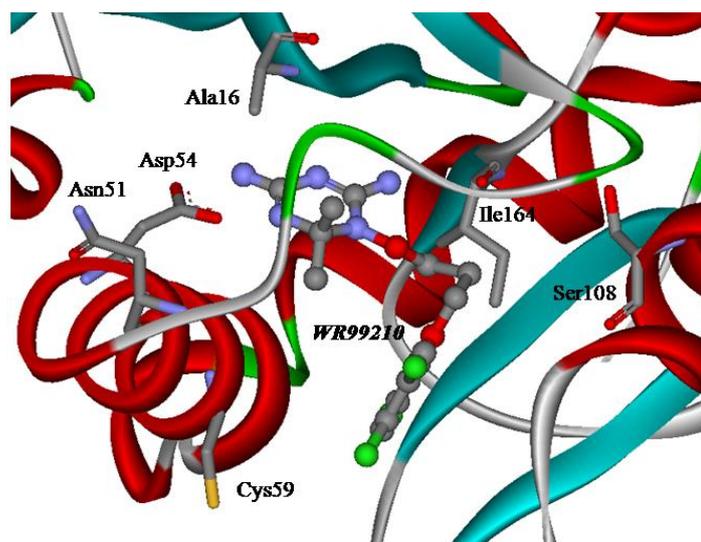


Figura 11 – Inibidor WR99210 no sítio ativo do domínio diidrofolato redutase da DHFR-TSPf. Os resíduos de aminoácido nas posições onde surgiram mutações que conferiram resistência aos antifolatos aparecem em destaque, com exceção do Asp54 que aparece na figura por ser um resíduo crucial para a catálise.

Uma destas enzimas é a L-lactato desidrogenase (LDH) do *P. falciparum* (LDHPf – Figura 12), essencial para o modo de vida anaeróbio do parasita (SESSIONS et al., 1997). A LDHPf é uma enzima chave do metabolismo da glicose do *P. falciparum*, catalisando a etapa final da glicólise durante seu estágio intraeritrocítico anaeróbio, reduzindo o piruvato à L-lactato e, simultaneamente, convertendo NADH à NAD⁺, regenerando o NAD⁺ para o uso contínuo na glicólise (DECK et al., 1998; BROWN et al., 2004; CAMERON et al., 2004; CHOI et al., 2007; SHOEMARK et al., 2007). Como esta enzima é fundamental para a produção de energia no parasita, espera-se que qualquer composto que bloqueie a ação da LDHPf pare a produção de ATP, com subsequente morte do *P. falciparum* (CAMERON et al., 2004; BROWN et al., 2004; CHOI et al., 2007).

A enzima LDHPf difere das isozimas humanas em muitas características estruturais e cinéticas importantes (SHOEMARK et al., 2007), sugerindo que uma seletividade na inibição pode ser possível (CHOI et al., 2007). Uma comparação entre as

estruturas cristalográficas da LDH humana (LDHh) e do *P. falciparum* mostrou algumas diferenças estruturais fundamentais entre ambas. Primeiramente, aparece um deslocamento significativo do cofator NADH em relação a outras formas de LDH, sugerindo que a LDHPf apresenta um modo único de associação com este cofator e, portanto, uma cavidade de ligação do NADH distinta (DUNN et al., 1996; READ et al., 1999). Além disso, existe, em relação às outras LDHs conhecidas, uma inserção de cinco resíduos de aminoácidos em um *loop* flexível na superfície da enzima, o qual confere especificidade ao substrato e define seu sítio de ligação, criando uma cavidade distinta na superfície adjacente à região catalítica (DUNN et al., 1996; SESSIONS et al., 1997; BROWN et al., 2004). A combinação destas mudanças produz um aumento no volume da reentrância do sítio ativo na LDHPf comparado com a enzima humana (CAMERON et al., 2004) e explica muitas das propriedades bioquímicas únicas da enzima LDHPf (DUNN et al., 1996), sugerindo que esta pode constituir um alvo apropriado para o *design* de antimaláricos seletivos (READ et al., 1999). Além disso, os sítios de ligação do cofator e do substrato da LDHPf apresentam muitos resíduos de aminoácidos únicos quando comparados à LDH humana, como a Lys102, Pro246, Pro250, Asn197 e Leu163 (SESSIONS et al., 1997; DECK et al., 1998; CHOI et al., 2007), sugerindo que estes sítios podem ser alvos para fármacos seletivos (DECK et al., 1998; BROWN et al., 2004; CHOI et al., 2007; SHOEMARK et al., 2007).



Figura 12 – Representação esquemática da estrutura quaternária do tetrâmero LDHPf (código *1cet* no PDB), onde cada monômero aparece em uma cor diferente.

1.4 Os Inibidores – Ariloxazinas, Cloroquina e Azul de Metileno

O surgimento da resistência dos parasitas causadores da malária aos fármacos antimaláricos mais baratos e tradicionais tornou estes ineficazes. Como a malária afeta países, em sua maioria, com poucos recursos destinados à saúde pública, as características de um tratamento ideal para esta doença são diferentes daquelas para doenças de países mais desenvolvidos. Assim, um antimalárico ideal deve ser barato para sintetizar, possuir boa biodisponibilidade oral, ser bem tolerado pelo paciente, entre outras características (PLOUFFE et al., 2008).

Os compostos da família das ariloxazinas (Fig. 13) apresentam propriedades favoráveis, tais como baixa toxicidade e baixos custos de produção, além de terem mostrado possuir atividade antimalárica contra o *P. falciparum* (SCHÖNLEBEN-JANAS et al., 1996), sendo, por isso, recomendados como candidatos a fármacos contra a malária (SCHÖNLEBEN-JANAS et al., 1996; KRAUTH-SIEGEL, SCHIRMER e BAUER, 2005).

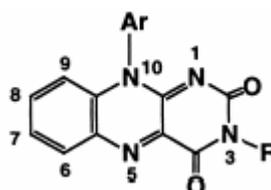


Figura 13 – Estrutura geral dos compostos da família das ariloxazinas. Adaptado de Sarma et al. (2003).

A fim de se entender a relação estrutura-atividade destes compostos, foram feitos estudos cinéticos de uma série de ariloxazinas nas enzimas GRh e GRPf. Além disso, com base em dados cristalográficos sabe-se que pelo menos dois derivados desta família se ligam ao sítio da interface da GRh (SCHÖNLEBEN-JANAS et al., 1996). Para a enzima do *P. falciparum*, entretanto, não foram obtidos, ainda, cristais de complexos GRPf-ariloxazina (SARMA et al., 2003). Desta maneira, o modo de ligação destes compostos à enzima GRPf permanece incerto.

O composto cloroquina (Fig. 14), da classe quinolina, é um dos fármacos mais comumente utilizados no tratamento contra a malária. Este composto foi desenvolvido como um fármaco antimalárico durante a Segunda Guerra Mundial e passou a ser a forma mais barata e eficaz para a profilaxia e tratamento da malária, até a resistência começar a se

espalhar ao redor do mundo no início da década de 60. Apesar do surgimento da resistência do *P. falciparum* a este fármaco, ainda há interesse no estudo dos compostos da classe quinolina, pois, embora os compostos desta classe sejam utilizados há muitos anos, os mecanismos de ação e de surgimento de resistência estão longe de serem totalmente entendidos, sendo ainda hoje alvo de debates (FOLEY e TILLEY, 1998; DAVIOUD-CHARVET et al., 2001; OLLIARO, 2001; GINSBURG, 2002).

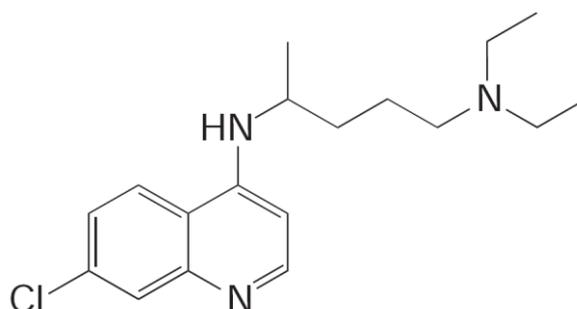


Figura 14 – Cloroquina. Adaptado de Ridley (2002).

A perda de eficácia da cloroquina levou a uma intensa pesquisa no modo de ação deste fármaco, sendo propostos vários mecanismos para sua atividade e para o surgimento de resistência (FOLEY e TILLEY, 1998; DAVIOUD-CHARVET et al., 2001; OLLIARO, 2001). A hipótese mais aceita é a de que a cloroquina interfere de algum modo no processo de alimentação do parasita, inibindo o processo de degradação da hemoglobina pelo *P. falciparum* (FOLEY e TILLEY, 1998). Embora a cloroquina possa se ligar à lactato desidrogenase do parasita, esta enzima parece não ser o alvo preferencial deste inibidor. Assim, o alvo preferencial da cloroquina no parasita permanece incerto (READ et al., 1999).

Por fim, o composto antimalárico azul de metileno (Fig. 15) é conhecido por interferir no metabolismo da glutatona de eritrócitos parasitados. Este foi o primeiro agente quimioterapêutico a ser utilizado com sucesso em humanos e, comparado com muitos outros agentes antiparasíticos, é um composto barato, além de ser um fármaco já aprovado. A enzima GR foi a primeira molécula identificada como alvo do azul de metileno no parasita. Sabe-se que este composto atua como um inibidor não-competitivo da *GRPf* e que provavelmente se liga ao sítio da interface da *GRh*, como é o caso da maioria dos inibidores tricíclicos conhecidos desta enzima (FÄRBER et al., 1998; KRAUTH-SIEGEL, SCHIRMER e BAUER,

2005; BUCHHOLZ, et al., 2008). Entretanto, os detalhes da interação entre o azul de metileno e as enzimas GRh e GRPf, a nível estrutural, não são conhecidos.

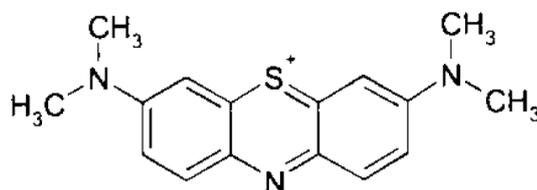


Figura 15 – Azul de metileno. Adaptado de Krauth-Siegel, Schirmer e Bauer (2005).

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho incluem produzir conhecimento sobre processos biológicos relacionados com o metabolismo do parasita malarial, em nível molecular e utilizando a bioinformática, para que seja possível sugerir compostos que possam atuar como potenciais fármacos. Ainda, pretende-se elucidar, por meio da formação de complexos enzima-inibidor teóricos, o comportamento dos inibidores da família das ariloxazinas e da cloroquina nos sítios de ligação das enzimas Glutathione Redutase, Dihydrofolate Redutase-Timidilate Sintase e Lactate Dehydrogenase do *P. falciparum*. Também será analisada a interação dos mesmos inibidores com as enzimas humanas correspondentes para fins de comparação. Desta maneira, pretende-se criar modelos teóricos para explicar dados experimentais, quando estes estiverem disponíveis na literatura, identificando os complexos mais favoráveis e, ainda, sugerindo modificações nos inibidores para se otimizar a ligação das moléculas às enzimas do parasita causador da malária, a fim de que estes possam atuar como fármacos contra esta moléstia.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O primeiro passo foi selecionar, em bancos de dados, as coordenadas tridimensionais dos átomos das enzimas que foram utilizadas como alvo neste projeto e selecionar seus sítios de ligação. Em uma etapa seguinte, os ligantes foram modelados e preparados para os cálculos. Quando as duas classes de moléculas haviam sido selecionadas e preparadas para os estudos de *docking*, foram realizados os cálculos para simular a formação dos complexos, os quais foram avaliados posteriormente com auxílio da visualização gráfica e avaliação dos parâmetros obtidos. Toda a metodologia seguiu o esquema mostrado na Figura 16.

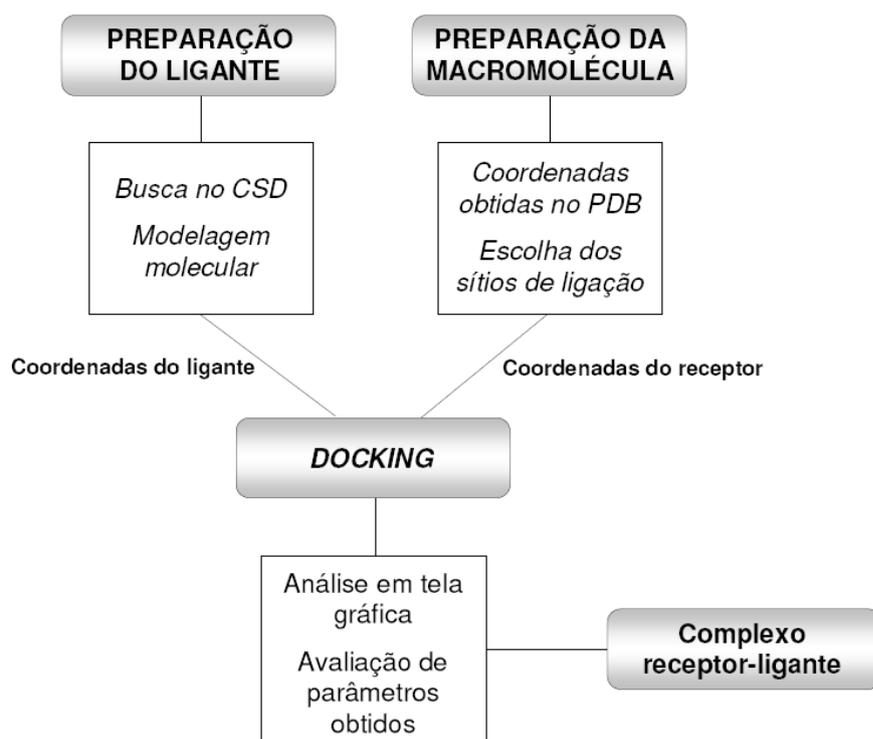


Figura 16 – Esquema da metodologia utilizada no trabalho.

3.1 Obtenção das Estruturas Tridimensionais dos Receptores

As coordenadas atômicas estruturais das enzimas utilizadas no trabalho foram obtidas de bancos de dados de macromoléculas biológicas, como o *Protein Data Bank* – PDB (PDB – www.rcsb.org/pdb) e *PDBSum* (PDBSum – www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/). Foram estudadas as enzimas: Glutathione Redutase humana, com códigos PDB *Igra* (KARPLUS e SCHULZ, 1989; PDB – www.rcsb.org/pdb) e *Ixan* (SAVVIDES e KARPLUS, 1996; PDB – www.rcsb.org/pdb); Glutathione Redutase do *P. falciparum*, código *Ionf* (SARMA et al., 2003; PDB – www.rcsb.org/pdb); Diidrofolato Redutase-Timidilato Sintase do *P. falciparum*, de códigos *Ij3i*, *Ij3j* e *Ij3k* (YUVANIYAMA et al., 2003; PDB – www.rcsb.org/pdb); Diidrofolato Redutase humana, *Ikms* (KLON et al., 2002; PDB – www.rcsb.org/pdb); Lactato Desidrogenase do *P. falciparum*, código *Icet* no PDB (READ et al., 1999; PDB – www.rcsb.org/pdb); e, por fim, Lactato Desidrogenase humana, códigos *Ii10* e *Ii0z* (READ et al., 2001; PDB – www.rcsb.org/pdb). Os arquivos formato PDB contendo as coordenadas tridimensionais das moléculas foram acessados a partir do servidor *Protein Quaternary Structure* (PQS) do *European Bioinformatics Institute* (EBI), um recurso que disponibiliza as coordenadas das estruturas quaternárias de proteínas contidas no banco de dados (PDBSum – www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/).

A enzima GRh sob o código *Igra* (KARPLUS e SCHULZ, 1989) apresenta o substrato glutathione, em sua forma oxidada (GSSG), complexado no sítio ativo (Fig. 17A). Esta estrutura foi utilizada para fazer as simulações de formação de complexos entre os inibidores estudados e o sítio ativo da enzima GRh. Para as simulações no sítio da interface desta mesma enzima, utilizou-se a GRh sob o código *Ixan*, a qual apresenta o inibidor ácido 6-hidroxi-3-oxo-3H-xantona-9-propiónico (**XAN**) complexado neste sítio (Fig. 17B) (SAVVIDES e KARPLUS, 1996). Ambas as estruturas foram resolvidas por difração de raio X e possuem resolução de 2,00 Å (KARPLUS e SCHULZ, 1989; SAVVIDES e KARPLUS, 1996).

A estrutura tridimensional da GRPf, sob o código *Ionf*, não apresenta ligantes complexados e foi utilizada para a realização do *docking* tanto no sítio ativo como no sítio da interface. Esta estrutura foi resolvida por difração de raio X e apresenta resolução de 2,60 Å (SARMA et al., 2003). Uma representação da estrutura da GRPf mostrando a região dos sítios ativo e da interface pode ser vista na Figura 9.

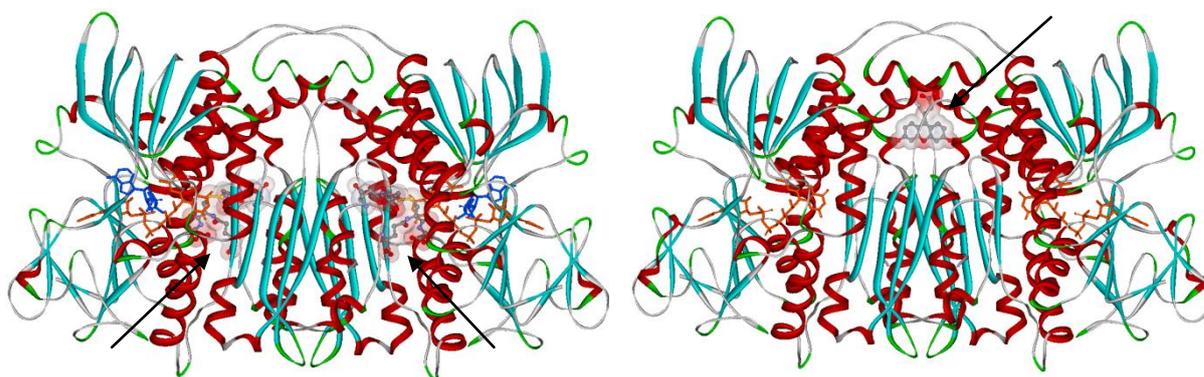


Figura 17 – **A.** Estrutura tridimensional da GRh (*Igra*), com destaque para o FAD (em laranja), o NADPH (em azul) e o substrato GSSG complexado no sítio ativo (seta). **B.** Estrutura tridimensional também da GRh (*Ixa*), mas com o inibidor XAN complexado no sítio da interface (seta).

Para o *docking* na enzima DHFR-TSPf foram consideradas três estruturas diferentes: a enzima nativa sob o código *Ij3i*, que apresenta o inibidor 6,6-dimetil-1-[3-(2,4,5-triclorofenoxi)propoxi]-1,6-diidro-1,3,5-triazina-2,4-diamina (WR99210) complexado no sítio ativo de seu domínio diidrofolato redutase (Fig. 18); o duplo mutante (C59R + S108N) sob o código *Ij3j*, com a pirimetamina complexada neste mesmo sítio; e o quádruplo mutante (N51I + C59R + S108N + I164L) sob o código *Ij3k*, que também apresenta o inibidor WR99210 complexado no sítio receptor do domínio diidrofolato redutase. Todas estas estruturas foram resolvidas por difração de raio X e possuem resolução de 2,33 Å, 2,30 Å e 2,10 Å, respectivamente (YUVANIYAMA et al., 2003). Na Figura 11 aparece, em destaque, a posição dos resíduos de aminoácido da DHFR-TSPf (*Ij3i*) que sofrem estas mutações, em relação ao inibidor WR99210.

Já para o *docking* na DHFRh, considerou-se a estrutura sob o código *Ikms*. Esta estrutura foi resolvida por difração de raio X – apresenta uma resolução de 1,09 Å – e possui o 6-([5-quinolilamino]metil)-2,4-diamino-5-metilpirido[2,3-*d*]pirimidina (SRI-9439), um inibidor antifolato lipofílico, complexado em seu sítio ativo.

A enzima LDHPf, sob o código *Icet*, possui o inibidor cloroquina complexado no sítio de ligação do cofator nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) (Fig. 19), região na qual foram realizadas as simulações computacionais. Sua estrutura também foi resolvida por difração de raio X e possui resolução de 2,05 Å (READ et al., 1999).

Por fim, considerou-se para o *docking* na LDHh as estruturas sob os códigos *Ii10* e *Ii0z* do PDB. A primeira corresponde à isoforma M (M-LDHh), encontrada, por exemplo, no músculo estriado esquelético e no fígado, enquanto que a segunda corresponde à

isoforma H (H-LD H_h), encontrada predominantemente em tecidos aeróbicos, como o músculo estriado cardíaco (READ et al., 2001). Ambas foram resolvidas por difração de raio X e apresentam 2,30 Å e 2,10 Å de resolução, respectivamente.

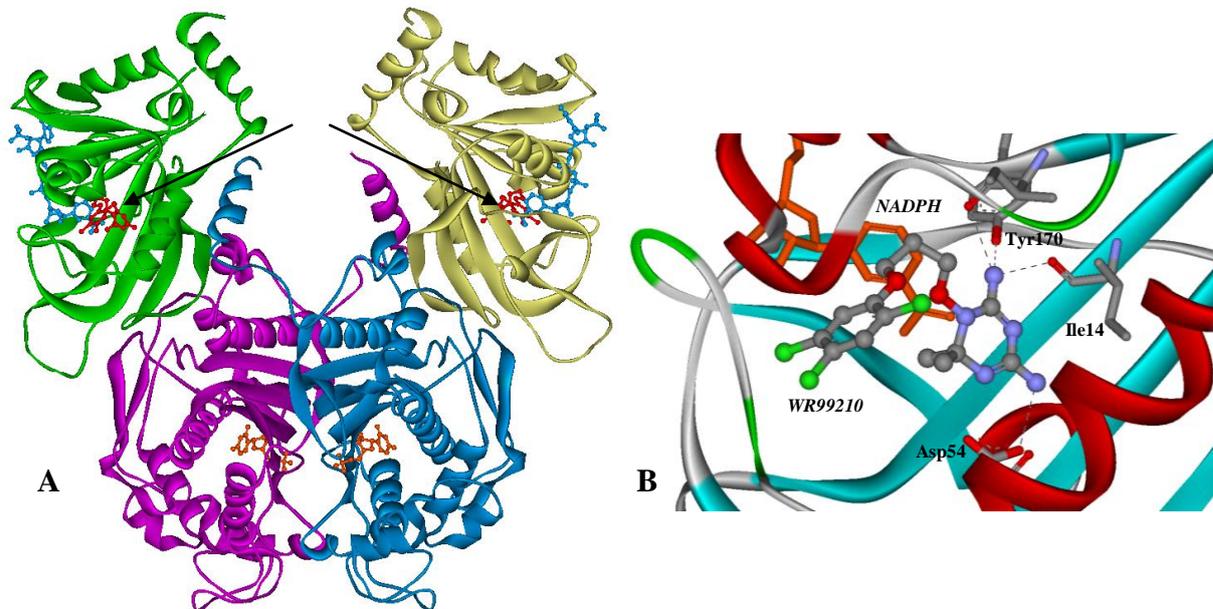


Figura 18 – Em **A**, temos uma visão geral da enzima DHFR-TSP f . Em verde e em dourado está o domínio diidrofolato redutase, enquanto que em roxo e em azul aparece o domínio timidilato sintase. Em vermelho aparece o inibidor WR99210 (setas), em azul o cofator NADPH e em laranja o dUMP. Em **B**, aparece em destaque o inibidor WR99210 no sítio de ligação do domínio diidrofolato redutase, com suas principais interações com resíduos de aminoácido da enzima (ao fundo, em laranja, o NADPH).

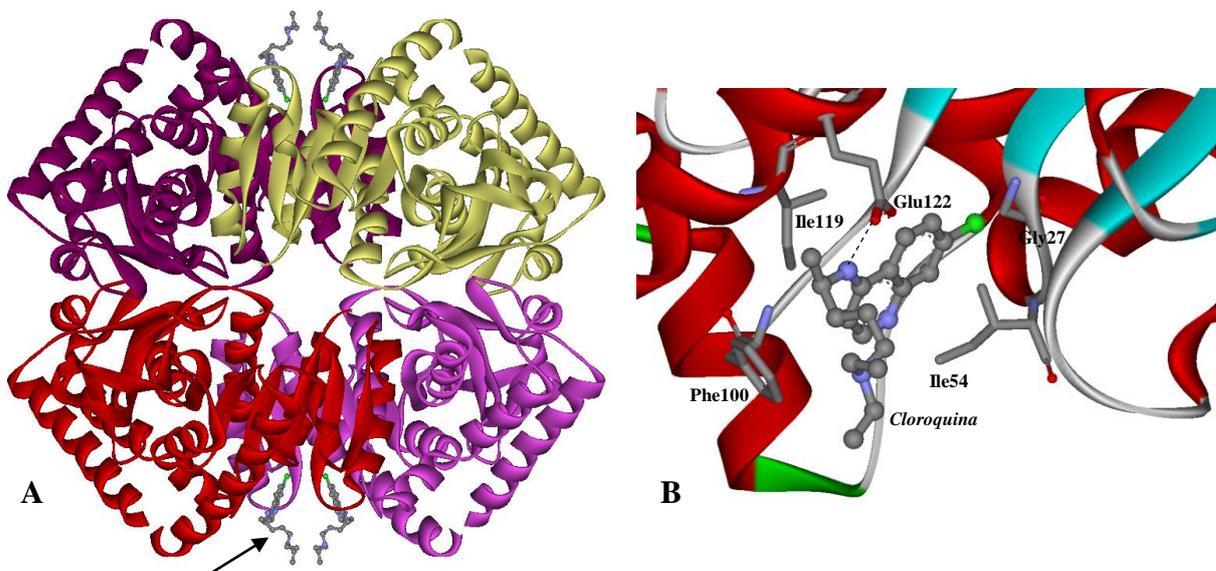


Figura 19 – **A**. Esquema geral do tetrâmero LDHP f (cada monômero aparece com uma cor diferente), com destaque para o inibidor cloroquina complexado no sítio de ligação do cofator NADH (seta). **B**. Orientação da cloroquina no sítio do NADH, com destaque para a interação com o resíduo Glu122.

3.2 Obtenção das Estruturas Tridimensionais e Modelagem Molecular dos Ligantes

Durante os cálculos de *docking* os ligantes foram considerados flexíveis, ou seja, sua conformação poderia variar, variando os ângulos de torção. Entretanto, o programa de *docking* utilizado neste trabalho não altera ângulos ou comprimentos de ligação. Sendo assim, estes parâmetros deveriam apresentar valores razoáveis, deixando o ligante próximo ao seu mínimo de energia potencial local (JONES, WILLETT e GLEN, 1995; JONES et al., 1997). Por isso foi feita a modelagem molecular dos ligantes ou a obtenção destes diretamente de bancos de dados de estruturas cristalográficas.

A estrutura tridimensional dos ligantes da família das ariloxazinas (Fig. 20A) foi obtida por modelagem molecular, uma vez que não estavam disponíveis estruturas tridimensionais destes compostos em bancos de dados. Para isso, foi feita uma busca por compostos estruturalmente semelhantes no banco de dados de pequenas moléculas *Cambridge Structural Database* (CSD; licença concedida ao Prof. Dr. Julio Zukerman Schpector), utilizando a estrutura da isoaloxazina (Fig. 21A) para esta busca. A estrutura do composto 3-metil-10-(2-hidroxifenil)isoaloxazina (Fig. 21B) – código SAKKOE no CSD (SHINKAI et al., 1988) – foi selecionada como ponto de partida para a modelagem molecular dos compostos desejados. A modelagem foi feita utilizando-se o programa de simulação e modelagem molecular HyperChem 6.01 (HYPERCHEM, 2000). Depois de desenhados os compostos, foram feitas otimizações geométricas também no HyperChem 6.01: método MM+, *Steepest Descent*, gradiente RMS de 0,01 kcal/(Å mol). A seguir, foram feitos cálculos PM6 semiempíricos adicionais utilizando o MOPAC2009 (STEWART, 2007; MOPAC2009, 2008), com as seguintes *keywords* no cabeçalho do arquivo de entrada: PM6 GNORM=0.01 GEO-OK CHARGE=0.

A estrutura tridimensional da cloroquina (Fig. 20B), por sua vez, foi obtida a partir do complexo desta com a enzima LDH*Pf*, sob o código *Icet* no PDB (READ et al., 1999; PDB – www.rcsb.org/pdb). Entretanto, como esta estrutura não continha átomos de hidrogênio, estes foram adicionados utilizando o programa GOLD 4.0.1 (JONES, WILLETT e GLEN, 1995; JONES et al., 1997).

A estrutura tridimensional do azul de metileno (Fig. 22) também foi obtida a partir de um complexo com uma macromolécula, presente no PDB sob o código *2yve* (artigo não publicado) (PDB – www.rcsb.org/pdb). Novamente, os átomos de hidrogênio foram

adicionados à estrutura utilizando o programa GOLD 4.0.1 (JONES, WILLETT e GLEN, 1995; JONES et al., 1997).

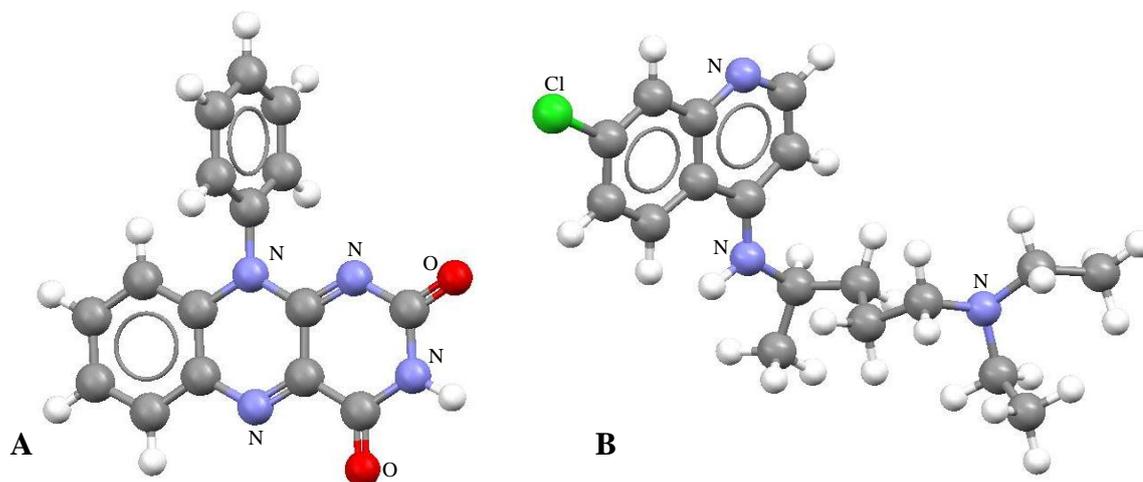


Figura 20 – **A.** Estrutura básica geral dos inibidores da família das ariloxazinas, obtida por modelagem molecular. **B.** Estrutura tridimensional da cloroquina, obtida do PDB (*Icet*). Figuras feitas com o programa Mercury 2.2 (MACRAE et al., 2006).

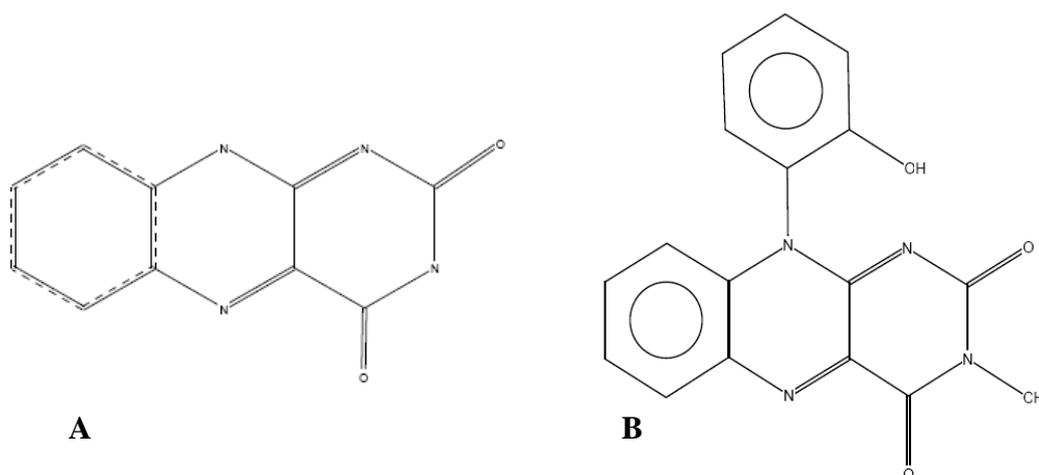


Figura 21 – **A.** Estrutura da isoaloxazina, utilizada para a busca por compostos semelhantes no CSD. **B.** 3-metil-10-(2-hidroxifenil)isoaloxazina (SHINKAI et al., 1988), estrutura obtida no CSD e escolhida para servir como ponto de partida para a modelagem dos compostos desejados.

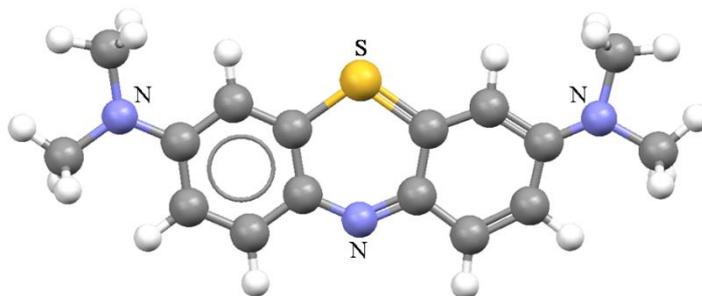


Figura 22 – Estrutura tridimensional do azul de metileno, obtida a partir da estrutura 2yve.

3.3 Alinhamentos Sequenciais e Estruturais

Para a realização dos cálculos de *docking*, é necessária a escolha do sítio receptor, ou seja, a região da macromolécula onde será efetuada a simulação. Como a estrutura tridimensional da GRPf obtida no PDB não apresenta ligantes complexados (substrato ou inibidores), a escolha dos sítios receptores depende, então, de uma comparação desta estrutura com as estruturas das GRs humanas com ligantes complexados no sítio ativo e no sítio da interface. Portanto, foram feitos alinhamentos sequenciais e estruturais entre a GRh (*Igra* e *Ixan*) e a GRPf (*Ionf*) com o objetivo de se escolher corretamente o sítio onde seriam efetuados os cálculos de *docking* na GRPf.

Da mesma maneira, para se fazer o *docking* nas enzimas M-LDHh e H-LDHh na mesma região do sítio do NADH que a cloroquina ocupa na estrutura da LDHPf, foram feitos os alinhamentos sequenciais e estruturais destas moléculas a fim de se escolher corretamente o sítio onde seria feito o *docking* nas isoformas humanas da enzima.

Os alinhamentos sequenciais *pairwise* foram feitos entre a sequência primária de aminoácidos (sequência em formato *FASTA*) das enzimas GRs humana (*Igra*) e do parasita (*Ionf*) e também entre a LDHPf (*Icet*) e as LDHhs (*Ii10* e *Ii0z*), a fim de se analisar as diferenças entre as sequências de aminoácidos destas moléculas e os resíduos que são conservados entre elas. Estas sequências *FASTA* foram obtidas no *National Center of Biotechnology Information* (NCBI – www.ncbi.nlm.nih.gov). O alinhamento foi feito utilizando o programa *ClustalW on-line* (LARKIN et al., 2007; CLUSTALW – www.ebi.ac.uk/clustalw/), utilizando os parâmetros padrões.

Além das diferenças na sequência de aminoácidos das proteínas, foi necessária também a análise das diferenças entre as estruturas tridimensionais destas

macromoléculas. Para isto, foi feito o alinhamento estrutural (sobreposição) das enzimas estudadas (GRh com GR*Pf* e LDH*Pf* com M-LDHH/H-LDHH), utilizando o programa Swiss-PDB Viewer (GUEX e PEITSCH, 1997; SwissPDB Viewer – <http://www.expasy.org/spdbv/>).

Para a sobreposição das enzimas GRh e GR*Pf*, a GR*Pf* (*Ionf*) foi selecionada para que ficasse fixa, enquanto as GRs humanas estudadas foram “rodadas” em cima desta. A sobreposição foi feita com base em resíduos sabidamente correspondentes entre as diferentes enzimas; assim, foram selecionados os resíduos catalíticos da *Igre* (segundo aparece no *PDBSum*: Cys58, Cys63, Lys66, Tyr197, Glu201, His467’ e Glu472’) e seus correspondentes nas *Ixan* e *Ionf*. Os resíduos catalíticos correspondentes na enzima do parasita (*Ionf*) foram obtidos através da análise do alinhamento sequencial feito anteriormente. Para a sobreposição, utilizou-se a subrotina “*Fit molecules (from selection)*” do programa. As matrizes de rotação foram obtidas a partir do programa O (JONES et al., 1991; JONES e KJELDGAARD, [199-]).

As matrizes de rotação e os vetores de translação obtidos foram:

1gre.pdb-para-1onf.pdb

Matriz de rotação:

```
-0.04630000 -0.00800000  0.99890000
-0.99879998  0.01510000 -0.04610000    DET=  1
-0.01470000 -0.99989998 -0.00870000
```

Vetor de translação:

```
60.8761      127.4984      130.2351
```

1xan.pdb-para-1onf.pdb

Matriz de rotação:

```
0.05790000 -0.99800003  0.02710000
-0.99820000 -0.05760000  0.01400000    DET=  1
-0.01240000 -0.02790000 -0.99949998
```

Vetor de translação:

```
50.6242      125.5514      129.5122
```

Na sobreposição das enzimas LDH*Pf* e LDHh, a LDH*Pf* (*Icet*) foi selecionada para que ficasse fixa. Para a sobreposição, foram selecionados alguns resíduos de aminoácido localizados próximos à cloroquina na estrutura da LDH*Pf* e seus correspondentes nas enzimas humanas (identificados através do alinhamento sequencial feito anteriormente): Asp53, Ile54, Tyr85, Ala98 e Ile119 na LDH*Pf* e seus correspondentes Asp51, Val52, Tyr82, Ala95 e Ile115 na M-LDHH e Asp52, Val53, Tyr83, Ala96 e Val116 na H-LDHH.

3.4 Docking Molecular

Tendo em mãos as coordenadas tridimensionais dos átomos das enzimas e dos ligantes, o próximo passo foi, então, o *docking* molecular. Para realizar a simulação da formação dos complexos teóricos biomolécula-ligantes, foi utilizado o programa computacional GOLD 4.0.1 (JONES, WILLETT e GLEN, 1995; JONES et al., 1997), o qual faz uso de um algoritmo genético na busca por possíveis soluções. O programa GOLD (*Genetic Optimisation for Ligand Docking*) realiza o *docking* considerando uma flexibilidade total de ligantes acíclicos, flexibilidade parcial de ligantes cíclicos e flexibilidade parcial da proteína nos resíduos de aminoácido próximos ao sítio de ligação considerado (JONES et al., 1997).

A função escore utilizada foi a *GoldScore*, a fim de se ordenar as diferentes soluções obtidas. *GoldScore* é uma função baseada em mecânica molecular, que possui quatro termos:

$$\text{GOLD Fitness} = S_{hb_ext} + 1.375 * S_{vdw_ext} + S_{hb_int} + S_{vdw_int}$$

onde S_{hb_ext} representa a contribuição da energia das ligações de hidrogênio entre a proteína e o ligante; S_{vdw_ext} a contribuição da energia de van der Waals do complexo proteína-ligante; S_{hb_int} é a contribuição da energia de ligação de hidrogênio intramolecular à função; e S_{vdw_int} a energia de van der Waals interna do ligante. A multiplicação do fator S_{vdw_ext} por 1.375 é uma correção empírica para encorajar os contatos hidrofóbicos proteína-ligante. Como o *GoldScore* é tomado como sendo o negativo da soma dos termos de energia componentes, quanto maior o valor do escore, melhor (JONES et al., 1997).

A partir dos valores de escore, dados pela função *GoldScore*, foi possível obter a variação da energia livre de ligação, $\Delta G_{\text{binding}}$, segundo a equação descrita no trabalho de Roumen et al. (2007):

$$\Delta G_{\text{binding}} = - 0,1075 * \text{GoldScore} - 2,2665$$

expressa em kcal/mol.

O GOLD ignora tanto a carga formal quanto a carga parcial das moléculas. O programa pode deduzir se um átomo está carregado levando-se em conta a ordem de

ligação deste e comparando com sua valência normal. Sendo assim, é essencial que os tipos de átomos e ligações sejam configurados corretamente nos arquivos de entrada, tanto para a proteína quanto para o ligante (JONES, WILLETT e GLEN, 1995; JONES et al., 1997). Os tipos de átomos e de ligações utilizados nos arquivos de entrada são baseados no Sybyl e o campo de força utilizado pelo GOLD é o Tripos 5.2 (CLARK, CRAMER e VAN OPDENBOSCH, 1989).

Como já mencionado, foram consideradas para o *docking* as enzimas sob os seguintes códigos PDB (PDB – www.rcsb.org/pdb):

- *Igra* (KARPLUS e SCHULZ, 1989), para o sítio ativo da GRh;
- *Ixan* (SAVVIDES e KARPLUS, 1996), para o sítio da interface da GRh;
- *Ionf* (SARMA et al., 2003), para os sítios ativo e da interface da GRPf;
- *Ij3i*, *Ij3j* e *Ij3k* (YUVANIYAMA et al., 2003), para o sítio ativo do domínio diidrofolato redutase das enzimas DHFR-TSPf nativa, duplo e quádruplo mutante, respectivamente;
- *Ikms* (KLON et al., 2002), para o sítio ativo da DHFRh;
- *Icet* (READ et al., 1999), para o sítio do NADH da LDHPf;
- *Ii10* e *Ii0z* (READ et al., 2001), para o sítio do NADH da M-LDHh e H-LDHh, respectivamente.

Além destas enzimas, também foram considerados para o *docking* os ligantes da família das ariloxazinas, obtidos por modelagem molecular, e a cloroquina e o azul de metileno, obtidos do PDB.

Para o sítio ativo da enzima GRh foram considerados para os cálculos apenas os resíduos de aminoácido presentes em um raio de 5 Å ao redor do substrato GSSG cristalográfico. Para o sítio da interface, por sua vez, foram considerados os resíduos dentro de um raio de 10 Å ao redor de um ponto médio entre os átomos NE2 do par His82/His82' e OE2 de Glu442/Glu442'.

Com relação à GRPf, para o sítio ativo foram considerados para o *docking* os aminoácidos em um raio de 10 Å ao redor dos átomos SG do par Cys39/Cys44, enquanto que para o sítio da interface foi considerado 15 Å ao redor de um ponto médio entre os átomos OG do par Ser63/Ser63' e OE2 de Glu459/Glu459'.

Para a enzima DHFR Pf , foram considerados apenas os resíduos de aminoácido presentes em um raio de 5 Å ao redor do ligante cristalográfico WR99210 de $Ij3i$ e $Ij3k$, e 5 Å ao redor do inibidor pirimetamina de $Ij3j$. Para a DHFR h , por sua vez, 5 Å ao redor do inibidor antifolato lipofílico cristalográfico SRI-9439 de $Ikms$.

Finalmente, para a LDHP f considerou-se 5 Å ao redor da cloroquina cristalográfica. Já, para o *docking* nas M-LDH h e H-LDH h , foram considerados os resíduos presentes dentro de um raio de 10 Å ao redor do ponto médio entre os átomos CG1 da Val52 e CB da Ala95 na M-LDH h e entre os átomos CG1 da Val53 e CB da Ala96 na H-LDH h .

Depois de selecionado o sítio de ligação onde seria feita a simulação, foram adicionados, utilizando-se o programa GOLD 4.0.1, pares de elétrons isolados aos átomos aceptores de ligação de hidrogênio a uma distância de 1,0 Å levando-se em consideração o estado de hibridização do átomo. Também através do mesmo programa foram adicionados átomos de hidrogênio à proteína; o número de hidrogênios adicionados a cada átomo foi o suficiente para satisfazer as valências não preenchidas dos mesmos (o comprimento da ligação C–H foi de 1,083 Å, o da N–H foi de 1,009 Å e, por fim, da ligação O–H foi de 0,983 Å). Os resíduos de histidina dos sítios de ligação foram considerados como protonados no átomo ND1 após rodar os cálculos com diferentes estados de protonação, testando todas as possibilidades para este aminoácido. Por fim, as ligações simples que conectam um átomo doador ou receptor à proteína foram consideradas como rotacionáveis (flexibilidade parcial da proteína), permitindo aos doadores e aceptores de ligação de hidrogênio no sítio receptor rotacionarem seus pares de elétrons isolados e átomos de hidrogênios em posições mais adequadas para formar estas ligações entre o ligante e a enzima (JONES, WILLETT e GLEN, 1995; JONES et al., 1997).

Sabe-se que as moléculas de água geralmente desempenham papel fundamental no reconhecimento proteína-ligante, já que estas podem mediar ligações de hidrogênio entre a macromolécula e o ligante ou ainda serem deslocadas pelo próprio ligante na formação do complexo. Para o *docking* no sítio da interface das GRs humana e do *P. falciparum* as águas foram incluídas nos cálculos, já que este sítio encontrava-se preenchido por estas moléculas e, ainda, algumas águas interagem com o inibidor **XAN** na enzima humana. Durante os cálculos utilizando o GOLD 4.0.1, permitiu-se que as águas fossem “ligadas” e “desligadas” (ou seja, considerando a água como presente ou deslocada pelo ligante) e, ainda, que rotacionassem ao redor de seus três eixos principais, a fim de se otimizar a ocorrência de ligações de hidrogênio. Para predizer se a molécula de água deve estar presente ou deslocada pelo ligante, o GOLD estima a mudança na energia livre, ΔG_b ,

associada com a transferência desta molécula do solvente para o sítio de ligação no complexo proteína-ligante. Este ΔG_b para uma dada molécula de água é definido como:

$$\Delta G_b(W) = \Delta G_p(W) + \Delta G_i(W)$$

onde $\Delta G_p(W)$ é uma constante de penalidade associada a cada molécula de água que é “ligada”, representando a perda de entropia ao se ligar ao alvo (dando peso, desta maneira, ao deslocamento das águas); e $\Delta G_i(W)$ representa, por sua vez, a afinidade de ligação intrínseca de uma molécula de água e contém as contribuições resultantes das interações que a água faz com a proteína e com o ligante (as mudanças nas interações entre a proteína e o ligante causadas pela introdução da água também são levadas em conta). Desta maneira, para que uma molécula de água fosse considerada como presente no complexo proteína-ligante, sua afinidade de ligação intrínseca deveria superar a perda de entropia durante a ligação. Além disso, nos cálculos de *docking* todos os átomos doadores/aceptores de ligações de hidrogênio foram considerados como acessíveis ao solvente (JONES, WILLETT e GLEN, 1995; JONES et al., 1997).

Todos os experimentos de *docking* foram realizados utilizando a função *GoldScore* e considerando os parâmetros evolucionários automáticos baseados nas características dos ligantes. Neste ponto, o programa GOLD 4.0.1 (JONES, WILLETT e GLEN, 1995; JONES et al., 1997) calcula automaticamente o número de operadores genéticos a serem aplicados, dependendo das características do ligante selecionado e do sítio receptor – número de ligações rotacionáveis do ligante, flexibilidade do ligante, volume do sítio receptor e número de moléculas de água consideradas. Desta maneira, os parâmetros evolucionários utilizados para cada simulação foram:

- Número de operadores aplicados em cada cálculo = entre 24000 e 150000;
- Tamanho da população (número de cromossomos na população) = 100;
- Pressão de seleção = 1.1;
- Número de ilhas = entre 2 e 5;
- Tamanho do nicho = 2;
- Pesos dados aos operadores = 95, 95 e 10 para cruzamento, mutação e migração, respectivamente.

Dependendo do ligante e do sítio receptor considerado, o GOLD otimizou automaticamente o processo de *docking* variando o número de operadores genéticos aplicados (entre 24000 e 150000) e o número de ilhas (entre 2 e 5), baseado nas características citadas acima, a fim de se diminuir o tempo computacional gasto nos cálculos. Quanto menor o ligante e menos ligações rotacionáveis este apresenta, menos operadores são aplicados durante a execução do algoritmo genético (JONES et al., 1997).

Os ligantes foram considerados flexíveis e, ainda, foi configurado para que o programa gerasse 10 saídas (soluções) em cada cálculo. Cada cálculo de *docking* de um ligante em cada sítio estudado durou, em média, quatro minutos em um computador com processador Intel® Core™ 2 Quad Q6600 2,4 GHz e 4 GB de memória RAM. Este tempo, entretanto, variou dependendo do tamanho e grau de flexibilidade do ligante, tamanho do sítio receptor e se moléculas de água eram consideradas no cálculo.

A partir dos cálculos de *docking* molecular, foram geradas orientações e conformações (saídas ou soluções) dos compostos da família das ariloxazinas, da cloroquina e do azul de metileno nos sítios de ligação das enzimas estudadas, com valores de escore (dados pela função *fitness*) associados a cada complexo formado. Estes complexos foram analisados utilizando programas de visualização molecular.

Nos casos em que foi necessário sobrepor os resultados, a sobreposição das moléculas foi feita utilizando o programa Qmol 4.02 (GANS e SHALLOWAY, 2001).

Para se estabelecer os padrões de ligação dos compostos nas enzimas estudadas, uma série de parâmetros foi considerada: o padrão de orientações obtido no cálculo de *docking* (saídas semelhantes em cada cálculo), as interações que os átomos dos inibidores fazem com átomos de resíduos de aminoácidos da enzima, os escores associados a cada orientação gerada e, por fim, se o modo de ligação é representativo para uma série de compostos de uma mesma família estudada (VEGA-TEIJIDO, CARACELLI e ZUKERMAN-SCHPECTOR, 2006).

Analisando todos estes parâmetros, foi possível sugerir possíveis modos de ligação das ariloxazinas e da cloroquina nas enzimas GRh, GRPf, DHFR-TSPf, DHFRh, LDHPf e LDHh (isoformas M e H), além do azul de metileno nas GRh e GRPf, destacar as principais interações que ocorrem na formação do complexo, além de se predizer quais destes complexos são mais favoráveis.

3.5 Visualização Molecular – Análise em Tela Gráfica

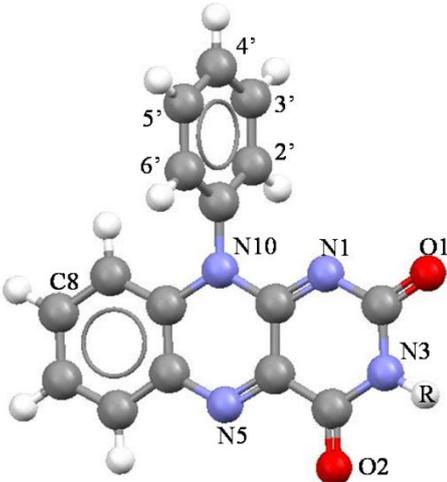
Para a visualização molecular das estruturas tridimensionais das enzimas que foram utilizadas como alvos, dos ligantes e dos complexos enzima-ligante obtidos (resultados de *docking*), foram utilizados os programas Hermes 1.0.1 (Hermes v.1.0.1, 2008), DS Visualizer 2.0 (DS Visualizer 2.0, 2007), Swiss-PDBViewer (GUEx e PEITSCH, 1997; SwissPDB Viewer – <http://www.expasy.org/spdbv/>), HyperChem 6.01 (HYPERCHEM, 2000) e Mercury 2.2 (MACRAE et al., 2006). A visualização molecular também fez possível a identificação de ligações de hidrogênio não-convencionais, como as C–H... π , e interações π - π através de medidas de distâncias e ângulos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Modelagem Molecular dos Compostos da Família das Ariloxazinas

As ariloxazinas estudadas neste trabalho aparecem na Tabela 1 (SARMA et al., 2003). Como as estruturas tridimensionais destes compostos não estão disponíveis em bancos de dados, foi necessário fazer a modelagem molecular destes inibidores.

Tabela 1 – Inibidores da família das ariloxazinas (adaptado de SARMA et al., 2003).

Composto	Substituinte no N3	Substituinte no N10	
	2e	H	Pentafluorofenil
	2a	H	4'-Clorofenil
	4b	(Etoxicarbonil)metil	3',5'-Diclorofenil
	4c	(Etoxicarbonil)metil	3'-Trifluormetilfenil
	5b	Carboximetil	3',5'-Diclorofenil
	6	Metil	Metilpiridínio-4'-il
	6a	Metil	4'-Piridil
	12	3-Metil (e 8-azida) ^a	4'-Clorofenil
	14	3-Metil (e 8-flúor) ^a	4'-Clorofenil
	19	Metil	1'-Naftil
20	Metil	1'-Antril	

^a Compostos **12** e **14** possuem, ainda, um substituinte no átomo C8.

Na busca por compostos semelhantes à isoaloxazina (Fig. 21A) no CSD, foram obtidas as moléculas indicadas na Figura 23. Dentre estas moléculas, a 3-metil-10(2-hidroxifenil)isoaloxazina (Fig. 21B e Fig. 23D) foi a escolhida para servir como molde por ser a molécula mais parecida com as ariloxazinas a serem modeladas.

Após a modelagem molecular e otimizações geométricas feitas com o HyperChem 6.01 (HYPERCHEM, 2000), além de cálculos semiempíricos com o MOPAC2009 (STEWART, 2007; MOPAC2009, 2008), obteve-se a estrutura tridimensional dos compostos da família das ariloxazinas estudadas neste projeto – **2e**, **2a**, **4b**, **4c**, **5b**, **6**, **6a**, **12**, **14**, **19** e **20** (Fig. 24). Esta nomenclatura (**2e** – **20**) é de acordo com o trabalho de

Schönleben-Janás et al. (1996). Também foram modeladas as ariloxazinas **2b**, **2c**, **2d**, **3a**, **3b**, **3c**, **3d**, **3e**, **4a**, **4d**, **5a**, **5c**, **5d**, **7**, **7a** e **18** e feito o *docking* destas apenas na GRh e GRPf, já que estão presentes na literatura dados experimentais destes compostos na GRh (SCHÖNLEBEN-JANÁS et al., 1996).

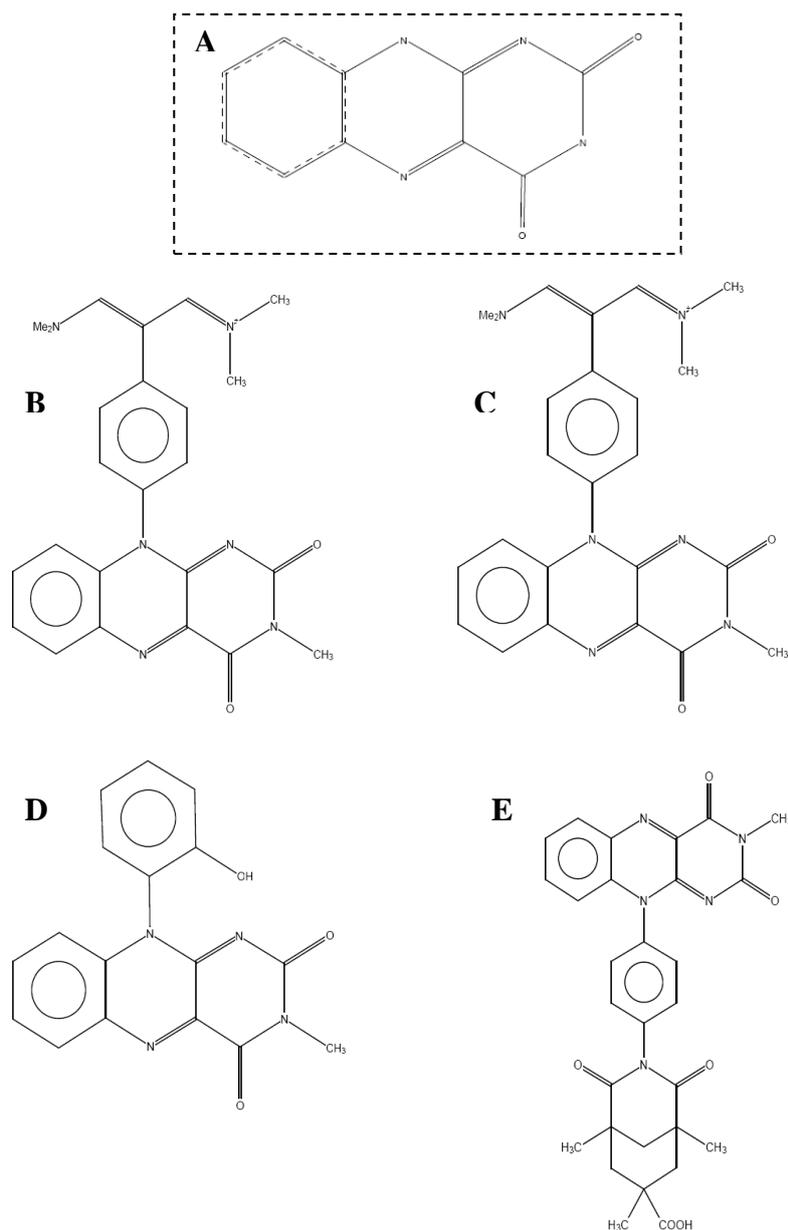


Figura 23 – Resultado da busca no CSD. Em **A**, aparece a isoaloxazina utilizada para se fazer a busca. Em **B**, **C**, **D** e **E**, temos os compostos semelhantes obtidos. O composto **D** (código CSD SAKKOE) foi o escolhido para servir como ponto de partida na modelagem molecular.

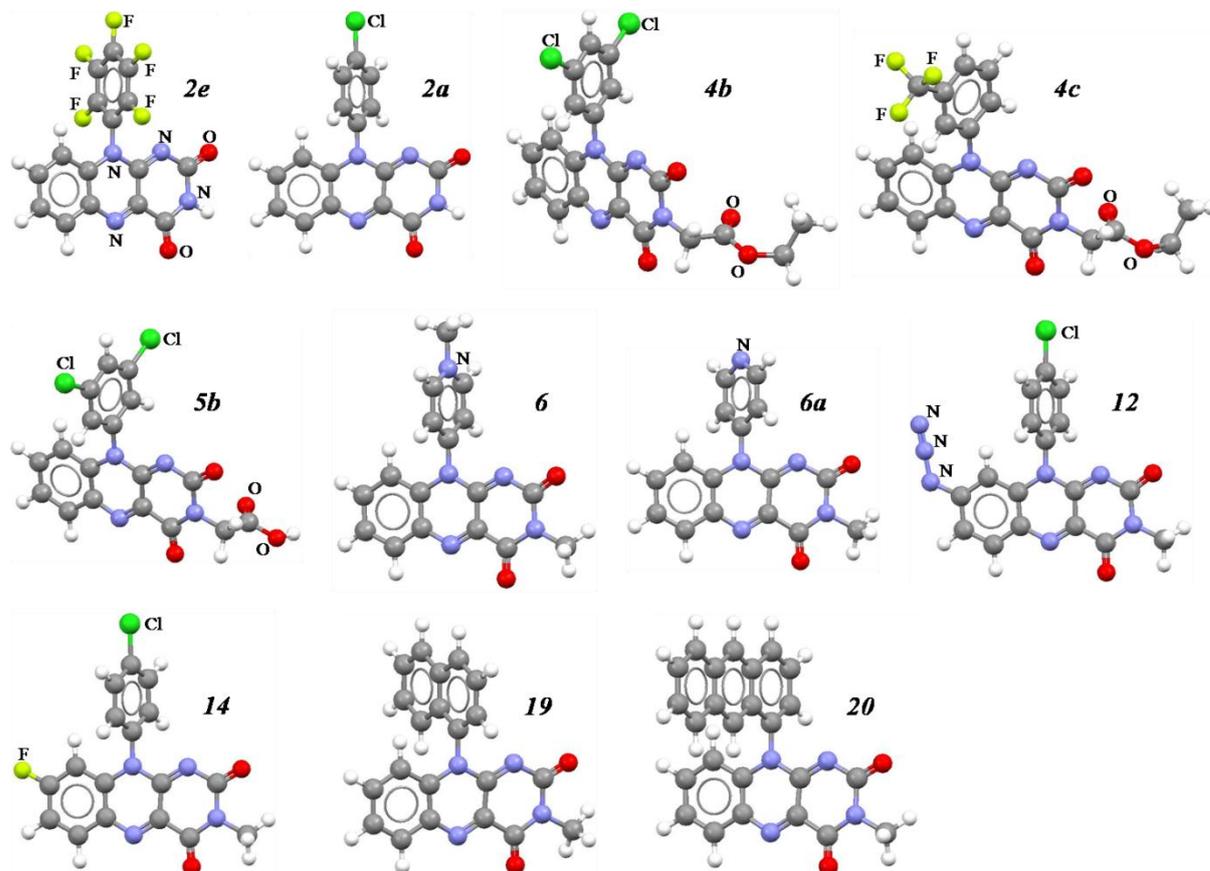


Figura 24 – Estrutura tridimensional dos compostos da família das ariloxazinas modelados segundo indicado na Tabela 1. O código de cores utilizado é: C = cinza; H = branco; O = vermelho; N = azul; Cl = verde; F = amarelo.

4.2 A Escolha dos Sítios de Ligação

A escolha do sítio de ligação é uma etapa crucial em estudos de *docking*, já que nestas simulações deve ser fornecido corretamente o tamanho e a localização do sítio receptor. Nos casos em que a estrutura tridimensional da enzima complexada com um ligante no sítio a ser estudado estava disponível, este sítio foi configurado para o *docking* como sendo constituído por todos os resíduos de aminoácido presentes em um raio de 5 Å ao redor de todos os átomos do ligante; este foi o caso do sítio ativo da GRh, sítio ativo do domínio diidrofolato redutase da DHFR-TSPf nativa e mutantes, sítio ativo da DHFRh e sítio do NADH da LDHPf. Este parâmetro foi suficiente, em todos estes casos, para considerar todos os resíduos que delineavam a cavidade onde seria feito o *docking*.

A estrutura tridimensional da GRP*f* obtida no PDB (*Ionf*), entretanto, não apresenta ligantes complexados em nenhum dos sítios escolhidos como alvo (sítios ativo e da interface). Desta maneira, a escolha destes sítios receptores dependia, então, de uma comparação desta estrutura com as estruturas das GRs humanas com ligantes complexados nestas cavidades. Para isto, foram feitos alinhamentos sequenciais e estruturais entre a GRh (*Igra* e *Ixan*) e a GRP*f* (*Ionf*) com o objetivo de se escolher corretamente a reentrância onde seriam efetuados os cálculos de *docking* na GRP*f*.

O resultado do alinhamento sequencial entre a GRh (*Igra*) e a GRP*f* (*Ionf*) aparece na Figura 25. É possível notar que os resíduos catalíticos da GRh (segundo aparece no *PDBSum*: Cys58, Cys63, Lys66, Tyr197, Glu201, His467' e Glu472') são conservados na GRP*f*. Além disso, a região que envolve as cisteínas catalíticas (Cys58 e Cys63) também aparece bastante conservada, o que está de acordo com outros trabalhos na literatura (MÜLLER et al., 1995). Já os resíduos que compõem o sítio da interface da GRh não são totalmente conservados na GRP*f* (Fig. 25), o que também já havia sido descrito por outros autores (SARMA et al., 2003).

Na Figura 26, por sua vez, está representado o resultado do alinhamento estrutural feito neste trabalho. As estruturas tridimensionais das enzimas GRh e GRP*f* são bastante similares entre si, principalmente quando se consideram as hélices α e folhas β (SARMA et al., 2003).

A partir da análise em conjunto das informações obtidas no alinhamento sequencial e na sobreposição destas enzimas, além de dados da literatura (MÜLLER et al., 1995; SARMA et al., 2003), foi possível identificar quais resíduos de aminoácidos são conservados entre as moléculas (aminoácidos da GRh correspondentes na GRP*f*) e em quais regiões das enzimas ocorrem as substituições de aminoácidos. Assim, foi possível sugerir os sítios de ligação para o estudo de *docking* na GRP*f*.

Para o *docking* no sítio ativo da GRh, considerou-se os aminoácidos presentes em um raio de 5 Å ao redor do substrato GSSG cristalográfico da enzima *Igra* (KARPLUS e SCHULZ, 1989). A partir da análise dos resíduos que faziam parte desta cavidade, escolheu-se, baseado nos alinhamentos sequenciais e estruturais da GRh e GRP*f*, considerar para o *docking* no sítio ativo da GRP*f* os resíduos em um raio de 10 Å ao redor dos átomos SG do par Cys39/Cys44 catalítico.

```

1GRA_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      ACRQEPQPGQPPPAAGAVASYDYLVI GGGSGGLASARRAAELGARA AAVVE 50
1ONF_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      -----MVDYLIVIGGGSGGMAAARRAARHNAKVALVE 32
                                     ** :*****:*:*****. .*:**:*

1GRA_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      SHKLGGTGVNVGCVPKHVMWNTAVHSEFMHDHADYGFPSCEGKFNWRVIK 100
1ONF_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      KSRLGGTGVNVGCVPKHIMFNAASVHDI IENSRHYGFDT-KFSFNLPLLV 81
. :*****:***:* : : .*** : : .** : :

1GRA_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      EKRDAYVSRNLAIYQNNLTKSHIEI IRGHAAFTSDP----KPTIEVSGKK 146
1ONF_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      ERRDKYIQLRNNIYRQNLKSKDKVDLYEGTASFLSENRIKIGTKDNNNKD 131
*:** *:.*** **:*:***: : : . * ** * : * * : ..*

1GRA_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      -----YTAPHILIAATGGMPSTPHESQIPGASLGITSDGFFQLEELPG 188
1ONF_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      NGPLNEEILEGRNILIAVGNKPVFP---PVKGIENISSDEFENIKESK- 177
. :****.*. * * : * . *:* **::*

1GRA_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      RSVIVGAGYIAVEMAGILSALGSKTSLMIRHDKVLRSPFDSMI STNCTEEL 238
1ONF_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      KIGIVGSGYIAVRELINVIKRLGIDSYIFARGNRI LRFDESVINLENLDM 227
: **:*:*****: ..* . * : : * :***.*. : . : : :

1GRA_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      ENAGVEVLKFSQVKEVKKTL SGLLEVSMVTAVPGRLPVMTMIPDVCLLWA 288
1ONF_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      KKNINIVTFADVVEIKKVS D-----KNLSIHLSDGR IYEHFDHVIYC 270
: : : : :.*:* *:* . . . : * . : ..* : : :

1GRA_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      IGRVPNTKDLSLNKLGIQTDDKGHI IVDEFQNTNVKGIYAVGDVCG---- 334
1ONF_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      VGRSPDTENLKLEKLVETNNN-YIVVDENQRTSVNNIYAVGCCMVKKS 319
:* *:*:***:*:***: : : : *:* ** *.*.*.***** *

1GRA_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      -----KALLTPVAIAAGRKL AHRLF 354
1ONF_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      KEIEDLNLKLYNEERYLNKKNVTEDI FYNVOLTPVAI NAGRLLADRLF 369
. : ***** ** **.*

1GRA_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      EYKEDSKLDYNNIPTVVF SHPPIGTVGLTEDEAIHKYGIENVKTYSTSFT 404
1ONF_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      LKKTR-KTNYKLIPTVIFSHPP IGTIGLSEEAIIQIYGKENVKIYESKFT 418
* * : : *:*:*****:***:*: ** * ** ** ** *.*.*

1GRA_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      PMYHAVT---KRRTKCVMRMVCANKEEKVVG IHMQLGCDMLQGF AFA 450
1ONF_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      NLFFSVYDIEPELKEKTYLKLVCV GKDELIKGLHI IGLNADEIVQGF AFA 468
: : : * : * * : *:*:***:*:***: : *:*: *.*.*:*****

1GRA_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      VKMGATKADFNTVAIHPTSEELVTLR---- 478
1ONF_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      LKMNATKKDFDETIPIHPTA AEEFLTLPQPMK 500
:*.* ** *:*:***:*:***: : *:*:***:

```

Figura 25 – Alinhamento sequencial *pairwise* entre as sequências primárias (FASTA) de aminoácidos da GRh (*Igra*) e da GRPf (*Ionf*). Em vermelho, aparecem os resíduos catalíticos, conservados entre as enzimas; note como a região ao redor das cisteínas catalíticas é bastante conservada. Dentro das caixas, aparecem alguns dos resíduos que compõem o sítio da interface das enzimas.

Para o sítio da interface da GRh, foram considerados os resíduos dentro de um raio de 10 Å ao redor de um ponto médio entre os átomos NE2 do par His82/His82' e OE2 de Glu442/Glu442', de modo a selecionar os aminoácidos que delineavam a cavidade e interagiam com o inibidor **XAN** na enzima *Ixan* (SAVVIDES e KARPLUS, 1996). De forma análoga, para o sítio da interface da GRPf considerou-se 15 Å ao redor de um ponto médio entre os átomos OG do par Ser63/Ser63' e OE2 de Glu459/Glu459'; estes resíduos são correspondentes aos pares His82/His82' e Glu442/Glu442' da GRh, identificados por meio dos alinhamentos. Para a GRPf considerou-se uma cavidade maior (15 Å) para permitir que os ligantes buscassem um modo de ligação diferente do **XAN**, pois sabe-se que a forma desta

reentrância difere entre as duas enzimas e alguns autores defendem que o modo de ligação de inibidores no sítio da interface da enzima do parasita não pode ser deduzido diretamente a partir da análise de complexos formados nesta mesma cavidade da enzima humana (SARMA et al., 2003). Uma comparação entre os sítios da interface da GRh e da GRPf aparece na Figura 27.

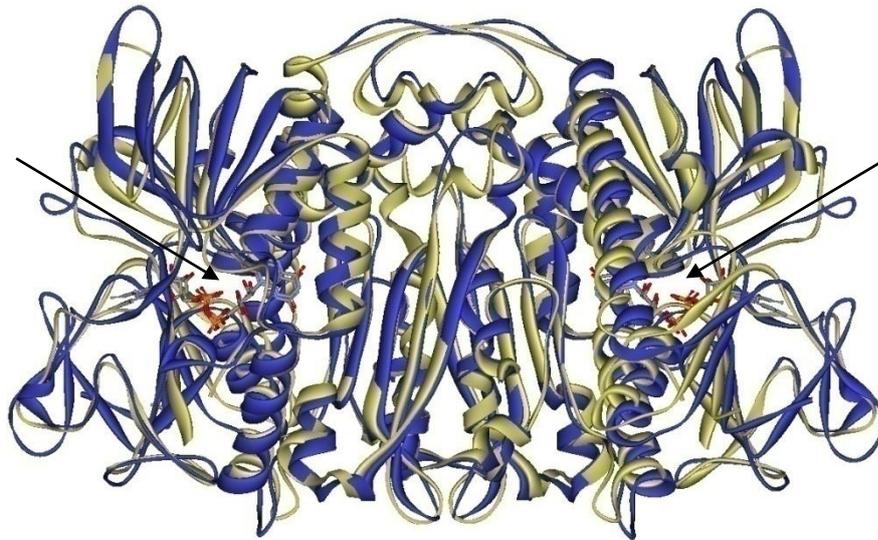


Figura 26 – Sobreposição das estruturas tridimensionais das enzimas GRh (azul) e GRPf (dourado). Note como até mesmo a posição do FAD (setas; um em cada monômero) é conservada entre elas.

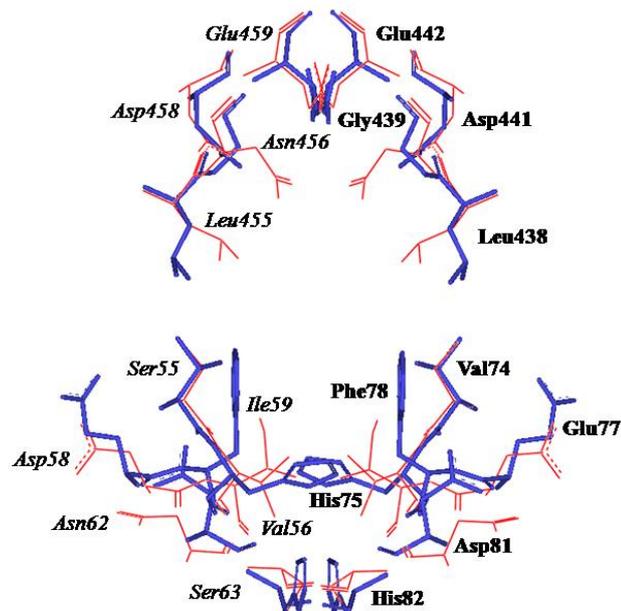


Figura 27 – Sítio da interface da GRh (linha grossa e azul) e da GRPf (linha fina e vermelha) sobrepostos. Os nomes dos resíduos de aminoácidos da enzima humana aparecem em negrito e da enzima do parasita em itálico (somente em um monômero de cada enzima para facilitar a visualização).

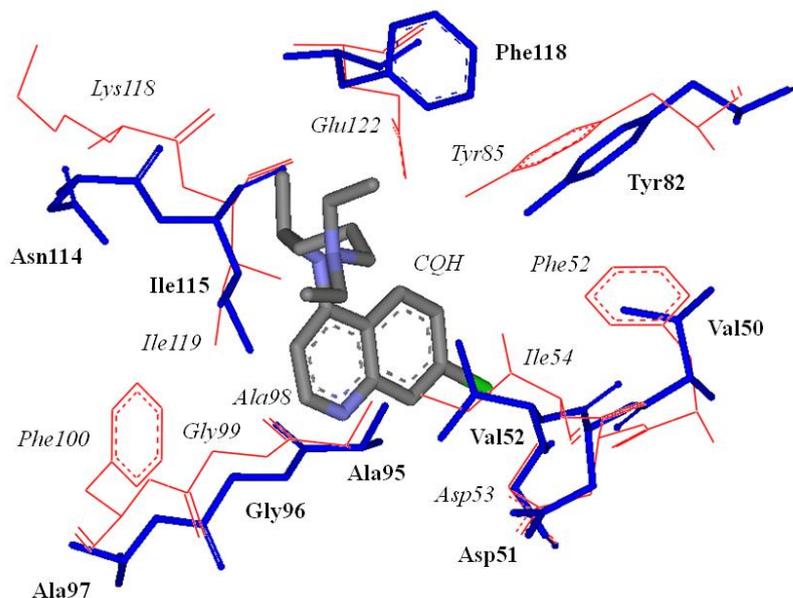


Figura 29 – Resultado da sobreposição das enzimas M-LDHh (linha grossa e azul) e LDHPf (linha fina e vermelha). Estão mostrados somente os resíduos mais próximos à cloroquina (CQH – ligante cristalográfico da LDHPf). Os nomes dos resíduos da enzima humana aparecem em negrito, enquanto os da enzima do *P. falciparum* aparecem em itálico.

4.3 Docking

Os cálculos de *docking* dos compostos da família das ariloxazinas (**2e**, **2a**, **4b**, **4c**, **5b**, **6**, **6a**, **12**, **14**, **19** e **20**) e da cloroquina (CQH) nos sítios de ligação da GRh, GRPf, DHFRPf, DHFRh, LDHPf e LDHh (na GRh e GRPf ainda foram testados os compostos **2b**, **2c**, **2d**, **3a**, **3b**, **3c**, **3d**, **3e**, **4a**, **4d**, **5a**, **5c**, **5d**, **7**, **7a**, **18** e azul de metileno) geraram 10 possíveis orientações e conformações de cada inibidor em cada sítio estudado, com seus respectivos valores de escore associados. O primeiro parâmetro analisado foi o número de orientações semelhantes obtidas em cada cálculo, a fim de se identificar modos de ligação dos inibidores com peso estatístico (VEGA-TEIJIDO, CARACELLI e ZUKERMAN-SCHPECTOR, 2006). No caso de não haver um padrão de orientações semelhantes significante, considera-se que não é provável a formação do complexo entre a enzima e o ligante. Esta primeira avaliação foi feita em tela gráfica, utilizando-se os programas de visualização molecular Hermes 1.0.1 (Hermes v.1.0.1, 2008) e DS Visualizer 2.0 (DS Visualizer 2.0, 2007). Também foram analisados os escores associados a cada complexo formado, calculados por meio da função *GoldScore* presente no programa GOLD 4.0.1 (JONES, WILLETT e GLEN, 1995; JONES et al., 1997), além das interações entre átomos

dos ligantes e das enzimas. Como uma família de compostos estava sendo estudada, utilizou-se também como parâmetro de análise dos resultados a comparação entre as orientações obtidas para os diferentes compostos, verificando se o modo de ligação obtido é representativo para diferentes inibidores da mesma família (VEGA-TEIJIDO, CARACELLI e ZUKERMAN-SCHPECTOR, 2006).

4.3.1 Redocking

O *redocking* consiste em se reproduzir um complexo cristalográfico proteína-ligante com um RMSD menor que 2 Å (NISSINK et al., 2002; VERDONK et al., 2003; KANG et al., 2009). Para isto o ligante é retirado da estrutura cristalográfica e então o cálculo de *docking* é realizado para reposicioná-lo. Isto serve como validação dos resultados que serão obtidos, já que as condições utilizadas nestes cálculos serão as usadas para o *docking* com os compostos a serem testados.

4.3.1.1 Glutathione Redutase

Na enzima GRh, foi feito o *redocking* em dois sítios: o sítio ativo (SA) e o sítio da interface (SI). Para o SA da GRh, considerou-se a enzima sob o código *Igra* no PDB (KARPLUS e SCHULZ, 1989; PDB – www.rcsb.org/pdb), a qual apresenta o substrato GSSG nesta cavidade. Para o SI da mesma enzima, utilizou-se a *Ixan* (SAVVIDES e KARPLUS, 1996; PDB – www.rcsb.org/pdb), que possui o inibidor **XAN** complexado neste sítio.

O resultado do *redocking* do substrato GSSG no SA da *Igra* aparece na Figura 30A. Note como todas as orientações obtidas nos cálculos de *docking* foram semelhantes à orientação do substrato no complexo cristalográfico, indicando que houve êxito na tentativa de se recriar este complexo. Foram recriadas as ligações de hidrogênio entre o inibidor e os resíduos de aminoácido Arg37, Tyr114, Asn117, Arg347 e Glu472'. O RMSD entre uma das soluções obtidas e a orientação cristalográfica, calculado com o Qmol 4.02 (GANS e SHALLOWAY, 2001), foi de 0,259 Å.

O *redocking* do inibidor **XAN** no SI da *Ixan*, por sua vez, aparece na Figura 30B. O valor calculado de RMSD entre uma das soluções e o **XAN** cristalográfico foi de 0,508 Å.

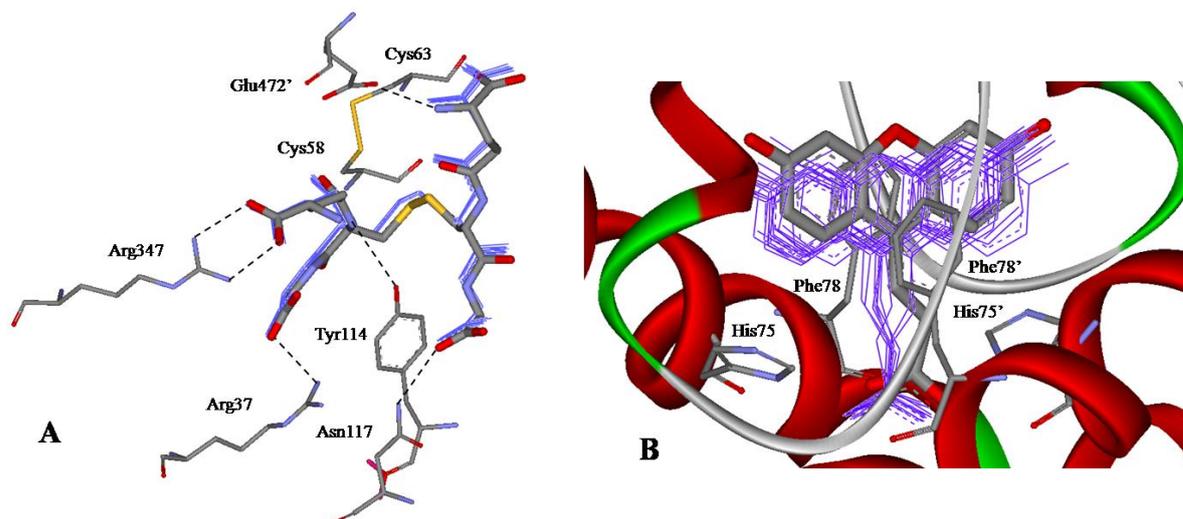


Figura 30 – **A.** *Redocking* do substrato GSSG cristalográfico no SA da GRh. As linhas pontilhadas indicam as ligações de hidrogênio (não são mostrados os átomos de hidrogênio). Note como as soluções obtidas na simulação (em *line*, azul) se sobrepuseram à orientação cristalográfica (em *stick*, colorido). **B.** Em *line* e azul, o *redocking* do **XAN** no SI da GRh. Em *stick* e colorido, o ligante cristalográfico.

4.3.1.2 Diidrofolato Redutase

O resultado do *redocking* do ligante cristalográfico WR99210 no sítio de ligação (domínio diidrofolato redutase) da DHFR-TSPf nativa (código *Ij3i* no PDB) aparece na Figura 31A. Todas as orientações obtidas nos cálculos de *docking* foram semelhantes à orientação do WR99210 no complexo cristalográfico, indicando mais uma vez que houve êxito na tentativa de se recriar este complexo. Foram recriadas as ligações de hidrogênio entre o inibidor e os resíduos de aminoácido Ile14, Asp54, Ile164 e Tyr170, segundo aparecem no trabalho de Yuvaniyama et al. (2003).

A média dos escores obtida nestes cálculos, dada pela função *GoldScore* (JONES, WILLETT e GLEN, 1995; JONES et al., 1997), foi de 63,08. O RMSD entre a melhor solução obtida e a orientação cristalográfica (Fig. 31B), calculado com o Qmol 4.02 (GANS e SHALLOWAY, 2001), foi de 0,167 Å.

No *redocking* da pirimetamina cristalográfica na DHFR-TSPf sob o código *1j3j* (duplo mutante) o RMSD foi de 0,157 Å (Fig. 32A), enquanto que no *redocking* do inibidor WR99210 cristalográfico na *1j3k* (quádruplo mutante) o RMSD foi de 0,537 Å (Fig. 32B).

Já, para o *redocking* do inibidor antifolato lipofílico SRI-9439 na DHFRh (*1kms*), foi obtido um valor de RMSD de 1,009 Å.

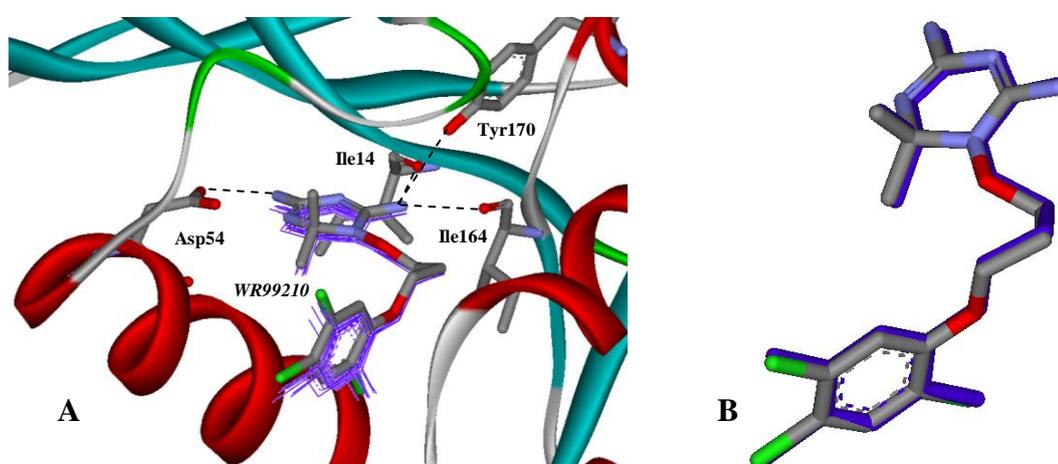


Figura 31 – **A.** *Redocking* do ligante cristalográfico WR99210 na DHFR-TSPf, indicando as ligações de hidrogênio com a enzima (soluções em *line* e WR99210 cristalográfico em *stick*). **B.** Em azul, uma das soluções obtidas no *redocking* e, em colorido, o ligante cristalográfico (RMSD de 0,167 Å).

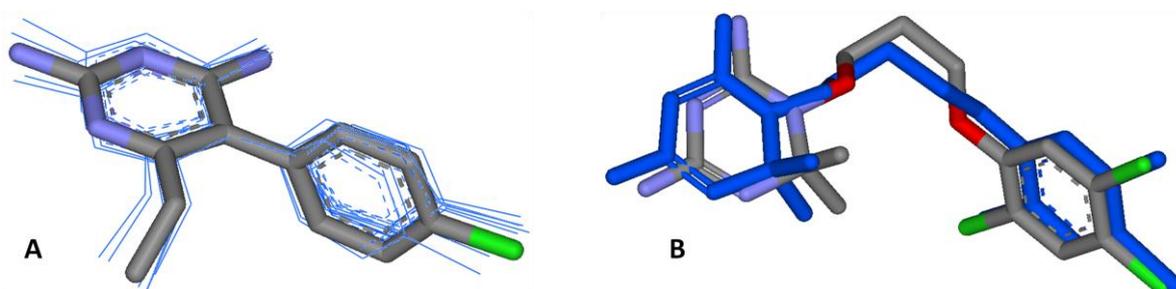


Figura 32 – **A.** Saídas obtidas no *redocking* da pirimetamina na DHFR-TSPf duplo mutante; em *line* (azul) as saídas e em *stick* (colorido) o ligante cristalográfico. **B.** Em azul, uma das soluções obtidas no *redocking* e, em colorido, o ligante cristalográfico na DHFR-TSPf quádruplo mutante.

4.3.1.3 Lactato Desidrogenase

No *redocking* da cloroquina cristalográfica no sítio de ligação do NADH da enzima LDHPf (código *Icet* no PDB), foram obtidas 9 soluções semelhantes à cristalográfica e apenas uma distinta. A região dos anéis da cloroquina ficou mais bem sobreposta, enquanto uma maior variação foi obtida para a porção acíclica do composto (Fig. 33A). Isto já era esperado, uma vez que a porção terminal da cadeia alifática do ligante orienta-se na superfície da enzima, região onde os compostos apresentam maior liberdade. Ainda assim, foi obtida uma solução que se sobrepõe à cristalográfica, a qual apresentou RMSD de 0,328 Å (Fig. 33B).

Foi possível recriar a ligação de hidrogênio que a **CQH** faz com o resíduo Glu122 (Fig. 33A), além da interação *pi-stacking* perpendicular com a cadeia lateral da Phe100, descritas por Read et al. (1999). A média dos escores obtida nestes cálculos foi de 41,18. Por tudo isto, pode-se considerar bem sucedida a tentativa de se recriar o complexo cristalográfico.

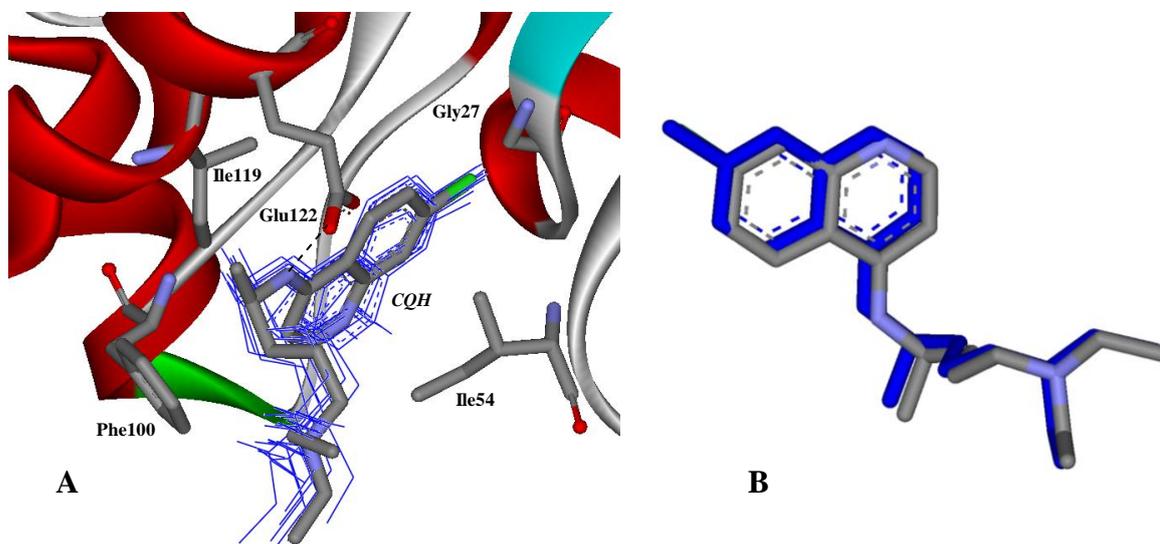


Figura 33 – **A.** *Redocking* da **CQH** na LDHPf. Em *line* (azul) estão as soluções obtidas e em *stick* (colorido) aparece a cloroquina cristalográfica. **B.** Em azul, uma das soluções obtidas no *redocking* e, em colorido, o ligante cristalográfico (RMSD de 0,328 Å).

Por fim, no *redocking* do NADH cristalográfico na M-LDHh (*Ii10*) foi obtido um RMSD de 0,186 Å, enquanto que no *redocking* do mesmo NADH na H-LDHh (*Ii0z*) o RMSD foi de 0,321 Å.

4.3.2 Glutationa Redutase

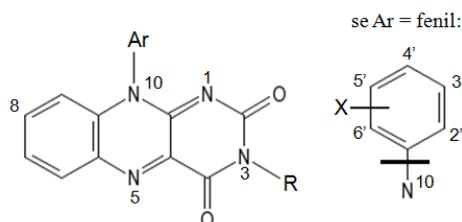
Sabe-se que os inibidores da família das ariloxazinas estudados neste projeto atuam como inibidores tanto da Glutationa Redutase humana (GRh), quanto da Glutationa Redutase do *P. falciparum* (GRPf). Segundo Sarma et al. (2003), na presença de concentrações saturadas de substrato estes compostos atuam como inibidores não-competitivos destas enzimas. Além disso, Schönleben-Janans et al. (1996) mostraram, em estudos cristalográficos, que as ariloxazinas **5a** e **5b** se ligam ao sítio da interface da GRh (embora a estrutura cristalográfica do complexo não tenha sido publicada). Ainda, em experimentos de marcação por fotoafinidade utilizando o composto **12**, mais de 50% dos marcadores ficaram próximos aos segmentos p(49-84) e p(410-430) da GRPf, ambos peptídeos marcados que contêm resíduos que delimitam a cavidade da interface desta enzima (SARMA et al., 2003).

Sarma et al. (2003) fizeram estudos de inibição dos compostos da família das ariloxazinas **2a**, **2e**, **4b**, **4c**, **5b**, **6**, **6a**, **12**, **14**, **19** e **20** nas enzimas GRh e GRPf, enquanto que Schönleben-Janans et al. (1996) fizeram estudos de inibição das ariloxazinas **2a**, **2b**, **2c**, **2d**, **2e**, **3a**, **3b**, **3c**, **3d**, **3e**, **4a**, **4b**, **4c**, **4d**, **5a**, **5b**, **5c**, **5d**, **6**, **6a**, **7**, **7a**, **12**, **14**, **18**, **19** e **20** apenas na enzima GRh. Estes dados de atividade aparecem na Tabela 2.

Também é sabido que o composto antimalárico azul de metileno (Fig. 15) atua como um inibidor não-competitivo da GRPf e que provavelmente se liga ao sítio da interface da GRh (FÄRBER et al., 1998; KRAUTH-SIEGEL, SCHIRMER e BAUER, 2005; BUCHHOLZ, et al., 2008).

Apesar da disponibilidade de todas estas informações, para a enzima do *P. falciparum* não foram obtidos, ainda, cristais de complexos GRPf-ariloxazina (SARMA et al., 2003) ou GRPf-azul de metileno, de maneira que o modo de ligação destes compostos à GRPf permanece incerto e os detalhes das interações destes ligantes com as enzimas GRh e GRPf em nível estrutural também não são conhecidos. Portanto, tornou-se oportuno fazer o estudo de *docking* molecular dos inibidores da família das ariloxazinas e do azul de metileno nos sítios ativo e da interface das enzimas GRh e GRPf.

Tabela 2 – Dados de atividade dos inibidores da família das ariloxazinas nas enzimas GRh e GRP*f* (adaptado de Sarma et al., 2003 e Schönleben-Janias et al., 1996).



Composto	Substituinte no N3	Substituinte no N10	K_i para GRP <i>f</i> (μM) ^a	K_i para GRh (μM) ^a	IC ₅₀ para GRh (μM) ^b
2a	H	4'-Clorofenil	5,4	0,6	< 1,0
2b	H	3',5'-Diclorofenil	-	-	< 1,0
2c	H	3'-Trifluormetilfenil	-	-	1,0
2d	H	3',5'-Ditrifluormetilfenil	-	-	3,5
2e	H	Pentafluorfenil	1,9	2,5	3,5
3a	Metil	4'-Clorofenil	-	-	< 1,0
3b	Metil	3',5'-Diclorofenil	-	-	< 1,0
3c	Metil	3'-Trifluormetilfenil	-	-	1,0
3d	Metil	3',5'-Ditrifluormetilfenil	-	-	5,0
3e	Metil	Pentafluorfenil	-	-	< 1,0
4a	(Etóxicarbonil)metil	4'-Clorofenil	-	-	18,0
4b	(Etóxicarbonil)metil	3',5'-Diclorofenil	13	6,6	7,0
4c	(Etóxicarbonil)metil	3'-Trifluormetilfenil	> 1000	9,3	8,0
4d	(Etóxicarbonil)metil	3',5'-Ditrifluormetilfenil	-	-	100,0
5a	Carboximetil	4'-Clorofenil	-	-	12,0
5b	Carboximetil	3',5'-Diclorofenil	14	7,2	14,0
5c	Carboximetil	3'-Trifluormetilfenil	-	-	20,0
5d	Carboximetil	3',5'-Ditrifluormetilfenil	-	-	25,0
6	Metil	Metilpiridínio-4'-il	> 1000	> 200	40,0
6a	Metil	4'-Piridil	15	2,5	3,0
7	Metil	Metilpiridínio-3'-il	-	-	> 100
7a	Metil	3'-Piridil	-	-	8,0
12	3-Metil (e 8-azida) ^c	4'-Clorofenil	6,2	1,4	2,5
14	3-Metil (e 8-flúor) ^c	4'-Clorofenil	5,9	0,4	1,0
18	Metil	Fenil	-	-	2,0
19	Metil	1'-Naftil	11	0,5	2,0
20	Metil	1'-Antril	> 200	2,5	4,0

^a Dados de Sarma et al., 2003.

^b Dados de Schönleben-Janias et al., 1996.

^c Compostos **12** e **14** possuem, ainda, um substituinte no átomo C8.

4.3.2.1 Sítio da Interface da Glutaciona Redutase Humana

Por meio de estudos de *docking* molecular, foi possível sugerir o modo de ligação dos compostos da família das ariloxazinas, do azul de metileno (**AM**) e da cloroquina (**CQH**) no sítio da interface (SI) da GRh.

Sabe-se que este é o sítio onde se ligam derivados da menadiona (KARPLUS, PAI e SCHULZ, 1989), safranina (KARPLUS, PAI e SCHULZ, 1989), xantona

(SAVVIDES e KARPLUS, 1996), além das próprias ariloxazinas (SCHÖNLEBEN-JANAS et al., 1996) e do azul de metileno (BUCHHOLZ, et al., 2008), entre outros (SAVVIDES e KARPLUS, 1996; BIOT et al., 2004); é o sítio de ligação da maioria dos inibidores tricíclicos conhecidos da GRh, que inibem esta enzima de forma não-competitiva (FÄRBER et al., 1998; SARMA et al., 2003). Ainda, estudos cristalográficos mostraram densidade eletrônica para as ariloxazinas **5a** e **5b** exclusivamente nesta cavidade (SCHÖNLEBEN-JANAS et al., 1996).

Uma das explicações de como a ligação de um composto neste sítio pode inibir a atividade da enzima é que os resíduos His75 e Phe78, bem como o par redox-ativo Cys58/Cys63 do sítio ativo da GRh, são constituintes de uma mesma hélice α (resíduos 56-80) (Fig. 34), de modo que a ligação de compostos aromáticos entre Phe78/Phe78' pode influenciar a catálise através da alteração da distribuição eletrônica no sítio ativo (SCHÖNLEBEN-JANAS et al., 1996; VEGA-TEIJIDO, CARACELLI e ZUKERMAN-SCHPECTOR, 2006).

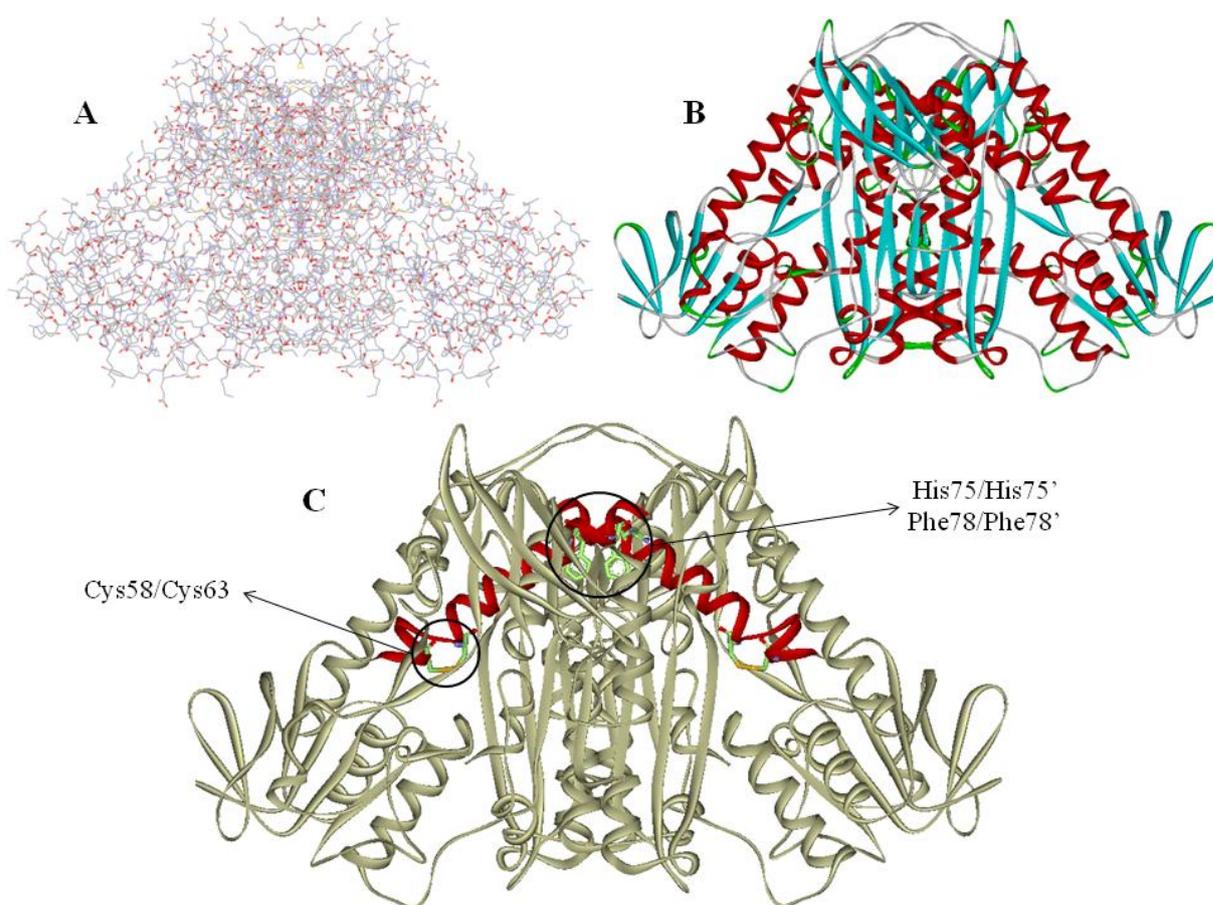


Figura 34 – **A.** Representação de todos os átomos (sem contar os hidrogênios) da GRh. **B.** Representação das estruturas secundárias da GRh: hélices α em vermelho, folhas β em ciano e *loops* em verde. **C.** Esquema mostrando as regiões do sítio da interface, que contém os resíduos His75/His75' e Phe78/Phe78', e do sítio ativo da GRh, próximo à Cys58/Cys63, interligadas por meio de uma hélice α (em vermelho).

Utilizando a função *GoldScore* do programa GOLD 4.0.1 (JONES, WILLETT e GLEN, 1995; JONES et al., 1997), calculou-se o escore de cada complexo enzima-ligante formado nas simulações de *docking*. A média dos escores obtida no *redocking* do **XAN** no SI da GRh foi de 70,48, enquanto que a média dos escores obtidos para as ariloxazinas neste sítio foi de 84,71, para o **AM** foi de 60,99 e, por fim, para a **CQH** foi de 81,63 (Tabela 3). Estes valores sugerem que a afinidade das ariloxazinas e da **CQH** pelo SI da GRh deve ser comparável, ou ainda maior, do que a do próprio **XAN** cristalográfico. Entretanto, somente o valor de escore não é parâmetro suficiente para se estimar afinidade de ligação; a função *fitness* do GOLD foi otimizada mais no sentido de se predizer modos de ligação dos compostos do que predizer afinidade de ligação, embora em alguns casos este último também seja possível (JONES, WILLETT e GLEN, 1995; JONES et al., 1997). Portanto, além dos escores, foram analisadas as orientações obtidas para os inibidores no SI da GRh.

Para os compostos da família das ariloxazinas, foi obtido neste trabalho que, no geral, estes se orientam com sua porção isoaloxazina entre o par de resíduos de aminoácido Phe78/Phe78' (o sinal "linha" indica que o resíduo pertence ao outro monômero da enzima) e com o substituinte aromático da posição N10 voltado para os pares His75/His75' e His82/His82' (Fig. 35A). Uma vez que este sítio é simétrico, formado pelos mesmos resíduos dos dois monômeros da enzima, sempre eram obtidas duas possíveis soluções equivalentes, sendo uma orientação "espelho" da outra. Desta maneira, no modo de ligação padrão obtido para as ariloxazinas neste sítio o substituinte da posição N3 destes compostos fica voltado para a Asn71 ou, na solução simétrica equivalente, para a Asn71'. Os compostos **2a**, **2b**, **2c**, **2e**, **3a**, **3b**, **3c**, **3e**, **4a**, **4b**, **4c**, **4d**, **5a**, **5b**, **5c**, **5d**, **6**, **6a**, **7**, **7a**, **12**, **14** e **18** orientaram-se de acordo com este padrão; as exceções ficaram por conta dos inibidores **2d**, **3d**, **19** e **20**. A Figura 35B mostra como existe uma boa complementaridade de forma entre este sítio e os compostos da família das ariloxazinas: os resíduos Asn71/Asn71', His75/His75', Phe78/Phe78', His82/His82' e Tyr407/Tyr407' delimitam uma cavidade com uma forma aproximada de um "T", justamente semelhante à forma dos inibidores da família estudada.

Neste padrão de ligação, os compostos se orientam com a porção isoaloxazina entre o par Phe78/Phe78', onde ocorrem interações do tipo π - π (ERMONDI e CARON, 2006) entre os sistemas π do anel aromático desta porção do inibidor e das cadeias laterais aromáticas das fenilalaninas, além de ocorrer uma possível interação do tipo C-H... π entre o mesmo anel e um grupo metila da cadeia lateral da Val74 (ou Val74' na solução simétrica equivalente) (Fig. 36A). Assim como foi obtido para as ariloxazinas neste estudo de

docking, diversos outros inibidores da GRh são conhecidos por se ligarem entre as Phe78 e Phe78', formando um "sanduíche" com estas (SARMA et al., 2003); sabe-se, inclusive, que estes resíduos estabilizam a menadiona também através de interações π - π (KARPLUS, PAI e SCHULZ, 1989; BIOT et al., 2004) e que a porção tricíclica do **XAN** se alinha entre estes resíduos a uma distância aproximada de 4 Å, fazendo este tipo de interação "sanduíche" (SAVVIDES e KARPLUS, 1996) – a isoaloxazina das ariloxazinas se sobrepõe a esta porção tricíclica do **XAN** nos resultados de *docking* (Fig. 36B). Além disso, já foi mostrado, em estudos cristalográficos, que a porção isoaloxazina de **5a** e **5b** orienta-se entre os resíduos Phe78 das duas subunidades (SCHÖNLEBEN-JANAS et al., 1996).

Tabela 3 – Escores e $\Delta G_{\text{binding}}$ obtidos para os complexos formados entre o SI da GRh e GRP^f e compostos da família das ariloxazinas, **AM** e **CQH**.

Composto	Substituinte no N3	Substituinte no N10	Escore ^a no SI da GRh	ΔG^b para o SI da GRh (kcal/mol)	Escore ^a no SI da GRP ^f	ΔG^b para o SI da GRP ^f (kcal/mol)
2a	H	4'-Clorofenil	82,03	-11,08	73,86	-10,21
2b	H	3',5'-Diclorofenil	77,04	-10,55	77,31	-10,58
2c	H	3'-Trifluormetilfenil	83,72	-11,27	75,32	-10,36
2d	H	3',5'-Ditrifluormetilfenil	88,03	-11,73	78,56	-10,71
2e	H	Pentafluorfenil	87,37	-11,66	70,58	-9,85
3a	Metil	4'-Clorofenil	87,53	-11,68	69,88	-9,78
3b	Metil	3',5'-Diclorofenil	73,68	-10,19	71,19	-9,92
3c	Metil	3'-Trifluormetilfenil	88,25	-11,75	68,74	-9,66
3d	Metil	3',5'-Ditrifluormetilfenil	86,37	-11,55	72,17	-10,02
3e	Metil	Pentafluorfenil	91,04	-12,05	63,68	-9,11
4a	(Etóxicarbonil)metil	4'-Clorofenil	93,03	-12,27	78,39	-10,69
4b	(Etóxicarbonil)metil	3',5'-Diclorofenil	74,37	-10,26	74,45	-10,27
4c	(Etóxicarbonil)metil	3'-Trifluormetilfenil	95,78	-12,56	75,56	-10,39
4d	(Etóxicarbonil)metil	3',5'-Ditrifluormetilfenil	64,60	-9,21	76,96	-10,54
5a	Carboximetil	4'-Clorofenil	92,96	-12,26	74,67	-10,29
5b	Carboximetil	3',5'-Diclorofenil	77,77	-10,63	75,83	-10,42
5c	Carboximetil	3'-Trifluormetilfenil	90,27	-11,97	73,45	-10,16
5d	Carboximetil	3',5'-Ditrifluormetilfenil	60,70	-8,79	69,08	-9,69
6	Metil	Metilpiridínio-4'-il	84,78	-11,38	70,10	-9,80
6a	Metil	4'-Piridil	90,06	-11,95	66,28	-9,39
7	Metil	Metilpiridínio-3'-il	93,80	-12,35	68,56	-9,64
7a	Metil	3'-Piridil	89,80	-11,92	66,64	-9,43
12	3-Metil (e 8-azida)	4'-Clorofenil	89,11	-11,84	76,99	-10,54
14	3-Metil (e 8-flúor)	4'-Clorofenil	83,98	-11,29	69,58	-9,75
18	Metil	Fenil	92,50	-12,21	66,90	-9,46
19	Metil	1'-Naftil	80,48	-10,92	69,78	-9,77
20	Metil	1'-Antril	87,88	-11,71	65,95	-9,36
AM	-	-	60,99	-8,82	50,71	-7,72
CQH	-	-	81,63	-11,04	63,41	-9,08
XAN^c	-	-	70,48	-9,84	-	-

^a Média dos escores das soluções obtidas, calculados utilizando a função *GoldScore* implementada no programa GOLD 4.0.1 (JONES, WILLETT e GLEN, 1995; JONES et al., 1997).

^b Média da variação da energia livre de ligação obtida a partir dos escores dados pela função *GoldScore*.

^c *Redocking* do inibidor **XAN** no SI da GRh.

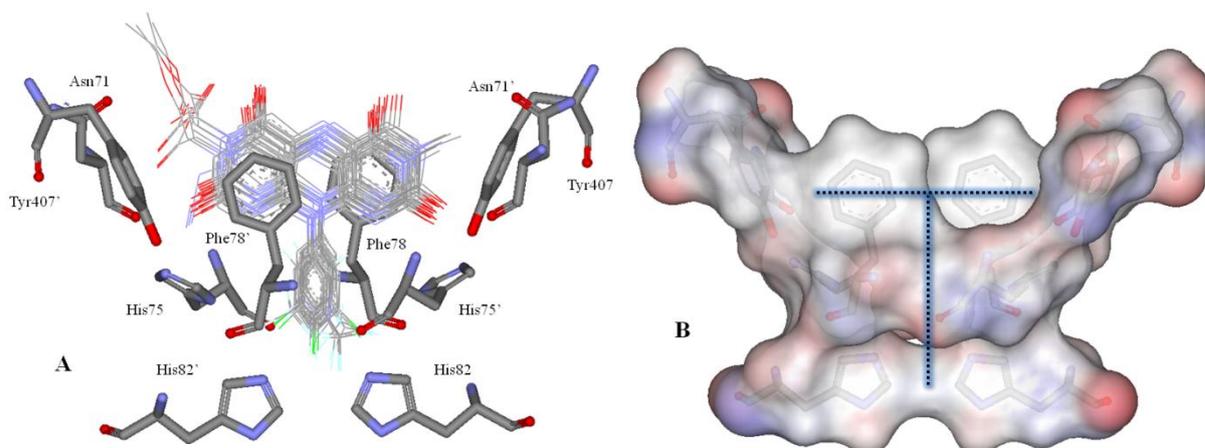


Figura 35 – **A.** Modo de ligação padrão das ariloxazinas no SI da GRh. Estão representados os compostos **2a**, **2b**, **2c**, **2e**, **3a**, **3b**, **3c**, **3e**, **4a**, **4b**, **4c**, **4d**, **5a**, **5b**, **5c**, **5d**, **6**, **6a**, **7**, **7a**, **12**, **14** e **18** e alguns resíduos da GRh (não são mostrados os átomos de H). **B.** Representação da superfície de alguns dos resíduos que compõem o SI da GRh (mostrados em **A**), com destaque para a cavidade em forma de “T” que estes delimitam.

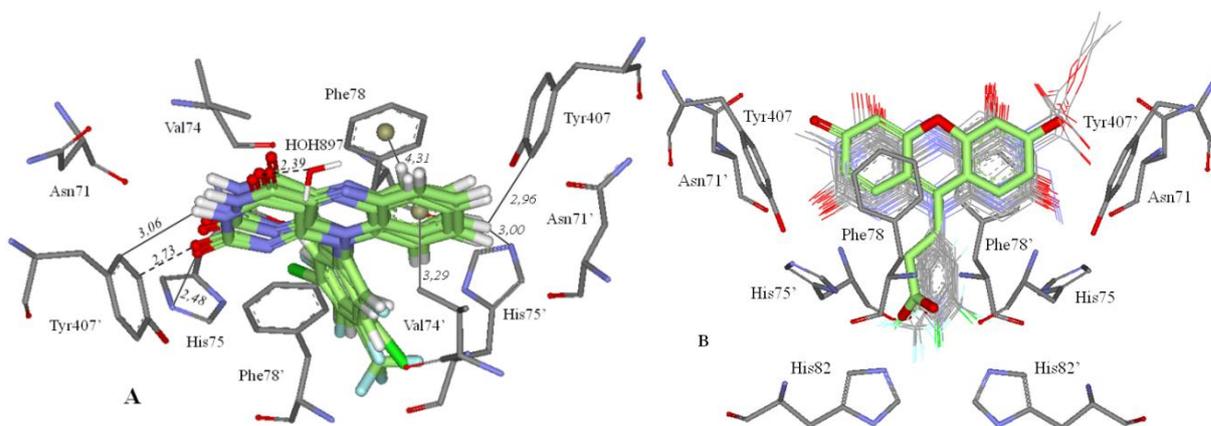


Figura 36 – **A.** Interações entre a porção isoaloxazina de **2a**, **2b**, **2c** e **2e** e alguns resíduos da GRh. Os átomos de carbono dos ligantes estão representados em verde e os da proteína em cinza. As linhas contínuas representam as interações de van der Waals (ou π - π e C-H... π) entre os ligantes e a enzima e as linhas tracejadas representam ligações de H. São mostradas as distâncias em angstroms (Å). **B.** Sobreposição do XAN cristalográfico (em verde e em *stick*) e das soluções obtidas para as ariloxazinas (em *line*) no SI da GRh.

As interações hidrofóbicas também ganham peso, já que a região hidrofóbica da porção isoaloxazina se orienta próxima e interage com resíduos apolares do sítio, como Phe78 e Val74. Também ocorrem ligações de hidrogênio entre o átomo O2 desta porção dos inibidores e moléculas de água do sítio, além de uma potencial ligação de H do tipo C-H...O entre o O1 dos ligantes e um CH da cadeia lateral da Tyr407 (ou Tyr407') (Fig. 36A). Estas interações hidrofóbicas com as fenilalaninas e ligações de H entre átomos de

oxigênio de um inibidor tricíclico e moléculas de água do SI da GRh já haviam sido descritas para o inibidor **XAN** neste sítio (SAVVIDES e KARPLUS, 1996). Por fim, esta porção isoaloxazina faz, ainda, interações de van der Waals com Asn71/Asn71', His75/His75' e Tyr407/Tyr407', do mesmo modo que a porção tricíclica do **XAN** (SAVVIDES e KARPLUS, 1996).

Considerando a posição N3 dos inibidores, quando o substituinte nesta posição é um átomo de hidrogênio ou um grupo metila – compostos **2a**, **2b**, **2c**, **2d**, **2e**, **3a**, **3b**, **3c**, **3d**, **3e**, **6**, **6a**, **7**, **7a**, **12**, **14**, **18**, **19** e **20** (Tabela 2) – ocorrem, segundo os resultados de *docking*, apenas interações de van der Waals entre estes substituintes e os resíduos Asn71 e Tyr407' (ou Asn71' e Tyr407, nas soluções “espelho” equivalentes) (Fig. 36A e Fig. 37A), com exceção dos compostos **2d**, **3d**, **19** e **20** que se orientaram de maneira distinta do padrão obtido para esta família de inibidores. Isto indica que a mudança de um H por uma metila nesta posição não deve afetar a atividade dos compostos, o que está de acordo com dados experimentais (Tabela 2) – Schönleben-Janias et al. (1996) demonstraram experimentalmente que não há diferença considerável de atividade entre compostos cuja única diferença entre eles seja a presença de H ou metila nesta posição N3.

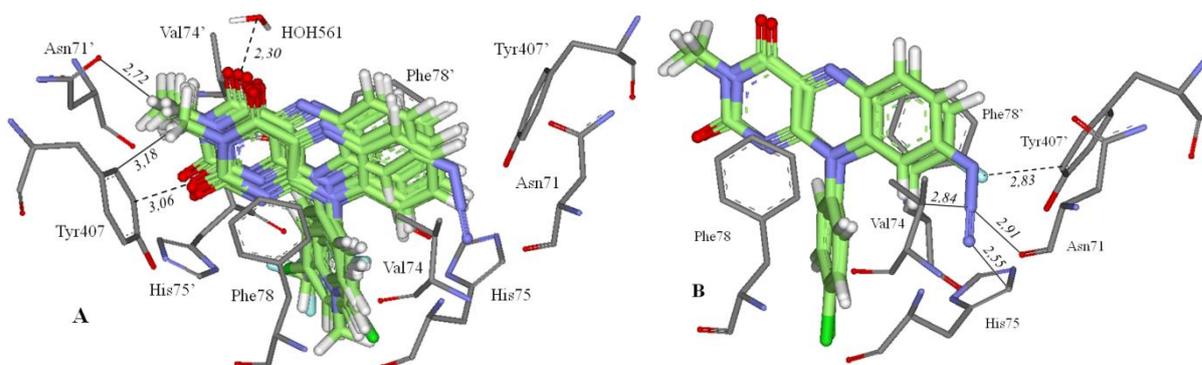


Figura 37 – **A.** Interações entre o substituinte metila da posição N3 de **3a**, **3b**, **3c**, **3e**, **6**, **6a**, **7**, **7a**, **12**, **14** e **18** e alguns resíduos da GRh (além das ligações de H entre os compostos e a enzima). **B.** Interações entre os substituintes azida de **12** e flúor de **14** e a enzima (ligação de H com o flúor).

Os compostos **12** e **14** apresentam, ainda, um substituinte na posição C8. A azida de **12** faz apenas interações de van der Waals com Asn71, Val74, His75 e Tyr407', enquanto que o átomo de flúor de **14** faz uma ligação de H do tipo C–H...F com a Tyr407' (Fig. 37B). Este resultado também está de acordo com dados experimentais (Tabela 2), que mostram que estes ligantes inibem a GRh tão efetivamente quanto os compostos

correspondentes sem substituintes nesta posição e que **14** apresenta uma atividade ligeiramente melhor do que **12** (SCHÖNLEBEN-JANAS et al., 1996; SARMA et al., 2003). Schönleben-Janás et al. (1996) defendem, ainda, que esta posição C8 possivelmente é mais adequada para a introdução de substituintes do que N3.

Substituintes mais volumosos no N3, como o (etoxicarbonil)metil de **4a**, **4b**, **4c** e **4d** ou o carboximetil de **5a**, **5b**, **5c** e **5d**, ocupam posição semelhante no sítio em relação aos compostos anteriores. O substituinte (etoxicarbonil)metil das ariloxazinas faz apenas interações de van der Waals com Lys67, Trp70, Asn71, Phe78', Tyr407' e Leu438' (Fig. 38A), enquanto que o carboximetil, um pouco menor, faz este mesmo tipo de interações com Trp70, Asn71, Val74 e Tyr407' (Fig. 38B); esta orientação de **5a** e **5b** no SI da GRh obtida por meio de cálculos de *docking* neste trabalho é a mesma que a obtida em estudos cristalográficos de Schönleben-Janás et al. (1996), ou seja, com a isoaloxazina entre Phe78/Phe78', o substituinte aromático no N10 voltado para as histidinas do sítio e com o substituinte no N3 voltado para Asn71 (ou Asn71'). Além de não fazer interações importantes que os “preendam” nesta posição (como ligações de H), estes substituintes mais volumosos orientam-se em uma região “apertada” do sítio, próximo aos resíduos Asn71 e Tyr407' (Fig. 35A e Fig. 38), de modo que esta porção dos ligantes deve sofrer torções, mudanças conformacionais, para se encaixar no sítio sem que ocorram choques estéricos com resíduos da enzima (Fig. 39).

Assim, os compostos **4a**, **4b**, **4c**, **4d**, **5a**, **5b**, **5c** e **5d** se ligam ao SI da GRh em uma conformação diferente daquela de mínima energia devido aos seus substituintes volumosos na posição N3, o que possivelmente explica suas atividades inibitórias diminuídas em relação a ariloxazinas com um H ou metila na mesma posição (Tabela 2) – sabe-se que uma penalidade energética conformacional pode afetar significativamente a afinidade do ligante pela enzima, onde a cada 1,4 kcal/mol de aumento na energia conformacional do composto bioativo leva a uma diminuição na afinidade pela enzima por um fator de 10 (BOSTRÖM, NORRBY e LILJEFORS, 1998). Isto está em concordância com o trabalho de Schönleben-Janás et al. (1996), que defende que a introdução de um grupo (etoxicarbonil)metil ou um carboximetil no N3 enfraquece a ligação do inibidor a esta enzima devido unicamente ao tamanho do substituinte, e não devido à hidrofiliabilidade ou carga negativa do mesmo (qualquer substituinte maior do que uma metila diminui a atividade).

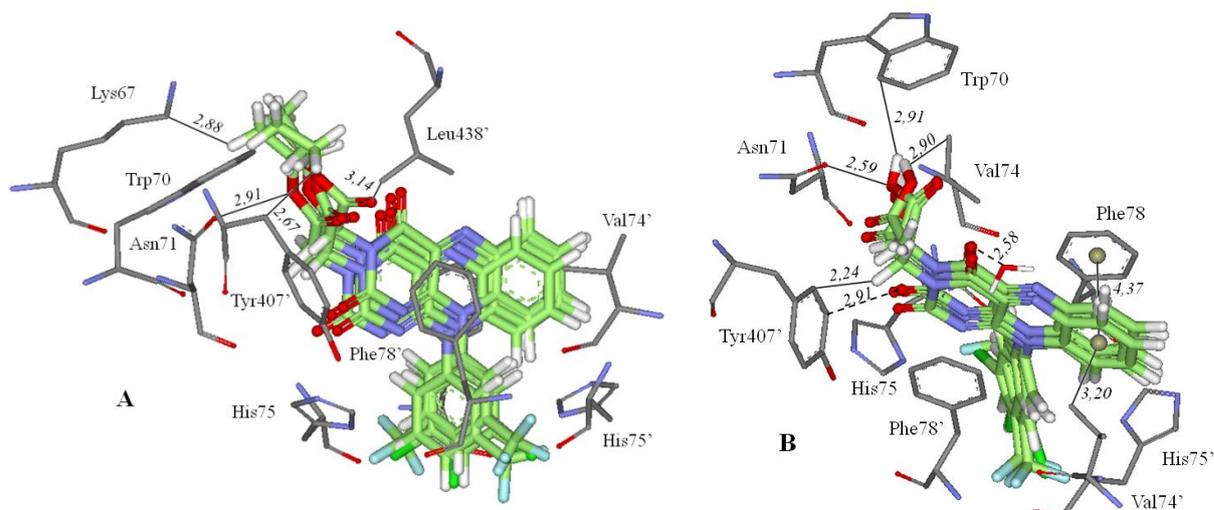


Figura 38 – **A.** Algumas das interações entre o (etoxicarbonil)metil da posição N3 de **4a**, **4b**, **4c** e **4d** e o SI da GRh. **B.** Interações de van der Waals entre o carboximetil de **5a**, **5b**, **5c** e **5d** e o SI da GRh, além das interações π - π com a Phe78, C-H... π com a Val74' e ligações de H com a Tyr407' e com uma molécula de água, características para toda a família das ariloxazinas.

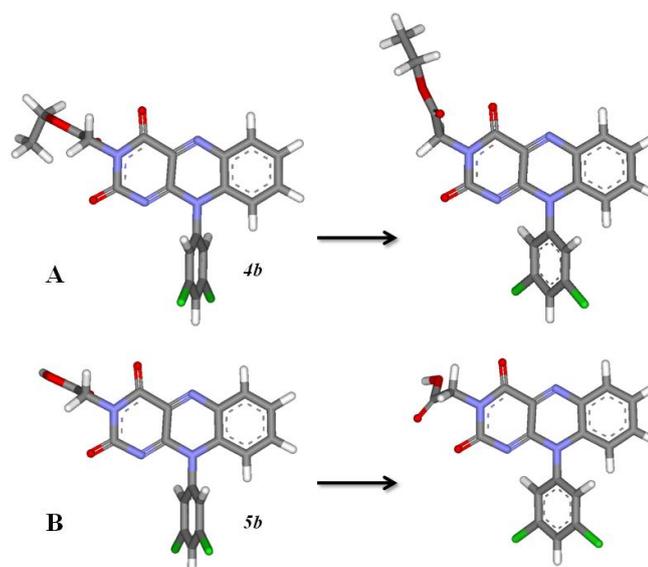


Figura 39 – Comparação das conformações de mínima energia (esquerda), obtidas por meio de modelagem molecular, com as conformações geradas durante o *docking* (direita). Em **A** para o composto **4b** e, em **B**, para o **5b**.

De acordo com os resultados da simulação computacional, o substituinte aromático da posição N10 das ariloxazinas orienta-se, por sua vez, entre o par de resíduos His75/His75' e apontando para His82/His82' (Fig. 35A e Fig. 40), no modo de ligação padrão obtido para estes ligantes neste sítio. Foi obtido que todos os substituintes no N10 orientam-se nesta mesma posição (com exceção de **2d**, **3d**, **19** e **20** que se orientaram de maneira distinta

do padrão), fazendo interações de van der Waals com Val74/Val74', His75/His75', Phe78/Phe78' e His82/His82' (Fig. 40); interações desta natureza com estes resíduos também foram encontradas para o **XAN** neste sítio (SAVVIDES e KARPLUS, 1996) – esta porção das ariloxazinas se sobrepõe, nos resultados de *docking*, ao substituinte alifático do **XAN** no SI da GRh (Fig. 36B). Ainda, o átomo ND1 das histidinas 75 e 75' aponta para o centro dos substituintes aromáticos destes ligantes, ocorrendo potenciais interações do tipo N–H... π (Fig. 40). As interações hidrofóbicas que ocorrem entre alguns destes substituintes da posição N10 e a cadeia lateral de Phe78/Phe78' e cadeia principal de His75/His75' também parecem importantes para manter o ligante nesta posição.

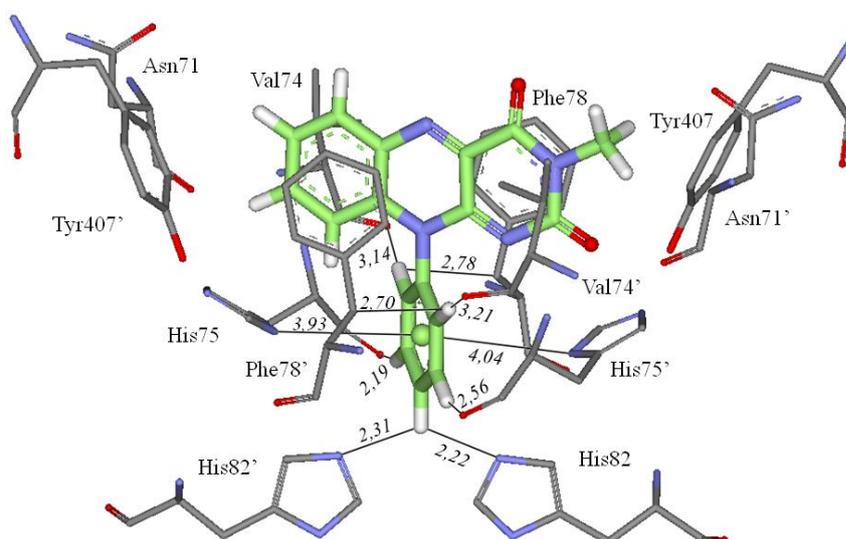


Figura 40 – Algumas das interações de van der Waals entre o substituinte fenil da posição N10 do composto **18** e resíduos da enzima. Também aparecem interações N–H... π com a His75 e His75'. Estas interações foram obtidas para todos os substituintes aromáticos desta posição nas ariloxazinas estudadas.

O substituinte 4'-clorofenil nesta posição N10 de **2a**, **3a**, **4a**, **5a**, **12** e **14**, além das interações descritas acima, apresenta um átomo de cloro que interage com o NE2 das histidinas 82 e 82' (Fig. 41A); dependendo do estado de protonação destas histidinas, podem ocorrer ligações de H entre estes átomos NE2 dos resíduos e o átomo de cloro dos inibidores. Quando o substituinte nesta mesma posição N10 é um 3',5'-diclorofenil, como em **2b**, **3b**, **4b** e **5b**, ocorrem, ainda, potenciais ligações de H entre o ND1 das His75/His75' e os átomos de cloro do inibidor, além de interações de van der Waals adicionais entre os cloros e o par Met79/Met79' (Fig. 41B).

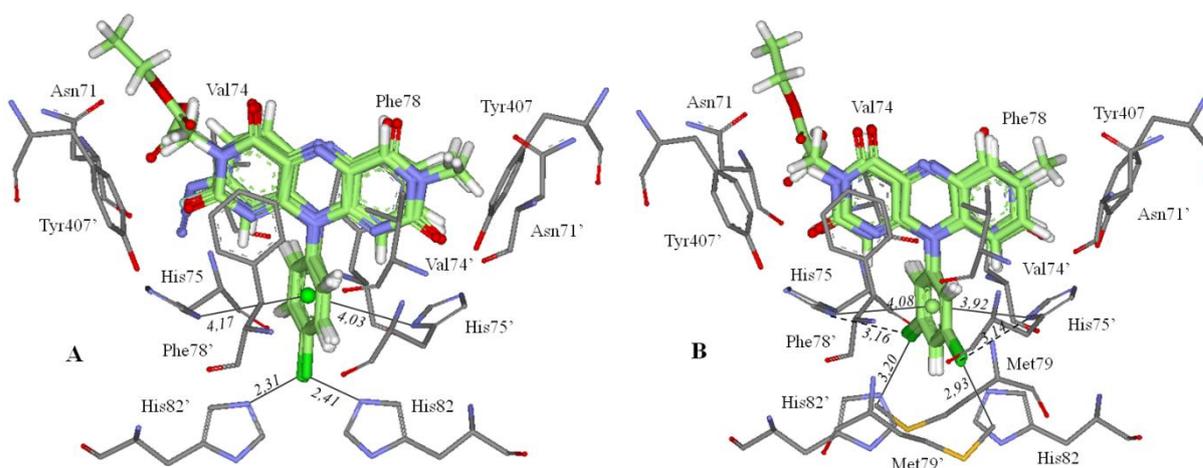


Figura 41 – A. Interações entre o 4'-clorofenil de **2a**, **3a**, **4a**, **5a**, **12** e **14** e o SI da GRh. B. Interações entre o 3',5'-diclorofenil de **2b**, **3b**, **4b** e **5b** e a mesma enzima. Ocorrem duas ligações de H (linhas tracejadas).

Os compostos **2c**, **3c**, **4c** e **5c** apresentam, por sua vez, o substituinte 3'-trifluorometilfenil na posição N10. Por meio deste, faz uma ligação N–H...F com o ND1 da His75 (ou His75' na solução simétrica equivalente) e interações de van der Waals entre seus átomos de flúor e a His75' e Met79' (Fig. 42A). De acordo com estes resultados, estes três substituintes no N10 – 4'-clorofenil, 3',5'-diclorofenil e 3'-trifluorometilfenil – parecem igualmente favoráveis para a inibição desta enzima, o que está de acordo com os dados experimentais presentes na literatura (Tabela 2): o trabalho de Schönleben-Janás et al. (1996) mostra que os derivados 4'-clorofenil, 3',5'-diclorofenil e 3'-trifluorometilfenil são inibidores altamente efetivos da GRh.

2e e **3e** eram os únicos compostos que apresentavam o pentafluorfenil como substituinte na posição N10. Através de seus átomos de flúor, estes compostos fazem interações C–H...F com His75/His75' e Phe78/Phe78', além de interações de van der Waals com a carbonila das cadeias principais de Val74/Val74' e His75/His75' e com o NE2 de His82/His82' (Fig. 42B). Dados de atividade (Tabela 2) mostram que estes dois ligantes também são bons inibidores da GRh.

Os compostos **6** e **7** apresentam os substituintes metilpiridínio-4'-il e metilpiridínio-3'-il, respectivamente, na posição N10. As interações que estes dois substituintes fazem com a enzima são basicamente as mesmas, limitando-se a contatos de van der Waals com Val74/Val74', His75/His75', Phe78/Phe78' e His82/His82'; a diferença entre eles, entretanto, é que **6** pode fazer interações do tipo C–H...N com o NE2 de His82/His82', enquanto **7** faz uma interação C–H...O com a carbonila da His75' (Fig. 43A). Apesar dos bons

resultados de *docking* obtidos para **6** e **7** (resultados comparáveis aos obtidos para as demais ariloxazinas), estes compostos apresentaram baixa atividade na enzima GRh em estudos experimentais descritos na literatura (Tabela 2). Schönleben-Janás et al. (1996) e Sarma et al. (2003) mostraram que a presença de uma carga positiva na cadeia lateral das ariloxazinas, como em **6** e em **7**, não é favorável à inibição da enzima, interferindo na ligação do composto à cavidade. Isto pode ser devido ao fato de que a cavidade da interface é acessível via um canal que liga este sítio ao sítio ativo da enzima, positivamente carregado, o que possivelmente interfere na ligação de inibidores com cargas positivas (BIOT et al., 2004).

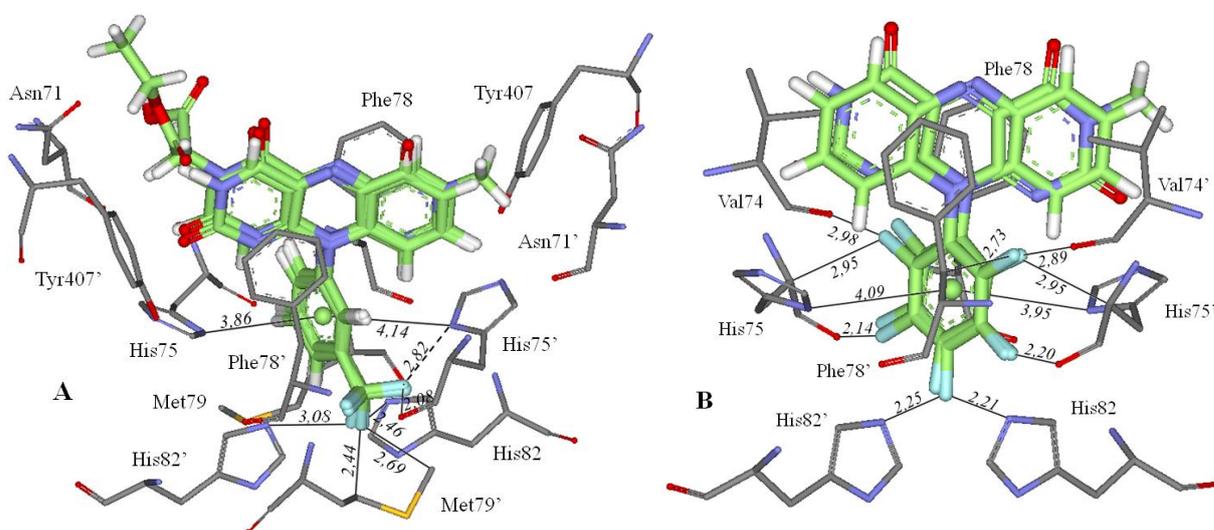


Figura 42 – **A.** Interações entre o 3'-trifluormetilfenil de **2c**, **3c**, **4c** e **5c** e o SI da GRh. Ocorre uma ligação de H entre um dos átomos de flúor e a His75'. **B.** Interações entre o pentafluorfenil de **2e** e **3e** e a GRh.

Já os substituintes 4'-piridil e 3'-piridil de **6a** e **7a**, respectivamente, fazem apenas as interações gerais descritas anteriormente para os substituintes na posição N10; entretanto, **6a** e **7a** possuem um átomo de nitrogênio no substituinte (nas posições 4' e 3', respectivamente) que faz interações de van der Waals com NE2 de His82/His82' no caso de **6a** ou com a carbonila da His75' no caso do **7a** (Fig. 43B); isto também está de acordo com trabalhos que mostram que a inibição da GRh por **6a** e **7a** é comparável a de um composto com um anel fenila no N10, como **18** (SCHÖNLEBEN-JANÁS et al., 1996). Suas atividades inibitórias um pouco mais baixas em relação às ariloxazinas com outros substituintes no N10 (Tabela 2) podem ser devido ao menor volume de 4'-piridil e 3'-piridil, de modo que ocorrem menos interações com as histidinas do sítio.

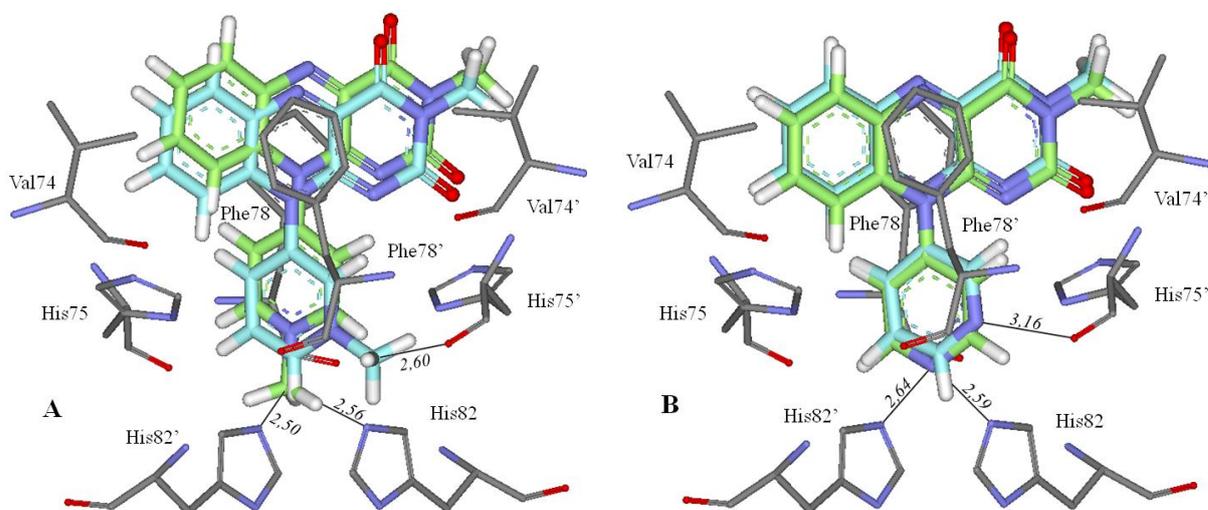


Figura 43 – **A.** Interações entre o metilpiridínio-4'-il de **6** (verde) e metilpiridínio-3'-il de **7** (ciano) e o SI da GRh. **B.** Interações entre o 4'-piridil de **6a** (verde) e 3'-piridil de **7a** (ciano) e o SI da GRh.

O composto **18** apresenta um anel fenila como substituinte no N10, de modo que as únicas interações que este faz com a enzima são as mesmas descritas acima para todos os outros ligantes (Fig. 40): interações de van der Waals com Val74/Val74', His75/His75', Phe78/Phe78' e His82/His82', N–H... π com o ND1 das His75/His75' e interações hidrofóbicas entre este substituinte aromático e a cadeia lateral de Phe78/Phe78' e cadeia principal de His75/His75'.

A presença do substituinte 3',5'-ditrifluorometilfenil volumoso na posição N10 de **2d**, **3d**, **4d** e **5d** fez com que **2d** e **3d** se orientassem de maneira distinta do padrão obtido para os compostos da família das ariloxazinas neste sítio. Isto porque a região do sítio próxima aos pares His75/His75' e His82/His82' parece ser muito “apertada” para receber um substituinte deste volume. Assim, **2d** e **3d** se orientam ainda com a porção isoaloxazina entre Phe78/Phe78', mas apresentam agora o substituinte volumoso da posição N10 voltado para o lado oposto do sítio, entre Leu438 e Leu438' (Fig. 44). Nesta orientação, a porção isoaloxazina de **2d** e **3d** ainda faz a interação π - π com Phe78/Phe78', assim como obtido para as outras ariloxazinas, e, além desta, uma ligação de H com uma molécula de água do sítio através de seu O1 e interações de van der Waals com Asn71/Asn71' e His75/His75' (Fig. 44). Os substituintes da posição N3 destes compostos (H ou metila) estão envolvidos apenas em interações de van der Waals com Asn71', Val74' e Tyr407 (ou Asn71, Val74 e Tyr407' em soluções equivalentes). O 3',5'-ditrifluorometil fenil do N10 destes compostos está envolvido

para se orientar próximo às histidinas do sítio. Desta maneira, sua porção isoaloxazina (inclusive o substituinte metila da posição N3) faz as mesmas interações que as obtidas para **2d** e **3d** (Fig. 45A). Seu 1'-naftil da posição N10, por sua vez, faz interações de van der Waals principalmente com Leu438, Gly439 e Phe78', além de interações C–H...O com algumas moléculas de água do sítio (Fig. 45A).

Diferentemente, **20** se orienta com seu substituinte 1'-antril apolar volumoso da posição N10 entre o par Phe78/Phe78', ocorrendo interações π - π com estes resíduos e interações C–H... π com a metila das cadeias laterais de Val74/Val74' (Fig. 45B). As interações hidrofóbicas parecem importantes para manter o composto nesta posição, uma vez que o 1'-antril apolar orienta-se entre os resíduos Val74/Val74' e Phe78/Phe78' apolares. A porção isoaloxazina de **20**, por sua vez, faz interações de van der Waals com Trp70, Phe78/Phe78', Tyr407', Leu438/Leu438', Gly439, Pro376 e Asp441, além de uma ligação de H entre seu O2 e uma molécula de água (Fig. 45B).

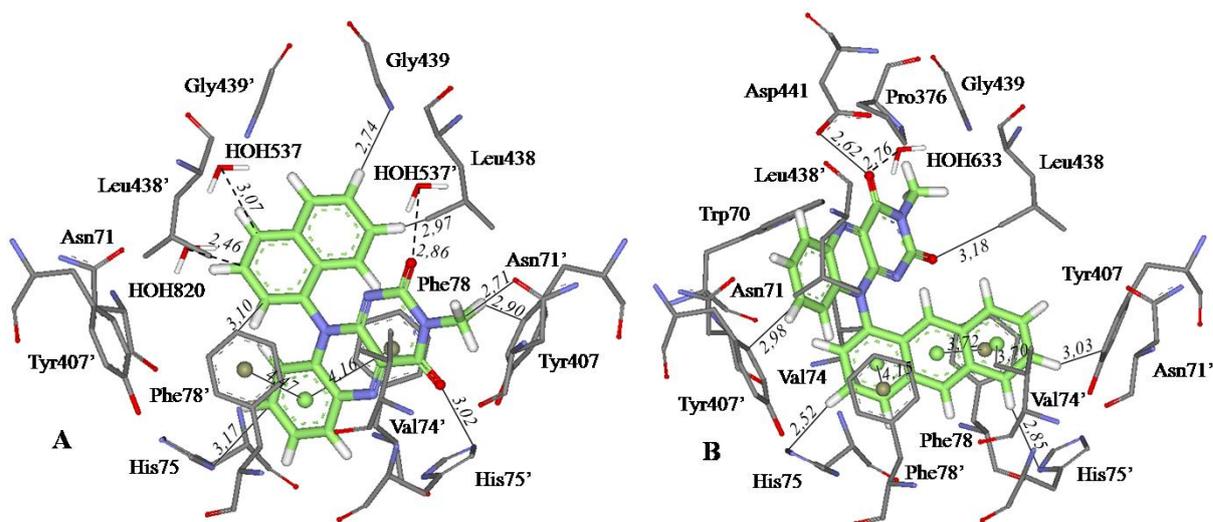


Figura 45 – A. Interações entre **19** e resíduos do SI da GRh. B. Interações entre **20** e a mesma enzima.

Assim, de acordo com os resultados de *docking* as ariloxazinas com substituintes volumosos na posição N10, como **2d**, **3d**, **19** e **20**, orientam-se de maneira distinta, quase que “inversa”, em relação ao modo de ligação padrão obtido para a família de compostos, a fim de se evitar choques estéricos com as histidinas do sítio, mas ainda se mantêm entre o par Phe78/Phe78', onde ocorrem as importantes interações π - π . Isto parece ter sido determinante para estes compostos manterem a boa atividade na enzima GRh, visto que

apresentaram atividade semelhante aos seus correspondentes com substituintes menos volumosos na mesma posição (Tabela 2). Schönleben-Janás et al. (1996) e Sarma et al. (2003) mostraram que mesmo derivados com substituintes volumosos no N10 são bons inibidores da GRh.

De acordo com os resultados obtidos nas simulações computacionais realizadas, o **AM** também se orienta entre o par Phe78/Phe78', assim como as ariloxazinas, onde aparecem interações π - π entre estes resíduos e seu anel aromático (Fig. 46A). Em uma das extremidades do composto, ocorrem interações de van der Waals principalmente com os pares His75/His75' e His82/His82', enquanto que na outra extremidade aparecem interações de van der Waals com Lys67, Trp70, Asn71, Asp441 e Tyr407', além de uma ligação de H entre seu nitrogênio e uma molécula de água do sítio (Fig. 46A). O fato de os escores obtidos para o **AM** (60,99) serem piores do que os obtidos para as ariloxazinas (84,93 – Tabela 3) e, além disso, o encaixe ao sítio e as interações com a enzima não serem muito bons, sugerem que a formação de complexos no SI da GRh é mais favorável para as ariloxazinas do que para o **AM**.

Já para a **CQH**, foi obtido que esta se orienta no SI da GRh com sua porção quinolina em uma posição muito próxima à obtida para a isoaloxazina de **2d**, **3d** e **19**, entre as Phe78/Phe78', de modo que também ocorrem interações π - π com estes resíduos. Esta porção quinolina também está envolvida em interações de van der Waals com His75/His75', Tyr407 e Val74'; seu átomo de cloro interage com a Tyr407 (Fig. 46B). Seu substituinte alifático, por sua vez, está envolvido somente em contatos de van der Waals com Lys67, Asn71, Val74, His75, Phe78/Phe78', Tyr407' e Leu438' em toda sua extensão (Fig. 46B). Assim como foi obtido para as ariloxazinas menos ativas, que apresentavam substituintes volumosos na posição N3, a **CQH** também se ligou ao sítio em uma conformação distinta daquela de mínima energia, em uma conformação estendida, possivelmente a fim de se evitar choques estéricos entre seu substituinte alifático e resíduos do sítio como Phe78' e Leu438'. Assim, apesar de ter sido obtido um bom escore para a **CQH** neste sítio – média de 81,63 –, comparável aos obtidos para as ariloxazinas – média de 84,93 (Tabela 3) –, este inibidor se liga em uma conformação diferente da de mínima energia (do mesmo modo que as ariloxazinas menos ativas) e, além disso, não apresenta uma complementaridade de forma e um encaixe ao sítio tão bom quanto o obtido para as ariloxazinas, mais uma vez sugerindo que a formação do complexo entre a **CQH** e o SI da GRh não é tão favorável quanto a formação do complexo SI GRh-ariloxazinas.

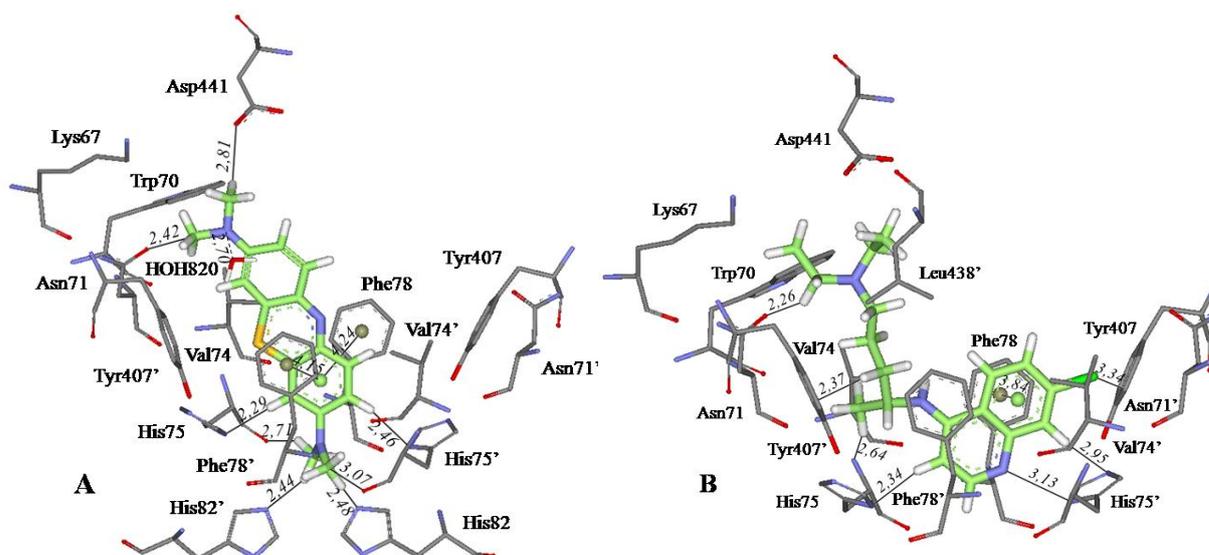


Figura 46 – **A.** Modo de ligação obtido para o **AM** no **SI** da **GRh**. São mostradas as principais interações que faz com a enzima. **B.** Interações entre a **CQH** e o **SI** da **GRh**.

4.3.2.2 Sítio da Interface da Glutathiona Redutase do *P. falciparum*

O **SI** da enzima *GRPf* tornou-se recentemente um alvo atrativo para o *design* de fármacos seletivos à enzima do parasita devido à elucidação de sua estrutura tridimensional e a constatação de que apenas 9, dos 21 resíduos de aminoácidos que compõem este sítio, são conservados entre a enzima humana e a do parasita. Apesar de estas cavidades apresentarem volumes similares, a forma e as características químicas diferem entre ambas. Primeiramente, notou-se que a parte superior da cavidade (em relação à orientação apresentada na Fig. 27) na *GRPf* é menor do que na cavidade da enzima humana e que um maior volume na parte inferior deste sítio na enzima do parasita compensa esta diferença (Fig. 27). Além disso, as cargas elétricas na parede da cavidade também são diferentes, sendo negativa na *GRh* e neutra na *GRPf*. A principal diferença entre estes sítios, entretanto, é que o par Phe78/Phe78', importante por formar um “sanduíche” com inibidores da *GRh* (interações π - π entre a enzima e inibidores com anéis aromáticos), está ausente na *GRPf* – aparece Ile59/Ile59' nesta posição (Fig. 27). Estas diferenças implicam que o modo de ligação de inibidores na *GRPf* não pode ser inferido diretamente, de maneira confiável, somente a partir de complexos dos mesmos inibidores com a *GRh* (SARMA et al., 2003; KRAUTH-SIEGEL, SCHIRMER e BAUER, 2005).

Em experimentos de marcação por fotoafinidade descritos na literatura utilizando o composto **12** da família das ariloxazinas, mais de 50% dos marcadores ficaram próximos aos segmentos p(49-84) e p(410-430) da *GRPf* – estes peptídeos marcados contêm resíduos que delimitam o SI desta enzima, indicando que as ariloxazinas possivelmente se ligam a este sítio (SARMA et al., 2003). Ainda, sabe-se que a *GRPf* é um alvo do **AM**, um antimalárico que inibe eficientemente esta enzima, e evidências indiretas mostram que o SI é o sítio de ligação deste inibidor na *GRPf*; a GR é a única proteína, até o momento, identificada como alvo deste composto no parasita (FÄRBER et al., 1998; SARMA et al., 2003). Dada a inexistência de estruturas cristalográficas de complexos *GRPf*-ariloxazinas ou *GRPf*-azul de metileno, daí a importância de se elucidar o modo de ligação destes inibidores através de *docking* molecular.

Novamente, a explicação de como a ligação de um composto nesta cavidade pode inibir a atividade da enzima é que alguns dos resíduos que compõem o SI e o par redoxativo do sítio ativo da *GRPf* Cys39/Cys44 são constituintes da mesma hélice α (resíduos 37-62). Assim como descrito para a GRh, a ligação de compostos no SI da *GRPf* também pode influenciar a catálise através da alteração da distribuição eletrônica no sítio ativo (SCHÖNLEBEN-JANAS et al., 1996; VEGA-TEIJIDO, CARACELLI e ZUKERMAN-SCHPECTOR, 2006).

A partir dos cálculos de *docking* foi possível sugerir o modo de ligação dos compostos da família das ariloxazinas, do **AM** e da **CQH** no SI da *GRPf*.

A média dos escores obtidos para as ariloxazinas neste sítio, calculada utilizando a função *GoldScore* do programa GOLD 4.0.1 (JONES, WILLET e GLEN, 1995; JONES et al., 1997), foi de 71,87, para o **AM** foi de 50,45 e para a **CQH** foi de 63,41 (Tabela 3). Como já citado anteriormente, estes valores podem sugerir que a afinidade das ariloxazinas pelo SI da *GRPf* é maior do que a do azul de metileno e da cloroquina, mas somente este valor de escore não é parâmetro suficiente para se estimar afinidade de ligação e, portanto, foram analisadas também as orientações obtidas para os inibidores no SI da *GRPf*.

Foi obtido que todas as ariloxazinas estudadas orientam-se da mesma maneira na cavidade da interface, indicando ser este o modo de ligação padrão destes ligantes neste sítio. Assim como foi obtido para o SI da GRh, aqui também foram encontradas sempre duas soluções simétricas equivalentes, uma vez que este sítio também é simétrico, formado pelos mesmos resíduos das duas subunidades da enzima. No padrão de ligação obtido para as ariloxazinas, a porção isoaloxazina destes inibidores encontra-se entre os resíduos Ser55 e Leu455 (ou Ser55' e Leu455' nas soluções “espelho” equivalentes) e com o substituinte

aromático da posição N10 voltado para o par Ile59/Ile59' e entre Phe420/Phe420' (Fig. 47). Dependendo da natureza do substituinte da posição N3 destes inibidores, este substituinte pode ficar ou voltado para o Asp458 (ou Asp458') ou próximo ao Asp58 (ou Asp58') (Fig. 47).

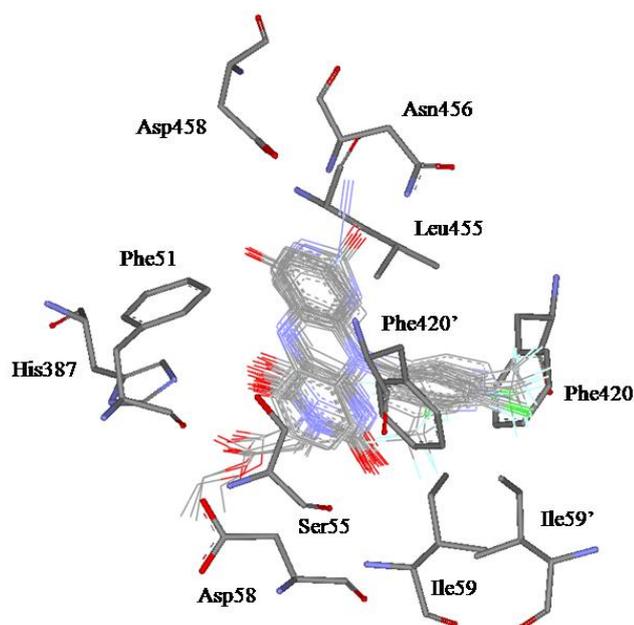


Figura 47 – Modo de ligação padrão obtido para as ariloxazinas no SI da GRP.

De acordo com os resultados de *docking*, somente quando o substituinte na posição N3 das ariloxazinas é um átomo de hidrogênio – compostos **2a**, **2b**, **2c**, **2d** e **2e** – a porção isoaloxazina se orienta de modo que este substituinte fica voltado para o Asp458 (ou Asp458'). Nesta orientação, os inibidores **2a**, **2b**, **2c**, **2d** e **2e** fazem uma ligação de H entre seu átomo N3 e o OD1 do Asp458 (Fig. 48A). Além desta, ocorrem, ainda, ligações de H entre o O1 da porção isoaloxazina e o ND2 da Asn456, entre o mesmo O1 e uma das moléculas de água do sítio e uma possível ligação de H do tipo C–H...O entre seu O2 e a cadeia lateral da Pro389 (Fig. 48A). Por fim, ocorrem interações de van der Waals entre a porção isoaloxazina destes compostos e resíduos do sítio, como Phe51, Ser55, Asp58, Ile59, His387, Pro389, Leu455, Asn456 e Asp458. Pelos dados de atividade de Sarma et al. (2003), os compostos com um H na posição N3 são os inibidores mais efetivos na GRP (Tabela 2).

Os inibidores da família das ariloxazinas que apresentam um grupo metila na posição N3, como é o caso de **3a**, **3b**, **3c**, **3d**, **3e**, **6**, **6a**, **7**, **7a**, **12**, **14**, **18**, **19** e **20**, orientam-

se com este substituinte voltado para o lado oposto ao obtido para os que apresentam um H na mesma posição: voltado para Asp58 (ou Asp58'). A porção isoaloxazina destes inibidores se sobrepõe ao obtido para **2a**, **2b**, **2c**, **2d** e **2e**, mas fica com o substituinte do N3 voltado para o lado oposto, em uma orientação “inversa” (Fig. 48B); isto parece ser devido à presença da metila na posição N3, a qual impede que ocorra a ligação de H com Asp458 obtida para os inibidores com um átomo de H nesta mesma posição, fazendo com que seja mais favorável que estes ligantes se orientem de maneira “inversa” em relação aos anteriores. Nesta orientação, o substituinte metila do N3 faz apenas interações de van der Waals com Asp58 e Phe421 (ou Asp58' e Phe421' nas soluções equivalentes obtidas). No geral, a porção isoaloxazina destes inibidores faz ligações de H entre o O2 e uma molécula de água do sítio e entre o O1 e o OH da Tyr424 (Fig. 48B). Também aparece uma interação do tipo C–H... π entre o anel aromático da porção isoaloxazina dos inibidores e a metila da cadeia lateral de Leu455. Além destas, ocorrem ainda as interações de van der Waals com Phe51, Ser55, Asp58, Ile59, His387, Pro389, Leu455, Asn456 e Asp458.

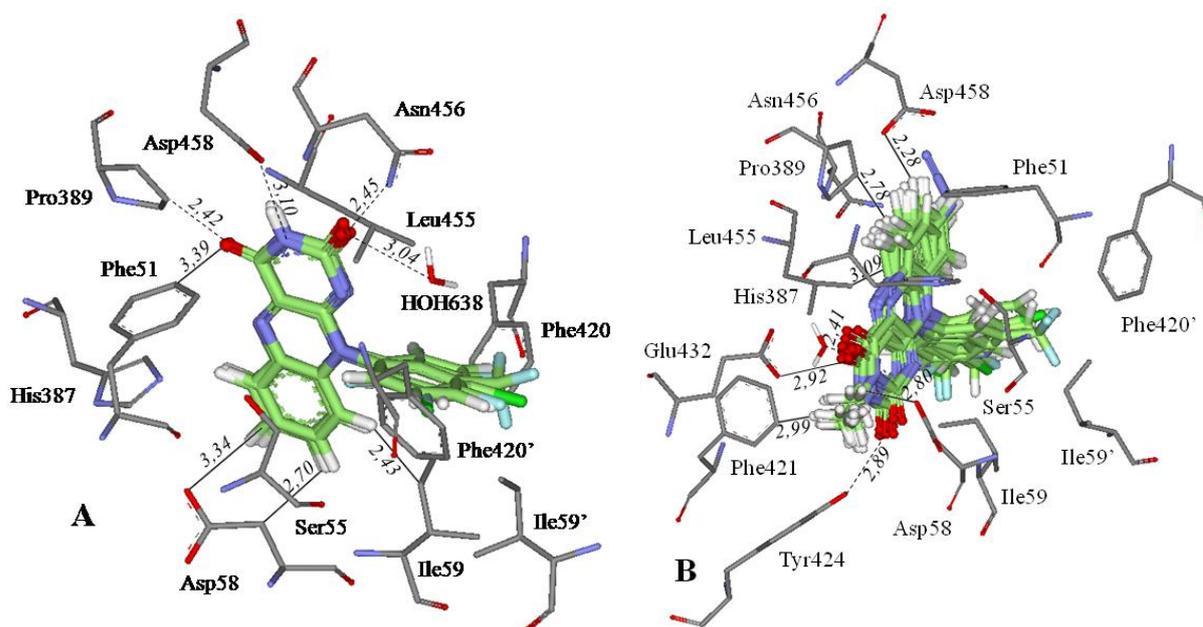


Figura 48 – A. Compostos **2a**, **2b**, **2c**, **2d** e **2e** no SI da GRP78. É dado destaque para as interações que a porção isoaloxazina e o substituinte da posição N3 fazem com a enzima. As linhas tracejadas representam ligações de H. B. Principais interações entre a porção isoaloxazina e metila da posição N3 de **3a**, **3b**, **3c**, **3d**, **3e**, **6**, **6a**, **7**, **7a**, **12**, **14**, **18**, **19** e **20** e o SI da GRP78.

Os compostos **12** e **14** eram os únicos da série que apresentavam substituintes também na posição C8. **12** apresenta uma azida positivamente carregada nesta

posição, a qual orienta-se próxima ao Asp458 negativamente carregado; através dos átomos de nitrogênio deste substituinte, o inibidor faz ligações de H com uma molécula de água do sítio e com o ND2 da Asn456 (Fig. 49). O inibidor **14**, por sua vez, apresenta um átomo de flúor na mesma posição, através do qual possivelmente também faz ligações de H com a mesma molécula de água e com o ND2 da Asn456 (Fig. 49).

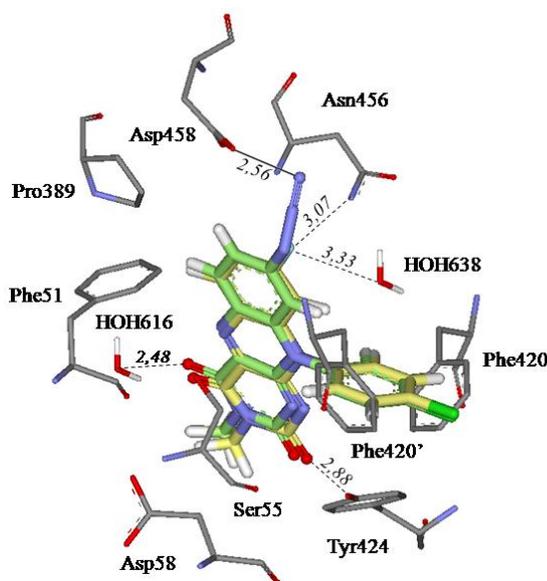


Figura 49 – Principais interações que a azida de **12** (verde) e o flúor de **14** (amarelo) fazem com a enzima. Também são mostradas as ligações de H que a porção isoaloxazina destes inibidores faz.

Pela análise dos resultados de *docking*, das orientações obtidas para estes inibidores e as interações que estes fazem com a enzima, é possível sugerir que a presença de um átomo de H como substituinte na posição N3 é mais favorável para a inibição da GRP*f* do que uma metila na mesma posição. Apesar disto, os compostos **12** e **14**, que apresentam a metila como substituinte no N3, possuem substituintes na posição C8 que fazem ligações de H com a enzima e, por conta disto, sugere-se que sejam tão bons inibidores quanto aqueles com um H na posição N3; assim, a introdução destes substituintes na posição C8 dos inibidores parece ser favorável à inibição da GRP*f*. Estes resultados estão de acordo com os dados de atividade (Tabela 2) presentes na literatura (SARMA et al., 2003).

Alguns ligantes possuíam substituintes mais volumosos na posição N3, como era o caso de **4a**, **4b**, **4c** e **4d**, que apresentam um (etoxicarbonil)metil nesta posição, e **5a**, **5b**, **5c** e **5d**, que apresentam, por sua vez, um carboximetil. Para estes compostos, foi obtido que eles se orientam com sua porção isoaloxazina se sobrepondo ao obtido para os que

apresentam uma metila no N3, fazendo, no geral, as mesmas interações descritas acima para **3a**, **3b**, **3c**, **3d**, **3e**, **6**, **6a**, **7**, **7a**, **12**, **14**, **18**, **19** e **20** (ligações de H e interações de van der Waals). Os substituintes da posição N3 destes compostos, entretanto, orientam-se voltados para a Arg196 positivamente carregada, de modo a fazerem uma ligação de H entre um dos átomos de oxigênio destes substituintes e uma molécula de água do sítio, além de interações de van der Waals com Asp58, Arg196, Glu432 e, algumas vezes, Asn229 (Fig. 50). Apesar disto, os substituintes volumosos localizam-se em uma pequena cavidade delimitada por Asp58, Arg196, Asn229 e Glu432 de modo que, a fim de se “encaixar” nesta cavidade fazendo as interações citadas, os inibidores não se ligam à enzima em sua conformação de mínima energia, o que parece ter sido responsável por estes compostos terem apresentado, no geral, atividades mais baixas do que inibidores com substituintes menos volumosos nesta mesma posição (Tabela 2). Resultado semelhante foi obtido e descrito para estes mesmos compostos no SI da GRh.

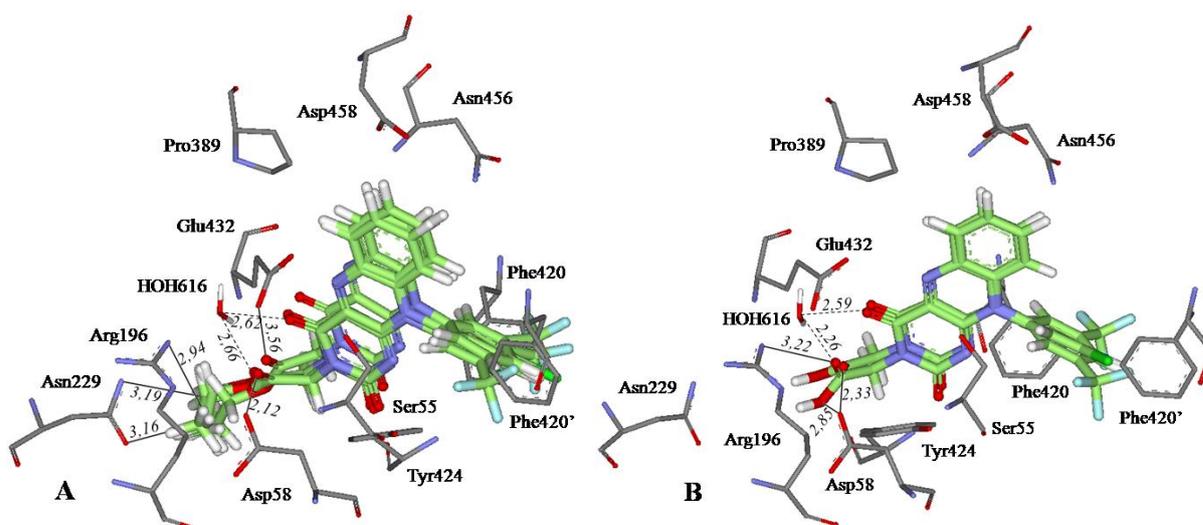


Figura 50 – A. Principais interações entre o (etoxicarbonil)metil de **4a**, **4b**, **4c** e **4d** e o SI da GRPp. B. Principais interações entre o (etoxicarbonil)metil de **5a**, **5b**, **5c** e **5d** e o SI da mesma enzima.

Foi obtido também que o substituinte aromático da posição N10 dos inibidores da família das ariloxazinas orienta-se entre o par Phe420/Phe420', próximo à Ile59/Ile59', segundo os resultados de *docking* (Fig. 47 e Fig. 51). Nesta posição, estes substituintes fazem principalmente interações de van der Waals com os pares de resíduos Ser55/Ser55', Ile59/Ile59' e Phe420/Phe420'; além disso, como o substituinte aromático dos inibidores fica quase que perpendicular às cadeias laterais aromáticas de Phe420/Phe420',

muitas vezes ocorrem interações com os elétrons π dos anéis deste par de aminoácidos (Fig. 51). As interações hidrofóbicas também parecem importantes para manter alguns destes substituintes aromáticos nesta posição, visto que se orientam em uma cavidade delimitada pelos resíduos apolares Ile59/Ile59' e Phe420/Phe420'.

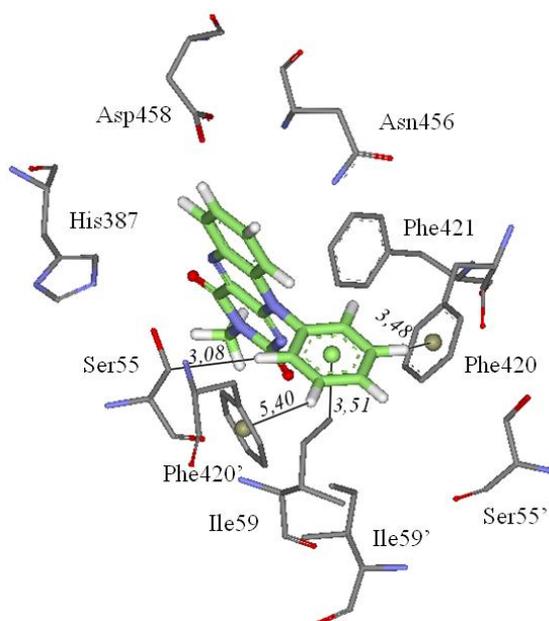


Figura 51 – Principais interações entre o substituinte fenil da posição N10 de **18** e o SI da GRPp. Estas interações foram encontradas para todos os substituintes aromáticos das ariloxazinas.

O 4'-clorofenil da posição N10 de **2a**, **3a**, **4a**, **5a**, **12** e **14**, além das interações de van der Waals com Ser55/Ser55', Ile59/Ile59' e Phe420/Phe420' descritas acima, apresenta um átomo de cloro que interage com Ser55 (ou Ser55') e Ile59 (ou Ile59') (Fig. 52A). O 3',5'-diclorofenil de **2b**, **3b**, **4b** e **5b** ocupa posição semelhante no sítio; entretanto, como os átomos de cloro agora estão em posições diferentes no anel, desta vez estes fazem interações de van der Waals principalmente com Ile59/Ile59' e Phe420/Phe420', além de apontarem e interagirem com o sistema π da cadeia lateral destes resíduos aromáticos (Fig. 52B). Por conta disto, sugere-se que o 3',5'-diclorofenil seja mais favorável no N10 do que o 4'-clorofenil.

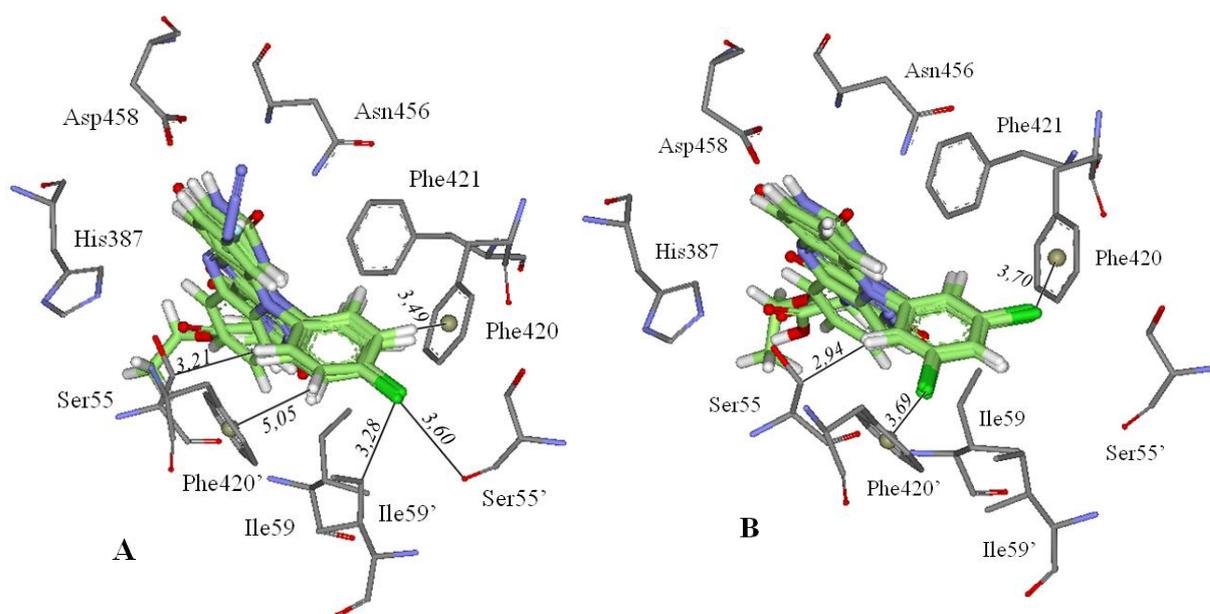


Figura 52 – Em **A**, temos as principais interações entre o 4'-clorofenil de **2a**, **3a**, **4a**, **5a**, **12** e **14** e o SI da *GRP78*. Em **B**, as interações entre o 3',5'-diclorofenil de **2b**, **3b**, **4b** e **5b** e a mesma enzima.

Os ligantes **2c**, **3c**, **4c** e **5c** apresentam um 3'-trifluorometilfenil na posição N10; os átomos de flúor deste substituinte fazem interações de van der Waals com Ser55, Val56, Ile59' e Phe420', além de uma ligação de H com uma molécula de água do sítio (Fig. 53A). Já os compostos **2d**, **3d**, **4d** e **5d** apresentam o 3',5'-ditrifluorometilfenil ainda mais volumoso nesta mesma posição N10; através deste, faz ligações de H entre seus átomos de flúor e moléculas de água, além de interações de van der Waals principalmente com Val56/Val56', Ile59/Ile59' e Phe420/Phe420' (Fig. 53B). Entretanto, estes substituintes volumosos nesta posição não parecem adequados para inibir a *GRP78*, principalmente quando o inibidor também possui um substituinte volumoso na posição N3, visto que **4c** apresentou atividade muito baixa nesta enzima (Tabela 2), segundo dados presentes na literatura (SARMA et al., 2003).

2e e **3e** possuem um pentafluorfenil como substituinte na posição N10. Através dos átomos de flúor deste substituinte, ocorre uma ligação de H com uma molécula de água do sítio e interações de van der Waals principalmente com Ser55/Ser55', Ile59/Ile59' e Phe420/Phe420' (Fig. 54). Dois dos átomos de flúor apontam para a face dos anéis do par Phe420/Phe420', possivelmente ocorrendo interações com os sistemas π destes resíduos (Fig. 54). Estas interações parecem ter sido determinantes para que **2e** apresentasse boa atividade; segundo dados (Tabela 2) presentes na literatura (SARMA et al., 2003), este substituinte

pentafluorfenil no N10 é o mais efetivo para se inibir a *GRPf* – estes dados apontam, inclusive, que **2e** é mais efetivo na *GRPf* do que na GRh.

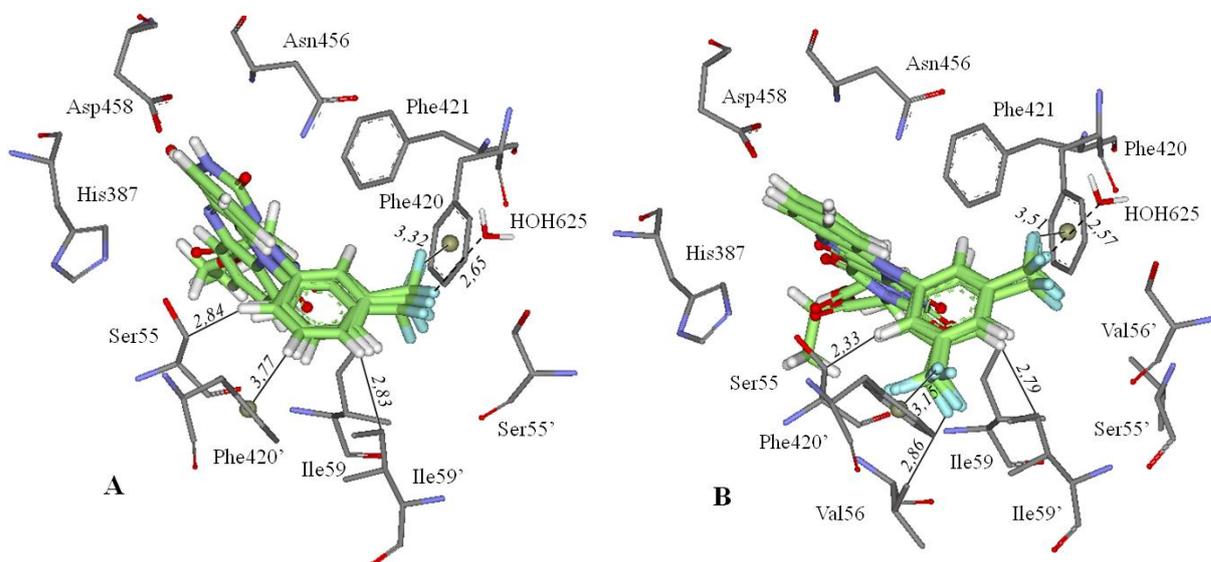


Figura 53 – A. Algumas das interações entre o substituinte 3'-trifluormetilfenil de **2c**, **3c**, **4c** e **5c** e o SI da *GRPf*. B. Interações entre o 3',5'-difluormetilfenil de **2d**, **3d**, **4d** e **5d** e a *GRPf*.

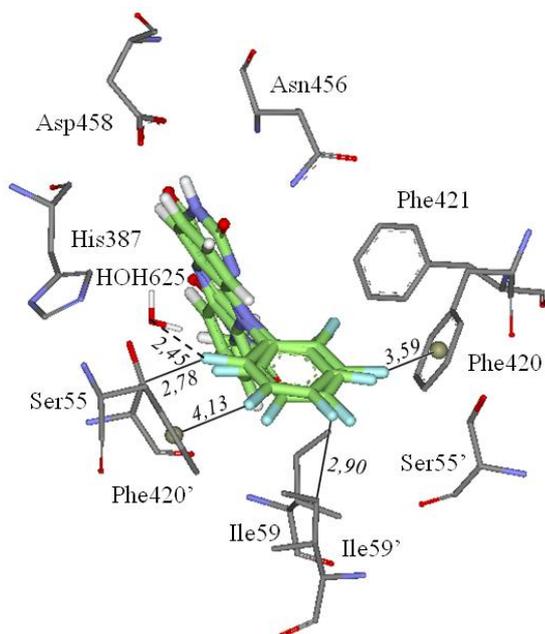


Figura 54 – Principais interações entre o substituinte pentafluorfenil de **2e** e **3e** e o SI da *GRPf*.

Os compostos **6** e **7** apresentam, respectivamente, os substituintes metilpiridínio-4'-il e metilpiridínio-3'-il na posição N10. Estes substituintes fazem apenas as interações de van der Waals com os mesmos resíduos já descritos para outros compostos, como Ser55/Ser55', Val56/Val56', Ile59/Ile59' e Phe420/Phe420' (Fig. 55A). Entretanto, sabe-se que **6** é um inibidor fraco da GRP*f* (Tabela 2), segundo aparece na literatura (SARMA et al., 2003). Sarma et al. (2003) mostraram que a presença de uma carga positiva na cadeia lateral das ariloxazinas, como em **6** e em **7**, não é favorável para a ligação do composto à cavidade. Sugere-se, novamente, que isto seja devido ao fato de que o SI é acessível através de um canal que liga esta cavidade ao sítio ativo da enzima, positivamente carregado, o que provavelmente deve interferir na ligação de inibidores com cargas positivas (BIOT et al., 2004), assim como também ocorreu para estes compostos no SI da GRh.

As interações que os substituintes 4'-piridil e 3'-piridil de **6a** e **7a**, respectivamente, fazem com a enzima também são apenas de van der Waals, com os mesmos resíduos já citados anteriormente: Ser55/Ser55', Ile59/Ile59' e Phe420/Phe420' (Fig. 55B). O mesmo ocorre para **18** (Fig. 51), que apresenta um anel fenila na mesma posição; as interações hidrofóbicas ganham em importância, já que este substituinte apolar é rodeado por aminoácidos também apolares, como os pares Ile59/Ile59' e Phe420/Phe420'.

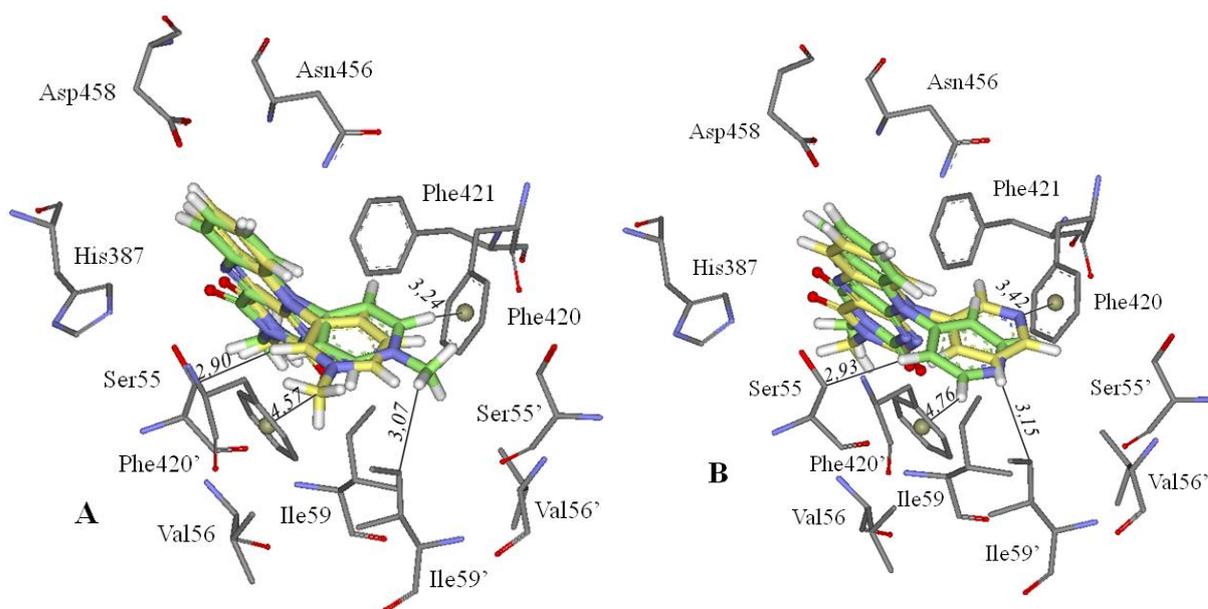


Figura 55 – **A.** Principais interações entre o metilpiridínio-4'-il e metilpiridínio-3'-il de **6** (verde) e **7** (amarelo), respectivamente, e o SI da GRP*f*. **B.** Interações entre o 4'-piridil de **6a** (amarelo) e 3'-piridil de **7a** (amarelo) e o mesmo sítio.

Um substituinte volumoso e apolar aparece na posição N10 de **19** – o 1'-naftil. Este também se orienta entre o par Phe420/Phe420', ficando com seus anéis aromáticos perpendiculares às cadeias laterais aromáticas destes resíduos, formando um “sanduíche” com estas e interagindo com os elétrons π dos anéis das fenilalaninas (Fig. 56A). Mais uma vez, as interações hidrofóbicas entre esta região apolar do ligante e os resíduos apolares do sítio (principalmente Ile59/Ile59' e Phe420/Phe420') parecem essenciais para manter o inibidor nesta posição. O substituinte 1'-antril de **20**, por sua vez, é demasiadamente volumoso para se orientar entre o par Phe420/Phe420', de modo que orienta-se de maneira “inclinada” em relação ao obtido para o 1'-naftil de **19**, não ficando perpendicular em relação à cadeia lateral aromática das fenilalaninas do sítio e não interagindo com estas (Fig. 56B). Esta orientação obtida para **20**, onde o substituinte aromático do N10 não fica entre o par Phe420/Phe420' e não interage com este, parece não ser adequada para inibir esta enzima, o que está de acordo com dados que mostram que **20** apresenta fraca inibição da GRP*f* (Tabela 2).

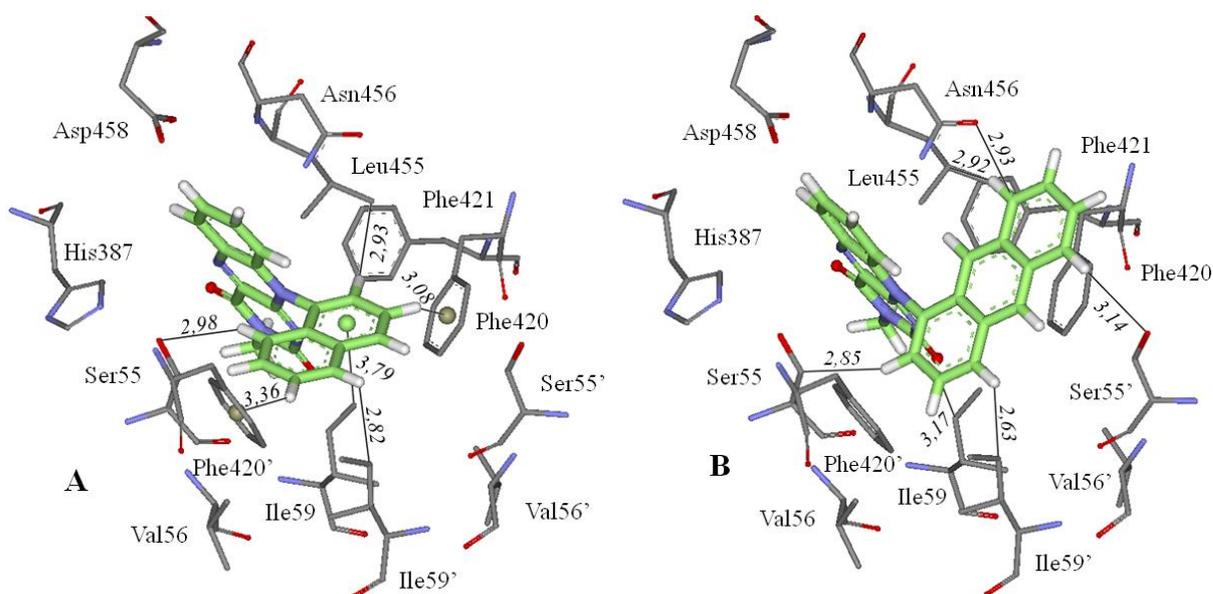


Figura 56 – A. Principais interações entre o substituinte 1'-naftil da posição N10 de **19** e o SI da GRP*f*. B. Interações entre o 1'-antril de **20** e a mesma enzima. Note como este substituinte volumoso não mais se orienta de forma perpendicular ao par Phe420/Phe420'.

Com base nestes resultados de *docking*, juntamente com dados de atividade presentes na literatura (SARMA et al., 2003), é possível sugerir que os substituintes mais favoráveis na posição N10 para a inibição da GRP*f* são aqueles que apresentam átomos de cloro ou flúor nas posições 3' e 5' do anel, como o 3',5'-diclorofenil e o pentafluorfenil, pois

orientam-se de modo que estes átomos apontam e interagem com os elétrons π do par Phe420/Phe420', formando um "sanduíche" com estes resíduos. Ainda, sugere-se que o pentafluorfenil seja ainda mais favorável do que o 3',5'-diclorofenil nesta posição pois, além destas interações as fenilalaninas, faz uma ligação de H com uma molécula de água do sítio através de um de seus átomos de flúor.

Por meio destes estudos de *docking*, foi possível elucidar também o possível modo de ligação do **azul de metileno (AM)** ao SI da *GRPf*. Como foi citado anteriormente, já se sabe que a enzima *GRPf* é um alvo do **AM** e existem evidências indiretas sugerindo que este inibidor se liga ao SI desta enzima (FÄRBER et al., 1998; SARMA et al., 2003), embora seu modo de ligação ainda não seja conhecido. Desta maneira, sugere-se, a partir dos resultados obtidos, que o **AM** orienta-se em uma região do sítio próxima ao obtido para a porção isoaloxazina das ariloxazinas, de modo que seu átomo de enxofre interage com o Glu432 (ou Glu432') (Fig. 57). Seu anel aromático fica perpendicular à cadeia lateral da Phe421, ocorrendo uma interação do tipo C-H... π . Também aparece uma ligação de H do tipo C-H...O com a Asn62 (Fig. 57). Além destas, ainda ocorrem interações de van der Waals com diversos resíduos do sítio, como Phe51, Ser55, Asp58, Ile59, Asn62, Phe421, Tyr424, Glu432, Leu455 e Asn456.

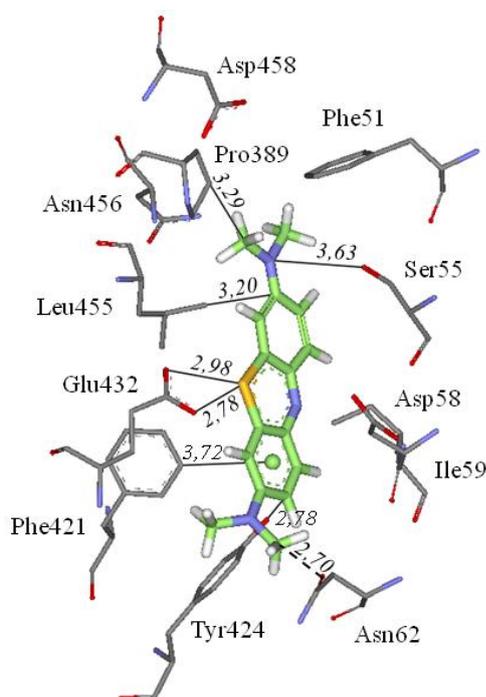


Figura 57 – Modo de ligação obtido para o inibidor **AM** no SI da *GRPf*.

Não foram obtidos bons resultados para a **cloroquina (CQH)** no SI da *GRPf*. As soluções (orientações + conformações) obtidas para este ligante neste sítio foram aleatórias, não sendo possível reconhecer um padrão de orientações que se repetisse, o que indica que a formação do complexo *GRPf-CQH* não é provável e que este composto possivelmente não inibe esta enzima.

4.3.2.3 Sítio Ativo da Glutathione Redutase humana e do *P. falciparum*

Apesar das diversas evidências apontando que as ariloxazinas inibem as GRs humana e do *P. falciparum* de forma não-competitiva e que provavelmente se ligam ao sítio da interface destas enzimas (SCHÖNLEBEN-JANAS et al., 1996; SARMA et al., 2003), foi feito o estudo de *docking* destes inibidores também no sítio ativo (SA) destas enzimas, a fim de se verificar a possibilidade de ser este sítio o alvo dos ligantes desta família. Além disso, também foi feita a simulação da **CQH** no SA das GRs, uma vez que o mecanismo molecular pelo qual este composto exerce seu efeito sobre o *P. falciparum* ainda não está claro (FOLEY e TILLEY, 1998; READ et al., 1999; DAVIOUD-CHARVET et al., 2001; OLLIARO, 2001; GINSBURG, 2002).

Com a elucidação da estrutura tridimensional da enzima *GRPf*, ficou claro que o SA das enzimas GRh e *GRPf* são extremamente semelhantes, com resíduos conservados entre ambos. No sítio de ligação do substrato GSSG, apenas um resíduo não é idêntico entre as enzimas: a Met406' da GRh é substituída por Leu419' na *GRPf* (Fig. 58). Em uma inspeção da estrutura cristalográfica das enzimas GRh e *GRPf* não foram encontradas diferenças suficientes entre estes sítios que pudessem sugerir um modo de ligação do substrato diferente entre estas enzimas (SARMA et al., 2003).

A estrutura tridimensional da *GRPf* depositada no PDB (PDB – www.rcsb.org/pdb), sob o código *Ionf* (SARMA et al., 2003), não possui o substrato complexado ao SA. Os cálculos de *docking* permitiram posicionar corretamente o substrato GSSG, retirado do SA da GRh sob o código *Igra* no PDB (KARPLUS e SCHULZ, 1989), no SA da enzima do parasita (Fig. 58). Foi verificado que este substrato orienta-se no SA da *GRPf* na mesma posição em que se liga à enzima humana, fazendo as mesmas interações com resíduos da enzima, o que já era esperado dada a grande semelhança entre os dois sítios. As

principais interações que a GSSG faz no SA da GRh foram recriadas no sítio da enzima do parasita por meio de cálculos de *docking* (Fig. 58).

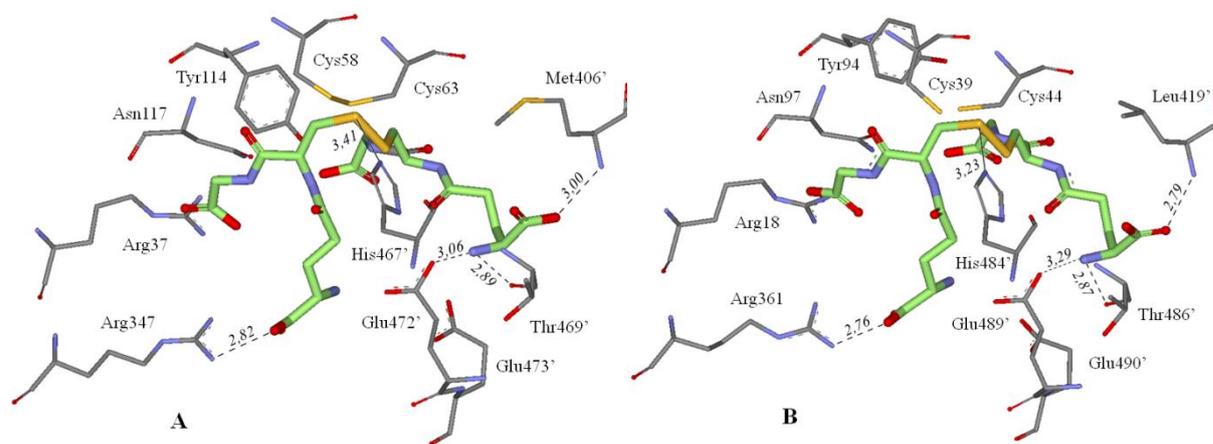


Figura 58 – **A.** Orientação cristalográfica do substrato GSSG no SA da GRh (código *1gra* no PDB). **B.** Orientação da GSSG no SA da GRPf, obtida por meio de *docking*. São destacadas algumas das principais ligações de H (linhas tracejadas) recriadas no *docking*. Note como neste sítio somente o resíduo Met406' da GRh não é conservado na enzima do parasita (substituída por Leu419').

Para os ligantes da família das ariloxazinas, obteve-se que todos eles se orientam da mesma maneira, tanto no SA da GRh quanto no SA da GRPf. Os escores obtidos nas simulações nestes sítios aparecem na Tabela 4. Os resultados sugerem que estes ligantes apresentam um mesmo modo de ligação no SA das enzimas humana e do *P. falciparum*, fazendo as mesmas interações com resíduos destas enzimas (Fig. 59). Isto pode ser facilmente explicado pela grande semelhança existente entre os dois sítios; o único resíduo de aminoácido que difere entre estes sítios – Leu419' na GRPf no lugar da Met406' da GRh (Fig. 58) – fica distante e não interage com as ariloxazinas, conforme indicam os resultados de *docking*, daí os compostos se orientarem da mesma maneira no SA das duas enzimas. Isto não é desejado, pois o interessante é inibir apenas a enzima do parasita, sem interferir no funcionamento normal da humana.

No modo de ligação padrão obtido para as ariloxazinas no SA da GRh e da GRPf, estes compostos se orientam com sua porção isoaloxazina próxima às Arg37 e Arg347 na GRh – equivalentes a Arg18 e Arg361 na GRPf – e com o substituinte aromático da posição N10 apontando para o par redox-ativo Cys58-Cys63 da enzima humana (Cys39-Cys44 na GRPf) (Fig. 59). Neste padrão, as principais interações que aparecem são as ligações de H entre a cadeia lateral positivamente carregada da Arg347 da GRh (Arg361 na

GRPf) e os átomos O2 e N3 da porção isoaloxazina dos ligantes; também podem ocorrer ligações de H entre a hidroxila da Ser30 (Ser11 na GRPf) e átomos de cloro ou flúor dos substituintes 3',5'-diclorofenil e pentafluorfenil aromáticos da posição N10 de alguns compostos e entre a hidroxila da Tyr114 (Tyr94 na GRPf) e átomos de flúor do pentafluorfenil de **2e** (Fig. 59). Além disso, ocorrem interações de van der Waals com resíduos reconhecidamente importantes para a catálise da enzima, como Arg37, Cys58, Cys63, Tyr114, Arg347, His467', Glu472' (Arg18, Cys39, Cys44, Tyr94, Arg361, His484' e Glu489' na GRPf), entre outros (PAI e SCHULZ, 1983; JANES e SCHULZ, 1990; SAVVIDES e KARPLUS, 1996; BÖHME et al., 2000).

Tabela 4 – Escores e $\Delta G_{\text{binding}}$ obtidos para os complexos formados entre o SA da GRh e GRPf e compostos da família das ariloxazinas e CQH.

Composto	Substituinte no N3	Substituinte no N10	Escore ^a no SA da GRh	ΔG^b para o SA da GRh (kcal/mol)	Escore ^a no SA da GRPf	ΔG^b para o SA da GRPf (kcal/mol)
2a	H	4'-Clorofenil	49,70	-7,61	39,61	-6,52
2e	H	Pentafluorfenil	42,64	-6,85	33,15	-5,83
4b	(Etotoxicarbonil)metil	3',5'-Diclorofenil	50,34	-7,68	40,94	-6,67
4c	(Etotoxicarbonil)metil	3'-Trifluormetilfenil	51,23	-7,77	42,94	-6,88
5b	Carboximetil	3',5'-Diclorofenil	59,35	-8,65	48,24	-7,45
6	Metil	Metilpiridínio-4'-il	43,12	-6,90	36,60	-6,20
6a	Metil	4'-Piridil	44,14	-7,01	36,19	-6,16
12	3-Metil (e 8-azida)	4'-Clorofenil	46,39	-7,25	40,91	-6,66
14	3-Metil (e 8-flúor)	4'-Clorofenil	43,39	-6,93	38,66	-6,42
19	Metil	1'-Naftil	46,69	-7,28	38,95	-6,45
20	Metil	1'-Antril	52,25	-7,88	42,02	-6,78
CQH	-	-	38,48	-6,40	31,50	-5,65
GSSG^c	-	-	60,29	-8,75	60,32	-8,75

^a Média dos escores das soluções obtidas, calculados utilizando a função *GoldScore* implementada no programa GOLD 4.0.1 (JONES, WILLETT e GLEN, 1995; JONES et al., 1997).

^b Média da variação da energia livre de ligação obtida a partir dos escores dados pela função *GoldScore*.

^c *Redocking* da GSSG no SA da GRh e *docking* no SA da GRPf.

Estes resultados também corroboram as evidências de que o SA não é o alvo principal das ariloxazinas nas GRs, pois os dados experimentais de inibição mostraram que estes ligantes apresentam diferentes atividades na GRh e na GRPf (Tabela 2), enquanto que os resultados de *docking* indicam que, se o SA fosse o alvo principal destes compostos, possivelmente a atividade das ariloxazinas seria a mesma nas duas enzimas, já que os sítios são praticamente idênticos (substituição de apenas um aminoácido) e o modo de ligação e as interações entre os inibidores e as enzimas são os mesmos.

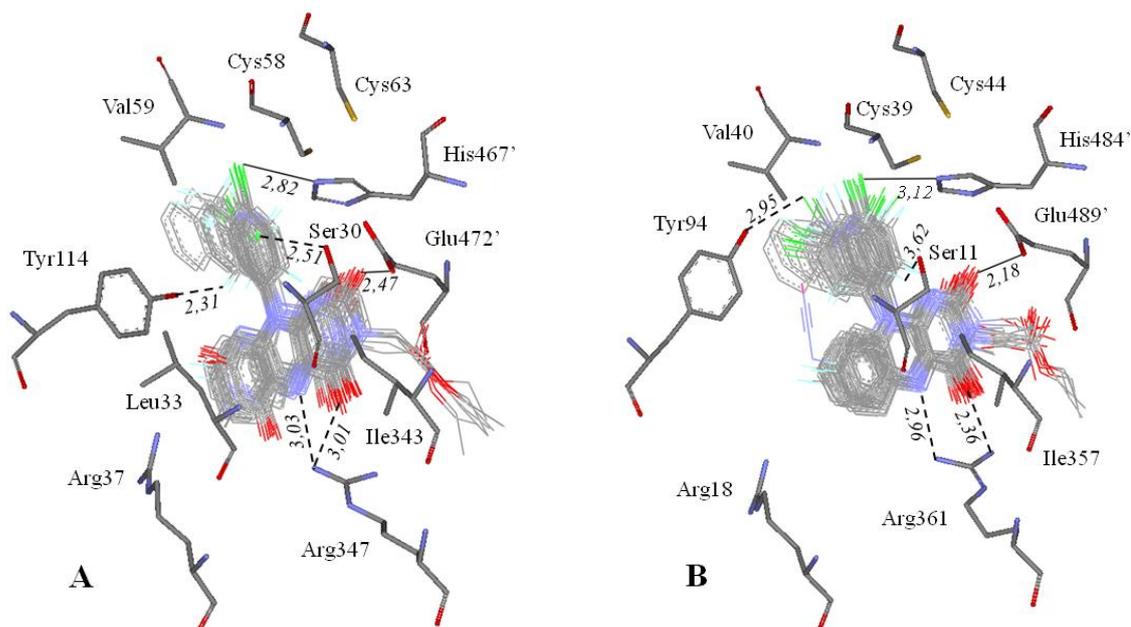


Figura 59 – Modo de ligação obtido para as ariloxazinas no SA da GRh (A) e no SA da GRPf (B). As interações que estes compostos fazem são, basicamente, as mesmas para as duas enzimas. São mostradas diversas saídas do *docking* das ariloxazinas neste sítio.

O SA das GRs também não parece ser o alvo principal da **CQH**, já que os cálculos de *docking* neste sítio resultaram em diversas soluções aleatórias, sem um padrão definido, o que sugere que a formação do complexo entre o SA das GRh e GRPf e a **CQH** não é favorável.

4.3.3 Diidrofolato Redutase

O domínio diidrofolato redutase da enzima DHFR-TS do *P. falciparum* (DHFRPf) é um dos poucos alvos bem definidos para o *design* de fármacos antimaláricos (RASTELLI et al., 2000). Alguns antifolatos antimaláricos muito utilizados, como a pirimetamina e o proguanil, se ligam ao sítio ativo deste domínio. Entretanto, a eficácia dos inibidores desta enzima está atualmente comprometida devido às mutações ocorridas no sítio ativo da DHFRPf: primeiramente no resíduo da posição 108 e subsequentemente em outros resíduos, como os das posições 16, 51, 59 e 164 da DHFR-TSPf (RASTELLI et al., 2000; YUVANIYAMA et al., 2003).

Atualmente estão disponíveis no PDB as estruturas tridimensionais da DHFR-TSPf nativa, duplo mutante (C59R + S108N) e quádruplo mutante (N51I + C59R + S108N + I164L) e neste trabalho foi realizado o *docking* dos compostos da família das ariloxazinas e da cloroquina nestas três enzimas, verificando as semelhanças e diferenças nos complexos formados. Na Figura 11 aparece a posição dos resíduos de aminoácido da DHFR-TSPf que sofrem estas mutações, em relação ao inibidor WR99210. Também foi feito o *docking* na DHFRh correspondente para fins de comparação.

Os resultados de *docking* mostraram que não há diferença significativa entre o modo de ligação das ariloxazinas no domínio diidrofolato redutase da DHFR-TSPf nativa, duplo ou quádruplo mutante (Fig. 60). Em todas estas três formas da enzima, o padrão de orientação dos compostos foi, em geral, o mesmo – apenas para a enzima duplo mutante foram encontradas algumas soluções distintas do padrão obtido para as nativa e quádruplo mutante; isto porque esta encontra-se complexada com um inibidor diferente no sítio ativo (a pirimetamina, enquanto as demais apresentavam o inibidor WR99210), de modo que as cadeias laterais dos aminoácidos do sítio da enzima duplo mutante encontram-se em uma conformação diferente das presentes nas enzimas nativa e quádruplo mutante. Além disso, foi obtido que as ariloxazinas se posicionam distantes e não interagem com três dos resíduos que sofrem mutação para conferir resistência ao parasita (Ala16, Asn51 e Cys59 na enzima nativa) e poucos compostos interagem com a Ser108 (substituída por Asn108 nas enzimas mutantes). Por fim, as interações que os ligantes fazem com a Ile164 (substituída por Leu164 na enzima quádruplo mutante) são com a cadeia principal e com um pedaço da cadeia lateral da isoleucina – região idêntica à da leucina presente na enzima quádruplo mutante (Fig. 60). Assim, a natureza das interações entre as ariloxazinas e as enzimas nativa e mutantes é praticamente a mesma. Por tudo isto, sugere-se que não deve existir, no geral, uma diferença significativa entre a inibição da enzima nativa e dos mutantes pelos compostos da família das ariloxazinas.

Por meio de cálculos de *docking*, pôde-se identificar um modo de ligação padrão dos compostos da família das ariloxazinas no sítio ativo da DHFRPf. Foi obtido que compostos com substituintes volumosos na posição N3, como **4b**, **4c** e **5b**, orientam-se de maneira distinta dos demais ligantes – este resultado também foi obtido no *docking* na DHFRh.

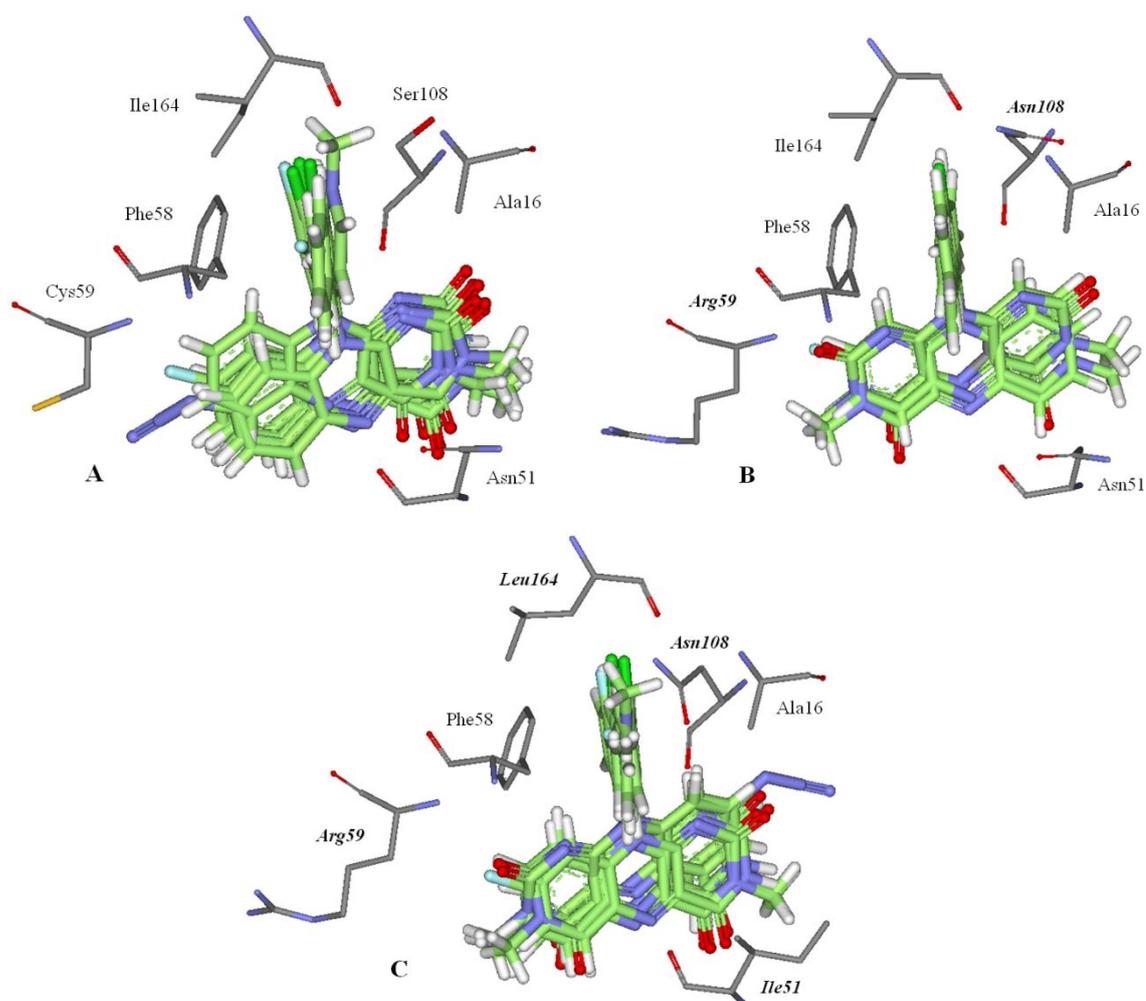


Figura 60 – Modo de ligação obtido para as ariloxazinas no sítio ativo do domínio diidrofolato redutase das enzimas DHFR-TSPf nativa (A), duplo (B) e quádruplo (C) mutantes. Os resíduos que sofreram mutação aparecem em destaque.

Na Tabela 5 aparece a média dos escores obtidos para cada composto em cada forma da enzima DHFR*Pf* estudada e na DHFRh, além dos escores obtidos no *redocking*. Pode-se observar que não há uma diferença significativa entre os escores obtidos para a enzima nativa do parasita, para as enzimas mutantes e para a forma humana. A seguir, são descritos os modos de ligação obtidos para as ariloxazinas e para a cloroquina no sítio estudado das diferentes formas da DHFR*Pf* e da DHFRh. Este sítio é onde se ligam dois dos mais importantes antifolatos utilizados no tratamento da malária – a pirimetamina e o cicloguanil (WARHURST, 1998; GREGSON e PLOWE, 2005; FRANÇA, SANTOS e FIGUEROA-VILLAR, 2008).

Tabela 5 – Escores e $\Delta G_{\text{binding}}$ obtidos para os complexos formados entre o domínio diidrofolato redutase da DHFR-TSPf nativa, mutantes e DHFRh e compostos da família das ariloxazinas/CQH.

Composto	Escore ^a na DHFRPf nativa	ΔG^b para a DHFRPf nativa (kcal/mol)	Escore ^a – duplo mutante	ΔG^b – duplo mutante (kcal/mol)	Escore ^a – quádruplo mutante	ΔG^b – quádruplo mutante (kcal/mol)	Escore ^a na DHFRh	ΔG^b para a DHFRh (kcal/mol)
2a	44,43	-7,04	41,04	-6,68	44,13	-7,01	45,26	-7,13
2e	37,95	-6,35	36,76	-6,22	40,85	-6,66	42,24	-6,81
4b	53,88	-8,06	53,08	-7,97	56,21	-8,31	55,15	-8,19
4c	54,59	-8,13	52,48	-7,91	55,03	-8,18	54,66	-8,14
5b	51,83	-7,84	49,04	-7,54	51,88	-7,84	53,10	-7,97
6	45,23	-7,13	44,17	-7,01	43,61	-6,95	45,67	-7,18
6a	43,75	-6,97	42,94	-6,88	43,76	-6,97	43,57	-6,95
12	52,34	-7,89	46,74	-7,29	53,04	-7,97	53,12	-7,98
14	46,63	-7,28	41,43	-6,72	44,26	-7,02	47,32	-7,35
19	52,08	-7,86	46,00	-7,21	51,24	-7,77	52,05	-7,86
20	57,92	-8,49	51,68	-7,82	54,06	-8,08	48,70	-7,50
CQH	46,59	-7,27	44,40	-7,04	44,26	-7,02	47,57	-7,38
Redocking^c	63,08	-9,05	48,16	-7,44	58,94	-8,60	46,64	-7,28

^a Média dos escores das soluções obtidas, calculados utilizando a função *GoldScore* implementada no programa GOLD 4.0.1 (JONES, WILLETT e GLEN, 1995; JONES et al., 1997).

^b Média da variação da energia livre de ligação obtida a partir dos escores dados pela função *GoldScore*.

^c Ligante WR99210 nas enzimas nativa e quádruplo mutante; ligante pirimetamina na duplo mutante; ligante antifolato lipofílico na DHFRh.

Os resultados de *docking* mostram que os compostos da família das ariloxazinas **2a**, **2e**, **6**, **6a**, **12**, **14**, **19** e **20** apresentaram um modo padrão de ligação à DHFRPf (tanto nativa quanto mutantes), onde suas porções isoaloxazina se orientam entre os resíduos de aminoácido Ser111/Ile112 de um lado e Leu46/Met55 do outro, e seus substituintes aromáticos da posição N10 se orientam paralelamente à cadeia lateral da Phe58, voltado principalmente para a Ile164 (ou Leu164 na enzima quádruplo mutante) (Fig. 61). Neste cenário, estas moléculas muitas vezes interagem com resíduos reconhecidamente importantes para a atividade diidrofolato redutase da enzima, como Ile14, Asp54, Phe58, Ser108 e Ile164, os quais, sabe-se, interagem com o substrato diidrofolato, com inibidores antifolato antimaláricos ou, ainda, com o cofator NADPH (YUVANIYAMA et al., 2003).

A porção isoaloxazina dos inibidores estudados fica envolvida, além dos pares Ser111/Ile112 e Leu46/Met55 já citados, pela Val45, Pro113, Phe116 e Leu119 (Fig. 61B). Com exceção da Ser111, que é um resíduo polar não-carregado, apenas resíduos apolares interagem com esta região do ligante, sendo um indício de que as interações hidrofóbicas são importantes para manter o inibidor nesta posição; interações hidrofóbicas também estabilizam os complexos entre esta enzima e outros antifolatos antimaláricos, como a pirimetamina e o cicloguanil, além do próprio substrato (WARHURST, 1998; OLLIARO, 2001; DELFINO, SANTOS-FILHO e FIGUEROA-VILLAR, 2002; PARENTI et al., 2004). Ainda, o átomo O1 destes compostos faz, em geral, uma ligação de hidrogênio com a

hidroxila da Ser111, o que também parece ser determinante para manter estes inibidores nesta posição (Fig. 61). Esta região do sítio onde a porção isoaloxazina se orienta é a mesma onde ocorrem interações do anel triclorofenóxi do inibidor WR99210 e de fragmentos aromáticos hidrofóbicos de outros inibidores conhecidos com resíduos da enzima: próximo à Leu46, Met55, Ser111, Ile112, Pro113, Phe116 e Leu119, na entrada do sítio (RASTELLI et al., 2000; RASTELLI et al., 2003; YUVANIYAMA et al., 2003; FOGEL et al., 2008; MAITARAD et al., 2009).

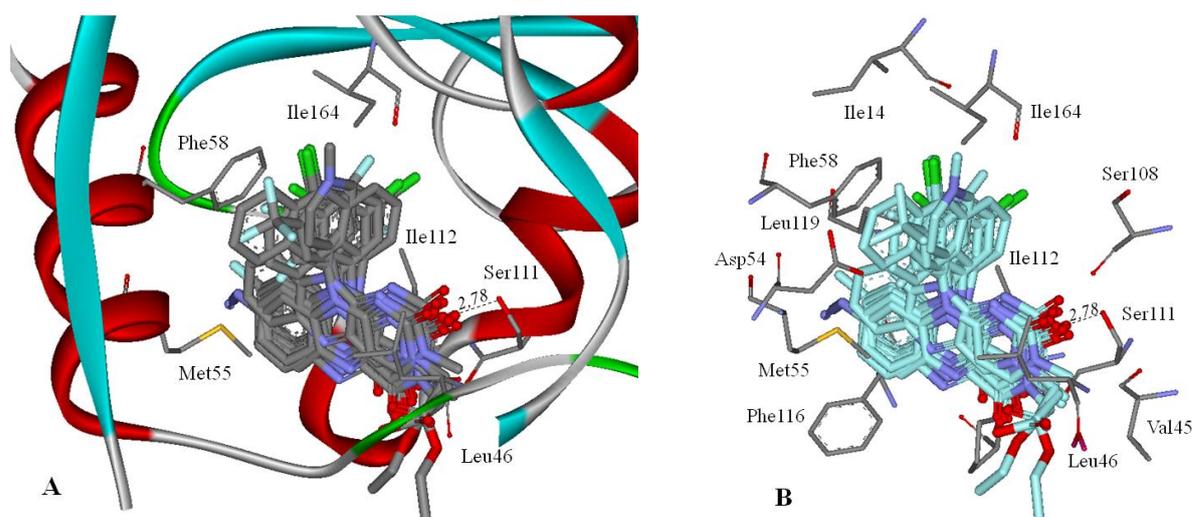


Figura 61 – **A.** Modo de ligação obtido para os compostos da família das ariloxazinas no sítio de ligação do domínio DHFR*Pf* da enzima nativa. Não são mostrados os átomos de hidrogênio. A linha pontilhada indica ligação de hidrogênio. **B.** Mesma visão que em **A**, mas sem a representação da estrutura secundária da proteína e com mais resíduos de aminoácido representados. O mesmo modo de ligação e, em geral, as mesmas interações foram obtidas também para as enzimas mutantes.

Para a enzima humana, obteve-se que a porção isoaloxazina dos compostos também se orientou entre Ser59/Ile60 de um lado e Leu22/Phe31 do outro (correspondentes à Ser111/Ile112 e Leu45/Met55, respectivamente, na DHFR*Pf*) e com os substituintes aromáticos da posição N10 paralelos à Phe34 (Fig. 62), correspondente à Phe58 da DHFR*Pf*. Em geral, também na DHFRh ocorrem ligações de H entre o O1 das ariloxazinas e a hidroxila da Ser59, ligações estas correspondentes às que estes compostos faziam com a Ser111 da DHFR*Pf*. Entretanto, uma importante interação só é possível com a enzima humana: interação π - π entre o anel aromático da porção isoaloxazina dos ligantes e a cadeia lateral aromática da Phe31 – na DHFR*Pf* o resíduo correspondente nesta posição é a Met55, incapaz de fazer este tipo de interação.

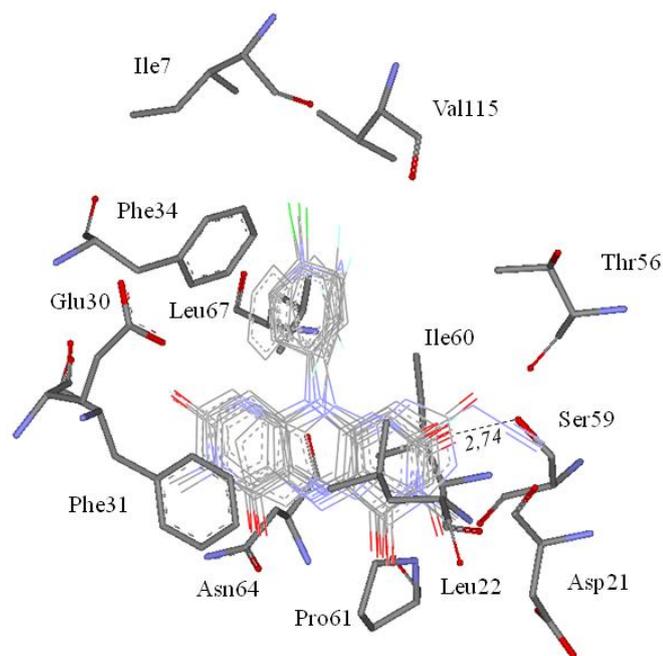


Figura 62 – Modo de ligação obtido para as ariloxazinas na DHFRh. São mostradas algumas saídas obtidas nos cálculos de *docking* para estes ligantes nesta enzima, com destaque para a ligação de H que os compostos fazem com a Ser59 (correspondente à Ser111 na DHFRPf).

Nos compostos onde o substituinte na posição N3 é um átomo de hidrogênio, como em **2a** e **2e**, ocorre uma ligação de H entre seu N3 e o grupo hidroxila da Ser111 da DHFRPf, além da ligação de H já citada entre a mesma Ser111 e o O1 dos ligantes (Fig. 63).

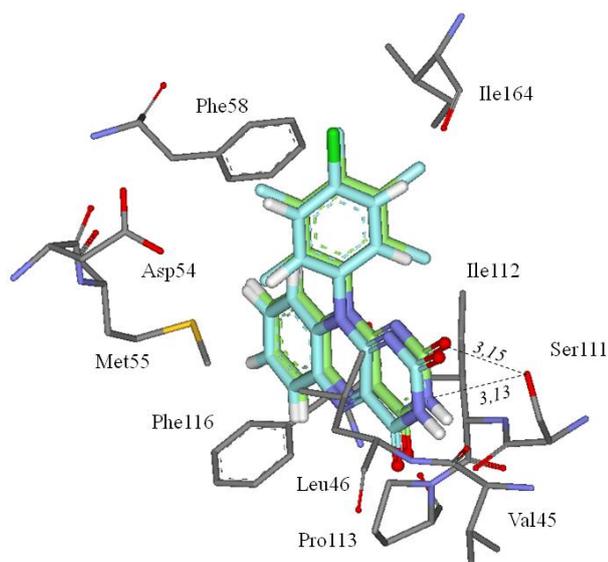


Figura 63 – Orientação de **2e** (verde) e **2a** (ciano) no sítio de ligação da DHFRPf nativa, com destaque para as ligações de H com a Ser111. O mesmo resultado foi obtido para as enzimas mutantes.

Nos casos em que o substituinte da posição N3 das ariloxazinas era uma metila, como em **6**, **6a**, **12**, **14**, **19** e **20**, foi obtido que duas orientações parecem possíveis: com este grupo voltado para a Val45 (Fig. 64A) ou emparelhado com a cadeia lateral da Phe116, em uma orientação inversa (Fig. 64B). No primeiro caso, ocorrem principalmente interações de van der Waals com a Val45 apolar, além de permitir a ligação de hidrogênio entre o O1 dos compostos e a hidroxila da Ser111 obtida para toda a família das ariloxazinas neste sítio (Fig. 64A). Na segunda orientação possível, os compostos se orientam de maneira “inversa”, ou seja, a isoaloxazina e o substituinte aromático da posição N10 continuam sobrepostos, mas os substituintes da posição N3 apontam para lados opostos. Agora, a metila da posição N3 se emparelha à Phe116, onde ocorrem interações do tipo C–H... π com este resíduo e ligações de H do tipo C–H...O entre o O1 e a cadeia lateral da Phe58 (Fig. 64B); entretanto, perde-se a ligação de hidrogênio entre o O1 e o OH da Ser111.

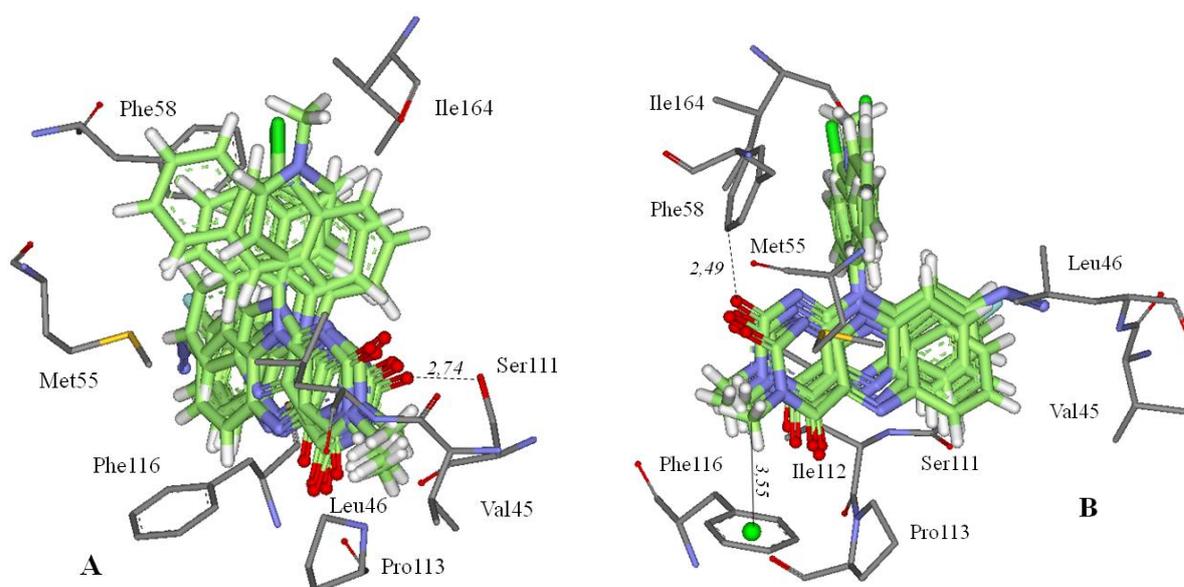


Figura 64 – **A.** Uma das orientações possíveis dos compostos **6**, **6a**, **12**, **14**, **19** e **20** na DHFR*Pf* nativa. **B.** Segunda orientação possível para os mesmos compostos na enzima.

Interações de mesma natureza foram obtidas entre os mesmos substituintes da posição N3 de **2a**, **2e**, **6**, **6a**, **12**, **14**, **19** e **20** e a DHFRh (Fig. 62). A exceção fica por conta das interações C–H... π , que não ocorrem na enzima humana já que aparece a Asn64 no lugar da Phe116 presente na DHFR*Pf* (Fig. 62).

12 e **14** possuem, ainda, um substituinte no átomo C8 – azida e flúor, respectivamente. Como visto acima, estes dois compostos apresentaram duas possíveis orientações (“inversas”) no sítio de ligação da DHFR*Pf*, de modo que estes substituintes ficaram voltados ou para a Leu119 de um lado, ou para a Val45 do lado oposto do sítio (Fig. 64). Entretanto, sugere-se que esta última orientação seja a mais favorável para **12** e **14**, já que nesta ocorrem ligações de H entre a hidroxila da Ser111 e os substituintes da posição C8 destes compostos – azida de **12** ou flúor de **14** (Fig. 65). Estas ligações de H também ocorrem quando se considera a DHFR*h*, mas com a Ser59 (correspondente à Ser111 da DHFR*Pf*).

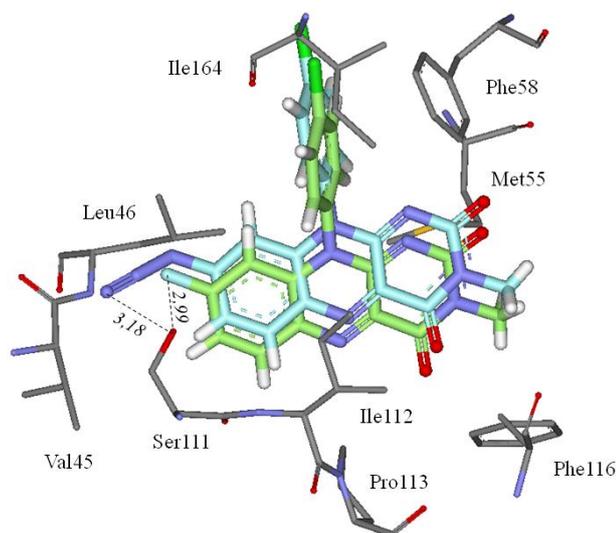


Figura 65 – Ligações de H obtidas entre os substituintes azida de **12** (ciano) e flúor de **14** (verde) e a hidroxila da Ser111 das enzimas DHFR*Pf*.

O substituinte aromático da posição N10 de **2a**, **2e**, **6**, **6a**, **12**, **14**, **19** e **20**, por sua vez, orienta-se paralelamente à cadeia lateral da Phe58 da DHFR*Pf*, onde aparecem interações entre os elétrons π destes anéis – interações do tipo π - π (Fig. 61 e Fig. 66). Sabe-se que interações desta natureza também ocorrem entre a Phe58 e sistemas aromáticos do substrato e de outros antifolatos conhecidos (WARHURST, 1998; CHUSACULTANACHAI et al., 2002; RASTELLI et al., 2003; YUTHAVONG et al., 2005; MAITARAD et al., 2009). Além disso, os substituintes nesta posição N10 ficam voltados principalmente para Ile14 e Ile164, de modo que em todos os inibidores estudados desta família ocorrem interações de van der Waals entre estes substituintes aromáticos e os resíduos Phe58, Ile164 (ou Leu164 na forma quádruplo mutante da enzima) e algumas vezes com Ile14 (Fig. 61 e Fig. 66); diversos

inibidores da DHFR*Pf* fazem ligações de H com Ile14 e Ile164, como a pirimetamina, o cicloguanil e o WR99210 (RASTELLI et al., 2000; RASTELLI et al., 2003; YUTHAVONG et al., 2005; FOGEL, CHEUNG e PITTMAN, 2008; FOGEL et al, 2008; MAITARAD et al., 2009). Nas enzimas duplo e quádruplo mutante ocorrem, ainda, interações de van der Waals entre os substituintes da posição N10 e a cadeia lateral da Asn108; na enzima nativa não ocorrem, em geral, interações com a Ser108 nesta mesma posição devido ao menor tamanho de sua cadeia lateral (Fig. 60).

A principal interação que estes substituintes fazem com estas enzimas plasmodiais – interação π - π com a Phe58 – também aparece quando se considera a DHFRh: interação do tipo π - π entre os substituintes aromáticos da posição N10 das ariloxazinas e a cadeia lateral aromática da Phe34 (Fig. 62).

Além destas interações apresentadas, o substituinte 4'-clorofenil de **2a**, **12** e **14** possui um átomo de cloro que faz interações de van der Waals com os resíduos Ile14, Phe58 e Ile164 da DHFR*Pf* (Fig. 66).

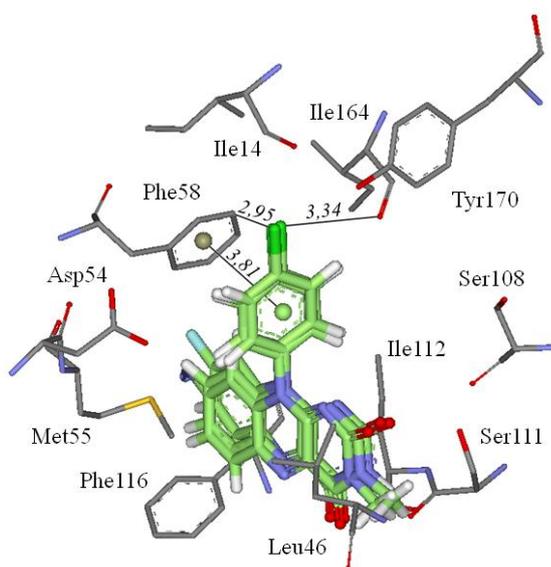


Figura 66 – Interações entre o 4'-clorofenil de **2a**, **12** e **14** e a DHFR*Pf*.

O substituinte pentafluorfenil de **2e**, por sua vez, está envolvido em uma rede de potenciais ligações de H do tipo C–H...F entre seus átomos de flúor e as cadeias laterais de Met55, Phe58, Ile112 e Ile164; ainda, ocorrem interações entre dois de seus átomos de flúor e o oxigênio da Ile164 (Fig. 67A). Na forma quádruplo mutante desta enzima

plasmodial, o composto **2e** faz, além de todas estas interações descritas para a enzima nativa, uma ligação N–H...F com a cadeia lateral da Asn108, através de seu pentafluorfenil (Fig. 67B); na forma plasmodial nativa e na forma humana aparecem, respectivamente, uma serina ou uma treonina nesta posição, as quais, devido ao pequeno tamanho de suas cadeias laterais, não interagem com o ligante (Fig. 62 e Fig. 67A). Assim, sugere-se que **2e** deve apresentar uma maior afinidade pela forma quádruplo mutante da DHFR-TSPf do que pela sua forma nativa ou pela enzima humana.

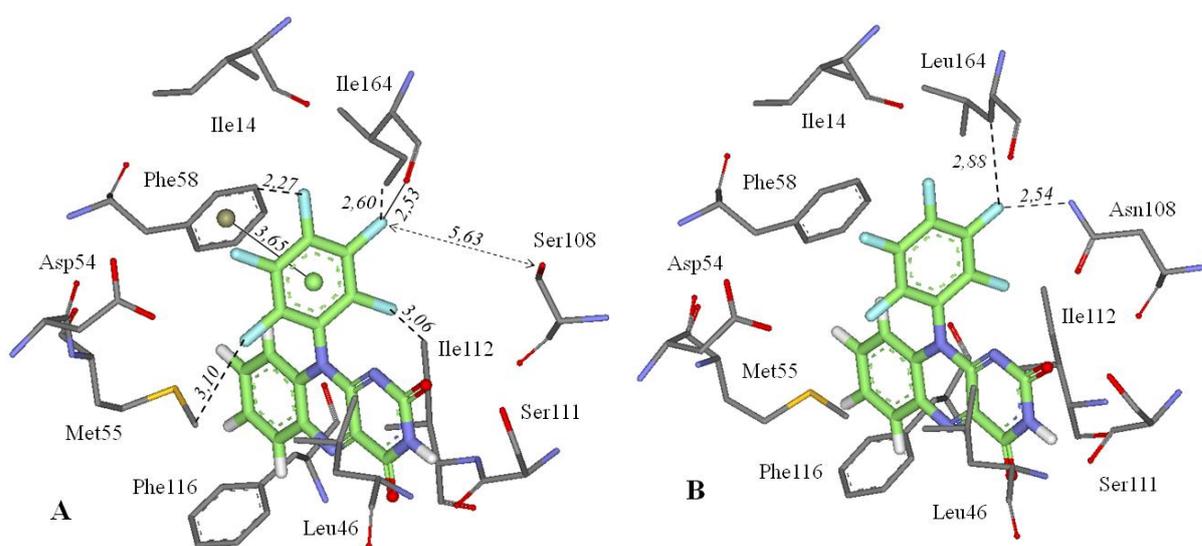


Figura 67 – Em **A** temos a orientação de **2e** no sítio de ligação do domínio DHFRPf da enzima nativa, enquanto que em **B** aparece o mesmo **2e**, mas no sítio de ligação da enzima quádruplo mutante. Note como na enzima nativa a Ser108 fica distante (seta) e não faz ligações de H com o composto, enquanto que na enzima mutante aparece uma Asn108 na mesma posição, através da qual faz uma ligação de H com **2e**; pode-se notar também que, mesmo ocorrendo a substituição da Ile164 por Leu164, ainda ocorre a ligação de H com o composto na enzima mutante.

O composto **6** apresenta o substituinte metilpiridínio-4'-il na posição N10, o qual, por ser um pouco mais volumoso do que os demais substituintes, consegue interagir com o trio Ile14, Ile164 (ou Leu164 em algumas formas mutantes) e Tyr170 da DHFRPf, fazendo inclusive algumas ligações de H do tipo C–H...O (Fig. 68A); ligações de H com estes três resíduos também são descritas para o inibidor WR99210 (YUVANIYAMA et al., 2003) – o grupo metil do metilpiridínio-4'-il de **6** se sobrepõe a um dos nitrogênios deste inibidor. Já o composto **6a** apresenta o substituinte 4'-piridil, o menos volumoso dentre os estudados, o qual está envolvido apenas em interações de van der Waals com Phe58, Ile112 e Ile164 (Fig. 68B). Em geral, interações de mesma natureza ocorrem com a DHFRh.

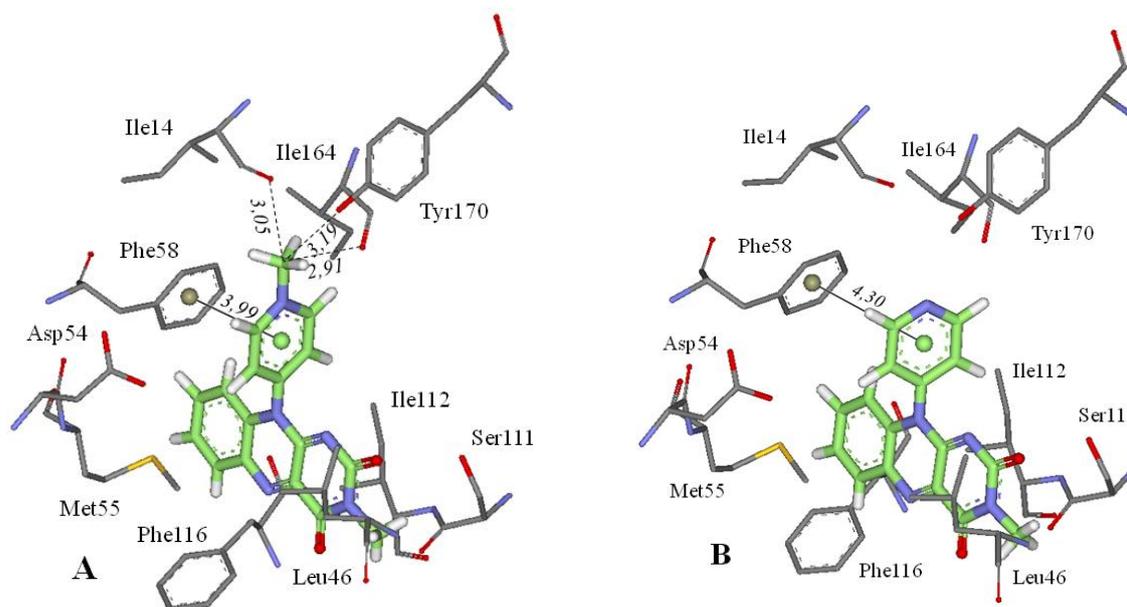


Figura 68 – A. Potenciais ligações de H C–H...O e interação π - π entre o substituinte metilpiridínio-4'-il de **6** e a DHFRPf. B. Orientação de **6a** no sítio de ligação da DHFRPf.

Ariloxazinas com substituintes apolares e mais volumosos na posição N10, como **19** e **20**, conseguem preencher bem a cavidade hidrofóbica do sítio, orientando-se entre os resíduos Ser108 (ou Asn108 nas formas mutantes) e Asp54, região onde se encaixa o sistema aromático heterocíclico do substrato e de muitos inibidores conhecidos da DHFR-TSPf (WARHURST, 1998; GREGSON e PLOWE, 2005). O substituinte 1'-naftil de **19** faz uma ligação do tipo C–H...O com a carbonila da Ile164 (Fig. 69A) e o 1'-antril de **20** faz, além desta, interações de van der Waals com Asp54 e Ser108 (ou Asn108) (Fig. 69B). Ligações de H com a Ile164 e interações com a Ser108 também são encontradas para diversos antifolatos antimaláricos (RASTELLI et al., 2000; RASTELLI et al., 2003; YUTHAVONG et al., 2005; FOGEL, CHEUNG e PITTMAN, 2008; FOGEL et al, 2008; MAITARAD et al., 2009); além disso, o resíduo Asp54 foi identificado como crítico neste sítio em estudos anteriores, estando envolvido em ligações de H com inúmeros inibidores desta enzima, além do próprio substrato (WARHURST, 1998; LEMCKE, CHRISTENSEN e JØRGENSEN, 1999; RASTELLI et al., 2000; OLLIARO, 2001; CHUSACULTANACHAI et al., 2002; DELFINO, SANTOS-FILHO e FIGUEROA-VILLAR, 2002; RASTELLI et al., 2003; YUVANIYAMA et al., 2003; YUTHAVONG et al., 2005; FOGEL, CHEUNG e PITTMAN, 2008; FOGEL et al, 2008; MAITARAD et al., 2009). As interações hidrofóbicas possivelmente têm um maior peso e contribuem para o bom escore obtido para estes dois inibidores (Tabela 5); como citado anteriormente, interações hidrofóbicas estabilizam os

complexos formados entre esta enzima e o substrato ou outros inibidores (WARHURST, 1998; OLLIARO, 2001; DELFINO, SANTOS-FILHO e FIGUEROA-VILLAR, 2002; PARENTI et al., 2004).

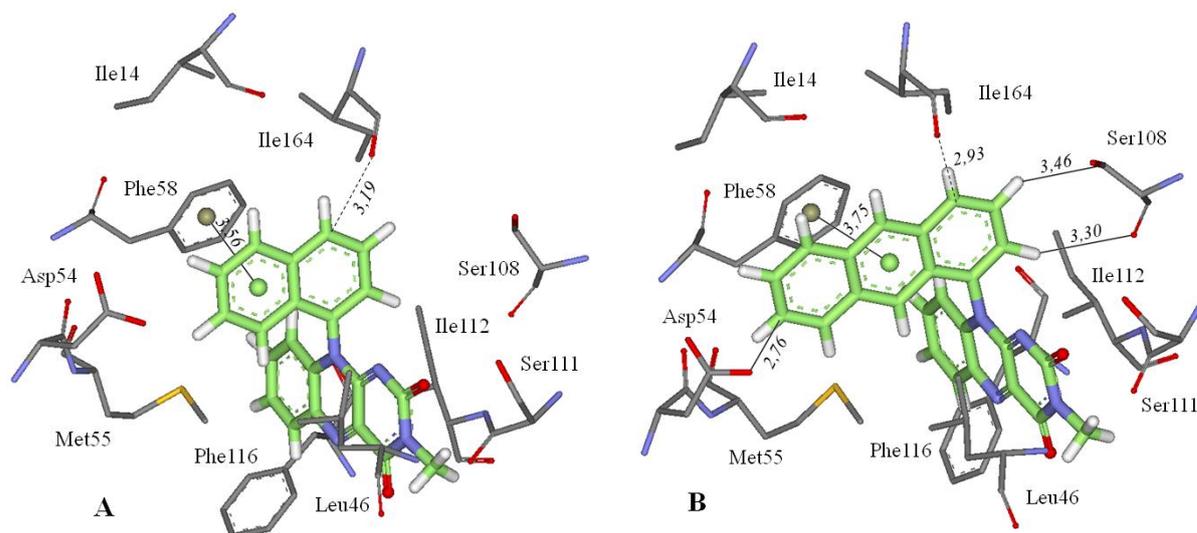


Figura 69 – Em **A** estão representadas as principais interações entre o substituinte 1'-naftil de **19** e a DHFRPf e, em **B**, interações do 1'-antril de **20** com a mesma enzima.

Na forma humana da enzima, estes substituintes apolares volumosos de **19** e **20** ocupam uma região semelhante do sítio, entre Thr56 e Glu30 (Fig. 62) – correspondentes às Ser108 e Asp54 da DHFRPf –, interagindo com a DHFRh de forma semelhante à DHFRPf.

A análise dos resultados de *docking* mostra que os compostos **4b**, **4c** e **5b** se orientam no sítio das DHFRPf e DHFRh de maneira diferente do padrão obtido para as outras ariloxazinas. Estes compostos se orientam de modo que suas porções isoaloxazina se posicionam entre a Leu46 e a Ser111 da DHFRPf, com o substituinte aromático da posição N10 apontando para a cadeia lateral da Phe58 (Fig. 70). Ocorrem ligações de H entre seus átomos O1 e a hidroxila da Ser108, “amarrando” estes inibidores nesta posição; na enzima duplo mutante do parasita, entretanto, esta ligação de H é com a cadeia lateral da Asn108 (Fig. 70) e, na enzima humana, com a Thr56. O substituinte (etoxicarbonil)metil de **4b** e **4c** fica voltado para a Thr107 da DHFRPf, ocorrendo apenas interações de van der Waals com os resíduos Thr107, Gly166, Ser167 e Val195. O carboximetil de **5b**, por sua vez, pode ficar voltado para a Thr107 ou para o lado oposto, em direção à Leu40, mas também aparecem apenas interações de van der Waals com resíduos do sítio. O substituinte aromático da posição

N10 destes compostos aponta para a Phe58 (ou Phe34, na DHFRh), fazendo uma interação em forma de “T” com o sistema π deste resíduo, além de interações de van der Waals com resíduos apolares do sítio, como Phe58, Ile112, Ile164 (Fig. 70). Entretanto, os compostos **4b** e **4c** se orientam em uma conformação diferente da de mínima energia, de modo que se pode sugerir que estes possivelmente serão menos favoráveis nas DHFR*Pf* ou DHFRh do que as demais ariloxazinas estudadas.

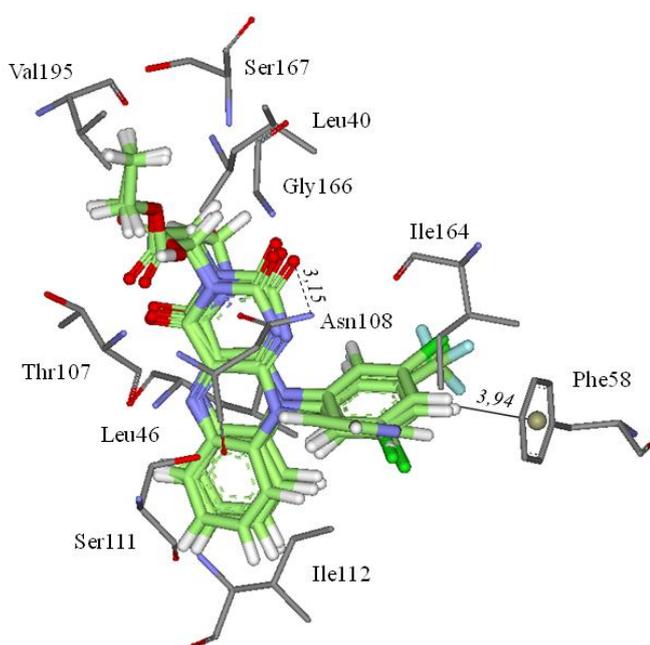


Figura 70 – Orientação obtida para os compostos **4b**, **4c** e **5b** (além da segunda orientação possível de **6a**) na DHFR*Pf* duplo mutante. Este mesmo modo de ligação destes compostos também foi obtido para as formas nativa e quádruplo mutante da enzima.

Assim como foi obtido para o SA das enzimas GRh e GR*Pf*, as saídas obtidas para a **CQH** nas diferentes formas da enzima DHFR-TS*Pf* e na DHFRh foram, de certo modo, aleatórias, de forma que nenhuma orientação teve um peso estatístico satisfatório. Isto sugere que a formação dos complexos DHFR*Pf*-**CQH** (nativa ou mutantes) ou DHFRh-**CQH** não é favorável.

4.3.4 Lactato Desidrogenase

Os cálculos de *docking* permitiram identificar o modo de ligação de compostos da família das ariloxazinas no sítio de ligação do NADH das enzimas LDHPf, M-LDHh e H-LDHh. Foi obtido que todos os compostos estudados desta família apresentam o mesmo padrão de ligação no sítio da LDHPf, onde apenas **19** e **20** ficam um pouco deslocados em relação à orientação padrão obtida. Este sítio é onde se ligam alguns compostos antimaláricos conhecidos, como a própria cloroquina (embora este seja apenas um dos alvos descritos para este composto) e o gossipol e seus derivados (DECK et al., 1998; READ et al., 1999; RAZAKANTOANINA, PHUNG e JAUREGUIBERRY, 2000; CONNERS et al., 2005). A estratégia de se buscar ligantes para este sítio é interessante, pois um inibidor que tenha a capacidade de competir com o NADH irá se beneficiar da afinidade 10 vezes mais fraca deste cofator para a LDHPf, em comparação com as isozimas humanas (SHOEMARK et al., 2007).

A média dos escores obtida para cada ariloxazina estudada nestas enzimas aparece na Tabela 6. Note que, para a LDHPf, os escores foram próximos, algumas vezes até melhores, do que os obtidos no *redocking*. Além disso, os escores na enzima plasmodial foram, em geral, melhores do que nas M-LDHh e H-LDHh. A seguir, são descritas as orientações obtidas para estes compostos no sítio de ligação do NADH da LDHPf, comparando-se com o obtido para as isozimas humanas.

Tabela 6 – Escores $\Delta G_{\text{binding}}$ obtidos para os complexos formados entre os sítios de ligação do NADH da LDHPf, M-LDHh e H-LDHh e compostos da família das ariloxazinas.

Composto	Escore ^a na LDHPf	ΔG^b para a LDHPf (kcal/mol)	Escore ^a na M-LDHh	ΔG^b para a M-LDHh (kcal/mol)	Escore ^a na H-LDHh	ΔG^b para a H-LDHh (kcal/mol)
2a	42,11	-6,79	38,27	-6,38	38,64	-6,42
2e	33,80	-5,90	30,58	-5,55	30,87	-5,58
4b	35,69	-6,10	46,07	-7,22	44,89	-7,09
4c	40,01	-6,57	49,28	-7,56	44,88	-7,09
5b	46,27	-7,24	40,46	-6,62	40,03	-6,57
6	41,23	-6,70	31,86	-5,69	34,17	-5,94
6a	41,16	-6,69	39,19	-6,48	34,98	-6,03
12	49,26	-7,56	41,38	-6,71	39,87	-6,55
14	43,78	-6,97	36,17	-6,15	36,71	-6,21
19	33,88	-5,91	37,85	-6,34	37,34	-6,28
20	47,78	-7,40	40,20	-6,59	38,14	-6,37
CQH^c	41,18	-6,69	-	-	-	-

^a Média dos escores das soluções obtidas, calculados utilizando a função *GoldScore* implementada no programa GOLD 4.0.1 (JONES, WILLETT e GLEN, 1995; JONES et al., 1997).

^b Média da variação da energia livre de ligação obtida a partir dos escores dados pela função *GoldScore*.

^c *Redocking* da CQH na LDHPf.

No modo de ligação obtido por meio de estudos de *docking* para as ariloxazinas no sítio do NADH da LDH*Pf*, estes compostos se orientam com a porção isoaloxazina entre os resíduos de aminoácido apolares Ile54 de um lado e Ala98/Ile119 do outro, onde as interações hidrofóbicas ganham importância, e com o substituinte aromático da posição N10 emparelhado com a cadeia lateral da Phe100, onde aparecem interações entre os sistemas π dos anéis (Fig. 71). Todos os compostos, exceto **19** e **20**, apresentaram o mesmo padrão de orientação neste sítio.

Nas formas humanas da enzima, foi obtido que a porção isoaloxazina também se orienta entre Val52 de um lado e Ala95/Ile115 do outro (na M-LDHh; na H-LDHh é Val53 e Ala96/Val116, respectivamente) (Fig. 72), resíduos apolares correspondentes aos Ile54 e Ala98/Ile119 da LDH*Pf*. Entretanto, devido à ausência de uma fenilalanina correspondente à Phe100 da LDH*Pf* – há a Ala97 na M-LDHh e Val98 na H-LDHh (Fig. 29) –, não ocorrem as interações do tipo π - π com os substituintes aromáticos da posição N10 das ariloxazinas. Isto fez com que, embora a porção isoaloxazina dos ligantes continuasse se orientando entre Val52 e Ala95/Ile115, os substituintes da posição N10 dos compostos apontasse para diversas regiões diferentes do sítio, de modo que as saídas de *docking* obtidas para as ariloxazinas nas M-LDHh e H-LDHh não formam, em geral, um padrão bem definido (Fig. 72) – na LDH*Pf* as saídas de *docking* ficaram bem sobrepostas, sendo possível identificar um modo de ligação padrão bem definido. Isto é um indício de que, devido à ausência de um resíduo aromático correspondente à Phe100 da LDH*Pf*, as ariloxazinas devam apresentar uma afinidade mais baixa pelas isoformas humanas da enzima em comparação com a enzima plasmoidal, o que é desejável para se inibir seletivamente a enzima do *P. falciparum*.

Apesar de a porção isoaloxazina se sobrepor nas orientações obtidas para estes compostos na LDH*Pf*, em **2e** e **2a** a orientação é “inversa”, ou seja, nestes o substituinte da posição N3 aponta para a Gly27, enquanto que nos outros compostos os substituintes desta posição apontam para o lado oposto, em direção à Lys118, próximos à superfície da enzima (Fig. 71B). Esta diferença se deve, possivelmente, ao menor volume do substituinte na posição N3 de **2e** e **2a** – um átomo de hidrogênio –, o qual permitiu que esta porção do composto se orientasse próximo à Gly27 e Phe52; portanto, ariloxazinas com substituintes maiores do que um H nesta posição orientam-se de maneira “inversa”, a fim de evitar choques estéricos com estes resíduos do sítio.

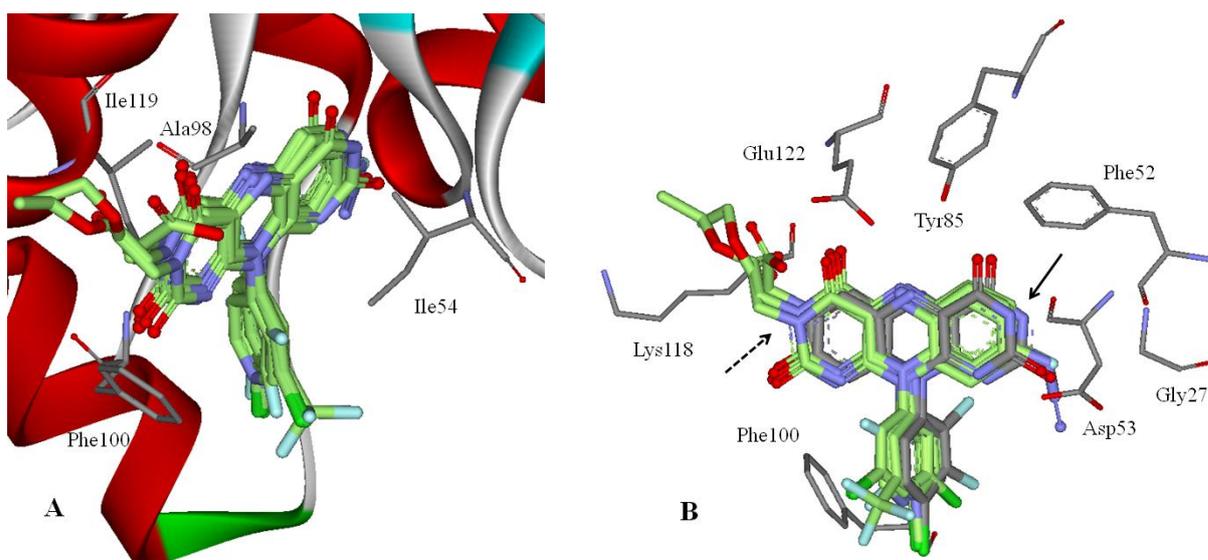


Figura 71 – A. Modo de ligação padrão obtido para os compostos da família das ariloxazinas no sítio do NADH da LDHPf. B. Orientação de **2e** e **2a** (cinza) em relação aos demais compostos da família (verde). A seta cheia mostra a região onde se orientam os substituintes da posição N3 de **2e** e **2a**, enquanto que a seta pontilhada mostra a região dos substituintes da posição N3 dos demais compostos.

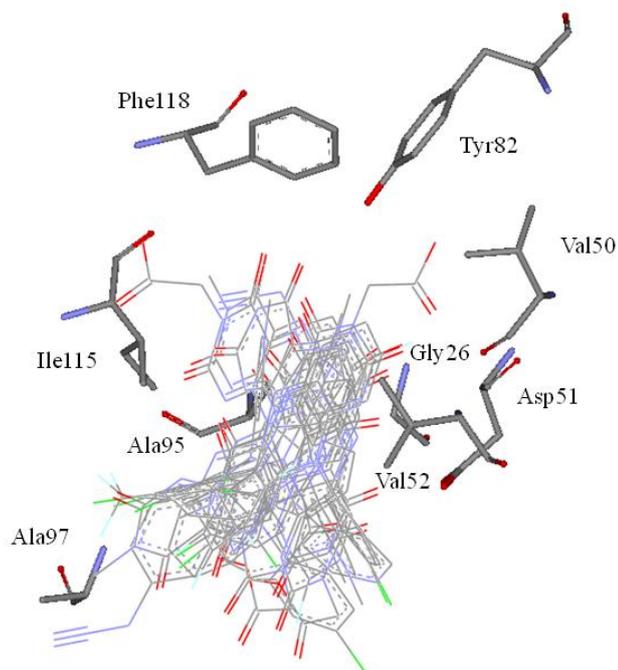


Figura 72 – Algumas das saídas de *docking* obtidas para as ariloxazinas no sítio do NADH da M-LDHh. Note como a porção isoaloxazina dos compostos orienta-se entre Val52 e Ala95/Ile115, mas o substituinte aromático da posição N10 pode apontar para diferentes regiões do sítio. Resultados semelhantes foram obtidos na H-LDHh.

Nesta orientação de **2e** e **2a**, a porção isoaloxazina fica entre os resíduos apolares Ile54 de um lado e Ala98/Ile119 do outro, região onde se orienta a porção quinolina

da **CQH** e o anel adenil do cofator NADH na LDH*Pf* (READ et al., 1999). Ocorre uma ligação de hidrogênio C–H... π entre a cadeia lateral da Ile119 e o anel aromático da porção isoaloxazina destes compostos, além de uma ligação de H entre a hidroxila da Tyr85 e o átomo O2 de **2e** e **2a** (Fig. 73A). Além destas, aparecem interações C–H...O entre a cadeia lateral da Phe52 e o O2 dos compostos e também entre um dos anéis da isoaloxazina e o grupo carboxílico do Glu122 (Fig. 73A); sabe-se que a Phe52 é um resíduo único à LDH*Pf* (substituída por outros aminoácidos em outros organismos: nas M-LDHh e H-LDHh há uma Val) e o Glu122 também é único à forma plasmodial da enzima (substituído por Phe em LDHs de mamíferos, não sendo capaz de fazer a interação C–H...O com as ariloxazinas quando substituída por Phe), além de também fazer ligação de H com a **CQH** (READ et al., 1999). Ainda, o N5 e o O1 de **2e** e **2a** interagem, respectivamente, com Glu122 e Asp53, resíduos negativamente carregados (Fig. 73A); Asp53 é um resíduo altamente conservado e importante na ligação do cofator (READ et al., 1999). Assim como a quinolina da **CQH**, a porção isoaloxazina destes compostos está envolvida em contatos de van der Waals com a Ile54, a qual é normalmente substituída por valina em LDHs de mamíferos. O substituinte H da posição N3 destas ariloxazinas orienta-se na mesma posição que o átomo de cloro do inibidor **CQH**, fazendo as mesmas interações que este – contatos de van der Waals com Gly27, Ala98 e Asp53 (READ et al., 1999). Além da **CQH**, foi descrito que alguns derivados do gossipol também se ligam a esta reentrância lipofílica, região onde se orienta a adenina do cofator, e também fazem interações de van der Waals com os resíduos descritos acima (DECK et al., 1998; CONNERS et al., 2005; CHOI et al., 2007).

A porção isoaloxazina de **4b**, **4c**, **5b**, **6**, **6a**, **12** e **14**, como visto acima, se sobrepõe à obtida para **2e** e **2a** na LDH*Pf*, embora se oriente de maneira “inversa”: agora, os substituintes da posição N3 ficam voltados para a Lys118, do lado oposto do sítio, em direção à entrada da reentrância hidrofóbica (Fig. 73B). Desta maneira, a natureza das interações com resíduos do sítio são diferentes (embora interajam com os mesmos resíduos). Aparecem interações C–H... π entre a cadeia lateral da Ala98 e o anel aromático da porção isoaloxazina, além de interações C–H...O entre a cadeia lateral da Phe100 e o O1 dos compostos e entre a cadeia lateral do Glu122 e o O2 das ariloxazinas. Também aparecem interações C–H...N entre a cadeia lateral da Ile119 e o N1 destas ariloxazinas. Além disso, o átomo N5 interage com a cadeia lateral negativamente carregada do Glu122 (Fig. 73B), que, como já citado, é substituído por Phe na LDH de mamíferos, um resíduo apolar (READ et al., 1999). Ocorrem, também, interações de van der Waals com Asp53, resíduo negativamente carregado e importante na ligação do cofator (READ et al., 1999).

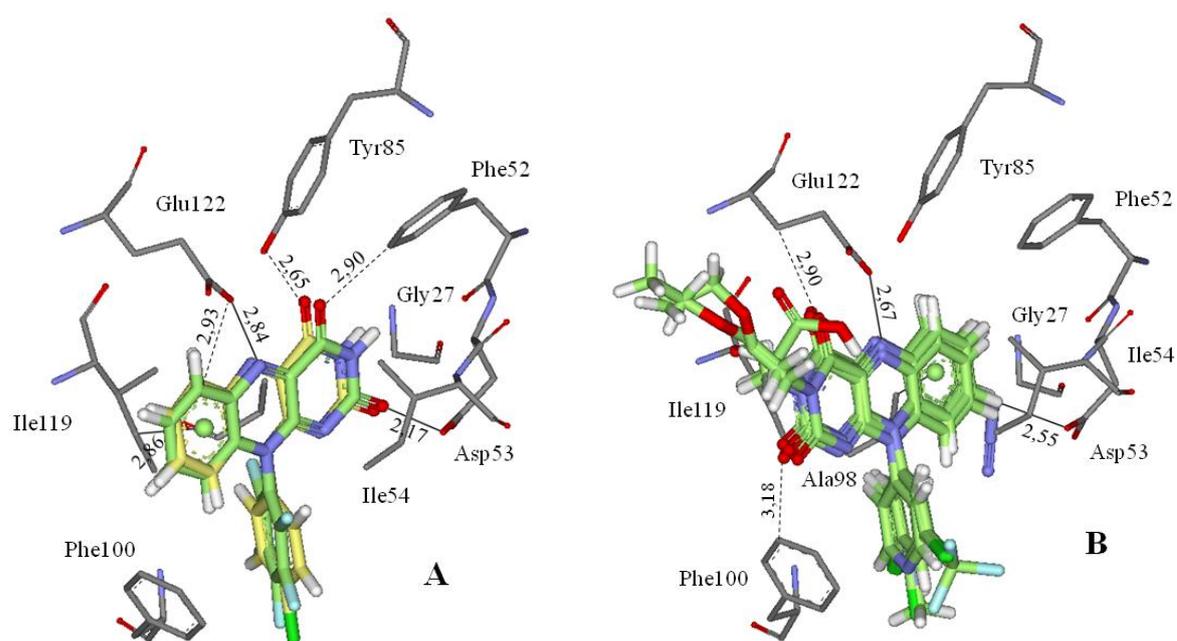


Figura 73 – A. **2e** (verde) e **2a** (amarelo) no sítio do NADH da LDHPf, com destaque para as ligações de H (linhas tracejadas) e outras interações com a enzima (linha contínua). B. **4b**, **4c**, **5b**, **6**, **6a**, **12** e **14** e a LDHPf.

Os resultados de *docking* para os compostos **4b** e **4c** mostraram que o substituinte (etoxicarbonil)metil, que é bastante volumoso, pode apresentar diversas conformações. Isto porque este fica voltado para a superfície da enzima LDHPf (Fig. 74), o que lhe confere maior liberdade para seu posicionamento.

O substituinte carboximetil da posição N3 de **5b**, por sua vez, também se orienta em direção à entrada do sítio, próximo à superfície da enzima. Entretanto, nesta orientação este substituinte não fica “livre” como o (etoxicarbonil)metil, já que ocorre uma ligação de H entre um de seus átomos de oxigênio e o grupo carboxílico do Glu122 da LDHPf (Fig 75A). Além disso, a conformação deste substituinte nesta posição foi próxima à de mínima energia obtida na modelagem molecular (Fig. 75B). Assim, sugere-se que o carboximetil seja mais favorável do que o (etoxicarbonil)metil na posição N3 das ariloxazinas, daí o escore ter sido melhor para **5b** do que para **4b** (Tabela 6).

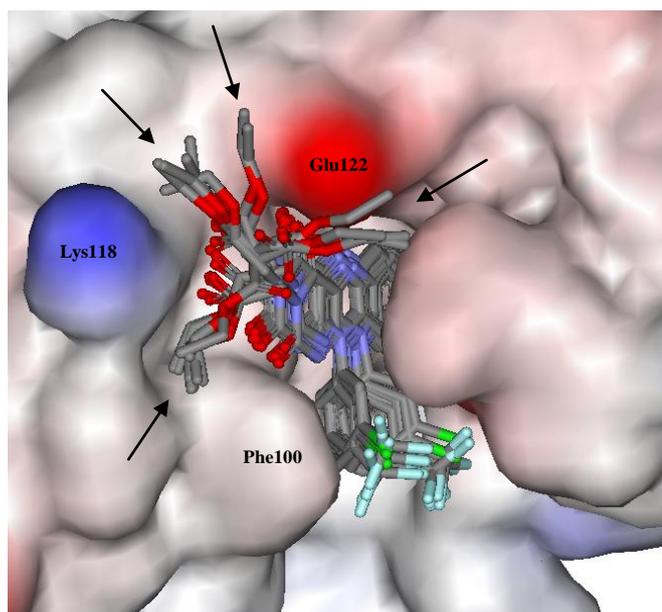


Figura 74 – Saídas de *docking* obtidas para **4b** e **4c**. Note como o substituinte (etoxicarbonil)metil da posição N3 pode assumir diferentes orientações (setas), sempre em direção à superfície da enzima. O contorno da superfície da enzima está representado na figura, colorido de acordo com o potencial eletrostático.

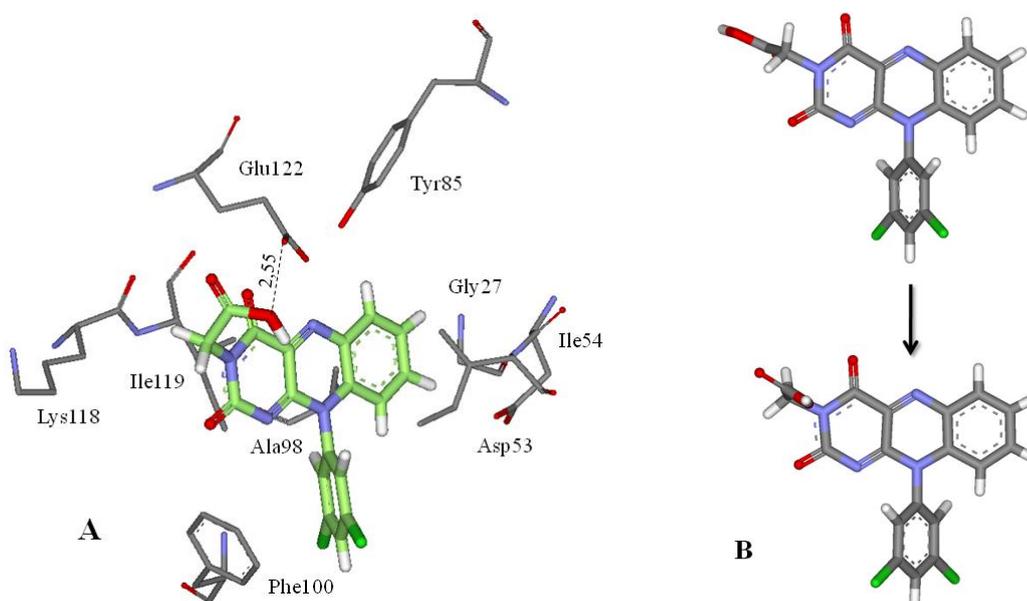


Figura 75 – **A.** Orientação de **5b** na LDHPf, com destaque para a ligação de H entre seu substituinte (etoxicarbonil)metil da posição N3 e o resíduo Glu122. **B.** Comparação entre a conformação do **5b** obtida por modelagem molecular (acima) e a gerada nos cálculos de *docking* (abaixo).

Os compostos **6**, **6a**, **12** e **14** possuem uma metila como substituinte na posição N3. No modo de ligação padrão obtido para as ariloxazinas neste sítio, estes compostos se orientam de modo que o substituinte metila faz apenas alguns contatos de van

der Waals com Lys118 e Ile119, não parecendo ser essencial para manter os compostos nesta posição (Fig. 76A).

Desta maneira, pode-se concluir que, para a posição N3, um substituinte muito volumoso como o (etoxicarbonil)metil não é favorável para a formação de complexo com a LDHPf, já que este se coloca na superfície da enzima, apresentando muitos graus de liberdade. Já um substituinte pouco volumoso, como um átomo de hidrogênio, é favorável por permitir que o composto se posicione em uma orientação “inversa”, de modo que ocorram ligações de H com a Tyr85 e sem que ocorram choques estéricos com resíduos do sítio. Um carboximetil na posição N3 também parece favorável, já que permite que ocorra uma ligação de H entre este substituinte e o Glu122. A presença de uma metila nesta posição, por sua vez, parece não influenciar na orientação dos compostos por fazer limitadas interações com resíduos da enzima, de modo que sua presença não seja prejudicial para os compostos, mas também não seja essencial para a formação do complexo.

Os ligantes **12** e **14** possuem um substituinte na posição C8 – uma azida e um flúor, respectivamente – e estes ficam voltados para a Gly27 da LDHPf, de modo que fazem interações de van der Waals com Gly27, Asp53 e Ala98 (Fig. 76B), mesmas interações que o átomo de cloro da **CQH** faz com a enzima (READ et al., 1999). Estes resíduos são altamente conservados entre as LDHs e sabe-se que o Asp53 é importante para a ligação do cofator (READ et al., 1999). O fato de o substituinte azida, positivamente carregado, ficar próximo ao Asp53, resíduo negativamente carregado, parece ter sido determinante para o bom escore obtido para **12**. Deste modo, sugere-se que a presença de substituintes na posição C8, principalmente da azida, seja favorável à formação do complexo LDHPf-ariloxazina.

Foi obtido que as ariloxazinas estudadas se orientam com os substituintes aromáticos da posição N10 paralelos à cadeia lateral da Phe100 da LDHPf (Fig. 71), onde aparecem importantes interações entre os sistemas π destes anéis. Estas interações π - π fornecem uma interação única à forma malarial desta enzima, já que, como visto anteriormente, nas LDHs de mamíferos este resíduo é substituído por Ala ou Val (na M-LDHh há a Ala97 e na H-LDHh há a Val98), ambas incapazes de fazer este tipo de interação. Sabe-se, também, que uma interação π -stacking perpendicular aparece entre o anel quinolina da **CQH** e esta mesma Phe100 (READ et al., 1999).

Além destas interações π , outras aparecem entre o substituinte aromático da posição N10 dos compostos e resíduos da LDHPf, dependendo da natureza do substituinte. **2a**, **12** e **14** apresentam um 4'-clorofenil nesta posição, o qual faz diversas interações de van der Waals com resíduos apolares do sítio, como Ile54, Gly99, Phe100 e Ile119 (Fig. 77A). O

átomo de cloro deste substituinte aponta em direção à entrada do sítio, estando envolvido apenas em contatos de van der Waals com Phe100. O substituinte 3',5'-diclorofenil de **4b** e **5b** também está envolvido em interações de van der Waals com os mesmos resíduos apolares; seus átomos de cloro, entretanto, agora fazem contato de van der Waals com Gly99 e Phe100 (Fig. 77B).

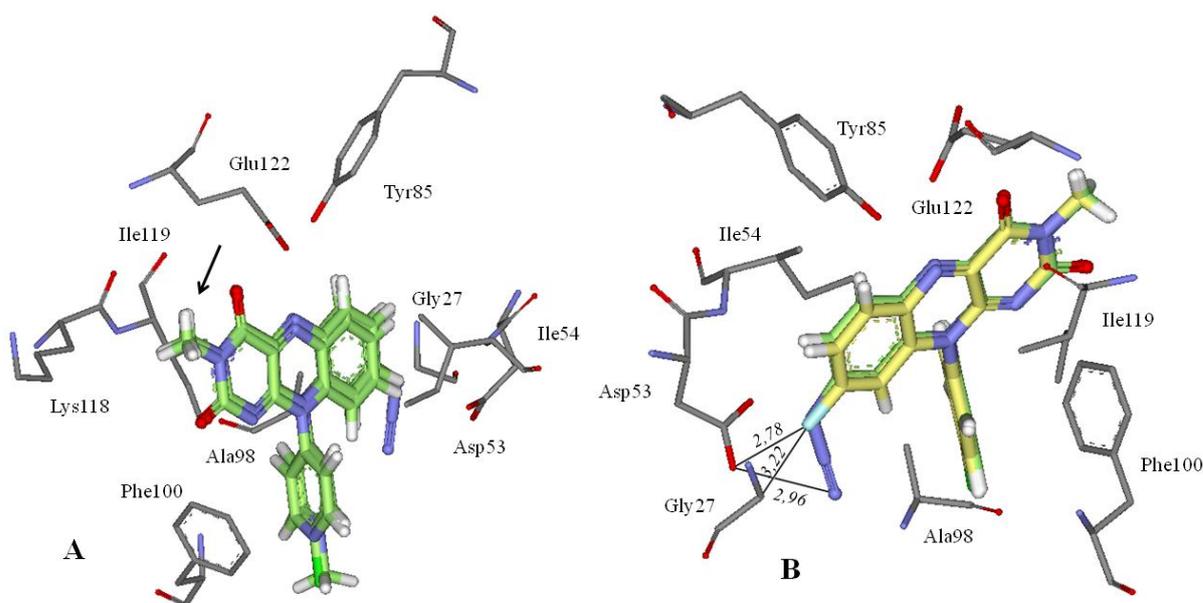


Figura 76 – A. Compostos **6**, **6a**, **12** e **14** e a LDHPf; a seta aponta para o substituinte metila da posição N3, o qual faz interações de van der Waals com Lys118 e Ile119. B. Compostos **12** (verde) e **14** (amarelo) no sítio de ligação da LDHPf.

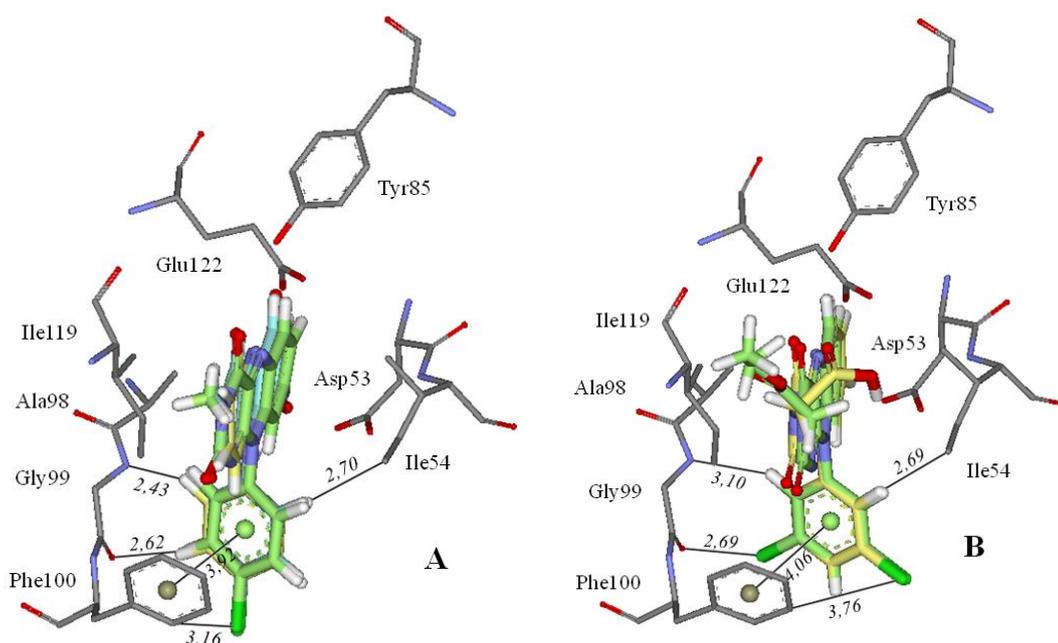


Figura 77 – A. Principais interações entre o substituinte 4'-clorofenil de **2a** (amarelo), **12** (verde) e **14** (ciano) e resíduos do sítio da LDHPf. B. Interações entre o 3,5'-diclorofenil de **4b** (verde) e **5b** (amarelo) e a LDHPf.

Os substituintes metilpiridínio-4'-il e 4'-piridil de **6** e **6a**, respectivamente, também se encontram envolvidos apenas em interações de van der Waals com as mesmas Ile54, Gly99, Phe100 e Ile119 da LDH*Pf* (Fig. 78A). O mesmo se repete para o 3'-trifluorometilfenil de **4c**; seus átomos de flúor orientam-se em direção à superfície da enzima, estando envolvidos apenas em contatos de van der Waals com Phe100 e Ile54 (Fig. 78B). Já o substituinte pentafluorfenil da posição N10 de **2e** está envolvido em uma rede de ligações de H entre seus átomos de flúor e resíduos do sítio: aparecem ligações de H do tipo N–H...F com a Gly99 e C–H...F com Ile54 e Ala98 (Fig. 79).

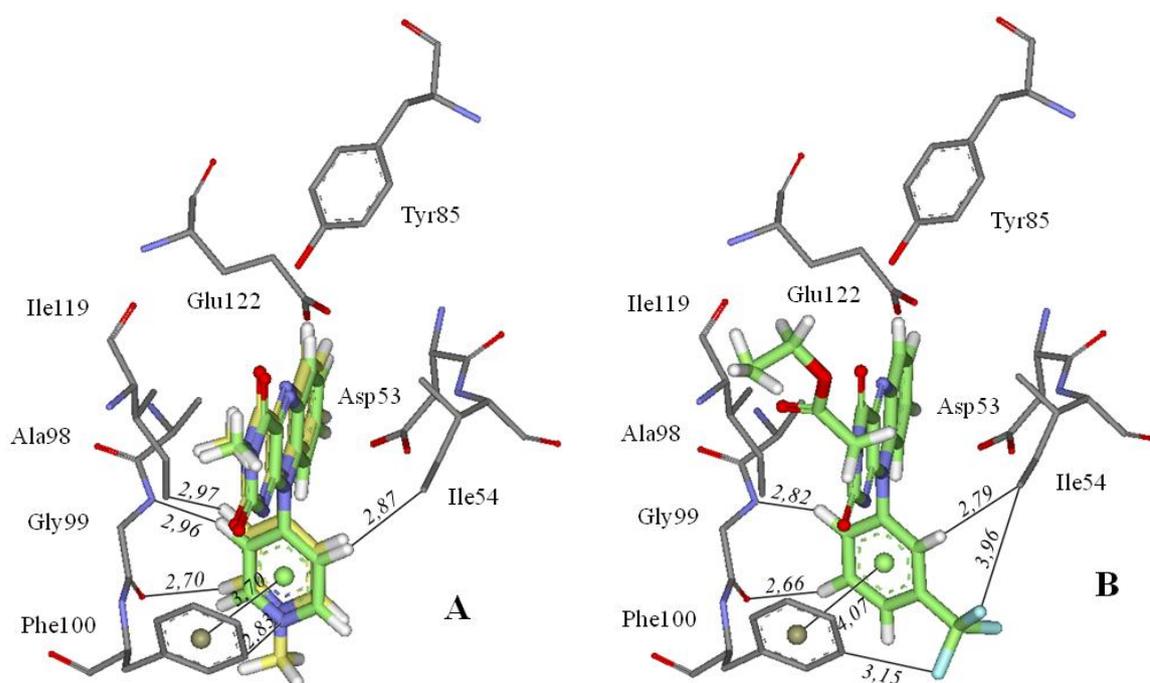


Figura 78 – **A.** Principais interações entre o substituinte aromático da posição N10 de **6** (amarelo) e **6a** (verde) e a enzima LDH*Pf*. **B.** Interações entre o 3'-trifluorometilfenil de **4c** e a LDH*Pf*.

Portanto, os diferentes substituintes na posição N10 parecem não influenciar tanto na formação do complexo com a LDH*Pf* quanto as diferenças nos substituintes da posição N3, já que estes substituintes aromáticos estão, em geral, envolvidos apenas em poucas interações de van der Waals com resíduos apolares do sítio (além, é claro, da importante interação π - π que todos eles fazem com a Phe100). Apenas o substituinte pentafluorfenil de **2e** consegue fazer ligações de H com a enzima, através de seus átomos de flúor (Fig. 79).

Substituintes mais volumosos neste N10, entretanto, parecem influenciar negativamente na formação do complexo, já que os compostos que possuíam os substituintes mais volumosos nesta posição foram os que apresentaram piores resultados, como é o caso de **19** e **20**. Estes não apresentaram um padrão muito bem definido de orientações no sítio; as saídas obtidas nos cálculos de *docking* foram, de certa forma, aleatórias em comparação com as obtidas para as outras ariloxazinas neste sítio. Sugere-se que isto seja devido ao grande volume do substituinte na posição N10, o que faz com que **19** e **20** se orientem de modo diferente do padrão obtido a fim de evitar choques estéricos entre estes substituintes e resíduos do sítio, como Gly99, Phe100 e Ile54 (Fig. 80).

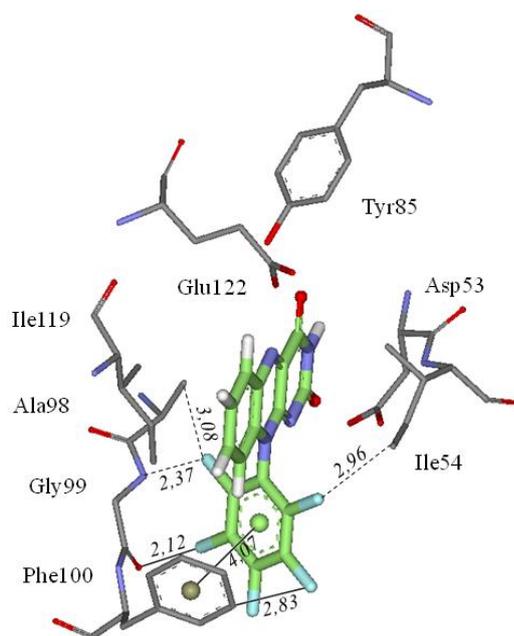


Figura 79 – Principais interações entre o pentafluorfenil de **2e** e resíduos da enzima LDHPf. Ligações de H são representadas como linhas pontilhadas.

A porção isoaloxazina de **19** se desloca, em relação ao padrão obtido para os outros compostos da família, possivelmente a fim de acomodar melhor seu 1'-naftil da posição N10 entre a Phe100 e a Ile54. Assim, um dos anéis aromáticos do 1'-naftil orienta-se paralelamente à cadeia lateral da Phe100, enquanto que o outro anel emparelha-se com uma metila da cadeia lateral da Ile54 (Fig. 80A).

O composto **20**, por sua vez, orienta-se com o substituinte 1'-antril da posição N10 na mesma região em que a porção isoaloxazina dos outros compostos se orienta,

ou seja, entre a Ile54, Ala98 e Ile119 (Fig. 80B). Nesta orientação, o anel aromático de sua porção isoaloxazina se sobrepõe ao obtido para os substituintes aromáticos da posição N10 dos compostos anteriores, paralelamente à cadeia lateral da Phe100. Assim, o substituinte hidrofóbico 1'-antril interage com diversos resíduos apolares do sítio, enquanto a porção isoaloxazina faz uma interação π - π com a Phe100. Estas interações hidrofóbicas parecem ter sido as responsáveis pelo bom escore obtido para este composto (Tabela 6). O substituinte metila da posição N3, entretanto, orienta-se em direção à superfície da enzima, não interagindo com resíduos do sítio.

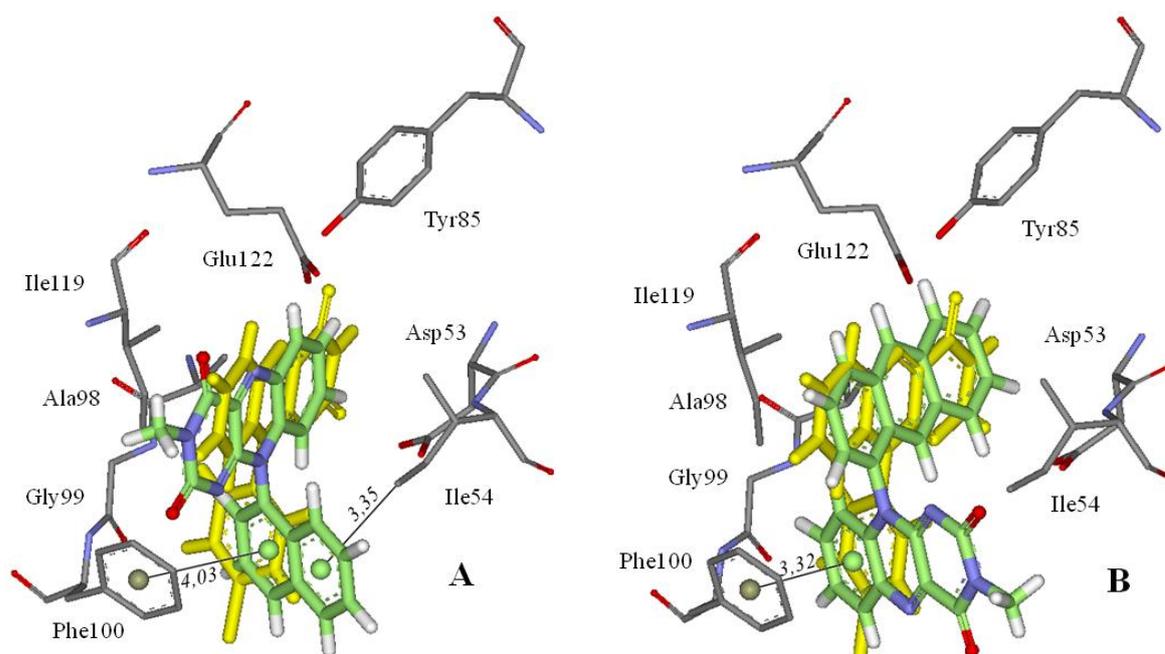


Figura 80 – **A.** Orientação de **19** (verde) no sítio do NADH da LDHPf, em comparação com **2a** (amarelo) que representa o modo de ligação padrão obtido para as ariloxazinas neste sítio. **B.** Orientação de **20** (verde) neste mesmo sítio, em comparação com **2a** (amarelo). Note que, neste caso, o substituinte 1'-antril se orienta na mesma região que a porção isoaloxazina de **2a**.

5 CONCLUSÕES

A partir de cálculos de *docking* de compostos da família das ariloxazinas e da cloroquina nas enzimas GRP_f, DHFRP_f e LDHP_f do parasita causador da malária, além das enzimas humanas correspondentes para fins de comparação, foi possível sugerir o modo de ligação destes compostos nestas enzimas, além de identificar quais os complexos e, portanto, os compostos mais favoráveis. Também foi possível elucidar o papel de cada substituinte das ariloxazinas na formação de complexos com as diferentes enzimas estudadas, identificando os substituintes mais favoráveis e os menos adequados para os compostos atuarem como inibidores destas enzimas. Ainda, para as GRh e GRP_f criou-se um modelo teórico para explicar os dados experimentais de Schönleben-Janás et al. (1996) e Sarma et al. (2003).

A sistematização dos resultados do *docking* nos diferentes sítios das diferentes enzimas estudadas é apresentada a seguir.

5.1 SI da enzima GRh

Os resultados de *docking* obtidos neste trabalho sugerem que as ariloxazinas se ligam ao SI da enzima GRh de modo que sua porção isoaloxazina orienta-se entre o par Phe78/Phe78' e seu substituinte aromático da posição N10 fica voltado para His75/His75' e His82/His82' (Fig. 35A). Uma orientação semelhante a esta foi obtida para **5a** e **5b** em estudos cristalográficos de Schönleben-Janás et al. (1996). Como mostra a Figura 35B, existe uma boa complementaridade de forma entre este sítio de ligação e as ariloxazinas, de modo que estes inibidores parecem se “encaixar” muito bem à enzima. Mais ainda, é possível que as interações π - π governem esta ligação das ariloxazinas, já que o sistema aromático dos inibidores se coloca entre o par Phe78/Phe78', formando um “sanduíche” com estas.

Os substituintes presentes nas posições N3 e N10 (e algumas vezes C8) das ariloxazinas influenciam de diferentes maneiras a formação do complexo GRh-inibidor. O papel destes substituintes é descrito a seguir:

Posição N3 – na posição N3 foi obtido que os substituintes H ou metila são igualmente favoráveis, estando envolvidos em interações de van der Waals com Asn71 e

Tyr407' (Fig. 36A e Fig. 37A) – este foi o caso da maioria dos compostos mais ativos (Tabela 2), como **2a**, **2b**, **2c**, **2e**, **3a**, **3b**, **3c**, **3e**, **6a**, **7a**, **12**, **14** e **18**. Substituintes mais volumosos nesta posição não são favoráveis, visto que se orientam muito próximos a resíduos de aminoácido do sítio e, a fim de se evitar choques estéricos com estes, sofrem mudanças conformacionais, orientando-se em uma conformação distinta da de mínima energia (Fig. 39), o que parece ter sido responsável pela atividade mais baixa dos compostos **4a**, **4b**, **4c**, **4d**, **5a**, **5b**, **5c** e **5d** (Tabela 2).

Posição N10 – para a posição N10, todos os substituintes parecem ser aceitáveis. No modo de ligação padrão obtido para as ariloxazinas neste sítio, o substituinte aromático desta posição fica entre o par His75/His75', onde ocorrem interações N–H... π (Fig. 40). Entretanto, foi obtido que quando está presente um substituinte mais volumoso nesta posição, como 3',5'-ditrifluormetilfenil (**2d**, **3d**, **4d** e **5d**), 1'-naftil (**19**) e 1'-antril (**20**), os compostos tendem a se orientar de maneira diferente deste padrão, com o substituinte do N10 apontando para o lado oposto do sítio (Fig. 44 e Fig. 45); apesar disto, esta orientação também parece aceitável para inibir a enzima, embora um pouco menos favorável do que as anteriores, visto que perdem-se as interações N–H... π . Além disso, substituintes menores nesta posição, como 4'-piridil (**6a**) e 3'-piridil (**7a**) interagem menos com a enzima e, provavelmente por isso, apresentam uma atividade um pouco menor do que compostos com outros substituintes nesta posição (Tabela 2). Um ponto interessante é que, embora tenham sido obtidos bons resultados para **6** e **7**, já se sabe que estes inibidores com carga positiva no substituinte da posição N10 não são favoráveis, pois a entrada do sítio é positivamente carregada, de forma que a carga nestes substituintes interfere na ligação à enzima (BIOT et al., 2004). Assim, os substituintes mais favoráveis, nesta posição, para inibirem a GRh parecem ser 4'-clorofenil, 3',5'-diclorofenil, 3'-trifluormetilfenil e pentafluorfenil.

Posição C8 – a presença de substituintes na posição C8, como a azida de **12** e o flúor de **14**, também parece favorável. O flúor de **14** está, inclusive, envolvido em uma ligação de H com a Tyr407' do sítio (Fig. 37B). Esta posição parece, portanto, adequada para receber diferentes substituintes, a fim de se aumentar a afinidade dos compostos pela enzima.

A presença de substituintes volumosos ao mesmo tempo nas posições N3 e N10, como é o caso de **4d** e **5d**, não é favorável, uma vez que estes inibidores parecem não “caber” adequadamente no sítio receptor. Por outro lado, sugere-se que os substituintes mais adequados para a posição N3 seja um H ou uma metila e para a posição N10 seja um 4'-clorofenil, 3',5'-diclorofenil, 3'-trifluormetilfenil ou um pentafluorfenil; ainda, um átomo de flúor na posição C8 também parece aumentar a afinidade dos inibidores pela enzima. Todos

estes resultados estão de acordo com dados experimentais de atividade de Schönleben-Janás et al. (1996) e Sarma et al. (2003), de modo que foi possível criar um modelo teórico para explicar estes dados, o que permitirá propor a síntese de novos compostos.

A Tabela 7 apresenta a influência, a partir dos resultados de *docking*, dos diferentes substituintes, nas diferentes posições dos compostos da família das ariloxazinas, na formação de complexos com as enzimas estudadas.

Tabela 7 – Influência dos substituintes das ariloxazinas na formação de complexos com as enzimas estudadas.

Substituinte		SI GRh ^a	SI GRP ^a	DHFRP ^a	DHFRh ^a	LDHP ^a	LDHh ^{a, b}
N3	H	+	+	+	+	+	-
	Metil	+	0	0	0	0	-
	(Etoxicarbonil)metil	-	-	-	-	-	-
	Carboximetil	-	-	-	-	+	-
N10	4'-Clorofenil	+	0	0	0	0	-
	3',5'-Diclorofenil	+	+	0	0	0	-
	3'-Trifluorometilfenil	+	0	0	0	0	-
	Pentafluorfenil	+	+	+	0	+	-
	Metilpiridínio-4'-il	-	-	+	+	0	-
	4'-Piridil	0	0	0	0	0	-
	1'-Naftil	0	0	+	+	-	-
	1'-Antril	0	-	+	+	-	-
C8	Azida	+	+	+	+	+	-
	Flúor	+	+	+	+	+	-

^a O sinal “+” indica que o substituinte é favorável na posição indicada; o sinal “-” indica que é desfavorável e o “0” indica que a influência do substituinte não é significativa. Nas situações onde o substituinte é favorável para a formação do complexo com uma enzima plasmódial e desfavorável para as enzimas humanas, o sinal aparece em vermelho.

^b Foi obtido, por meio de cálculos de *docking*, que a formação de complexos LDHh-ariloxazinas não é provável.

Para o inibidor **AM**, os resultados mostram que este se liga ao SI da GRh também entre o par Phe78/Phe78', onde ocorrem interações π - π com estes resíduos, e faz uma ligação de H com uma molécula de água do sítio (Fig. 46A). Entretanto, como o escore obtido para este composto foi muito inferior ao obtido para as ariloxazinas (Tabela 3) e, além disso, as interações que faz com a enzima não são tão adequadas como as que as ariloxazinas fazem, isto sugere que as ariloxazinas possam atuar melhor como inibidores da GRh do que o **AM**.

Já para a **CQH**, pelos resultados obtidos pode-se sugerir que a formação do complexo SI GRh-cloroquina é possível, embora esta enzima possa não ser o alvo preferencial da **CQH**. Este composto também se orienta com sua porção quinolina entre o par Phe78/Phe78' (Fig. 46B).

5.2 SI da enzima GRPf

As ariloxazinas apresentam praticamente um único padrão de ligação ao SI da GRPf. Neste padrão, a porção isoaloxazina dos inibidores encontra-se entre os resíduos Ser55 e Leu455 e com o substituinte aromático da posição N10 entre o par Phe420/Phe420', apontando para Ile59/Ile59' (Fig. 47). O substituinte da posição N3, por sua vez, pode ficar voltado para o Asp458 ou para o Asp58. O papel dos diferentes substituintes das ariloxazinas na formação de complexo com o SI da GRPf aparece a seguir.

Posição N3 – quando o substituinte nesta posição é um H, ocorrem ligações de H com Asp458, Asn456 e com uma molécula de água do sítio (Fig. 48A). Um substituinte mais volumoso do que um H nesta posição faz com que os compostos se orientem de maneira inversa, perdendo estas ligações de H, mas fazendo outras com a Tyr424 e com outra molécula de água (Fig. 48B). Substituintes muito volumosos nesta posição, como o (etoxicarbonil)metil (**4a**, **4b**, **4c** e **4d**) ou o carboximetil (**5a**, **5b**, **5c** e **5d**), se encaixam no sítio em uma conformação distinta da de mínima energia, assim como ocorreu para o SI da GRh, sugerindo que estes substituintes não são adequados nesta posição.

Posição N10 – no geral, os substituintes aromáticos desta posição formam um “sanduíche” com o par Phe420/Phe420', fazendo interações de van der Waals com os pares Ser55/Ser55' e Ile59/Ile59', além de Phe420/Phe420' (Fig. 51). Um substituinte volumoso como o 1'-antril de **20** não é favorável pois, devido ao seu tamanho, não se orienta entre Phe420/Phe420'. Substituintes aromáticos com átomos de cloro ou flúor nas posições 3' e 5' do anel parecem ser mais adequados para interagir com o sistema aromático do par Phe420/Phe420' (Fig. 52B e Fig. 54) – os resultados mostram que os substituintes 3',5'-diclorofenil e pentafluorfenil são os mais favoráveis nesta posição (o pentafluorfenil faz, inclusive, ligação de H com uma molécula de água do sítio). Assim como ocorreu para o SI da GRh, a carga positiva no substituinte da posição N10 não é favorável, também devido à entrada do sítio ser positivamente carregada e interferir na ligação do composto à enzima (BIOT et al., 2004).

Posição C8 – a presença da azida em **12** ou do flúor em **14** é favorável nesta posição, visto que ocorrem ligações de H entre estes substituintes e a Asn456 e também com uma molécula de água do sítio (Fig. 49).

Por tudo isto, é possível sugerir que a presença de um H na posição N3 é favorável pelas ligações de H que o composto faz com a enzima e as presenças do

pentafluorfenil ou do 3',5'-diclorofenil são as mais favoráveis na posição N10 pelas interações que os átomos de F e Cl, respectivamente, fazem com os anéis de Phe420 e Phe420', embora o pentafluorfenil pareça ser ainda mais favorável pela ligação de H que faz com uma molécula de água do sítio. Ainda, quando uma metila está presente na posição N3, a presença da azida ou do átomo de flúor na posição C8 torna-se interessante, pois consegue fazer ligações de H com a enzima. Assim como ocorria para a GRh, a presença de substituintes volumosos ao mesmo tempo nas posições N3 e N10 não é adequada para inibir a enzima (Tabela 7). Mais uma vez, estes resultados estão em concordância com dados experimentais (SARMA et al., 2003) e, portanto, novamente podemos postular um modelo teórico para explicar os dados de atividade.

Também foi possível concluir como se dá a formação do complexo GRPf-azul de metileno, um conhecido inibidor da enzima GRPf (FÄRBER et al., 1998). Sugere-se que o **AM** se orienta em uma posição próxima à obtida para a porção isoaloxazina das ariloxazinas, de modo que seu anel aromático fica perpendicular à cadeia lateral da Phe421, onde ocorre uma interação do tipo C–H... π (Fig. 57). Os escores obtidos (Tabela 3) e as interações que os compostos fazem com a enzima sugerem que as ariloxazinas apresentam uma maior afinidade pela GRPf do que o conhecido inibidor **AM**.

Para a **CQH** não foram obtidos bons resultados, de modo que se pode concluir que a formação do complexo GRPf-cloroquina não é favorável e, conseqüentemente, que a enzima GRPf não é um alvo para a ação do fármaco **CQH**.

5.3 SA das enzimas GRh e GRPf

Utilizando cálculos de *docking*, foi possível posicionar o substrato GSSG no SA da GRPf, já que não há estrutura cristalográfica desta enzima com seu substrato, e demonstrou-se que este se liga à enzima do parasita do mesmo modo que se liga à enzima humana, fazendo as mesmas interações (Fig. 58). Até mesmo os escores obtidos para o *docking* do substrato nestas enzimas foram semelhantes (Tabela 4).

Para as ariloxazinas, os resultados indicam que estas também se orientam da mesma maneira no SA da GRh e no SA da GRPf. Isto já era esperado, dada a grande semelhança entre os sítios ativos das duas enzimas. A porção isoaloxazina destes compostos orienta-se próxima às Arg37 e Arg347 na GRh (Arg18 e Arg361 na GRPf) e seus

substituintes aromáticos da posição N10 apontam para o par redox-ativo Cys58-Cys63 da GRh (Cys39-Cys44 na GRPf) (Fig. 59). A partir destes resultados e da comparação com dados de atividade presentes na literatura (SCHÖNLEBEN-JANAS et al., 1996; SARMA et al., 2003), pode-se concluir que o SA não é o sítio preferencial das ariloxazinas nas glutatonas redutases, já que a simulação demonstrou que a afinidade das ariloxazinas pelos SAs da GRh e da GRPf deveria ser praticamente a mesma, enquanto os dados experimentais mostram que estes compostos apresentam diferentes afinidades pelas duas enzimas (em geral, maior afinidade pela enzima humana). Portanto, as ariloxazinas devem mesmo se ligar ao SI destas enzimas, atuando como inibidores não-competitivos.

Além disso, mais uma vez os resultados de *docking* indicaram que o SA das enzimas GRh e GRPf não são os alvos preferenciais da CQH, visto que não foram obtidos bons resultados para este ligante nestes sítios.

5.4 Enzimas DHFRPf e DHFRh

A análise dos resultados de *docking* mostra que as ariloxazinas apresentam um modo de ligação padrão no sítio ativo do domínio diidrofolato redutase das enzimas DHFR-TSPf nativa, duplo e quádruplo mutantes, que é o mesmo obtido para a DHFRh. Neste padrão, a porção isoaloxazina dos ligantes orienta-se, em geral, entre os pares de resíduos Ser111/Ile112 e Leu46/Met55 da DHFRPf, com o substituinte aromático da posição N10 ficando paralelo à cadeia lateral da Phe58, onde aparecem importantes interações π - π (Fig. 60 e Fig. 61). Apenas as ariloxazinas com substituintes volumosos na posição N3, como **4b**, **4c** e **5b** fugiram deste padrão. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos para a DHFRh.

Posição N3 – foi obtido que um átomo de hidrogênio é o mais favorável como substituinte nesta posição, pois permitiu que os compostos fizessem duas ligações de hidrogênio com a Ser111 (Fig. 63). Estas mesmas ligações de H foram obtidas para a DHFRh, com o resíduo Ser59 correspondente. Uma metila nesta posição permitia que os compostos se orientassem de duas maneiras possíveis, ficando ou voltada para a Val45 ou fazendo interação C-H... π com a cadeia lateral da Phe116 (Fig. 64). Substituintes mais volumosos, como o (etoxicarbonil)metil e o carboximetil, fizeram com que **4b**, **4c** e **5b** se orientassem de maneira distinta do padrão obtido para os outros compostos (Fig. 70).

Posição N10 – substituintes apolares volumosos nesta posição, como 1'-naftil de **19** e 1'-antril de **20**, foram, segundo os resultados de *docking*, favoráveis para a formação de complexo com a DHFR*Pf*, pois ocupam uma região hidrofóbica do sítio, entre Ser108 (ou Asn108 nas formas mutantes) e Asp53 (Fig. 69), região esta onde se liga o sistema aromático heterocíclico do substrato e de muitos inibidores conhecidos (GREGSON e PLOWE, 2005), além de fazerem ligação C–H...O com a Ile164. O metilpiridínio-4'-il de **6** também parece favorável, visto que consegue fazer algumas ligações C–H...O com Ile14, Ile164 (ou Leu164 nas formas mutantes) e Tyr170 (Fig. 68A). Por fim, sugere-se que o pentafluorfenil como substituinte nesta posição, como em **2e**, também seja favorável para a formação do complexo devido a uma rede de ligações de H do tipo C–H...F que este substituinte faz com Met55, Phe58, Ile112 e Ile164; além disso, na forma mutante da enzima ocorre também uma ligação N–H...F com a Asn108 (Fig. 67), sendo um indício de que **2e** deve apresentar uma maior afinidade pelas formas mutantes da enzima do que pela DHFR-TSP*f* nativa ou pela DHFR*h*.

Posição C8 – quando uma metila está presente como substituinte na posição N3 das ariloxazinas, a presença da azida ou do flúor como substituintes na posição C8 (como em **12** e **14**, respectivamente) torna-se interessante devido às ligações de H que ocorrem entre estes substituintes e a hidroxila da Ser111 (Fig. 65). Estas ligações também foram obtidas para a DHFR*h*, através do resíduo Ser59.

Por tudo isto, pode-se concluir que as ariloxazinas devem apresentar uma afinidade semelhante pelas formas nativa, duplo e quádruplo mutante da enzima DHFR-TSP*f* (interações e escores semelhantes dos compostos nos complexos com as diferentes formas da enzima), embora para alguns compostos, como **2e**, possivelmente a afinidade seja maior pelas formas mutantes (ocorre ligação de H com a Asn108, única às enzimas mutantes). Ainda, foi possível sugerir que um átomo de H é o substituinte mais favorável na posição N3 e, quando estiver presente uma metila nesta posição, torna-se interessante a presença da azida ou do flúor no átomo C8. Para a posição N10, os resultados mostram que pentafluorfenil, metilpiridínio-4'-il, 1'-naftil e 1'-antril sejam favoráveis para a formação do complexo (Tabela 7).

Estes ligantes, entretanto, possivelmente apresentarão uma afinidade um pouco maior pela forma humana da enzima. Isto porque, além das interações citadas para a DHFR*Pf*, a DHFR*h* apresenta ainda a Phe31 no lugar da Met55 da enzima plasmodial, através da qual faz interações do tipo π - π com a porção isoaloxazina dos compostos (Fig. 62) – interações estas que não ocorrem quando se considera a DHFR*Pf*. Apesar disto, a presença do

substituinte pentafluorfenil na posição N10 dos compostos é mais favorável na formação de complexos com as DHFR Pf mutantes do que com a DHFR h , uma vez que nas enzimas mutantes do parasita ocorre uma ligação de H com a Asn108, a qual não ocorre com a enzima humana devido à presença da Thr56 menos volumosa nesta mesma posição (Fig. 62).

Os resultados também sugerem que as DHFR Pf e a DHFR h não sejam alvos preferenciais do fármaco **CQH**, uma vez não foi obtido um padrão de posicionamento deste ligante nestes sítios.

5.5 Enzimas LDHPf e LDHh

De acordo com os resultados obtidos dos cálculos de *docking*, foi possível concluir que as ariloxazinas apresentam, no geral, um modo de ligação padrão à enzima LDHPf, com estes compostos orientando-se com sua porção isoaloxazina entre os resíduos Ile54 de um lado e Ala98/Ile119 do lado oposto, e com seu substituinte aromático da posição N10 emparelhado com a cadeia lateral da Phe100, ocorrendo interações π - π (Fig. 71).

Nas M-LDHh e H-LDHh a porção isoaloxazina dos ligantes também se orienta entre Val52 e Ala95/Ile115 (na H-LDHh é Val53 e Ala96/Val116), correspondentes à Ile54 e Ala98/Ile119 da LDHPf. Contudo, devido à ausência de um resíduo de aminoácido com cadeia lateral aromática equivalente à Phe100 da LDHPf (há a Ala97 na M-LDHh e Val98 na H-LDHh), não ocorrem as interações do tipo π - π com os substituintes aromáticos da posição N10 das ariloxazinas na enzima humana (Fig. 72). Isto é um indício de que as ariloxazinas devem apresentar uma afinidade maior pela enzima plasmodial.

O modo como os diferentes substituintes das ariloxazinas podem influenciar na formação do complexo com a LDHPf aparece descrito a seguir.

Posição N3 – os resultados sugerem que um átomo de hidrogênio (como em **2e** e **2a**) ou um grupo carboximetil (como em **5b**) sejam os substituintes mais favoráveis para a formação de complexo com a enzima LDHPf: no primeiro caso devido ao pequeno volume do substituinte, o qual permite que a porção isoaloxazina assumira uma orientação “inversa” em relação aos demais compostos, permitindo uma ligação de H entre a hidroxila da Tyr85 e o O2 de **2e** e **2a** (Fig. 73A); no segundo caso, devido a uma ligação de H que ocorre entre o substituinte carboximetil e o grupo carboxílico do Glu122 (Fig. 75A). Substituintes muito volumosos nesta posição, como o (etoxicarbonil)metil de **4b** e **4c**, não foram favoráveis, uma

vez que estes se colocam na superfície da enzima, podendo assumir diversas conformações devido ao alto grau de liberdade nesta região da enzima (Fig. 74).

Posição N10 – para esta posição, substituintes muito volumosos, como o 1'-naftil de **19** e 1'-antril de **20**, parecem não ser favoráveis à formação do complexo. Todos os outros substituintes estudados nesta posição parecem ser aceitáveis, estando envolvidos em interações de van der Waals com resíduos apolares do sítio, além da interação π - π com a cadeia lateral da Phe100. Apenas o pentafluorofenil de **2e** parece ser capaz de fazer ligações de H com a enzima (Fig. 79).

Posição C8 – quando uma metila está presente no N3, a presença de substituintes na posição C8 das ariloxazinas também parece ser favorável (Tabela 6). Principalmente a presença de uma azida positivamente carregada, como em **12**, pois esta região do composto orienta-se próxima ao resíduo de aminoácido Asp53 negativamente carregado (Fig. 76B).

Sendo assim, podemos sugerir que os compostos **2e**, **5b** e **12** sejam os melhores candidatos a inibidores da enzima LDHPf: no primeiro caso devido às ligações de H do substituinte pentafluorfenil da posição N10, no segundo devido à ligação de H do carboximetil da posição N3 e, no terceiro, devido à proximidade entre a azida positivamente carregada da posição C8 e a cadeia lateral negativamente carregada do Asp53. Os compostos **4b**, **4c**, **19** e **20**, por sua vez, parecem ser os menos favoráveis: os dois primeiros devido ao substituinte volumoso na posição N3 e os dois últimos devido ao substituinte volumoso na posição N10 (Tabela 7).

5.6 Comparando as enzimas e compostos

Uma análise global dos resultados de *docking* (orientações dos compostos, suas interações com as enzimas e média dos escores) permite concluir que as ariloxazinas devem apresentar maior afinidade pela GRh, seguida por GRPf, DHFRh, DHFR-TSPf, LDHPf e LDHh, nesta ordem. Este resultado está de acordo com dados experimentais que mostram que as ariloxazinas se ligam às enzimas GRh e GRPf, mas com maior afinidade pela forma humana (SARMA et al., 2003). Isto não é desejado, uma vez que se pretende inibir enzimas do parasita sem interferir em enzimas do hospedeiro humano.

Esta maior afinidade das ariloxazinas pela GRh parece ser devido ao par Phe78/Phe78', já que os inibidores se orientaram entre esse par e as interações π - π estabilizaram este complexo. Muitos outros inibidores da GRh também se orientam entre estes resíduos e são estabilizados por interações π - π , como a menadiona, o ácido 6-hidroxi-3-oxo-3H-xantona-9-propionico (**XAN**) e outros (KARPLUS, PAI e SCHULZ, 1989; SAVVIDES e KARPLUS, 1996; BIOT et al., 2004). Neste trabalho foi obtido, ainda, que o **AM** também se liga à GRh orientando-se entre Phe78/Phe78'.

As interações entre anéis, principalmente interações π - π , foram essenciais em todos os complexos formados. Na GRh, a porção isoaloxazina dos compostos orienta-se entre Phe78/Phe78', onde ocorrem estas interações; na GRPf, o substituinte aromático da posição N10 destes inibidores orienta-se perpendicularmente entre Phe420/Phe420', ocorrendo interações C-H... π ou interações entre os átomos de Cl ou F e os sistemas π destes resíduos; na DHFR-TSPf o substituinte aromático da posição N10 fica paralelo à Phe58 e, na LDHPf, paralelo à Phe100, também ocorrendo interações π - π .

Embora no geral os resultados tenham sido melhores para a enzima GRh, foi possível observar que alguns substituintes das ariloxazinas interferem negativamente na ligação às enzimas humanas ao mesmo tempo em que, possivelmente, aumentam a afinidade por enzimas do parasita (Tabela 7). Assim, tendo como base os resultados de *docking* em diferentes sítios de ligação das enzimas GRh, GRPf, DHFRPf, DHFRh, LDHPf e LDHh, resume-se a seguir a influência destes substituintes:

Posição N3 – um átomo de H como substituinte nesta posição é o mais favorável para a formação de complexos com todas as enzimas estudadas, sendo que somente para a LDHPf um carboximetil nesta mesma posição, como o de **5b**, também parece ser favorável. Substituintes muito volumosos nesta posição, como o (etoxicarbonil)metil, não são favoráveis à formação do complexo em nenhuma das enzimas estudadas; assim, pode-se sugerir que os compostos **4b** e **4c** não são adequados para atuarem como fármacos contra a malária (Tabela 7).

Posição N10 – o substituinte pentafluorfenil de **2e** é um dos mais favoráveis para aumentar a afinidade das ariloxazinas pelas enzimas plasmodiais GRPf, DHFR-TSPf e LDHPf, enquanto que a presença deste pouco influencia na formação do complexo com a GRh. Além disso, o substituinte metilpiridínio-4'-il foi favorável nesta posição para se ligar às enzimas DHFR-TSPf e DHFRh e foi desfavorável quando se considerou as enzimas GRh e GRPf (Tabela 7).

Posição C8 – de acordo com os resultados obtidos, a presença de uma azida ou um átomo de flúor nesta posição é favorável para aumentar a afinidade pelas *GRPf*, *DHFR-TSPf* e *LDHPf* apenas quando uma metila está presente no N3. Para a *GRh*, estes substituintes são favoráveis mesmo com a presença de um H no N3 (Tabela 7).

Portanto, para se buscar inibidores da família das ariloxazinas que apresentem maior afinidade pela *GRPf* do que pela *GRh*, sugere-se considerar um pentafluorfenil como substituinte na posição N10, como em **2e**. Para que atuem como inibidores da *DHFR-TSPf*, também o pentafluorfenil seria interessante nesta posição, já que o composto possivelmente apresentaria uma maior afinidade pela forma mutante desta enzima e, portanto, ideal para lidar com as mutações ocorridas na enzima para conferir resistência aos antifolatos antimaláricos atualmente disponíveis. Por fim, na busca por ariloxazinas com maior afinidade pela *LDHPf*, sugere-se considerar um carboximetil na posição N3, pois foi favorável para esta enzima e desfavorável para as enzimas humanas *GRh*, *DHFRh* e *LDHh*, além de se considerar também um pentafluorfenil na posição N10 (Tabela 7).

Foi possível concluir, ainda, que as enzimas *GRPf* e *DHFR-TSPf* não são alvos do fármaco antimalárico **CQH**, de modo que seu modo de ação permanece incerto. Para a *GRh*, sugere-se que a formação *GRh-CQH* seja possível, embora este não seja o alvo preferencial deste composto. Por fim, estes estudos de *docking* permitiram elucidar o comportamento do conhecido antimalárico **AM** no SI das enzimas *GRh* e *GRPf*.

Desta maneira, todos estes dados podem ser tomados como ponto de partida para o *design* de novos compostos da família das ariloxazinas, a fim de que possam atuar como compostos líderes na busca por inibidores eficientes das enzimas *GRPf*, *DHFR-TSPf* e *LDHPf*, interferindo o mínimo possível no funcionamento das enzimas humanas correspondentes e, conseqüentemente, podendo vir a atuar como fármacos contra a malária que apresentem poucos efeitos colaterais.

REFERÊNCIAS

BIOT, C.; BAUER, H.; SCHIRMER, R. H.; DAVIOUD-CHARVET, E. 5-substituted tetrazoles as bioisosteres of carboxylic acids. Bioisosterism and mechanistic studies on glutathione reductase inhibitors as antimalarials. **J. Med. Chem.**, v. 47, p. 5972-5983, 2004.

BÖHME, C. C.; ARSCOTT, L. D.; BECKER, K.; SCHIRMER, R. H.; WILLIAMS, C. H. Kinetic characterization of glutathione reductase from the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 48, p. 37317-37323, 2000.

BOSTRÖM, J.; NORRBY, P. O.; LILJEFORS, T. Conformational energy penalties of protein-bound ligands. **J. Comput.-Aided Mol. Des.**, v.12, p. 383-396, 1998.

BRAGA, E. M.; FONTES, C. J. F. *Plasmodium* – Malária. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 10^a ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2002. cap. 17

BREMAN, J. G. The ears of the hippopotamus: manifestations, determinants, and estimates of the malaria burden. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 64, n. 1-2, p. 1-11, 2001.

BROWN, W. M.; YOWELL, C. A.; HOARD, A.; JAGT, T. A. V.; HUNSAKER, L. A.; DECK, L. M.; ROYER, R. E.; PIPER, R. C.; DAME, J. B.; MAKLER, M. T.; JAGT, D. L. V. Comparative structural analysis and kinetic properties of lactate dehydrogenases from four species of human malarial parasites. **Biochemistry**, v. 43, p. 6219-6229, 2004.

BUCHHOLZ, K.; SCHIRMER, R. H.; EUBEL, J. K.; AKOACHERE, M. B.; DANDEKAR, T.; BECKER, K.; GROMER, S. Interactions of methylene blue with human disulfide reductases and their orthologues from *Plasmodium falciparum*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 52, n. 1, p. 183-191, 2008.

CAMERON, A.; READ, J.; TRANTER, R.; WINTER, V. J.; SESSIONS, R. B.; BRADY, R. L.; VIVAS, L.; EASTON, A.; HENDRICK, G.; CROFT, S. L.; BARROS, D.; LAVANDERA, J. L.; MARTIN, J. J.; RISCO, F.; GARCÍA-OCHOA, S.; GAMO, F. J.; SANZ, L.; LEON, L.; RUIZ, J. R.; GABARRÓ, R.; MALLO, A.; de las HERAS, F. G. Identification and activity of a series of azole-based compounds with lactate dehydrogenase-directed anti-malarial activity. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 30, p. 31429-31439, 2004.

CHOI, S.; BEELER, A. B.; PRADHAN, A.; WATKINS, E. B.; RIMOLDI, J. M.; TEKWANI, B.; AVERY, M. A. Generation of oxamic acid libraries: antimalarials and inhibitors of *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase. **J. Comb. Chem.**, v. 9, p. 292-300, 2007.

CHUSACULTANACHAI, S.; THIENSATHIT, P.; TARNCHOMPOO, B.; SIRAWARAPORN, W.; YUTHAVONG, Y. Novel antifolate resistant mutations of *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase selected in *Escherichia coli*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 120, p. 61-72, 2002.

CLARK, M.; CRAMER, R. D.; VAN OPDENBOSCH, N. Validation of the general-purpose Tripos 5.2 force field. **J. Comput. Chem.**, v. 10, p. 982-1012, 1989.

CLUSTALW – ClustalW *on line*. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>>. Acesso em: 02 jul. 2009.

CONNERS, R.; SCHAMBACH, F.; READ, J.; CAMERON, A.; SESSIONS, R. B.; VIVAS, L.; EASTON, A.; CROFT, S. L.; BRADY, R. L. Mapping the binding site for gossypol-like inhibitors of *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 142, p. 137-148, 2005.

CSD - Cambridge Structural Database - licença concedida ao Prof. Dr. Julio Zukerman Schpector - LaCrEMM - DQ - UFSCar

DAVIOUD-CHARVET, E.; DELARUE, S.; BIOT, C.; SCHWÖBEL, B.; BÖHME, C., C.; MÜSSIGBRODT, A.; MAES, L.; SERGHERAERT, C.; GRELLIER, P.; SCHIRMER, H.; BECKER, K. A prodrug form of a *Plasmodium falciparum* glutathione reductase inhibitor conjugated with a 4-anilinoquinoline. **J. Med. Chem.**, v. 44, p. 4268-4276, 2001.

DECK, L. M.; ROYER, R. E.; CHAMBLEE, B. B.; HERNANDEZ, V. M.; MALONE, R. R.; TORRES, J. E.; HUNSAKER, L. A.; PIPER, R. C.; MAKLER, M. T.; JAGT, D. L. V. Selective inhibitors of human lactate dehydrogenases and lactate dehydrogenase from the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. **J. Med. Chem.**, v. 41, p. 3879-3887, 1998.

DELFINO, R. T.; SANTOS-FILHO, O. A.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Molecular modeling of wild-type and antifolate resistant mutant *Plasmodium falciparum* DHFR. **Biophys. Chem.**, v. 98, p. 287-300, 2002.

DS Visualizer 2.0. Discovery Studio Visualizer 2.0, *Accelrys Inc., San Diego*, 2007. Disponível em: <<http://accelrys.com>>. Acesso em: 25 mar. 2009.

DUNN, C. R.; BANFIELD, M. J.; BARKER, J. J.; HIGHAM, C. W.; MORETON, K. M.; TURGUT-BALIK, D.; BRADY, R. L.; HOLBROOK, J. J. The structure of lactate dehydrogenase from *Plasmodium falciparum* reveals a new target for anti-malarial design. **Nat. Struct. Biol.**, v. 3, p. 912-915, 1996.

ERMONDI, G.; CARON, G. Recognition forces in ligand-protein complexes: Blending information from different sources. **Biochem. Pharm.**, v. 72, p. 1633-1645, 2006.

EWING, T. J. A.; KUNTZ, I. D. Critical evaluation of search algorithms for automated molecular docking and database screening. **J. Comput. Chem.**, v. 18, p. 1175-1189, 1997.

EWING, T. J. A.; MAKINO, S.; SKILLMAN, A. G.; KUNTZ, I. D. DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases. **J. Comput. Aided Mol. Des.**, v. 15, p. 411-428, 2001.

FÄRBER, P. M.; ARSCOTT, L. D.; WILLIAMS Jr, C. H.; BECKER, K.; SCHIRMER, R. H. Recombinant *Plasmodium falciparum* glutathione reductase is inhibited by the antimalarial dye methylene blue. **FEBS Lett.**, v. 442, p. 311-314, 1998.

FERONE, R. Folate metabolism in malaria. **Bull. World Health Organ.**, v. 55, p. 291-298, 1977.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz. Disponível em:

<www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=191&sid=6>. Acesso em: 13 mai. 2009.

FOGEL, G. B.; CHEUNG, M.; PITTMAN, E. Modeling the inhibition of quadruple mutant *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase by pyrimethamine derivatives. **J. Comput. Aided Mol. Des.**, v. 22, p. 29-38, 2008.

FOGEL, G. B.; CHEUNG, M.; PITTMAN, E.; HECHT, D. *In silico* screening against wild-type and mutant *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase. **J. Mol. Graphics Modell.**, v. 26, p. 1145-1152, 2008.

FOLEY, M.; TILLEY, L. Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance and prospects for new agents. **Pharmacol. Ther.**, v. 79, p. 55-87, 1998.

FRANÇA, T. C. C.; SANTOS, M. G.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. **Quim. Nova**, v. 31, p. 1271-1278, 2008.

GANS, J.; SHALLOWAY, D. Qmol: a program for molecular visualization on Windows based PCs. **J. Mol. Graphics Model.**, v. 19, p. 557-559, 2001.

GINSBURG, H. A double-headed pro-drug that overcomes chloroquine resistance. **Trends Parasitol.**, v. 18, n. 3, p. 103, 2002.

GREENWOOD, B.; MUTABINGWA, T. Malaria in 2002. **Nature**, v. 415, p. 670-672, 2002.

GREGSON, A.; PLOWE, C. V. Mechanisms of resistance of malaria parasites to antifolate. **Pharmacol. Rev.**, v. 57, p. 117-145, 2005.

GSCHWEND, D. A.; GOOD, A. C.; KUNTZ, I. D. Molecular docking towards drug discovery. **J. Mol. Recognit.**, v. 9, p. 175-186, 1996.

GUEX, N.; PEITSCH, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, v. 18, p. 2714-2723, 1997.

Hermes v.1.0.1. Hermes 1.0.1, *The Cambridge Crystallographic Data Centre, Cambridge*, 2008. Disponível em: <http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/hermes/>. Acesso em: 18 jan. 2009.

HYPERCHEM, Release 6.01 for Windows, Molecular Modeling System, *Hypercube, Inc.*, Gainsville, FL, 2000.

IVANETICH, K. M.; SANTI, D. V. Bifunctional thymidylate synthase-dihydrofolate reductase in protozoa. **FASEB J.**, v. 4, p. 1591-1597, 1990.

- JANES, W.; SCHULZ, G. E. Role of the charged groups of glutathione disulfide in the catalysis of glutathione reductase: crystallographic and kinetics studies with synthetic analogues. **Biochemistry**, v. 29, p. 4022-4030, 1990.
- JONES, T. A.; ZOU, J. Y.; COWAN, S. W.; KJELDGAARD, M. Improved methods for building protein models in electron-density maps and the location of errors in these models. **Acta Crystallogr.**, v. A47, p. 110-111, 1991.
- JONES, G.; WILLETT, P. Docking small-molecule ligands into active sites. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v.6, p. 652-656, 1995.
- JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R. C. Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. **J. Mol. Biol.**, v. 245, p. 43-53, 1995.
- JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R. C.; LEACH, A. R.; TAYLOR, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **J. Mol. Biol.**, v. 267, p. 727-748, 1997.
- JONES, T.A.; KJELDGAARD, M. Manual for O, Uppsala, Uppsala University, [199-].
- KANG, L.; LI, H.; JIANG, H.; WANG, X. An improved adaptive genetic algorithm for protein-ligand docking. **J. Comput. Aided Mol. Des.**, v. 23, p. 1-12, 2009.
- KARPLUS, P. A.; SCHULZ, G. E. Substrate binding and catalysis by glutathione reductase as derived from refined enzyme: substrate crystal structures at 2 Å resolution. **J. Mol. Biol.**, v. 210, n. 1, p. 163-180, 1989.
- KARPLUS, P. A.; PAI, E. F.; SCHULZ, G. E. A crystallographic study of the glutathione binding site of glutathione reductase at 0.3-nm resolution. **Eur. J. Biochem.**, v. 178, p. 693-703, 1989.
- KLON, A. E.; HÉROUX, A.; ROSS, L. J.; PATHAK, V.; JOHNSON, C. A.; PIPER, J. R.; BORHANI, D. W. Atomic structures of human dihydrofolate reductase complexes with NADPH and two lipophilic antifolates at 1.09 Å and 1.05 Å resolution. **J. Mol. Biol.**, v. 320, p. 677-693, 2002.
- KONTOYIANNI, M.; McCLELLAN, L. M.; SOKOL, G. S. Evaluation of docking performance: comparative data on docking algorithms. **J. Med. Chem.**, v. 47, p. 558-565, 2004.
- KRAUTH-SIEGEL, R. L.; MÜLLER, J. G.; LOTTSPREICH, F.; SCHIRMER, R. H. Glutathione reductase and glutamate dehydrogenase of *Plasmodium falciparum*, the causative agent of tropical malaria. **Eur. J. Biochem.**, v. 235, p. 345-350, 1996.
- KRAUTH-SIEGEL, R. L.; SCHIRMER, R. H.; BAUER, H. Dithiol proteins as guardians of the intracellular redox milieu in parasites: old and new drug targets in trypanosomes and malaria-causing plasmodia. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 44, p. 690-715, 2005.
- KUNTZ, I. D.; BLANEY J. M.; OATLAY S. J.; LANDRIDGE R.; FERRIN T. E. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. **J. Mol. Biol.**, v. 161, p. 269, 1982.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; McGETTIGAN, P. A.; McWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, 2007.

LEMCKE, T.; CHRISTENSEN, I. T.; JØRGENSEN, F. S. Towards an understanding of drug resistance in malaria: three-dimensional structure of *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase by homology building. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 7, p. 1003-1011, 1999.

MACRAE, C. F.; EDGINGTON, P. R.; McCABE, P.; PICOCK, E.; SHIELDS, G. P.; TAYLOR, R.; TOWLER, M.; VAN DE STREEK, J. Mercury: visualization and analysis of crystal structures. **J. Appl. Cryst.**, v. 39, p. 453-457, 2006.

MAITARAD, P.; KAMCHONWONGPAISAN, S.; VANICHTANANKUL, J.; VILAIIVAN, T.; YUTHAVONG, Y.; HANNONGBUA, S. Interactions between cycloguanil derivatives and wild type and resistance-associated mutant *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductases. **J. Comput. Aided Mol. Des.**, v. 23, p. 241-252, 2009.

McCARTHY, D. J. Computational approaches to structure-based ligand design. **Pharmacol. Ther.**, v. 84, p. 179-191, 1999.

MILLER, L. H.; BARUCH, D. I.; MARSH, K.; DOUMBO, O. K. The pathogenic basis of malaria. **Nature**, v. 415, p. 673-679, 2002.

MIRANDA, M. N. **Algoritmos genéticos: fundamentos e aplicações**. 2000. Disponível em: <<http://www.gta.ufrj.br/~marcio/genetic.html>>. Acesso em: 14 nov. 2009.

MOPAC2009, James J. P. Stewart, Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA, <http://OpenMOPAC.net>, 2008

MORRIS, G. M.; GOODSSELL, D. S.; HALLIDAY, R. S.; HUEY, R.; HART, W. E.; BELEW, R. K.; OLSON, A. J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **J. Comput. Chem.**, v. 19, n. 14, p. 1639-1662, 1998.

MOUSTAKAS, D. T.; LANG, P. T.; PEGG, S.; PETTERSEN, E.; KUNTZ, I. D.; BROOIJMANS, N.; RIZZO, R. C. Development and validation of a modular, extensible docking program: DOCK 5. **J. Comput. Aided Mol. Des.**, v. 20, p. 601-619, 2006.

MÜLLER, S.; BECKER K.; BERGMANN, B.; SCHIRMER H. R.; WALTER R. D. *Plasmodium falciparum* glutathione reductase exhibits sequence similarities with the human host enzyme in the core structure but differs at the ligand-binding sites. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 74, p. 11-18, 1995.

MÜLLER, S. Redox and antioxidant systems of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Mol. Microbiol.**, v. 53, p. 1291-1305, 2004.

NCBI – National Center of Biotechnology Information. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 02 jul. 2009.

NISSINK, J. W. M.; MURRAY, C.; HARTSHORN, M.; VERDONK, M. L.; COLE, J. C.; TAYLOR, R. A new test set for validating predictions of protein-ligand interaction. **Proteins: Struct., Funct., Genet.**, v. 49, p. 457-471, 2002.

OLLIARO, P. Mode of action and mechanisms of resistance for antimalarial drugs. **Pharmacol. Ther.**, v. 89, p. 207-219, 2001.

PAI, E. F.; SCHULZ, G. E. The Catalytic Mechanism of Glutathione Reductase as Derived from X-ray Diffraction Analyses of Reaction Intermediates. **J. Biol. Chem.**, v. 258, n. 3, p. 1752-1757, 1983.

PARENTI, M. D.; PACCHIONI, S.; FERRARI, A. M.; RASTELLI, G. Three-dimensional quantitative structure-activity relationship analysis of a set of *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase inhibitors using a pharmacophore generation approach. **J. Med. Chem.**, v. 47, p. 4258-4267, 2004.

PDB – Protein Data Bank. Disponível em: <www.rcsb.org/pdb>. Acesso em: 07 mar. 2009.

PDBSum. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/>>. Acesso em: 07 mar. 2009.

PLOUFFE, D.; BRINKER, A.; McNAMARA, C.; HENSON, K.; KATO, N.; KUHEN, K.; NAGLE, A.; ADRIÁN, F.; MATZEN, J. T.; ANDERSON, P.; NAM, T.; GRAY, N. S.; CHATTERJEE, A.; JANES, J.; YAN, S. F.; TRAGER, R.; CALDWELL, J. S.; SCHULTZ, P. G.; ZHOU, Y.; WINZELER, E. A. *In silico* activity profiling reveals the mechanism of action of antimalarials discovered in a high-throughput screen. **PNAS**, v. 105, n. 26, p. 9059-9064, 2008.

RASTELLI, G.; SIRAWARAPORN, W.; SOMPORNPIST, P.; VILAIVAN, T.; KAMCHONWONGPAISAN, S.; QUARRELL, R.; LOWE, G.; THEBTARANONTH, Y.; YUTHAVONG, Y. Interactions of pyrimethamine, cycloguanil, WR99210 and their analogues with *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase: structural basis of antifolate resistance. **Bioor. Med. Chem.**, v. 8, p. 1117-1128, 2000.

RASTELLI, G.; PACCHIONI, S.; SIRAWARAPORN, W.; SIRAWARAPORN, R.; PARENTI, M. D.; FERRARI, A. M. Docking and database screening reveal new classes of *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase inhibitors. **J. Med. Chem.**, v. 46, p. 2834-2845, 2003.

RAZAKANTOANINA, V.; PHUNG, N. K. P.; JAUREGUIBERRY, G. Antimalarial activity of new gossypol derivatives. **Parasitol. Res.**, v. 86, p. 665-668, 2000.

READ, J. A.; WILKINSON, K. W.; TRANTER, R.; SESSIONS, R. B.; BRADY, R. L. Chloroquine binds in the cofactor binding site of *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 15, p. 10213-10218, 1999.

READ, J. A.; WINTER, V. J.; ESZES, C. M.; SESSIONS, R. B.; BRADY, R. L. Structural basis for altered activity of M- and H-isozyme forms of human lactate dehydrogenase. **Proteins: Struct., Funct., Genet.**, v. 43, p. 175-185, 2001.

RESTER, U. Dock around the clock – current status of small molecule docking and scoring. **QSAR Comb. Sci.**, v. 25, n. 7, p. 605-615, 2006.

RIDLEY, R. G. Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. **Nature**, v. 415, 2002.

ROUMEN, L.; SANDERS, M. P. A.; PIETERSE, K.; HILBERS, P. A. J.; PLATE, R.; CUSTERS, E.; GOOYER, M.; SMITS, J. F. M.; BEUGELS, I.; EMMEN, J.; OTTENHEIJM, H. C. J.; LEYSEN, D.; HERMANS, J. J. R. Construction of 3D models of the CYP11B family as a tool to predict ligand binding characteristics. **J. Comput. Aided Mol. Des.**, v. 21, p. 455-471, 2007.

ROVER JÚNIOR, L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quim. Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

SACHS, J.; MALANEY, P. The economic and social burden of malaria. **Nature**, v. 415, p. 680-685, 2002.

SARMA, G.N.; SAVVIDES, S.N.; BECKER, K.; SCHIRMER, M.; SCHIRMER, R.H.; KARPLUS, P.A. Glutathione reductase of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*: crystal structure and inhibitor development. **J. Mol. Biol.**, v. 328, p. 893-907, 2003.

SAVVIDES, S. N.; KARPLUS, P. A. Kinetics and crystallographic analysis of human glutathione reductase in complex with a xanthene inhibitor. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 14, p. 8101-8107, 1996.

SCHÖNLEBEN-JANAS, A.; KIRSCH, P.; MITTL, P. R. E.; SCHIRMER, R. H.; KRAUTH-SIEGEL, R. L. Inhibition of human glutathione reductase by 10-arylisoalloxazines: crystallographic, kinetic, and electrochemical studies. **J. Med. Chem.**, v. 39, p. 1549-1554, 1996.

SESSIONS, R. B.; DEWAR, V.; CLARKE, A. R.; HOLBROOK, J. J. A model of *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase and its implications for the design of improved antimalarials and the enhanced detection of parasitaemia. **Protein Eng.**, v. 10, n. 4, p. 301-306, 1997.

SHERMAN, I. W. Biochemistry of *Plasmodium* (malarial parasites). **Microbiological Reviews**, v. 43, n. 4, p. 453-495, 1979.

SHINKAI, S.; KAWANABE, S.; KAWASE, A.; YAMAGUCHI, T.; MANABE, O.; HARADA, S.; NAKAMURA, H.; KASAI, N. Flavin activation by intramolecular acid catalysis at N(1) position. **Bull. Chem. Soc. Jpn.**, v. 61, p. 2095-2102, 1988.

SHOEMARK, D. K.; CLIFF, M. J.; SESSIONS, R. B.; CLARKE, A. R. Enzymatic properties of the lactate dehydrogenase enzyme from *Plasmodium falciparum*. **FEBS Journal**, v. 274, p. 2738-2748, 2007.

SHOICHET, B. K.; KUNTZ, I. D. Protein docking and complementarity. **J. Mol. Biol.**, v. 221, p. 327-346, 1991.

SHOICHET, B. K.; BODIAN, D. L.; KUNTZ, I. D. Molecular docking using shape descriptors. **J. Comp. Chem.**, v. 13, p. 380-397, 1992.

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods V: modification of NDDO approximations and application to 70 elements. **J. Mol. Model.**, v. 13, p. 1173-1213, 2007.

SwissPDB Viewer – SwissPDB Viewer. Disponível em: <<http://spdbv.vital-it.ch/>>. Acesso em: 10 fev. 2009.

VEGA-TEIJIDO, M., CARACELLI, I., ZUKERMAN-SCHPECTOR, J. Conformational analyses and docking studies of a series of 5-nitrofuranyl- and 5-nitrothiophenyl-semicarbazone derivatives in three possible binding sites of trypanothione and glutathione reductases. **J. Mol. Graph. Model.**, v. 24, p. 349-355, 2006.

VERDONK, M. L.; COLE, J. C.; HARTSHORN, M. J.; MURRAY, C. W.; TAYLOR, R. D. Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins**, v. 52, p. 609-623, 2003.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 2000. cap. 14

WARHURST, D. C. Antimalarial drug discovery: development of inhibitors of dihydrofolate reductase active in drug resistance. **Drug Discovery Today**, v. 3, p. 538-546, 1998.

WHO – World Health Organization. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/malaria/en/>>. Acesso em: 10 set. 2007.

WILLETT, P. Genetic algorithms in molecular recognition and design. **Trends Biotechnol.**, v. 13, p. 516-521, 1995.

YEH, I.; HANEKAMP, T.; TSOKA, S.; KARP, P. D.; ALTMAN, R. B. Computational analysis of *Plasmodium falciparum* metabolism: organizing genomic information to facilitate drug discovery. **Genome Res.**, v. 14, p. 917-924, 2004.

YUTHAVONG, Y.; YUVANIYAMA, J.; CHITNUMSUB, P.; VANICHTANANKUL, J.; CHUSACULTANACHAI, S.; TARNCHOMPOO, B.; VILAIVAN, T.; KAMCHONWONGPAISAN, S. Malarial (*Plasmodium falciparum*) dihydrofolate reductase-thymidylate synthase: structural basis for antifolate resistance and development of effective inhibitors. **Parasitol.**, v. 130, p. 249-259, 2005.

YUVANIYAMA, J.; CHITNUMSUB, P.; KAMCHONWONGPAISAN, S.; VANICHTANANKUL, J.; SIRAWARAPORN, W.; TAYLOR, P.; WALKINSHAW, M. D.; YUTHAVONG, Y. Insights into antifolate resistance from malarial DHFR-TS structures. **Nat. Struct. Biol.**, v. 10, n. 5, p. 357-365, 2003.

APÊNDICE – Currículo Lattes do autor

Denis da Silva Corrêa

Currículo Lattes

Formação Acadêmica/Titulação

- 2008** Mestrado em Biotecnologia.
Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, Brasil
Título: *Docking* de compostos da família das ariloxazinas em enzimas relacionadas com a malária
Orientadores: Ignez Caracelli e Julio Zukerman Schpector
Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)
- 2004 - 2007** Graduação em Licenciatura Plena em Ciências Biológicas.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP - Bauru
Título: Avaliação do comportamento dos inibidores da família das ariloxazinas e da cloroquina nos sítios de ligação das enzimas Glutathione Redutase humana e Glutathione Redutase do *Plasmodium falciparum*
Orientadora: Ignez Caracelli
Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

Formação complementar

- 2009 - 2009** Curso de curta duração em Química de produtos naturais.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Bauru, UNESP, Brasil
- 2009 - 2009** Curso de curta duração em SUPRAMOLECULAR AND BIOMIMETIC CHEMISTRY.
Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, Brasil
- 2009 - 2009** Curso de curta duração em MOLECULAR SHAPE AND SIMILARITY ANALYSIS: THEORY AND APPLICATIONS.
Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, Brasil
- 2009 - 2009** Curso de curta duração em Modelagem Molecular. Métodos Clássicos e Quânticos.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP
- 2009 - 2009** Curso de curta duração em Interação entre Polieletrólitos e Macroíons.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP
- 2009 - 2009** Curso de curta duração em I Workshop de *Docking* Molecular.
Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, Brasil
- 2009 - 2009** Curso de curta duração em Biologia molecular aplicada à pesquisa e ao diagnóstico.
Fundação para o Estudo e Tratamento das Deformidades Crânio-Faciais, FUNCRAF, Bauru, Brasil
- 2009 - 2009** Curso de curta duração em Identificação humana através do DNA.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Bauru, UNESP, Brasil
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em Catálise Homogênea.
Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, Brasil

- 2008 - 2008** Curso de curta duração em School of Advanced Topics on Molecular Modeling. Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, Brasil
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em The Chemistry and Materials Aspects of Silicon - T. Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, Brasil
- 2007 - 2007** Curso de curta duração em Mecanismos de sinalização intracelular da insulina. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Bauru, UNESP, Brasil
- 2007 - 2007** Curso de curta duração em Chemical engineering and metal-based drugs. Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, Brasil
- 2007 - 2007** Curso de curta duração em Bioinformática estrutural: organização, classifica. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP
- 2007 - 2007** Curso de curta duração em Química das Plantas. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Bauru, UNESP, Brasil
- 2007 - 2007** Curso de curta duração em Metal-based Drugs. Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Biosynthesis and Biotransformation. Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Modelagem Molecular: Ferramentas virtuais para pro. Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Biodiversidade do Pantanal. Instituto de Pesquisa Acqua Azuli, IPAA, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Ionic Liquids as Green Solvents: Progress and Pros. Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Biodiesel. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Bauru, UNESP, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Descoberta de Novos Fármacos: Estratégias Clássica. Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Química Forense. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Bauru, UNESP, Brasil
- 2005 - 2005** Curso de curta duração em Organização do genoma humano. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS, Campo Grande, Brasil
- 2005 - 2005** Curso de curta duração em Genética do Câncer. Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil
- 2005 - 2005** Curso de curta duração em Bioinformática. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Bauru, UNESP, Brasil
- 2005 - 2005** Curso de curta duração em Células Tronco e Terapia Gênica. Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil
- 2004 - 2004** Curso de curta duração em Introdução à Biofísica Estrutural. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Bauru, UNESP, Brasil
- 2004 - 2004** Curso de curta duração em Prevenção de Acidentes - animais peçonhentos. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Bauru, UNESP, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

Vínculo institucional

2008 - 2010 Vínculo: Estudante, Enquadramento funcional: Bolsista de Mestrado - FAPESP
 Outras informações: Bolsista de Mestrado da FAPESP, processo no. 2007/06125-9.
 Projeto de pesquisa: *Docking* de compostos da família das ariloxazinas em enzimas relacionadas com a malária.

Atividades

08/2008 - 12/2008 Pós-graduação, Biotecnologia
Disciplinas Ministradas:
 Aluno Monitor da disciplina "Introdução à Bioquímica: Biomoléculas", ministrada pelos Profa. Dra. Ignez Caracelli e Prof. Dr. Julio Zukerman-Schpector, pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Programa de Pós-Graduação em Química

03/2008 - 2010 Projetos de pesquisa, Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Departamento de Química
Participação em projetos:
 Processo FAPESP no. 2007/06125-9: *Docking* de compostos da família das ariloxazinas em enzimas relacionadas com a malária

2. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP

Vínculo institucional

2008 - 2010 Vínculo: Bolsista de Mestrado, Enquadramento funcional: Bolsista de Mestrado
 Outras informações: Bolsista de Mestrado da FAPESP, processo no. 2007/06125-9.
 Projeto de pesquisa: "*Docking* de compostos da família das ariloxazinas em enzimas relacionadas com a malária".

2006 - 2007 Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Estudante - Bolsista de Iniciação Científica
 Outras informações: Bolsista FAPESP a partir de janeiro de 2006, processo 2005/02775-3. Houve renovação da Bolsa de Iniciação Científica até dezembro de 2007. Projeto de pesquisa: "Estudo da formação de complexos enzimas-inibidores *in silico* aplicado ao estudo das enzimas glutatona redutase humana e glutatona redutase do *Plasmodium falciparum* e dos inibidores da família das ariloxazinas".

Atividades

03/2008 - 02/2010 Projetos de pesquisa, UFSCar, Departamento de Química
Participação em projetos:
Docking de compostos da família das ariloxazinas em enzimas relacionadas com a malária

01/2006 - 12/2007 Projetos de pesquisa, Faculdade de Ciências, Departamento de Física
Participação em projetos:
 Estudo da formação de complexos enzimas-inibidores *in silico* aplicado ao estudo das enzimas glutatona redutase humana e glutatona redutase do *Plasmodium falciparum* e dos inibidores das famílias das ariloxazinas

3. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP

Vínculo institucional

2004 - 2007 Vínculo: Estudante, Enquadramento funcional: Estudante - Bolsista de Iniciação Científica
 Outras informações: Bolsista FAPESP a partir de janeiro de 2006, processo 2005/02775-3. Houve renovação da bolsa de iniciação científica da FAPESP até dezembro de 2007.

Atividades

01/2006 - 12/2007 Projetos de pesquisa, Faculdade de Ciências de Bauru, Departamento de Física
Participação em projetos:
Processo FAPESP 2005/02775-3: Estudo da Formação de Complexos Enzimas-Inibidores in silico aplicado ao estudo das enzimas glutathione reductase humana e glutathione reductase do Plasmodium falciparum e dos inibidores das famílias das ariloxazinas

Projetos

2008 - 2010 Processo FAPESP no. 2007/06125-9: *Docking* de compostos da família das ariloxazinas em enzimas relacionadas com a malária

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (1);

Integrantes: Denis da Silva Corrêa; Ignez Caracelli (Responsável); Julio Zukerman-Schpector (Responsável)

Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP

2006 - 2007 Processo FAPESP 2005/02775-3: Estudo da Formação de Complexos Enzimas-Inibidores in silico aplicado ao estudo das enzimas glutathione reductase humana e glutathione reductase do Plasmodium falciparum e dos inibidores das famílias das ariloxazinas

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1);

Integrantes: Denis da Silva Corrêa; Ignez Caracelli (Responsável)

Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP

Prêmios e títulos

2007 Prêmio pelo Melhor Trabalho Científico para o Painel na XIV Semana da Biologia, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências, UNESP - Bauru

2005 Premio Iniciação Científica - Menção Honrosa para o Painel na XII Semana da Biologia, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências da UNESP, Campus de Bauru., Faculdade de Ciências, UNESP - Bauru

Produção em C, T & A

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. CORRÊA, D. S., ZUKERMAN-SCHPECTOR, J., CARACELLI, I.

Docking de compostos da família das ariloxazinas em enzimas relacionadas com a malária In: XV Simpósio Brasileiro de Química Teórica, 2009, Poços de Caldas - MG.

XV Simpósio Brasileiro de Química Teórica - Livro de Resumos. , 2009. p.146 - 146

2. BAPTISTINI, N., CORRÊA, D. S., ALBERTO, E. E., SOARES, L. C., BRAGA, A. L., ZUKERMAN-SCHPECTOR, J., CARACELLI, I.

Docking molecular de compostos derivados de telúrio na enzima COX-2 In: XV Simpósio Brasileiro de Química Teórica, 2009, Poços de Caldas - MG.

XV Simpósio Brasileiro de Química Teórica - Livro de Resumos. , 2009. p.139 - 139

3. ARMELIN, P. R. G., CORRÊA, D. S., CARACELLI, I., STEFANI, H. A., ALVES, D., ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.

Docking de Telurofenos na Enzima Ciclooxygenase-1 (COX-1) In: II ESeTe - Encontro sobre Selênio e Telúrio - Brasil, 2008, Campos do Jordão.

II Encontro sobre Selênio e Telúrio - Brasil - Livro de Resumos. , 2008. p.QI - 16 - QI - 16

4. CORRÊA, D. S., ARMELIN, P. R. G., ZUKERMAN-SCHPECTOR, J., STEFANI, H. A., ALVES, D., CARACELLI, I.

Estudo do Comportamento de Telurofenos como Inibidores da COX-2 In: II ESeTe - Encontro sobre Selênio e Telúrio - Brasil, 2008, Campos do Jordão.

II Encontro sobre Selênio e Telúrio - Brasil - Livro de Resumos. , 2008. p.QI - 13 - QI - 13

5. CORRÊA, D. S., CARACELLI, I.

Estudo de Docking de Compostos da Família das Ariloxazinas nas Enzimas Glutathione Redutase Humana e Glutathione Redutase do Plasmodium falciparum In: IX Semana da Física, 2006, Bauru.

CD - IX Semana da Física. , 2006. p.2 -

6. HONÓRIO, P. A. P., CARACELLI, I., CORRÊA, D. S., RODRIGUES, S. R. P., ARMELIN, P. R. G., ALMEIDA, J. R.

Anidrase carbônica do Plasmodium falciparum (I): busca de seqüências para determinação da estrutura tridimensional por homologia In: XVII Congresso de Iniciação Científica, 2005, Bauru.

XVII Congresso de Iniciação Científica. , 2005.

7. CORRÊA, D. S., CARACELLI, I., RODRIGUES, S. R. P., HONÓRIO, P. A. P., ARMELIN, P. R. G., ALMEIDA, J. R.

Anidrase carbônica do Plasmodium falciparum (II): análise das estruturas das proteínas selecionadas para a construção do modelo tridimensional por homologia In: XVII Congresso de Iniciação Científica, 2005, Bauru.

XVII Congresso de Iniciação Científica. , 2005.

8. RODRIGUES, S. R. P., CARACELLI, I., CORRÊA, D. S., HONÓRIO, P. A. P., ALMEIDA, J. R., ARMELIN, P. R. G.

Anidrase carbônica do Plasmodium falciparum (III): construção do modelo tridimensional por homologia do sítio ativo In: XVII Congresso de Iniciação Científica, 2005, Bauru.

XVII Congresso de Iniciação Científica. , 2005.

9. ALMEIDA, J. R., ARMELIN, P. R. G., CORRÊA, D. S., RODRIGUES, S. R. P., HONÓRIO, P. A. P., CARACELLI, I.

DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL, POR HOMOLOGIA, DA ANIDRASE CARBÔNICA DO Plasmodium falciparum. In: VII CAEB - Congresso Aberto aos Estudantes de Biologia, 2005, Campinas.

Caderno de Resumos. , 2005. p.43 - 43

10. HONÓRIO, P. A. P., CARACELLI, I., CORRÊA, D. S., RODRIGUES, S. R. P.

Docking no estudo de Nifurtimox , um fármaco para Doença de Chagas. In: XIII Simpósio Brasileiro de Química Teórica, 2005, São Pedro.

XIII SBQT - 2005 - Livro de Resumos. , 2005. v.178.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. CORRÊA, D. S., CARACELLI, I.

Avaliação de ariloxazinas como inibidores das enzimas glutathione redutase humana e do Plasmodium

falciparum através de docking In: XIV Simpósio Brasileiro de Química Teórica, 2007, Poços de Caldas.

XIV Simpósio Brasileiro de Química Teórica - Resumos. , 2007. p.84 - 84

2. CORRÊA, D. S., CARACELLI, I.

DOCKING COMO FERRAMENTA PARA O ESTUDO DE INIBIDORES ARILOXAZINAS NAS ENZIMAS GLUTATIONA REDUTASE HUMANA E DO Plasmodium falciparum In: XIX Congresso de Iniciação Científica da UNESP - CIC, 2007, Botucatu.

Anais - XIX Congresso Iniciação Científica UNESP. , 2007.

3. CORRÊA, D. S., CARACELLI, I.

Estudo da Formação de Complexos Enzimas-Inibidores in silico Aplicado ao Estudo das Enzimas Glutaciona Redutase Humana e Glutaciona Redutase do Plasmodium falciparum e dos Inibidores das Famílias das Ariloxazinas In: XVIII CIC, 2006, Bauru.

XVIII Congrso de Iniciação Científica da UNESP - Área de Exatas. , 2006.

Apresentação de Trabalho

1. BAPTISTINI, N., CORRÊA, D. S., ALBERTO, E. E., SOARES, L. C., BRAGA, A. L., ZUKERMAN-SCHPECTOR, J., CARACELLI, I.

Estudo de Complexos entre a Enzima COX-2 e Compostos Organocalcogênios Antiinflamatórios, 2010. (Outra, Apresentação de Trabalho)

Painel premiado pelo melhor trabalho na área de Saúde na XVII Semana da Biologia da Unesp - Bauru.; Local: UNESP/Bauru; Cidade: Bauru, SP; Evento: XVII Semana da Biologia da Unesp - Bauru; Inst.promotora/financiadora: Departamento de Ciências Biológicas - Faculdade de Ciências - UNESP/Bauru

2. CORRÊA, D. S., ZUKERMAN-SCHPECTOR, J., CARACELLI, I.

Docking de compostos da família das ariloxazinas em enzimas relacionadas com a malária, 2009. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)

Local: Hotel Palace; Cidade: Poços de Caldas - MG; Evento: XV Simpósio Brasileiro de Química Teórica; Inst.promotora/financiadora: SBQ

3. OLIVEIRA, A. A., CORRÊA, D. S., RODRIGUES, S. R. P., CARACELLI, I.

Docking molecular aplicado ao estudo de compostos de Se e Te na formação de complexos com DNA, 2009. (Outra, Apresentação de Trabalho)

Local: FunDeB - Fundação para o Desenvolvimento de Bauru; Cidade: Bauru; Evento: XII Semana da Física; Inst.promotora/financiadora: Faculdade de Ciências - UNESP/Campus de Bauru

4. BAPTISTINI, N., CORRÊA, D. S., ALBERTO, E. E., SOARES, L. C., BRAGA, A. L., ZUKERMAN-SCHPECTOR, J., CARACELLI, I.

Estudos de docking molecular na busca por anti-inflamatórios contendo telúrio, 2009. (Outra, Apresentação de Trabalho)

Local: FunDeB - Fundação para o Desenvolvimento de Bauru; Cidade: Bauru; Evento: XII Semana da Física; Inst.promotora/financiadora: Faculdade de Ciências - UNESP/Campus de Bauru

5. CORRÊA, D. S., CARACELLI, I., ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.

Simulação computacional na formação de complexos entre compostos inibidores e enzimas-alvo relacionadas com a malária, 2009. (Outra, Apresentação de Trabalho)

Local: FunDeB - Fundação para o Desenvolvimento de Bauru; Cidade: Bauru; Evento: XII Semana da Física; Inst.promotora/financiadora: Faculdade de Ciências - UNESP/Campus de Bauru

6. CORRÊA, D. S., CARACELLI, I., ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.

Simulação computacional na formação de complexos entre compostos inibidores e enzimas-alvo relacionadas com a malária, 2009. (Outra, Apresentação de Trabalho)

Local: FunDeB - Fundação para o Desenvolvimento de Bauru; Cidade: Bauru; Evento: XII Semana da Física; Inst.promotora/financiadora: Faculdade de Ciências - UNESP/Campus de Bauru

7. ARMELIN, P. R. G., CORRÊA, D. S., CARACELLI, I., STEFANI, H. A., ALVES, D., ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.

Docking de Telurofenos na Enzima Ciclooxygenase-1 (COX-1), 2008. (Outra, Apresentação de Trabalho)

Local: Hotel Leão da Montanha; Cidade: Campos do Jordão - SP; Evento: II ESeTe - Encontro sobre Selênio e Telúrio - Brasil

8. CORRÊA, D. S., ARMELIN, P. R. G., ZUKERMAN-SCHPECTOR, J., STEFANI, H. A., ALVES, D., CARACELLI, I.

Estudo de Docking de Telurofenos na Enzima COX-2, 2008. (Outra, Apresentação de Trabalho)

Local: Bauru, SP; Cidade: Bauru, SP; Evento: XI Semana da Física; Inst.promotora/financiadora: Departamento de Física - Faculdade de Ciências/UNESP

9. CORRÊA, D. S., ARMELIN, P. R. G., ZUKERMAN-SCHPECTOR, J., STEFANI, H. A., ALVES, D., CARACELLI, I.

Estudo do Comportamento de Telurofenos como Inibidores da COX-2, 2008. (Outra, Apresentação de Trabalho)

Local: Hotel Leão da Montanha; Cidade: Campos do Jordão - SP; Evento: II ESeTe - Encontro sobre Selênio e Telúrio - Brasil

10. ARMELIN, P. R. G., CORRÊA, D. S., CARACELLI, I., STEFANI, H. A., ALVES, D., ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.

Estudos de telurofenos em complexo com a ciclooxygenase-1 (COX-1), 2008. (Outra, Apresentação de Trabalho)

Local: UNESP/Campus de Bauru; Cidade: Bauru; Evento: XI Semana da Física; Inst.promotora/financiadora: Faculdade de Ciências - UNESP

11. CORRÊA, D. S., CARACELLI, I.

Avaliação de ariloxazinas como inibidores das enzimas glutatona redutase humana e do Plasmodium falciparum através de docking, 2007. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)

Local: Carlton Plaza Palace Hotel; Cidade: Poços de Caldas; Evento: XIV Simpósio Brasileiro de Química Teórica

12. CORRÊA, D. S., CARACELLI, I.

DOCKING COMO FERRAMENTA PARA O ESTUDO DE INIBIDORES ARILOXAZINAS NAS ENZIMAS GLUTATIONA REDUTASE HUMANA E DO Plasmodium falciparum, 2007. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Local: FCA - UNESP; Cidade: Botucatu; Evento: XIX Congresso de Iniciação Científica da UNESP - CIC; Inst.promotora/financiadora: UNESP

13. CORRÊA, D. S., CARACELLI, I.

Docking como ferramenta para o estudo de inibidores ariloxazinas nas enzimas glutatona redutase humana e do Plasmodium falciparum, 2007. (Outra, Apresentação de Trabalho)

Trabalho recebeu o Prêmio pelo Melhor Trabalho Científico no evento.; Local: UNESP; Cidade: Bauru; Evento: XIV Semana da Biologia; Inst.promotora/financiadora: Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências - UNESP/Bauru

14. CORRÊA, D. S., CARACELLI, I.

Estudo da Formação de Complexos Enzimas-Inibidores in silico Aplicado ao Estudo das Enzimas Glutaciona Redutase Humana e Glutaciona Redutase do Plasmodium falciparum e dos Inibidores das Famílias das Ariloxazinas., 2006. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Local: UNESP; Cidade: Bauru; Inst.promotora/financiadora: XVIII CIC - Congresso de Iniciação Científica UNESP

15. CORRÊA, D. S., CARACELLI, I.

ESTUDO DE DOCKING DE COMPOSTOS DA FAMÍLIA DAS ARILOXAZINAS NAS ENZIMAS GLUTATIONA REDUTASE HUMANA E GLUTATIONA REDUTASE DO Plasmodium falciparum., 2006. (Outra, Apresentação de Trabalho)

Local: Campus da Unesp, Bauru; Cidade: Bauru; Inst.promotora/financiadora: Departamento de Física da Faculdade de Ciências da UNESP/Bauru

16. CORRÊA, D. S.

Transgênicos, 2006. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)

Local: Rotary Club de Bauru Norte; Cidade: Bauru; Inst.promotora/financiadora: Rotary Club

17. HONÓRIO, P. A. P., CARACELLI, I., RODRIGUES, S. R. P., CORRÊA, D. S., ARMELIN, P. R. G., ALMEIDA, J. R.

ANIDRASE CARBÔNICA DO Plasmodium falciparum (I): BUSCA DE SEQÜÊNCIAS PARA DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL POR HOMOLOGIA., 2005. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Local: UNESP; Cidade: Bauru, SP; Inst.promotora/financiadora: UNESP

18. CORRÊA, D. S., CARACELLI, I., RODRIGUES, S. R. P., HONÓRIO, P. A. P., ARMELIN, P. R. G., ALMEIDA, J. R.

ANIDRASE CARBÔNICA DO Plasmodium falciparum (II): ANÁLISE DAS ESTRUTURAS DAS PROTEÍNAS SELECIONADAS PARA A CONSTRUÇÃO DO MODELO TRIDIMENSIONAL POR

HOMOLOGIA., 2005. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Local: UNESP; Cidade: Bauru, SP; Inst.promotora/financiadora: UNESP

19. RODRIGUES, S. R. P., CARACELLI, I., CORRÊA, D. S., HONÓRIO, P. A. P., ARMELIN, P. R. G., ALMEIDA, J. R.

ANIDRASE CARBÔNICA DO Plasmodium falciparum (III): CONSTRUÇÃO DO MODELO TRIDIMENSIONAL POR HOMOLOGIA DO SÍTIO ATIVO., 2005. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Local: UNESP; Cidade: Bauru, SP; Inst.promotora/financiadora: UNESP

20. CORRÊA, D. S., HONÓRIO, P. A. P., RODRIGUES, S. R. P., PARDO, R. S., CARACELLI, I.

DOENÇA DE CHAGAS: ESTUDO DO INIBIDOR NIFURTIMOX® ATRAVÉS DE SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL., 2005. (Outra, Apresentação de Trabalho)

Local: UNESP; Cidade: Bauru, SP; Inst.promotora/financiadora: UNESP - Bauru

21. HONÓRIO, P. A. P., RODRIGUES, S. R. P., CORRÊA, D. S., CARACELLI, I.

Estudo de inibidores para Doença de Chagas através de simulação computacional., 2004. (Outra, Apresentação de Trabalho)

Local: UNESP; Cidade: Bauru, SP; Inst.promotora/financiadora: UNESP - Bauru

22. RODRIGUES, S. R. P., CORRÊA, D. S., HONÓRIO, P. A. P., CARACELLI, I.

Simulação computacional de complexos nifurtimox® com enzimas relacionadas com a Doença de Chagas., 2004. (Outra, Apresentação de Trabalho)

Local: UNESP; Cidade: Bauru, SP; Inst.promotora/financiadora: UNESP - Bauru

23. HONÓRIO, P. A. P., RODRIGUES, S. R. P., CORRÊA, D. S., CARACELLI, I.

Simulação computacional dos complexos nifurtimox®-flavoenzimas relacionadas com a Doença de Chagas. (I), 2004. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Local: UNESP; Cidade: Ilha Solteira, SP; Inst.promotora/financiadora: UNESP

24. RODRIGUES, S. R. P., HONÓRIO, P. A. P., CORRÊA, D. S., CARACELLI, I.

Simulação computacional dos complexos nifurtimox®-flavoenzimas relacionadas com a Doença de Chagas. (II), 2004. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Local: UNESP; Cidade: Ilha Solteira, SP; Inst.promotora/financiadora: UNESP

Demais produções bibliográficas

1. CORRÊA, D. S.

Avaliação do comportamento dos inibidores da família das ariloxazinas e da cloroquina nos sítios de ligação das enzimas Glutathione Redutase humana e Glutathione Redutase do Plasmodium falciparum. Trabalho de Conclusão de Curso - Monografia. , 2007. (Outra produção bibliográfica)

O trabalho fez parte dos requisitos para a conclusão do curso Licenciatura Plena em Ciências Biológicas do Departamento de Ciências Biológicas - Faculdade de Ciências da UNESP/Bauru - e foi realizado sob a orientação da Profa. Dra. Ignez Caracelli do Departamento de Física da Faculdade de Ciências da UNESP/Bauru. Aprovado pela comissão julgadora com nota máxima (10).

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XV Simpósio Brasileiro de Química Teórica**, 2009.

2. Apresentação Oral no(a) **XII Semana da Física**, 2009.

3. **XXIX Escola de Verão em Química - Prof. Dr. José Tércio B. Ferreira**, 2009.

4. **XVI Semana da Biologia**, 2009.

5. **I Workshop de Docking Molecular**, 2009.

6. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XI Semana da Física**, 2008.

7. Apresentação Oral no(a) **II ESeTe - Encontro sobre Selênio e Telúrio - Brasil**, 2008.
8. **XXVIII Escola de Verão em Química Prof. Dr. José Tércio B. Ferreira**, 2008.
9. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XIV Simpósio Brasileiro de Química Teórica**, 2007.
10. Apresentação Oral no(a) **I Workshop de Ciências Biológicas**, 2007.
11. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XIX Congresso de Iniciação Científica da UNESP - CIC**, 2007.
12. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XIV Semana da Biologia**, 2007.
13. **XXVII Escola de Verão em Química Prof. Dr. José Tércio B. Ferreira**, 2007.
14. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XVIII CIC - Congresso de Iniciação Científica da UNESP**, 2006.
15. Apresentação de Poster / Painel no(a) **IX Semana da Física**, 2006.
16. **XXVI Escola de Verão em Química Prof. Dr. José Tércio B. Ferreira**, 2006.
17. **20. Ciclo de Palestras em Microbiologia**, 2006.
18. **IV Semana da Química do Centro Oeste Paulista**, 2006.
19. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XVII Congresso de Iniciação Científica**, 2005.
20. Apresentação de Poster / Painel no(a) **VII CAEB - Congresso Aberto aos Estudantes de Biologia**, 2005.
21. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XII Semana da Biologia**, 2005.
22. **16o. Encontro de Biólogos do CRBio-1**, 2005.
23. **7ª. Semana da Física**, 2004.
24. **I Jornada Científica dos Estudantes Pesquisadores dos Cursos de Ciências Biológicas de Bauru**, 2004.
25. **I Ciclo de Estudos Biológicos - Saúde**, 2004.

Organização de evento

1. CORRÊA, D. S.
XII Semana da Física, 2009.
Membro da Comissão Organizadora da "XII Semana da Física"
2. CORRÊA, D. S.
XIII Semana da Biologia, 2006.
Membro da Comissão Organizadora da "XIII Semana da Biologia"

Outras informações relevantes

1 Disciplinas **BIOINFORMÁTICA ESTRUTURAL** e **CRISTALOGRAFIA FÍSICA** cursadas na condição de Aluno Especial do Programa de Pós-Graduação em **CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS**, curso de MESTRADO. Aprovado com Conceito A em ambas disciplinas.