

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Planejamento *in silico* de novos inibidores das enzimas Pteridina Redutase 1 e
Dihidrofolato Redutase de espécies de *Leishmania*

GUSTAVO MACHADO DAS NEVES

PORTO ALEGRE, 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Planejamento *in silico* de novos inibidores das enzimas Pteridina Redutase 1 e
Dihidrofolato Redutase de espécies de *Leishmania*

Dissertação apresentada por **Gustavo
Machado das Neves** para obtenção do GRAU
DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Vera Lucia Eifler Lima

Porto Alegre, 2018

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 15/03/2018, pela Banca Examinadora constituída por:

Dra. Adriana Raffin Pohlmann

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr. Rafael Andrade Caceres

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Dra. Tiana Tasca

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

das Neves, Gustavo Machado
Planejamento in silico de novos inibidores das
enzimas Pteridina Redutase 1 e Diidrofolato Redutase
de espécies de Leishmania / Gustavo Machado das
Neves. -- 2018.
219 f.
Orientador: Vera Lucia Eifler-Lima.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto
Alegre, BR-RS, 2018.

1. Farmácia. 2. Leishmaniose. 3. Planejamento de
Fármacos. 4. Modelagem molecular. I. Eifler-Lima,
Vera Lucia, orient. II. Título.

DEDICATÓRIA

“Dedico esse trabalho a minha família e aos meus amigos”

Agradecimentos à CAPES órgão que financiou a bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, sem ele nada disso teria sido possível.

Agradeço ao apoio incondicional dos meus pais, Ivone e Mário, que sempre me incentivaram, com tanto carinho e compreensão, a buscar e a investir naquilo que eu gostasse. Aos meus irmãos, Rogério e Suzele e ao meu cunhado Rodrigo, que me proporcionaram momentos de descontração.

Aos meus amados e queridos mestres, professora Vera Lima e professor Daniel Kawano, que me acolheram no LaSOM durante a minha iniciação científica, me deram as bases da síntese medicinal e da modelagem molecular, plantaram uma sementinha que aos poucos está desabrochando.

Ao meu braço direito, Luciano, meu irmão científico, um dos meus mais estimados amigos e colega, obrigado por todas as discussões valiosas que tínhamos no pequeno intervalo que tinha do trabalho, elas me fizeram amadurecer e crescer como modelista.

À minha querida Hellen, pelo incentivo, pelo carinho, pelos momentos de descontração, pelas discussões sobre a carreira acadêmica e por ter me motivado a ir pelo mestrado.

Aos meus amigos e colegas do LaSOM ao longo desses quase 6 anos: Maristela, Patrícia, Fabiana, Fernando, Thiago, Itamar, Gabriel, Guilherme, Leonardo, Mariana, Isabel, obrigado pelas discussões filosóficas de onde sintetizar tal coisa em tal lugar, das risadas, das dúvidas, dos congressos e apresentações de pôsteres, pelos encontros de final de ano do lab. Vocês são parte da minha família. Obrigado.

Aos professores e membros da banca, professora Adriana, professor Pablo, professor Rafael e professora Tiana, muito obrigado por aceitarem avaliar o meu singelo trabalho, pelas correções e colocações feitas, agradeço encarecidamente.

Às agências CAPES, CNPq e INCT-If pelos auxílios financeiros que tornaram esse trabalho possível.

Resumo

Introdução: As leishmanioses apresentam-se como uma das maiores doenças negligenciadas do mundo. No entanto, o arsenal terapêutico vem apresentando baixa eficácia e dificuldades de adesão, fazendo-se necessária a soma de esforços na busca de novos alvos terapêuticos e no desenvolvimento de novos fármacos para tratamento dessa enfermidade. **Objetivos:** O presente trabalho, dividido em dois capítulos, visa construir modelos das enzimas pteridina redutase 1 (PTR1) e diidrofolato redutase-timidilato sintetase (DHFR-TS) de *Leishmania* spp., realizar triagem virtual com a quimioteca do LaSOM e analisar parâmetros ADMETox. **Materiais e métodos:** A construção dos modelos foi realizada usando I-TASSER, Swiss-Model e Modeller. A validação foi realizada pelos servidores PSVS, SAVES e WHAT-IF. A análise dos resíduos foi realizada através do Discovery Studio Visualizer e do Chimera. A triagem virtual foi realizada usando os modelos de *L. major*. O *docking* foi realizado nos programas GOLD e Glide, sendo validado por *redocking* e *cross-docking*. As funções de escore foram avaliadas pelos parâmetros de enriquecimento com os *decoys* dos programas DUD-E e RADER. A afinidade foi determinada pelas funções X-Score e MM-GBSA. Por fim um consenso entre as proteínas foi estabelecido. **Resultados:** Foram construídos 9 modelos (4 de PTR1 e 5 de DHFR-TS) considerados adequados para estudos de docagem molecular. A análise dos sítios de PTR1 demonstrou uma alta conservação entre as espécies de *Leishmania* analisadas. Ao final da triagem foram obtidas 12 moléculas (5 diidropirimidinonas e 7 cumarinas) para análises de parâmetros físico-químicos e ADMETox, os quais demonstraram que 7 compostos apresentaram perfis adequados, 3 podem apresentar problemas de biodisponibilidade e 2 podem apresentar carcinogenicidade e mutagenicidade. **Conclusão:** Foram construídos 4 modelos de PTR1 e 5 de DHFR-TS. As diferenças no sítio de ligação não foram observadas com as ferramentas empregadas. A triagem virtual apontou 12 moléculas com possível atividade frente às enzimas. Os ensaios ADMETox revelaram que 7 compostos apresentaram perfis adequados. Como perspectivas futuras, estudos *in vitro* e de dinâmica molecular estão sendo realizados com as moléculas para confirmar as predições *in silico*.

Palavras-chaves: Modelagem molecular, *Leishmania*, Pteridina Reductase 1

Abstract

Introduction: Leishmaniasis is one of the most important neglected diseases in the world. However, the therapeutic arsenal has presented low efficacy and difficulties of adhesion, making it necessary the sum of efforts in the search of new therapeutic targets and in the development of new drugs for treatment of this disease. **Objectives:** This study was divided in two chapters and aims to construct models of the enzymes pteridine reductase 1 (PTR1) and dihydrofolate reductase-thymidylate synthetase (DHFR-TS) from *Leishmania* spp., to perform virtual screening with the LaSOM library and to analyze ADMETox parameters. **Materials and methods:** The models were constructed using the I-TASSER, Swiss-Model and Modeller. The evaluation was made by the PSVS, SAVES and WHAT-IF. The residue analysis was performed through the Discovery Studio Visualizer and Chimera programs. Virtual screening was performed using the *L. major* models. The docking was done in the GOLD and Glide programs and it was validated by redocking and cross-docking. The scoring functions were evaluated by the enrichment parameters with the decoys of the DUD-E and RADER programs. The affinity was determined by the X-Score and MM-GBSA functions. A consensus was established among the proteins. **Results:** Nine models (4 of PTR1 and 5 of DHFR-TS) were constructed and were considered suitable for molecular docking studies. The analysis of the PTR1 sites demonstrated a high conservation among the analyzed *Leishmania* species. At the end of the screening, 12 molecules (5 dihydropyrimidinones and 7 coumarins) were obtained for analysis of physicochemical parameters and ADMETox, which showed that 7 compounds presented adequate profiles, 3 may present bioavailability problems and 2 may present carcinogenicity and mutagenicity. **Conclusion:** Five models of PTR1 and four of DHFR-TS were constructed. The differences in the binding site were not observed with the tools employed. Virtual screening indicated 12 molecules with possible activity against enzymes. The ADMETox assays revealed that 7 compounds showed adequate profiles. As future perspectives *in vitro* studies and molecular dynamics are being performed with the molecules to confirm the predictions *in silico*.

Keywords: Molecular modeling, *Leishmania*, Pteridine Reductase 1

Lista de figuras

| | |
|--|-----|
| Figura 1 – Casos de LTA e LV no Brasil durante o período de 2007 a 2015. | 21 |
| Figura 2 – Interdisciplinaridade dentro do escopo do planejamento de fármacos... .. | 22 |
| Figura 3 - Ciclo de vida dos protozoários do gênero Leishmania..... | 28 |
| Figura 4 – Fórmulas estruturais dos folatos..... | 32 |
| Figura 5 – Fórmulas estruturais das pterinas..... | 33 |
| Figura 6 – Rota metabólica das biopterinas e do folato em espécies do gênero Leishmania | 34 |
| Figura 7 – Rota biossintética de pterinas no organismo humano..... | 35 |
| Figura 8 – Gráfico de Ramachandran e representação dos ângulos diedros. | 42 |
| Figura 9 – Fluxograma de trabalho para análise filogenética e construção dos modelos | 45 |
| Figura 10 - Alinhamento múltiplo da enzima PTR1 das 5 espécies de Leishmania..... | 52 |
| Figura 11 - Árvores filogenéticas das enzimas (A) PTR1 e (B) DHFR-TS | 53 |
| Figura 12 - Gráfico dos perfis de acurácia local dos modelos de L. donovani: | 56 |
| Figura 13 - Gráficos de comparação 3D-1D para os modelos finais de PTR1 | 65 |
| Figura 14 – Análise dos resíduos de aminoácidos dos modelos de PTR1 | 70 |
| Figura 15 – Análise das interações através da sonda de oxigênio de hidroxila de PTR1 | 71 |
| Figura 16– Análise das interações através do MetaPocket de PTR1..... | 72 |
| Figura 17 - Principais fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses | 85 |
| Figura 18 - Sítios de modificações explorados nas DHPM sintetizadas no LaSOM | 89 |
| Figura 19 – DHPMs com atividade antitumoral..... | 90 |
| Figura 20 - Núcleo benzopirona químico comum às cumarinas | 90 |
| Figura 21 –Enantiômeros do limoneno | 91 |
| Figura 22 – Compostos testados contra L. donovani | 94 |
| Figura 23 Compostos testados contra L. major | 95 |
| Figura 24 – Produtos naturais com possível atividade contra PTR1 de L. major..... | 96 |
| Figura 25 - Produtos naturais com possível atividade contra PTR1 de L. major..... | 97 |
| Figura 26 - Produtos naturais e sintéticos com atividade contra PTR1 de L. major e de T. brucei..... | 98 |
| Figura 27 - Produtos com atividade contra PTR1 de L. major e de T. brucei..... | 98 |
| Figura 28 Inibidores com atividade contra PTR1 de L. major | 99 |
| Figura 29 - Inibidores de DHFR descritas na literatura..... | 100 |
| Figura 30 - Comparação das poses com segundos melhor escores do ligante metotrexato (MTX)..... | 118 |
| Figura 31 - Curvas ROC determinadas paras as diferentes funções de escore dos programas. | 120 |
| Figura 32 - Moléculas do LaSOM e selecionadas nas triagens virtuais em PTR1 e DHFR-TS..... | 123 |
| Figura 1C - Valores de penalidade e estados de ionização das poses do ligante C-448 | 198 |

Lista de Tabelas

| | |
|--|-----|
| Tabela 1 – Avaliação dos resíduos de aminoácidos importantes nas DHFR-TS | 38 |
| Tabela 2- Matrizes de percentual de identidade global e local das sequências de PTR1 de Leishmania ... | 53 |
| Tabela 3 - Resultados da análise estrutural dos modelos de L. donovani | 58 |
| Tabela 4 - Resultados da primeira validação estrutural dos modelos finais de PTR1 | 61 |
| Tabela 5 - Valores de fator-G para os modelos finais da enzima PTR1 | 63 |
| Tabela 6 - Valores de fator-G para o primeiro e para o segundo modelos finais da enzima PTR1 | 66 |
| Tabela 7 - Qualidade de empacotamento dos modelos finais obtidos através do servidor WHAT-IF. | 68 |
| Tabela 8: Matrizes de percentuais de identidade e de similaridade da enzima PTR1 de Leishmania | 69 |
| Tabela 9- Resultados da análise estrutural dos modelos de L. donovani | 74 |
| Tabela 10 - Resultados da primeira validação estrutural dos modelos finais de DHFR-TS..... | 76 |
| Tabela 11- Valores de fator-G para os modelos finais da enzima DHFR-TS..... | 77 |
| Tabela 12 - Qualidade de empacotamento dos modelos finais da enzima DHFR-TS | 79 |
| Tabela 15 - Valores dos escores encontrados pelo Glide durante o redocking | 116 |
| Tabela 16 - Valores dos escores encontrados pelo GOLD durante o redocking | 117 |
| Tabela 17 – Valores da função X-Score obtidos para os ligantes cristalográficos..... | 121 |
| Tabela 18 - Valores do MM-GBSA para os ligantes cristalográficos das enzimas PTR1 e DHFR-TS | 122 |
| Tabela 19 – Parâmetros físico-químicos obtidos pelo Volsurf e pelo servidor SwissADME | 127 |
| Tabela 1A - Resultados das 10 melhores estruturas ranqueadas pelo Blast para PTR1. | 153 |
| Tabela 2A - Resultados das 10 melhores estruturas ranqueadas pelo Blast para DHFR-TS..... | 154 |
| Tabela 1B - Resultado dos 10 alinhamentos propostos pelo LOMETS | 155 |
| Tabela 2B - Resultados da validação estrutural para enzima PTR1 | 156 |
| Tabela 3B - Resultados da validação estrutural dos modelos de L. donovani da enzima PTR 1 | 157 |
| Tabela 4B - Resultados dos parâmetros obtidos para os modelos híbridos da enzima PTR1. | 158 |
| Tabela 5B - Resultados da validação estrutural dos modelos de L. donovani e L. infantum da PTR 1 | 159 |
| Tabela 6B - Validação estrutural dos modelos de L. amazonensis e L. braziliensis da PTR1..... | 160 |
| Tabela 7B - Resultados do PROCHECK para os modelos finais da enzima PTR1..... | 161 |
| Tabela 8B - Principais resíduos de aminoácidos diferentes analisados nos modelos da enzima PTR1. ... | 162 |
| Tabela 9B – Avaliação de RMSD dos aminoácidos pertencentes ao sítio ortostérico da enzima PTR1. ... | 163 |
| Tabela 10B - Principais pontos de interação do sítio de ligação ao substrato/cofator na enzima PTR1. ... | 164 |
| Tabela 10B cont - Pontos de interação do sítio de ligação ao substrato/cofator na enzima PTR1..... | 165 |
| Tabela 11B – Análises dos prováveis sítios de interação dos modelos da enzima PTR1 | 166 |
| Tabela 12B - Resultado dos 10 alinhamentos propostos pelo LOMETS da enzima DHFR-TS..... | 167 |
| Tabela 13B - Validação estrutural dos modelos obtidos para enzima DHFR-TS..... | 168 |
| Tabela 14B - Validação estrutural dos modelos obtidos para enzima DHFR-TS..... | 169 |
| Tabela 15B - Parâmetros obtidos para os modelos híbridos construídos para a enzima DHFR-TS. | 170 |
| Tabela 16B - Validação estrutural (PSVS) dos modelos da DHFR-TS | 171 |
| Tabela 16B cont - Validação estrutural (PSVS) dos modelos da DHFR-TS | 172 |
| Tabela 17B - Resultados do PROCHECK dos modelos da enzima DHFR-TS. | 173 |
| Tabela 1C - Ligantes utilizados no procedimento de cross-docking nas enzimas PTR1 e DHFR-TS | 174 |
| Tabela 2C - PTR1 crossdocking | 176 |
| Tabela 3C - DHFR-TS Crossdocking | 177 |
| Tabela 4C EF PTR1 | 178 |
| Tabela 5C EF PTR1 | 178 |
| Tabela 6C Consenso - PTR1 | 179 |
| Tabela 7C EF DHFR-TS | 180 |
| Tabela 8C EF DHFR-TS | 180 |
| Tabela 9C Consenso - DHFR-TS..... | 181 |
| Tabela 10C - Resultados da triagem virtual da quimioteca | 182 |
| Tabela 10C cont - Resultados da triagem virtual da quimioteca | 183 |
| Tabela 11C - Resultados da determinação de afinidade de ligação dos melhores ligantes | 184 |
| Tabela 11C cont - Resultados da determinação de afinidade de ligação dos melhores ligantes | 185 |

| | |
|--|-----|
| Tabela 12C - Interações realizadas na enzima PTR1 pelas melhores DHPMs selecionadas | 186 |
| Tabela 12C cont - Interações realizadas na enzima PTR1 pelas melhores DHPMs selecionadas..... | 187 |
| Tabela 13C - Interações realizadas na enzima PTR1 pelas melhores cumarinas selecionadas | 188 |
| Tabela 13C cont - Interações realizadas na enzima PTR1 pelas melhores cumarinas selecionadas | 189 |
| Tabela 13C cont - Interações realizadas na enzima PTR1 pelas melhores cumarinas selecionadas | 190 |
| Tabela 13C cont - Interações realizadas na enzima PTR1 pelas melhores cumarinas selecionadas | 191 |
| Tabela 14C - Interações realizadas na enzima DHFR-TS pelas melhores DHPMs selecionadas..... | 192 |
| Tabela 14C cont - Interações realizadas na enzima DHFR-TS pelas melhores DHPMs selecionadas | 193 |
| Tabela 15C - Interações realizadas na DHFR-TS pelas melhores cumarinas selecionadas | 194 |
| Tabela 15C cont - Interações realizadas na enzima DHFR-TS pelas melhores cumarinas selecionadas. | 195 |
| Tabela 15C cont - Interações realizadas na enzima DHFR-TS pelas melhores cumarinas selecionadas. | 196 |
| Tabela 16C - Predição de toxicidade para os compostos analisados | 197 |

Lista de Abreviaturas e Siglas

| | |
|------------------|---|
| 3D-QSAR | <i>Tridimensional Quantitative Structure-Activity Relationship</i> |
| ATP | Trifosfato de Adenosina |
| BLAST | <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> |
| CADD | <i>Computer-Aided Drug Design</i> |
| CPQC | <i>Coarse Packing Quality Control</i> |
| DHFR-TS | Enzima bifuncional diidrofolato redutase-timidilato sintetase |
| DHPM | Diidropirimidinonas |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| DOPE | <i>Discrete Optimized Protein Energy</i> |
| DSV | Discovery Studio Visualizer |
| dTMP | Monofosfato de Desoxitimidina |
| dUMP | Monofosfato de Desoxiuridina |
| Ecto-5'-NT | Ecto-5'-nucleotidase |
| ED ₅₀ | Dose efetiva em 50% dos indivíduos de uma população |
| FdUMP | 5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato |
| FPQC | <i>Fine Packing Quality Control</i> |
| FTHS | Formiltetrahidrofolato Sintetase |
| FTL | Tetrahidrofolato Ligase |
| GCC | Complexo de Clivagem de Glicinas |
| GFP | <i>Green Fluorescent Protein</i> |
| GMQE | <i>Global Model Quality Estimation</i> |
| GTP | Trifosfato de Guanosina |
| GTP-CH | Guanosina Trifosfato Ciclodrolase I |
| (2H)B | 7,8-diidrobiopterina |
| (2H)F | 7,8-diidrofolato |
| (4H)B | 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina |
| (4H)F | 5,6,7,8-tetrahidrofolato |
| HIV | Vírus da Imunodeficiência Humana |
| HMG-CoA | 3-hidróxi-3-metil-glutaril-coenzima A |
| HTS | <i>High Throughput Screening</i> |
| IC ₅₀ | Concentração inibitória de 50% |
| IFN- γ | Interferon gama |
| IL-10 | Interleucina 10 |
| K _i | Constante de inibição |
| LaSOM | Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal |
| LBDD | <i>Ligand-Based Drug Design</i> |
| LC | Leishmaniose Cutânea |
| LMC | Leishmaniose mucocutânea |
| logP | Logaritmo do Coeficiente de Partição octanol/água |
| LT | Leishmaniose Tegumentar |
| LTA | Leishmaniose Tegumentar Americana |
| LV | Leishmaniose Visceral |
| MetS | Metionina Sintetase |
| MOE | Molecular Operating Environment |
| MS | Ministério da Saúde |
| MTHFDCH | Enzima Bifuncional Metilnotetrahidrofolato Desidrogenase-Meteniltetrahidrofolato Ciclodrolase |

| | |
|---------------|---|
| MTHFR | Metileno-tetra-hidrofolato Redutase |
| MTX | Metotrexato |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| pABA | Ácido para-aminobenzoico |
| PAH | Fenilalanina Hidroxilase |
| PCD | Pterina 4- α -carbinolamina Deidratase |
| PDB | <i>Protein Data Bank</i> |
| PDTD | <i>Potential Drug Target Database</i> |
| PPA | <i>Profile-Profile threading Alignment</i> |
| PTPS | 6-piruviltetrahidropterina sintetase |
| PTR1 | Pteridina Redutase 1 |
| qDPR | Diidropterina Quinonóide Redutase |
| QMEAN | Qualitative Model Energy Analysis |
| RMC | Reação Multicomponente |
| RMSD | <i>Root Mean Square Deviation</i> |
| RNAi | <i>Ribonucleic Acid interference</i> |
| SBDD | <i>Structure-Based Drug Design</i> |
| SDR | <i>Short-chain dehydrogenase/reductase</i> |
| SHMT | Serina Hidroximetiltransferase |
| SR | Sepiapterina Redutase |
| TB1 | Transportador de biopterina 1 |
| TbPTR1 | Pteridina redutase de <i>Trypanosoma brucei</i> |
| TF1 | Transportador de folato 1 |
| TNF- α | Fator de Necrose Tumoral alfa |
| TS | Timidilato Sintetase |
| UMP | 2'-desoxiuridina-5'-monofosfato |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO GERAL | 21 |
| CAPÍTULO 1 – ELABORAÇÃO DOS MODELOS POR HOMOLOGIA DAS ENZIMAS PTERIDINA REDUTASE 1 E ENZIMA BIFUNCIONAL DIIDROFOLATO REDUTASE – TIMIDILATO SINTETASE DE LEISHMANIA SPP. | 25 |
| 1. INTRODUÇÃO | 27 |
| 1.1 <i>Aspectos gerais das leishmanioses</i> | 27 |
| 1.1.1 Modo de transmissão das leishmanioses | 27 |
| 1.1.2 Aspectos fisiopatológicos das leishmanioses | 28 |
| 1.1.2.1 Leishmaniose Visceral | 29 |
| 1.1.2.2 Leishmaniose Cutânea | 29 |
| 1.1.2.3 Leishmaniose Mucocutânea ou Mucosa | 30 |
| 1.2 Metabolismo de folatos e de pterinas em Leishmania e no hospedeiro humano | 30 |
| 1.2.1 Composição química dos folatos e das pterinas | 31 |
| 1.2.2 Rotas metabólicas dos folatos e das pterinas na <i>Leishmania</i> | 33 |
| 1.2.3 Rotas metabólicas dos folatos e das pterinas no hospedeiro humano | 35 |
| 1.2.4 As enzimas PTR1 e DHFR-TS de <i>Leishmania</i> como alvos moleculares | 36 |
| 1.3 As enzimas PTR1 e DHFR-TS de Leishmania e seus complexos cristalográficos | 36 |
| 1.3.1 As enzimas PTR1 de <i>Leishmania</i> e complexos cristalográficos disponíveis | 36 |
| 1.3.2 Complexos cristalográficos de DHFR-TS de Tripanossomatídeos e diferenças para DHFR humana..... | 37 |
| 1.4 Planejamento de fármacos baseado em estruturas (SBDD) | 39 |
| 1.4.1 Formas de obtenção de modelos tridimensionais para estudos <i>in silico</i> | 39 |
| 1.4.1.1 Modelagem por homologia x modelagem por enovelamento | 40 |
| 1.4.1.2 Métodos de predição de sítio de ligação..... | 43 |
| 2. OBJETIVOS | 43 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 45 |
| 3.1 <i>Materiais utilizados</i> | 45 |
| 3.2 <i>Elaboração dos modelos por homologia das espécies de Leishmania</i> | 45 |
| 3.2.1.1 Análise da influência dos resíduos de aminoácidos na conformação das enzimas PTR1..... | 48 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 51 |
| 4.1 <i>Elaboração dos modelos por homologia das espécies de Leishmania</i> | 51 |
| 4.1.1 Obtenção dos modelos da enzima Pteridina Redutase 1..... | 55 |
| 4.1.1.1 Construção dos modelos de PTR1 utilizando I-Tasser..... | 55 |
| 4.1.1.1.1 Primeira etapa de validação dos modelos gerados pelo I-Tasser através do servidor PSVS..... | 57 |
| 4.1.1.1.2 Construção dos modelos de PTR1 utilizando Swiss-Model | 57 |
| 4.1.1.1.2.1 Primeira etapa de validação dos modelos gerados pelo Swiss-Model através do servidor PSVS | 58 |
| 4.1.1.1.3 Construção dos modelos híbridos de PTR1 usando o Modeller..... | 59 |
| 4.1.1.1.3.1 Primeira etapa de validação dos modelos finais da enzima PTR1 | 60 |
| 4.1.1.1.3.2 Segunda etapa de validação dos modelos finais para a enzima PTR1 | 62 |
| 4.1.1.1.4 Análise da influência das diferenças nos resíduos de aminoácidos na conformação das enzimas PTR1..... | 69 |
| 4.1.2 Obtenção dos modelos da enzima DHFR-TS..... | 73 |
| 4.1.2.1 Construção dos modelos de DHFR-TS utilizando I-Tasser | 73 |
| 4.1.2.1.1 Validação dos modelos de DHFR-TS gerados pelo I-Tasser através do servidor PSVS | 73 |
| 4.1.2.1.2 Construção dos modelos de DHFR-TS utilizando Swiss-Model | 73 |
| 4.1.2.1.2.1 Validação dos modelos de DHFR-TS gerados pelo Swiss-Model através do servidor PSVS..... | 74 |
| 4.1.2.1.3 Construção dos modelos híbridos de DHFR-TS usando o Modeller | 75 |
| 4.1.2.1.3.1 Primeira etapa de validação dos modelos finais da enzima DHFR-TS..... | 75 |
| 4.1.2.1.3.2 Segunda etapa de validação dos modelos finais para a enzima DHFR-TS | 77 |
| 5. CONCLUSÕES | 81 |

| | |
|--|-----------|
| CAPÍTULO 2 – TRIAGENS VIRTUAIS DA QUIMIOTECA DO LASOM NAS ENZIMAS PTR1 E DHFR-TS DE <i>L. MAJOR</i> E ESTUDOS DE ADMETOX..... | 83 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 85 |
| 1.1 <i>Fármacos usados para o tratamento das leishmanioses.....</i> | 85 |
| 1.1.1 Antimoniato..... | 85 |
| 1.1.2 Pentamidinas..... | 86 |
| 1.1.3 Antibióticos..... | 86 |
| 1.1.4 Alquil-fosfolípidios..... | 87 |
| 1.2 <i>Mecanismos de resistência farmacológica.....</i> | 87 |
| 1.3 <i>Principais classes de moléculas sintetizadas no LaSOM e estudos prévios do grupo.....</i> | 88 |
| 1.3.1 Síntese de Diidropirimidinonas..... | 88 |
| 1.3.2 Síntese de Cumarinas..... | 90 |
| 1.3.3 Funcionalização do Limoneno..... | 91 |
| 1.4 <i>Revisão dos estudos de planejamento de fármacos sobre PTR1 e DHFR-TS de Leishmania disponíveis na literatura.....</i> | 93 |
| 1.4.1 Inibidores de PTR1 de <i>Leishmania</i> | 93 |
| 1.4.1.1 Diidropirimidin-2(1 <i>H</i>)-onas/tionas..... | 93 |
| 1.4.1.2 Produtos naturais..... | 95 |
| 1.4.1.3 Outros inibidores de PTR1..... | 98 |
| 1.4.2 Inibidores de DHFR-TS..... | 99 |
| 1.5 <i>Docking molecular e triagem virtual associados ao SBDD.....</i> | 101 |
| 1.6 <i>Predição de propriedades físico-químicas e ADMETOX.....</i> | 103 |
| 2. OBJETIVOS..... | 105 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 107 |
| 3.1 <i>Desenho da quimioteca virtual do LaSOM e preparo dos ligantes.....</i> | 107 |
| 3.2 <i>Processo e Validação da Triagem Virtual.....</i> | 107 |
| 3.2.1 <i>Redocking.....</i> | 108 |
| 3.2.1.1 <i>Redocking no programa Glide:.....</i> | 108 |
| 3.2.1.2 <i>Redocking no programa GOLD:.....</i> | 109 |
| 3.2.2 <i>Cross-docking.....</i> | 109 |
| 3.2.3 <i>Determinação dos descritores de enriquecimento para cada função de escore.....</i> | 110 |
| 3.2.4 <i>Procedimento de docking da quimioteca, seleção dos compostos e determinação de escores e afinidades de ligação.....</i> | 112 |
| 3.3 <i>Avaliação de parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos.....</i> | 113 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 115 |
| 4.1 <i>Validação do Processo de Triagem Virtual nas Enzimas PTR1 e DHFR-TS.....</i> | 115 |
| 4.1.1 <i>Redocking.....</i> | 115 |
| 4.1.1.1 <i>Redocking realizado no programa Glide.....</i> | 115 |
| 4.1.1.2 <i>Redocking realizado no programa GOLD.....</i> | 116 |
| 4.1.2 <i>Cross-docking.....</i> | 117 |
| 4.1.3 <i>Determinação dos descritores de enriquecimento para as triagens virtuais realizadas na PTR1 e na DHFR-TS.....</i> | 119 |
| 4.1.4 <i>Procedimento de docking da quimioteca, seleção dos compostos e determinação de escores e afinidades de ligação.....</i> | 121 |
| 4.2 <i>Avaliação de parâmetros físico-químicos, farmacocinéticos e toxicológicos.....</i> | 126 |
| 5. CONCLUSÕES..... | 131 |
| 6. CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS..... | 133 |
| 7. REFERÊNCIAS..... | 135 |
| 8. ANEXO A1 - SEQUÊNCIAS-ALVOS DA PTERIDINA REDUTASE 1 OBTIDOS ATRAVÉS DO SERVIDOR UNIPROT..... | 151 |
| 9. ANEXO B - TABELAS DOS MODELOS CONSTRUÍDOS PELAS FERRAMENTAS (I-TASSER, SWISSMODEL E MODELLER) E AVALIADOS PELOS SERVIDORES PSVS, PDBSUM..... | 155 |
| 10. ANEXO C - REDOCKING, CROSSDOCKING PTR1 E DHFR-TS..... | 174 |
| 11. ANEXO D – Manuscrito publicado no periódico <i>Current Drug Discovery Technologies - In silico Design of New Inhibitors of Guanine Phosphoribosyl-transferase (GPRT) from Giardia lamblia as Antiparasitic Drug Candidates</i>..... | 199 |

INTRODUÇÃO GERAL

O conteúdo das páginas 21 a 23 foi excluído em função da proteção de dados, os quais se encontram submetidos para possível publicação em periódico.

O presente trabalho visa identificar novos inibidores das enzimas pteridina redutase 1 (PTR1) e diidrofolato redutase-timidilato sintetase (DHFR-TS), através de ferramentas de quimioinformática, das seguintes espécies de *Leishmania*: (1) espécies do “Velho Mundo”: *L. major* e *L. donovani*; (2) espécies prevalentes no Brasil: *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum chagasi*.

Capítulo 1 – Elaboração dos modelos por homologia das enzimas pteridina redutase 1 e enzima bifuncional diidrofolato redutase – timidilato sintetase de *Leishmania* spp.

O conteúdo das páginas 27 a 81 foi excluído em função da proteção de dados, os quais se encontram submetidos para possível publicação em periódico / obtenção de patente. Consta da elaboração e de análise de modelos propostos por homologia das enzimas pteridina redutase 1 e diidrofolato redutase-timidilato sintetase de espécies de *Leishmania*.

Capítulo 2 – Triagens virtuais da quimioteca do LaSOM nas enzimas PTR1 e DHFR-TS de *L. major* e estudos de ADMETox.

O conteúdo das páginas 85 a 150 foi excluído em função da proteção de dados, os quais se encontram submetidos para possível publicação em periódico / obtenção de patente. Consta da triagem virtual da quimioteca do LaSOM nas pteridina redutase 1 e diidrofolato redutase-timidilato sintetase de *Leishmania major*, bem como de estudos ADMETox, revelando a existência de 7 possíveis inibidores com perfis toxicológicos e farmacocinéticos adequados.

Anexo A1 - Sequências-alvos da Pteridina Redutase 1 obtidos através do servidor Uniprot

O conteúdo das páginas 151 a 154 foi excluído em função da proteção de dados, os quais se encontram submetidos para possível publicação em periódico / obtenção de patente.

ANEXO B - Tabelas dos modelos construídos pelas ferramentas (I-Tasser, Swissmodel e Modeller) e avaliados pelos servidores PSVS, PDBsum

O conteúdo das páginas 155 a 173 foi excluído em função da proteção de dados, os quais se encontram submetidos para possível publicação em periódico / obtenção de patente

ANEXO C - Redocking, crossdocking PTR1 e DHFR-TS

O conteúdo das páginas 174 a 198 foi excluído em função da proteção de dados, os quais se encontram submetidos para possível publicação em periódico / obtenção de patente.

ANEXO D – Manuscrito publicado no periódico *Current Drug Discovery Technologies* - In silico Design of New Inhibitors of Guanine Phosphoribosyltransferase (GPRT) from *Giardia lamblia* as Antiparasitic Drug Candidates

O anexo D apresenta artigo científico publicado, conforme referência abaixo, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 201 – 219.

DAS NEVES, GUSTAVO; KAGAMI, LUCIANO ; RODRIGUES, RICARDO ; DA SILVA, VINICIUS ; EIFLER-LIMA, VERA ; KAWANO, DANIEL . In silico design of new inhibitors of guanine phosphoribosyltransferase (GPRT) from *Giardia lamblia* as antiparasitic drug candidates. *Current Drug Discovery Technologies*, v. 13, p. 1-1, 2017. doi: **10.2174/1570163813666161213125622**

