

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – Unifal-MG

THIAGO CASTILHO ELIAS

**SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL DE MUTAÇÕES EM *PLASMODIUM*
FALCIPARUM QUE PODEM CONFERIR RESISTÊNCIA E BUSCA DE NOVOS
FÁRMACOS CAPAZES DE COMBATER O MUTANTE**

Alfenas/MG
2014

THIAGO CASTILHO ELIAS

SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL DE MUTAÇÕES EM *PLASMODIUM FALCIPARUM* QUE PODEM CONFERIR RESISTÊNCIA E BUSCA DE NOVOS FÁRMACOS CAPAZES DE COMBATER O MUTANTE

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Físico-Química. Orientador: Nelson José Freitas da Silveira.

Alfenas/MG
2014

Elias, Thiago Castilho.

Simulação computacional de mutações em *Plasmodium falciparum* que podem conferir resistência e busca de novos fármacos capazes de combater o mutante / Thiago Castilho Elias. -- Alfenas, MG, 2014.

79 f. -

Orientador: Nelson José Freitas da Silveira

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.

Bibliografia.

1. Malária. 2. Resistência a Medicamentos. 3. Mutação. 4. Biologia Computacional. I. Silveira, Nelson José Freitas da. II. Título.

CDD: 541.3

THIAGO CASTILHO ELIAS

**SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL DE MUTAÇÕES EM PLASMODIUM
FALCIPARUM QUE PODEM CONFERIR RESISTÊNCIA E BUSCA DE NOVOS
FÁRMACOS CAPAZES DE COMBATER O MUTANTE**

A banca examinadora abaixo-assinada aprova a
Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre em
Química pela Universidade Federal de Alfenas.
Área de concentração: físico-química.

Aprovada em: 29/07/2014

Profº. Nelson José Freitas da Silveira

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: 

Profº. Márcia Paranho Veloso

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: 

Profº. Helen Andrade Arcuri

Instituição: Universidade de São Paulo – Rio Claro

Assinatura: 

RESUMO

A malária é uma doença infecciosa que afeta principalmente populações de países pobres vivendo em áreas tropicais. É transmitida pela picada de insetos do gênero *Anopheles*. Seu agente infeccioso é um protozoário do gênero *Plasmodium*, quatro espécies infectam o ser humano, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale*, sendo a primeira a espécie mais letal. Não existe uma vacina para a doença e o tratamento é quimioterápico, fármacos como quinina, cloroquina, pirimetamina, sulfadoxina, atovaquona e artemisina são empregados. Entretanto, o uso prolongado desses fármacos, a monoterapia e a interrupção precoce do tratamento tem favorecido o surgimento e estabelecimento de plasmócitos resistentes, que sobrevivem apesar da administração do fármaco. Muitos dos mecanismos de resistência são resultantes de mutações pontuais, que podem alterar um ou mais resíduos de aminoácidos presentes na cadeia proteica, de forma que a afinidade de ligação entre fármaco e a proteína fica comprometida e a inibição não mais ocorre. Torna-se então necessário a pesquisa por novas moléculas que possam atuar como fármacos capazes de combater plasmócitos mutantes. A enzima dihidrofolato redutase de *Plasmodium falciparum* pertence à via do ácido fólico e é inibida pelos fármacos pirimetamina e cicloguanil. Mutações A16V/S108T tornam o parasita resistente ao cicloguanil e N51I/C59R/S108N/I164L à pirimetamina. Por meio de modelagem por homologia, geraram-se novas estruturas tridimensionais dessa enzima, com mutações sítio-dirigida em outros resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo. Realizou-se então estudo de *docking* utilizando-se essas estruturas modelo, procurando-se sugerir outros mutantes que também teriam baixa afinidade com os fármacos, podendo então originar possíveis plasmócitos resistentes. Selecionaram-se algumas das enzimas mutantes e se realizou um *virtual screening* com novas moléculas obtidas da base de dados **NCI Diversity Set II** para se procurar protótipos para novos fármacos. A enzima dihidrofolato redutase existe como uma molécula bifuncional ligada com a enzima timidilato sintase por meio de uma região de junção de 89 aminoácidos, realizou-se também *virtual screening* visando moléculas que interagissem com a região de junção que, segundo alguns autores, pode ser alvo para a ação de fármacos não competitivos.

Palavras-chave: malária. resistência. mutação. *virtual screening*.

ABSTRACT

Malaria is an infectious disease that affects mostly poor populations living in tropical areas. It is transmitted by bite of insects of genus *Anopheles*. Infectious agent is a protozoan of the genus *Plasmodium*, four species infect humans, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*, the first is the most lethal. There is no vaccine for the disease and the treatment is chemotherapy, drugs like quinine, chloroquine, pyrimethamine, sulfadoxine, atovaquone and artemisinin are employed. However, prolonged use of these drugs, monotherapy and early discontinuation of treatment has favored the emergence and establishment of resistant strains, which survive despite the administration of the drug. Many of resistance mechanisms are due to mutations that may alter one or more amino acid residues present in the protein chain, such that the binding affinity between the drug and the protein is compromised and not inhibition occurs. It then becomes necessary to search for new molecules that can act as drugs capable of fighting mutant strains. The *Plasmodium falciparum*'s dihydrofolate reductase enzyme belongs to the path of folic acid and is inhibited by drugs pyrimethamine and cycloguanil. A16V/S108T mutation becomes the parasite resistant to cycloguanil and N51I/C59R/S108N/I164L mutation to pyrimethamine. Through homology modeling, were generated new three-dimensional structures of this enzyme, with site-directed mutations in other amino acid residues present in the active site. Then docking study using these model structures was conducted, seeking to suggest other mutants that also have low affinity for inhibitors, which may then lead to possible strains resistant. We selected some of the mutant enzymes and conducted a virtual screening with new molecules obtained from the database **NCI Diversity Set II** to search prototypes for new drugs. The enzyme dihydrofolate reductase exists as a bifunctional molecule bound to the enzyme thymidylate synthase through a junction region of 89 amino acids, we also perform virtual screening targeting molecules that interact with the junction region, according to some authors, can be targeted for action of noncompetitive drugs.

Keywords: malaria. resistance. mutation. virtual screening.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 –	Ocorrência de malária no mundo	18
Figura 02 –	Ciclo de vida do parasita da malária	20
Figura 03 –	Fármaco quinina	22
Figura 04 –	Fármaco cloroquina	23
Figura 05 –	Fármaco primaquina	24
Figura 06 –	Fármaco pirimetamina	25
Figura 07 –	Fármaco cicloguanil	26
Figura 08 –	Fármaco sulfadoxina	26
Figura 09 –	Fármaco atovaquona	27
Figura 10 –	Fármaco artemisina	28
Figura 11 –	Alinhamento entre as sequências primárias da enzima diidrofolato redutase tipo selvagem e mutantes	32
Figura 12 –	Divisão esquemática da região de junção da enzima DHFR-TS de <i>Plasmodium falciparum</i>	53
Figura 13 –	Sobreposição entre a configuração dos ligantes obtidos por <i>redocking</i> e a configuração original presente no arquivo PDB	56
Figura 14 –	Sobreposição entre as enzimas DHFR-TS de <i>Plasmodium falciparum</i> tipo selvagem e o mutante G165R complexados com o fármaco pirimetamina	58
Figura 15 –	Sobreposição entre as enzimas DHFR-TS de <i>Plasmodium falciparum</i> tipo selvagem e o mutante S108R complexados com o fármaco pirimetamina	59
Figura 16 –	Sobreposição entre as enzimas DHFR-TS de <i>Plasmodium falciparum</i> tipo selvagem e o mutante F58I complexados com o fármaco pirimetamina	60
Figura 17 –	Sobreposição entre as enzimas DHFR-TS de <i>Plasmodium falciparum</i> tipo selvagem e o mutante N51I/C59R/S108N/Y170S complexados com o fármaco pirimetamina	62

Figura 18 –	Estrutura 2D dos compostos da biblioteca química NCI Diversity Set II com melhor energia de ligação aos modelos mutantes da enzima DHFR-TS de <i>Plasmodium falciparum</i>	64
Figura 19 –	Interação entre as moléculas com melhor energia de ligação obtidas em <i>virtual screening</i> tendo como alvo molecular enzimas mutantes DHFR-TS de <i>Plasmodium falciparum</i>	65
Figura 20 –	Interação entre as moléculas com melhor energia de ligação obtidas em <i>virtual screening</i> tendo como alvo molecular enzimas com mutações quádruplas DHFR-TS de <i>Plasmodium falciparum</i>	66
Figura 21 –	Visualização da interação entre moléculas com melhor resultantes de <i>virtual screening</i> realizado pelo programa AutoDock Vina com enzimas DHFR-TS de <i>Plasmodium falciparum</i> com mutações simples e quádruplas	67
Figura 22 –	Estrutura tridimensional do modelo da enzima homodimérica DHFR-TS de <i>Plasmodium falciparum</i> apresentando a região de junção	69
Figura 23 –	Plot da interação das moléculas com melhor energia de ligação junto à região de junção da enzima DHFR-TS de <i>Plasmodium falciparum</i>	71
Figura 24 –	Estrutura 2D da molécula ZINC03844856, análoga à NCI_293778 e plot da interação da mesma com a região de junção da enzima DHFR-TS de <i>Plasmodium falciparum</i>	73
Fluxograma 1 –	Estudo de <i>redocking</i> feito com o programa AutoDock Vina	40
Fluxograma 2 –	Mutação sítio-dirigida com programa Modeller9.12 seguida de <i>docking</i> molecular com programa AutoDock Vina	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de RMSD encontrados em estudo de <i>redocking</i> realizado com enzimas DHFR-TS de <i>Plasmodium falciparum</i>	54
Tabela 2 – Configurações obtidas em <i>redocking</i> da estrutura 3D (código acesso PDB:3DG8), apresentando o RMSD em relação ao ligante na estrutura cristalográfica (PDB:3DG8) e o respectivo valor de energia calculado	55
Tabela 3 – Energias de interação obtidas por <i>docking</i> molecular entre enzimas DHFR-TS de <i>Plasmodium falciparum</i> com uma mutação e os fármacos pirimetamina e cicloguanil	57
Tabela 4 – Energia de interação obtido por <i>docking</i> molecular entre enzimas DHFR-TS de <i>Plasmodium falciparum</i> com quatro mutações e os fármacos pirimetamina e cicloguanil	61
Tabela 5 – Resultado de <i>virtual screening</i> de modelos mutantes da enzima DHFR-TS contra a biblioteca química NCI Diversity Set II	63
Tabela 6 – Alinhamento dos <i>templates</i> usados para a modelagem da região de junção (JR) da enzima DHFR-TS	69
Tabela 7 – Melhores <i>scores</i> de <i>docking</i> molecular visando a região de junção da enzima DHFR-TS de <i>Plasmodium falciparum</i>	70
Tabela 8 – Resultado de <i>virtual screening</i> para moléculas homólogas à NCI_293778, tendo-se como alvo a região de junção da enzima DHFR-TS	73

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – <i>Input</i> para <i>script</i> de separação entre estruturas de receptor e ligante de um arquivo pdb	35
Quadro 2 – <i>Shellscript</i> utilizado para separar as estruturas de receptor e ligante de arquivos pdb	36
Quadro 3 – <i>Shellscript</i> utilizado para realizar estudo de <i>redocking</i> com o programa AutoDock Vina	39
Quadro 4 – <i>Script</i> utilizado para selecionar os resíduos de aminoácido próximos ao ligante para sofrer mutação	42
Quadro 5 – <i>Script</i> para selecionar quais resíduos substituirão aquele a ser mutado e chamar o programa <i>mutate_model.py</i>	44
Quadro 6 – <i>Shellscript</i> usado para rodar o programa AutoDock Vina iterativamente	47
Quadro 7 – Parte do <i>script</i> Modeller onde se lê as coordenadas do <i>template</i> principal (código acesso PDB:1J3K), sendo as mesmas copiadas para o modelo	51
Quadro 8 – <i>Script</i> Modeller completo para se gerar o modelo da enzima DHFR-TS contendo a região de junção	52

LISTA DE SIGLAS

ACT	Artemisinin-based Combination Therapy – Terapias Baseadas na Combinação com Artemisina
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool – Ferramenta de Procura de Alinhamento Local Básico
DHFR-TS	Enzima Dihidrofolato Redutase - Timidilato Sintase
DNA	Deoxyribonucleic Acid – Ácido Desoxirribonucleico
dTMP	Deoxythymidine Monophosphate – Deoxitimidina Monofosfato
dUMP	Deoxyuridine Monophosphate – Deoxiuridina Monofosfato
HIV	Human Immunodeficiency Virus – Vírus da Imunodeficiência Humana
IC₅₀	Concentração do fármaco capaz de inibir 50% da população parasitária
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate – Fosfato de Dinucleotídio de Nicotinamida e Adenina
NCBI	National Center for Biotechnology Information, Centro Nacional de informação de biotecnologia
NCI	National Cancer Institute – Instituto Nacional do Câncer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance – Ressonância Magnética Nuclear
PDB	Protein Data Bank – Banco de Dados de Proteínas
Pfcr1	Gene que codifica para uma proteína transportadora resistente à cloroquina em <i>Plasmodium falciparum</i>
Pfdhfr	Gene que codifica para a enzima diidrofolato redutase em <i>Plasmodium falciparum</i>
pmv	Python Molecular Viewer – Visualizador Molecular Python (programa de visualização molecular)
RMSD	Root Mean Square Deviation – Raiz Quadrada do Desvio Médio
vmd	Visual Molecular Dynamics – Dinâmica Molecular Visual (programa de visualização molecular)
WHO	World Health Organization – Organização Mundial da Saúde
ZINC	Zinc Is Not Comercial – Zinc não é comercial (Banco de dados de ligantes)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
3	JUSTIFICATIVA	15
4	REVISÃO DA LITERATURA	16
4.1	A MALÁRIA	16
4.2	CICLO DE VIDA DO <i>Plasmodium</i>	18
4.3	FÁRMACOS UTILIZADOS NO COMBATE À MALÁRIA	20
4.3.1	Quinina	21
4.3.2	Cloroquina	22
4.3.3	Primaquina	23
4.3.4	Pirimetamina	24
4.3.5	Cicloguanil	25
4.3.6	Sulfadoxina	26
4.3.7	Atovaquona	27
4.3.8	Artemisina	27
4.4	RESISTÊNCIA A FÁRMACOS	28
4.5	ENZIMA DIHIDROFOLATO REDUTASE - TIMIDATO SINTASE	30
4.6	<i>DOCKING</i> MOLECULAR	32
5	MATERIAIS E MÉTODOS	34
5.1	ESTUDOS DE <i>REDOCKING</i>	34
5.2	MUTAÇÃO SÍTIO-DIRIGIDA NA ENZIMA DHFR-TS TIPO SELVAGEM E MUTANTE N51I/C59R/S108N DE <i>Plasmodium falciparum</i>	41
5.3	<i>DOCKING</i> MOLECULAR DAS ENZIMAS MUTANTES CONTRA OS FÁRMACOS PIRIMETAMINA E CICLOGUANIL	46
5.4	<i>VIRTUAL SCREENING</i> DAS ENZIMAS MUTANTES SELECIONADAS CONTRA BIBLIOTECA QUÍMICA NCI DIVERSITY SET II	48
5.5	MODELAGEM DA REGIÃO DE JUNÇÃO DA ENZIMA DHFR-TS	50
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
6.1	ESTUDOS DE <i>REDOCKING</i>	54

6.2	SELEÇÃO DE ENZIMAS MUTANTES RESISTENTES À PIRIMETAMINA E CICLOGUANIL	56
6.3	BUSCA DE NOVOS FÁRMACOS COM POTENCIAL DE INIBIR ENZIMAS MUTANTES	62
6.4	MODELAGEM DA REGIÃO DE JUNÇÃO	68
6.5	<i>VIRTUAL SCREENING</i> VISANDO A REGIÃO DE JUNÇÃO	69
7	CONCLUSÃO	74
	REFERÊNCIAS	75

1 INTRODUÇÃO

A malária, também conhecida como paludismo, sezão, maleita, febre terçã e febre quartã, é uma das doenças mais antigas da humanidade, chegou a atingir no passado praticamente todas as regiões do globo, com exceção das regiões polares. Atualmente se concentra nos trópicos, onde o clima quente e úmido favorece a disseminação dos vetores da doença, mosquitos do gênero *Anopheles*, somando-se a isto há a condição precária de vida das populações dos países subdesenvolvidos, onde se concentram a maioria dos casos de malária, com baixo acesso a sistemas de saúde, saneamento básico e medicamentos (REY, 2010). O protozoário que provoca a doença pertence ao gênero *Plasmodium*, possui um ciclo de vida complexo, passando por diversos estágios no mosquito e no ser humano, dentro do fígado, na corrente sanguínea e no interior das hemácias. A cada estágio evolutivo, o parasita apresenta diferentes epítomos, confundindo o sistema imune (NEVES, 2005).

Embora existam fármacos utilizados no combate à malária, nas últimas décadas tem-se registrado casos de fracasso na administração do fármaco, ocasionados principalmente por mutações pontuais em linhagens de *Plasmodium* espalhadas ao redor do mundo (WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010). As mutações ocorrem de forma rara e são independentes da presença do fármaco. Em condições normais, a população de parasitas mutantes tende a ser bem menor que a população de parasitas selvagens, uma vez que mutações geralmente acarretam redução da capacidade enzimática da proteína mutada ou outras desvantagens. Entretanto, quando há pressão seletiva ocasionada pela administração de um fármaco e quando este é ministrado de forma incorreta, (em monoterapias, em doses subterapêuticas, interrupção precoce do tratamento), enquanto as formas selvagens são eliminadas, plasmócitos mutantes sobrevivem e se multiplicam até um momento em que a maior parte da população de parasitas é do tipo mutante e a droga já não tem efeito (WHO, 2010). Já estão descritos focos de resistência para a maioria dos antimaláricos, e alguns possuem marcadores moleculares confirmados, como é o caso da mutação K76T na proteína Pfert, que confere resistência à cloroquina (SIDHU et al., 2002), e a mutação Y268S no citocromo b de *Plasmodium falciparum*, conferindo resistência à atovaquona (FISHER et al., 2012).

O surgimento de resistência a antimaláricos tem preocupado organizações como a WHO, uma vez que poucas moléculas com efeito antimalárico, de preço acessível e baixos efeitos colaterais estão disponíveis, e a possibilidade de uma resistência cruzada, onde o

patógeno é resistente a mais de um tipo de fármaco, podem prejudicar o controle da doença (WHO, 2010).

O desenvolvimento de novas drogas é um dos ramos de pesquisa mais importantes atualmente, por garantir um tratamento eficaz da enfermidade mesmo em frente a patógenos com resistência aos fármacos antigos. O uso de ferramentas computacionais auxilia na busca por novas moléculas candidatas a fármacos, ao fazer uma triagem de compostos com potencial de inibir alvos vitais do parasita por meio do *docking* molecular e *virtual screening*. Conhecendo-se as mutações desenvolvidas e a maneira como ocorrem, pode-se simular as mesmas, criando modelos tridimensionais de enzimas mutadas por técnicas de modelagem por homologia, e então avaliar como ocorre a interação destas com os fármacos.

Propõe-se um protocolo para simulação de mutações em alvos moleculares onde inicialmente é selecionado um alvo a ser estudado, a partir deste gera-se modelos com mutação sítio dirigida, estando as mutações localizadas no sítio ativo da enzima; avalia-se por meio de *docking* molecular como é a interação desses mutantes com os fármacos disponíveis atualmente; os mutantes com baixa interação com os fármacos são selecionados; finalmente, é feita uma procura por novas moléculas com potencial de inibir os mutantes selecionados.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos os seguintes itens:

- a) Gerar, por meio de modelagem molecular por homologia e mutação sítio dirigida, modelos 3D de enzimas DHFR-TS de *Plasmodium falciparum* com mutações simples e quádruplas que possam ser diferentes daquelas encontradas na natureza;
- b) Selecionar por meio de *docking* molecular modelos 3D mutantes que apresentem baixa afinidade com fármacos utilizados atualmente no tratamento da doença;
- c) Submeter os mutantes selecionados a *virtual screening* em busca de moléculas que possam ser protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos que tenham boa energia de ligação com enzimas mutadas;
- d) Gerar um modelo da enzima DHFR-TS contendo toda a região de junção (JR) e submetê-lo a *virtual screening* a procura de moléculas que interajam com a JR, sendo protótipos para fármacos não competitivos.

3 JUSTIFICATIVA

A malária está entre as doenças que mais provoca mortes no mundo, ocorrendo principalmente em países subdesenvolvidos. *Plasmodium falciparum* é um parasita altamente adaptado e especializado em infectar seres humanos, possui um ciclo de vida complexo e mecanismos que dificultam para o sistema de defesa do hospedeiro a eliminação da infecção, tornando a cura total viável apenas pela administração de fármacos, uma vez que ainda não foi desenvolvida uma vacina. As mutações sofridas pelo protozoário podem resultar em plasmócitos resistentes a fármacos, conforme é relatado para a maioria dos fármacos usados atualmente. A resistência a fármacos consiste um grande problema de saúde pública. Plasmócitos resistentes podem levar os tratamentos tradicionais à falência, impossibilitando a cura do doente e favorecendo o espalhamento da doença. A pesquisa por novos fármacos se faz necessária a fim de tentar combater os parasitas mutantes. Entender os mecanismos de resistência pode ajudar na elaboração de estratégias para a formulação de novas moléculas candidatas a fármaco. A metodologia empregada no presente estudo poderá servir também para o estudo de outras doenças infecciosas.

4 REVISÃO DA LITERATURA

Será abordado na revisão da literatura o que é a malária, como é o ciclo de vida do agente etiológico da doença, os principais fármacos utilizados no combate a essa enfermidade, como ocorre a resistência a fármacos, a enzima dihidrofolato redutase - timidilato sintase como alvo terapêutico e o que é *docking* molecular.

4.1 A MALÁRIA

A malária é uma doença infecciosa febril aguda, que afeta principalmente populações pobres de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (SUH et. al., 2004). É transmitida pela picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles*. O principal vetor no continente africano é o *Anopheles gambiae*, uma espécie que se alimenta quase exclusivamente de sangue humano, vive dentro de residências humanas e bota seus ovos em corpos d'água provenientes de atividade humana, onde suas larvas se desenvolvem (HOLT et. al., 2002). Regiões tropicais, com elevadas temperaturas e alta umidade relativa favorecem a proliferação desses mosquitos.

Os agentes etiológicos são protozoários pertencentes à família *Plasmodiidae* e gênero *Plasmodium*, quatro espécies infectam o homem: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium malariae* (REY, 2001). Uma vez no corpo humano, o parasita ataca inicialmente células hepáticas e após um período de desenvolvimento, são liberados do fígado e entram na corrente sanguínea, onde atacam as hemácias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). *Plasmodium falciparum* é a espécie que causa a doença mais grave, sendo responsável por grande parte das mortes por malária, embora outras espécies, como *Plasmodium vivax* possam ser responsáveis por quadros letais (SNOW et. al., 2005). Em uma pesquisa realizada na Indonésia, apenas a espécie *Plasmodium vivax* foi encontrada no sangue de 28% de pacientes mortos por malária (ELSENSTEIN, 2012). Os grupos mais vulneráveis à malária incluem crianças, mulheres grávidas e pessoas imunodeprimidas, como os portadores de HIV (SHETTY, 2012).

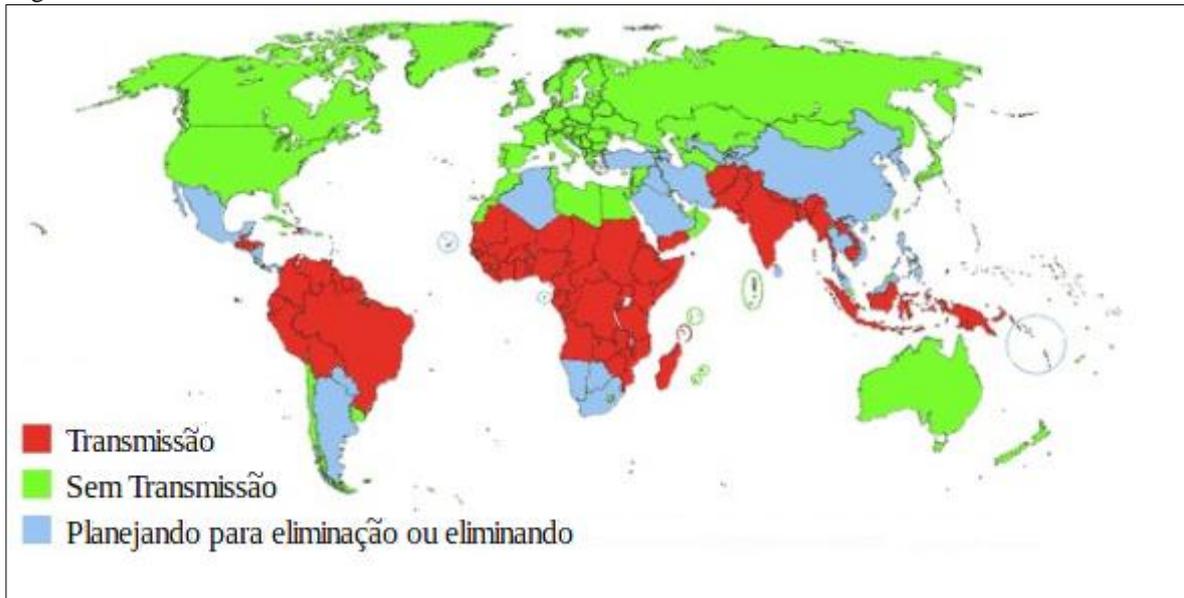
Estima-se que em 2012 houve 207 milhões de casos de malária no mundo, 80% destes ocorrendo no continente africano, provocando cerca de 627000 mortes, 77% em crianças com

menos de cinco anos de idade (WHO, 2013).

A malária pode se manifestar como Malária não complicada e Malária grave e complicada. Na malária não complicada, podem ser observados calafrios, febre e sudorese, a temperatura do paciente pode chegar a 40°C ou mais, podem ocorrer também cefaleia, mialgia, náuseas e vômitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Na malária grave podem ser observados prostração, anemia, alterações da consciência, edema pulmonar, convulsões, colapso circulatório, sangramento anormal, icterícia e anemia severa (WHO, 2000). A anemia severa ocorre devido à destruição das células vermelhas parasitadas, a destruição ocasionada pelo sistema imune de células vermelhas não infectadas e a redução da capacidade da medula óssea em repor novas hemácias. As hemácias infectadas se ligam a células endoteliais dos capilares sanguíneos, um processo chamado citoaderência, provocando obstrução microvascular, quando esta ocorre no cérebro, tem-se a malária cerebral, cujas consequências são déficits mentais e coma, podendo evoluir para problemas mentais irreversíveis e também a morte (PASVOL, 2005). Os sintomas iniciais da malária se confundem com os sintomas de outras doenças, para se confirmar a instalação da doença, faz-se um diagnóstico laboratorial, que pode ser por gota espessa e por esfregaço delgado (WHO, 2010).

Atualmente não existe uma vacina para a doença, embora pesquisas estejam em andamento. A dificuldade de se projetar uma vacina é em parte devido aos diversos estágios de desenvolvimento do parasita, que a cada estado morfológico apresenta diferentes epítomos, confundindo o sistema imune do hospedeiro (SAUERWEIN, 2011). O controle do inseto transmissor utilizando-se inseticidas e a quimioterapia são as formas usadas para prevenir e tratar a doença. Dentre os antimaláricos utilizados, encontram-se quinina, cloroquina, primaquina, sulfadoxina, pirimidina e artemisina, e sua aplicação depende de fatores, como o tipo de espécie infectante, a localização geográfica e a gravidade da infecção (SUH et. al., 2004). O mapa na figura 01 apresenta a ocorrência de malária no mundo.

Figura 01 – Ocorrência de malária no mundo.



Fonte: Adaptado de Malaria Elimination Initiative (2011) UCSF Global Health Group.

Nota: Dados referentes a 2011.

4.2 CICLO DE VIDA DO *Plasmodium*

Quando um mosquito do gênero *Anopheles* infectado com a malária pica uma pessoa, juntamente com a saliva injeta formas infectantes do parasita, denominadas esporozoítas. Estes são alongados e possuem extremidades afiladas, medem cerca de 11 μm , sua extremidade anterior possui um sistema de penetração, chamado complexo apical, constituído por três estruturas anulares, em cujo centro há uma depressão, de onde saem um par de roptrias e vários micronemas (REY, 2010).

Em menos de uma hora os esporozoítas migram da corrente sanguínea para o fígado, onde irão infectar os hepatócitos e sofrer transformações morfológicas, originando os criptozoítas. Estes se tornam arredondados e perdem algumas estruturas, como o aparelho apical. No interior dos hepatócitos os criptozoítas crescem rapidamente e promovem intensa divisão nuclear e replicação de mitocôndrias, podendo ser contados cerca de 200 núcleos em uma única célula. Esta nova forma é chamada esquizonte, em sua superfície começam a surgir protuberâncias que vão adquirindo formato digitiforme em cujas extremidades se formam complexos apicais, em cada protuberância entram um núcleo e uma mitocôndria, que por fim se separa dando origem a vários merozoítas (processo de esquizogonia), deixando para trás um citoplasma residual, o hepatócito se rompe, liberando os merozoítas para a corrente

sanguínea (REY, 2001).

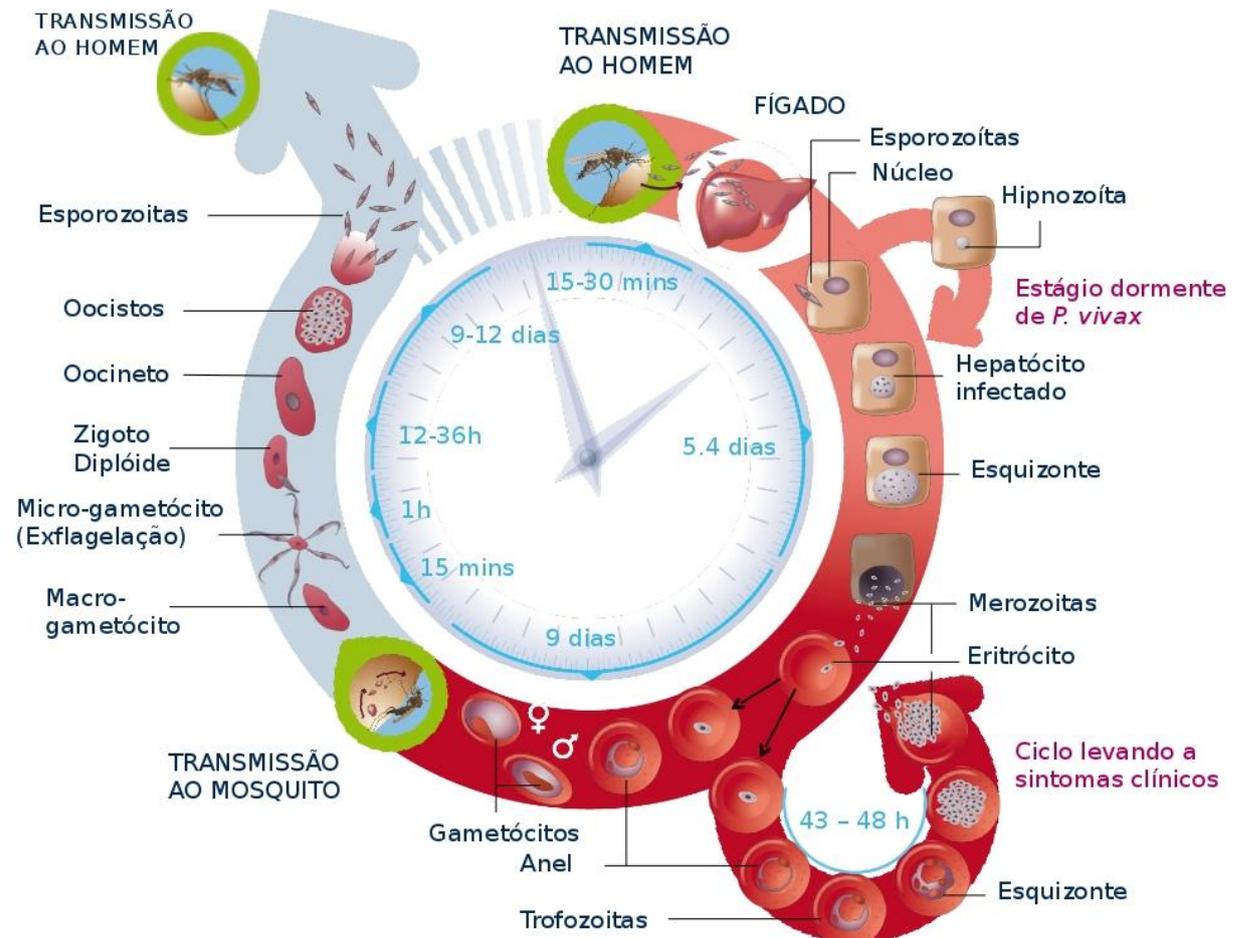
Nas espécies de *Plasmodium vivax* e *Plasmodium ovale*, alguns esporozoítas que invadiram os hepatócitos entram em estado de latência, sendo denominados hipnozoítas, podendo entrar em atividade vários meses depois, provocando recaídas da doença mesmo após um tratamento eficiente (REY, 2010).

Os merozoítas formados no processo de esquizogonia entram na corrente sanguínea, onde irão infectar hemácias. Sua superfície é recoberta por um envoltório de aspecto piloso, formado por glicoproteínas em forma de T ou Y que se aderem à superfície do eritrócito, o parasita aderido à hemácia se reorienta de forma que seu complexo apical entre em contato com a célula hospedeira. Ocorre a formação de uma junção entre a membrana do parasita e da hemácia, o merozoíta é endocitado, sendo o envoltório piloso abandonado, difundindo-se pela corrente sanguínea. No interior da hemácia o merozoíta se transforma em trofozoíta, adquirindo aspecto ameboide, alimenta-se principalmente da hemoglobina, liberando como subproduto de seu metabolismo um complexo inerte chamado hemozoína. À medida que o trofozoíta cresce, torna-se um esquizonte ao sintetizar mais núcleos e mitocôndrias em seu interior, em sua superfície surgem protuberâncias onde irão se alojar um núcleo e uma mitocôndria, surgem complexos apicais na extremidade de cada protuberância e estas se separam do corpo residual, dando origem a novos merozoítas, a hemácia se rompe, liberando os merozoítas para a corrente sanguínea, onde irão infectar novas hemácias. Esse processo é conhecido como ciclo eritrocitário, e é quando as manifestações clínicas da doença são observadas (NEVES, 2005).

Após algum tempo de infecção, alguns trofozoítas se desenvolvem em formas sexuadas, os macrogametas (gametas femininos) e o microgametas (gametas masculinos) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Os microgametas são formados num processo de exflagelação, em que são sintetizados oito núcleos que migram para a periferia da célula, a partir dos centríolos crescem flagelos, dentro dos quais entrarão os núcleos, os flagelos se desprendem e passam a procurar um gameta feminino. Os macrogametas possuem em sua superfície um cone atrativo, por onde entrará o microgameta. Quando um mosquito pica uma pessoa infectada com malária em que as formas sexuadas estão presentes, ingere junto com o sangue todas as formas evolutivas do parasita, que com exceção dos gametócitos, são digeridos pelo inseto. No interior do mosquito o microgameta se funde ao macrogameta, formando um zigoto, este torna-se alongado e adquire mobilidade, constituindo um oocineto. O oocineto se move para a parede intestinal do mosquito, a perfura e se coloca entre o epitélio e a membrana basal. Nesse momento o oocineto sintetiza um envoltório protetor, passando a

ser chamado de oocisto, dentro do qual ocorre uma multiplicação esporogônica, em que milhares de esporozoítas são produzidos. O oocisto se rompe, liberando os esporozoítas, estes migram para as glândulas salivares do mosquito, podendo então infectar outras pessoas (REY, 2010). A figura 02 apresenta de forma esquemática o ciclo de vida do parasita da malária.

Figura 02 – Ciclo de vida do parasita da malária



Fonte: Adaptado de Animated lifecycle of the malaria parasite.

Nota: Endereço eletrônico da figura original: <http://www.mmv.org/malaria-medicines/parasite-lifecycle>.

4.3 FÁRMACOS UTILIZADOS NO COMBATE À MALÁRIA

Existe um conjunto de drogas naturais e sintéticas utilizadas no tratamento da malária. Cada droga ataca preferencialmente um estágio evolutivo do parasita, e assim podem ser classificadas segundo sua ação em (REY, 2001):

- a) Ação esquizonticida tissular: atacam os esquizontes do interior de hepatócitos. Sua ação evita o surgimento de quadros clínicos como a febre, pois inibem a ação do patógeno no sangue.
- b) Ação esquizonticida hemática: atacam as formas parasitárias encontradas no sangue (trofozoítas, esquizontes, merozoítas). O paciente apresenta os quadros clínicos da doença, que vão diminuindo no transcorrer do tratamento.
- c) Ação gametocitocida: destrói micro e macrogametas, evitando o ciclo de reprodução sexual no mosquito caso esse venha a picar a pessoa doente.
- d) Ação esporonticida: afeta os gametócitos sem destruí-los, impedindo sua transformação em oocistos e esporozoítas.

Os fármacos podem ser também classificados quanto à classe química a qual pertencem, tais como 4-aminoquinolinas (cloroquina, amodiaquina, piperaquina), amino-álcoois (quinino, quinidina, mefloquina, halofantrina, lumenfantrina), sulfonamidas e sulfonas (sulfadoxina, sulfalene, dapsona) e lactonas sesquiterpenas (artemisina, arteeter, artemeter, artesunato) (WHO, 2010).

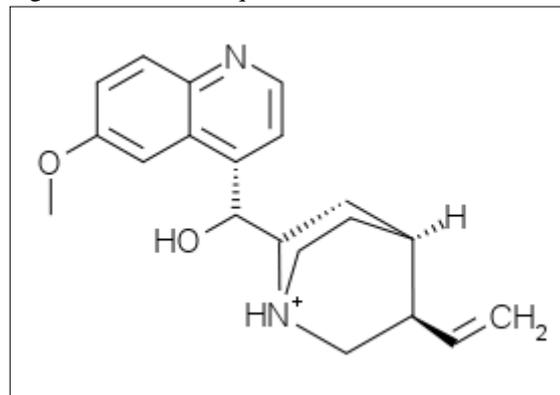
A WHO não recomenda a monoterapia, ou seja, a administração de um único fármaco no tratamento da doença, visto que esta prática favorece o surgimento de resistência. Recomenda-se o uso de combinações de fármacos, especialmente quando estes atingem diferentes alvos no parasita, e que possuam tempo de meia-vida similar, a fim de evitar que o parasita fique exposto a apenas um dos fármacos da combinação por longo período de tempo (WHO, 2010). Entre as combinações utilizadas tem-se cloroquina+primaquina, quinina+doxiciclina+primaquina, atovaquona+proguanil, e as chamadas ACT (artemisinin-based combination therapy, terapias baseadas na combinação com artemisina), na qual um dos componentes é a artemisina ou um de seus derivados, como artemeter+lumefantrina, artesunato+sulfadoxina+pirimetamina e artesunato+mefloquina.

4.3.1 Quinina

A quinina é um alcaloide extraído da casca de vegetais do gênero *Cinchona*, sendo uma das primeiras drogas eficazes no combate à malária, utilizada desde antes de 1633. Três outros alcaloides com efeito antimalárico podem ser extraídos deste mesmo vegetal: quinidina, cinchonina e cinchonidina. Índios do Peru utilizavam a casca desta árvore para o

tratamento de febre, o que foi observado pelos conquistadores espanhóis dos séculos XVI e XVII (WHO, 2010). Utiliza-se a quinina também como analgésico e antipirético, no tratamento da babesiose, e distúrbios musculares como câibras nas pernas, devido aos seus efeitos diretos sobre a membrana muscular e os canais de sódio. No tratamento da malária é administrada por via parenteral para tratar parasitas resistentes à cloroquina, atua como esquizotocida sanguíneo contra *Plasmodium falciparum* e possui ação gametocitocida contra *Plasmodium vivax* e *Plasmodium malariae*. Sendo uma base fraca, concentra-se nos vacúolos alimentares do parasita, onde interfere na desintoxicação de grupamentos heme, provocando o acúmulo desta substância que é tóxica para o patógeno. Tem massa molar média de 324,4168 Da e fórmula molecular $C_{20}H_{24}N_2O_2$, ponto de fusão de 57 °C, solubilidade em água de 500 mg/L, logP de 3,44 e logS igual a -2,76. Sua absorção no organismo ocorre numa faixa de 76 a 88%, cerca de 80% da quinina administrada é metabolizada no fígado para hidroxiquinina, o restante é excretado na urina sem sofrer modificações, possui meia vida de aproximadamente 18 horas. Como efeito tóxico, a quinina pode induzir a trombocitopenia, uma diminuição no número de plaquetas no sangue, causada pela indução da produção de anticorpos contra o complexo glicoproteína(GP) Ib-IX, ou mais raramente, contra o complexo plaqueta-glicoproteína GPIIb-IIIa (LAW et al., 2014).

Figura 03 – fármaco quinina.



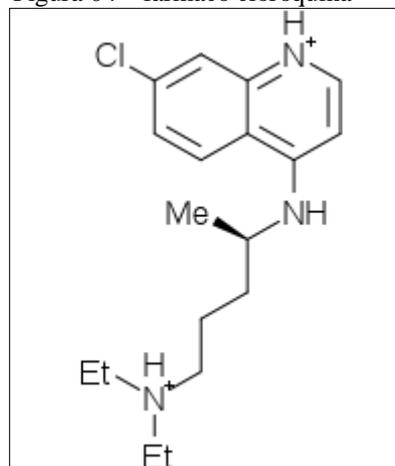
Fonte: do autor.

4.3.2 Cloroquina

A cloroquina pertence ao grupo de drogas amino-4-quinoleínas, ataca as formas sanguíneas do parasita, além de ser ativa contra gametócitos de *Plasmodium vivax*. É usado

no tratamento supressivo de ataques agudos ocasionados por *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale*, e também para formas susceptíveis de *Plasmodium falciparum*. É utilizada também no tratamento da artrite reumatoide (agente de segunda linha), lúpus eritematoso sistêmico e na terapia sistêmica de abscessos amebianos do fígado. É uma molécula alcalina que se acumula no vacúolo digestivo do protozoário, elevando seu pH, sua entrada no vacúolo ocorre por difusão simples, como o pH do vacúolo é ácido (pH 4,7), a cloroquina torna-se protonada, não podendo mais sair por difusão. Ao se nutrir das hemoglobinas presentes nas hemácias, o parasita produz como subproduto grupos heme de porfirina, que são tóxicos e tendem a provocar sua morte, dessa forma, o patógeno possui mecanismos de metabolização que desintoxicam os grupos heme, convertendo-os em um pigmento inerte, a hemozoína, a cloroquina atua ao impedir a desintoxicação de grupos heme ao inibir a enzima heme polimerase (WHO, 2010). Pode também interferir na biossíntese de ácidos nucleicos. Tem peso molecular média de 319,872 Da e fórmula molecular $C_{18}H_{26}ClN_3$. Possui meia vida de 1 a 2 meses, sua excreção ocorre de forma muito lenta, podendo ser aumentada pela acidificação da urina, sua solubilidade em água é de 10,6 mg/L, seu logP é de 4,63 e pKa de 10,1 (LAW et al., 2014).

Figura 04 – fármaco cloroquina



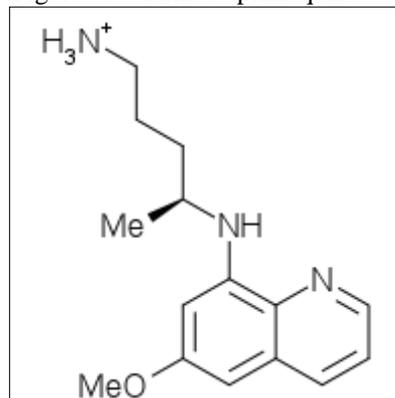
Fonte: do autor.

4.3.3 Primaquina

A primaquina pertence ao grupo de drogas amino-8-quinoleínas, seu efeito ocorre contra esquizontes hepáticos e gametócitos, é dada por via oral para produzir cura radical e

evitar recaídas na malária ocasionada por *Plasmodium vivax* e *Plasmodium ovale* (devido aos hipnozoítas) após o tratamento com um esquizotocida sanguíneo. Possui alta toxicidade, principalmente para pessoas deficientes na produção da enzima glucose-6-fosfato desidrogenase, podendo ocasionar dores abdominais, náusea, vômitos, tonturas e sonolência (WHO, 2010). Seu mecanismo de ação é desconhecido, especula-se que pode atuar através da geração de espécies reativas de oxigênio, ou por interferência com o transporte de elétrons no parasita, ou ainda poder se ligar e alterar as propriedades do DNA do protozoário. Seu peso molecular média é de 259,3467 Da, com fórmula química $C_{15}H_{21}N_3O$, sua meia vida é de 3,7 a 7,4 horas, seu ponto de fusão é menor que 25 °C e seu ponto de ebulição é de 177 °C a 2.00E-01 mm Hg, o logP é de 2,1 (LAW et al., 2014).

Figura 05 – fármaco primaquina



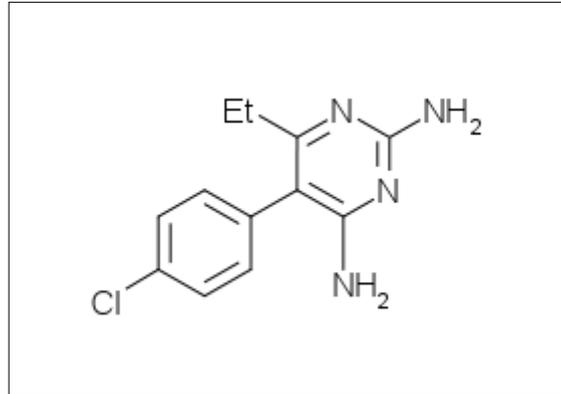
Fonte: do autor.

4.3.4 Pirimetamina

A pirimetamina pertence ao grupo das pirimidinas, é utilizada em combinação com drogas como a sulfadoxina, possui ação esquizotocida tissular e esporontocida, interferindo na síntese de purinas e pirimidinas ao inibir a enzima dihidrofolato redutase, possui baixa toxicidade (WHO, 2010). A pirimetamina atua contra a via do ácido fólico, é usada juntamente com a sulfonamida ou outro fármaco relacionado. É utilizada também para combater a toxoplasmose. Seu peso molecular médio é de 248.711 Da, tendo a fórmula química $C_{12}H_{13}ClN_4$. É um esquizotocida sanguíneo. A pirimetamina inibe a enzima dihidrofolato redutase, bloqueando desta forma a biossíntese de purinas e pirimidinas, essenciais para a síntese de DNA e multiplicação celular. O resultado é o fracasso da divisão

celular quando o esquizonte se forma no eritrócito ou no fígado. Sua meia vida é de 96 horas. Seu ponto de fusão é de 233,5 °C, sua solubilidade em água é de 121 mg/L, logP de 2,69 e pKa de 7,34 a 20 °C (LAW et al., 2014).

Figura 06 – fármaco pirimetamina.

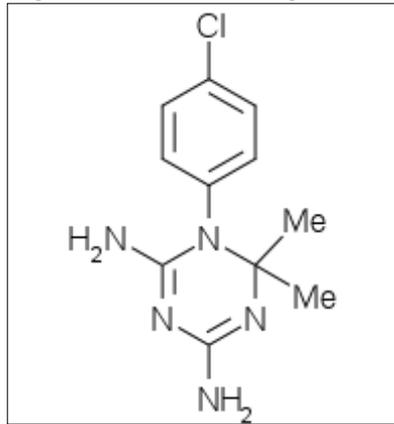


Fonte: do autor.

4.3.5 Cicloguanil

O cicloguanil é administrado como pró-fármaco, o proguanil, metabolizado pela enzima polimórfica CYP2C19 do citocromo P450, atua de forma semelhante à pirimetamina ao inibir a enzima dihidrofolato redutase, seu predecessor possui baixa atividade antimalarial por meio de um mecanismo desconhecido. Apresenta poucos efeitos colaterais, como intolerância gástrica e diarreia. Possui peso molecular médio de 253,731 Da e fórmula molecular $C_{11}H_{16}ClN_5$, seu tempo de meia vida é de aproximadamente 20 horas, possui ponto de fusão de 129 °C, solubilidade em água de 156 mg/L e logP de 2,53 (LAW et al., 2014).

Figura 07 – fármaco cicloguanil.

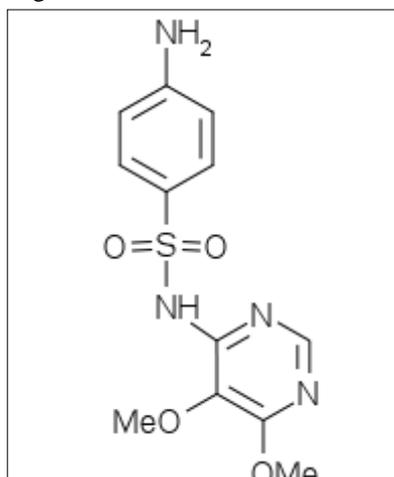


Fonte: do autor.

4.3.6 Sulfadoxina

A sulfadoxina atua interferindo com a síntese do ácido fólico, por ser muito similar ao seu predecessor, o ácido paraminobenzóico, competindo com este na ligação à enzima dihidropteroato sintase, sendo o ácido fólico vital para a síntese, reparo e metilação do DNA, vital para o crescimento celular, a falta deste metabólito faz com que o parasita tenha dificuldades em se reproduzir. Deve ser utilizada juntamente com outro antimalárico, potencializando sua ação. Devido á sua lenta eliminação no organismo, podem ocorrer reações alérgicas e quadros de náuseas, vômitos, anorexia e diarreia (WHO, 2010). Seu peso molar médio é de 310,329 Da, sua fórmula molecular é $C_{12}H_{14}N_4O_4S$. Seu ponto de fusão é de 190 a 194 °C e o logP de 0,70 (LAW et al., 2014).

Figura 08 – fármaco sulfadoxina.

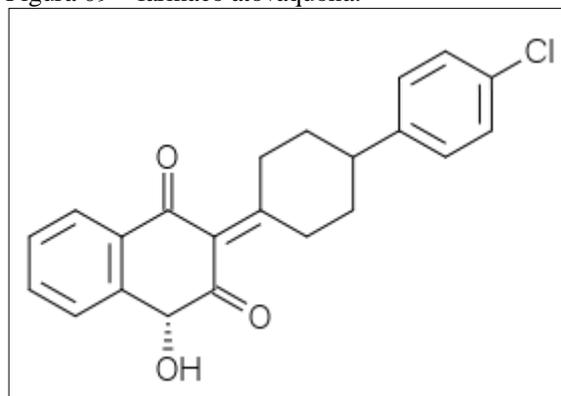


Fonte: do autor.

4.3.7 Atovaquona

A atovaquona é uma hidroxinaftoquinona usada em combinação com o proguanil, tendo nome comercial Malarone. É uma droga sintética resultante de pesquisas iniciadas a partir da Segunda Guerra Mundial, quando, devido ao conflito, ocorreu a falta de fornecimento do fármaco quinino. É análoga ao ubiquinol, uma coenzima participante da cadeia respiratória no interior das mitocôndrias, responsável pelo transporte de elétrons. Sendo um fármaco competitivo, liga-se ao sítio de oxidação do quinol, prejudicando a atividade mitocondrial. Como consequência, a mitocôndria não produz suficiente concentração de orotato, um metabólito necessário na biossíntese de pirimidinas (NIXON et. al., 2013). Possui peso molecular médio de 366,837 Da e fórmula molecular $C_{22}H_{19}ClO_3$. Também é usado no tratamento da pneumonia causada por *Pneumocystis carinii* quando o paciente é intolerante ao trimetoprim-sulfametoxazola. Seu volume de distribuição é de $0,60 \pm 0,17$ L/kg, meia vida e 2,2 a 3,2 dias, é praticamente insolúvel em água e possui logP de 5,8 (LAW et al., 2014).

Figura 09 – fármaco atovaquona.



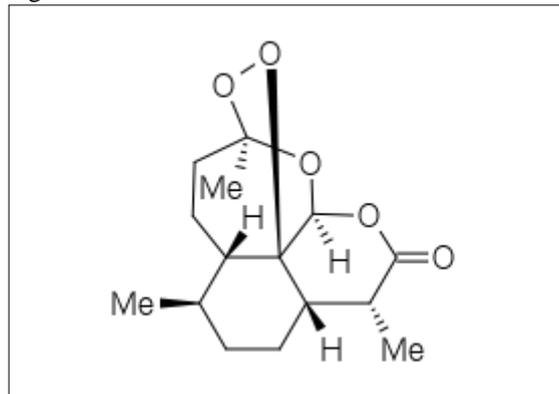
Fonte: do autor.

4.3.8 Artemisina

A artemisina é uma lactona sesquiterpênica possuindo um grupo 1,2,4 trioxano, extraída das folhas de plantas da espécie *Artemisia annua*, um vegetal usado na medicina popular da China a muitos séculos para o tratamento de febre. Atualmente é o tratamento de

primeira-linha recomendado pela Organização Mundial da Saúde nos casos em que é comprovada a resistência aos demais fármacos. É ativa contra praticamente todos os estágios de desenvolvimento do parasita. O mecanismo de ação não é bem esclarecido, existindo pelo menos três hipóteses, a primeira seria a inibição da enzima cálcio adenosina trifosfatase (PfATPase 6), outro mecanismo proposto é a sua decomposição em radicais livres na mitocôndria do parasita, provocando danos não específicos, ou poderia atuar interferindo a desintoxicação de grupos heme, também com a formação de radicais livres. A artemisina não se solubiliza bem em água nem em óleo, tornando difícil sua administração, além disso, possui curto período de meia-vida, de aproximadamente 1 hora. Moléculas derivadas da artemisina, mais potentes, incluem artemeter, artemotil e artesunato. É um fármaco seguro e bem tolerado pelo organismo (LI; ZHOU, 2010). Seu peso molecular médio é de 282,336 Da e sua fórmula química é $C_{15}H_{22}O_5$, seu ponto de fusão é de 150 a 152 °C, solubilidade em água de 0,52 g/L a 20 °C (LAW et al., 2014).

Figura 10 – fármaco artemisina.



Fonte: do autor.

4.4 RESISTÊNCIA A FÁRMACOS

Embora existam antimaláricos eficientes no tratamento da doença, essa eficácia pode ser diminuída e o antimalárico pode se tornar até mesmo ineficaz devido ao surgimento de parasitas resistentes ao fármaco (MONTROYA, 2005), resultando em um problema de saúde pública ao dificultar o controle da doença. A resistência é identificada quando o patógeno é capaz de sobreviver e se multiplicar no hospedeiro apesar da administração do fármaco (WHO, 2010). A resistência pode ocorrer devido a mutações no DNA, cuja proteína resultante

possui o sítio de ligação ao fármaco alterado, já não podendo mais ser inibida pelo mesmo (MONTROYA, 2005). Pode ocorrer também que o patógeno evite a acumulação da droga em sua célula, bombeando a droga para fora da membrana celular (CAMMACK, 2011).

A resistência à cloroquina está relacionada com mutações no gene PfCRT (FIDOCK et. al., 2000). Esse gene codifica para uma proteína transmembrana localizada no vacúolo digestivo do parasita. A comparação entre diferentes alelos de plasmócitos coletados do Velho Mundo revelou 8 variações que ocorrem próximo ou dentro das regiões transmembrana, incluindo mudanças de carga e hidrofobicidade (NEVES, 2005). Mutações K76T e A220S estão presentes em todos os plasmócitos resistentes à cloroquina encontradas no Velho e Novo Mundo. Foi localizada também uma mutação S163R em PfCRT capaz de conferir resistência à amantadina e halofantrina (JOHNSON et. al., 2004).

Foi identificado em um indivíduo francês que voltava de viagem do Senegal e que havia contraído malária plasmócitos resistentes ao tratamento com quinina. Foi detectado a mutação K76T no gene PfCRT e duas repetições DNNND e DDDNHNDNHNN no microsatélite ms4760. O tratamento com artemeter controlou a infecção (PRADINES et. al., 2010).

A mutação D1246Y na proteína codificada pelo gene *pfmdr1* foi associada com a falha no tratamento com piperaquina-dihidroartemisinina em estudo com crianças infectadas em Papua Nova Guiné (WONG et. al., 2011). Nesse mesmo estudo verificou-se que 93% dos isolados de *Plasmodium falciparum* possuíam o haplótipo YYSND do gene *pfmdr1*, associado com a resistência a cloroquina.

Mutações nos genes *pfdhfr*, codificante da enzima dihidrofolato redutase, e *pfdhps*, codificante de dihidropteroato sintase são responsáveis pela resistência à sulfadoxina e pirimetamina (MU et. al., 2010). As mutações em dihidrofolato redutase incluem substituições S108N, N51I e C59R (COWMAN et. al., 1988). Quando juntamente com a mutação S108N encontra-se mutações I164L, C59R e/ou N51I verifica-se resistência à pirimetamina e cicloguanil (MHARAKURWA et. al., 2011).

Duas mutações no citocromo b de *Plasmodium falciparum* estão relacionadas com a resistência à atovaquona, ambas no mesmo resíduo de aminoácido, a primeira e mais comum sendo Y268S e a menos frequente Y268N. O resíduo Y268 está presente no sítio de oxidação do quinol, local onde se liga o ubiquinol. Plasmócitos mutantes apresentam IC₅₀ (concentração de fármaco necessária para matar metade dos parasitas) cerca de 1000 vezes maior que plasmócitos sensíveis, entretanto, há consequências negativas para o patógeno, com redução de aproximadamente 40% de eficiência do complexo bc1. Estudos de expressão

genética tem demonstrado que plasmócitos resistentes possuem altos níveis de expressão de genes do complexo bc1 e citocromo c oxidase quando comparados com plasmócitos sensíveis, sugerindo que esse aumento da expressão gênica possa compensar a menor atividade do complexo bc1 mutado (FISHER et. al., 2012).

A emergência de resistência à artemisinina foi registrada no Camboja e na Tailândia. O surgimento dessa resistência é explicado em parte devido à monoterapia prolongada, com duração de mais de 30 anos, na qual apenas um antimalárico, artemisinina, foi utilizado em doses subterapêuticas, favorecendo o surgimento e a proliferação de plasmócitos resistentes (WHITE; OLLIARO, 1996).

4.5 ENZIMA DIHIDROFOLATO REDUTASE – TIMIDILATO SINTASE

Enquanto muitos organismos possuem as enzimas diidrofolato (DHFR) redutase e timidilato sintase como moléculas independentes e separadas, *Plasmodium falciparum* e as demais espécies de *Plasmodium* possuem essas moléculas unidas formando uma única estrutura bifuncional, na forma de dímeros (CHAIANANTAKUL; SIRAWARAPORN; SIRAWARAPORN, 2013). O gene responsável por sua codificação encontra-se no cromossomo 4. A região N-terminal, compreendendo 231 resíduos de aminoácidos, corresponde ao domínio DHFR, a região C-terminal, com 288 resíduos, forma o domínio timidilato sintase, esses domínios são unidos por uma região de junção composta por 89 resíduos (BZIK et. al., 1987). DHFR é responsável pela conversão de diidrofolato para tetraidrofolato usando NADPH, por meio da reação enzimática:



enquanto timidilato sintase cataliza a reação:



Essas reações fazem parte da via do ácido fólico, um importante precursor da via de síntese de purinas e alguns aminoácidos. Dentre os alvos moleculares reconhecidos de *Plasmodium falciparum*, apenas DHFR possui estrutura cristalográfica resolvida depositada

no PDB (Protein Data Bank). Pirimetamina e cicloguanil são fármacos que atuam inibindo a enzima DHFR. Mutações do tipo S108N, N51I, C59R e I164L estão relacionadas com a resistência a pirimetamina e mutações S108T e A16V promovem resistência ao cicloguanil (MHARAKURWA et. al., 2011). Pesquisas tem sido feitas a procura de novas moléculas com potencial de inibir as enzimas mutadas, tais como as moléculas WR99210 (YUVANIYAMA et. al., 2003) , RJF670 e RJF01302 (DASGUPTA et. al., 2009). Além da busca por fármacos para o domínio DHFR, há investigadores que sustentam a possibilidade de se buscar fármacos não competitivos capazes de interagir com a região de junção, cuja importância para o correto funcionamento da enzima foi analisada por Chaianantakul e colaboradores, em um experimento no qual foram construídas enzimas mutantes em que a região de junção era gradativamente reduzida em números de resíduos; constatou-se que na medida em que seu tamanho se reduzia, a atividade do domínio TS também diminuía e que um comprimento mínimo de 44 aminoácidos da região de junção eram necessários para que o domínio TS apresentasse atividade catalítica. Os autores sugeriram então que a região de junção poderia ser alvo de fármacos não competitivos (CHAIANANTAKUL; SIRAWARAPORN; SIRAWARAPORN, 2013). Em um estudo de *virtual screening*, usando como biblioteca química a "Maybridge HitFinderTM library", visou-se moléculas que interagissem com a região de junção, próximo ao domínio TS. Duas das moléculas com melhor score (RJF01302 e RJF00670) foram cristalizadas junto com a enzima DHFR-TS tipo selvagem e o mutante quádruplo N51I/C59R/S108N/I164L, respectivamente. Curiosamente, essas moléculas foram localizadas interagindo com o sítio ativo do domínio DHFR e não com a região de junção conforme era esperado (DASGUPTA et. al., 2009). A figura 11 apresenta o alinhamento entre as sequências primárias da enzima DHFR tipo selvagem e as mutantes N51I/C59R/S108N/I164L e A16V/S108T.

Figura 11 – Alinhamento entre as sequências primárias da enzima diidrofolato redutase tipo selvagem e mutantes.

selvagem	MMEQVCDVFDIYAICACCKVESKNEGKKNEVFNNYTFRGLGNKGVLPWKC	50
A16V/§108T	MMEQVCDVFDIYAICVCKVESKNEGKKNEVFNNYTFRGLGNKGVLPWKC	50
N51I/C59R/S108N/I164L	MMEQVCDVFDIYAICACCKVESKNEGKKNEVFNNYTFRGLGNKGVLPWKC	50

selvagem	NSLDMKYFCAVTTYVNESKYEKLYKRCKYLNKETVDNVNDMPNSKKLQN	100
A16V/§108T	NSLDMKYFCAVTTYVNESKYEKLYKRCKYLNKETVDNVNDMPNSKKLQN	100
N51I/C59R/S108N/I164L	ISLDMKYFRAVTTYVNESKYEKLYKRCKYLNKETVDNVNDMPNSKKLQN	100

selvagem	VVVMGRITNESIPKKFKPLSNRINVILSRTLKKEFDDEDVYIINKVEDLI	150
A16V/§108T	VVVMGRITNESIPKKFKPLSNRINVILSRTLKKEFDDEDVYIINKVEDLI	150
N51I/C59R/S108N/I164L	VVVMGRINNESIPKKFKPLSNRINVILSRTLKKEFDDEDVYIINKVEDLI	150

selvagem	VLLGKLNYYKCFIIGGSVVYQEFLEKKLIKKIYFTRINSTYECDVFFPEI	200
A16V/§108T	VLLGKLNYYKCFIIGGSVVYQEFLEKKLIKKIYFTRINSTYECDVFFPEI	200
N51I/C59R/S108N/I164L	VLLGKLNYYKCFILGGSVVYQEFLEKKLIKKIYFTRINSTYECDVFFPEI	200

Fonte: do autor

Nota: mutantes do tipo N51I/C59R/S108N/I164L e A16V/S108T de *Plasmodium falciparum*. Alinhamento realizado pelo programa clustalW.

4.6 DOCKING MOLECULAR

Docking molecular é um método computacional que simula a interação entre duas moléculas, geralmente uma proteína, chamada receptor, e uma pequena molécula, chamada ligante, onde se faz a predição da melhor orientação entre as mesmas e se calcula a energia de ligação. *Virtual screening* é uma técnica computacional que utiliza o *docking* para avaliar a afinidade de ligação de um receptor contra uma biblioteca de compostos químicos, a fim de selecionar aqueles com melhor interação para futuros estudos experimentais, auxiliando na pesquisa por novos fármacos (MUKESH; RAKESH, 2011).

Existem três diferentes abordagens para se realizar um *docking*: 1º) *docking* rígido-rígido, no qual tanto ligante quanto receptor são considerados como estruturas rígidas, sem liberdade para sofrer torções em seus ângulos de ligação; 2º) *docking* rígido-flexível, em que o ligante possui flexibilidade, enquanto o receptor permanece rígido; 3º) *docking* flexível-flexível, quando ambos receptor e ligante podem sofrer torções em sua conformação. A primeira abordagem tem a vantagem de ser a mais rápida, permitindo a docagem de uma grande biblioteca de compostos químicos em reduzido espaço de tempo, entretanto seus resultados são apenas aproximados, visto que na realidade tanto receptor como ligante

possuem flexibilidade e se ajustam um ao outro no momento da interação. A terceira abordagem apresenta os resultados mais precisos, por representar mais fielmente o mundo real, entretanto o custo computacional para sua implementação é elevado e o tempo gasto para calcular uma única interação pode se tornar impraticável. A segunda abordagem, que procura fazer um balanceamento entre qualidade dos resultados e tempo de execução, tende a ser a mais utilizada em pesquisas (MUKESH; RAKESH, 2011).

Idealmente, um software de *docking* testaria todas as configurações possíveis entre um receptor e ligante, retornando aquela de menor energia, entretanto essa abordagem não é viável devido às inúmeras configurações que podem ser geradas, foram desenvolvidos algoritmos para se procurar uma conformação mais favorável dentro de um espaço amostral, entre os quais algoritmos de emparelhamento, construção incremental, Monte Carlo e algoritmos genéticos (MENG et. al., 2011). Após gerar as configurações, é feita uma seleção das melhores por meio de uma função de score, que mede a energia de interação entre receptor e ligante, quanto mais negativo seu valor, melhor será a interação, a função de score é usada também para se escolher qual ligante dentro de uma biblioteca de compostos possui melhor afinidade com determinado receptor. Dentre as funções de score tem-se as funções baseadas em campos de força clássicos, funções empíricas e funções baseadas em conhecimento (MENG et. al., 2011).

AutoDock Vina, ou simplesmente Vina, é um programa de *docking* molecular desenvolvido por Oleg Trott, do Departamento de Biologia Molecular junto ao “Scripps Research Institute”. Escrito em C++, é relacionado com o programa AutoDock 4, desenvolvido no mesmo laboratório, sendo cerca de duas vezes mais rápido que este e mais fácil de se utilizar, por calcular automaticamente os mapas de grid, tarefa feita manualmente com o software anterior (TROTT; OLSON, 2009). Realiza *docking* do tipo rígido-flexível, onde o receptor permanece imóvel e o ligante possui flexibilidade, é possível também definir alguns resíduos de aminoácido do sítio ativo como sendo flexíveis. Utiliza algoritmos genéticos e implementa uma função de score que considera tanto as interações entre receptor e ligante, quanto as interações intramoleculares do ligante, sendo calculadas interações estéricas, interações hidrofóbicas, interações de hidrogênio. É escrita basicamente da seguinte forma:

$$c = \sum_{i < j} f_{t_i t_j}(r_{ij})$$

em que a soma é feita sobre todos os pares de átomos que podem se mover um em relação ao outro. O programa buscará a configuração que minimiza o valor do score c .

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Realizou-se inicialmente um estudo de *redocking* utilizando-se o programa AutoDock Vina, em seguida gerou-se modelos mutantes da enzima dihidrofolato - redutase timidilato sintase de *Plasmodium falciparum* por meio do programa Modeller9.12, esses modelos foram submetidos a *docking* molecular contra os fármacos pirimetamina e cicloguanil, os modelos com os piores scores de ligação foram submetidos a um *virtual screening* contra a biblioteca química NCI **Diversity Set II**, por fim a região de junção de DHFR-TS foi modelada e submetida a *virtual screening* contra a mesma biblioteca química.

5.1 ESTUDOS DE *REDOCKING*

O estudo de *redocking* é utilizado para avaliar se um programa de *docking* é capaz de prever com pequena margem de erro como se dará a interação entre uma proteína e uma pequena molécula. Consiste em se fazer o *docking* entre uma proteína com estrutura resolvida experimentalmente e o ligante cristalizado junto com a mesma. A proteína escolhida para o *redocking* deve ser semelhante com a proteína em estudo ou ser a própria. Para o estudo de *redocking* foram selecionadas 14 estruturas da enzima DHFR-TS de *Plasmodium falciparum* obtidas do PDB (Protein Data Bank): 5 estruturas correspondem a enzima tipo selvagem (códigos PDB: 1J3I, 3DGA, 3QGT, 3UM8, 4DPD), 6 ao mutante N51I/C59R/S108N/I164L (códigos PDB: 1J3K, 3DG8, 3JSU, 3QG2, 4DP3, 4DPH), 2 ao mutante A16V/S108T (códigos PDB: 3UM5, 3UM6), e uma ao mutante C59R/S108N (código PDB: 1J3J), sendo uma complexada ao substrato natural (4DPD), 4 ao fármaco pirimetamina (1J3J, 3QG2, 3QGT, 3UM5), 2 ao fármaco cicloguanil (3UM6, 3UM8) e 7 a fármacos experimentais (1J3I, 1J3K, 3DG8, 3DGA, 3JSU, 4DP3, 4DPH). A primeira etapa no *redocking* é separar as coordenadas da proteína e do ligante em dois arquivos distintos, o que pode ser feito utilizando-se o programa grep do sistema LINUX. As coordenadas do ligante são obtidas com o seguinte comando:

```
$ grep -P "^HETATM.{11}$ligante $cadeia" 1J3K.pdb > ligante.pdb
```

Nota: Os destaques em fundo preto e fonte branca representam comandos efetuados no terminal virtual de um computador com sistema operacional LINUX.

O programa `grep` lê um arquivo e retorna as linhas que correspondam à expressão regular fornecida entre aspas, a opção `-P` indica que a expressão regular é compatível com a linguagem `perl`, a expressão regular `“^HETATM.{11}$ligante $cadeia”` indica que se deseja linhas que começam com a tag `HETATM` (tag que contém as coordenadas do ligante), `$ligante` é o identificador do ligante de interesse (para distinguí-lo de outros ligantes presentes na estrutura) e `$cadeia` é a cadeia a qual o ligante pertence (para distinguí-lo de ligantes idênticos complexados a outras cadeias), o redirecionamento no final do comando `“> ligante.pdb”` indica que as linhas retornadas serão escritas no arquivo `ligante.pdb` (sem o redirecionamento as linhas são escritas na tela do terminal). Para gerar o arquivo com as coordenadas do receptor basta acrescentar a opção `-v` ao comando anterior, o que irá inverter a busca, será retornado todo o arquivo, com exceção das coordenadas do ligante, e no lugar de `“> ligante.pdb”` coloca-se `“> proteina.pdb”` para que as coordenadas da proteína sem o ligante sejam salvas no arquivo `proteina.pdb`.

```
$ grep -P -v "^HETATM.{11}$ligante $cadeia" 1J3K.pdb > proteina.pdb
```

Para automatizar a separação da proteína e do ligante das 14 estruturas utilizadas, escreveu-se em um arquivo de texto o código `pdb`, o identificador do ligante e a cadeia a qual o ligante pertence de cada estrutura, uma estrutura por linha, conforme quadro 1:

Quadro 1 – *Input* para *script* de separação entre estruturas de receptor e ligante de um arquivo `pdb`.

1J3I	WRA	A
1J3J	CP6	A
1J3K	WRA	A
3DG8	RJ6	A
3DGA	RJ1	A
3JSU	KA5	A
3QG2	CP6	A
3QGT	CP6	A
3UM5	CP6	A
3UM6	1CY	A
3UM8	1CY	A
4DP3	MMV	A
4DPD	DHF	A
4DPH	P65	A

Fonte: do autor

Nota: A primeira coluna corresponde ao código `pdb`, a segunda ao ligante que será separado e a terceira é a cadeia a qual o ligante pertence.

Utilizou-se um *shellscript* para fazer a leitura do arquivo acima e separar as estruturas, sendo cada uma armazenada em diretório próprio para melhor organização, de

acordo com *script* seguinte:

Quadro 2 – *Shellscript* utilizado para separar as estruturas de receptor e ligante de arquivos pdb.

```
while read linha
do
  proteina=$(echo $linha | cut -f 1 -d " ")
  ligante=$(echo $linha | cut -f 2 -d " ")
  cadeia=$(echo $linha | cut -f 3 -d " ")
  mkdir $proteina
  grep -P -v "^HETATM.{11}$ligante $cadeia" ${proteina}.pdb > ${proteina}/proteina.pdb
  grep -P "^HETATM.{11}$ligante $cadeia" ${proteina}.pdb > ${proteina}/ligante.pdb
done < $lista
```

Fonte: do autor

A próxima etapa é preparar a proteína para o *docking*, adicionando-se átomos de hidrogênio, corrigindo ordens de ligação, corrigindo cargas elétricas dos átomos. A preparação é feita utilizando-se o *script* `prepare_receptor4.py` pertencente à suíte de programas MGLTools. A saída é um arquivo `pdbqt`, uma extensão do arquivo `pdb`, contendo a carga (Q) e o tipo do átomo (T). Scripts pertencentes ao MGLTools são chamados com o programa `pythonsh`, o qual irá setar as variáveis de ambiente necessárias para o correto funcionamento dos scripts.

```
$ pythonsh prepare_receptor4.py -r proteina.pdb -A bonds_hydrogens
```

De forma similar prepara-se o ligante com o *script* `prepare_ligand4.py`, onde são adicionados átomos de hidrogênio e definidas quais ligações químicas terão liberdade de rotação, a saída também é um arquivo `pdbqt`.

```
$ pythonsh prepare_ligand4.py -l ligante.pdb -A bonds_hydrogens
```

O *script* `prepare_ligand4.py` não foi capaz de preparar corretamente todos os ligantes (alguns átomos não eram escritos para o arquivo de saída), devido provavelmente ao alto grau de torção verificado nos ligantes extraídos da estrutura `pdb`. Utilizou-se então o programa `obabel` para relaxação da estrutura, com a opção `--gen3D` (gerar novas coordenadas espaciais) e `-d` (omitir átomos de hidrogênio), após a qual o ligante pode ser convertido para `pdbqt` corretamente.

```
$ obabel -ipdb ligante.pdb -O ligante2.pdb --gen3d -d
```

Em um estudo de *redocking* é preciso antes alterar a conformação do ligante para

evitar tendenciosidades, uma vez que a tarefa de procura da melhor conformação realizada pelo software seria inadvertidamente facilitada, já que o ligante se encontraria na conformação de melhor energia antes mesmo de se rodar o *docking*. Embora a estrutura do ligante já tenha sido relaxada com o programa obabel, optou-se por se fazer nova alteração da conformação utilizando-se o *script* `write_random_state.py`.

```
$ pythonsh write_random_state_ligand.py -l ligante2.pdbqt
```

O *docking* é realizado sobre um espaço de procura, ou gridbox, uma caixa imaginária, geralmente envolvendo o sítio ativo da proteína, dentro da qual o software procura ancorar o ligante em uma posição e conformação que resulte em menor energia de ligação entre receptor e ligante. A construção do espaço de procura seguiu o método utilizado por Trott e Olson, 2009, quando estes realizaram estudos de *redocking* para validar o programa AutoDock Vina nas etapas finais do seu desenvolvimento. Primeiro se constrói um paralelepípedo mínimo capaz de envolver todo o ligante (utiliza-se o ligante originalmente encontrado na estrutura pdb, sem mudanças conformacionais), em cada um dos eixos ortogonais x, y e z se acrescenta 10 Å uniformemente à caixa, para cada um dos eixos se escolhe aleatoriamente um de seus sentidos e se adiciona mais 5 Å, por fim, se o comprimento em qualquer eixo for inferior a 22,5 Å, o mesmo é ampliado uniformemente até atingir esse valor. O acréscimo aleatório de 5 Å em uma das extremidades de cada eixo tem por finalidade deslocar o centro da caixa que se localiza no centro de massa do ligante, evitando-se “ajudar” o software na procura da configuração de menor energia. Seis parâmetros definem o espaço de procura utilizado pelo Vina: o centro em x (`center_x`) e os correspondentes em y e z, o comprimento da caixa na direção x (`size_x`) e os correspondentes nas direções y e z. Utilizou-se um *script* em perl para calcular esses parâmetros, conforme quadro n. O script faz a leitura das coordenadas x, y e z de todos os átomos do ligante, a maior coordenada encontrada para o eixo x é salva na variável `x_max` e a menor na variável `x_min`. O comprimento da caixa é calculado então da seguinte forma:

$$\text{size}_x = (\text{x_max} - \text{x_min}) + 15$$

O valor 15 corresponde ao acréscimo de 10 Å uniformemente mais os 5 Å em apenas uma extremidade da caixa.

O centro em x é calculado pela equação:

$$\text{center}_x = \frac{(\text{x_max} + \text{x_min})}{2} + dx$$

em que dx é um número aleatório que pode assumir dois valores: 2.5 ou -2.5,

referentes ao deslocamento do centro da caixa. Escreveu-se um *script* em perl para realizar essa tarefa, rodando-se o seguinte comando:

```
$ perl config.pl 1J3K.pdb
```

A saída do programa é o arquivo config.txt, que além de ter os parâmetros do espaço de procura, possui também os demais parâmetros requeridos pelo Vina (nome dos arquivos de receptor e ligante, e nome dos arquivos de saída), o programa Vina é então chamado por meio do comando:

```
$ Vina --config config.txt
```

Por *default* são impressos as 9 melhores conformações encontradas, todas em um único arquivo. O programa Vina_split é usado para separar as configurações em arquivos individuais:

```
$ Vina_split --input conformacoes.pdbqt --ligand lig
```

Tendo-se concluído o *docking*, as conformações encontradas são comparadas com a conformação original do ligante da estrutura pdb por meio de um cálculo de RMSD, feito pelo *script* compute_rms_between_conformations.py da suíte de programas MGLTools. Considera-se que o *redocking* foi bem sucedido quando se tem valores de RMSD abaixo de 2 Å.

```
$ pythonsh compute_rms_between_conformations.py -f ligante.pdb -s 1J3K.pdb -x -o rms_1J3K.txt
```

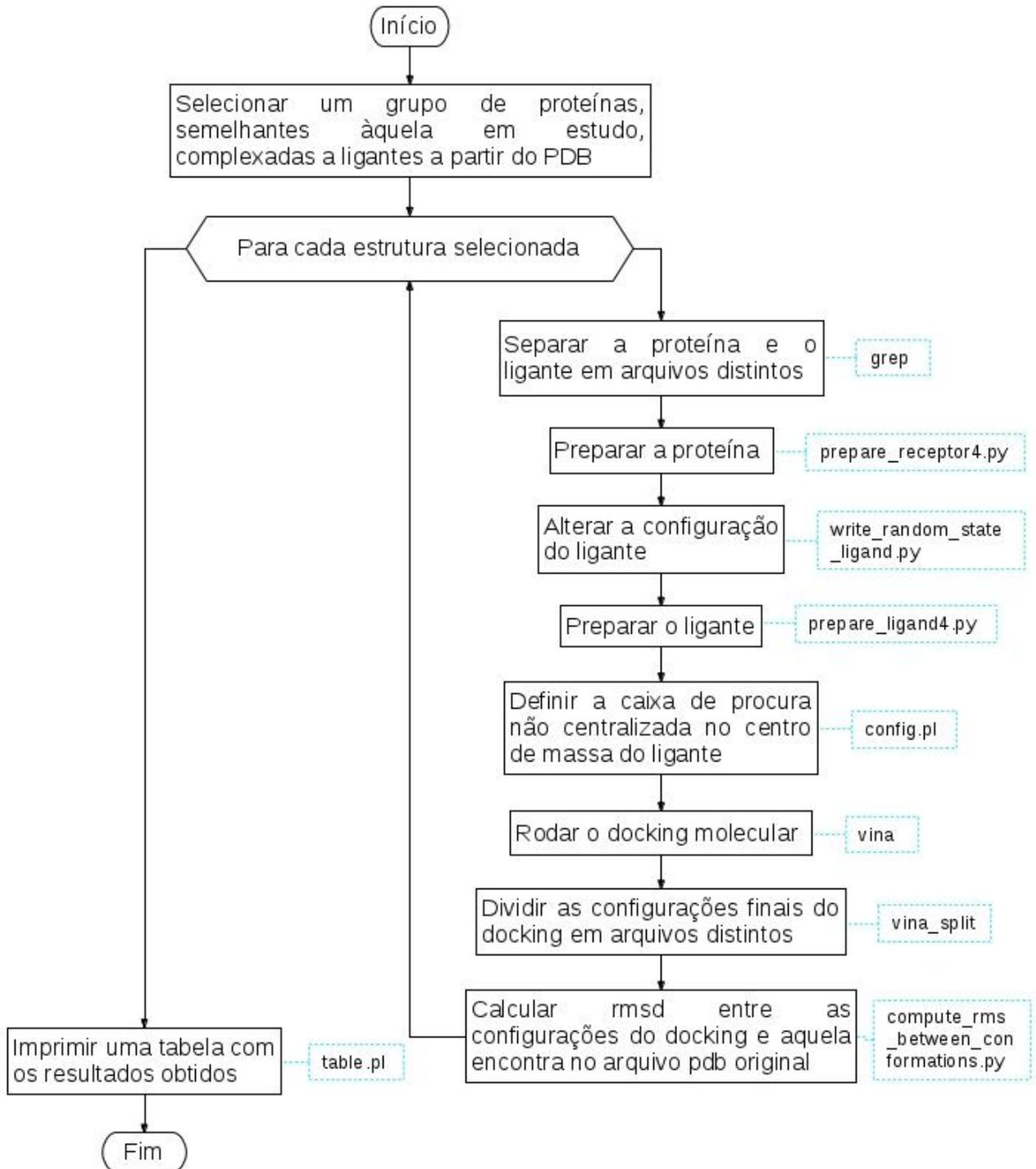
O quadro 3 apresenta o *shellscript* completo utilizado para se fazer o *redocking* e o fluxograma 1 mostra de forma esquemática como se fazer um estudo de *redocking* com o programa Vina.

Quadro 3 – *Shellscript* utilizado para realizar estudo de *redocking* com o programa AutoDock Vina.

```
#!/bin/bash
# redocking.sh - realizar um estudo de redocking utilizando o programa AutoDock Vina

py="/usr/local/bin/pythonsh" # diretório onde está o script pythonsh
dir="/usr/local/MGLToolsPckgs/AutoDockTools/Utilities24" # diretório onde estão os scripts
da suite de programas MGLTools
lista="lista.txt" # arquivo listando os códigos das estruturas pdb e seus respectivos ligantes
while read linha
do
    proteina=$(echo $linha | cut -f 1 -d " ") # código da estrutura pdb
    ligante=$(echo $linha | cut -f 2 -d " ") # código do ligante presente na estrutura
    cadeia=$(echo $linha | cut -f 3 -d " ") # cadeia onde o ligante se encontra
    mkdir $proteina # criar um diretório próprio para cada estrutura
    grep -P -v "^HETATM.{11}$ligante $cadeia" ${proteina}.pdb >
    ${proteina}/proteina.pdb # criar um arquivo separado para a proteína sem o ligante
    grep -P "^HETATM.{11}$ligante $cadeia" ${proteina}.pdb >
    ${proteina}/ligante.pdb # criar um arquivo separado apenas para o ligante
    cd $proteina # entrar no diretório de cada estrutura específica
    $py ${dir}/prepare_receptor4.py -r proteina.pdb -A bonds_hydrogens # preparar a
    proteína
    obabel -ipdb ligante.pdb -O ligante2.pdb --gen3d -d # melhorar a estrutura do
    ligante usando o programa obabel
    $py ${dir}/prepare_ligand4.py -l ligante2.pdb -A bonds_hydrogens # preparar o
    ligante
    $py ${dir}/write_random_state_ligand.py -l ligante2.pdbqt # alterar a conformação
    do ligante
    perl ../config.pl ligante.pdb # gerar o espaço de procura (gridbox) por meio de script
    em perl baseado no método utilizado por Trott e Olson, 2009
    Vina --config config.txt # rodar o programa Vina (todos os parâmetros necessários
    foram escritos no arquivo config.txt gerado pelo script config.pl anteriormente)
    Vina_split --input conformacoes.pdbqt --ligand lig # dividir as diferentes
    conformações geradas em arquivos separados
    for ligconf in $(ls lig?.pdbqt) # operações para calcular o rms entre o ligante do pdb
    e as conformações geradas no docking
    do
        $py ${dir}/pdbqt_to_pdb.py -f $ligconf # converter o ligante para pdb
        pdb=$(basename $ligconf .pdbqt) # raiz dos nomes dos arquivos de saída
        grep "^HETATM" ${pdb}.pdb > temp.pdb # remover os hidrogênios
        rm -f ${pdb}.pdb
        mv temp.pdb ${pdb}.pdb
        $py ${dir}/compute_rms_between_conformations.py -f ligante.pdb -s
        ${pdb}.pdb -x -o rms_${pdb}.txt # calcular o rmsd
    done
    cd .. # voltar para o diretório acima
done < $lista
exit
```

Fonte: do autor

Fluxograma 1 – Estudo de *redocking* feito com o programa AutoDock Vina.

5.2 MUTAÇÃO SÍTIO-DIRIGIDA NA ENZIMA DHFR-TS TIPO SELVAGEM E MUTANTE N51I/C59R/S108N DE *Plasmodium falciparum*

A modelagem por homologia é utilizada quando se deseja saber a estrutura tridimensional de uma proteína que não foi resolvida por métodos experimentais, como cristalografia de raios-X ou NMR. Baseia-se no fato de que se duas proteínas possuem sequência primária similar, a estrutura tridimensional também será semelhante, dessa forma, pode-se construir um modelo para uma proteína com estrutura 3D não resolvida experimentalmente, tendo-se como referência uma homóloga com estrutura 3D conhecida. Quatro passos são seguidos na modelagem por homologia: 1º) é feita a procura de pelo menos uma proteína que seja homóloga àquela que se deseja modelar por meio de uma varredura em banco de dados de estruturas proteicas; 2º) faz-se o alinhamento entre a sequência alvo e o template selecionado; 3º) constrói-se o modelo baseado nas coordenadas do template; 4º) avalia-se a qualidade estereoquímica do modelo, e se esta for insatisfatória, constrói-se novo modelo (ESWAR et. al., 2003). Modeller9.12 é um programa de computador, escrito por Andrej Šali, utilizado para modelar estruturas tridimensionais de proteínas por satisfação de restrições espaciais (ŠALI, 1993). Requer como entrada um arquivo de alinhamento de sequências entre a proteína a ser modelada e seus *templates*, sendo estas proteínas homólogas, além da estrutura tridimensional dos *templates*, a saída é a estrutura 3D otimizada de acordo com as restrições implementadas. O programa roda unicamente por scripts, não havendo interface gráfica.

Utilizou-se o Modeller9.12 para gerar mutações sítio dirigidas na enzima DHFR tipo selvagem de *Plasmodium falciparum*. Na página web do programa Modeller9.12 encontra-se um *script* escrito em python que permite gerar uma proteína mutante com mutação por substituição de uma forma mais aprimorada, otimizando a cadeia mutada por gradiente conjugado e refinando o resultado com dinâmica molecular. Este *script*, denominado `mutate_model.py`, recebe como entrada um arquivo `pdb`, a posição do aminoácido que se deseja mutar, qual o tipo de resíduo que será colocado nessa posição e em qual cadeia a mutação ocorrerá. Como exemplo, para realizar a mutação da enzima DHFR tipo selvagem salva no arquivo `dhfr.pdb`, na posição 108 da cadeia A, substituindo a serina original por uma treonina, roda-se da seguinte forma:

```
$ python mutate_model.py dhfr 108 THR A > result.log
```

Não é necessário colocar a extensão `.pdb` e o redirecionamento `> result.log` imprime informações de execução do programa no arquivo correspondente. Utilizou-se a estrutura `pdb 3QGT` como template, sendo esta a enzima tipo selvagem que possui a menor resolução (2.30 Å).

Uma vez que as mutações que provocam resistência ocorrem nos resíduos de aminoácido do sítio ativo da enzima, estes foram selecionados para sofrer mutação. Escreveu-se um *script* em python, denominado `sitio.py`, utilizando as funções do programa Modeller9.12 para selecionar os resíduos:

```
$ python sitio.py
```

Inicialmente o *script* lê o arquivo `pdb` e armazena suas coordenadas na variável 'modelo' por meio da classe `model`, cria-se uma nova variável 'hetero' com a classe `selection` contendo apenas as coordenadas do ligante presente no sítio ativo da enzima; utilizando a função `'select_sphere'` são selecionados os resíduos de aminoácido a uma distância de até 6.8 Å do ligante, o valor de distância foi testado para que fosse a menor distância capaz de englobar os resíduos das posições 16, 51, 59, 108 e 164, onde ocorrem mutações já relatadas pela literatura; as posições dos resíduos dentro da distância estabelecida são salvas em arquivo `log`, podendo ser utilizada pelos programas seguintes. O quadro 4 apresenta o *script* utilizado.

Quadro 4 – *Script* utilizado para selecionar os resíduos de aminoácido próximos ao ligante para sofrer mutação.

(continua)

```
import sys
from Modeller import *

log.minimal()

env = environ()
env.io.atom_files_directory = ['.']
env.io.hetatm = True

protein = '3QGT.pdb'
ligand = '609:A'
distance = 6.8

modelo = model(env, file=protein)
hetero = selection(modelo.residues[ligand])

sitio = selection()

for atomos in hetero:
    elemento = atomos.name
```

Quadro 4 – *Script* utilizado para selecionar os resíduos de aminoácido próximos ao ligante para sofrer mutação. (conclusão)

```

numero = str(atomos.residue.num)
cadeia = atomos.residue.chain.name
ident = elemento+": "+numero+": "+cadeia
selecao = modelo.atoms[ident].select_sphere(distance)
sitio.add(selecao)

sitio = sitio.only_std_residues()

residuos = { }
for a in sitio:
    numero = str(a.residue.num)
    resid = a.residue.name
    nome = resid+"_"+numero
    residuos[nome] = 1

print "Residuos selecionados para mutacao:"
for r in residuos.keys():
    print r

```

Fonte: do autor

Estando definidas em quais posições da enzima iria ocorrer mutação, estabeleceu-se quais tipos de resíduos iriam substituir cada posição. Sendo simulada mutação pontual em um único nucleotídeo, o resíduo mutado não pode ser substituído por qualquer dos demais 19 aminoácidos, mas apenas por um grupo menor. Como exemplo, considerando o tripleto aaa que codifica para lisina, as seguintes mutações em um único nucleotídeo são possíveis, codificando para os respectivos aminoácidos:

aat => asparagina

aac => asparagina

aag => lisina

ata => isoleucina

aca => treonina

aga => arginina

taa => stop codon

caa => glutamina

gaa => ácido glutâmico

Dessa forma, eliminando-se as mutações silenciosas, que não alteram o aminoácido (no exemplo, o tripleto aag), e os códons de término de cadeia, vê-se que uma mutação no tripleto aaa retornará um dos seguintes aminoácidos: asparagina, isoleucina, treonina, arginina, glutamina ou ácido glutâmico; ao invés de montar 19 modelos, um para cada um dos

aminoácidos existentes diferentes do aminoácido original, gera-se apenas 6 modelos, correspondentes aos resíduos de aminoácidos que podem ser originados pela mutação de um único nucleotídeo. Escreveu-se um *script* em perl, denominado mutar.pl, para identificar os resíduos que poderiam substituir aquele mutado. Inicialmente é declarado um vetor @posicoes que contém as posições onde haverá mutação (definidas pelo *script* anterior), declara-se também a sequência de DNA da enzima, esta sequência foi obtida do banco de dados KEGG (KANEHISA, 2012) no endereço eletrônico http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?pfa:PFD0830w. Para cada elemento do vetor @posicoes é chamada a função newres definida no cabeçalho do *script*, esta função lê a sequência de DNA, copia para uma nova variável o tripleto a ser alterado, gera todos os tripletos mutantes, recupera os resíduos de aminoácidos correspondentes, retornando-os para a chamada da função. Por fim, o *script* chama por meio da função system o programa mutate_model.py, que irá construir o modelo com a mutação especificada. O *script* é apresentado no quadro 5.

Quadro 5 – *Script* para selecionar quais resíduos substituirão aquele a ser mutado e chamar o programa mutate_model.py.

(continua)

```
#!/usr/bin/perl
sub newres
{
    my ($dna, $posicao) = @_ ;
    my %codge = ("tca" => "SER", "tct" => "SER", "tcc" => "SER", "tcg" => "SER",
                "ttt" => "PHE", "ttc" => "PHE", "tta" => "LEU", "ttg" => "LEU",
                "tac" => "TYR", "tat" => "TYR", "tgc" => "CYS", "tgt" => "CYS",
                "tgg" => "TRP", "cta" => "LEU", "ctc" => "LEU", "ctg" => "LEU",
                "ctt" => "LEU", "cca" => "PRO", "cct" => "PRO", "ccg" => "PRO",
                "ccc" => "PRO", "cac" => "HIS", "cat" => "HIS", "caa" => "GLN",
                "cag" => "GLN", "cga" => "ARG", "cgc" => "ARG", "cgg" => "ARG",
                "cgt" => "ARG", "ata" => "ILE", "atc" => "ILE", "att" => "ILE",
                "atg" => "MET", "aac" => "ASN", "aat" => "ASN", "gaa" => "GLU",
                "gag" => "GLU", "aca" => "THR", "acc" => "THR", "act" => "THR",
                "acg" => "THR", "aaa" => "LYS", "aag" => "LYS", "gac" => "ASP",
                "gat" => "ASP", "agc" => "SER", "agt" => "SER", "aga" => "ARG",
                "agg" => "ARG", "gca" => "ALA", "gcc" => "ALA", "gct" => "ALA",
                "gcg" => "ALA", "gta" => "VAL", "gtt" => "VAL", "gtc" => "VAL",
                "gtg" => "VAL", "gga" => "GLY", "ggc" => "GLY", "ggt" => "GLY",
                "ggg" => "GLY");
    my $res_ori = $codge{substr($dna, 3*($posicao - 1), 3)};
    my $tripleto = substr($dna, 3*($posicao - 1), 3);
    my %resids;
    my @nuc = ("t", "c", "a", "g");
    for(my $i = 0; $i <= 2; $i++)
    {
```

Quadro 5 – *Script* para selecionar quais resíduos substituirão aquele a ser mutado e chamar o programa `mutate_model.py`.

(conclusão)

```

foreach my $nc (@nuc)
{
    my $newtri = $tripleto;
    substr($newtri, $i, 1, $nc);
    my $novotripleto = $codge{$newtri} || $codge{$tripleto};
    $resids{$novotripleto} = 1;
}
}
delete $resids{$res_ori};
my @selec = keys(%resids);
unshift(@selec, $res_ori);
return(@selec);
}
# mutações feitas na enzima DHFR tipo selvagem em resíduos pertencentes ao sítio ativo
my @posicoes = (14, 15, 16, 17, 40, 46, 48, 50, 51, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 104, 107, 108,
109, 110, 111, 112, 119, 163, 164, 165, 166, 170, 183, 184, 185, 223);
my $dna =
'atgatggaacaagtctgcgacgttttcgatattatgccatattgtgcatggtgtaagggtgaaagcaaaaatgaggggaaaaaaaaatga
ggttttaataactacacatttagaggtctaggaaataaaggagattaccatggaatgtaattccctagatatgaaatattttgtgcagtt
acaacatatgtgaatgaatcaaaaatgaaaattgaaatataagagatgtaaatatttaacaagaactgtggataatgtaaatgata
tcctaattctaaaaattacaaaatggtgtattatgggaagaacaagctgggaaagcattcaaaaaatttaaccttaagcaatag
gataaatgttatattgtctagaaccttaaaaaagaagattttgatgaagatgtttatatcattaacaagttgaagatctaatagtttacttg
ggaaataaattactataaatgtttattataggaggttccgtgtttatcaagaatttttagaaaagaataataaaaaaaatataatttacta
gaataaatagtacatatgaatgtgatgtattttccagaataaatgaaatgagatcaaaattttctgttagcgatgtatatactagtaa
caatacaacattggattttatcattataagaaaacgaataataaatgttaaatgaacaaaattgtataaaaggagaagaaaaaataat
gatatgcctttaagaatgatgacaaagatacatgtcatatgaaaaattaacagaattttacaaaaatgtagacaaatataaaattaatta
tgaaaatgatgatgatgaagaagaagatgatttgtttatttaatttaataaagaaaaagaagagaaaaataaaaattctatacatcc
aatgattttcaaatatataatagcttgaaatataaatatcatcctgaatacaaatatttaaatattttatgatattatgatgaatggaaataa
acaaagtgatcgacgggagtaggtgttttaagtaaattcggatataatgaaattgatttaagtcaatattccattattaactacgaa
gaaattattttaagaggaattattgaagaattgcttggttatttagaggagaacaatggaatacgttgtaataaagaatgtaaggat
atgggaagctaatggtactagggaaattttagataatagaaaattttcatagagaagttaacgatttaggacctatttatggtttcaatg
gagacattcgggtctgaatatacaaatatgtatgataattatgaaaataaaggagtgatcaattaaataataaatttaattaa
atgatctacaagtagaagaattctttgtgtgcatggaatgtaaaagatcttgaccaaattggcattacctcctgtcatattttatgtcagttt
tatgttttcgatgggaaattatcatgtattatgtatcaaagatcatgtgatttagggctaggagtaccttttaattgcttctattctattttac
tcatatgattgcacaagtctgaatttgaacctgcgcagttcatacacgttttaggaaatgcacatgtttataataatcacattgatagttta
aaaattcaacttaacagaataacctatccattccaacacttaataatccagatattaaaaatattgaagattttacaatttcggattta
caatacaaaattatgttcatcatgaaaaatttcaatgggatggctgcttaa';
foreach my $respos (@posicoes)
{
    my ($resori, @mutacoes) = &newres($dna, $respos);
    foreach my $resname (@mutacoes)
    {
        system("python", "mutate_model.py", "selvagem", $resori, $respos, $resname, "A");
    }
}
exit;

```

Fonte: do autor.

Encontra-se na literatura um experimento laboratorial em que foram geradas enzimas mutantes a partir do mutante triplo N51I/C59R/S108N em que uma quarta mutação era feita de forma aleatória, a fim de se verificar o efeito desta na resposta da enzima aos fármacos (HUNT; REZVANI; SIBLEY, 2004). Baseado neste experimento, gerou-se também modelos computacionais da enzima DHFR-TS, tendo-se como template o mutante triplo, fazendo-se neste uma quarta mutação. Uma vez que não há uma estrutura resolvida deste mutante triplo, utilizou-se a estrutura pdb 1J3I, que corresponde ao mutante quádruplo N51I/C59R/S108N/I164L, sendo o resíduo 164 modificado de leucina para isoleucina com o programa `mutate_model.py`.

```
$ python mutate_model.py 1J3I 164 ILE A > result.log
```

Realizou-se o mesmo procedimento descrito anteriormente para mutação com a enzima tipo selvagem, com o *script* `mutar.pl`, com a diferença de se remover as posições 51, 59 e 108 do vetor `@posicoes` para que as mutações originais N51I/C59R/S108N fossem inalteradas.

5.3 DOCKING MOLECULAR DAS ENZIMAS MUTANTES CONTRA OS FÁRMACOS PIRIMETAMINA E CICLOGUANIL

A fim de se avaliar o efeito das mutações na afinidade de ligação entre fármaco e receptor, realizou-se *docking* molecular entre os modelos mutantes obtidos e os fármacos pirimetamina e cicloguanil, cujas estruturas foram obtidas do banco de dados ZINC (IRWIN et. al., 2012). As proteínas foram preparadas com o *script* `prepare_receptor4.py` e os ligantes com o *script* `prepare_ligand4.py`, conforme descrito anteriormente. Construiu-se a caixa de *docking* para os modelos com uma mutação baseando-se nas coordenadas do ligante presente na estrutura 3QGT, e para os modelos com quatro mutações baseando-se no ligante da estrutura 1J3K, utilizando-se um *script* um pouco diferente daquele usado no *redocking*: as coordenadas do ligante eram lidas, o maior valor de coordenada no eixo x era salva na variável `x_max` e a menor na variável `x_min`, o centro da caixa é calculado como:

$$\text{center_x} = \frac{\text{x_max} + \text{x_min}}{2}$$

e o comprimento da caixa como:

$$\text{size_x} = k(\text{x_max} - \text{x_min})$$

Onde k é uma constante controladora do tamanho da caixa (aumentando-a ou diminuindo-a) e possui como valor padrão $k=1.5$, podendo este ser alterado. A mesma operação é feita para as coordenadas y e z .

Para organizar melhor os dados, foi criada a seguinte árvore de diretórios:

- a) receptores → diretório para armazenar os receptores preparados;
- b) ligantes → diretório para armazenar os ligantes preparados;
- c) gridbox → diretório para armazenar os gridbox;
- d) log → diretório para armazenar os arquivos log gerados após do *docking*;
- e) out → diretório para armazenar as orientações do ligante gerados após do *docking*.

O programa AutoDock Vina foi rodado de forma iterativa, cada enzima contra cada ligante, utilizando-se uma estrutura de laço *for* escrita em *shellscript*, conforme quadro 6:

Quadro 6 – *Shellscript* usado para rodar o programa AutoDock Vina iterativamente.

```
#!/bin/bash
grid="./gridbox/grid.txt"
for rec in $(ls ./receptores/*.pdbqt)
do
    for lig in $(ls ./ligantes/*.pdbqt)
    do
        out=$(basename $rec .pdbqt)"-"$(basename $lig .pdbqt)".pdbqt"
        log=$(basename $rec .pdbqt)"-"$(basename $lig .pdbqt)".log"
        vina --receptor $rec --ligand $lig --config $grid --out ./out/$out --log ./log/$log
    done
done
exit
```

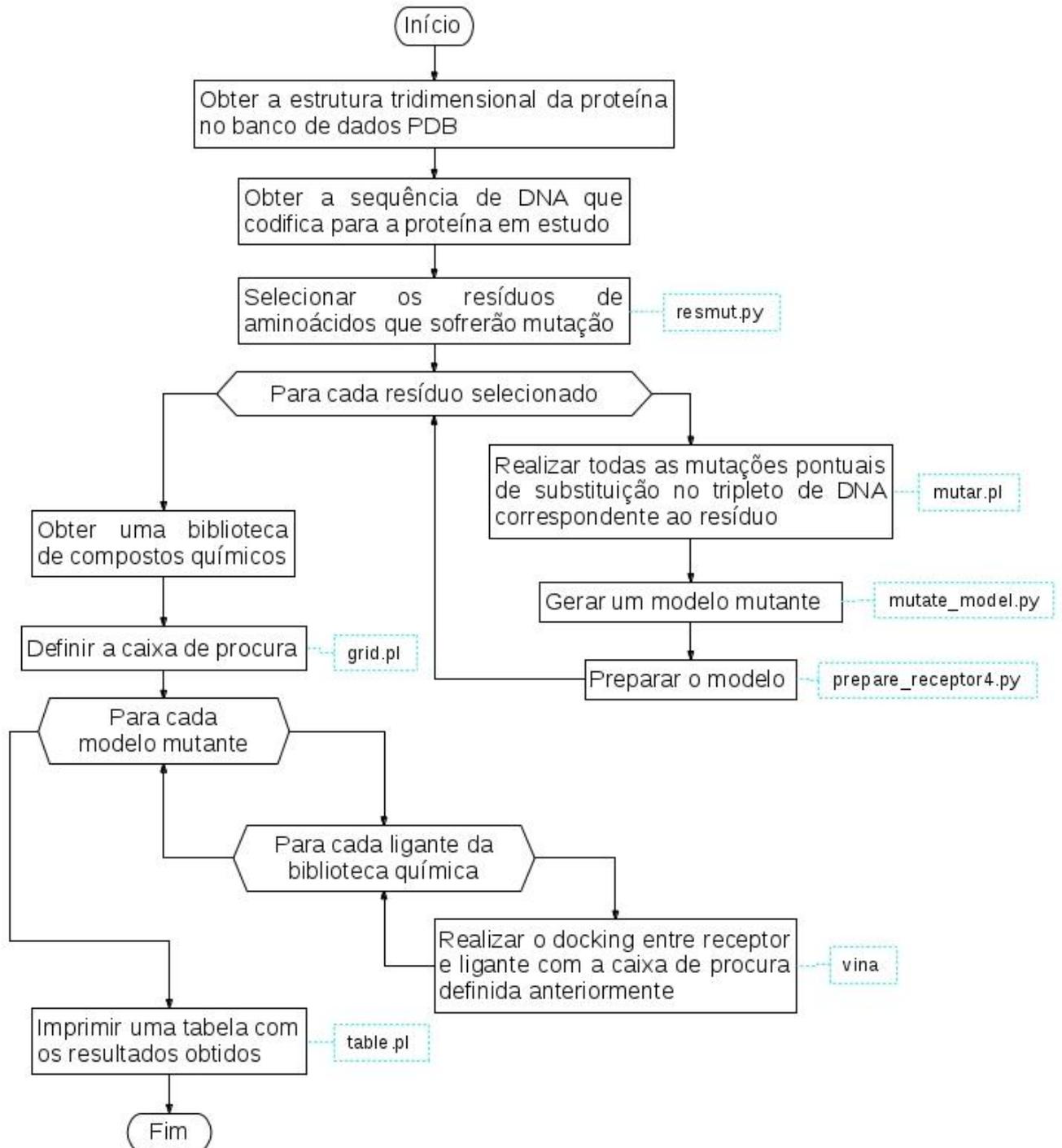
Fonte: do autor.

Os resultados de cada *docking* foram salvos em um arquivo log diferente. Para fazer a comparação dos resultados, escreveu-se um *script* em perl para fazer a leitura de cada arquivo log e organizar os dados em uma tabela, esta foi estruturada no formato html, podendo ser aberta por um navegador web.

5.4 VIRTUAL SCREENING DAS ENZIMAS MUTANTES SELECIONADAS CONTRA BIBLIOTECA QUÍMICA NCI DIVERSITY SET II

Os modelos que apresentaram piores *scores*, sendo considerados, portanto capazes de resistir à ação do fármaco, foram selecionados para se rodar um *virtual screening* contra a biblioteca química **NCI Diversity Set II** (DIVERSITY SET IV INFORMATION), a fim de se buscar novas moléculas que possam ser protótipo para o desenvolvimento de fármacos capazes de interagir com enzimas mutantes. **NCI Diversity Set II** é um conjunto de 1596 compostos organizado pelo "National Cancer Institute", que são disponibilizados em placas Greiner 650201 de 96 poços, para pesquisas laboratoriais, além de fornecer a representação computacional dos mesmos. A biblioteca química foi derivada de uma coleção de 140000 compostos, primeiro foram selecionados compostos que possuíam pelo menos 250 mg de material disponível, excluiu-se também aqueles sem uma representação computacional, sobrando cerca de 80000. Estes ainda foram filtrados com uso de programas como Chem-X e Catalyst, em que centros farmacofóricos eram reconhecidos e moléculas com centros farmacofóricos já presentes em outras pré-escaneadas eram eliminadas, resultando no número final de 1596 compostos. As estruturas destas moléculas foram obtidas a partir do site do programa AutoDock, no endereço <http://autodock.scripps.edu/resources/databases>, onde as mesmas já estão preparadas no formato pdbqt para uso pelo programa AutoDock Vina. Foi utilizado protocolo de *docking* como descrito anteriormente. O fluxograma 2 apresenta um esquema da metodologia utilizada.

Fluxograma 2 – Mutação sítio-dirigida com programa Modeller9.12 seguida de *docking* molecular com programa AutoDock Vina.



5.5 MODELAGEM DA REGIÃO DE JUNÇÃO DA ENZIMA DHFR-TS

A enzima DHFR-TS possui uma região de junção de 89 resíduos que une os domínios principais, alguns autores sugeriram que esta região poderia ser alvo para fármacos não competitivos (CHAIANANTAKUL; SIRAWARAPORN; SIRAWARAPORN, 2013). Embora existam vários trabalhos de busca de fármacos competitivos para o domínio DHFR (GAHTORI et. al., 2012; Hunt et. al., 2005; Fogel et. al., 2008; Bhat et. al., 2013), em menor quantidade são os trabalhos que procuraram fármacos capazes de interagir com a região de junção (DASGUPTA et. al., 2009), realizou-se então uma procura por ligantes capazes de interagir com essa região. Das 14 estruturas da enzima DHFR-TS de *Plasmodium falciparum* depositadas no PDB até o momento, nenhuma possui a região de junção completa, faltando 51 resíduos de aminoácidos (resíduos 232 a 282). Gerou-se um modelo contendo toda a região de junção por meio do programa Modeller9.12. O modelo foi criado usando a estrutura pdb 1J3K, já que esta possui a menor resolução (2.10 Å). Esta estrutura não foi utilizada diretamente como template, suas coordenadas atômicas foram lidas e adicionadas a uma função especial de restrição, de forma que as coordenadas do modelo fossem as mais próximas possível daquelas encontradas na estrutura pdb. O arquivo 1J3K sofreu uma pequena edição, sendo salvo em novo arquivo “main.pdb”, todas as suas linhas, com exceção das que continha a tag ATOM, foram apagadas, e as cadeias definidas como C e D (domínios TS) foram renomeadas para A e B, de acordo com o domínio DHFR ao qual cada uma estava ligada. Junto aos comandos para fixar as coordenadas atômicas, acrescentou-se as tarefas de leitura e extração dos dados do arquivo “main.pdb”, conforme quadro 7 da página seguinte:

Quadro 7 – Parte do *script* Modeller onde se lê as coordenadas do *template* principal (código acesso PDB:1J3K), sendo as mesmas copiadas para o modelo.

```
class MyModel(loopmodel):
    def special_restraints(self, aln):
        arquivo = 'main.pdb'
        leitura = open(arquivo, 'r')
        texto = leitura.readlines()
        for linha in range(len(texto)):
            x = texto[linha][30:38]
            y = texto[linha][38:46]
            z = texto[linha][46:54]
            x = float(meu_x)
            y = float(meu_y)
            z = float(meu_z)
            chain = texto[linha][21:22]
            atom= texto[linha][12:16]
            at = atom.strip()
            position = texto[linha][22:26]
            posit = position.strip()
            ide = at+":"+posit+":"+chain
            self.restraints.add(forms.gaussian(group=physical.xy_distance,
feature=features.x_coordinate(self.atoms[ide]), mean=x, stdev=0.001))
            self.restraints.add(forms.gaussian(group=physical.xy_distance,
feature=features.y_coordinate(self.atoms[ide]), mean=y, stdev=0.001))
            self.restraints.add(forms.gaussian(group=physical.xy_distance,
feature=features.z_coordinate(self.atoms[ide]), mean=z, stdev=0.001))
        leitura.close()
```

Fonte: do autor.

Dessa forma há economia de tempo e memória na execução do programa, já que não é necessário calcular as coordenadas dos domínios DHFR e TS, apenas as da região de junção.

A região de junção não possui homologia com qualquer sequência conhecida até o momento, para buscar *templates* para essa região, a mesma foi fragmentada em três partes contendo 17 resíduos cada, que foram submetidas a um alinhamento local contra as sequências depositadas no banco de dados PDB por meio do programa BLAST (ALTSCHUL et. al., 1990). O programa BLAST é uma ferramenta web disponibilizada pelo NCBI (National Center for Biotechnology Information), realiza alinhamentos locais entre sequências de DNA ou proteína, é utilizado para se escanear grandes bancos de dados de forma rápida. Para a seleção dos *templates* foram excluídos aqueles contendo gaps no alinhamento, deu-se preferência para os que cobriam uma maior parte da sequência com o mínimo de mismatches. Na construção do modelo foi utilizada uma função de restrição para que as regiões de junção das cadeias A e B possuíssem simetria, além de se usar um protocolo de refinamento de

dinâmica molecular de nível “slow”, conforme o *script* completo apresentado no quadro 8.

Quadro 8 – *Script* Modeller completo para se gerar o modelo da enzima DHFR-TS contendo a região de junção.

```

from Modeller import *
from Modeller.automodel import *

log.verbose()
env = environ()
env.io.atom_files_directory = ['.', './atom_files']
class MyModel(loopmodel):
    def special_patches(self, aln):
        self.rename_segments(segment_ids=['A', 'B'], renumber_residues=[1, 1])
    def special_restraints(self, aln):
        s1 = selection(self.residue_range('232:A', '282:A')).only_atom_types('CA')
        s2 = selection(self.residue_range('232:B', '282:B')).only_atom_types('CA')
        self.restraints.symmetry.append(symmetry(s1, s2, 1.0))
        arquivo = 'main2.pdb'
        leitura = open(arquivo, 'r')
        texto = leitura.readlines()
        for linha in range(len(texto)):
            x = texto[linha][30:38]; x = float(meu_x)
            y = texto[linha][38:46]; y = float(meu_y)
            z = texto[linha][46:54]; z = float(meu_z)
            chain = texto[linha][21:22]
            atom= texto[linha][12:16]
            at = atom.strip()
            position = texto[linha][22:26]
            posit = position.strip()
            ide = at+":"+posit+"-"+chain
            self.restraints.add(forms.gaussian(group=physical.xy_distance,
            feature=features.x_coordinate(self.atoms[ide]), mean=x, stdev=0.001))
            self.restraints.add(forms.gaussian(group=physical.xy_distance,
            feature=features.y_coordinate(self.atoms[ide]), mean=y, stdev=0.001))
            self.restraints.add(forms.gaussian(group=physical.xy_distance,
            feature=features.z_coordinate(self.atoms[ide]), mean=z, stdev=0.001))
        leitura.close()
    def select_loop_atoms(self):
        return selection(self.residue_range('232:A', '282:A'), self.residue_range('233:B', '282:B'))
model = MyModel(env, alnfile = 'alignment.ali', knowns = ('2ING_X_1727_1733', '4JE5_A_73_79',
'1ID1_A_141_148', '2A4V_A_71_89', '1GE9_A_16_25', '2H4C_A_109_119', '3ACP_A_23_26'),
sequence = 'SEQ')
model.starting_model = model.ending_model = 1
model.max_molpdf = 1e15
model.loop.starting_model = model.loop.ending_model = 1
model.loop.md_level = refine.slow
model.make()

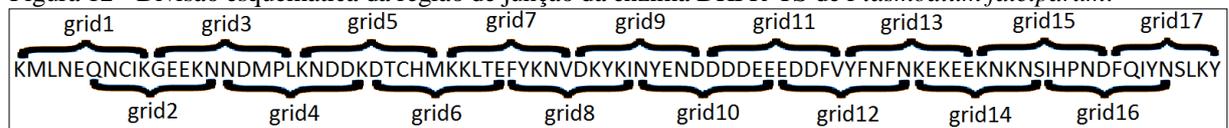
```

Fonte: do autor.

Após a conclusão do modelo, este foi analisado com uso do PROCHECK, uma suíte de programas que avaliam a qualidade estereoquímica de uma proteína, gerando diversos gráficos no formato PostScript (LASKOWSKI et. al., 1993). Recebe como entrada a estrutura

da proteína no formato pdb e um arquivo de parâmetros onde estão as opções para a formatação dos gráficos. Os programas pertencentes ao PROCHECK rodam em sequência, sendo estes CLEAN.F, para preparar o arquivo de entrada a ser processado; SECSTR.F, que faz avaliação da estrutura secundária; NB.C, identificando interações entre pares de resíduos; ANGLN.F, que calcula os tamanhos de ligação e os ângulos de ligação da cadeia principal e PPLOT.F para produzir os gráficos. Uma vez que o modelo apresentou vários resíduos em regiões desfavoráveis do gráfico de Ramachandran, foram feitos refinamentos posteriores até que todos os resíduos apresentassem uma estereoquímica favorável, respeitando-se a simetria entre as cadeias A e B. Realizou-se por fim um *virtual screening* com os ligantes da biblioteca química **NCI Diversity Set II**, tendo-se como alvo a região de junção, estendendo-se dos resíduos 232 a 320, apenas a cadeia A foi considerada. Sendo a região de junção extensa (89 resíduos de aminoácidos), uma caixa de procura cobrindo toda sua extensão seria muito grande, com volume de 811026 \AA^3 , tornando os cálculos mais dispendiosos e menos precisos. Foram criadas 17 caixas de procura focalizando apenas os resíduos da região de junção, cada caixa englobou 10 resíduos, após a construção da primeira caixa (do resíduo 232 ao 241) contou-se 5 resíduos para a construção da próxima caixa (do resíduo 237 ao 246), e assim sucessivamente até a última, isso foi feito para se evitar perder possíveis interações ocorrendo na intersecção de caixas adjacentes caso fossem construídas a cada 10 resíduos (figura 12). Utilizou-se um *script* em perl para a construção das caixas, rodou-se o *virtual screening* conforme descrito anteriormente, com a diferença de serem utilizados mais de um espaço de procura.

Figura 12 - Divisão esquemática da região de junção da enzima DHFR-TS de *Plasmodium falciparum*.



Fonte: do autor.

Nota: Divisão feita para a construção das várias caixas de *docking*, uma vez que uma caixa que cobrisse toda a extensão da região de junção seria muito grande, o que não é recomendado em estudos de *docking*. Cada gridbox foi construído contornando-se 10 resíduos de aminoácidos.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho encontram-se descritos a seguir.

6.1 ESTUDOS DE *REDOCKING*

A tabela 1 apresenta os resultados do *redocking* realizado com o programa AutoDock Vina. Das 14 estruturas avaliadas, apenas duas apresentaram RMSD maior que 2 Å (código PDB: 1J3I e 1J3K), estando ambas complexadas a uma molécula WRA (fármaco experimental), este resultado está dentro do esperado, pois quanto mais ligações com liberdade de rotação tiver um ligante, maior tende a ser o RMSD calculado, o ligante possui 8 ligações que podem girar, menor apenas que os ligantes MMV com 10 e DHF com 9.

Tabela 1 – Valores de RMSD encontrados em estudo de *redocking* realizado com enzimas DHFR-TS de *Plasmodium falciparum*.

Estrutura	Ligante	Menor RMSD	Energia	Config. nº
1J3I	WRA	2.7122	-5.3	7
1J3J	CP6	0.3683	-9.8	1
1J3K	WRA	3.6940	-5.8	4
3DG8	RJ6	0.5469	-8.1	2
3DGA	RJ1	1.1916	-8.0	5
3JSU	KA5	1.2179	-10.0	1
3QG2	CP6	0.3405	-9.0	2
3QGT	CP6	0.4839	-9.5	2
3UM5	CP6	0.3692	-9.1	1
3UM6	1CY	0.3085	-8.2	1
3UM8	1CY	0.3089	-8.9	2
4DP3	MMV	0.5322	-9.3	1
4DPD	DHF	1.8844	-8.6	3
4DPH	P65	0.8980	-8.5	2

Fonte: do autor.

Nota: Enzimas do tipo selvagem e mutantes obtidas do PDB. *Docking* realizado com o programa AutoDock Vina. Energias em kcal/mol.

O programa Vina retorna por *default* as nove configurações com melhor energia, a última coluna da tabela 1 informa qual a configuração obteve o menor RMSD. Em um estudo de *redocking* espera-se que a configuração de melhor energia seja também a de menor RMSD, apenas cinco das estruturas analisadas apresentaram este comportamento e outras cinco tiveram a segunda melhor configuração com menor RMSD, entretanto, comparando-se o score entre a primeira e segunda configuração, conforme é ilustrado na tabela 2 para a estrutura 3DG8, vê-se que a diferença entre ambas é mínima, embora o RMSD encontrado tenha diferença significativa.

Tabela 2 – Configurações obtidas em *redocking* da estrutura 3D (código acesso PDB:3DG8), apresentando o RMSD em relação ao ligante na estrutura cristalográfica (PDB:3DG8) e o respectivo valor de energia calculado.

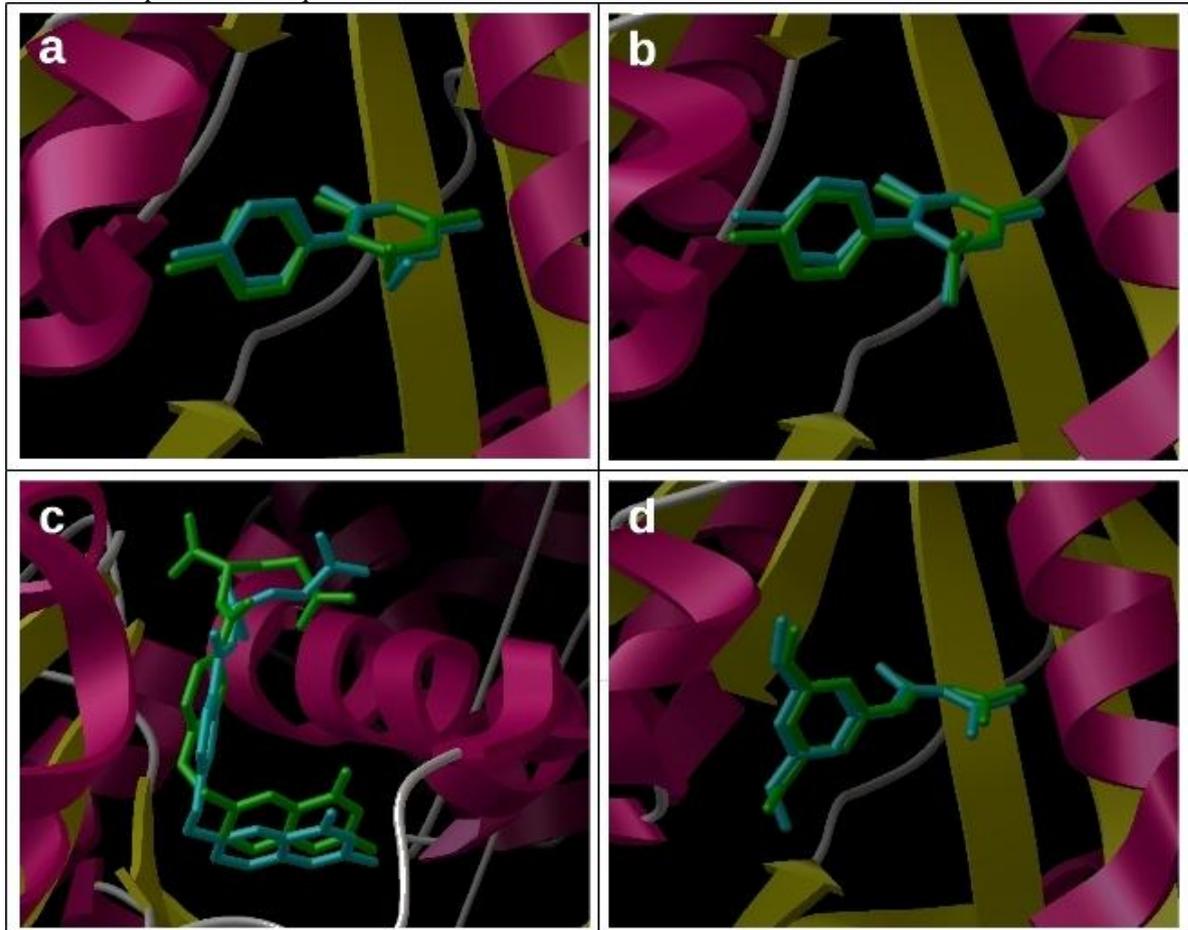
Config. nº	RMSD	Energia
1	2.5311	-8.2
2	0.5469	-8.1
3	2.6623	-7.7
4	3.6329	-7.5
5	4.1389	-6.9
6	4.4564	-6.7
7	1.5245	-6.5
8	2.6464	-6.4
9	3.8998	-6.3

Fonte: do autor.

Nota: *Docking* realizado com o programa AutoDock Vina.
Energias em kcal/mol.

A figura 13 ilustra a conformação original encontrada no arquivo pdb de quatro estruturas em contraste com aquela obtida por *docking*, observa-se nitidamente que moléculas maiores (no caso o ligante DHF – ácido dihidrofólico) tendem a apresentar RMSD maior que moléculas menores, embora a orientação geral do ligante esteja correta. O programa AutoDock Vina foi capaz de reproduzir a ancoragem entre proteína e ligante para a maioria dos complexos avaliados, com RMSD dentro da faixa considerada satisfatória (2 Å), sendo portanto viável para o estudo de *docking* com a enzima DHFR-TS de *Plasmodium falciparum*.

Figura 13 – Sobreposição entre a configuração dos ligantes obtidos por *redocking* e a configuração original presente no arquivo PDB.



Fonte: do autor.

Nota: a) Estrutura pdb 3UM5 complexada à pirimetamina, em verde: configuração de *redocking*, em ciano: configuração original, RMSD: 0.3692. b) Estrutura pdb 3UM6 complexada ao cicloguanil, em verde: configuração de *redocking*, em ciano: configuração original, RMSD: 0.3085. c) Estrutura pdb 4DPD complexada ao ácido dihidrofólico, em verde: configuração de *redocking*, em ciano: configuração original, RMSD: 1.8844. d) Estrutura pdb 3DG8 complexada com o ligante RJ6, em verde: configuração de *redocking*, em ciano: configuração original, RMSD: 0.5469. Figuras renderizadas pelo programa pmv.

6.2 SELEÇÃO DE ENZIMAS MUTANTES RESISTENTES À PIRIMETAMINA E CICLOGUANIL

Foram gerados modelos mutantes da enzima DHFR-TS tipo selvagem por meio de mutações pontuais em resíduos de aminoácidos pertencentes ao sítio ativo, os resíduos selecionados foram os seguintes: ILE14, CYS15, ALA16, CYS17, LEU40, LEU46, TRP48, CYS50, ASN51, ASP54, MET55, LYS56, TYR57, PHE58, CYS59, MET104, THR107, SER108, TRP109, GLU110, SER111, ILE112, LEU119, ILE163, ILE164, GLY165, GLY166,

TYR170, TYR183, PHE184, THR185 e PHE223, num total de 32, sendo obtidos 186 modelos. Estes foram submetidos a *docking* molecular contra os fármacos pirimetamina e cicloguanil, os mutantes com pior energia de ligação com estes fármacos são apresentados na tabela 3, onde se vê também o score da enzima tipo selvagem para comparação.

Tabela 3 – Energias de interação obtidas por *docking* molecular entre enzimas DHFR-TS de *Plasmodium falciparum* com uma mutação e os fármacos pirimetamina e cicloguanil.

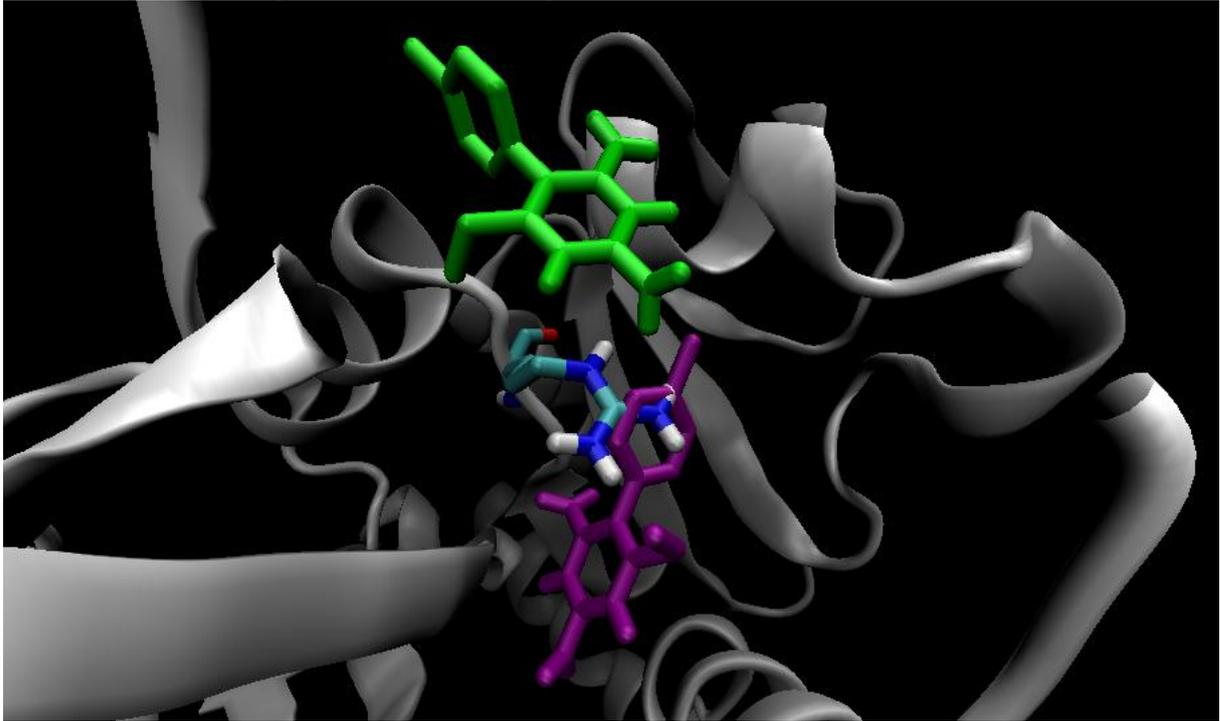
Pirimetamina		Cicloguanil	
Enzima	Energia	Enzima	Energia
G165R	-5.9	S108R	-6.0
S108R	-6.5	G165R	-6.1
F58I	-6.6	Y170S	-6.9
F58C	-6.8	S108N	-6.9
F58V	-6.8	Y170C	-6.9
F58S	-6.8	F58S	-6.9
F58Y	-6.9	Y170N	-7.0
Y170D	-7.0	G165V	-7.0
D54Y	-7.0	L40R	-7.0
Y170C	-7.0	S108I	-7.0
Y170N	-7.0	Y170D	-7.0
selvagem	-7.2	selvagem	-7.3

Fonte: do autor.

Nota: *Docking* realizado com o programa AutoDock Vina.
Energias em kcal/mol.

Dois mutantes se encontram no topo da tabela para ambos os fármacos, G165R e S108R. O primeiro não é relatado pela literatura e apresenta uma mutação brusca na qual um resíduo de glicina, cujo radical é apenas um átomo de hidrogênio, é trocado por uma arginina, que tem uma cadeia lateral longa com quatro carbonos e três nitrogênios, além dos átomos de hidrogênio. Como se vê na figura 14, essa cadeia lateral volumosa ocupa parte do sítio ativo que antes estava disponível para o fármaco, impedindo que este ocupe o sítio de ligação, resultando em menor afinidade de ligação. Provavelmente o mesmo efeito ocorre quando o ligante é o substrato natural da enzima, o ácido dihidrofólico, dessa forma, embora a mutação possa conferir resistência ao fármaco, ela também impede a ligação com o substrato natural, tornando a enzima não funcional e inviabilizando a sobrevivência do parasita que a possua, o que explica a não ocorrência da mesma na natureza.

Figura 14 – Sobreposição entre as enzimas DHFR-TS de *Plasmodium falciparum* tipo selvagem e o mutante G165R complexados com o fármaco pirimetamina.

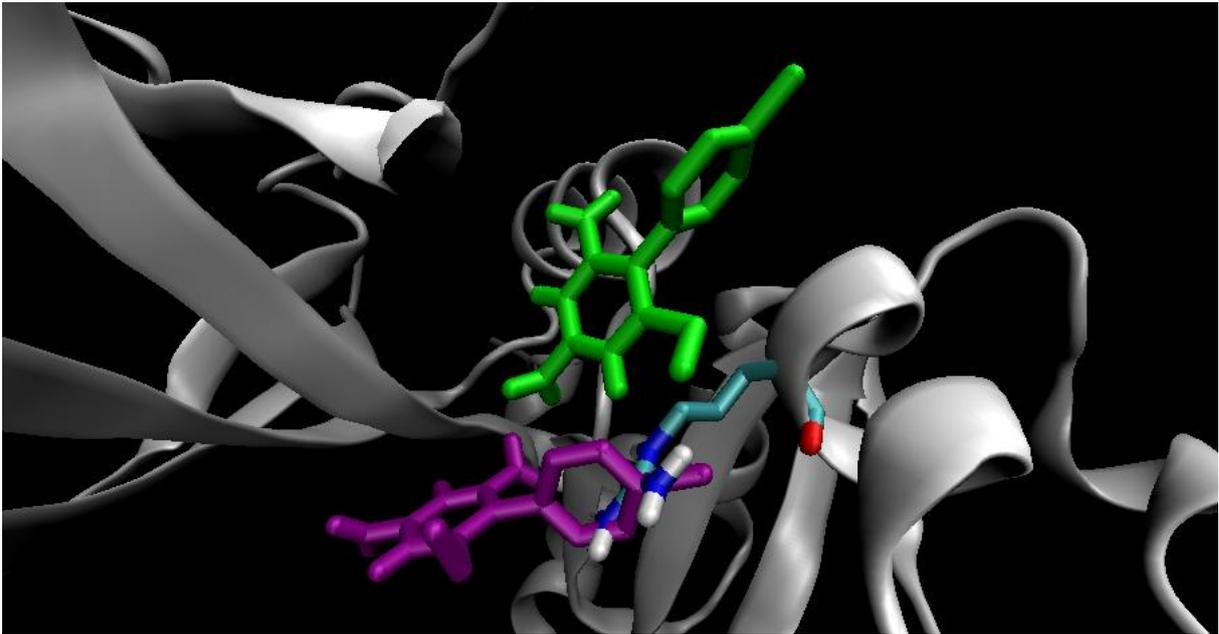


Fonte: do autor.

Nota: Em púrpura molécula pirimetamina complexada com a enzima tipo selvagem, em verde molécula pirimetamina complexada com o mutante G165R, o resíduo ARG165 é evidenciado, percebe-se que o mesmo ocupa uma região do sítio ativo que antes estava vazia e entra em choque estereoquímico com a pirimetamina, fazendo com que esta seja empurrada para uma região mais externa. A cadeia principal é representada em cartoon, parte desta foi removida para melhor visualização. Figura renderizada pelo programa vmd.

O segundo mutante, S108R, é mais próximo de mutações encontradas na natureza (S108N e S108T), mais uma vez o que parece reduzir a afinidade de ligação entre o fármaco e a enzima mutante é o choque estereoquímico ocasionado pela troca de um resíduo com cadeia lateral média, a serina com apenas um carbono ligado a uma hidroxila, por outra de cadeia maior, a arginina (o mesmo tipo de resíduo visualizado no mutante anterior). Da mesma forma que esta mutação impede a entrada do fármaco no sítio ativo, deve também impedir a entrada do substrato natural, e por isso essa também não é uma mutação observada na natureza. Os mutantes encontrados na natureza, S108N e S108T, embora tenham a cadeia lateral na posição 108 mais volumosa que aquela encontra na enzima tipo selvagem, esta ainda é menor que a do mutante S108R, de forma que conseguem impedir a entrada do fármaco no sítio ativo e ao mesmo tempo apresentam alguma afinidade com o substrato natural, apesar desta ser menor que na enzima selvagem. O mutante S108N ainda é visto na tabela 3 entre os mutantes com menor score de ligação em relação ao fármaco cicloguanil.

Figura 15 – Sobreposição entre as enzimas DHFR-TS de *Plasmodium falciparum* tipo selvagem e o mutante S108R complexados com o fármaco pirimetamina.

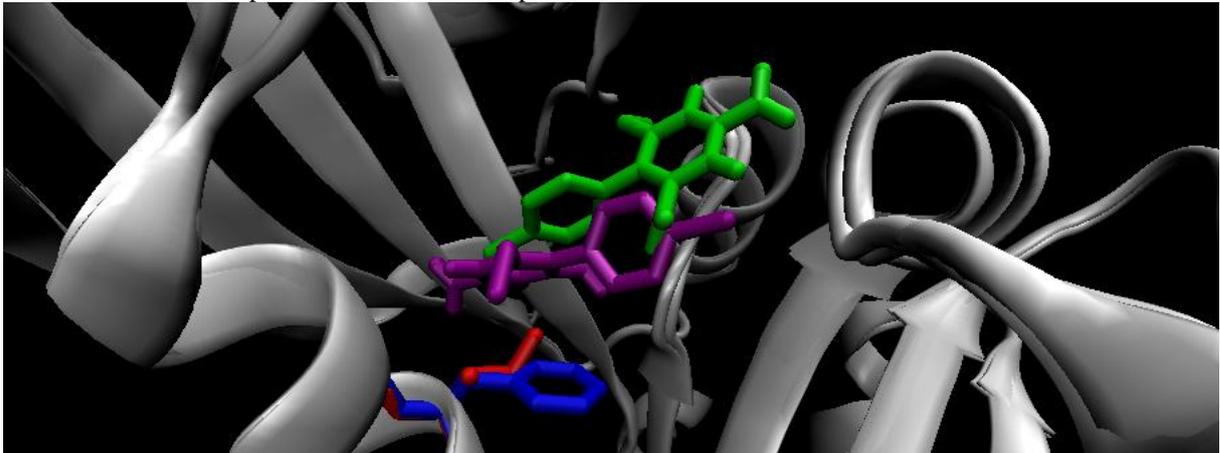


Fonte: do autor.

Nota: Em púrpura molécula pirimetamina complexada com a enzima tipo selvagem, em verde molécula pirimetamina complexada com o mutante S108R, o resíduo ARG108 é evidenciado, percebe-se que o mesmo ocupa uma região do sítio ativo que antes estava vazia e entra em choque estereoquímico com a pirimetamina, fazendo com que esta não consiga entrar no sítio ativo. A cadeia principal é representada em cartoon, parte desta foi removida para melhor visualização. Figura renderizada pelo programa vmd.

Outros mutantes que apresentaram baixo score na interação com a pirimetamina são aqueles com variação na posição 58 (F58I, F58C, F58V, F58S e F58Y). Nessas mutações não há a troca de um resíduo de pequena cadeia lateral por outro de cadeia lateral maior. Observa-se pela figura 16 que deve haver uma interação entre o anel aromático da fenilalanina na enzima selvagem e o anel pirimidina da pirimetamina, a troca deste resíduo por outro qualquer resulta na perda deste tipo de interação, o que pode diminuir a afinidade entre a proteína e o ligante, caracterizando aquela como resistente ao fármaco.

Figura 16 – Sobreposição entre as enzimas DHFR-TS de *Plasmodium falciparum* tipo selvagem e o mutante F58I complexados com o fármaco pirimetamina.



Fonte: do autor.

Nota: Em púrpura molécula pirimetamina complexada com a enzima tipo selvagem, em verde molécula pirimetamina complexada com o mutante F58I, em azul resíduo PHE58 da enzima selvagem, em vermelho resíduo ILE58 do mutante. O anel aromático da fenilalanina deve interagir com um dos anéis do fármaco, a troca deste por outro resíduo provoca a perda desta interação, diminuindo a afinidade de ligação entre proteína e fármaco. A cadeia principal é representada em cartoon. Figura renderizada pelo programa vmd.

Além destes mutantes simples, a partir do mutante triplo N51I/C59R/S108N foram gerados mutantes quádruplos com uma quarta mutação em um dos resíduos do sítio ativo, as três mutações originais não foram alteradas. Foram obtidos 167 modelos, sendo estes submetidos a *docking* molecular contra os fármacos citados anteriormente. Os mutantes com pior score são apresentados na tabela 4, mais uma vez a mutação G165R, agora somada às três mutações iniciais, aparece no topo da tabela para ambos os fármacos, a razão da energia de interação menos favorável observada deve ser a mesma que para o mutante simples descrito anteriormente. O mutante quádruplo N51I/C59R/S108N/I164L, que de acordo com a literatura apresenta o maior grau de resistência tanto para a pirimetamina quanto para o cicloguanil, não aparece entre os mutantes com mais baixa afinidade de ligação nos cálculos de *docking* realizados. Devido ao número maior de mutações presentes nestes modelos, pode se tornar mais difícil para um programa de *docking* correlacionar o grau de resistência com os tipos de mutação, uma vez que não é levado em consideração os processos dinâmicos de interação fármaco-proteína, como a barreira de energia que pode existir entre o estado em receptor e ligante estão separados e o estado em que o complexo está formado.

Tabela 4 - Energia de interação obtido por *docking* molecular entre enzimas DHFR-TS de *Plasmodium falciparum* com quatro mutações e os fármacos pirimetamina e cicloguanil.

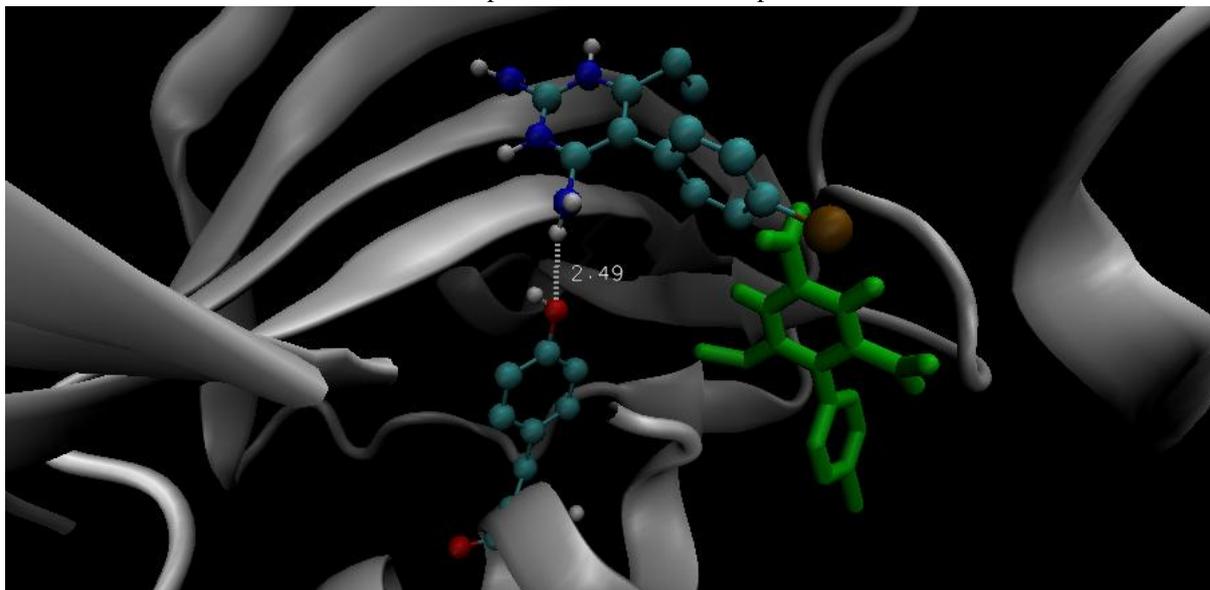
Pirimetamina		Cicloguanil	
Enzima	Energia	Enzima	Energia
triplo_G165R	-6.5	triplo_G165R	-6.3
triplo_Y170S	-7.0	triplo_F58C	-6.9
triplo_Y170C	-7.0	triplo_F58V	-6.9
triplo_L40Q	-7.0	triplo_I112M	-6.9
triplo_G165V	-7.1	triplo_F58I	-7.0
triplo_L46S	-7.1	triplo_A16E	-7.0
triplo_Y170D	-7.1	triplo_I164R	-7.0
triplo_Y170H	-7.1	triplo_F58S	-7.0
triplo_Y170N	-7.1	triplo_Y170C	-7.0
triplo_Y57H	-7.2	triplo_F58L	-7.0
triplo_I14R	-7.2	triplo_G165A	-7.0
triplo_L40R	-7.2	triplo_S111I	-7.1

Fonte: do autor.

Nota: Mutações do tipo N51I/C59R/S108N mais uma quarta mutação. *Docking* realizado com o programa AutoDock Vina. Energias em kcal/mol.

Mutações nas posições 58 e 170 são vistas em maior quantidade tal qual ocorre na tabela para os mutantes simples. Conforme é visto na figura 17, o resíduo TYR170 deve ser importante para a ancoragem do fármaco por meio interações entre a hidroxila do resíduo e um grupamento amina do ligante, uma vez que ocorra uma mutação neste resíduo, a interação é perdida, contribuindo para a menor afinidade de ligação do complexo formado. O fármaco ancorado no mutante ficou bastante deslocado em relação ao mesmo ligado à enzima tipo selvagem, embora não se vejam choques estereoquímicos neste caso, o que deve ocorrer é uma somatória de mutações na qual um resíduo que interage com o ligante é trocado por outro com menor interação, seja pela perda de radicais polares por apolares ou pela perda de radicais de cadeia longa por outros de cadeia curta que não podem alcançar a região de interação, de forma que o ligante é fracamente atraído para o interior do sítio ativo.

Figura 17 – Sobreposição entre as enzimas DHFR-TS de *Plasmodium falciparum* tipo selvagem e o mutante N51I/C59R/S108N/Y170S complexados com o fármaco pirimetamina.



Fonte: do autor.

Nota: Em verde molécula pirimetamina complexada ao mutante. A molécula pirimetamina complexada à enzima selvagem é apresentada em *balls and stick* assim como o resíduo TYR170, evidenciando uma possível interação entre a hidroxila da tirosina e uma das aminas do ligante, a troca deste resíduo por outro qualquer provoca a perda desta interação, o que somado às três mutações anteriores, diminui ainda mais a afinidade entre proteína e fármaco. A cadeia principal é representada em *cartoon*, parte desta foi removida para melhor visualização. Figura renderizada pelo programa vmd.

6.3 BUSCA DE NOVOS FÁRMACOS COM POTENCIAL DE INIBIR ENZIMAS MUTANTES

Os mutantes simples e quádruplos que apresentaram menor interação com os fármacos pirimetamina e cicloguanil foram submetidos a um *virtual screening* contra a biblioteca química **NCI Diversity Set II**, a tabela 5 apresenta os melhores *scores* encontrados. Existe um conjunto de cinco moléculas que se repete para diferentes mutantes nesta tabela, sendo estas a NCI_84100_b (aparece 14 vezes), NCI_84100_a (12 vezes), NCI_37553 (13 vezes), NCI_61610, (12 vezes) e NCI_293778 (7 vezes), cujas estruturas são mostradas na figura 18. O que essas moléculas tem em comum é o fato de serem longas e formadas pelo acoplamento de anéis aromáticos, além da presença de anéis com átomos de nitrogênio. A figura 19 apresenta um plot 2D da interação entre essas moléculas e modelos mutantes com mutação simples e a figura 20 apresenta um plot 2D da interação com mutantes quádruplos.

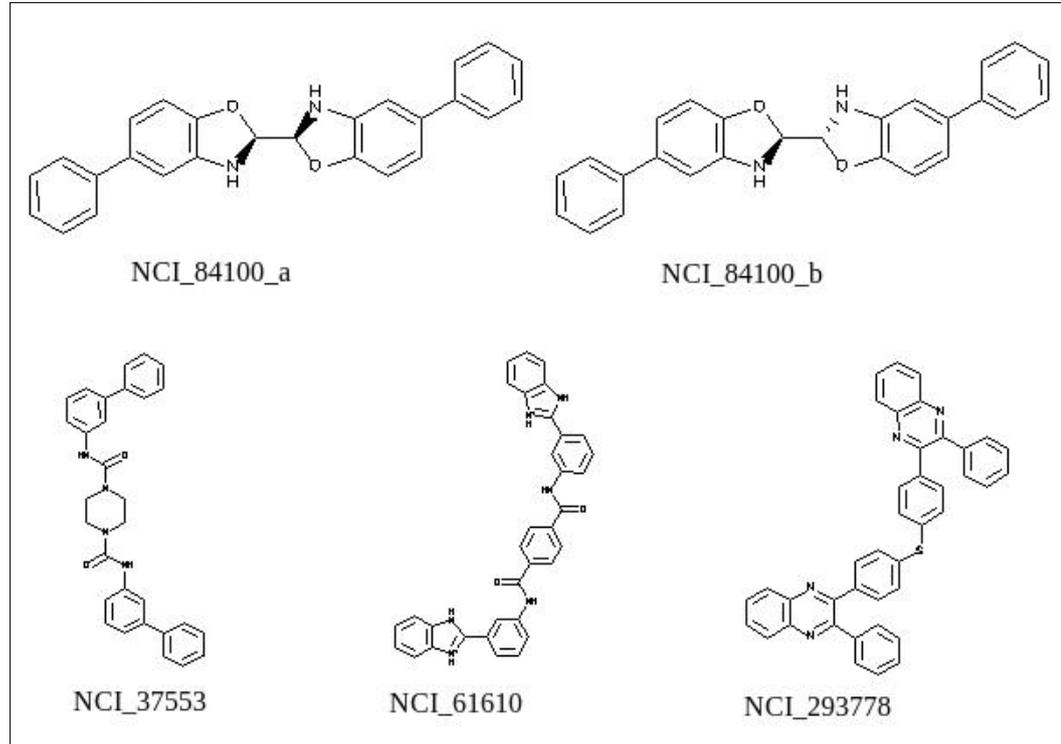
Tabela 5 – Resultado de *virtual screening* de modelos mutantes da enzima DHFR-TS de *Plasmodium falciparum* contra a biblioteca química NCI Diversity Set II.

Mutante	Ligante	Energia	Mutante	Ligante	Energia
F58I	NCI_37553	-13.3	triplo_F58S	NCI_293778	-13.6
F58Y	NCI_37553	-13.0	triplo_A16E	NCI_37553	-13.3
F58I	NCI_61610	-12.9	triplo_F58S	NCI_61610	-13.2
F58C	NCI_61610	-12.9	triplo_F58I	NCI_293778	-13.0
F58S	NCI_61610	-12.9	triplo_A16E	NCI_84100_b	-13.0
F58S	NCI_37553	-12.8	triplo_F58V	NCI_61610	-12.8
F58C	NCI_37553	-12.8	triplo_F58C	NCI_293778	-12.8
F58V	NCI_37553	-12.8	triplo_G165A	NCI_37553	-12.7
F58C	NCI_293778	-12.7	triplo_F58I	NCI_37553	-12.7
F58I	NCI_293778	-12.7	triplo_Y170C	NCI_84100_b	-12.6
F58V	NCI_293778	-12.7	triplo_Y170C	NCI_37553	-12.6
F58S	NCI_293778	-12.7	triplo_Y170C	NCI_84100_a	-12.6
Y170S	NCI_37553	-12.6	triplo_Y170S	NCI_84100_b	-12.6
Y170C	NCI_37553	-12.6	triplo_F58L	NCI_37553	-12.6
F58Y	NCI_84100_a	-12.5	triplo_G165A	NCI_61610	-12.5
F58Y	NCI_84100_b	-12.5	triplo_G165A	NCI_84100_a	-12.5
F58I	NCI_84100_a	-12.4	triplo_Y170S	NCI_84100_a	-12.5
F58I	NCI_84100_b	-12.4	triplo_G165A	NCI_84100_b	-12.5
F58V	NCI_61610	-12.3	triplo_F58L	NCI_61610	-12.5
Y170C	NCI_84100_b	-12.2	triplo_F58C	NCI_61610	-12.5
F58V	NCI_116702	-12.2	triplo_L40Q	NCI_84100_b	-12.4
Y170C	NCI_84100_a	-12.2	triplo_I112M	NCI_80734	-12.4
Y170S	NCI_84100_b	-12.2	triplo_F58L	NCI_84100_a	-12.4
Y170S	NCI_84100_a	-12.2	triplo_F58L	NCI_84100_b	-12.4
Y170S	NCI_61610	-12.1	triplo_G165A	NCI_80734	-12.4
F58Y	NCI_61610	-12.1	triplo_F58L	NCI_116702	-12.3
F58Y	NCI_670283	-12.1	triplo_F58I	NCI_84100_b	-12.3
F58Y	NCI_127133	-12.1	triplo_F58I	NCI_84100_a	-12.3
F58I	NCI_116702	-12.1	triplo_F58I	NCI_61610	-12.3
S108N	NCI_37553	-12.1	triplo_F58V	NCI_84100_b	-12.2
F58V	NCI_84100_b	-12.1	triplo_L40Q	NCI_84100_a	-12.2
S108N	NCI_142335	-12.1	triplo_F58V	NCI_84100_a	-12.2
F58V	NCI_84100_a	-12.1	triplo_F58S	NCI_84100_b	-12.1

Fonte: do autor.

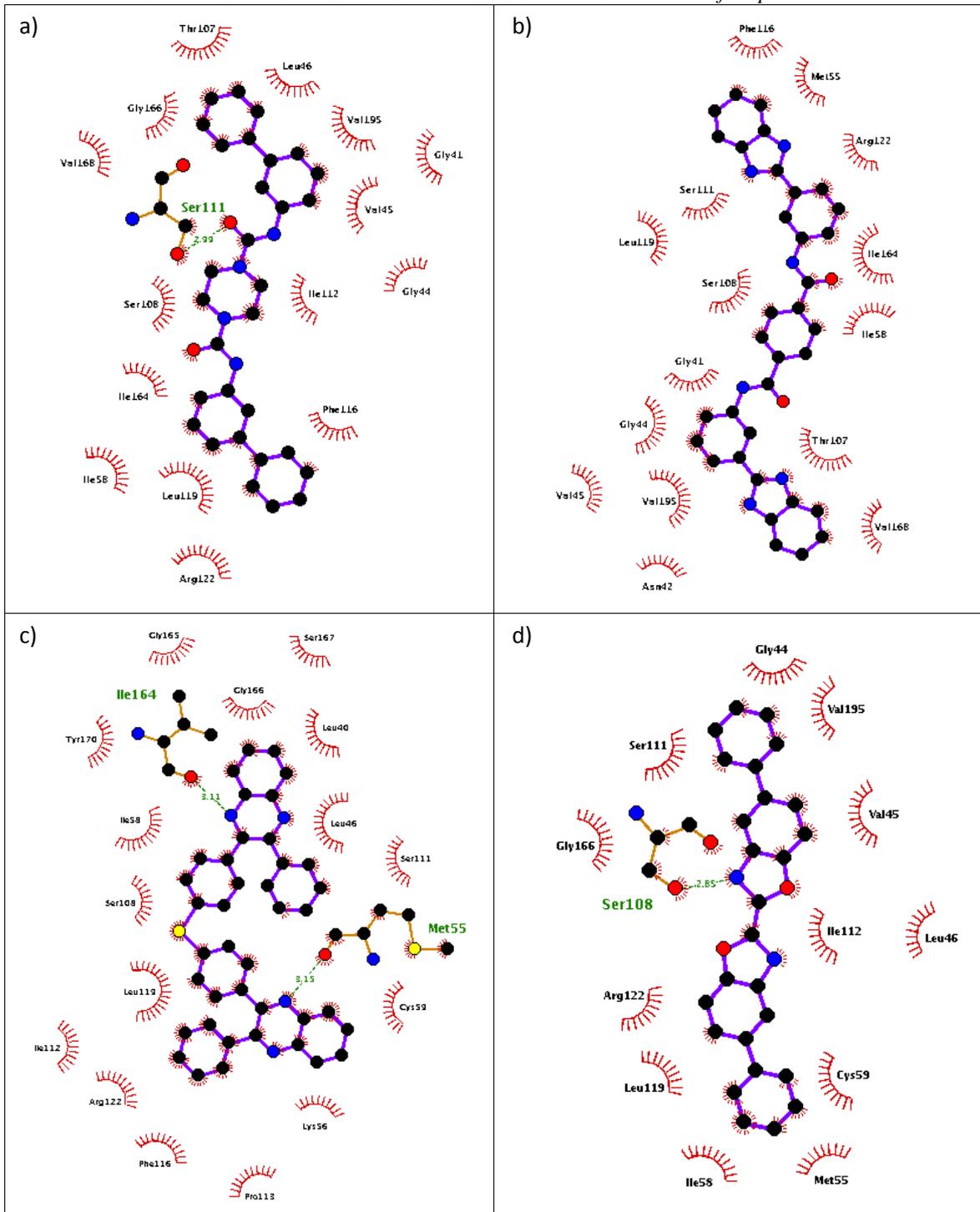
Nota: Utilizou-se o programa AutoDock Vina. Energias em kcal/mol.

Figura 18 – Estrutura 2D dos compostos da biblioteca química **NCI Diversity Set II** com melhor energia de ligação aos modelos mutantes da enzima DHFR-TS de *Plasmodium falciparum*.



Fonte: do autor.

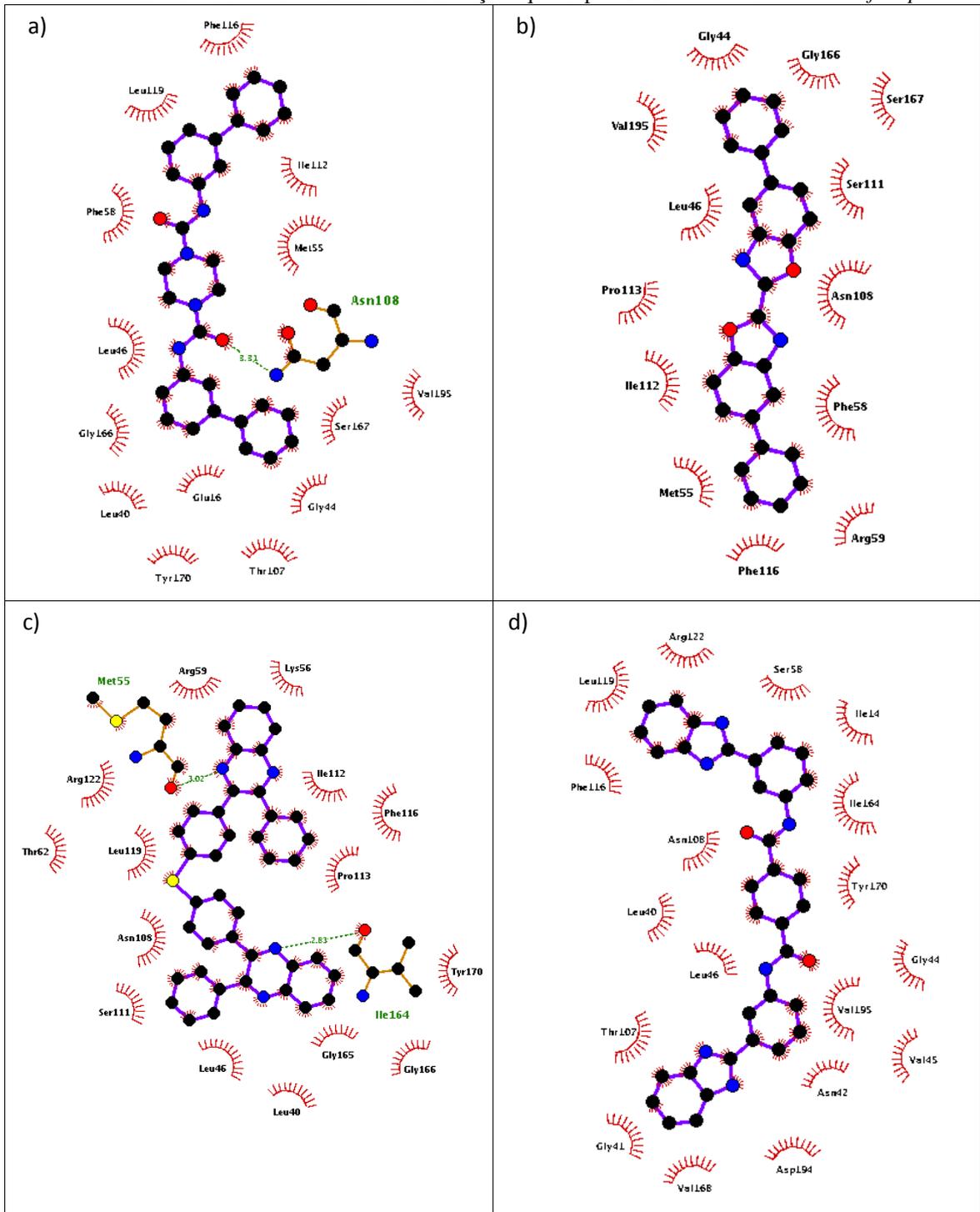
Figura 19 – Interação entre as moléculas com melhor energia de ligação obtidas em *virtual screening* tendo como alvo molecular enzimas mutantes DHFR-TS de *Plasmodium falciparum*.



Fonte: do autor.

Nota: Todas as quatro moléculas estão complexadas com o mutante F58I. a) molécula NCI_37553. b) molécula NCI_61610. c) molécula NCI_293778. d) molécula NCI_84100_a. Figuras geradas pelo programa LigPlot.

Figura 20 – Interação entre as moléculas com melhor energia de ligação obtidas em *virtual screening* tendo como alvo molecular enzimas com mutações quádruplas DHFR-TS de *Plasmodium falciparum*.



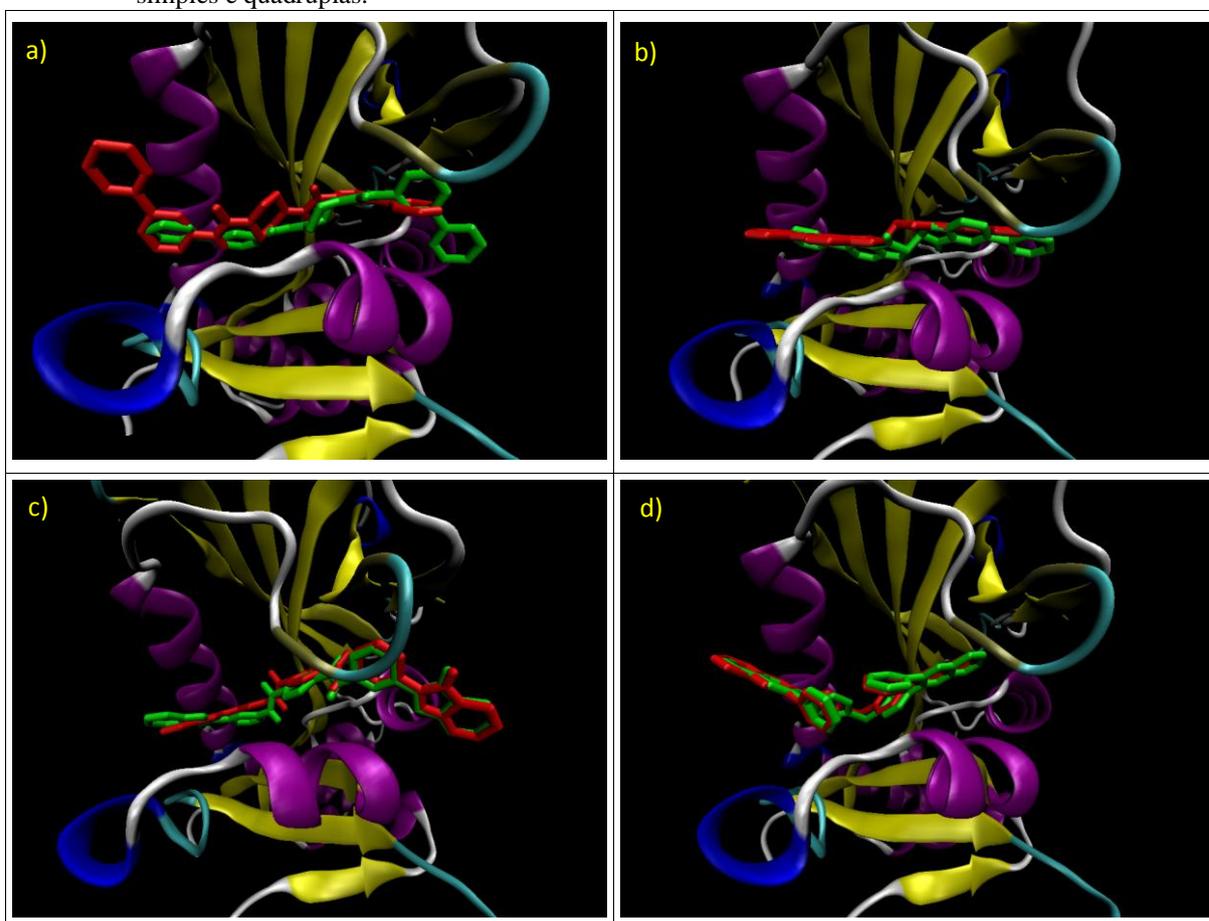
Fonte: do autor.

Nota: Moléculas *a* e *b* complexadas com o mutante A16E/N51I/C59R/S108N, moléculas *c* e *d* complexadas com o mutante N51I/F58S/C59R/S108N. a) molécula NCI_37553. b) molécula NCI_84100_b. c) molécula NCI_293778. d) molécula NCI_61610. Figuras geradas pelo programa LigPlot.

Observa-se pelos gráficos que os ligante se ancoram em um grande poço hidrofóbico, com poucas ou nenhuma interação de hidrogênio, sendo contados pelo menos 12 resíduos

interagindo hidrofobicamente com o ligante (figura 19d) até um total de 18 resíduos (figura 20d), embora as interações hidrofóbicas sejam mais fracas se comparadas a outras como interações de hidrogênio, a somatória daquelas resulta em energia de ligação favorável. A configuração tridimensional dessas moléculas ancoradas ao sítio ativo de enzimas mutantes simples e mutantes quádruplos é comparada em sobreposição na figura 21. Percebe-se que a orientação das mesmas no espaço em relação à enzima é similar, ocupando a maior parte do sítio ativo disponível.

Figura 21 – Visualização da interação entre moléculas com melhor resultantes de *virtual screening* realizado pelo programa AutoDock Vina com enzimas DHFR-TS de *Plasmodium falciparum* com mutações simples e quádruplas.



Fonte: do autor.

Nota: a) em verde: molécula NCI_37553 complexada ao mutante F58I, em vermelho: molécula NCI_37553 complexada ao mutante A16E/N51I/C59R/S108N. b) em verde: molécula NCI_84100_a complexada ao mutante F58I, em vermelho: molécula NCI_84100_b complexada ao mutante A16E/N51I/C59R/S108N. c) em verde: molécula NCI_61610 complexada ao mutante F58I, em vermelho: molécula NCI_61610 complexada ao mutante N51I/F58S/C59R/S108N. d) em verde: molécula NCI_293778 complexada ao mutante F58I, em vermelho: molécula NCI_293778 complexada ao mutante N51I/F58S/C59R/S108N. Figura renderizada pelo programa vmd.

Como são moléculas maiores e com maior liberdade de rotação, tendem a se dobrar e se reorientar, adaptando-se às diferentes topologias resultantes de resíduos mutados, o que não

ocorre com fármacos menores como pirimetamina e cicloguanil, que possuem pouca liberdade de rotação. A molécula NCI_293778 se orientou praticamente do mesmo modo tanto para o mutante simples quanto para o mutante quádruplo, sugerindo que a sua interação ocorre principalmente com resíduos não alterados, já a molécula NCI_37553 teve uma orientação mais divergente em relação ao mutante simples e ao quádruplo, sugerindo mecanismos de interação com pelo menos um dos resíduos mutados. Sugere-se que as moléculas encontradas possam ser usadas como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos capazes de inibir enzimas DHFR-TS tipo mutante.

6.4 MODELAGEM DA REGIÃO DE JUNÇÃO

Uma vez que um grande fragmento da região de junção está ausente nas estruturas cristalográficas disponíveis de DHFR-TS de *Plasmodium falciparum* (resíduos LYS232 a ASP282) e esta não possui homologia com outras proteínas, gerou-se um modelo para a região de junção a partir de vários *templates* que cobriam cada um pequenos trechos da sequência a ser modelada, conforme tabela 6. As coordenadas dos domínios DHFR e TS foram lidas e copiadas diretamente a partir da estrutura 1J3K. O modelo inicial apresentou alguns resíduos de aminoácidos em regiões desfavoráveis do gráfico de Ramachandran, foram feitos refinamentos graduais para corrigir esses resíduos, até o momento em que o modelo final apresentou 84.4% dos resíduos nas regiões mais favoráveis e 15.6% nas regiões adicionalmente permitidas em análise feita pelo PROCHECK. A figura 22 apresenta uma visão geral da enzima com seus domínios DHFR e TS, além da região de junção modelada. A região de junção parece ocupar um bolsão entre os domínios DHFR das cadeias A e B, mais afastadas entre si, enquanto que os domínios TS estão mais próximos e não permitem que a JR se insira no espaço entre os mesmos.

Tabela 6 – Alinhamento dos *templates* usados para a modelagem da região de junção (JR) da enzima DHFR-TS.

PDB	Posição/Cadeia	Sequência
JR	225-289	KMLNEQNCIKGEEKNNNDMPLKNDDKDTCHMKKLTEFYKNVDKYKINYENDD
2ING	1727-1733/X	KMLNEHD-----
4JE5	73-79/A	---DEQNCIK-----
1ID1	141-148/A	-----GEEINNDM-----
2A4V	71-89/A	-----DLSELLNEDNDSISLKKITE-----
1GE9	16-25/A	-----MKKAVEYYKN-----
2H4C	109-119/A	-----NVNTYDKNYEN--
3ACP	23-26/A	-----ENDD

Fonte: do autor.

Nota: JR: Região de Junção

Figura 22 – Estrutura tridimensional do modelo da enzima homodimérica DHFR-TS de *Plasmodium falciparum* apresentando a região de junção.



Fonte: do autor.

Nota: Em azul: domínio DHFR cadeia A, em púrpura: domínio DHFR cadeia B, em ciano: JR cadeia A, em amarelo: JR cadeia B, em verde: domínio TS cadeia A, em vermelho: domínio TS cadeia B. Figura renderizada pelo programa pmv.

6.5 VIRTUAL SCREENING VISANDO A REGIÃO DE JUNÇÃO

Sendo a região de junção extensa (89 resíduos de aminoácidos), uma caixa de procura cobrindo toda sua extensão seria muito grande, com volume de 811026 \AA^3 , tornando

os cálculos mais dispendiosos e menos precisos. A região de junção foi subdividida em 17 partes, contendo 10 resíduos de aminoácidos cada uma, com exceção da última que teve 9. Para cada parte construiu-se uma caixa de procura, cada caixa englobando os seguintes resíduos: grid1: resíduo LYS232 ao LYS241; grid2: resíduo GLN237 ao ASN246; grid3: resíduo GLY242 to LEU251; grid4: resíduo ASN247 to LYS256; grid5: resíduo LYS252 to MET261; grid6: resíduo ASP257 to GLU266; grid7: resíduo LYS262 to VAL271; grid8: resíduo PHE267 to ILE276; grid9: resíduo ASP272 to ASP281; grid10: resíduo ASN277 to GLU286; grid11: resíduo ASP282 to VAL291; grid12: resíduo GLU287 to ASN296; grid13: resíduo TYR292 to GLU301; grid14: resíduo LYS297 to SER306; grid15: resíduo LYS302 to ASP311; grid16: resíduo ILE307 to ASN316; grid17: resíduo PHE312 to TYR320.

Os espaços de procura foram centralizados no centro de massa dos resíduos pertencentes a caixa e a largura da aresta em cada eixo foi o mínimo para incluir totalmente os respectivos aminoácidos. As caixas foram feitas com passo 5, ou seja, a cada 5 resíduos uma nova caixa era formada, isso para se evitar perder possíveis regiões de interação presentes nas interseções entre as caixas. O *virtual screening* foi realizado com a mesma biblioteca química utilizada anteriormente, a tabela 7 apresenta os melhores resultados encontrados.

Tabela 7 – Melhores *scores* de *docking* molecular visando a região de junção da enzima DHFR-TS de *Plasmodium falciparum*.

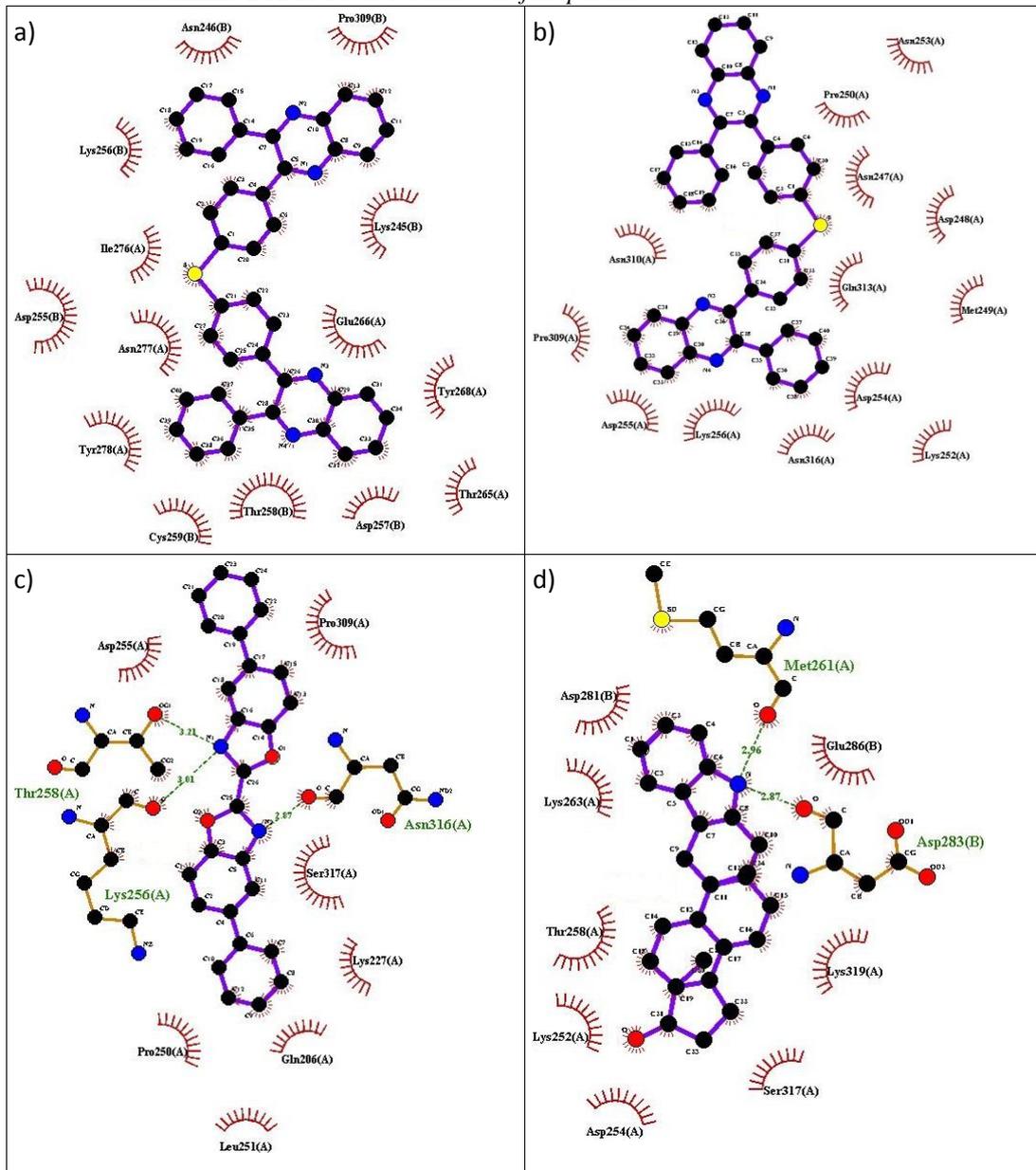
Composto	Grid box	Energia
NCI_293778	grid1	-11.8
NCI_293778	grid10	-11.4
NCI_84100_b	grid10	-11.1
NCI_60785_b	grid2	-11.1
NCI_84100_a	grid10	-11.1
NCI_80997_a	grid10	-11.0
NCI_84100_b	grid2	-10.8
NCI_84100_a	grid2	-10.8
NCI_293778	grid2	-10.8
NCI_61610	grid10	-10.8
NCI_97920	grid10	-10.6
NCI_308835	grid10	-10.5
NCI_293778	grid8	-10.5
NCI_345845	grid10	-10.5
NCI_122819_b	grid10	-10.4
NCI_60785_a	grid2	-10.3
NCI_37553	grid10	-10.3
NCI_97920	grid1	-10.3

Fonte: do autor.

Nota: Energias em kcal/mol, cálculo realizado pelo programa AutoDock Vina.

A região de procura definida pelo grid10 é a que mais aparece no topo da tabela, indicando ser este um possível sítio de interação para novos fármacos não competitivos.

Figura 23 – Plot da interação das moléculas com melhor energia de ligação junto á região de junção da enzima DHFR-TS de *Plasmodium falciparum*.



Fonte: do autor.

Nota: a) Molécula NCI_293778 ancorada na região definida pelo grid1. b) Molécula NCI_293778 ancorada na região definida pelo grid10. c) Molécula NCI_84100 ancorada na região definida pelo grid10. d) Molécula NCI_60785 ancorada na região definida pelo grid2. Figuras geradas pelo programa LigPlot.

A molécula que apresentou melhor energia de ligação foi a NCI_293778, uma das que foram encontradas no *docking* com enzimas mutantes, sugerindo uma possível via de inibição não competitiva. Ela aparece repetidas vezes na tabela 7, tendo uma boa energia de

ligação nos sítios definidos pelo grid1, grid10, grid2 e grid8. Na figura 23 há um plot da interação entre as moléculas com melhor score observadas para a região de junção.

A molécula NCI_293778 apresenta interações hidrofóbicas com 14 e 13 resíduos de aminoácidos nas áreas de procura do grid1 e grid10, respectivamente; o maior número de resíduos com os quais interage pode explicar o melhor score encontrado quando comparado a outras moléculas, que embora tenha-se detectado interações de hidrogênio (figura 23c e 23d), possuem menor número de interações hidrofóbicas (7 e 8, respectivamente). Uma vez que a região de junção não é o sítio catalítico da enzima, de forma a não apresentar cavidades em sua superfície, uma dos possíveis mecanismos de ação de um fármaco pode consistir no desenovelamento da JR, que desestabilizaria a enzima, prejudicando a atividade do domínio TS, dessa forma, quanto mais resíduos da JR interagirem com uma molécula candidata a fármaco, mais provável será o desenovelamento nas proximidades da superfície de contato. As outras moléculas encontradas anteriormente no *docking* com enzimas mutantes (NCI_84100, NCI_375553 e NCI_61610) também aparecem com boa energia de interação junto à região de junção.

A partir da estrutura da molécula NCI_293778 realizou-se uma pesquisa no banco de dados ZINC a procura de homólogas que pudessem ter afinidade de ligação igual ou superior à encontrada inicialmente. Foram recuperadas moléculas com até 70% similaridade, num total de 103. Essas novas moléculas foram submetidas a experimentos de *docking* como descrito anteriormente. A tabela 8 mostra o resultado do *virtual screening* com as moléculas homólogas obtidas do ZINC. A molécula ZINC03844856 aparece nas três primeiras posições da tabela, nas áreas de procura do grid10, grid1 e grid3, respectivamente, indicando ser esta também uma molécula com boa afinidade de ligação em mais de um sítio da JR. A figura 24 apresenta a estrutura 2D desta molécula e um plot da interação vista na área de procura do grid10. Desta vez, além de se ver um grande poço hidrofóbico, com dez resíduos, vê-se três interações de hidrogênio junto aos resíduos LYS256, ASP254 e SER317, cada um interagindo com um nitrogênio de uma das subunidades quinoxalinil do ligante. Mais uma vez a área de procura do grid10 é a que mais aparece no topo da tabela, sugerindo que esta sub-região apresenta melhores condições para o acoplamento de um ligante e em estudos futuros possa se focar apenas nesta região ao invés de se testar a ligação de compostos em toda a extensão da região de junção.

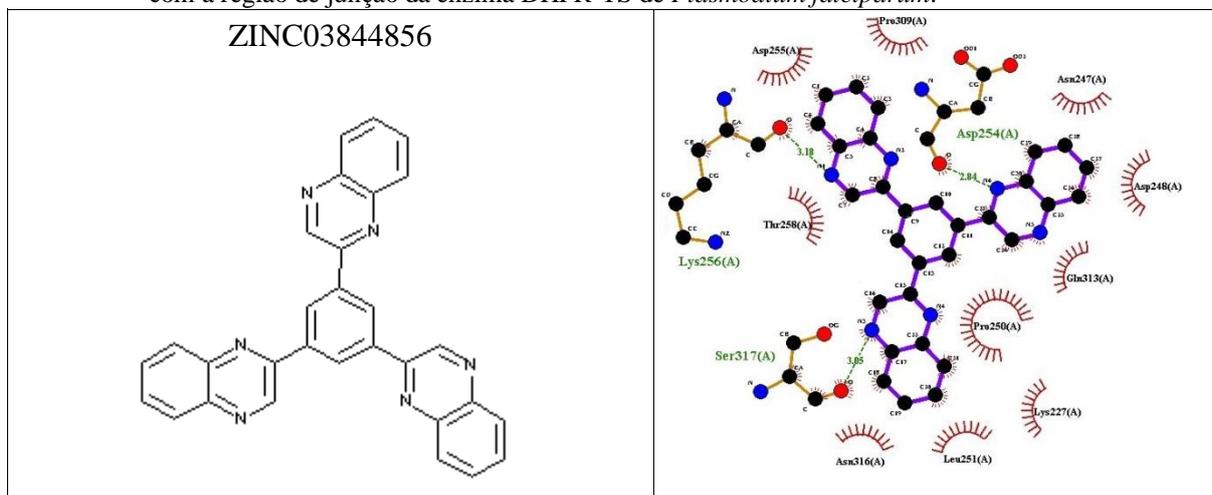
Tabela 8 – Resultado de *virtual screening* para moléculas homólogas à NCI_293778, tendo-se como alvo a região de junção da enzima DHFR-TS.

Composto	Grid box	Energia
ZINC03844856	grid10	-11.6
ZINC03844856	grid1	-11.1
ZINC03844856	grid3	-10.6
ZINC03122246	grid3	-10.5
ZINC01566272	grid10	-10.4
ZINC20530226	grid3	-10.4
ZINC20530226	grid10	-10.2
ZINC02304181	grid10	-10.1
ZINC03122246	grid10	-9.9
ZINC02184863	grid10	-9.9
ZINC02307871	grid10	-9.8
ZINC20530226	grid1	-9.8
ZINC01592864	grid3	-9.7
ZINC02895958	grid10	-9.7

Fonte: do autor.

Nota: Energias em kcal/mol, cálculos realizados pelo programa AutoDock Vina.

Figura 24 – Estrutura 2D da molécula ZINC03844856, análoga à NCI_293778 e plot da interação da mesma com a região de junção da enzima DHFR-TS de *Plasmodium falciparum*.



Fonte: do autor.

Nota: Gráfico plotado pelo programa LigPlot.

7 CONCLUSÃO

A malária, além de ser uma das doenças mais insidentes no mundo, apresenta sérios problemas de resistência a fármacos, devido em parte a mutações pontuais que ocorrem nas proteínas alvos dos fármacos, fazendo-se necessário o desenvolvimento de novos fármacos para combater a emergência de plasmócitos resistentes. A enzima DHFR-TS é um alvo molecular bem estudado, cujas formas mutantes resistentes são conhecidas. A fim de se investigar novas mutações que pudessem também conferir resistência foram gerados modelos mutantes por meio de modelagem computacional, entre os mecanismos de resistência encontrados tem-se o choque estereoquímico entre proteína e fármaco causado pela troca de um resíduo por outro mais volumoso e a perda de interações devido a mutações em que os aminoácidos substituídos possuem propriedades diferentes, como a substituição de resíduo polar por apolar. Por meio da seleção de compostos da biblioteca química **NCI Diversity Set II** por *virtual screening* foram encontradas moléculas que interagiram bem tanto com o sítio ativo das enzimas tipo mutante quanto com a região de junção (NCI_84100, NCI_37553, NCI_61610 e NCI_293778), além de uma homóloga do banco de dados ZINC com boa interação na região de junção (ZINC03844856). Estas moléculas poderão ser usadas como protótipo para o desenho de novos fármacos capazes de inibir enzimas mutantes por mecanismos competitivos e não competitivos.

REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, p. 403-410, 1990.

BHAT, H. R. et al. Antimalarial activity and docking studies of novel bifunctional hybrids derived from 4-aminoquinoline and 1,3,5-triazine against wild and mutant malaria parasites as *pf*-DHFR inhibitor. **RSC Adv.**, v. 3, p. 2942-2952, 2013.

BZIK, D. J. et al. Molecular cloning and sequence analysis of the *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 84, p. 8360-8364, 1987.

CAMMACK, N. Exploiting Malaria Drug Resistance to Our Advantage. **Science**, v. 333, p. 705-706, 2011.

CHAIANANTAKUL, N.; SIRAWARAPORN, R.; SIRAWARAPORN, W. Insights into the role of the junctional region of *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase-thymidylate syntase. **Malaria Journal**, v. 12, p. 1-13, 2013.

COWMAN, A. F. et al. Amino acid changes linked to pyrimethamine resistance in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum*. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 85, p. 9109-9113, 1988.

DASGUPTA, T. et al. Exploiting structural analysis, in silico screening, and serendipity to identify novel inhibitors of drug-resistant falciparum malaria. **Acs Chem. Biol.**, v. 4, p. 29-40, 2009.

DIVERSITY SET IV INFORMATION. Disponível em http://dtp.nci.nih.gov/branches/dscb/div2_explanation.html. Acesso em 23 Maio 2014.

ELSENSTEIN, M. Holding out for reinforcements: Signs of emerging drug resistance are turning the hunt for new malaria treatments into a race against the clock. **Nature**, v. 484, sem página., 2012.

ESWAR, N. et al. Tools for comparative protein structure modeling and analysis. **Nucleic Acids Res.**, v. 31, p. 3375-3380, 2003.

FIDOCK, D. A. et al. Mutations in the *P. falciparum* Digestive Vacuole Transmembrane Protein PfCRT and Evidence for Their Role in Chloroquine Resistance. **Mol Cell**, v. 6, p. 861-871, 2000.

FISHER, N. et al. Cytochrome b Mutation Y268S Conferring Atovaquone Resistance Phenotype in Malaria Parasite Results in Reduced Parasite *bc1* Catalytic Turnover and Protein Expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, p. 9731-9741, 2012.

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

GAHTORI, P. et al. Antimalarial evaluation and docking studies of hybrid phenylthiazolyl-1,3,5-triazine derivatives: A novel and potential antifolate lead for Pf-DHFR-TS inhibition. **Exp Parasitol**, v. 130, p. 292-299, 2012.

HOLT, R. A. et al. The Genome Sequence of the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae*. **Science**, v. 298, p. 129-149, 2002.

HUNT, S. Y. et al. Identification of the optimal third generation antifolate against *P. falciparum* and *P. vivax*. **Mol Biochem Parasit**, v. 144, p. 198-205, 2005.

HUNT, S. Y.; REZVANI, B. B.; SIBLEY, C. H. Novel alleles of *Plasmodium falciparum dhfr* that confer resistance to chlorcycloguanil. **Mol Biochem Parasitol**, v. 139, p. 25-32, 2005.

IRWIN, J. J. et al. ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology. **J Chem Inf Model**, v. 52, p. 1757-1768, 2012.

JOHNSON, D. J. et al. Evidence for a Central Role for PfCRT in Conferring *Plasmodium falciparum* Resistance to Diverse Antimalarial Agents. **Mol Cell**, v. 15, p. 867-877, 2004.

KANEHISA, M. et al. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular datasets. **Nucleic Acids Res.**, v. 40, p. D109-D114, 2012.

LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **J. Appl. Cryst.**, v. 26, p. 283-291, 1993.

LAW, V. et al. DrugBank 4.0: shedding new light on drug metabolism. **Nucleic Acids Res.** v. 42, p. D1091-D1097, 2013.

LI, J.; ZHOU, B. Biological Actions of Artemisin: Insights from Medicinal Chemistry Studies. **Molecules**, v. 15, p. 1378-1397, 2010.

MENG, X. Y. et al. Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. **Curr Comput Aided Drug Des.**, v. 7, p. 146-157, 2011.

MHARAKURWA, S. et al. Malaria antifolate resistance with contrasting *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase (DHFR) polymorphisms in humans and *Anopheles* mosquitoes. **PNAS**, v. 108, p. 18796-18801, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia prático de tratamento da malária no Brasil**. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

MONTOYA, R. **Resistência de Plasmódios aos Antimaláricos**. In Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias / editor José Rodrigues Coura. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, 2v. : il.

MU, J. et al. *Plasmodium falciparum* genome-wide scans for positive selection, recombination hot spots and resistance to antimalarial drugs. **Nature Genetics**, v. 42, p. 268-271, 2010.

MUKESH, B.; RAKESH, K. Molecular Docking: A Review. **IJRAP**, v. 2, p. 1746-1751, 2011.

NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

NIXON, G. L. et al. Antimalarial pharmacology and therapeutics of atovaquone. **J Antimicrob Chemother**, v. 68, p. 977-985, 2013.

PASVOL, G. Malaria. **Protozoal Tropical Infections**, v. 33, p. 39-43, 2005.

PRADINES, B. et al. Quinine-Resistant Malaria in Traveler Returning from Senegal, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, p. 546-548, 2010.

REY, L. **Bases da parasitologia médica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

REY, L. **PARASITOLOGIA: PARASITOS E DOENÇAS PARASITÁRIAS DO HOMEM NAS AMÉRICAS E NA ÁFRICA**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,

2001.

SAUERWEIN, R. W.; ROESTENBERG, M.; MOORTHY, V. S. Experimental human challenge infections can accelerate clinical malaria vaccine development. **Nature Reviews|Immunology**, v. 11, p. 57-64, 2011.

SHETTY, P. The Numbers Game: Nature Outlook maps the challenges in tackling the malaria epidemic. **Nature**, v. 484, s. p., 2012.

SIDHU, A. S.; PINARD-VERDIER, D.; FIDOCK, D. A. Chloroquine Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria Parasites Conferred by pfert Mutations. **Science**, v. 298, p. 210-213, 2002.

SNOW, R. W. et al. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. **Nature**, v. 434, p. 214-217, 2005.

SUH, K. N.; KAIN, K. C.; KEYSTONE, J. S. Malaria. **CMAJ**, v. 170, p. 1693-1702, 2004.

ŠALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. **J. Mol. Biol.**, v. 234, p. 779-815, 1993.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. **J Comput Chem**, v. 31, p.455-461, 2010.

WHITE, N. J.; OLLIARO, P. L. Strategies for the prevention of antimalarial drug resistance: rationale for combination chemotherapy for malaria. **Parasitol. Today**, v. 12, p. 399-401, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000-2010**. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Guidelines for the treatment of Malaria**. 2. ed. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **World malaria report:2013**. Geneva, World Health Organization, 2013. Disponível em <http://www.who.int/iris/bitstream/10665/97008/1/9789241564694_eng.pdf>. Acesso em 8 Fev. 2013

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Severe falciparum malaria**. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 94, suppl. 1, p. 1-90, 2000.

WONG, R. P. et al. Molecular Assessment of *Plasmodium falciparum* Resistance to Antimalarial Drugs in Papua New Guinea Using an Extended Ligase Detection Reaction Fluorescent Microsphere Assay. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 55, p.798-805, 2011.

YUVANIYAMA, J. et al. Insights into antifolate resistance from malarial DHFR-TS structures. **Nat. Struct. Biol.**, v. 10, p. 357-365, 2003.