



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

Programa de Pós-Graduação em  
Toxicologia e Análises toxicológicas

**Busca por inibidores seletivos de Sirtuína 2 de *T. cruzi*  
empregando técnicas de planejamento de fármacos baseado  
na estrutura do receptor**

Glaucio Monteiro Ferreira

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini

São Paulo  
2018

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

Programa de Pós-Graduação em  
Toxicologia e Análises toxicológicas

**Busca por inibidores seletivos de Sirtuína 2 de *T. cruzi*  
empregando técnicas de planejamento de fármacos baseado  
na estrutura do receptor**

Glaucio Monteiro Ferreira

Versão original

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini

São Paulo

2018

Glaucio Monteiro Ferreira

Busca por inibidores seletivos de Sirtuína 2 de T. cruzi empregando técnicas de planejamento de fármacos baseado na estrutura do alvo

Comissão Julgadora  
da  
Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Prof. Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini  
orientador

---

Profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro  
1º. examinador/presidente

---

Prof. Dr. Daniel Fábio Kawano  
2º. examinador

---

Profa. Dr. Maurício da Silva Baptista  
3º. examinador

São Paulo, \_\_\_\_ de 2018.

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

### Ficha Catalográfica

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

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:  
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

F383b Ferreira, Glaucio Monteiro  
Busca por inibidores seletivos de Sirtuína 2 de *T. cruzi*  
empregando técnicas de planejamento de fármacos baseado na  
estrutura do receptor / Glaucio Monteiro Ferreira . -- São  
Paulo, 2018 .  
85 p.

Tese ( doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da  
Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas  
e Toxicológicas.

Orientador: Trossini, Gustavo Henrique Goulart

1. Fármaco : Planejamento : Química farmacêutica . 2 .  
Doença de Chagas. I. T. II. Trossini, Gustavo Henrique  
Goulart, orientador.

615 . 19 CDD

# DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente à Deus, sem ele nem aqui eu estaria. Aos meus pais, Alice Monteiro Braga Ferreira e Gilmar Ferreira que são minha base e me ensinaram tudo que sei até hoje, sem eles nada eu seria.

A minha doce e querida avó Cilene Dalva Monteiro Silva (*In memoriam*), uma mulher guerreira que mudou a minha vida, devo tudo a ela.

Aos meus irmãos, David e Rodolfo. Vocês fazem parte desse trabalho, sou o que sou devido aos inúmeros esforços que fizeram para eu conseguir chegar até aqui.

A minha doce companheira Mariana Borges, fundamental em todos os momentos da minha vida, uma pessoa com quem aprendo diariamente a ser melhor.

Aos meus amigos, Iuri, Tiego, Luiz Gustavo, Fernando, Elys, João Paulo, Daniel e Juliana Mello, que construíram esse trabalho junto comigo nesse período.

A minha grandiosíssima amiga Drielli Gomes Vital Fujii, que com sua ternura fez a minha vida em São Paulo ser melhor sendo essencial em todos os momentos que estive/estou aqui.

Ao Dr. Thales Kronenberg, por ser uma pessoa ímpar em todos os sentidos tanto como profissional como amigo, pessoas assim valem ouro.

Aos meus amigos Vitor, Jecsan e Paulo, que são a minha companhia diária e fazem momentos ruins em bons e bons em melhores ainda.

Ao meu ex-orientador, Professor Doutor Pedro Alvez Bezerra Moraes, por confiar no meu trabalho durante minha graduação, por me passar suas experiências e oportunidades, pela amizade e ensinamentos.

Ao meu orientador, Professor Doutor Gustavo Henrique Goulart Trossini, por confiar no meu trabalho, por me passar suas experiências, pela amizade e ensinamentos.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF/USP) pela oportunidade.

À agência de fomento, CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo apoio financeiro.

À todos os colaboradores deste trabalho, sem eles o trabalho não estaria completo.

Aos professores da FCF/USP, que de uma maneira ou de outra contribuíram para o meu crescimento.

Aos meus colegas do LITEC que são responsáveis por tudo, me ensinaram, ajudaram no que sabiam, e de uma forma especial, agradeço ao Prof. Dr. Vinícius Maltarollo que foi quem iniciou e finalizou todo esse trabalho junto comigo, me orientando e passando todos conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Marcelo Castilho, Prof. Dr. Sandro Roberto Marana, Prof. Dr. Flavio Emery Silva, Prof. Dr. Ernani Pinto Junior e demais professores que me ensinaram e compartilharam seus enriquecedores ensinamentos.

*“Pássaros criados em gaiolas acreditam que voar é  
uma doença”*

*(Alejandro Jodorowsky)*

## RESUMO

A doença de Chagas, causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi*, acomete entre 6 a 8 milhões de pessoas em todo o mundo. Conhecida como tripanossomíase americana, por ter sido considerada endêmica apenas na América Latina, esta doença, se espalhou para outros continentes devido aos movimentos migratórios se tornando um problema de saúde mundial. Estima-se que 56.000 novos casos e cerca de 12.000 mortes por complicações relacionadas à doença de Chagas anualmente. A quimioterapia disponível para o tratamento é composta apenas por dois fármacos, nifurtimox e benznidazol, no entanto são pouco eficazes na fase crônica da doença. Estes fármacos apresentam, ainda, efeitos adversos graves e resistência por parte de algumas cepas do parasita. Diante deste panorama, é iminente a necessidade da busca de novos fármacos contra *T. cruzi*. Para a busca racional de novos quimioterápicos antiparasitários é fundamental a identificação e caracterização de vias metabólicas essenciais à sobrevivência dos parasitas. Assim, a enzima sirtuína 2 - *Silent Information Regulator 2* (Sir2), tem importante papel para a infecção por *T. cruzi*, pois está totalmente envolvida no seu ciclo celular do parasita. Esta é uma enzima  $\text{NAD}^+$  dependente da classe III histona desacetilases, e se mostra como um interessante alvo bioquímico para o desenvolvimento de antichagásicos. A disponibilidade do sequenciamento genômico da Sir2 nos permite utilizar estratégias de planejamento de fármaco baseado no receptor (*SBDD* - *Structure Based Drug Design*) na identificação de candidatos a fármacos para essa doença. Entre as técnicas modernas de *SBDD* utilizadas, a triagem virtual possibilita identificar e selecionar inibidores enzimáticos potentes e seletivos para o alvo escolhido. Assim, neste trabalho, foi construído por meio da técnica de modelagem comparativa o modelo da enzima Sir2 de *T. cruzi*. Uma simulação por dinâmica molecular de 200ns, foi realizada para averiguar a estabilidade do modelo obtido. Diante da estabilização do modelo a partir de 100ns, o mesmo foi validado utilizando análise de clusters, RMSD (*Root-mean-square Deviation*) e análises de frequência de ligações de hidrogênio com o Cofator ( $\text{NAD}^+$ ) e os aminoácidos do sítio de catálise foram observadas, estes passos de simulação e validação foram realizados no programa DESMOND. Com o modelo robusto, os campos de interações moleculares (MIFs) foram gerados no programa GRID (Molecular Discovery v2.1) com o intuito de elucidar as regiões favoráveis a interação com a enzima em relação a propriedades físico-químicas da Sir2. A partir dos MIFs favoráveis a Sir2 de *T. cruzi* foi possível a construção de dois modelos farmacofóricos, o qual se baseou nas interações do Cofator ( $\text{NAD}^+$ ) e o sítio de catálise (Nicotinamida). O mesmo foi aplicado como filtro para Triagem Virtual no programa UNITY da plataforma SYBYL X 2.0, utilizando os bancos de dados ZINC<sup>15</sup> e GSK. A triagem resultou na seleção de 8 compostos candidatos a inibidores. Destes foram adquiridos 6 compostos por serem considerados mais promissores devido a complementariedade molecular. Estes foram testados contra a enzima de *T. cruzi* Sir2. Após o ensaio foi possível avaliar a potência de 4 compostos, sendo o composto CDMS-01 ( $\text{IC}_{50} = 39,9\mu\text{M}$ ) o mais promissor que será submetido à processos de otimização molecular.

**Palavras-chave:** Sirtuína 2, dinâmica molecular (DM), Planejamento de Fármacos, SBDD e Cofator ( $\text{NAD}^+$ ).



## ABSTRACT

Chagas disease, caused by the parasite *Trypanosoma cruzi*, affects between 6 and 8 million people worldwide. Also known as American trypanosomiasis, because it is considered endemic only in Latin America, but has spread to other continents due to migratory movements. It is estimated that 56,000 new cases and about 12,000 deaths from complications related to Chagas disease annually. The chemotherapy available for treatment consists of only two drugs, nifurtimox and benznidazole, however these are poorly effective in the chronic phase. These drugs also have serious adverse effects and resistance from strains of the parasite. Faced with this scenario, the need to search for new drugs against *T. cruzi* is imminent. For the drug planning for new antiparasitic chemotherapeutics, the identification and characterization of metabolic pathways essential to the survival of parasites is fundamental. Therewith, the sirtuin 2 - Silent Information Regulator 2 (Sir2) enzyme has an important role for *T. cruzi* infection, since Sir2 in the parasite is totally involved in its cell cycle. This is an NAD<sup>+</sup>-dependent enzyme of class III histone deacetylases, and it shows an interesting biochemical target for the development of antichagasic. The availability of Sir2 genomic sequencing allows us to use SBDD (Structure Based Drug Design) strategies in identifying drug candidates for this disease. Among the modern techniques of SBDD used, virtual screening makes it possible to identify and select potent and selective enzyme inhibitors for the chosen target. The model of the *T. cruzi* Sir2 enzyme was constructed using the comparative modeling technique. A molecular dynamics simulation of 200ns was performed to ascertain the stability of the obtained model. Considering the stabilization of the model from 100ns, it was validated using cluster analysis, Root-mean-square Deviation (RMSD) and hydrogen bond frequency analyzes with Cofactor (NAD<sup>+</sup>) and the amino acids of the catalysis site were observed, these simulation and validation steps were performed in the DESMOND program. With the robust model, the molecular interaction fields (MIFs) were generated in the GRID program (Molecular Discovery v2.1) in order to elucidate the regions favorable to the interaction with the enzyme in relation to the physical-chemical properties of Sir2. From the MIFs favorable to Sir2 of *T. cruzi* it was possible to construct two pharmacophoric models, which was based on the interactions of Cofactor (NAD<sup>+</sup>) and the catalysis site (Nicotinamide). It was also applied as a Virtual screening filter in the UNITY program of the SYBYL X 2.0 platform, using the ZINC<sup>15</sup> and GSK databases. Screening resulted in the selection of 8 inhibitor candidate compounds. Six compounds were obtained from the screening, because they were considered more promising, and were tested against *T. cruzi* Sir2 enzyme. After the assay it was possible to evaluate the potency of 4 compounds, the most promising compound being CDMS-01 (IC<sub>50</sub> = 39.9 μM) that will be submitted to molecular optimization processes.

**Keywords:** Sirtuin 2, Molecular dynamics (DM), Drug Planning, SBDD, and Cofactor (NAD<sup>+</sup>).

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Fármacos autorizados pela FDA em 2018.	19
<b>Figura 2:</b> Estruturas dos antichagásicos disponíveis.	23
<b>Figura 3:</b> Sirtuina 2 (Sir2) visão geral do mecanismo de desacetilação envolvido na regulação epigenética focada neste trabalho.	27
<b>Figura 4:</b> Estrutura química dos inibidores de sirtuína conhecidos, sirtinol, cambinol e salermida.	30
<b>Figura 5:</b> Regiões importantes da Sirtuína 2 humana (pdb:3ZGV).	47
<b>Figura 6:</b> Alinhamento da sequência de <i>tcSir2</i> com a <i>hSir2</i> (PDB: 3ZGV)	50
<b>Figura 7:</b> Gráfico de predição da região de desordem para construção do modelo de <i>tcSir2</i> , no eixo X os aminoácidos e no eixo Y Å, onde é feita uma predição de movimentação desses resíduos baseado em dados teóricos de cada resíduo.	51
<b>Figura 8:</b> Gráfico de Ramachandran e qualidade do modelo: A - <i>hSir2</i> (0,0% de outlier) e B - <i>tcSir2</i> (0,5% de outlier) obtido por modelagem comparativa	52
<b>Figura 9:</b> A estrutura do complexo obtido após o Docking do co-fator (NAD+).	53
<b>Figura 10:</b> Análise da trajetória da DM que foram realizadas em triplicatas; A – Root Mean Square deviation e B - Root-mean-square fluctuation. Observa-se, tanto no gráfico A e como no B, uma parsimônia entre as réplicas mostrando que as mesmas se estabilizam da mesma maneira, mesmo mudando seu valor de alimentação.	58
<b>Figura 11:</b> Ramachandran do modelo após a DM	59
<b>Figura 12:</b> Modelo <i>tcSir2</i> – Inicial até a final ; A – Inicial; B – Após 200ps de DM; C – Após 100ns de DM; D – Após 150ns de DM; E – Após 200ns de DM.	30
<b>Figura 13:</b> A - frequência de ligações de hidrogênio e B - frequência interações hidrofóbicas entre a NAD- <i>tcSir2</i> em toda a simulação DM e durante a estabilização do sistema.	61
<b>Figura 14:</b> MIFs gerados no programa GRID v22c. (sonda DRY); A – NAD <sup>+</sup> e B – Sítio de catálise (Nicotinamida).	65
<b>Figura 15:</b> MIFs gerados no programa GRID v22c. (sonda O2); A – NAD <sup>+</sup> e B – Sítio de catálise (Nicotinamida)	66
<b>Figura 16:</b> MIFs gerados no programa GRID v22c. (sonda H2O); A – NAD <sup>+</sup> e B – Sítio de catálise (Nicotinamida)	68 73
<b>Figura 17:</b> Modelo farmacofórico baseado na estrutura do cofator: A – Estrutura do cofator (NAD <sup>+</sup> ) e B – Distâncias entre dos pontos dos modelo farmacofórico. Modelo farmacofórico baseado no sítio de catalise: C – Sítio de catálise (Nicotinamida) e D - Distâncias entre dos pontos dos modelo farmacofórico.	68 73
<b>Figura 18:</b> Exemplo de como foi realizado a inspeção visual. A – CDMS-06, pode-se observar que contempla quase todos os pontos propostos no modelo farmacofórico baseado pelo NAD <sup>+</sup> ; B – Molécula não selecionada para aquisição, modo de ligação indesejável onde não respeitou os pontos de interações propostos no modelo farmacofórico baseado pelo NAD <sup>+</sup> .	73
<b>Figura 19:</b> Protocolo de triagem virtual realizado contendo cada etapa desde a construção do banco de dados, aplicação do filtro molecular com a as características da regra de 5 de Lipinski, o modo de realização da busca pelo UNITY e o número de compostos obtido em cada etapa de filtragem.	75
<b>Figura 20:</b> Compostos adquiridos para os ensaios cinéticos enzimáticos.	82
<b>Figura 21:</b> Metodologia de ensaio cinético enzimático para <i>tcSir2</i> com as	84

estapas dividida por reação.

**Figura 22:** Atividade enzimática da *tcSir2*. A – Atividade enzimática com variação do tempo; B – curva de Michaelis–Menten do substrato e C – curva de Michaelis–Menten do cofator (NAD<sup>+</sup>). 85

**Figura 23:** Avaliação de potência do composto CDMS-01. A – Avaliação do concentração inibitória mínima para atingir 50% de inibição e B – Avaliação da afinidade do compostos em relação a *tcSir2*. 85

**Figura 24:** Porcentagem de inibição do composto CDMS-01 em várias concentrações. Caracterizando o fenômeno de precipitação em altas concentrações desse inibidor. A – concentrações de CDMS-01 variando de 300 µM até 0,1 µM e B – concentrações de CDMS-01 de 50 µM até 3 µM.. 86

**Figura 25:** Predição do mecanismo competitivo do CDMS-01 em relação ao cofator (NAD<sup>+</sup>), usando as condições testada e concentrações de 50 µM até 3 µM de NAD<sup>+</sup> e CDMS-01 frente a *tcSir2*.

**Figura 26:** Simulação de DM dos compostos que apresenram atividade frente a *tcSir2*. 86

**Figura 27:** Porcentagen de contatos do composto CDMS-01 ao longo do tempo de simulação de DM. A – Contatos de ligação de hidrogênio e B – Contatos de interçção hidrofóbica 90

**Figura 28:** Pose representativa da simulação por DM, no momento que o composto CDMS-01 está fazendo ligação de hidrogênio com o resíduo de Asn-123. 86 92

**Figura 29:** Pose representativa da simulação por DM do composto CDMS-01, evidenciando a sugestão de modificação molecular para alcançar os resíduos Ser-215 e Glu-217. 87 94

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Mudanças da doença de Chagas em 21 países endêmicos da América Latina, nos anos de 1990, 2000, 2006 e 2010 24

**Tabela 2:** Tabela com compostos bioativos descobertos por meio de técnicas de triagem virtual. 42

**Tabela 3:** Tabela com a identidade em relação a sequência de *T. cruzi* para todos os tripanosomítedos encontrados na plataforma NCBI, sequências hipotéticas/putative (XP), onde foram aferidas as porcentagem de similaridade com a sequência utilizada no estudo. 49

**Tabela 4:** Sondas utilizadas para calcular os campos de interações. 64

**Tabela 5:** Predições de ADME realizada com os compostos com a potência avaliada. 91

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**SBDD** → *Structure Based Drug Design*

**LBDD** → *Ligand Based Drug Design*

**tcSir2** → *Tripanossoma cruzi* Sirtuina 2  
**hsSir2** → *Homo sapiens* Sirtuina 2  
**LBVS** → *Ligand Based Virtual Screening*  
**SBVS** → *Structure Based Virtual Screening*  
**DM** → Dinâmica Molecular  
**MC** → Mecânica Clássica  
**MQ** → Mecânica Quântica  
**MIF** → Molecular Interactions Fields  
**ADME** → Administração; Distribuição; Metabolização e Excreção  
**OMS** → Organização Mundial da Saúde

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

15

CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
PARTE I. DOENÇAS NEGLIGENCIADAS: DOENÇA DE CHAGAS	18
1. DOENÇAS NEGLIGENCIADAS	18
1.1 <i>Doença de Chagas</i>	20
PARTE II. ALVOS BIOLÓGICOS: Epigenética e Sirtuina 2	24
1. Epigenética	24
1.1 <i>Sirtuina 2</i>	26
PARTE III. PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS	31
1. Planejamento de fármacos	31
2.1 Mecânica clássica e Mecânica quântica	32
2.1.1 Planejamentos de fármacos baseado na estrutura do receptor e planejamento de fármacos baseado na estrutura do ligante	32
2.1.2 <i>Docking molecular</i>	34
2.1.3 Modelagem Comparativa	35
PARTE IV. SIMULAÇÃO POR DINÂMICA MOLECULAR (DM)	37
1. Simulações por dinâmica molecular	37
PARTE V. TRIAGEM VIRTUAL E AVALIAÇÃO DE POTÊNCIA (CINÉTICA ENZIMÁTICA)	41
1.1 Triagem virtual: LBV e SBVS	42
1.2 Cinética enzimática: Enzimas, alvos de novos fármacos?	
PARTE IV. OBJETIVOS GERAIS E JUSTIFICATIVA	44
CAPÍTULO II - Estudos de Modelagem Comparativa da Sirtuína 2 (Sir2)	45
1. INTRODUÇÃO	46
2. OBJETIVOS	46
3. MATERIAIS E MÉTODOS	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5. CONCLUSÃO	53
CAPÍTULO III - Simulação por Dinâmica Molecular – Refinamento do Modelo Obtido por Modelagem Comparativa	54
1. INTRODUÇÃO	55
2. OBJETIVOS	55
3. MATERIAIS E MÉTODOS	56
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5. CONCLUSÃO	61
CAPÍTULO IV - Construção do Farmacóforo - Campos de Interações Moleculares ( <i>Molecular Interactions Fields – MIFs</i> )	62
1. INTRODUÇÃO	64
2. OBJETIVOS	64
3. MATERIAIS E MÉTODOS	64
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
5. CONCLUSÃO	69
CAPÍTULO V – TRIAGEM VIRTUAL	70
1. INTRODUÇÃO	70
2. OBJETIVOS	70
3. MATERIAIS E MÉTODOS	71
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
5. CONCLUSÃO	77
CAPÍTULO VI – Avaliação biológica dos compostos da triagem virtual	78
1. INTRODUÇÃO	80
2. OBJETIVOS	80
3. MATERIAIS E MÉTODOS	81
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	87

5. CONCLUSÃO	87
CAPITULO VII – Conclusões finais	89
1. INTRODUÇÃO	90
2. RESULTADOS FINAIS	90
CAPÍTULO VII – REFERÊNCIAS	96
1. REFERÊNCIAS	97

## INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As doenças negligenciadas são aquelas que, apesar da alta relevância médica, não possuem a devida atenção dos governos e indústrias farmacêuticas. Elas são causadas por agentes infecciosos como vírus, bactérias, protozoários e helmintos, sendo mais comuns em populações de baixa renda e em países em desenvolvimento (DNDI, 2015; FIDALGO; GILLE, 2011; WHO, 1992a, 1992b). Dentre essas doenças, podemos citar as causadas por tripanossomatídeos, tais como doença de Chagas e as Leishmanioses (DNDI, 2015; FIDALGO; GILLE, 2011), que são consideradas extremamente negligenciadas, pois acometem milhões de pessoas no mundo e recebem quase nenhum investimento em inovação (DNDI, 2015).

Neste contexto, a doença de Chagas é uma endemia infecciosa causada pelo parasita hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (DNDI, 2015; GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2008). Seu quadro epidemiológico demonstra que a mesma é endêmica em 21 países, estima-se que 5,7 milhões de pessoas estejam infectadas pelo parasita e que outros 70 milhões de indivíduos se encontrem sob risco de infecção. Segundo dados epidemiológicos, a doença apresenta 70.000 novos casos por ano, causando cerca de 7.500 mortes (CHATELAIN; IOSET, 2011b; DNDI, 2015).

Neste cenário, é alarmante a quantidade de pessoas que desconhecem essa doença. Segundo o Médico Sem Fronteiras (MsF), 90% dos infectados desconhecem esta situação, por falta de oportunidade de diagnóstico. Anteriormente considerada um problema do cone sul americano, a doença de Chagas passou a ser presente em todos os continentes devido à globalização (WHO, 2016).

A quimioterapia disponível contra essa doença é ineficiente, sendo composta por apenas dois fármacos, benznidazol e nifurtimox, os quais podem resultar em efeitos positivos para os pacientes infectados, mas são eficientes apenas no início

da infecção e possuem muitos efeitos adversos graves. Devemos priorizar a busca de novos fármacos contra essa doença, tendo em vista os aproximadamente 109 anos desde da sua descoberta, e uma quimioterapia nova e eficiente promoveria melhor esta de saúde a milhares de pessoas acometidas pela Doença de Chagas (VINHAES; DIAS, 2000).

Nos dias de hoje, obter novos fármacos para essa doença é um desafio e tanto. Com isso, alvos epigenéticos vem desmosntram-se promissores para busca de novos compostos bioativos e uma proteína que está extremamente envolvida no ciclo celular do parasita (*T. cruzi*), a Sirtuína 2 (Sir2), pode ser explorada a fim de planejar novos inibidores enzimáticos contra *T. cruzi*. Portanto, nesse trabalho foram utilizadas ferramentas computacionais na busca por novos candidatos antichagássicos.

Para alcançar esse objetivo, em um primeiro momento, um modelo da estrutura de Sir2 de *T. cruzi* (*tcSir2*) foi construído, utilizando como molde a estrutura cristalográfica da Sir2 humana (pdb:3ZGV) (SACCONNAY et al., 2014). Após a construção do modelo realizou-se simulação por dinâmica molecular, no intuito de compreender/elucidadar complementariedade da enzima com seu substrato e a complexidade conformacional dessa proteína. Com a conformação mais representativa, para o modelo construído, foi utilizada para passo de triagem virtual, na busca possíveis inibidores que interajam com a *tcSir2*. Esse estudo deu embasamento teórico para a seleção de 6 compostos, os quais foram adquiridos, para avaliação da potência frente a *tcSir2*. Quatro dos seis compostos que foram adquiridos para avaliação de potência apresentarão atividade contra *tcSir2* (CDMS-01, CDMS-02, CDMS-03 e CDMS-06), sendo o composto CDMS-01 ganhando destaque, apresentando um atividade de  $IC_{50} = 39,9 \mu M$  e  $K_i = 16,8 \mu M$ , sugerindo que o alvo *tcSir2* seria um alvo promissor na busca de novos antichagássicos.



# **CAPÍTULO I**

## ***Revisão Bibliográfica***

## PARTE I. DOENÇAS NEGLIGENCIADAS: DOENÇA DE CHAGAS

### 1. Doenças negligenciadas

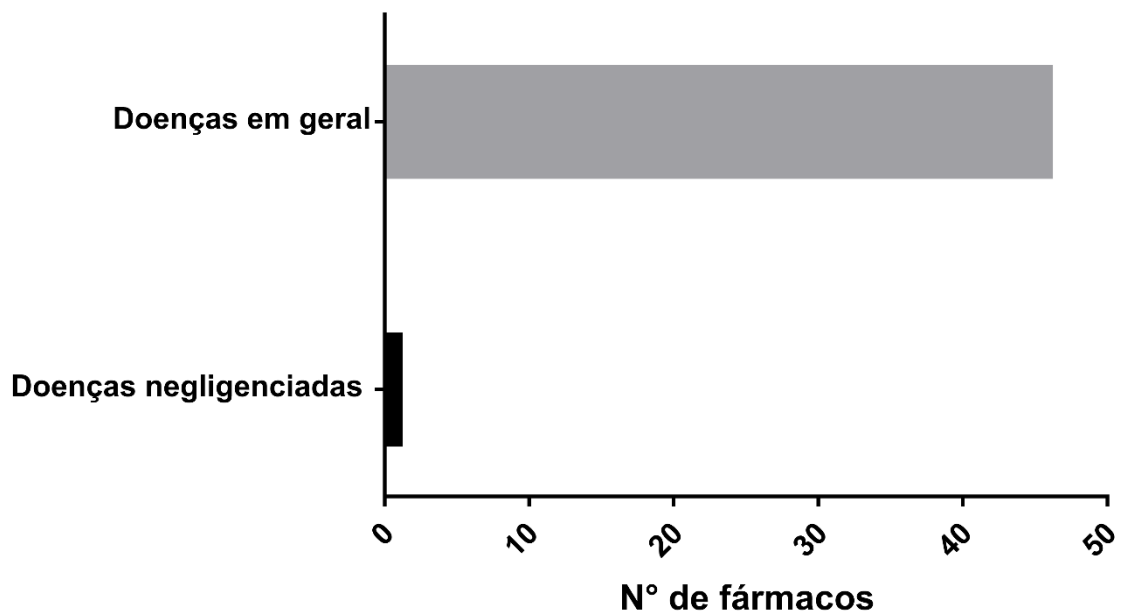
As doenças tropicais são, ainda hoje, responsáveis por incapacitar e levar milhões de indivíduos à morte. Causadas por agentes infecciosos e parasitários como vírus, bactérias, protozoários e helmintos, essas doenças são prevalentes em populações de baixa renda que vivem em países em desenvolvimento. Elas são chamadas de doenças negligenciadas, devido a grande relevância médica, acompanhada da incipiente atenção dos governos e indústrias farmacêuticas (CHATELAIN; IOSET, 2011a; DNDI, 2015; WHO, 1992b, 2016).

O fator negligenciada não se dá por essas doenças acomenentrem, em sua maioria, a população mais pobre e de países em desenvolvimento, o que inviabiliza a pesquisa por parte das indústrias farmacêuticas por alternativas terapêuticas, mas, também, por falta de incentivos tanto na área das indústrias farmacêuticas como da academia, entre outros. Isso, demonstra que elas são negligenciadas por vários motivos e não só um em particular (WILLYARD, 2013). Prova disso é que em 2018, cerca de 47 novas entidades químicas (*New Chemical Entities* - NCE) foram autorizadas pela *Food and Drug Administration* (FDA) – agência regulatória de alimentos e fármacos dos Estados Unidos – para serem testadas em humanos para o tratamento de doenças em geral. Desse total, apenas 1 foi direcionadas para o tratamento de doenças tropicais negligenciadas (DTN), a tafenoquina, descoberta pela GlaxoSmithKline e aprovada em 20/07/2018. Esse composto possui o nome comercial de *KRINTAFEL*, é um medicamento usado para prevenir a recidiva da malária causada pelo parasita *Plasmodium vivax*. É utilizado em doentes com idade

igual e superior a 16 anos, que já estão a receber medicamentos para o tratamento da infecção aguda por malária por *Plasmodium vivax* (TAN; HWANG, 2018).

Essa doenças afetam mais de 1 bilhão de pessoas pobres, principalmente que vivem com menos de U\$ 2,00/dia (Figura 1), de acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) (DNDI, 2015; FERREIRA; ANDRICOPULO, 2013). Desta maneira, as doenças negligenciadas se apresentam como um sério problema de saúde pública, representando 11,4% das doenças mundiais(CHATELAIN; IOSET, 2011b).

**Figura 1:** Fármacos autorizados pela FDA em 2018.



**Fonte:** (COMMISSIONER, 2018)

Dentre as doenças negligenciadas podemos citar as leishmanioses, a filariose linfática, a dengue, a tuberculose e a esquistossomose (DNDI, 2015; WHO, 2016). A malária foi considerada até o ano de 2014 como doença negligenciada pela OMS; fruto do alto investimento e diminuição dos casos, não é considerada mais por esta agência, porém outras importantes entidades, tais como DNDi (*Drugs for Neglected Diseases initiative*), MsF (Médicos sem Fronteiras) e MMV (*Medicine for Malaria*

*Venture*), a mantém no âmbito de negligência, visto os prejuízos humanos causados por ela. Outras doenças são, ainda, denominadas doenças extremamente negligenciadas, sendo elas a doença do sono (tripanossomíase humana africana (THA)), a leishmaniose visceral (LV), e a doença de Chagas ou tripanossomíase americana (DNDI, 2015; WHO, 2016), devido acometerem mais de 500 milhões de pessoas e receberem menos de 5% dos investimentos mundiais em inovação pelas indústrias farmacêuticas. Dentre as doenças extremamente negligenciadas, a doença de Chagas tem alta prevalência no Brasil e, atualmente, devido a problemas migratórios, se tornou problema de saúde pública mundial (DNDI, 2015).

### **1.1. Doença de Chagas**

A mais de 100 anos atrás, mas precisamente em 1909, o médico brasileiro Dr. Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, identificou uma doença que acometia humanos, que era causado por um protozoário hemoflagelado, o *Trypanosoma cruzi*, nome dado em homenagem ao seu companheiro de trabalho Oswaldo Cruz (PASTERNAK et al., 2009). Com o passar do tempo, essa doença recebeu o nome de doença de Chagas em homenagem a seu descobridor, o Dr. Carlos J. R. Chagas (URBINA, 2009, 2012).

Esta doença é também conhecida como tripanossomíase americana, sendo uma infecção endêmica causada pelo parasita hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (DNDI, 2015). Há 5,7 milhões de pessoas infectadas, é endêmica em 21 países da América Latina, mais de 6 milhões no mundo, acredita-se que 70 milhões de pessoas estejam em risco de contrair a doença e calcula-se que causa 7.000 mortes por ano nessas regiões endêmicas (CHATELAIN; IOSET, 2011a; DNDI, 2015; WHO, 2016).

Sua via de transmissão mais conhecida é a via vetorial, que acontece a partir da picada de insetos triatomíneos conhecidos comumente como “barbeiro”. Existindo outras vias de transmissão, apesar de menos frequentes, também são reportadas, tais como transfusão sanguínea e de órgãos, transmissão placentária, acidentes laboratoriais e alimentos contaminados (DNDI, 2015). Suas manifestações podem ser divididas em, manifestações agudas onde normalmente o quadro clínico da infecção surge de cinco a 14 dias após a transmissão pelo barbeiro e 30 a 40 dias para infecções por transfusão sanguínea, mas as manifestações crônicas da doença de Chagas aparecem mais tarde, na vida adulta. Aproximadamente de quatro a seis dias após o contato com o barbeiro pode surgir uma inflamação no local e quando a infecção se dá no olho ou próximo a ele, o olho pode ficar inchado, sinal característico da doença, mas pouco frequente, já na pele dos braços, pernas ou rosto, a lesão inicial pode se assemelhar a um furúnculo ou a uma mancha avermelhada quase sempre dolorosa. A febre é um dos sintomas mais frequentes nessa fase da doença, as vezes o único. Trata-se de febre baixa e contínua, geralmente durando semanas. Alguns dias após a penetração do parasito vão aparecendo mal-estar, falta de apetite, aceleração dos batimentos cardíacos, aumento do tamanho do baço e fígado, inchaço da face e de todo o corpo, indicando a disseminação da doença para todo o corpo. Trata-se da fase aguda da doença. Esse quadro é mais comum entre as crianças, mas jovens (um a cinco anos). Em pessoas mais velhas, geralmente, esses sinais ficam muito atenuados e fase inicial da doença passa despercebida, confundindo-se com uma gripe ou mal-estar. A fase aguda tende a desaparecer espontaneamente. Porém em certos casos graves, sobretudo em crianças, pode sobrevir a morte devido a um ataque intenso do parasito aos órgãos e tecidos mais nobres do corpo, como coração e o sistema

nervoso central. Passada a fase aguda, as manifestações da doença vão depender de muitos fatores, dentre os quais a capacidade de defesa do organismo e a intensidade agressora do tripanossoma. Muitos pacientes podem passar um longo período, ou mesmo a vida toda, sem apresentar nenhuma manifestação da doença, embora sejam portadores da infecção parasitária, esse estágio é chamada de forma latente. Em outros casos, entretanto, a doença evolue e, passada a fase inicial, pode comprometer muitos órgãos, principalmente o coração e o aparelho digestivo. Em geral, o órgão mais lesado é o coração, aos poucos vai se dilatando e crescendo, atingindo dimensões enormes, causando que comumente nós conhecemos de cardiomegalia. São comuns nessa fase avançada, as pernas ficarem inchadas, sensação de fraqueza, palpitações e falta de ar. Não são raras, infelizmente, as morte súbitas e inesperadas entre indivíduos jovens, aparentemente saudáveis. Os comprometimentos digestivos se traduzem geralmente pelo aumento do calibre do esôfago ou porções finais do intestino. Essas alterações podem determinar dificuldade progressiva para deglutir e constipação intestinal prolongada (FERREIRA; DE OLIVEIRA; ANDRICOPULO, 2016; NEITZ et al., 2015).

Ainda neste contexto, a descoberta da doença na fase inicial é extremamente importante, pois os recursos de tratamento, hoje disponíveis, podem, inclusive, proporcionar cura total da infecção, especialmente se o medicamento for dado adequadamente e precocemente (FERREIRA; DE OLIVEIRA; ANDRICOPULO, 2016).

Os processos migratórios da população, que deslocou-se de zonas rurais para urbanas de forma exponencial nas últimas décadas, influenciaram de forma significativa na mudança do perfil epidemiológico da doença de Chagas (WHO, 1992a, 2016). Quando a prevalência da doença era rural, relacionava-se o alto

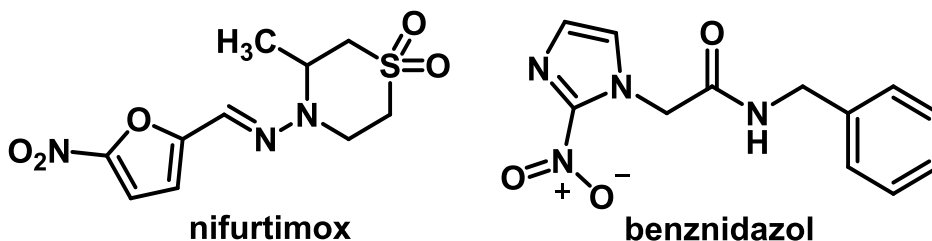
índice de contaminação à utilização de casas de taipa como moradia, o que propiciava o alojamento e a procriação dos insetos vetores. Com a chegada de pessoas infectadas às cidades, houve um aumento da distribuição do número de infectados e o risco de transmissão pelas vias menos frequentes como transfusão sanguínea (VINHAES; DIAS, 2000).

A quimioterapia disponível para a doença de Chagas é composta por apenas dois fármacos, o benznidazol e o nifurtimox (Figura 2), ativos quase exclusivamente na fase aguda da doença (DNDI, 2015). Tendo-se em vista a alta toxicidade e resistência às cepas brasileiras, ambos os fármacos apresentam efeitos adversos que comprometem sua utilização, ainda mais, por não serem eficazes na fase crônica da doença (FERREIRA et al., 2012; PEDRÓ-ROSA et al., 2015; URBINA, 2009, 2012).

O benznidazol, anteriormente fornecido pela Roche, teve sua produção descontinuada por esse laboratório farmacêutico, passando a ser produzido pelo Laboratório LAFEPE, de Pernambuco. Em 2016 o laboratório enviou para o Ministério da Saúde, em Brasília, o primeiro lote do Benznidazol, produzido no LAFEPE para os pacientes com a doença de chagas. O lote possuía 250 mil comprimidos de 100 mg, na apresentação para adultos, e chegou à população por meio do Sistema Único de Saúde (SUS) (“Arquivos Benznidazol | Lafepe”, 2016).

Já o nifurtimox é vendido como Lampit pela Bayer (CHATELAIN; IOSET, 2011a). O mesmo é licenciado apenas para uso na Argentina e na Alemanha, onde é vendido como comprimidos de 120 mg. Embora com os dois fármacos no mercado, segundo a DNDi (DNDI, 2015), atualmente estima-se que menos de 1% das pessoas infectadas recebem tratamento (FERREIRA et al., 2011b, 2012).

**Figura 2:** Estruturas dos antichagásicos disponíveis.



Fonte: (FERREIRA; DE OLIVEIRA; ANDRICOPULO, 2016)

Em 2016 o Consenso Brasileiro em Doença de Chagas junto com Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) fizeram uma projeção relativa às estimativas do número de pessoas infectadas por *T. cruzi* e do número de casos com doença de Chagas na fase crônica que apresentam a forma cardíaca na América Latina, no período entre 1990 a 2010 (DIAS, P. C. et al., 2016) (Tabela 1).

**Tabela 1:** Mudanças da doença de Chagas em 21 países endêmicos da América Latina, nos anos de 1990, 2000, 2006 e 2010

Estimativas	1990	2000	2006	2010
<b>Mortes por ano</b>	45.000	21.000	12.500	12.000
<b>Pessoas infectadas</b>	30.000	18.000	15.000	5.742.167
<b>Casos novos</b>	700.000	200.000	41.200	29.925
<b>População total sob risco</b>	100.000.000	40.000.000	28.000.000	70.199.360

Fonte: (DIAS, P.C. et al., 2016)

Considerando isso, podemos avaliar de forma positiva para a diminuição de casos com o passar dos anos. Porém o número de pessoas em áreas de risco só aumenta. Mesmo com os enormes esforços nas pesquisas de novos agentes antichagásicos, no âmbito nacional e internacional, e em sua maioria realizados academicamente, ainda não foram encontradas alternativas terapêuticas para o tratamento da doença. Sendo premente a necessidade urgente de descoberta e desenvolvimento de novos antichagásicos, e os desafios de se encontrar alternativas quimioterapêuticas realmente eficazes na fase crônica (FERREIRA et al., 2012; URBINA, 2009, 2012).



## PARTE II. ALVOS BIOLÓGICOS: Epigenética e Sirtuina 2

### 1. Epigenética

Historicamente, a genética clássica, por si só, não conseguiria explicar a diversidade de fenótipos dentro de uma população e nem mesmo explicar como, apesar de suas sequências de DNA idênticas, gêmeos monozigóticos ou animais clonados podem apresentar diferentes fenótipos e diferentes sensibilidades a uma doença, por exemplo (HUMPHERYS et al., 2001). Nesse sentido, a epigenética oferece uma explicação parcial desses fenômenos. C. H. Waddington, em 1939, introduziu o conceito “*As interações causais entre genes e seus produtos, que trazem o fenótipo a ser*”. Mais tarde, então, epignética foi definida como mudanças hereditárias na expressão gênica que não são devido a qualquer alteração na sequência de DNA (WADDINGTON, 2012). Em seguida, a mais recentemente descoberta da inativação de genes microRNA (mRNA) por metilação do DNA (WADDINGTON, 2012). Outro exemplo seria em caso de hipometilação do DNA em dinucleótidos, sendo esta a primeira anomalia epigenética a ser identificada em células cancerosas (CpG). Em um simpósio sobre “*heterogeneidade das células tumorais*” na Universidade Johns Hopkins em 1982 (HOPKINS; GROOM, 2003), Andy Feinberg e Bert Vogelstein se perguntaram qual é o mecanismo responsável pela alta frequência de “mutações” e adaptações ao ambiente em alguns tipos de câncer (FEINBERG; VOGELSTEIN, 1983). Após essa pergunta, muitos grupos foram estimulados a pesquisarem mais sobre as mudanças fenotípicas influenciadas pela metilação do DNA podendo estar relacionada ao silenciamento de alguns genes específicos.

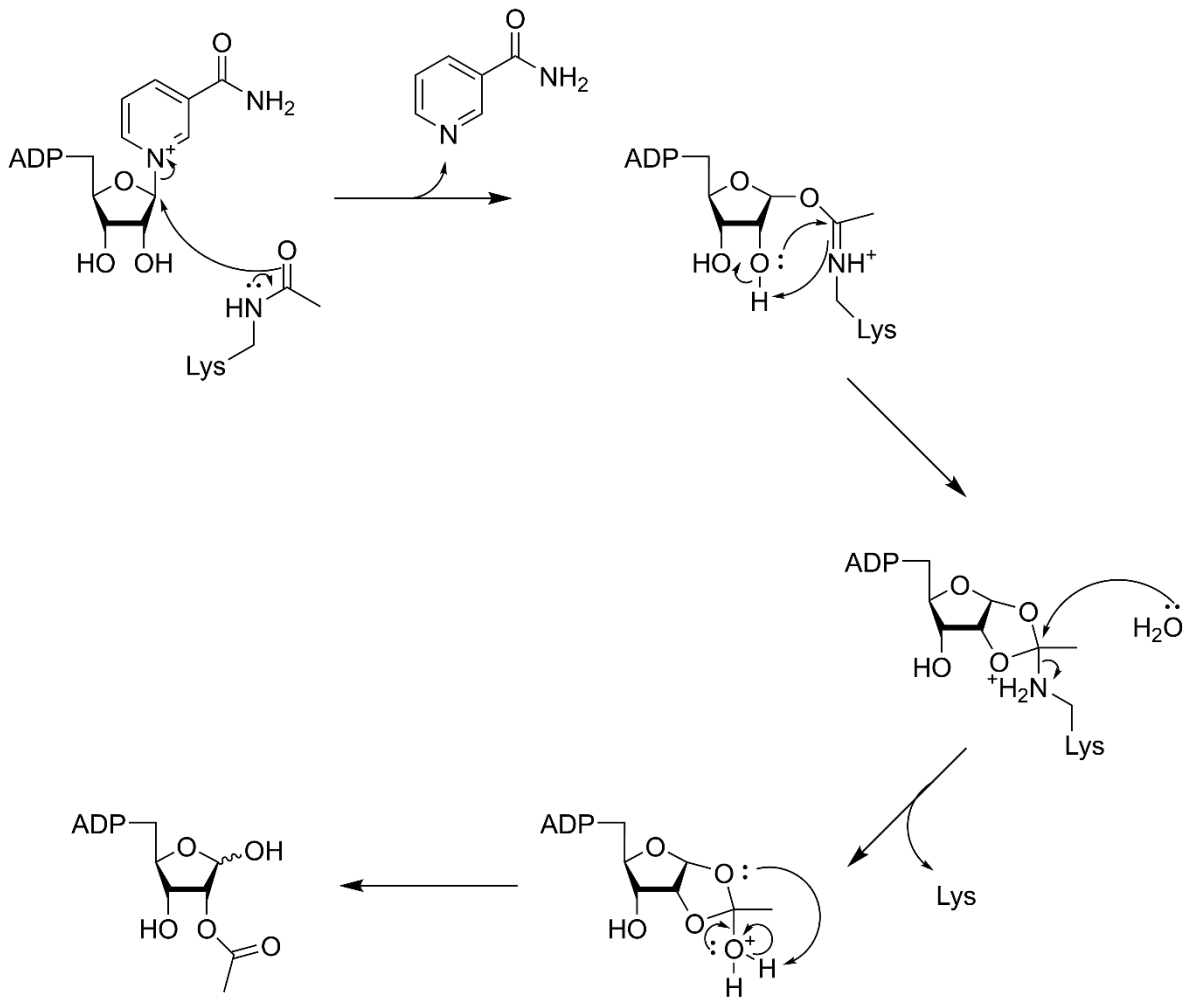
Com essas informações, a epigenética se tornou uma área de estudo que busca explicar as alterações da expressão gênica, ou alterações do fenótipo, ocasionadas por mecanismos que não modificam a sequência genética (BIRD, 2002, 2003; BIRD et al., 2002). Tanto as alterações genéticas quanto as alterações epigenéticas estão relacionadas ao controle do ciclo celular e à indução do desenvolvimento de câncer por alterar a expressão gênica e, conseqüentemente, alterar a estrutura e função celular. Porém, algumas características distinguem os dois processos, como o fato dos mecanismos epigenéticos serem reversíveis e adquiridos de maneira gradual (GONZALEZ-ZULUETA et al., 1995; KITADA et al., 2012).

As modificações citadas, como a metilação do DNA e as modificações covalentes de histonas, regulam a expressão gênica em conjunto, sinalizando a ativação ou repressão da transcrição gênica (GONZALEZ-ZULUETA et al., 1995; JONES; BAYLIN, 2007). Dentre as várias modificações epigenéticas descritas, os marcadores metilados (DNA) e acetilados (histona) são os mais comuns nos diversos tipos de câncer (CASCORBI; SCHWAB, 2016). Dessa forma, enzimas que alteram esses sinalizadores como, por exemplo, DNA metiltransferases e histonas acetiltransferase (que catalisam as modificações do DNA e histonas), histona deacetilases e lisina desmetilase (que removem as modificações de DNA e histonas) e domínios de proteínas que reconhecem e interagem com DNA e histonas modificadas estão intimamente ligadas ao controle epigenético (ELHAMAMSY, 2016).

## 1.1 Sirtuína 2

Sirtuínas, também chamadas reguladoras silenciadoras de informação 2 (*silent information regulator 2*, SIR2), são enzimas N-acetil-lisina deacetilases dependente de NAD<sup>+</sup> e são consideradas importantes reguladoras epigenéticas. Cada sirtuína abriga um domínio central catalítico conservado, que tem aproximadamente 270 aminoácidos. As sirtuínas catalisam a clivagem da ligação glicosídica entre nicotinamida (RODRIQUEZ et al., 2006) e ADP-ribose de NAD<sup>+</sup> seguida por transferência do grupo acetil da lisina para ADP-ribose, gerando uma lisina desacetilada, a nicotinamida e o 2'- e 3'-O-acetil-ADP-ribose. O mecanismo desta clivagem de acetil por sirtuína 2 é como segue (Figura 3, para uma visão geral da atividade): (i) o ataque de acetil-lisina ao carbono de ribose ligado a nicotinamida, seguido por neutralização de sua carga positiva e deslocamento deslocando a nicotinamida numa substituição nucleofílica do tipo 2 (SN2) e gera um intermediário de O-alkilamidato; (ii) o par de elétrons da 2'-hidroxila reage em um ataque nucleofílico intramolecular ao carbono ligado ao átomo de nitrogênio da imina, levando à formação de uma espécie de acetal; (iii) hidrólise do grupo acetal libera o intermediário previamente formado seguido de uma transesterificação intramolecular formando assim um grupo hidroxiacetil e hidroxil (MORETTI et al., 2015; RUMPF et al., 2015).

**Figura 3:** Sirtuina 2 (Sir2) visão geral do mecanismo de desacetilação envolvido na regulação epigenética focada neste trabalho.



**Fonte:** (RUMPF et al., 2015)

Em geral, tripanossomatídeos possuem um ciclo celular complexo e respondem às diversas circunstâncias ambientais como o organismo de diferentes hospedeiros e vetores. A regulação de superfície de proteínas é um pré-requisito claro para a diferenciação de um parasita e para a variação antigênica, que acontece provavelmente devido à sua rápida e drástica alteração no perfil de expressão gênica. Nesse sentido, a maquinaria epigenética é conhecida como um importante aspecto da biologia de parasitas. Sendo assim, considerados como potenciais alvos biológicos a serem estudados para o desenvolvimento de novos fármacos

antiparasitários (ALSFORD et al., 2007, 2011, 2012b; MORETTI et al., 2015; RITAGLIATI et al., 2015).

Considerando tripanossomatídeos, muitas enzimas são responsáveis por modificações pós-traducionais de histonas, que embora conservadas em outras espécies pareçam não estar presentes, enquanto sequências não usuais de histonas, assim como modificações de histonas e proteínas modificadoras de histonas não usuais estão presentes nessa família. Dentre os processos de modificações de histonas mais observados em parasitas, podem ser citadas a acetilação de múltiplas lisinas do C-terminal da histona H2A, a metilação de alaninas no N-terminal de histonas H2A, H2B e H4 e a tri-metilação das lisinas 4 e 76 da histona H3 (ALSFORD et al., 2012a).

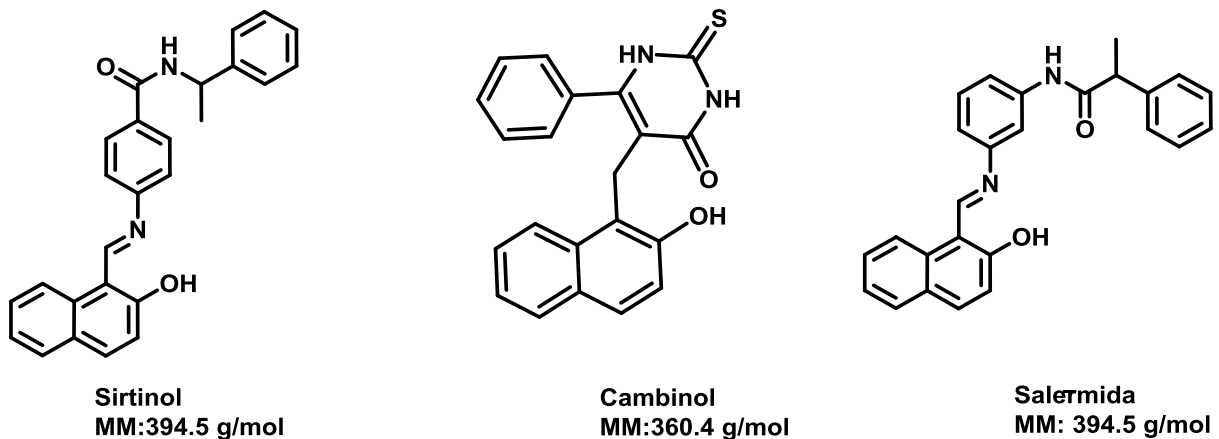
Sirtuínas mostraram-se essenciais para o crescimento *in vitro* do *T. cruzi* em suas formas amastigotas e epimastigotas (SACCONNAY et al., 2013, 2014, 2016). Para *P. falciparum* e *T. brucei*, as sirtuínas estão envolvidas em diversos processos biológicos como invasão do hospedeiro e sobrevivência ao sistema imune. Ainda, a sirtuína de *T. brucei* (*TbSir2rp1*) tem apresentado um papel essencial no reparo do DNA do parasita e está relacionada à sobrevivência do parasita em resposta ao estresse genotóxico. No caso de parasitas como tripanossomatídeos em geral, a superexpressão de Sir2 está relacionada com a sobrevivência de amastigotas (ADRIANO et al., 2007a, 2007b; VERGNES et al., 2007).

Inibidores de Sir2 como o sirtinol (Figura 4) mostraram-se eficazes tanto como leishmanicidas (ADRIANO et al., 2007b; MORETTI et al., 2015; SACCONNAY et al., 2016) quanto antichagásicos em ensaios *in vivo* (MORETTI et al., 2015). Dessa forma, essas evidências indicam que as Sir2 de tripanossomatídeos podem ser consideradas como alvos biológicos na busca e desenvolvimento de novos fármacos

antichagásicos (ADRIANO et al., 2007b; GAZANION et al., 2012; MORETTI et al., 2015).

Em relação aos inibidores de sirtuínas conhecidos, se destacam inibidores  $\text{NAD}^+$  dependentes. Esses são considerados inibidores seletivos por atuarem no sítio de ligação da nicotinamida (Sir1 inibida com  $\text{IC}_{50}$  de 40  $\mu\text{M}$  e a Sir2 com  $\text{IC}_{50}$  de 10  $\mu\text{M}$ ) (KIM et al., 2011; ROTILI et al., 2012). Entre os inibidores de sirtuína 2 conhecidos foram reportados o sirtinol (LARA et al., 2009; MAI et al., 2005a, 2005b), cambinol (BEDALOV et al., 2001; HELTWEG et al., 2006) e o salermida (Figura 4). Pequenas moléculas conseguem inibir a sirtuína 2 em concentrações em torno de micromolar. Observou-se, também que os inibidores de sirtuínas possuem atividade antitumoral, tais como nicotinamida, esplitomicina, sirtinol, cambinol, dihidrocurmarina, alguns indóis e salermida (MORETTI et al., 2015; ROTILI et al., 2012).

**Figura 4:** Estrutura química dos inibidores de sirtuína conhecidos, sirtinol, cambinol e salermida.



**Fonte:** (MORETTI et al., 2015)

Na literatura, foram reportados em estudo no qual caracterizam as sirtuínas de *T. cruzi* como possíveis alvos moleculares na busca de fármacos para doenças de Chagas. Um dos inibidores de sirtuínas humanas a salermida, foi testado contra

formas parasitárias do *T. cruzi* apresentando EC50 de 10,9µM. Esse mesmo estudo demonstrou que durante a infecção pelo parasita, a salermida impediu o crescimento e multiplicação inicial após a invasão de células de mamíferos em concentrações que não afetaram a viabilidade da célula hospedeira. Além disso, a infecção *in vivo* foi parcialmente controlada mediante a administração deste composto. Há dois tipos de sirtuina em *T. cruzi*, como antes comentado, *TcSir2rp1* e *tcSir2rp3*. A partir da utilização de anticorpos específicos e linhas celulares que superexpressam as versões marcadas de estas enzimas, ensaios mostraram que *tcSir2rp1* está localizada no citosol e *tcSir2rp3* na mitocôndria. Os efeitos observados que em *tcSir2rp3* desmontaram que o salermida apresentou uma potência igual a 10,6 µM em crescimento do parasita, e também que inibiu contra a enzima de *T. cruzi* em ensaio de fluorimetria com potência igual a 1 µM (MORETTI et al., 2015).

### **PARTE III. PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS**

#### **1. Planejamento de fármacos**

O planejamento racional de fármacos consiste em um processo complexo, dinâmico e integrado, envolvendo métodos experimentais e computacionais, visando à identificação e desenvolvimento de moléculas biologicamente ativas (ANDRICOPULO; SALUM; ABRAHAM, 2009; FERREIRA et al., 2011a). Este processo exige um conhecimento robusto da doença e de suas vias bioquímicas envolvidas/associadas à estudos de farmacocinética e toxicidade dos compostos estudados, portanto exigindo uma interdisciplinaridade e conhecimento em várias áreas de estudo (SALUM; POLIKARPOV; ANDRICOPULO, 2008).

Baseada nas características moleculares da terapêutica, essa estratégia utiliza modernas ferramentas estruturais, farmacológicas ou químicas, bancos de dados contendo compostos reais ou virtuais, estruturas 3D dos alvos bioquímicos, química computacional, entre outros para alcançar o objetivo principal: encontrar um fármaco que interaja de forma específica no alvo de interesse (FERREIRA; ANDRICOPULO, 2013).

O planejamento racional de fármacos pode ser realizado com base na estrutura do ligante ou do receptor, isto é, utilizando informações de vários ligantes da mesma classe com potências elucidadas ou por meio de elucidação da estrutura 3D de um alvo por vias experimentais, como por exemplo, cristalografia, RMN ou Cryo-EM ou por modelagem por homologia/comparativa (BAKER, 2018; HONÓRIO et al., 2008).

Utilizando ferramentas computacionais para o planejamento de fármacos, temos o Planejamento de Fármacos Auxiliado por Computadores (do inglês *Computer-Assisted Drug Design, CADD*), no qual é possível, por meio de dessas técnicas, planejar e otimizar compostos bioativos de forma a melhorar a estrutura do composto bioativo, melhorar biodisponibilidade e biotransformação e diminuir toxicidade a fim de descobrir um novo candidato a fármaco ou melhorar as propriedades de um fármaco já existente (ANDRICOPULO; SALUM; ABRAHAM, 2009).

## **2.1. Mecânica clássica e Mecânica quântica**

A mecânica clássica e mecânica quântica são ferramentas muito importante no planejamento de novos fármacos. A mecânica clássica (MC), as moléculas são descritas como um conjunto de “esferas” (átomos) conectadas entre si, ao invés de



núcleos e elétrons, como acontece nos métodos quânticos (MQ). O modelo da mecânica clássica é justificável porque os parâmetros associados a conjuntos dessas esferas permanecem razoavelmente constantes entre estruturas diferentes ao longo do tempo, desde que essas esferas possuam os mesmo parâmetros. O que se faz no modelo da mecânica clássica é desenvolver o chamado campo de força, um conjunto de funções de energia (calculados experimentalmente) que determinam penalidades energéticas para o afastamento da estrutura desses valores (BARREIRO et al., 1997; LIMA, 2018). Resumidamente a MC e a MQ obdecem um regra de complexidade onde a MC é indicada para compreensão de fenômenos macroscópicos, enquanto a MQ para fenômenos microscópicos.

### **2.1.1 Planejamentos de fármacos baseado na estrutura do receptor e planejamento de fármacos baseado na estrutura do ligante**

Nos dias hoje as estratégias de planejamento de novos fármacos vem sendo cada vez mais utilizadas. Para isso, elas se fundamentam no conhecimento da fisiopatologia das doenças, no estudo de vias bioquímicas e na seleção de alvos moleculares. As ferramentas computacionais fornecem informações valiosas para a descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos. A química medicinal farmacêutica possui papel central nesses processos, visando à identificação de substâncias bioativas e ao desenvolvimento de compostos-líderes com propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas otimizadas (SANTIAGO et al., 2017; YANG et al., 2018).

As abordagens integradas entre técnicas computacionais e experimentais são no planejamento e desenvolvimento de moléculas bioativas candidatas à fármacos vem sendo o caminho fundamental para a introdução de um novo fármaco na

terapêutica. Dentre essas técnicas, estratégias como Planejamento de Fármacos Baseado na Estrutura do Receptor (do inglês *SBDD – Structure-Based Drug Design*) e Planejamento de Fármacos Baseado na Estrutura do Ligante (do inglês *LBDD - Ligand-Based Drug Design*) ganham destaque (CHANG et al., 2016; WERMUTH, 2006).

O *LBDD* utiliza um conjunto de moléculas com propriedades e características diversas e que apresentam atividade biológica conhecida para o alvo em estudo, e são usadas a fim de identificar um novo composto ativo, como por exemplo, estudos de QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationships) para a classe de antialérgico das piranaminas, que por meio de uma série de compostos foi possível encontrar uma molécula mais potente (SNADER et al., 1980; VERMA; KHEDKAR; COUTINHO, 2010).

Para o método de *SBDD* é necessário um estudo detalhado do alvo biológico. Para isso, pode se utilizar informações obtidas experimentalmente, por meio da cristalografia de raios-X, Cryo-EM ou ressonância magnética nuclear (RMN) ou por meio de modelagem comparativa (BAKER, 2018; FERREIRA et al., 2011a; HONÓRIO et al., 2008). Por exemplo, o dorzolamida primeiro fármaco aprovado e descoberto por meio da técnica de *SBDD* (anti-glaucoma agente; inibidor da anidrase carbônica) (ANDERSON, 2003).

### **2.1.2 Docking molecular**

A ferramenta de *docking* molecular é comumente empregada no processo de busca de novos fármacos, ainda mais em estudos o qual basea-se na estrutura do alvo bioquímico para sugerir a orientação entre o ligante e o alvo. A metodologia possui dois objetivos principais: predição de conformação, e afinidade de ligação. O

primeiro objetivo deve ser capaz de prever corretamente a conformação do ligante, e as interações físico-químicas associadas. Utilizando essas informações, o método deve ser capaz de distinguir moléculas ligantes das não ligantes, ranqueando-as de acordo com suas afinidades. Por isso, o método *docking* necessita de dois componentes principais: Um algoritmo de busca e uma função de avaliação de energia (i.e. scoring function). A habilidade de lidar com a flexibilidade intrínseca do sistema e descrever corretamente a energia de interação entre receptor-ligante é crítica. Além disso, é necessária a estrutura tridimensional do receptor (e.g. uma proteína do Protein Data Bank), e da estrutura do ligante (HANN; LEACH; HARPER, 2001; LEACH; BRYCE; ROBINSON, 2000).

Neste contexto, os seis graus de liberdade translacional e rotacional de uma molécula em relação à outra, bem como os graus de liberdade conformacional de cada molécula, considerando o número de ligações sigma, são de suma importância nas metodologias de *docking*, pois no método, em geral, apenas os graus de liberdade conformacional do ligante são considerados, ou seja, o alvo rígido na análise, semelhante ao modelo chave-fechadura de Emil Fischer (JONES et al., 1997). Porém alguns algoritmos incluem certo grau de flexibilidade à cadeia lateral de resíduos de aminoácido do sítio de interação, permitindo melhor encaixe do ligante, mas o restante do alvo permanece rígido. Dessa forma, o método de *docking* ideal seria aquele que permitisse explorar os graus de liberdade conformacional tanto do ligante quanto o alvo (CHEN et al., 2017; LACROIX et al., 2016; YAN et al., 2017).

Dessa maneira, considerar a flexibilidade do sistema pode ser realizada por meio de simulações de dinâmica molecular (DM) do complexo ligante-alvo. Como será abordado no Capítulo III.

### **2.1.3 Modelagem Comparativa**

A técnica computacional de modelagem comparativa tem como finalidade a obtenção da estrutura tridimensional (3D) de uma proteína alvo, por meio da comparação da sequência de aminoácidos desta proteína com o de uma proteína de estrutura 3D conhecida, a qual é utilizada como molde. Ou seja, são utilizadas informações estruturais já determinadas experimentalmente na construção de modelos (CHEN et al., 2017; NEITZ et al., 2015; SACCONNAY et al., 2014; SATOH et al., 2005).

O alinhamento obtido entre as duas sequências, é realizado por meio de uma função de pontuação de alinhamento, na qual se têm uma matriz de pontuação para cada resíduo presente no molde e substituído ou mantido na sequência do banco de dados, e uma função de penalidade é utilizada. Quando a pontuação de alinhamento é gerada por uma matriz de pontuação. Essa matriz de pontuação evoluiu significativamente ao longo do tempo, porque analisando/buscam as preferências de substituição de aminoácidos que surgiram ao longo do tempo evolutivo. Algumas alterações de aminoácidos podem variar de forma conservada, por exemplo, leucina para valina ou arginina para lisina, ou dramaticamente diferente, por exemplo, triptofano para glicina. E são feitos da seguinte forma; mudanças conservadoras recebem pontuações positivas, enquanto mudanças não conservadoras receberão as maiores pontuações negativas. Como resultado, os valores de expectativa estatísticos (avaliações) baseados em pontuações de similaridade de aminoácidos são muito mais sensíveis do que a porcentagem de identidade para encontrar homólogos (SÁNCHEZ; SALI, 2000; WEBB; SALI, 2014).

A matriz *BLOSUM62* (PEARSON, 2013) usada pelos programas *BLAST* e a matriz *BLOSUM50* usada pelos programas, são projetadas para identificar homólogos distantes usando sequências longas (geralmente de comprimento total). Usar a matriz de pontuação adequada pode melhorar a sensibilidade da pesquisa e a precisão do alinhamento é essencial no intuito de procurar a melhor sequência de alinhamento no banco de dados, banco de dados, por exemplo, como o NCBI e UNIPROT (CHEN et al., 2012; SATOH et al., 2002).

O processo de modelagem de proteínas ocorre em três partes: encontrar uma sequência similar à ser utilizado como modelo; alinhamento da sequência molde com o modelo; e por fim, construir e avaliar o modelo (SACCONNAY et al., 2013, 2014).

A utilização desta técnica no desenvolvimento de fármacos por *SBDD* exige acurácia e avaliação da qualidade do modelo estrutural e dos métodos utilizados (PEARSON, 2013). A acurácia é descrita pela porcentagem de similaridade entre a sequência do molde com o modelo, e deve ser maior que 35% (SACCONNAY et al., 2014; SATOH; SATOH, 2008).

De maneira potencial esse tipo de técnica consegue contornar problemas onde não se tem a cristalografia do alvo a ser estudado, por exemplo. Entretanto, os modelos deverão ser submetidos à algum tipo de refinamento (dinâmica molecular) para aumentar sua robustez e tornando-os ideias para o tipo de estudo (BORHANI; SHAW, 2012; KRÜGER et al., 2018).

A partir disso, várias estruturas cristalográficas de Sirtuína 2, disponíveis no *Protein Data Bank* (PDB) com alta resolução (somente Sir2 humana), e a falta de estruturas cristalográficas da Sir2 (*T. cruzi*) que possam elucidar esse complexo para estudos, a técnica de modelagem comparativa, foi utilizada neste trabalho a fim

de superar essa barreira e construir modelos robustos para a aplicação da técnica de *SBDD* (SACCONNAY et al., 2014).

## PARTE IV. SIMULAÇÃO POR DINÂMICA MOLECULAR (DM)

### 1. Simulações por dinâmica molecular

A simulação por dinâmica molecular (DM) é uma das principais ferramentas computacionais criadas para o estudo do movimento de sistemas, proteínas e de outros biopolímeros, ao longo do tempo (BRUCCOLERI; KARPLUS, 1990; KARPLUS; PETSKO, 1990; KUCZERA et al., 1990; KUCZERA; KURIYAN; KARPLUS, 1990). Por conseguinte, se tornou muito importante na área de biomoléculas, sendo utilizado até mesmo como complemento de técnicas experimentais, por meio desta pode-se obter uma informação a nível microscópico de uma observação feita a nível experimental (BRUCCOLERI; KARPLUS, 1990; KUCZERA; KURIYAN; KARPLUS, 1990). A metodologia da DM é fundamentada na mecânica clássica, pois busca compreender informações sobre o comportamento dinâmico do alvo a ser estudado, sendo dependente do tempo e dos átomos individuais (átomos pesados) que compõem o sistema. Baseados na mecânica molecular, as moléculas são consideradas como uma coleção de átomos unidos por forças atômicas, e estas interações são medidas por meio de energias potenciais, cujo complemento é conhecido como campo de força. E o mesmo permite que a energia total do sistema seja calculada a partir da soma das contribuições de energia (MORI et al., 2016), como ilustrar a (eq. 1).

$$E_{\text{total}} = \sum E_{\text{est}} + \sum E_{\text{ang}} + \sum E_{\text{vdW}} + \sum E_{1,4} + \sum E_{\text{elet}} + \sum E_{\text{tors}} \quad (\text{eq. 1})$$

Onde:

- $E_{\text{total}}$  é a soma dos termos de energia (ligados e não ligados);
- $E_{\text{est}}$  é energia de estiramento da ligação em relação ao valor de equilíbrio;

- $E_{\text{ang}}$  representa a energia de deformação angular;
- $E_{\text{vdW}}$  representa a energia das interações de van der Waals;
- $E_{1,4}$  representa a energia de interações não ligadas do tipo 1-4;
- $E_{\text{elet}}$  é a energia de atração ou repulsão entre duas cargas eletrostáticas (lei de Coulomb);
- $E_{\text{tors}}$  corresponde à deformação torsional.

A lei de movimento de Newton permite um estudo das configurações do sistema ao longo do tempo, onde se conhece o tempo e a posição inicial de uma dada partícula, é possível calcular, a partir das equações Newtonianas, a posição e o tempo posterior dessa mesma partícula. A cada posição gerada, obtêm-se um novo movimento, resultando em uma trajetória que descreve as poses e velocidades das partículas do sistema nas diferentes variações de tempo (KARPLUS; PETSKO, 1990; MORI et al., 2016).

As forças que agem em cada átomo do sistema podem ser obtidas por meio da equação 2; essas forças são provenientes da contribuição das interações entre os átomos ligados (comprimentos e ângulos de ligação, ângulos diedros) e não ligados (interações de van der Waals e de Coulomb) (BRUCCOLERI; KARPLUS, 1990; MORI et al., 2016).

O conjunto das interações que descrevem as contribuições das forças de cada átomo do sistema que governam a DM é chamado campo de força, e este permite que a energia potencial do sistema como um todo seja calculada (equação acima descrita). A escolha do campo de força depende do sistema a ser estudado e dos parâmetros a serem pesquisados. Há vários tipos de campos de força disponíveis e os mais utilizados são: CHARMM (Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics); AMBER (Assisted Model Building and Energy Refinement); OPLS (Optimized Potential for Liquid Simulations); GROMOS

(GRONingen MOlecular Simulation) (MORI et al., 2016; SATOH; TANEKO, 2009; YU; MACKERELL; JR., 2017).

A DM evolui, passo a passo, baseada na equação newtoniana ( $F = m \cdot a$ ) (eq. 2) onde  $F$  é a força que atua sobre cada partícula em um instante  $T$  e a aceleração do átomo e  $M$  massa. Com o campo de força definido, é possível calcular as forças que atuam em cada átomo.

$$F_i(t) = m_i a_i \quad (\text{eq. 2})$$

onde:

- $F_i$  é a força exercida em cada átomo no tempo  $t$ ;
- $m_i$  é a massa do átomo;
- $a_i$  é a aceleração.

Após a escolha do campo de força, é possível calcular a força que age sobre cada átomo por meio da derivada da energia potencial ( $V$ ) obtida do campo de força em relação às posições dos átomos ( $r$ ) (eq. 3).

$$F_i(t) = - \frac{\delta V}{\delta r_i} \quad (\text{eq. 3})$$

$$r(t + \Delta t) = 2r(t) - r(t - \Delta t) + a(t) \Delta t^2 \quad (\text{eq. 4})$$

Esta equação calcula a aceleração da partícula que é derivada para a obtenção das velocidades, porém ela não trabalha por si só. Há uma integração das equações de movimento, a qual é realizada por meio de algoritmos baseados nos métodos das diferenças finitas, nos quais a integração é dividida em pequenos intervalos de tempo (passos de integração),  $\Delta t$ , permitindo simular os movimentos de maior frequência do sistema, que muitas vezes são as vibrações das ligações. Um dos métodos mais utilizados em dinâmica molecular para integrar as equações de



movimento é o algoritmo de Verlet (ALLEN; FRENKEL, 1988; ALLEN; WILSON, 1989; STROES et al., 2014), que utiliza as posições e acelerações dos átomos no tempo  $t$  e as posições do passo anterior,  $r(t-\Delta t)$ , para determinar as novas posições no tempo  $t+\Delta t$ , de acordo com a eq 4.

Portanto, a relação entre a velocidade nos diferentes pontos de tempo permite o cálculo das posições atômicas a cada instante (KARPLUS; PETSKO, 1990). A partir das posições e velocidades obtidas de cada átomo, é possível calcular a energia potencial e a cinética do sistema. Quando esse processo acima é aplicado consecutivamente, obtêm-se o conjunto de posições e velocidades de cada átomo ao longo do tempo, que é denominado de trajetória (BRUCCOLERI; KARPLUS, 1990).

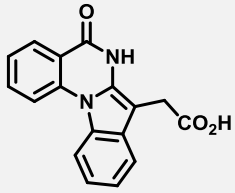
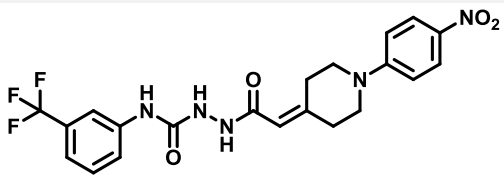
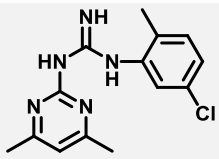
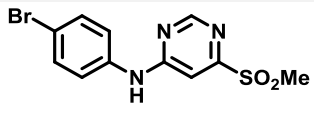
## **PARTE V. TRIAGEM VIRTUAL E AVALIAÇÃO DE POTÊNCIA (CINÉTICA ENZIMÁTICA)**

### **1.1 Triagem virtual: LBV e SBVS**

Com os avanços na ciência, os quais permitiram utilizar metodologias de busca em massa tais como (HTS - *High-Throughput screening* e VS – *Virtual screening*) (BAIG et al., 2018; HEVENER, 2018; POPOVA; ISAYEV; TROPSHA, 2018), o qual permite realizar estudos refinados para obtenção compostos bioativos com características desejáveis, que promovam potência frente ao alvo selecionado com toxicidade tolerável. Exemplo de sucesso de VS é: o estudo para a identificação de sulfonamidas de álcool hexafluoroisopropílico bicíclico como agonistas inversos do receptor órfão gama ( $ROR\gamma$  /  $RORc$ ), os quais relacionados com o receptor do ácido retinóico (GONG et al., 2018). De certa forma, esses avanços renovaram as esperanças no quesito de busca de um novo composto bioativo.

A triagem virtual é um método computacional que tem como objetivo identificar pequenas moléculas com afinidade por alvos biológicos determinados. Essa metodologia pode ser realizada com base na estrutura do ligante (LBVS – *Ligand Based Virtual Screening*) ou com base na estrutura do alvo biológico (SBVS - *Structure Based Virtual Screening*) por meio da análise estrutural, complementariedade química e/ou farmacofórica (HONÓRIO et al., 2008). Após seleção do alvo bioquímico, organizam-se bancos de dados virtuais de compostos que contemplem uma grande diversidade química (ex. ZINC, eMolecules e ChemDiv). Como esses bancos de dados são compostos por milhares de compostos, a triagem virtual pode ser guiada por filtros moleculares, tais como modelos farmacofóricos e propriedades físico-químicas. A regra dos cinco descrita por Lipinski e colaboradores em 1998 (peso molecular >500, doadores de ligação de hidrogênio >5, aceptores de ligação de hidrogênio >10 e clogP >5), é um excelente exemplo de filtro molecular que pode ser utilizado. Em seguida, realiza-se o *docking* molecular das estruturas previamente selecionadas pelos filtros estabelecidos de modo a avaliar a complementariedade com o alvo. A última, e mais importante, etapa é a seleção de compostos promissores e o teste biológico na enzima alvo. Essa etapa determina experimentalmente a atividade dos compostos selecionados, validando todo o processo realizado (MADHAVI SASTRY et al., 2013; SUN et al., 2016). Por fim, podemos citar alguns sucessos de compostos bioativos que foram desenvolvidos por meio de técnicas de LBVS e SBVS, o qual citado na tabela 2, onde são apresentados alguns desses compostos bioativos encontrados por meio dessas técnicas de triagem virtual (MATTER; SOTRIFFER, 2011). Com isso, essas técnicas vem demonstrando serem essenciais para planejamento de novos compostos bioativos.

**Tabela 2:** Tabela com compostos bioativos descobertos por meio de técnicas de triagem virtual.

NOME	ESTRUTURA 2D	ALVO	IC <sub>50</sub>
PBCM0546298		Quinase	80nM
ZINC8733517		Receptor Nuclear	20μM( <b>S</b> ) 0,75μM( <b>R</b> )
LN00452582		Protease	30μM
PBCM1471765		COX-2	1μM

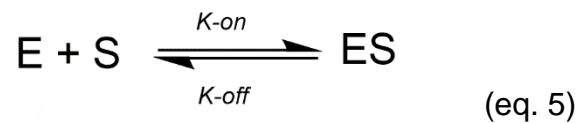
Fonte: (MATTER; SOTRIFFER, 2011)

## 1.2 Cinética enzimática: Enzimas, alvos de novos fármacos?

Entre as macromoléculas biológicas que se pode estudada na buscar novos fármacos, as enzimas ganham local de destaque, visto serem essenciais em processos biológicos e bioquímicos e, também, em muitos processos relacionados à uma doença. Deste modo, inibidores enzimáticos representam quase metade dos fármacos em uso clínico nos dias de hoje. Com as pesquisas sobre o genoma humano sugerem que o porção do genoma que codifica alvos “*druggable*” associados a doenças é dominado por enzimas (COPELAND, 2013; XU et al., 2018).

Portanto, a reação representa um equilíbrio reversível que pode ser descrito por uma constante de taxa de associação de “pseudo-primeira” ordem (*K-on*) e uma

constante de taxa de dissociação de primeira ordem ( $K\text{-off}$ ) (COPELAND, 2013) (eq. 5):



Deste modo, nas reações enzimáticas há formação do complexo ES como um equilíbrio isolado que é seguido por etapas químicas mais lentas. Entretanto, o modelo de “equilíbrio rápido” foi proposto pela primeira vez por Henri (1903) e independentemente por Michaelis e Menten (1913), onde correlaciona o estado estacionário da reação enzimática, estado esse ante de atingir o platô de saturação reacional (COPELAND, 2013).

Na prática, na maioria dos estudos de reações enzimáticas, o modelo de equilíbrio rápido não se sustenta; em vez disso, essas reações são estudadas em condições de estado estacionário. O termo estado estacionário refere-se a uma situação em que a concentração do complexo ES é mantida constante por um equilíbrio entre a taxa de formação de ES (por associação da enzima livre e substrato livre) e a taxa de desaparecimento complexo ES (através de dissociação de volta ao reagente livres e progressão para formação de produtos), onde  $v$  é a velocidade inicial;  $d$  dissociação do complexo;  $[S]$  concentração do substrato;  $[P]$  concentração do produto do meio reacional;  $dt$  tempo de dissociação;  $k_{cat}$  constante de catálise e  $[ES]$  complexo enzima substrato que gera produto no fim (COPELAND, 2013). A taxa ou velocidade de reação enzimática, medida quer pelo desaparecimento do substrato quer pelo formação do produto, é proporcional à concentração do complexo ES (eq. 6):

$$v = \frac{-d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = k_{cat} [ES] \quad (\text{eq. 6})$$

## PARTE VI. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

O objetivo geral desta tese foi identificar inibidores seletivos do alvo epigenético de *T. cruzi* Sir2 (*tcSir2*), por meio da integração de estratégias teóricas, computacionais e experimentais (ensaios biológicos). Assim, os objetivos específicos da proposta são:

1. Construção de modelo tridimensional da Sir2 de *T. cruzi*, por modelagem comparativa;
2. Estudo de campos de interação molecular e construção de fármacoforo;
3. Triagem virtual de possíveis inibidores de *tcSir2*;
4. Ensaios de cinética enzimática (Fluorimetria);
5. Avaliação da potência dos compostos selecionados;
6. Predição teórica de ADME.

# CAPÍTULO II

*Estudos de Modelagem Comparativa da Sirtuína 2*

*(Sir2)*

## 1. INTRODUÇÃO

No contexto de tripanossomatídeos em geral, a superexpressão de Sir2 está relacionada à sobrevivência de amastigotas (GAZANION et al., 2012; RITAGLIATI et al., 2015). Diversos autores consideram a maquinaria epigenética como potenciais alvos biológicos a serem estudados para o desenvolvimento de novos fármacos antiparasitários (GAZANION et al., 2012). Atualmente, a estrutura tridimensional da enzima Sir2 foi elucidada para a forma humana por cristalografia de raios-X (SACCONNAY et al., 2014).

Dessa forma, com base nas informações citadas no Capítulo I, a técnica de modelagem comparativa foi utilizada a fim de se obter a estrutura 3D da proteína em estudo, uma vez que até o momento a estrutura tridimensional da *tcSir2* ainda não foi obtida de maneira experimental.

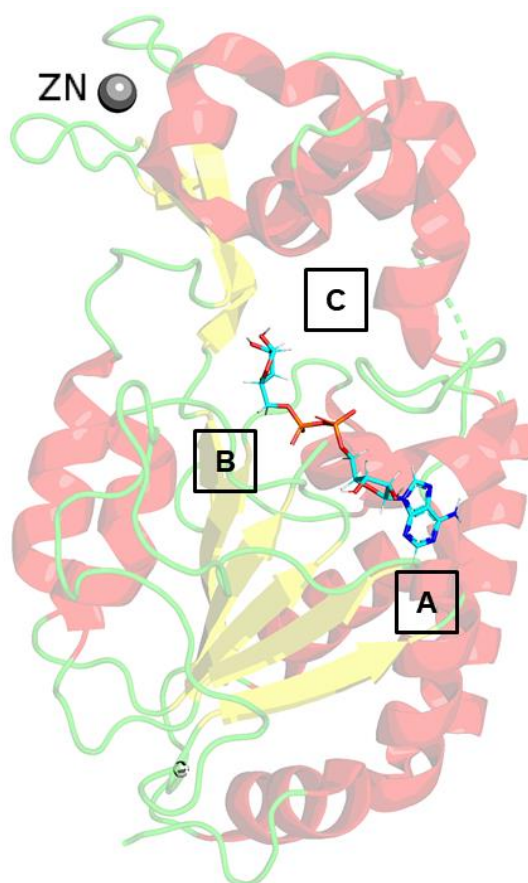
## 2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

O objetivo desta etapa do trabalho foi a construção do modelo da proteína Sir2 de *T. cruzi*. A estrutura da proteína se faz necessária para a aplicação das técnicas de SBDD e triagem virtual.

Como a sequência de aminoácidos da proteína Sir2 humana já está muito bem descrita na literatura, e a mesma possui uma alta identidade com a Sir2 de *T. cruzi*, utilizou-se a técnica de modelagem comparativa para a construção do modelo que foi posteriormente refinado por simulação de dinâmica molecular.

A estrutura cristalográfica da Sir2 humana (*hSir2*) (SACCONNAY et al., 2014), com resolução de 2,27 Å, foi utilizada para os avanços desse estudo, onde foram traçados possíveis bolsos de interações, as interações que cada bolso possui (Figura 5) e elucidado o mecanismo pelo qual age essa proteína, onde o Bolso C sendo o local o qual ocorre o a catálise citada anteriormente (Capítulo I), apresentando mais dois bolsos acessórios A e B, responsáveis por comportar a estrutura do cofator (NAD<sup>+</sup>), a partir dessas informações foi possível traçar o modo como seria construído o modelo 3D de *tcSir2*.

**Figura 5:** Regiões importantes da Sirtuína 2 humana (pdb:3ZGV).



**Fonte:** Elaborada pelo autor

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Primeiramente, foi realizado um BLASTp (*Basic Local Alignment Search Tool*) com objetivo de buscar/comparar a sequência de aminoácidos da proteína alvo com o sequenciamento de uma proteína de estrutura 3D já conhecida (ESWAR et al., 2007; SACCONNAY et al., 2014). A sequência de aminoácidos obtida, foi extraída da plataforma NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

A fim de correlacionar os dados, foi também realizada uma busca por proteínas com identidade estrutural no servidor HHpred (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>), por meio de algoritmos baseados em alinhamentos HMM-HMM (*Hidden Markov Models – Modelos ocultos de Markov*) (BIEGERT; SÖDING, 2009).

O modelo foi contruído utilizando o programa Modeller v9.19 (WEBB; SALI, 2014), e para validação do modelo construído, foi realizado uma predição dos ângulos de ligação dos aminoácidos, por meio do gráfico de Ramachandran, e a



predição de qualidade do modelo pela ferramenta *ProSa-web* (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007).

Para inserção do NAD<sup>+</sup> no modelo de *tcSir2*, foi realizado *docking* molecular, utilizando a metodologia de *cross-docking*, baseados no sítio de interação ocupado pelo cofator no cristal (pdb: 3ZGV) e no modelo *tcSir2*, antes do *docking*, o ligante e as moléculas água foram removidas e os átomos de hidrogênio foram adicionados na geometria padrão usando o módulo *Biopolymer* implementado na plataforma SYBYL 2.1 (TRIPOS, 2001), enquanto o átomo de Zn<sup>2+</sup> foi mantido no cristal e no modelo de *tcSir2*. Finalmente, os hidrogênios polares foram adicionados em ambas estruturas. O *docking*, então, foi realizado utilizando o programa GOLD 5.5. As corridas de acoplamento foram realizadas com um raio de 10 Å, nas coordenadas do cofator (NAD<sup>+</sup>).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A primeira etapa para seleção e identificação da sequência a ser utilizada no estudo, podemos definir duas situações possíveis: (a) conhece-se a família protéica a que pertence a proteína-problema; (b) não se sabe a que família a proteína-problema pertence. Com isso, no presente trabalho já tínhamos a situação (a) respondida, por isso, a busca foi feita relacionando a enzima Sir2 com o parasita *T. cruzi*.

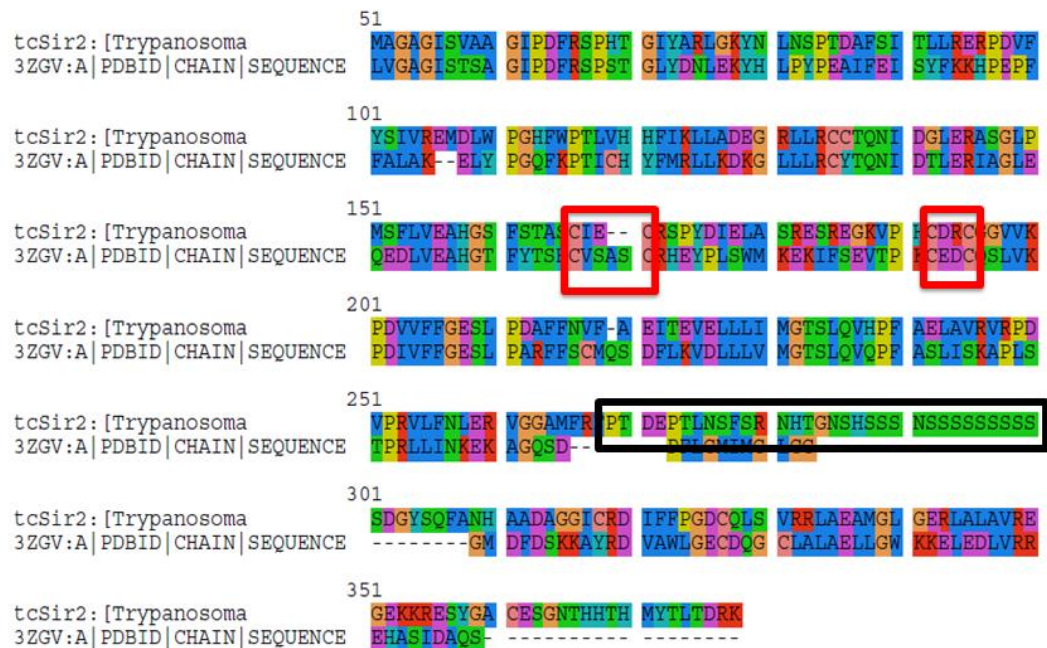
Posteriormente à esta etapa, a sequência “*silent information regulator 2 (Trypanosoma cruzi strain CL Brener)*” foi escolhida. A fim de confirmar a escolha da sequência, foi comparado algumas sequências primárias hipotéticas (*protein putative*) de vários tripanossomátideos, representadas pelo código inicial “XP” extraídas do servidor NCBI, encontrando semelhança estrutural com a *T. brucei* que possui evidência experimental comprovada (Tabela 3), isso é importante pois demonstra robustez da sequência utilizada.

**Tabela 3:** Tabela com a identidade em relação a sequência de *T. cruzi* para todos os tripanosomídeos encontrados na plataforma NCBI, sequências hipotéticas/*putative* (XP), onde foram aferidas as porcentagem de similaridade com a sequência utilizada no estudo.

Nome da Sir2 - Organismo	CódiGo NCBI	Identidade
<i>T. CRUZI CL BRENER</i>		---
<i>T. CRUZI GRAYI</i>	XP_009310548.1	70%
<i>T. BRCEI GAMBIENSE</i>	XP_011774481.1	69%
<i>T. BRUCEI</i>	AAC73004.1	67%
<i>T. VIVAX</i>	CCC48817.1	65%
<i>L. INFANTUM</i>	XP_001470369.1	56%
<i>L. DONAVIAN</i>	XP_003861609.1	56%
<i>L. AMAZONENSIS</i>	AAN63359.2	56%
<i>L. MEXICANA</i>	XP_003876325.1	55%

**Fonte:** Elaborada pelo autor

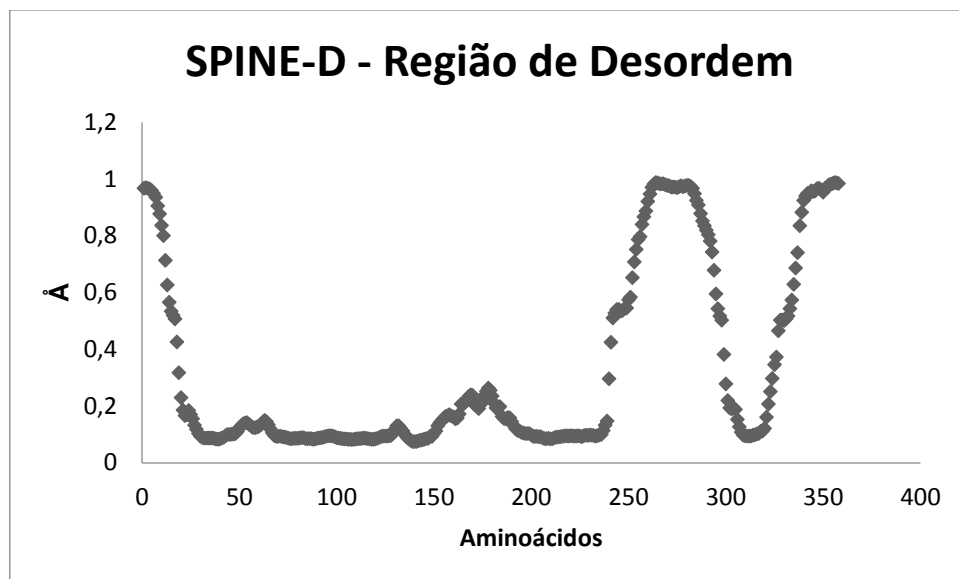
A sequência escolhida possui um total de 359 aminoácidos sem nenhuma quebra, a sequência encontrada possui 46% de identidade estrutural com a Sir2 humana (pdb: 3ZGV) e de 70-55% com os demais tripanosomatídeos. Para definir essa porcentagem de identidade, foi realizado, um alinhamento global, que é feito ao longo de toda a sequência, a fim de se determinar as regiões mais conservadas e que apresentam alto grau de similaridade (BIEGERT; SÖDING, 2009). Após essa etapa, foi feita a escolha por um molde apropriado, levando-se em consideração a identidade de sequência, a porcentagem de probabilidade, o *E-value* e a pontuação. O melhor alinhamento foi obtido em ambos servidores (NCBI e HHPRED) utilizando a estrutura cristalográfica selecionada. A qualidade da estrutura cristalográfica também foi verificada a partir dos valores de resolução, *R-free value*, gráfico de Ramachandran. O NAD<sup>+</sup> foi inserido por meio de docking molecular (VERDONK et al., 2003) e o átomo Zn<sup>2+</sup> foi inserido por sobreposição utilizando o programa PyMol (DELANO, 2004). Como esses resultados, tendo a estrutura com porcentagem de identidade (46%) definida e baixa probabilidade de erro (*e-value* =  $4 \times 10^{-69}$ ), foi realizada a construção do modelo da estrutura da *tcSir2* utilizando o programa Modeller v 9.19 (BIEGERT; SÖDING, 2009; SACCONNAY et al., 2014). Vale ressaltar, que o alinhamento 1D (Figura 6) foi utilizando os programas Seaviwer v2.4 e BioEdit v7.0.5, a fim de encontrar alinhamentos homogêneos (BIEGERT; SÖDING, 2009) (MONIOT; SCHUTKOWSKI; STEEBORN, 2013).

**Figura 6:** Alinhamento da sequência de *tcSir2* com a hSir2 (PDB: 3ZGV)

**Fonte:** Elaborada pelo autor

De modo a construir um modelo fidedigno, foi importante checar se as regiões do bolso catalítico estavam próximas às regiões de desordem, que são regiões altamente flexíveis que podem atrapalhar no momento da construção do modelo. A figura 6 é apresentada os aminoácidos que compõem a região de desordem (marcados em preto) se encontram distantes da região do  $Zn^{2+}$  (marcados em vermelho), encontrado entre as Cys-150, Cys-155, Cys-174 e Cys-177, podem observar também (Figura 6) que os aminoácidos são coloridos por suas características moleculares, em uma escala de cor que varia entre azul a vermelho, baseado na força de interação molecular, sendo na escala azul os aminoácidos susceptíveis a interações hidrofóbicas e em vermelho os aminoácidos susceptíveis a interações de hidrogênio, e onde encontram as linhas tracejadas, são correspondentes aos *gaps*, números de aminoácidos diferentes entre as seqüências (GOUY; GUINDON; GASCUEL, 2010). Adiante, foi realizada uma análise no servidor SPINE-D (ZHANG et al., 2012) (Figura 7) identificando essas regiões antes da construção do modelo. Esse procedimento, evita encontrar problemas na construção do modelo 3D de *tcSir2*, problemas esse que pudessem atrapalhar, por exemplo, o *fold*ing da *tcSir2*, que é fundamental para garantir a estabilidade da proteína (MONIOT; SCHUTKOWSKI; STEEGBORN, 2013; RITAGLIATI et al., 2015; SACCONNAY et al., 2014), então, finalmente o modelo foi construído.

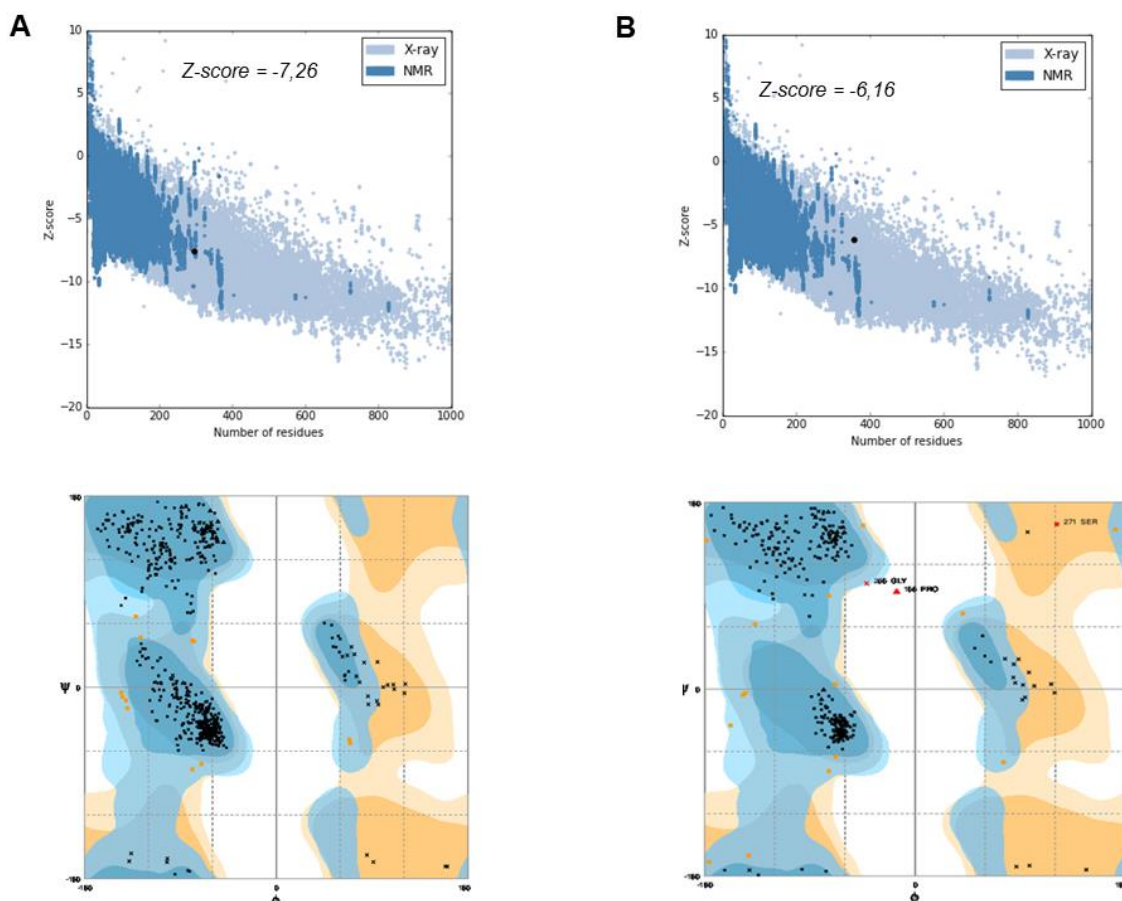
**Figura 7:** Gráfico de predição da região de desordem para construção do modelo de *tcSir2*, no eixo X os aminoácidos e no eixo Y  $\Delta$ , onde é feita uma predição de movimentação desses resíduos baseado em dados teóricos de cada resíduo.



**Fonte:** Elaborada pelo autor

A validação do modelo obtido foi realizada por meio do gráfico de Ramachandran. Este gráfico representa a representação em forma de diagrama ( $\phi, \psi$ ) onde pode-se visualizar todas as combinações possíveis de ângulos diédricos  $\Psi$  (psi) versus os  $\Phi$  (phi) que contribuem para a conformação das estruturas das proteínas (RAMACHANDRAN; RAMAKRISHNAN; SASISEKHARAN, 1963). E por fim, uma análise da qualidade do modelo ( $Z\text{-score} < 0$ ), onde pode-se observar características que definem um bom modelo baseado em um banco de dados de estruturas elucidadas experimentalmente (Figura 8). Para o gráfico de Ramachandran, apresentou 97,25% dos resíduos em regiões favoráveis, 2,5% dos resíduos em regiões permitidas e 0,5% dos resíduos em regiões não permitidas, o que corresponde a 2 resíduos: Pro-156 e Ser-271 (WEBB; SALI, 2016).

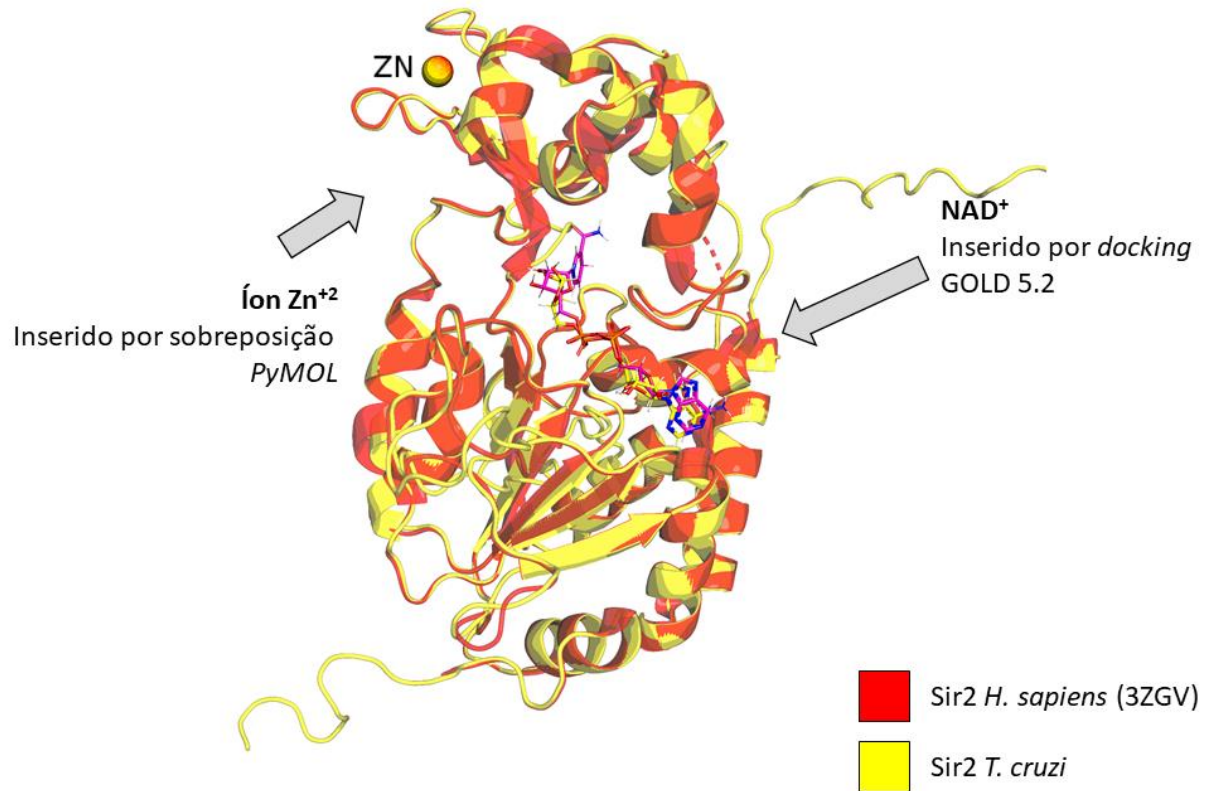
**Figura 8:** Gráfico de Ramachandran e qualidade do modelo: A - hSir2 (0,0% de *outlier*) e B - tcSir2 (0,5% de *outlier*) obtido por modelagem comparativa



**Fonte:** Elaborada pelo autor

Após a obtenção do modelo 3D inicial de *tcSir2*, um íon de  $Zn^{2+}$  foi adicionado ao domínio *Zn-finger* utilizando as coordenadas cartesianas do íon presente na estrutura 3D da proteína molde e a estrutura. Já o cofator  $NAD^+$  foi adicionada utilizando simulações de acoplamento molecular com o programa GOLD 5.5 (MARCEL L. VERDONK et al., 2005; VERDONK et al., 2003) utilizando os parâmetros padrão do programa. A estrutura do complexo obtido (*tcSir2*- $Zn^{2+}$ - $NAD$ ) (Figura 9), apresentando um RMSD em relação OADP-ribose (pdb: 3ZGV) e  $NAD^+$  (Modelo de *tcSir2*) de 1,7 Å. Em relação aos aminoácidos em comum (Figura 10), podemos notar que alguns aminoácidos como: Gln, Gly, Phe, Ala, Thr, Val, Asn, Ser e Arg. Com todas as análises devidamente realizadas, o modelo de *tcSir2* foi considerado robusto e assim foi submetido a simulações de dinâmica molecular (DM) para um refinamento e validações estruturais.

**Figura 9:** A estrutura do complexo obtido após o *Docking* do co-fator (NAD<sup>+</sup>).



**Fonte:** Elaborada pelo autor

## 5. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados acima, o modelo de *tcSir2* foi construído com sucesso, sua validação foi realizada por meio de gráfico de Ramachadran, RMSD com a estrutura molde e análise de qualidade do modelo (*Z-score*), demonstrando que o modelo possui confiabilidade e robustez para ser aplicado em estudos de simulação por dinâmica molecular. Pode-se, assim, concluir que a técnica de modelagem comparativa é uma técnica versátil, muito útil e de grande valia a ser utilizada quando não se conhece a estrutura cristalográfica da proteína em estudo, se mostrou eficiente em nosso estudo. O modelo obtido apresentou resultados satisfatórios em todas as etapas de validação, mostrando-se um modelo estável para as próximas etapas do trabalho.

# CAPÍTULO III

## *Simulação por Dinâmica Molecular – Refinamento do Modelo Obtido por Modelagem Comparativa*

## 1. INTRODUÇÃO

A simulação por dinâmica molecular (DM) é uma ferramenta computacional versátil, criada para o estudo do movimento de sistemas ao longo do tempo e pode ser utilizada para complementar técnicas experimentais, como descrito anteriormente (KALYAANAMOORTHY; CHEN, 2014; MAKAREWICZ; KAZMIERKIEWICZ, 2016; VAN DER SPOEL et al., 2005). A técnica de DM foi desenvolvida na década de 1970 a fim de compreender o movimento das proteínas (HESS et al., 2008), é uma ferramenta amplamente utilizada no planejamento de fármacos por SBDD por exemplo.

A partir da obtenção de um modelo da uma estrutura cristalográfica, criomicroscopia eletrônica, ressonância magnética nuclear ou por modelagem comparativa (DURRANT; MCCAMMON, 2011). A partir disso, utiliza-se equações matemáticas para prever interações que ocorrem entre átomos ligados e não ligados (interações de van der Waals, interações hidrofóbicas, ligação de hidrogênio, entre outros). Essas interações derivam de forças que agem sobre cada átomo, e essas forças tentam simular o movimento real do sistema (DURRANT; MCCAMMON, 2011; VAN DER SPOEL et al., 2005).

Os campos de força é um conjunto de parâmetros os quais descrevem características como propriedades físico-químicas, eletrônicas e físicas de cada átomo do sistema estudado. Esses parâmetros são preditos experimentalmente e refletidos conjuntos de dados, e sua escolha deriva do sistema estudado em questão. Dessa forma, todos esses parâmetros em conjuntos são chamados de campos de força, os quais descrevem as contribuições das forças que governam a DM (DURRANT; MCCAMMON, 2011).

Como descrito acima, existem vários tipos de campos de força. Neste trabalho utilizamos o campo de força OPLS3e, que foi desenvolvido principalmente para culminar esforços significativos e de grande escala, criando um campo de força mais preciso com a cobertura mais abrangente para o espaço químico (HALGREN, 1996; HESS et al., 2008; VAN DER SPOEL et al., 2005).

## 2. OBJETIVOS

Nesta etapa do trabalho, foi realizada a simulação por dinâmica molecular com o objetivo de refinar o modelo obtido por modelagem comparativa e verificar se não há alterações conformacionais, em especial, na região ocupada pelo cofator e o sítio de catálise, que é uma região conservada (*Rossmann-fold*) e que necessita ser



ocupada para que ocorra a desacetilação da lisina. Este modelo, posteriormente, foi utilizado para análises dos MIF's e triagem virtual.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Os cálculos de DM foram realizados no programa Desmond (*High-desempenho molecular dynamics simulations*) para a *tcSir2* + NAD<sup>+</sup>. Antes da simulação, a estrutura proteica foi preparada usando a ferramenta de *Protein preparation* (GUEDES; DE MAGALHÃES; DARDENNE, 2014), onde os estados de protonação da foram corrigidos, assim como as cargas do ligante atribuído (Cofator). O campo de força utilizado foi o OPLS3e (HARDER et al., 2016). Este campo de força tem um melhor desempenho no que representa as propriedades do ligante e, portanto, é adequado para lidar com a diversidade química derivada das triagens virtuais (DROR et al., 2010), isso será de suma importância para realização da simulações dos ligantes que apresentarem atividade frente a *tcSir2* (Capítulo VI). O sistema simulado abrangerá, além do complexo proteína-ligante, um modelo de água predefinido (carga pontuais simples, TIP3) como solvente em uma caixa cúbica com condições de contorno periódicas especificando a forma e tamanho da caixa como distância de 13 Å e sendo balanceadas com ions sódio e cloretos (Na<sup>+</sup> ou Cl<sup>-</sup> ajustado para neutralizar a carga geral do sistema). As interações de curto alcance serão tratadas usando um valor de corte de 9,0 Å, enquanto o método de Malha de Partícula Ewald (PME) lidará com interações de longo alcance.

Inicialmente, o relaxamento do sistema foi realizado usando o declive máximo (*Steepest Descent*) e os algoritmos de memória limitada *Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno* de maneira híbrida. A simulação foi realizada sob o *NPT ensemble* por 5 ns implementando os métodos do termostato e do barostato de *Berendsen*. Uma temperatura constante de 310 K foi mantida durante toda a simulação usando o algoritmo do termostato *Nose-Hoover* e o algoritmo *Martyna-Tobias-Klein Barostat* para manter 1 atm de pressão, respectivamente.

Após a minimização e relaxamento do sistema, prosseguiu-se com a simulação de produção. Foram realizadas as simulações durante 200 ns, registrando recordados a cada 200 ps, sendo realizado o mesmo procedimento duas vezes a mais, mudando apenas o valor de alimentação (*g\_seed*) da simulação. Com o protocolo estabelecido, o mesmo será submetido para os compostos adquiridos da triagem virtual (Vide capítulos IV; V; VI e VII) As simulações, então, foram analisadas usando a trajetória, tanto pela estabilidade do ligante quanto pelas mudanças gerais

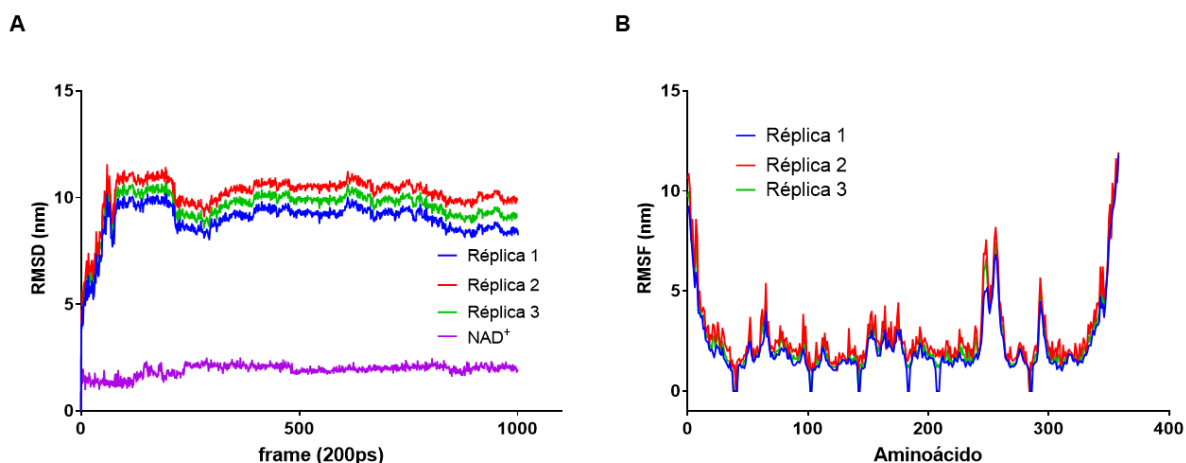
na conformação da proteína, ao longo do tempo, usando parâmetros como os ângulos de torção e a mudança no desvio médio quadrático médio (RMSD).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a construção do modelo de *tcSir2*, e inclusão do  $Zn^{2+}$  e do  $NAD^+$ . O complexo foi submetido a simulação de Dinâmica Molecular, para avaliar a estabilidade do sistema e o movimento da estrutura construída.

A simulação do sistema estabilizou a partir dos 100ns, mostrando um *cutoff* de variação entre as poses de 0,05 Å até os 200ns finais, demonstrando que as conformações geradas nesse período não sofrem muita variação conformacional. Corroborando com estudos que demonstram que este tempo de estabilização é essencial quando tentamos observar simulações de complexos (KRÜGER et al., 2018). Portanto, os últimos 100ns de simulação foram considerados para análise da trajetória devido à estabilização do sistema, de acordo com os gráficos de *root-mean-square deviation* desvio (RMSD) (Figura 10-A) dos átomos do *backbone* e análise de *root mean square fluctuation* (RMSF) (Figura 10-B), o qual foi possível calcular as regiões (aminoácido) que apresentaram alta ou baixa flutuação durante a simulação. Observou-se o RMSD, sendo que a linha azul, verde e vermelho, referentes a cada uma das réplicas das corridas de produção da DM, que mesmo quando alterado o valor de alimentação da DM, a produção demonstra-se um certa congruência referente a sua estabilização. Tal fato é corroborado quando observa-se a estabilidade do  $NAD^+$  quanto a sua estabilização, a linha em rosa, representando o RMSD do cofator.

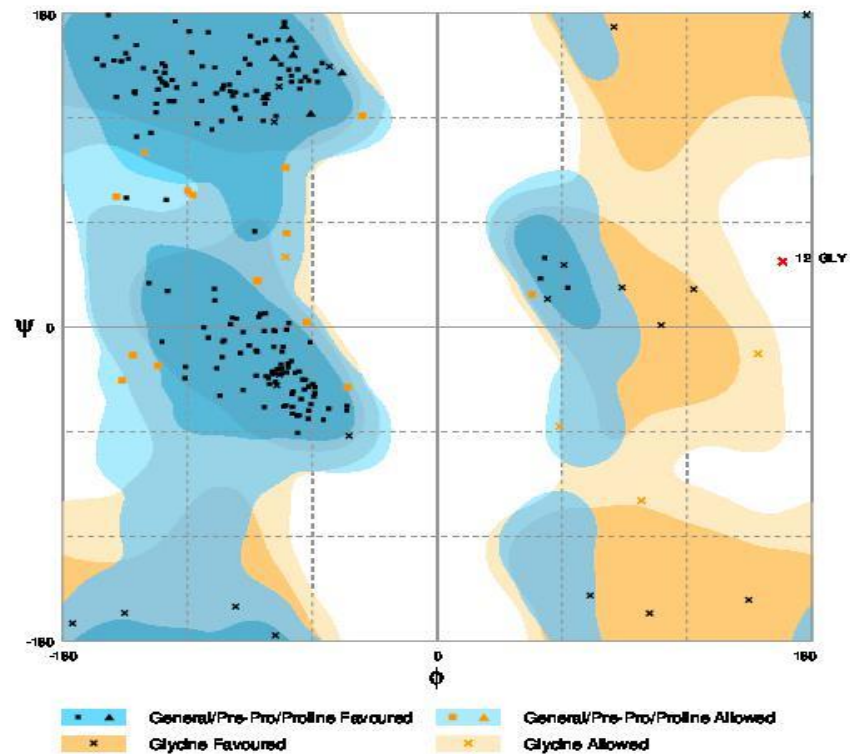
**Figura 10.** Análise da trajetória da DM que foram realizadas em triplicatas; A – *Root Mean Square deviation* e B - *Root-mean-square fluctuation*. Observa-se, tanto no gráfico A e como no B, uma parsimônia entre as réplicas mostrando que as mesmas se estabilizam da mesma maneira, mesmo mudando seu valor de alimentação.



**Fonte:** Elaborada pelo autor

Foi selecionada uma estrutura 3D representante da conformação *tcSir2* mais abundante na simulação, estrutura representativa que por uma análise de clusterização buscou a estrutura entre todas as conformações geradas na DM que apresentava o menor valor de RMSD,  $> 0,005 \text{ \AA}$ . A análise do gráfico de Ramachandran demonstrou que a maioria dos resíduos encontraram-se em regiões favoráveis, azul, o modelo de *tcSir2* mais representativo apresentou (0,1%) dos resíduos em regiões não permitidas, o que corresponde a 1 resíduo: Gly-12 que por possuir baixo peso molecular e uma cadeia curta, não influencia estatisticamente na análise por gráfico de Ramachandran, indicando uma qualidade estrutural, pois os resíduos de Pro-156 e Ser-271 retornaram para suas regiões permitidas (Figura 11).

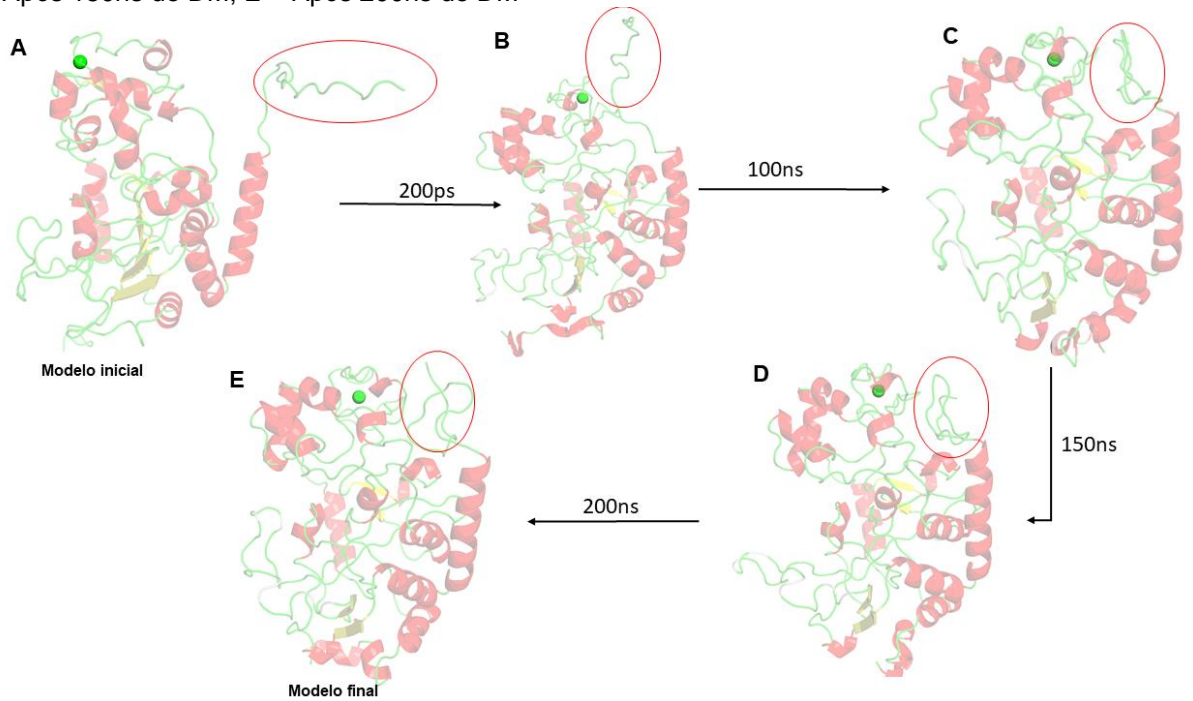
**Figura 11:** Ramachandran do modelo após a DM



**Fonte:** Elaborada pelo autor

A simulação de DM sugeriu movimentação das cadeias terminais da estrutura construída. A Figura 12 mostra a estrutura 3D *tcSir2* inicial até a final obtida por simulações DM. Nesta figura é possível observar a movimentação da alça N-terminal da estrutura inicial-*tcSir2* até a estrutura *tcSir2*-final a qual sugere que ocorre a compactação que leva melhor representação do modelo obtido, demonstrando que a partir de 100ns realmente o modelo assume uma conformação estável. Uma vez que a DM foi realizada com intuito de refinar o modelo construído por modelagem comparativa e a fim de extrair informações o mais fidedignas possíveis do modelo *tcSir2*, a compressão de como ocorre o enovelamento da *tcSir2* é importantíssima para os próximos passos como da triagem virtual e DM dos compostos selecionados testado biologicamente.

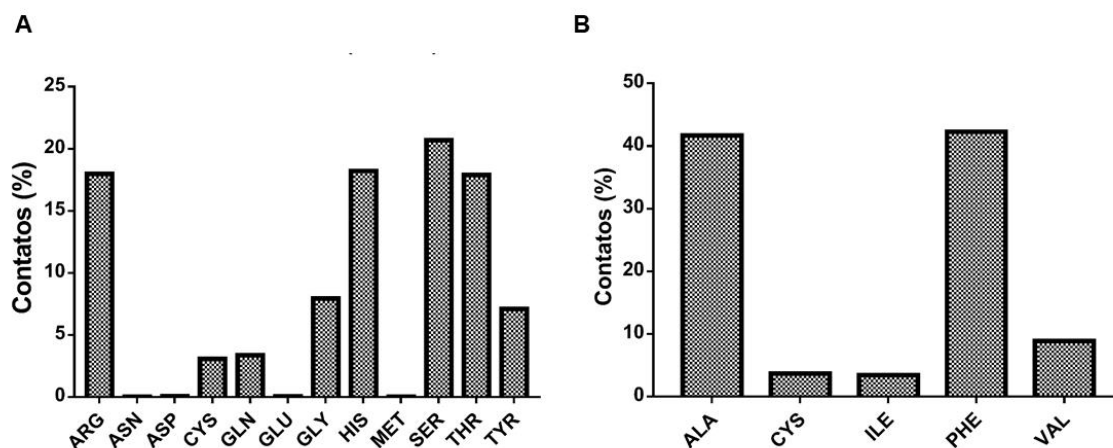
**Figura 12:** Modelo *tcSir2* – Inicial até a final ; A – Inicial; B – Após 200ps de DM; C – Após 100ns de DM; D – Após 150ns de DM; E – Após 200ns de DM



**Fonte:** Elaborada pelo autor

Com a amostra mais representativa do modelo de *tcSir2* após simulação por DM, foi realizada a análise de interações entre o cofator e enzima. Em primeiro lugar, foi feita uma análise das ligações de hidrogênio (*h-bond*), no sítio ativo ocupado pelo cofator, enzima com  $\text{NAD}^+$  (Figura 13). Em geral as principais ligações devem se manter constantes. Avaliações das ligações de hidrogênio mais estavam foram realizadas por meio da análise da constância destas ligações entre  $\text{NAD}^+$  e resíduos do sítio ativo ao longo do tempo. Esses resultados são apresentados em forma de gráfico na Figura 13. Norteados por essa análise, foi avaliada a frequência de ligações de hidrogênio com resíduos sobre o sítio de ligação durante toda trajetória e durante o tempo de estabilização do sistema (Figura 13 – A e B). A partir destes resultados, é possível observar os possíveis resíduos que interagem com a  $\text{NAD}^+$  de forma satisfatória. Baseado na frequência pode-se inferir que o sistema se estabiliza, e os resíduos de Gln-217, Glu-240 e Ser-215 sugerem ligações de hidrogênio com o  $\text{NAD}^+$  com uma frequência superior (> 60%). Portanto, os resíduos mencionados foram identificados como sendo essenciais para a interação no sítio de ligação a  $\text{NAD}^+$ .

**Figura 13:** A - frequência de ligações de hidrogênio e B - frequência interações hidrofóbicas entre a NAD-*tcSir2* em toda a simulação DM e durante a estabilização do sistema.



**Fonte:** Elaborada pelo autor

A literatura sugere que interações do tipo  $\pi$ -cátion e  $\pi$ -stacking são importantes para estabilizar os grupos adenina e nicotinamida, respectivamente, do NAD<sup>+</sup> dentro do sítio de ligação (AVALOS; BEVER; WOLBERGER, 2005; AVALOS; BOEKE; WOLBERGER, 2004). Portanto, as distâncias entre os centroides do grupo adenina e dos resíduos Arg-50 e Arg-241 (Figura 13-A), e do grupo nicotinamida e o resíduo Phe-49 (Figura 13-B), foram calculadas ao longo de toda a trajetória de DM e tem valores de 13%, 11% e 26% respectivamente, significando que esses resíduos são primordiais para estabilização do NAD<sup>+</sup> no sítio catalítico.

Estes resultados sugerem que ambas as interações propostas pela literatura acontecem entre o NAD e a *tcSir2*. Deste modo, não somente ligações de hidrogênio, mas também interações do tipo  $\pi$ -cátion e  $\pi$ -stacking são necessárias para estabilizar o NAD<sup>+</sup> dentro de seu sítio de ligação.

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados de simulação por DM apresentados sugerem que o modelo estabilizou após 100 ns, tempo no qual foi possível notar que as ligações necessárias para manter o modelo estável foram conservadas. Essas estão presentes no sítio catalítico da *Sir2*, tais como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas do tipo  $\pi$ -stacking, por exemplo, interação do tipo  $\pi$ -stacking entre o resíduo Phe-49 e a porção nicotinamida do NAD<sup>+</sup>. À vista disso, obtiveram-se resultados satisfatórios em todas as etapas de validação. Assim, o modelo pode ser utilizado nos próximos passos, como análises dos campos de interação molecular (MIF's) e triagem virtual.



# **CAPÍTULO IV**

## ***Construção do Farmacóforo - Campos de Interações Moleculares (Molecular Interactions Fields – MIFs)***



## 1. INTRODUÇÃO

Existem muitos programas que podem ser usados para calcular o potencial eletrostático em torno de uma molécula. Em geral esses programas utilizam átomos de prova, os quais têm características determinadas, tais como hidrofobicidade, hidrofílicidade, doadores ou aceptores de ligações de hidrogênio, entre outras. Após determinar a afinidade ou não por esses átomos de prova, os dados são traspostos para uma matriz, a qual reúne os resultados para cada um dos átomos da molécula em análise. Estes dados são tratados estatisticamente e apresentados por meio de um modelo gerado a partir das coordenadas  $x, y, z$  dos átomos analisados. Este modelo é então cercado por um imaginária grade ortogonal (caixa com as coordenadas  $x, y, z$ ) (CRUCIANI, 2006). O próximo passo seria calcular o força (trabalho) em *joules* necessária para trazer uma carga eletrostática unitária do infinito ao primeiro ponto da caixa e a força total necessária para esse trabalho, e é uma medida do potencial elétrico naquele ponto específico da grade. O mesmo procedimento é então repetido para cada um dos outros pontos da grade, incluindo aqueles que estão dentro da molécula, até que o potencial tenha sido calculado para cada posição. Os resultados poderiam então ser usados como entrada para mais cálculos, mas estudar uma tabela de dados impressos seria uma tarefa árdua, dessa maneira, os resultados são criados a partir de um ambiente tridimensional computacional teórico, mostrando, então, uma superfície de contorno ao redor da molécula (ROCHA; FREITAS; MONTANARI, 2010). Grandes avanços na área de planejamento de fármacos seu deu devido à esses estudos dos campos de força de interação, um exemplo marcante são os inibidores de neuraminidases, por exemplo (INAMDAR et al., 2014).

A complementariedade com o receptor é de suma para a ação de um fármaco. Assim, a compreensão da estrutura do receptor, ou seja do alvo bioquímico escolhido, de maneira completa, sua cinética ou outros parâmetros de funcionamento, é considerada um fator limitante quando o assunto é sucesso na busca por novos inibidores baseados na estrutura do receptor (DE MOLFETTA et al., 2009; FERREIRA et al., 2011a; ROCHA; FREITAS; MONTANARI, 2010).

O cálculo e análise dos campos de interação molecular (do inglês, *MIF - Molecular Interactions Fields*) se apresentam como uma ferramenta poderosa a fim de gerar informações sobre as características estruturais e físico-químicas de uma região da proteína alvo determinada, ou mesmo sobre o complexo ligante-receptor (COSGROVE et al., 2006; ROCHA; FREITAS; MONTANARI, 2010). Essa análise,

permite a identificação de possíveis pontos favoráveis à interação ligante-receptor de acordo com a propriedade avaliada, tais como hidrofiliicidade, hidrofobicidade, doadores e aceptores de ligação de hidrogênio (ROCHA; FREITAS; MONTANARI, 2010).

## 2. OBJETIVOS

Dessa maneira, os objetivos foram realizados com as análises desses campos de interação moleculares com a fim de obter informação a respeito do sítio ocupado pelo cofator da Sir2, para a construção do modelo farmacóforico. De modo fidedigno, foi feito uma comparação com a hSir2, o modelo mais representativo de *tcSir2* da simulação por DM, no intuito da construção de modelo fármacoforico com pontos mais específicos possíveis para a enzima parasitária. Assim, é possível buscar compostos mais seletivos na etapa de triagem virtual.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

Com base nos dados apresentados no capítulo anterior, uma análise dos campos de força moleculares (MIFs) foi realizada utilizando o programa GRID v22c (BALLANTE; RAGNO, 2012; ROCHA; FREITAS; MONTANARI, 2010), na qual foi utilizado as sondas descritas na tabela 4 para as devidas análises desses campos (Tabela 4). A grade caixa de 18 Å de eixo, com uma resolução de 5.0 Å, foi centrada no cofator NAD<sup>+</sup> e suas coordenadas são definidas nos eixos x, y e z.

**Tabela 4:** Sondas utilizadas para calcular os campos de interações.

<b>Sonda</b>	<b>Propriedade</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Hidrofílica
<b>DRY</b>	Hidrofóbica
<b>C1</b>	Vinil e carbono aromático
<b>C3</b>	Metil carbono sp <sup>3</sup> - Hidrofóbica
<b>N:</b>	Nitrogênio do grupo amina com par de elétrons livre ( <i>H-bond acceptor</i> )
<b>N1</b>	Nitrogênio grupo amida ( <i>H-bond donor</i> )
<b>O</b>	Oxigênio sp <sup>2</sup> ( <i>H-bond acceptor</i> )

**Fonte:** Elaborada pelo autor

Os campos foram analisados no programa *PyMol 2.1* (DELANO, 2004), a construção do modelo farmacóforico realizou-se no programa UNITY da plataforma SYBYL (TRIPOS, 2001).

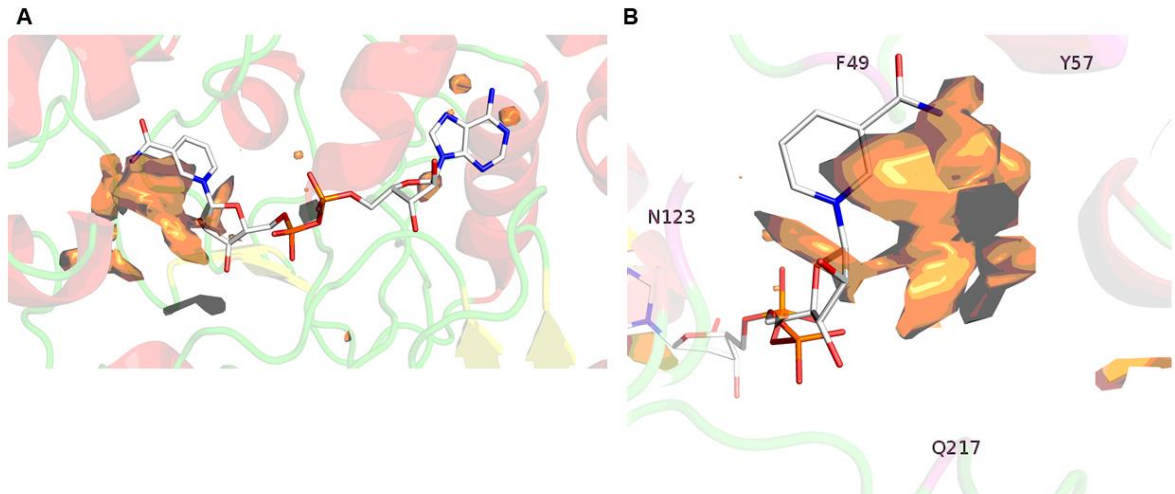
#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises realizadas das simulações por DM, indicaram regiões que continham resíduos importantes para interação com o cofator  $\text{NAD}^+$  (A) e o sítio de catálise (B) (sítio da nicotinamida), essas informações nos deram subsídios teóricos para foco nos estudos de campos de interação molecular.

A maioria das sondas GRID são anisométricas porque cada sonda representa um átomo ou um pequeno grupo de átomos. Por exemplo, uma sonda de oxigênio de carbonila é um átomo de oxigênio com um par de pares solitários  $\text{sp}^2$ , possui tamanho, polarizabilidade e carga eletrostática, e cada par solitário pode aceitar uma ligação de hidrogênio. O centro do oxigênio é colocado no primeiro ponto de grade, e uma verificação é feita para inaceitavelmente maus contatos próximos. Se nenhum for encontrado, o programa procurará por uma ligação de hidrogênio próxima átomos doadores no alvo, e uma lista desses doadores é feita e ordenada (CRUCIANI, 2006).

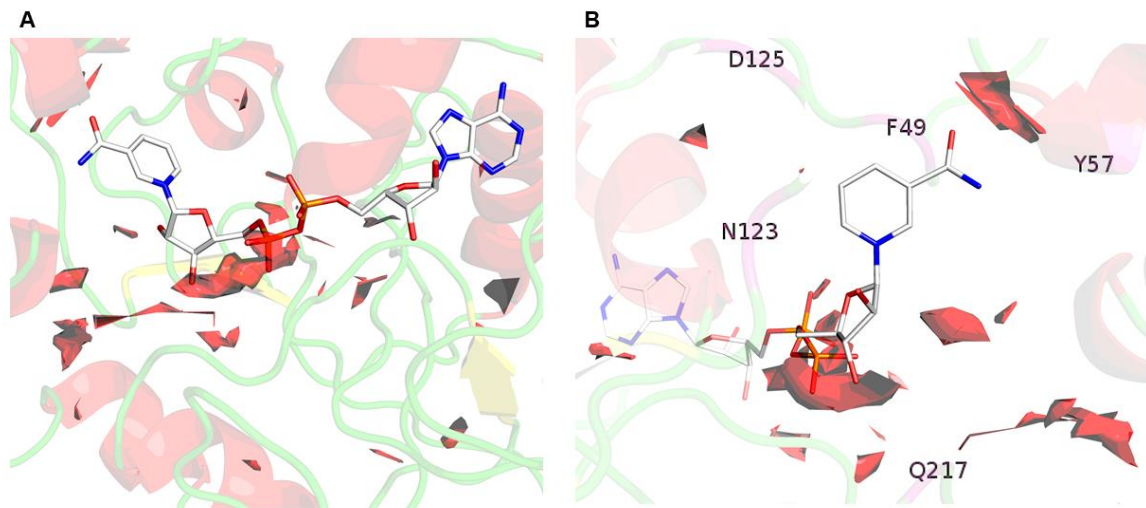
Dessa forma, primeiramente, foram observadas as características mais presentes no cofator e no sítio de catálise, como a sonda DRY que busca regiões susceptíveis a interações hidrofóbicas (Figura 14-A e Figura 14-B). Para a sonda O, encontra a qual surere regiões aceitadoras de ligação de hidrogênio, devido à característica de busca regiões aceitadoras de ligação de hidrogênio (Figura 15-A e Figura 15-B) e na sonda de  $\text{H}_2\text{O}$  podemos inferir regiões hidrofílicas (Figura 16-A e Figura 16-B). Essa análise corrobora com os dados apresentados no capítulo anterior, mostrando o contato com os resíduos que foram discutidos.

**Figura 14:** MIFs gerados no programa GRID v22c. (sonda DRY); A – NAD<sup>+</sup> e B – Sítio de catálise (Nicotinamida).



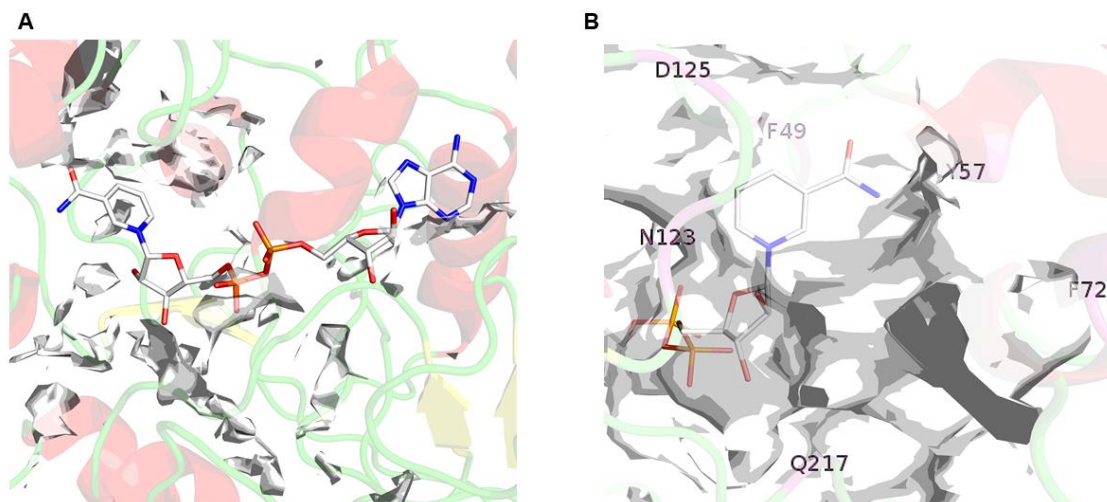
**Fonte:** Elaborada pelo autor

**Figura 15:** MIFs gerados no programa GRID v22c. (sonda O<sub>2</sub>); A – NAD<sup>+</sup> e B – Sítio de catálise (Nicotinamida)



**Fonte:** Elaborada pelo autor

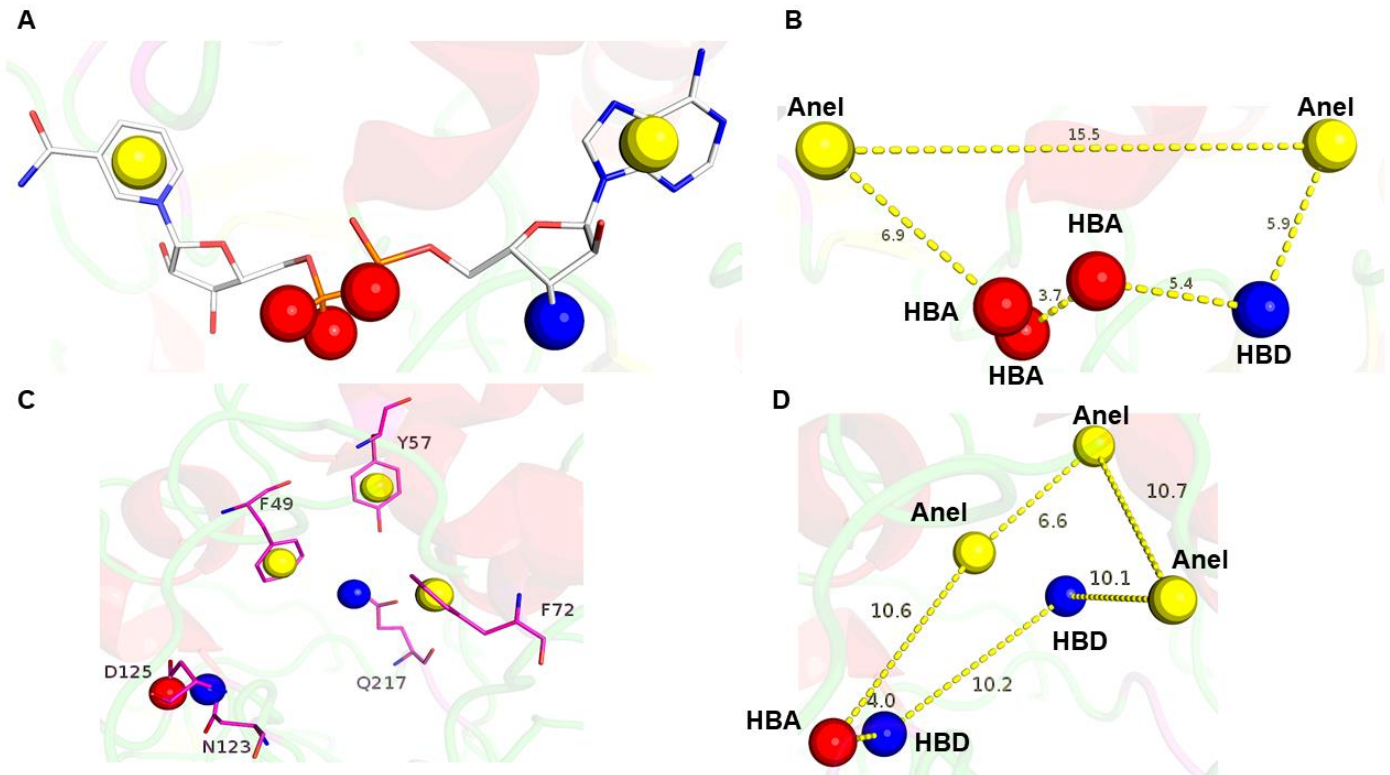
**Figura 16:** MIFs gerados no programa GRID v22c. (sonda H<sub>2</sub>O); A – NAD<sup>+</sup> e B – Sítio de catálise (Nicotinamida)



**Fonte:** Elaborada pelo autor

Como sugerida pelos estudos de frequência de interação entre os resíduos de aminoácidos do sítio catalítico da Sir2 e o co-fator, não somente ligações de hidrogênio, mas também interações do tipo  $\pi$ -cátion e  $\pi$ -stacking são necessários para estabilizar o NAD<sup>+</sup> no sítio da proteína. As interações observadas pelas simulações de DM e as pelos campos obtidos nos cálculos de MIF, apontam para a importância de grupos doadores observados na sonda H<sub>2</sub>O, na *tcSir2* podemos observar uma grande região que podemos inferir a presença de resíduos com essas características, regiões de resíduos aceitadores de ligações de hidrogênio observados na sonda O<sub>2</sub> e para regiões hidrofóbicas observadas na sonda DRY. Portanto, para a construção do modelo farmacofórico baseado no cofator (NAD<sup>+</sup>) (Figura 17 - A e B) foram considerados: (i) três pontos de grupos aceitadores de ligação de hidrogênio (esferas vermelhas); (ii) um ponto de grupo doador de ligações de hidrogênio (esfera azul); (iii) e dois pontos hidrofóbicas/aromáticos (esferas laranja) que possam realizar interações do tipo  $\pi$ -cátion e  $\pi$ -stacking, já para a construção do modelo farmacofórico baseado no sítio de catálise (Figura 17 - C e D) foram considerados: (i) um pontos de grupo aceitador de ligação de hidrogênio (esferas vermelhas); (ii) dois pontos de grupos doadores de ligações de hidrogênio (esfera azul); (iii) e três pontos hidrofóbicas/aromáticos (esferas amarelas) que possam realizar interações do tipo  $\pi$ -cátion e  $\pi$ -stacking. Vale ressaltar, a contribuição da Profa. Dra. Ana Paula Loureiro para construção do modelo farmacofórico baseado pelo sítio de catálise, onde foi salientado a importância em relação à competição com NAD<sup>+</sup>.

**Figura 17:** Modelo farmacofórico baseado na estrutura do cofator: A – Estrutura do cofator ( $\text{NAD}^+$ ) e B – Distâncias entre dos pontos dos modelo farmacofórico. Modelo farmacofórico baseado no sítio de catalise: C – Sítio de catálise (Nicotinamida) e D - Distâncias entre dos pontos dos modelos farmacofórico.



Fonte: Elaborada pelo autor

Os resultados acima apresentados são satisfatórios e foram utilizados para a etapa de triagem virtual.

## 5. CONCLUSÃO

Com os melhores resultados obtidos por meio das análises dos *MIFs* da enzima Sir2 (hSir2 e *tc*Sir2) para as sondas  $\text{H}_2\text{O}$ , DRY e  $\text{O}_2$ , foram sugestivos para demonstrarem campos importantes nas regiões do sítio catalítico que possuem regiões favoráveis para aceitadores e doadores de ligação de hidrogênio, e regiões favoráveis para interações hidrofóbicas, os quais nos dão subsídio teórico para a construção de dois modelos farmacofóricos. Sendo essas regiões, as mesmas observadas na simulação por DM, corroborando para obtenção dos possíveis pontos de interação com o cofator e do sítio de catálise, pois com isso nos permite passar para a próxima etapa que foi a triagem virtual, onde possivelmente podemos buscar moléculas com as características semelhantes com o  $\text{NAD}^+$  e guiando a busca por moléculas que possam competir com o mesmo.

# **CAPÍTULO V**

## ***Triagem Virtual***

## 1. INTRODUÇÃO

A triagem virtual é uma ferramenta computacional poderosa capaz de orientar na identificação de novos *hits* de grandes bibliotecas químicas. Essa técnica é largamente utilizada em programas de descoberta de fármacos tanto em empresas farmacêuticas como na academia. Existem duas grandes categorias de técnicas de triagem: triagem virtual baseada no ligante (LBVS - *Ligand Based Virtual Screening*), o qual por meio de informação de vários ligantes com atividade estabelecida frente à um alvo determinado, no fornece subsídios estatísticos e teóricos que determinam regiões favoráveis na estrutura principal do ligante que correlaciona com sua a atividade, a partir disso pode-se construir modelos farmacofóricos que contemplem essas informações observadas. Já a triagem virtual baseada em estrutura (SBVS - *Structure Based Virtual Screening*), a qual é empregada nesse trabalho, utilizam-se informações da estrutura do alvo como, *MIFs*, movimentação de resíduos e entre outras, para adquirir informações para construção de modelos farmacofóricos, em suma, utilizando o conhecimento da estrutura 3D de alvos biológicos no processo de seleção de ligantes com afinidade aceitável e complementariedade com o sítio de ligação. Portanto, SBVS pode ser realizado por meio de cálculos de *docking* e predição de afinidade de ligação, assim como por estrutura baseada em farmacóforos (MADHAVI SASTRY et al., 2013).

## 2. OBJETIVOS

Neste capítulo é descrito o procedimento de triagem virtual realizado, no qual se utilizou os modelos farmacofóricos e suas devidas análises, na busca por compostos candidatos à inibidores de *tcSir2*.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta etapa do projeto, os subconjuntos *all purchasable*, *all boutique* do banco de dados ZINC e um banco de dados cedidos pela GSK (*GlaxoSmithKline*), devido a projeto anterior com financiamento em conjunto pela empresa e pela



FAPESP ((2013/15650-0 e 2011/11499-0), contendo aproximadamente 35 milhões de compostos, foram empregados para os estudos de triagem virtual (IRWIN et al., 2018, 2012; STERLING; IRWIN, 2015). Os compostos foram extraídos dos bancos de dados no formato *smiles*, e agrupados em um banco de dados. Para a seleção dos compostos promissores, inicialmente, uma filtragem foi realizada utilizando um filtro de propriedades físico-químicas que representasse o espaço *drug-like* (número de HBD entre 0 e 5, número de HBA entre 0 e 10 e logaritmo do coeficiente de partição octanol/água (logP entre -2,5 e 5,5) mantendo no máximo 1 grupo nitro e carga formal entre -2 e 2, porém mantendo massa molecular adequada para a grande cavidade do cofator NAD<sup>+</sup> (massa molecular acima de 350 Da). Assim sendo, a partir destes resultados preliminares, o programa UNITY implementado no pacote computacional SYBYL X 2.1 (TRIPOS, 2001) foi empregado para a triagem de compostos que possuem os pontos identificados pelo modelo farmacofórico. Para a análise de inspeção visual, foi utilizado a metodologia de docking molecular utilizada para inserção do NAD<sup>+</sup> no modelo de *tcSir2* (Vide Capítulo II).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

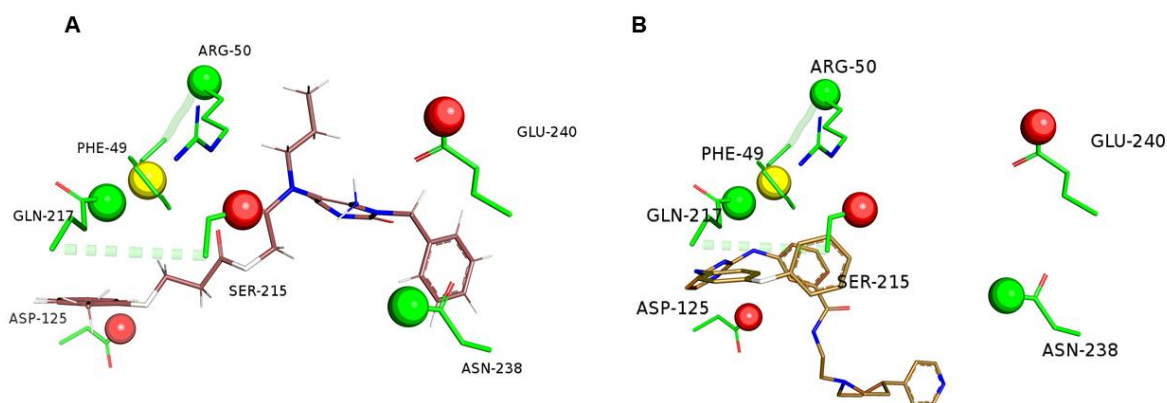
O banco de dados construído teve moléculas extraídas da plataforma ZINC<sup>15</sup> e e moléculas cedidas gentilmente pela GSK, as moléculas foram convertidas do extensão *smiles* para *sdf* a partir do programa OMEGA 2.5.1.4 (HAWKINS; NICHOLLS, 2012), no qual foi possível obter um banco de dados de 34.962.612 milhões de moléculas. Com a aplicação filtro molecular por meio do programa Filter (MARTIN\*, 2005), reduziu-se para 11 milhões de compostos (Figura 19), a qual essa 11 milhões de moléculas se enquadraram na *regra de 5 de Lipinski*, regra desenvolvida para fármacos que são administrados por via oral (LIPINSKI, 2016).

Após essa etapa, continuou-se a triagem virtual utilizando o modelo farmacofórico como filtro em uma busca flexível. Neste procedimento não existe uma ordem para encontrar os pontos definidos no modelo farmacofórico, e com isso o programa defini a quantidade de tentativas/maneiras que o ligante encontrou os pontos, e isso é refletido em uma pontuação de *score* (FAN et al., 2017; MOLNÁR; KESERÚ, 2002; RUDA et al., 2010) e a função *partial match*, que estipula uma regra para encontrar os pontos, que seria de no mínimo 4 dos 6 pontos para ambos modelos farmacofóricos previamente construídos (NAD<sup>+</sup> e Nicotinamida). Após esta etapa, simulações de acoplamento molecular foram realizadas utilizando o programa GOLD 5.5. Assim, determinamos a complementaridade entre os ligantes

selecionados e os pontos propostos pelo modelo farmacofórico. Antes da aplicação do estudo de docking, foi realizada a validação do docking, determinando parâmetros e a função de pontuação. Foi escolhida a função *GOLD-Score* (eq.  $fitness_{GOLD-Score} = -(w_{PLP} \cdot f_{PLP} + w_{lig-clash} \cdot f_{lig-clash} + w_{lig-tors} \cdot f_{lig-tors} + f_{chem-cov} + w_{prot} \cdot f_{chem-prot} + w_{cons} \cdot f_{cons})$ ) como a função principal para formação da população, devido às propriedades abordadas em sua equação e a função para formação de uma população para contra-prova, guiados pela pontuação de reescore, a função *ChemScore* ( $fitness_{CHEMSCORE} = fitness_{PLP} - (f_{chem-hb} + f_{chem-cho} + f_{chem-met})$ ), por sua capacidade de compreender graus de energias para gerar as populações, tal função não contemplada pela função *GOLD-Score* (HANN; LEACH; HARPER, 2001; MARCEL L. VERDONK et al., 2005; SMITH et al., 2007). Baseados na validação foram realizadas 30 rodadas independentes de docking, utilizando algoritmo genético, para cada ligante simulado. Esta primeira simulação de acoplamento molecular foi realizada para excluir os compostos com modo de ligação indesejado ou que não apresentassem uma complementariedade aceitável com o receptor (Figura 18 – A e B) (que não/respeitavam as interações mínimas identificadas pela construção dos modelos farmacofóricos) dentro do sítio do cofator da *tcSir2* e os compostos identificados com pontuação baixa pela função *GOLD-Score*. A filtragem por *docking*, aproximadamente 456 compostos (263  $NAD^+$  e 193 Nicotinamida) foram selecionados por ranqueamento e inspeção visual. A última etapa, também, foi realizada empregando o programa GOLD 5.5, porém 100 corridas de *docking* foram realizadas para cada ligante com o intuito de explorar melhor o espaço conformacional e avaliar a constrância das poses geradas pelo algoritmo genético.

Como definido anteriormente as funções de pontuação *GOLD-Score* e *ChemScore*, demonstraram resultados significativos no quesito de seleção. Assim, foi possível criar uma população baseada em características contempladas entre as duas funções para os cálculos dos compostos triados. Desta forma, três critérios foram considerados para a seleção dos possíveis inibidores de *tcSir2*: 1) ranqueamento pela função *GOLD-Score*; 2) ranqueamento pela função *ChemScore*; 3) ranqueamento por inspeção visual do modo de ligação dos compostos analisados de acordo com as interações dentro do sítio de ligação do  $NAD^+$  com a *tcSir2*.

**Figura 18:** Exemplo de como foi realizado a inspeção visual. A – CDMS-05, pode-se observar que contempla quase todos os pontos propostos no modelo farmacofórico baseado pelo  $\text{NAD}^+$  ; B – Molécula não selecionada para aquisição, modo de ligação indesejável onde não respeitou os pontos de interações propostos no modelo farmacofórico baseado pelo  $\text{NAD}^+$ .



Fonte: Elaborada pelo autor

**Figura 19:** Protocolo de triagem virtual realizado contendo cada etapa desde a construção do banco de dados, aplicação do filtro molecular com as características da regra de 5 de Lipinski, o modo de realização da busca pelo UNITY e o número de compostos obtido em cada etapa de filtragem.

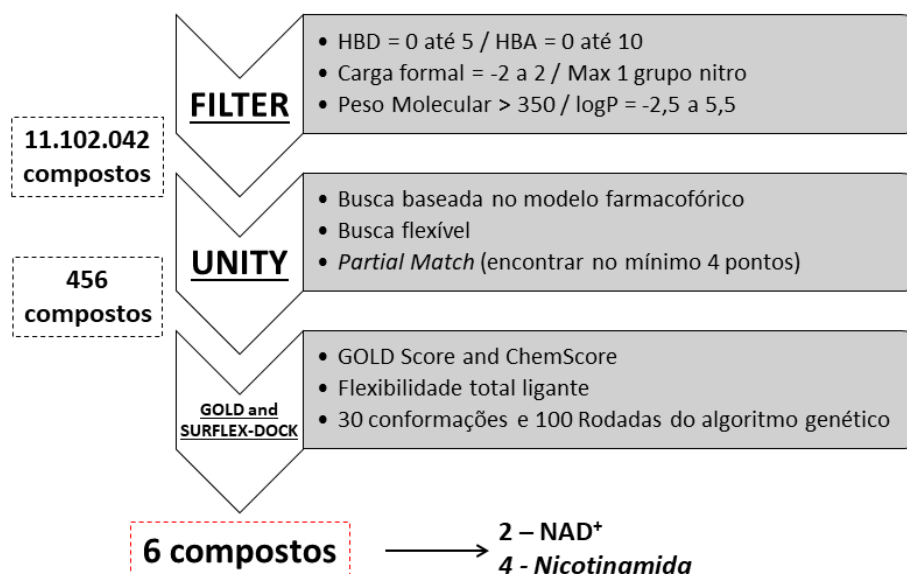
## Banco de dados – ZINC<sup>15</sup>

All Purchasable (22.724.825 compostos)

All Boutique (12.217.845 compostos)

GSK database (19.942)

**TOTAL (34.962.612 compostos)**



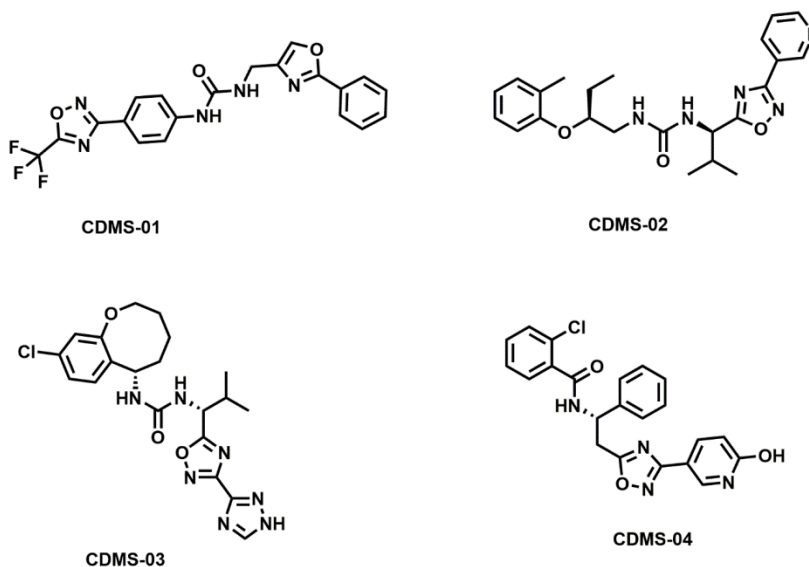
Fonte: Elaborada pelo autor

Finalmente, 6 compostos foram selecionados por um consenso entre a pontuação obtida pelas funções GOLD-Score e rescore (ChemScore), na qual

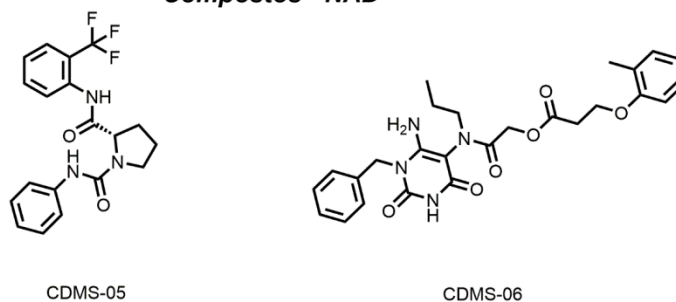
almejou-se buscar os compostos que apresentaram melhor encaixe em relação ao  $\text{NAD}^+$  e com o sítio de catálise e, também, com melhor pontuação em ambas as funções de ranqueamento utilizadas. Estes parâmetros foram utilizados em conjunto à inspeção visual dos compostos estudados junto a complementariedade aos pontos estabelecidos no modelo farmacológico utilizado na triagem. Assim, foram atribuídas pontuações para os compostos que correspondiam com o ponto e a propriedade do modelo, usando sítio de ligação do  $\text{NAD}^+$  e sítio de catálise (Nicotinamida) como referência a disposição desses compostos nos bolsos A, B e C, descritos no capítulo II. Após essa análise, apenas 6 compostos foram selecionados para aquisição, pois além de todas as pontuações obtidas são compostos que se assemelham estruturalmente com cofator e com a nicotinamida. Dessa forma, foram adquiridos os compostos, onde os mesmos foram divididos segundo o seu modelo farmacológico (Capítulo IV), no primeiro onde se baseou pelo cofator, compostos CDMS-05 e CDMS-06 ( $\text{NAD}^+$ ) e o segundo pelo sítio de catálise, compostos CDMS-01, CDMS-02, CDMS-03 e CDMS-04 (Nicotinamida) (Figura 20).

**Figura 20:** Compostos adquiridos para os ensaios cinéticos enzimáticos.

#### Compostos - Nicotinamida



#### Compostos - $\text{NAD}^+$



**Fonte:** Elaborada pelo autor

## 5 CONCLUSÃO

Portanto, pode-se destacar que a metodologia aplicada foi suficiente no quesito de selecionar compostos que possivelmente venham apresentar potência inibitória frente a *tcSir2*. No qual, pontos importantes como interação com o alvo (*tcSir2*), os se realmente trasmitiam as características proposta em cada ponto dos modelos farmacofóricos foram levados em consideração. Corroborando com as metodologias de seleção dos compostos pela literatura (RUDA et al., 2010; SACCONNAY et al., 2016). Com os compostos selecionados, os mesmos foram adquiridos para serem submetidos a avaliação de potência.

# **CAPÍTULO VI**

## ***Avaliação biológica dos compostos da triagem virtual***

## 1. INTRODUÇÃO

Neste capítulo serão discutidos os princípios de reações enzimáticas, o papel das mesmas e como ocorre sua ativação/inibição, dando foco nos ensaios bioquímicos realizados para os compostos selecionados por triagem virtual. Abordaremos ainda, a atividade catalítica seletiva e especializada, ou seja, uma enzima é capaz de acelerar uma determinada reação bioquímica em milhares de vezes, mas quase sempre, não apresenta nenhuma atividade em outro meio reacional, tendo uma função específica em um determinado organismo ou sistema biológico. São conhecidas mais de 2 mil enzimas, sendo cada uma capaz de catalisar um tipo específico de reação química/bioquímica (COPELAND, 2013).

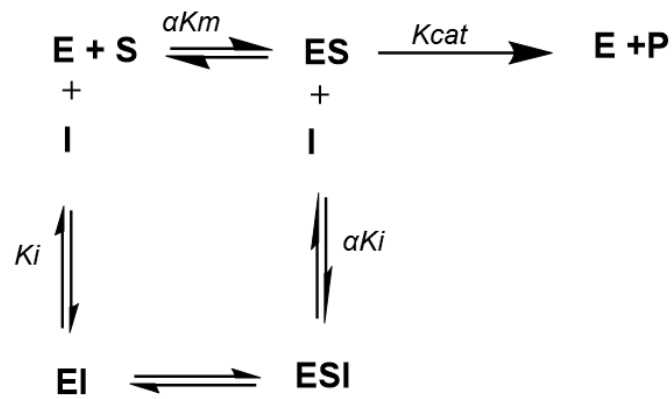
Neste contexto, a reação enzimática começa com a ligação reversível do substrato [S] à enzima livre [E] formando o complexo ES. Após a ligação ES uma série de etapas químicas previamente definidas inicia a formação do produto (E + P), deixando a E novamente livre e a liberação do produto P (COPELAND, 2013).

No processo de inibição enzimática, os inibidores interagem com a enzima por meio de ligações químicas, interferindo, assim, em sua atividade catalítica. Quanto mais estável o complexo enzima-inibidor (EI), menor atividade catalítica da enzima. Nesse contexto, a inibição enzimática pode acontecer de duas formas: inibição reversível ou inibição irreversível. Na inibição reversível, os inibidores e a enzima formam um complexo não-covalente. Apesar de serem mais instáveis, em relação à inibição irreversível, o complexo EI se forma devido as forças de interação intermoleculares, porém se desfaz após algum tempo, ou espontaneamente ou por ação de alguém interferente, por exemplo água, fazendo com que a enzima retome a sua atividade. Os inibidores reversíveis podem ser subdivididos em duas classes: inibidores competitivos, os quais atuam diretamente no sítio catalítico da enzima, competindo com o substrato específico; inibidores não-competitivos, atuam se ligando tanto à enzima quanto ao complexo ES, mas num sítio de ligação diferente do

catalítico. Nesse caso, a ligação do substrato pode ou não ocorrer, porém gera uma alteração na estrutura da enzima que impede a formação do produto da reação. Já na inibição irreversível, a enzima é inativada. Nesse tipo de inibição, o inibidor se liga à enzima por ligações covalentes (mais estáveis), em muitos casos tornando a enzima permanentemente inativa, popularmente se fala que a “enzima morre” (COPELAND, 2013).

Na equação abaixo (eq. 7), demonstra a o mecanismo de uma inibição competitiva, ou seja, o inibidor se liga à enzima livre, em competição direta com o substrato. Esses inibidores influenciam diretamente no valor  $K_m$  aparente (que se relaciona com a formação do complexo enzima-substrato) e  $V_{max}$  não se altera (que se relaciona com os passos químicos subsequentes à formação do complexo ES) (COPELAND, 2013). No equilíbrio entre o complexo EI, a afinidade entre enzima e o inibidor são definidas pela constante de afinidade  $K_i$ . No caso de um inibidor não-competitivo o inibidor se liga formando o complexo ESI, neste caso temos a relação  $K_m/V_{max}$ , os valores de  $K_m$  não se alteram, porém os valores de  $V_{max}$  são diferentes. A constante  $\alpha$  é quem define o grau de inibição, por ela pode-se avaliar a afinidade da enzima pelo substrato. Desta maneira, podemos demonstrar da seguinte forma: se não houver alteração na afinidade do substrato, devido à formação do complexo EI (inibição competitiva), então  $\alpha = 1$ ; se a formação do complexo EI excluir a ligação adicional com substrato (inibição competitiva irreversível), então  $\alpha = \infty$ ; se a formação do complexo EI aumenta a afinidade da enzima para substrato (inibição não competitiva),  $\alpha < 1$ .





(eq 7)

## 2. OBJETIVOS

Realizar avaliação da capacidade de inibição e, se possível, potência frente à *tcSir2*, dos compostos adquiridos por triagem virtual.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

A expressão da *tcSir2* foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Sandro Roberto Marana e pelo doutorando Vitor Medeiros de Almeida.

Após a obtenção da *tcSir2*, foram realizados ensaios enzimáticos para avaliar os compostos obtidos por triagem virtual. Esses ensaios cinéticos foram realizados por fluorimetria em equipamento *TECAN-infinity pro 2000* ("Focus In", 2017; GUIDO et al., 2008). As condições para o ensaio foram: a 37 C° em pH 8 no tampão 50 µl of 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>. A determinação da potência foi realizado em condições balanceadas (0,1 µM *tcSir2*, 10 µM *Abz-Gly-Pro-acetyl-Lys-Ser-Gln-EDDnp*, 25 µM NAD<sup>+</sup>, 12 mM nicotinamida e 0,6 µM de Tripisina ) a pH 8 (2 mM de tampão 50 µl of 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>). Foram utilizadas pelo menos sete concentrações de cada composto sobre a atividade catalítica *tcSir2* em triplicata, em comprimento de onda de 320 nm de excitação e 420 nm emissão. O substrato utilizado, foi construído e adquirido pela empresa AminoTech (<http://www.aminotech.net.br>). Foram determinados os valores de Km, seguindo a equação proposta por Michaelis–Menten (eq. 8).

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{(K_m + [S])} \quad (\text{eq 8})$$

Todos os compostos foram solubilizados em DMSO (concentração final de 5%). A porcentagem de inibição foi calculada com a (eq. 9) (TELES et al., 2018) e a constante de inibição com a (eq.10) (COPELAND, 2013):

$$\% \text{ inibição} = (100 - V_i/V_c) \times 100 \quad (\text{eq 9})$$

$$\frac{1}{i} = K_i \cdot \left( 1 + \frac{[S]}{K_m} \right) \cdot \frac{1}{[I]} + \frac{[I]}{[I]}$$

$\downarrow \qquad \qquad \qquad \downarrow \qquad \qquad \qquad \downarrow \qquad \qquad \qquad \downarrow$

$$y = \text{Inclinação} \cdot x + \text{Intercepto} \quad (\text{eq 10})$$

Sendo  $V_i$  representando a velocidade inicial na presença do inibidor putativo de *tcSir2* e  $V_c$  é a velocidade inicial do controle (5% DMSO v/v). Os valores de  $IC_{50}$  foram calculados usando uma regressão não linear com mínimos quadrados, disponível no GraphPad Prism versão 7.0 para Windows (GraphPad® Software, San Diego, CA, EUA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

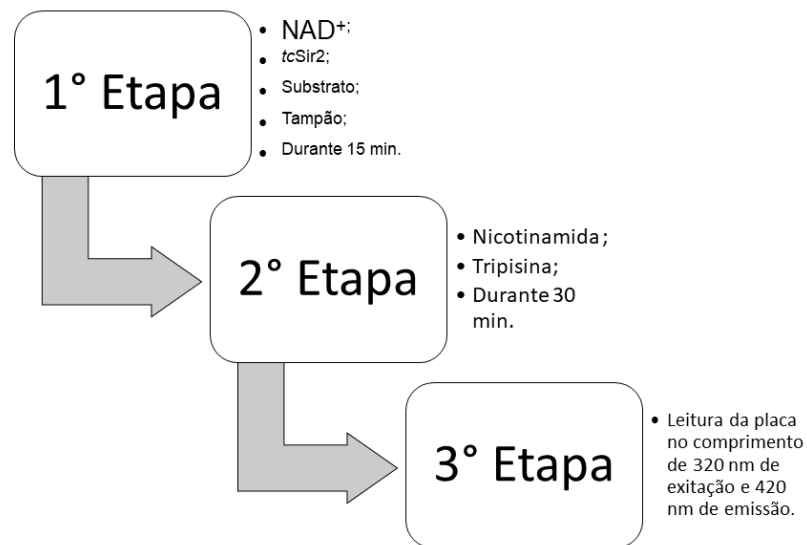
#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A construção do substrato peptídico, *Abz-Gly-Pro-acetyl-Lys-Ser-Gln-EDDnp*, utilizado no ensaio seguiu os seguintes passos: inserção do grupo fluoróforo Abz (2-Aminobenzoil) e o grupo puxador de fluorescência EDDnp (2, 4-dinitrofenil etulenediamina) (BARROS et al., 2007); um resíduo de lisina acetilada, o qual é responsável pela ação da *tcSir2*. A *tcSir2*, é uma lisina desacetilase, assim, a lisina acetilada ligada é fundamental para avaliar a ação da enzima e dos inibidores

Desta maneira, o ensaio enzimático foi dividido em 3° etapas (Figura 21): 1° etapa - (*tcSir2* +  $NAD^+$  + Tampão + Substrato peptídico) a enzima *tcSir2* realiza seu mecanismo de desacetilação da lisina; 2° etapa - (*tcSir2* +  $NAD^+$  + Tampão +

Substrato peptídico (desacetilado) + Nicotinamida + Tripsina) com intuito de parar a reação, é adicionado no meio reacional nicotinamida 12mM (Capítulo I – Figura 3). O mecanismo é iniciado por um ataque nucleofílico da amida da Lys-acetilada à ribose do cofator, assim, a adição de nicotinamida em excesso interrompe a reação. Ainda nesta etapa, adiciona-se tripsina 0,6  $\mu$ M, a qual tem a função de clivar o substrato peptídico entre Lys e Pro; 3ª etapa - o substrato peptídico que sofreram reação de desacetilação da Lys, pela *tcSir2*, são quantificados por fluorescência (MORETTI et al., 2015).

**Figura 21:** Metodologia de ensaio cinético enzimático para *tcSir2* com as etapas dividida por reação.



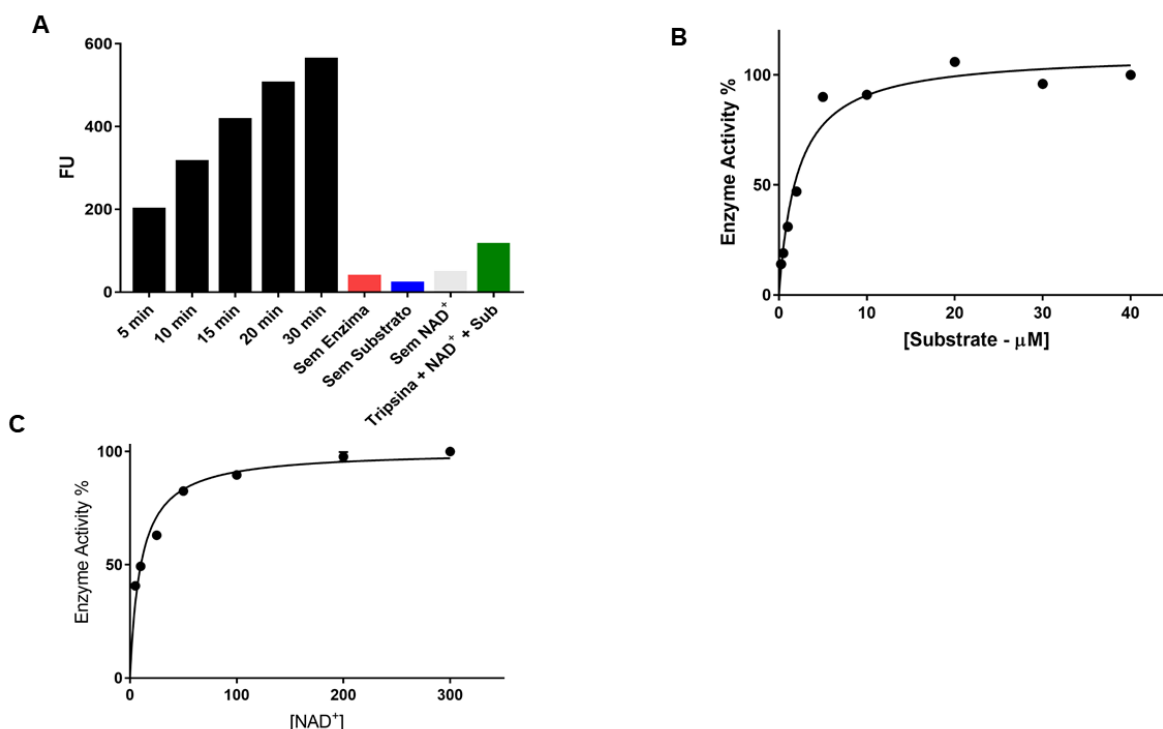
**Fonte:** Elaborada pelo autor

Realizou-se ensaio para determinação das condições de tempo do ensaio, evitando problemas de saturação do meio. Esse estudo foi realizado em cinco tempos diferentes sendo eles, 5, 10, 15, 20 e 30 minutos (Figura 22 – A). Diante dos resultados obtidos, atribuiu-se o tempo de 15 min como melhor para realização dos ensaios. Observou-se que os controles utilizados (Sem enzima, sem substrato, sem NAD<sup>+</sup> e tripsina/NAD/Substrato) não têm influência na reação (Figura 22 – A). Assim, podemos garantir que o método utilizado é robusto, visto que nenhum dos controles apresenta emissão na mesma faixa do peptídeo desacetilado.

Para determinação da constante de Michaelis-Menten foram utilizadas nove concentrações diferentes (variando do mais concentrado para o menos concentrado) do substrato peptídico e do NAD<sup>+</sup> (Figura 22- B e C) durante 15 min. Os valores de  $K_m$  da *tcSir2* para o substrato peptídico ( $2,113 \mu\text{M} / r^2 = 0,97$ ) e para o NAD<sup>+</sup> ( $25 \mu\text{M} /$

$r^2 = 0,99$ ) foram obtidos por meio de cálculo no programa GraphPad Prism versão 7 (EISENTHAL; DANSON, 2002).

**Figura 22:** Atividade enzimática da *tcSir2*. A – Atividade enzimática com variação do tempo; B – curva de Michaelis–Menten do substrato e C – curva de Michaelis–Menten do cofator ( $\text{NAD}^+$ ).



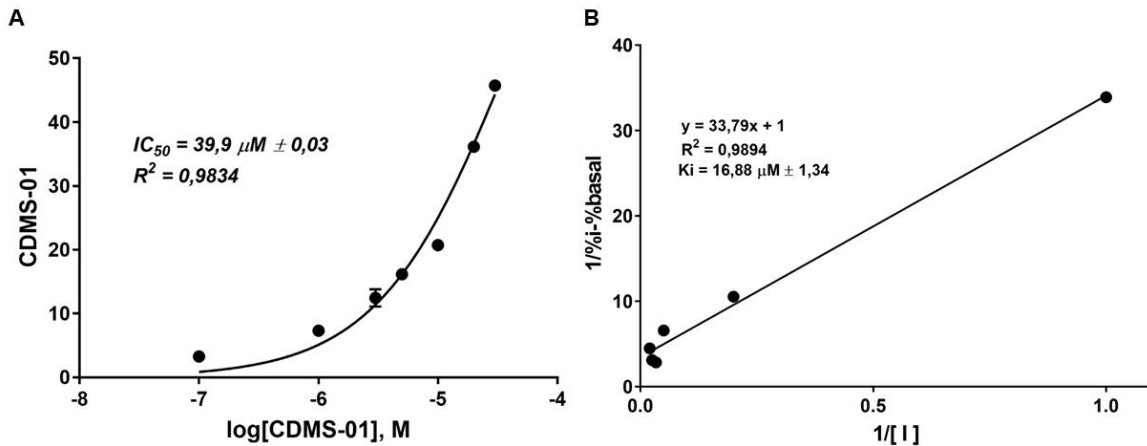
**Fonte:** Elaborada pelo autor

Com a determinação da atividade, tempo de ensaio e as constantes de Michaelis–Menten, para o substrato e cofator ( $\text{NAD}^+$ ), os ensaios cinéticos foram realizados com os compostos adquiridos da triagem (CDMS-01; CDMS-02; CDMS-03; CDMS-04; CDMS-05 e CDMS-06). A potência dos compostos foi determinada em relação a porcentagem de inibição em pelo menos sete concentrações. A partir destes valores foi possível contruir uma sigmóide e determinar os valores de  $\text{IC}_{50}$ . Dos seis compostos testados, apenas quatro apresentaram atividade frente a *tcSir2*, sendo eles: CDMS-01 ( $\text{IC}_{50} = 39,9 \mu\text{M}$ ), CDMS-02 ( $\text{IC}_{50} = 240 \mu\text{M}$ ), CDMS-03 ( $\text{IC}_{50} = 482 \mu\text{M}$ ) e CDMS-06 ( $\text{IC}_{50} = 332,5 \mu\text{M}$ ).

O composto CDMS-01 (Figura 23 – A e B) se apresentou como o mais promissor, visto sua potência,  $\text{IC}_{50}$  (eq. 8), e constante de inibição  $K_i$  (eq. 9), sendo considerado um *hit* para o desenvolvimento de novos inibidores de *tcSir2*, candidatos a fármaco. Considerou-se, ainda, que o mesmo possui características físico-química e eletrônicas complementares ao sítio catalítico da *tcSir2*, apresentando  $K_i = 16,88$

$\mu\text{M}$ , o qual tem valor menor que o  $K_i$  do cofator ( $K_m = 25 \mu\text{M}$ ), o que demonstra maior afinidade com a enzima

**Figura 23:** Avaliação de potência do composto CDMS-01. A – Avaliação da concentração inibitória mínima para atingir 50% de inibição e B – Avaliação da afinidade dos compostos em relação a *tcSir2*.

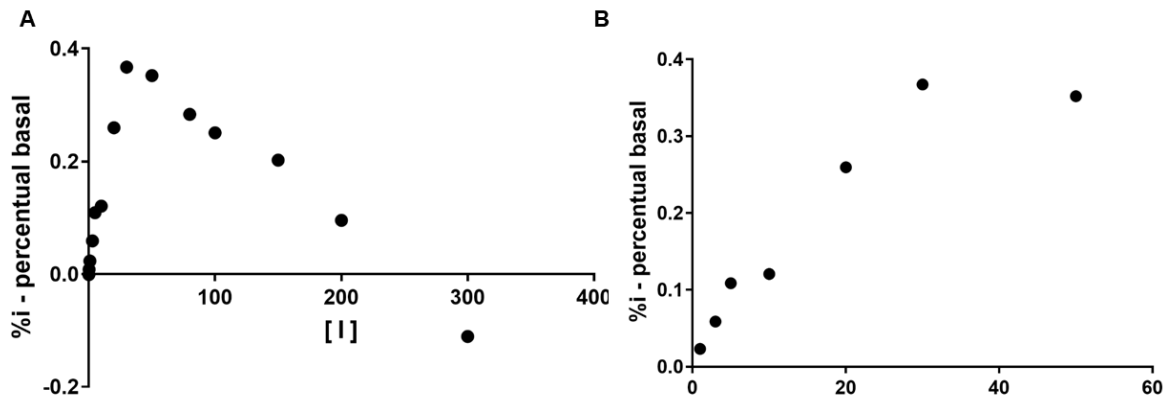


**Fonte:** Elaborada pelo autor

Em se tratando de um composto oriundo de uma triagem virtual, a qual tem taxa de sucesso entre 1-3%, consideramos os resultados obtidos de grande valia, visto que esse composto (CDMS-01), apesar de baixa potencia, tem capacidade de inibir a enzima alvo. Podemos concluir, assim, que essa metodologia utilizada se mostrou adequada (MADHAVI SASTRY et al., 2013).

O composto CDMS-01, apesar de sua atividade, apresentou problemas de solubilidade (Figura 24 – A e B). Nesta figura pode-se observar a diminuição da porcentagem de inibição em relação a concentração, o que dá indícios de precipitação do composto. Esse resultado inviabilizou a determinação do mecanismo de inibição para o CDMS-01. Dessa forma, a fim de contornar esse problema, foi construído o mecanismo enzimático do CDMS-01 (Figura 25) utilizando uma metodologia teórica, na qual simulou-se todas as concentrações e condições usadas no ensaio, seguindo a equação 9 (eq. 9), proposta por Copeland et al em 2005 (COPELAND, 2013).

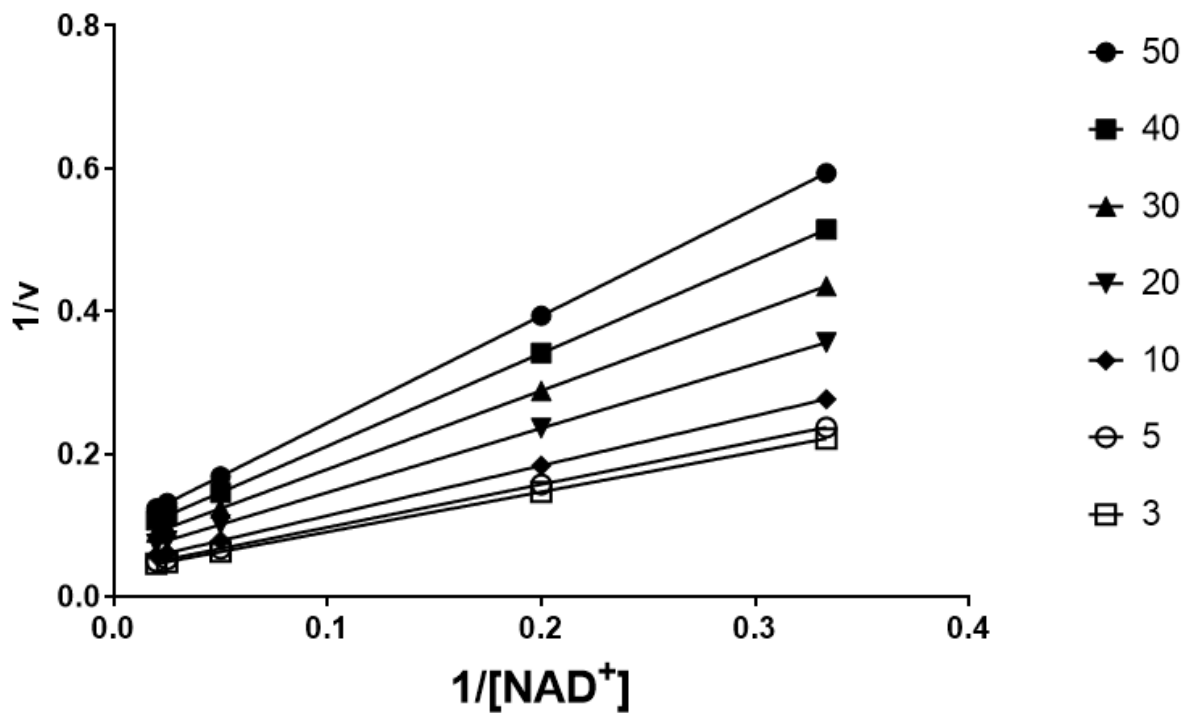
**Figura 24:** Porcentagem de inibição do composto CDMS-01 em várias concentrações. Caracterizando o fenômeno de precipitação em altas concentrações desse inibidor. A – concentrações de CDMS-01 variando de 300  $\mu\text{M}$  até 0,1  $\mu\text{M}$  e B – concentrações de CDMS-01 de 50  $\mu\text{M}$  até 3  $\mu\text{M}$ .



Fonte: Elaborada pelo autor

$$v^1 = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{[S] + K_m \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right)} \quad (\text{eq. 9})$$

**Figura 25:** Predição do mecanismo competitivo do CDMS-01 em relação ao cofator ( $\text{NAD}^+$ ), usando as condições testada e concentrações de 50  $\mu\text{M}$  até 3  $\mu\text{M}$  de  $\text{NAD}^+$  e CDMS-01 frente a *tcSir2*.



Fonte: Elaborada pelo autor

## 5 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos nos estudos de cinética enzimática, podemos concluir que o desenvolvimento e padronização do ensaio biológica foram obtidos com sucesso, visto os parâmetros cinéticos determinados ( $K_m$  pepetideo  $2,113 \mu\text{M}$  /  $r^2 = 0,97$  e para o  $\text{NAD}^+$   $25 \mu\text{M}$  /  $r^2 = 0,99$ ).

Foi avaliada a atividade dos seis compostos selecionados por triagem virtual frente a *tcSir2*. Destes, quatro apresentaram atividade sendo possível calcular os valores, sendo eles: CDMS-01 ( $\text{IC}_{50} = 39,9 \mu\text{M}$ ), CDMS-02 ( $\text{IC}_{50} = 240 \mu\text{M}$ ), CDMS-03 ( $\text{IC}_{50} = 482 \mu\text{M}$ ) e CDMS-06 ( $\text{IC}_{50} = 332,5 \mu\text{M}$ ). Portanto, com a avaliação de potência alcançada para os compostos foi possível obter um composto promissor, o CDMS-01 com valores de  $\text{IC}_{50} = 39,9 \mu\text{M}$  e  $K_i = 16,88 \mu\text{M}$ .

O CDMS-01, apesar de promissor, apresentou problemas de solubilidade, inviabilizando a determinação do mecanismo de inibição enzimática. Deste modo, utilizou-se de ferramenta teórica para determinação de tal mecanismo, o que indicou mecanismo de ação competitivo.

Considerado um *hit* o CDMS-01, será utilizado em estudos de otimização, os quais devem favorecer sua ação frente a *tcSir2*.

Um ponto de destaque neste trabalho como um todo, foi a importância do alvo escolhido, visto que os estudos realizados nos levou a caracterização da *tcSir2* como *druggability*, ou seja, um possível alvo para a busca de novos agentes antichagássicos.

# **CAPÍTULO VII**

## ***Conclusões finais***



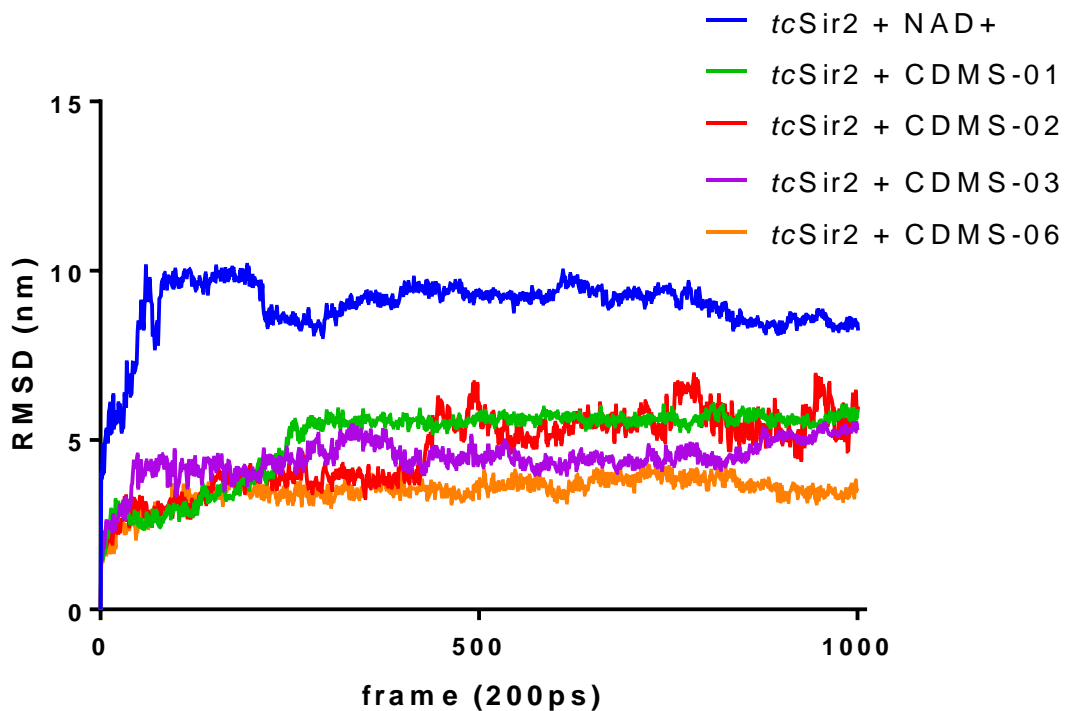
## 1. INTRODUÇÃO

Como dito e informado nos capítulos anteriores, o taxas de acertos em triagem virtual são muito pequenas, porém, podemos apresentar resultados significativos. A busca de novos composto que possa apresentar propriedades físico-químicas essenciais para promover uma inibição em um determinado alvo, é uma corrida entre montes, onde não importa o tempo que demore para completar essa corrida e sim o que mais importa é a maneira com que essa corrida será completada, a qual deve apresentar cadência, robustez e eficiência para não apresentar um *status quo* diferente do almejado no planejamento inicial dessa corrida.

## 2. RESULTADOS FINAIS

Por fim, com os resultados de potência e afinidade testadas e calculadas, foi realizado um estudo de simulação por DM (vídeos com a movimentação dos compostos frente a *tcSir2* - <http://twixar.me/PWZ3>) dos compostos testados e com a a potência estabelecida. Os composto foram submetidos a simulação de DM com os parâmetros e o tempo discutidos e apresentados no capítulo III. Dessa forma, foi capaz de observar que os composto se ligam a *tcSir2* ao longo do tempo, o que é indicado no gráfico de RMSD, onde tem-se os complexos *tcSir2* + NAD<sup>+</sup> (linha azul), *tcSir2* + CDMS-01 (linha verde claro), *tcSir2* + CDMS-02 (linha vermelha), *tcSir2* + CDMS-03 (linha roxa) e *tcSir2* + CDMS-06 (linha laranja) (Figura 26).

**Figura 26:** Simulação de DM dos compostos que apresenram atividade frente a *tcSir2*.



**Fonte:** Elaborada pelo autor

Buscando ainda uma melhor compreensão para a baixa solubilidade de alguns compostos, foi realizada uma predição de ADME (Administração, Distribuição, Metabolização e Excreção) no site (<http://www.swissadme.ch/>) (GASTEIGER; JUNG; BAIROCH, 2001) dos compostos adquiridos que são encontradas na tabela 5. Nesta análise, foi possível observar que todos os compostos violam a regra de *LEAD likeness* (GASTEIGER; JUNG; BAIROCH, 2001; LIPINSKI, 2004) por conta da massa molecular que deve ser entre 250 a 350 g/mol, e os compostos são acima de 350 g/mol. No entanto alguns, os compostos que apresentaram inibição apresentaram mais uma violação que é em relação ao número de ligações rotacionáveis que deve ser no máximo até sete, os compostos apresentam de 8 – 13 ligações rotacionáveis em sua estrutura. O composto CDMS-01 apresenta 8 ligações rotacionáveis, solubilidade em H<sub>2</sub>O moderada e possível baixa absorção no TGI (Trato

gastrointestinal), corroborando com o que foi apresentado nos ensaios em relação a solubilidade (Capítulo VII).

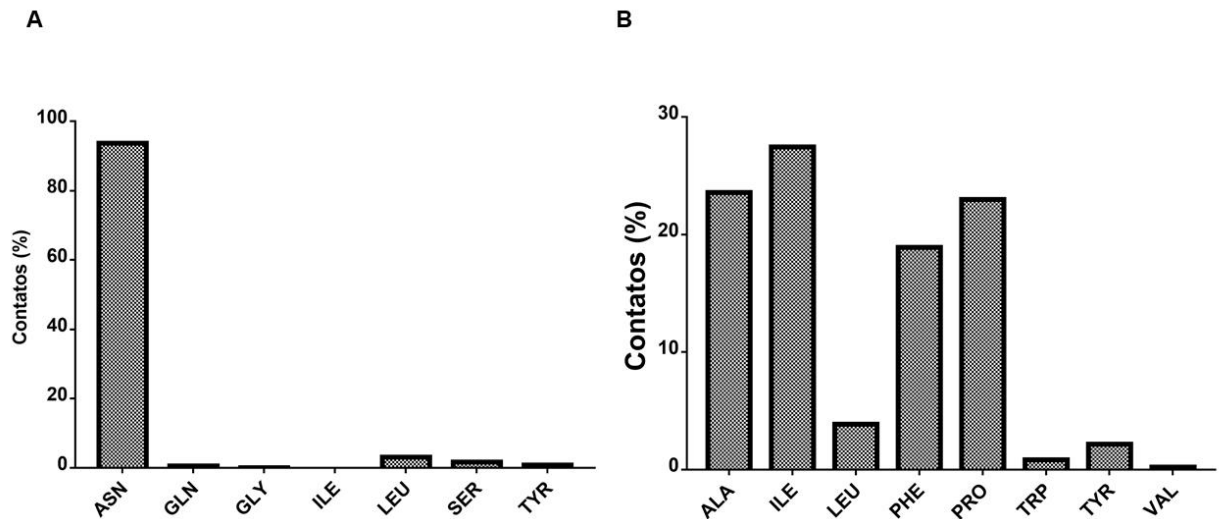
**Tabela 5:** Predições de ADME realizada com os compostos com a potência avaliada.

<b>Composto</b>	<b>LogP</b>	<b>LogS (H<sub>2</sub>O)</b>	<b>Absorção – LEAD</b> <b>TGI</b>	<b>likeness</b>	<b>Massa</b> <b>(g/mol)</b>	<b>N° de</b> <b>ligações</b> <b>rotacionáveis</b>
CDMS-01	3,3	Moderada	Baixa	2	429,35	8
CDMS-02	4,07	Moderada	Alta	3	423,1	11
CDMS-03	2,35	Alta	Alta	1	431,88	7
CDMS-06	2,58	Moderada	Alta	2	494,54	13

**Fonte:** Elaborada pelo autor

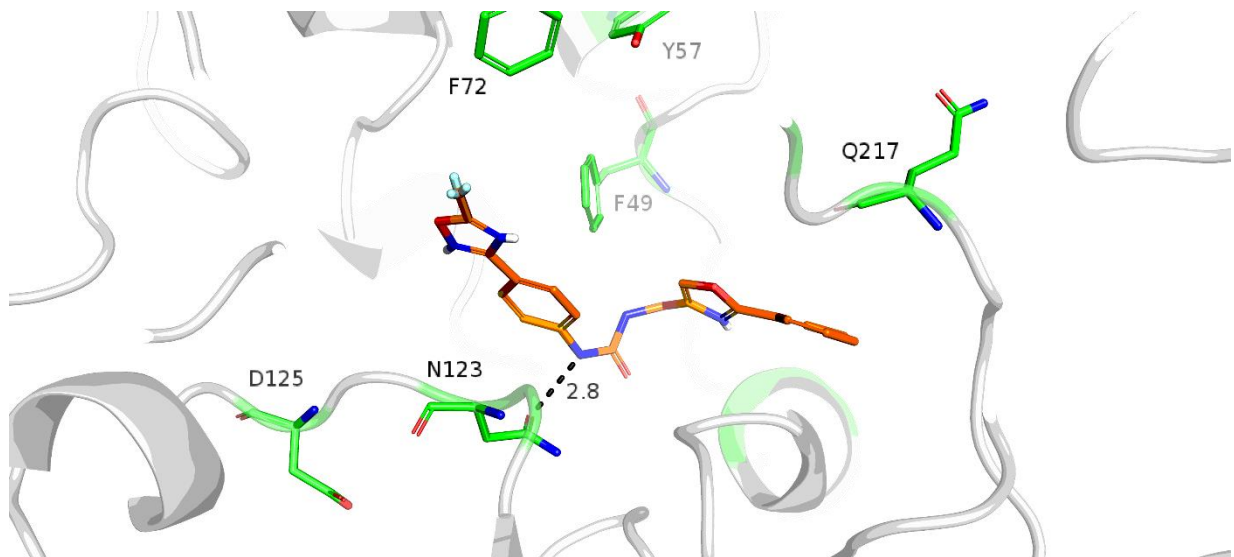
À vista disso, podemos destacar CDMS-01 com um composto promissor e que obteve sucesso em toda metodologia abordada neste trabalho. Desse modo, com as análises de DM foi realizada análise da porcentagem de contatos de ligação de hidrogênio e interações hidrofóbicas que o NAD<sup>+</sup> e o CDMS-01 apresentavam em relação a alvo estudado (Figura 27 – A e B). Observou-se então uma porcentagem de contatos muito grande com o resíduo de Asn e que em relação ao NAD<sup>+</sup> (Capítulo III) não ocorreu com essa porcentagem, cerca de 83% durante o tempo de simulação de 200 ns, sendo um dos principais resíduos que podem estar promovendo essa alta porcentagem de contato é o resíduo de Asn 123 (Figura 28), o que corrobora com o modelo farmacofórico (Capítulo IV), onde foi fixado como um ponto doador de ligação de hidrogênio, o composto CDMS-01 apresentou uma com uma distância de 2,8 Å, que seria um composto capaz de doar um próton para o O da carbonila da Asn 123, apresentado na Figura 29, sugerindo uma ligação de hidrogênio (VAN OSS; GOOD; CHAUDHURY, 1986; WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995).

**Figura 27:** Porcentagem de contatos do composto CDMS-01 ao longo do tempo de simulação de DM. A – Contatos de ligação de hidrogênio e B – Contatos de interação hidrofóbica.



**Fonte:** Elaborada pelo autor

**Figura 28:** Pose representativa da simulação por DM, no momento que o composto CDMS-01 está fazendo ligação de hidrogênio com o resíduo de Asn-123.

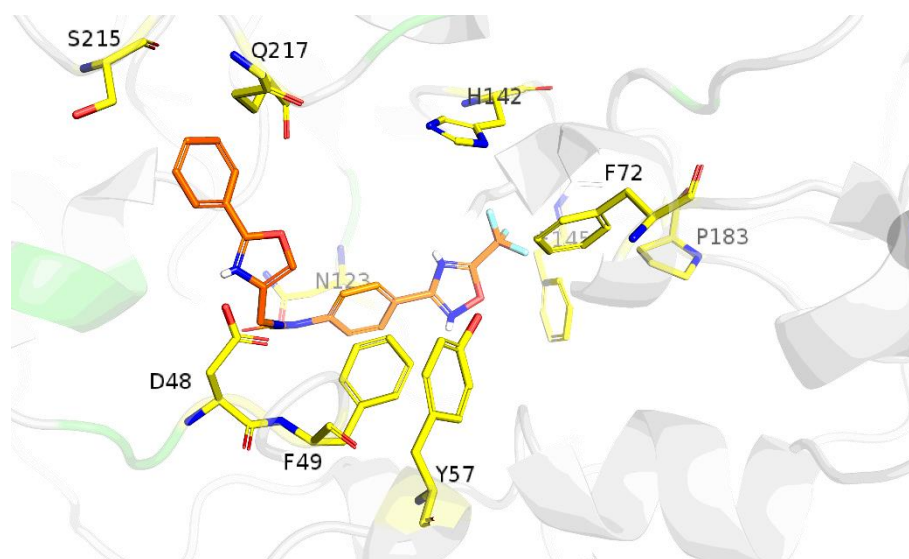


**Fonte:** Elaborada pelo autor

Por conseguinte, podemos inferir que modificações moleculares como: simplificação molecular para correção do número de ligações rotacionáveis e massa molecular seja contornada ou a inserção de grupo triazólicos a fim de promover um aumento da solubilidade. A simplificação molecular (BARREIRO et al., 1997; BARREIRO; KÜMMERLE; FRAGA, 2011; CHUNG et al., 2005), deverá ser realizada sem alterar a propriedade físico-química que promove essa inibição. Já a inserção de um grupo volumoso (BARREIRO, 2002; LIMA; BARREIRO, 2005) como uma anel triazólico, melhorará a propriedade físico-química de solubilidade, pois além

contornar os problemas apresentados no ensaio (Capítulo VI) podemos melhorar as absorção (Tabela 5) no TGI. Isto posto, é sugestivo que o composto CDMS-01 pode está competindo com o  $\text{NAD}^+$  interagindo diretamente no bolso C (Capitulo II), bolso este onde ocorre a catálise demonstrada na (Figura 3), que mostra que a nicotinamida participa diretamente da reação catalítica, onde a mesma é perdida no meio reacional para ocorrer o mecanismo da *tcSir2*, tal fato é corroborado que na 2° etapa de reação enzimática (Figura 22) é utilizado Nicotinamida concentrada (12 mM), corroborando também pelos tipos de interações que o composto pode está realizando na sua maior parte interações do tipo hidrofóbicas, e além disso, com a ligação do composto com a Asn-123, tendo esse resíduo presente no modelo farmacofórico baseado no sítio de catélise (Capítulo IV). Portanto, no quesito planejamento este trabalho conseguiu reunir várias técnicas a fim de buscar compostos ativos contra *tcSir2*, podendo iniciar processos de otimização estrutural com intuito de alcançar um composto que se torne um antichagássico e mude todo esse panorama negligenciado. Portanto, pode-se propor a exploração bolso onde composta a parte 1,2,4-oxadiazol-3-fenil do composto CDMS-01, como demonstrado na figura a seguir (Figura 29), dessa forma podendo realizar uma modificação molecular substituindo essa porção por uma anel triazólico ou tetrazólico para melhoria da solubilidade e uma inserção de uma OH no fenil para buscar interações com os resíduos Ser-215 e Glu-217 (LIMA; BARREIRO, 2005), esse resíduos corroboram com os resíduos propostos no modelo farmacofórico baseado pelo cofator ( $\text{NAD}^+$ ) e nos resultados de freqüência de contatos que a *tcSir2* faz com o  $\text{NAD}^+$ , então, podendo promover melhorias na atividade desse composto.

**Figura 30:** Pose representativa da simulação por DM do composto CDMS-01, evidenciando a sugestão de modificação molecular para alcançar os resíduos Ser-215 e Glu-217.



**Fonte:** Elaborada pelo autor

# **CAPÍTULO VIII**

## ***Referências***

## 1. REFERÊNCIAS

- ADRIANO, M.-A. et al. Proof of interaction between Leishmania SIR2RP1 deacetylase and chaperone HSP83. **Parasitology Research**, v. 100, n. 4, p. 811–818, 10 mar. 2007a.
- ADRIANO, M. A. et al. Proof of interaction between Leishmania SIR2RP1 deacetylase and chaperone HSP83. **Parasitol Res**, v. 100, n. 4, p. 811–818, 2007b.
- ALAM, R. et al. Druggability of the guanosine/adenosine/cytidine nucleoside hydrolase from *Trichomonas vaginalis*. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 92, n. 4, p. 1736–1742, 1 out. 2018.
- ALLEN, M. P.; FRENKEL, D. Calculation of liquid-crystal Frank constants by computer simulation. **Phys Rev A Gen Phys**, v. 37, n. 5, p. 1813–1816, 1988.
- ALLEN, M. P.; WILSON, M. R. Computer simulation of liquid crystals. **J Comput Aided Mol Des**, v. 3, n. 4, p. 335–353, 1989.
- ALSFORD, S. et al. A sirtuin in the African trypanosome is involved in both DNA repair and telomeric gene silencing but is not required for antigenic variation. **Molecular microbiology**, v. 63, n. 3, p. 724–36, fev. 2007.
- ALSFORD, S. et al. High-throughput phenotyping using parallel sequencing of RNA interference targets in the African trypanosome. **Genome Res**, v. 21, n. 6, p. 915–924, 2011.
- ALSFORD, S. et al. High-throughput decoding of antitrypanosomal drug efficacy and resistance. **Nature**, v. 482, n. 7384, p. 232–236, 2012a.
- ALSFORD, S. et al. High-throughput decoding of antitrypanosomal drug efficacy and resistance. **Nature**, v. 482, n. 7384, p. 232–6, 9 fev. 2012b.
- ANDERSON, A. C. The Process of Structure-Based Drug Design. **Chemistry & Biology**, v. 10, n. 9, p. 787–797, 1 set. 2003.
- ANDRICOPULO, A. D.; SALUM, L. B.; ABRAHAM, D. J. Structure-based drug design strategies in medicinal chemistry. **Curr Top Med Chem**, v. 9, n. 9, p. 771–790, 2009.
- Arquivos Benznidazol | Lafepe**. Disponível em: <<http://www.lafepe.pe.gov.br/category/benznidazol>>. Acesso em: 2 nov. 2018.
- AVALOS, J. L.; BEVER, K. M.; WOLBERGER, C. Mechanism of sirtuin inhibition by nicotinamide: altering the NAD(+) cosubstrate specificity of a Sir2 enzyme. **Mol Cell**, v. 17, n. 6, p. 855–868, 2005.
- AVALOS, J. L.; BOEKE, J. D.; WOLBERGER, C. Structural basis for the mechanism and regulation of Sir2 enzymes. **Mol Cell**, v. 13, n. 5, p. 639–648, 2004.
- BAIG, M. H. et al. Computer Aided Drug Design and its Application to the Development of Potential Drugs for Neurodegenerative Disorders. **Current Neuropharmacology**, v. 16, n. 6, p. 740–748, 8 jun. 2018.
- BAKER, M. Cryo-electron microscopy shapes up. **Nature**, v. 561, n. 7724, p. 565–567, 25 set. 2018.
- BALLANTE, F.; RAGNO, R. 3-D QSAutogrid/R: An Alternative Procedure To Build 3-D QSAR Models. Methodologies and Applications. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, n. 6, p. 1674–1685, 25 jun. 2012.
- BARREIRO, E. J. et al. Modelagem Molecular: Uma Ferramenta para o Planejamento Racional de Fármacos em Química Medicinal. **Química Nova**, v. 20, n. 3, p. 300–310, jun. 1997.
- BARREIRO, E. J. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo. **Química Nova**, v. 25, n. 6b, p. 1172–1180, dez. 2002.
- BARREIRO, E. J.; KÜMMERLE, A. E.; FRAGA, C. A. M. The Methylation Effect in Medicinal Chemistry. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 9, p. 5215–5246, 14 set. 2011.
- BARROS, N. M. T. et al. Nephilysin carboxydipeptidase specificity studies and

- improvement in its detection with fluorescence energy transfer peptides. **Biological Chemistry**, v. 388, n. 4, p. 447–55, 1 jan. 2007.
- BEDALOV, A. et al. Identification of a small molecule inhibitor of Sir2p. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 26, p. 15113–15118, 2001.
- BIEGERT, A.; SÖDING, J. Sequence context-specific profiles for homology searching. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 10, p. 3770–3775, 2009.
- BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes Dev**, v. 16, n. 1, p. 6–21, 2002.
- BIRD, A. Ii2 transcription unleashed by active DNA demethylation. **Nat Immunol**, v. 4, n. 3, p. 208–209, 2003.
- BIRD, A. W. et al. Acetylation of histone H4 by Esa1 is required for DNA double-strand break repair. **Nature**, v. 419, n. 6905, p. 411–415, 2002.
- BORHANI, D. W.; SHAW, D. E. The future of molecular dynamics simulations in drug discovery. **J Comput Aided Mol Des**, v. 26, n. 1, p. 15–26, 2012.
- BRUCCOLERI, R. E.; KARPLUS, M. Conformational sampling using high-temperature molecular dynamics. **Biopolymers**, v. 29, n. 14, p. 1847–1862, 1990.
- CARLOS PINTO DIAS, J. et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 21, p. 1–10, jun. 2016.
- CASCORBI, I.; SCHWAB, M. Epigenetics in Drug Response. **Clin Pharmacol Ther**, v. 99, n. 5, p. 468–470, 2016.
- CHANG, C. F. et al. Discovery of novel inhibitors of Aurora kinases with indazole scaffold: In silico fragment-based and knowledge-based drug design. **Eur J Med Chem**, v. 124, p. 186–199, 2016.
- CHATELAIN, E.; IOSET, J.-R. Drug discovery and development for neglected diseases: the DNDi model. **Drug design, development and therapy**, v. 5, p. 175–81, 16 mar. 2011a.
- CHATELAIN, E.; IOSET, J. R. Drug discovery and development for neglected diseases: the DNDi model. **Drug Des Devel Ther**, v. 5, p. 175–181, 2011b.
- CHEN, G. et al. A natural chalcone induces apoptosis in lung cancer cells: 3D-QSAR, docking and an in vivo/vitro assay. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 10729, 6 dez. 2017.
- CHEN, L. et al. A model of cancer stem cells derived from mouse induced pluripotent stem cells. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e33544, 2012.
- CHUNG, M.-C. et al. Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 155–180, jun. 2005.
- COMMISSIONER, O. OF THE. Press Announcements - FDA approves new drug to treat influenza. [s.d.].
- COPELAND, R. A. **Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2013.
- COSGROVE, M. S. et al. The structural basis of sirtuin substrate affinity. **Biochemistry**, v. 45, n. 24, p. 7511–7521, 2006.
- CRUCIANI, G. **Molecular interaction fields : applications in drug discovery and ADME prediction**. [s.l.] Wiley-VCH, 2006.
- DE MOLFETTA, F. A. et al. Docking and molecular dynamics simulation of quinone compounds with trypanocidal activity. **J Mol Model**, v. 15, n. 10, p. 1175–1184, 2009.
- DELANO, W. L. **PyMOL Reference Guide written by**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://pymol.sourceforge.net/newman/refman.pdf>>. Acesso em: 14 ago. 2018.
- DNDI. **Drugs for Neglected Diseases initiative**, 2015.
- DROR, R. O. et al. Exploring atomic resolution physiology on a femtosecond to millisecond timescale using molecular dynamics simulations. **The Journal of general physiology**, v. 135, n. 6, p. 555–62, jun. 2010.
- DURRANT, J. D.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations and drug discovery. **BMC Biol**, v. 9, p. 71, 2011.



- EISENTHAL, R.; DANSON, M. J. **Enzyme assays : a practical approach**. [s.l.] Oxford University Press, 2002.
- ELHAMAMSY, A. R. DNA methylation dynamics in plants and mammals: overview of regulation and dysregulation. **Cell Biochem Funct**, 2016.
- ESWAR, N. et al. Comparative protein structure modeling using MODELLER. **Curr Protoc Protein Sci**, v. Chapter 2, p. Unit 2.9, 2007.
- FAN, H. et al. The rational search for PDE10A inhibitors from *Sophora flavescens* roots using pharmacophore- and docking- based virtual screening. **Molecular Medicine Reports**, v. 17, n. 1, p. 388–393, 25 out. 2017.
- FEINBERG, A. P.; VOGELSTEIN, B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. **Nature**, v. 301, n. 5895, p. 89–92, 6 jan. 1983.
- FERREIRA, L. G. et al. Comparative molecular field analysis of a series of inhibitors of HIV-1 protease. **Med Chem**, v. 7, n. 2, p. 71–79, 2011a.
- FERREIRA, L. G.; ANDRICOPULO, A. D. Inhibitors of *Trypanosoma brucei* trypanothione reductase: comparative molecular field analysis modeling and structural basis for selective inhibition. **Future Med Chem**, v. 5, n. 15, p. 1753–1762, 2013.
- FERREIRA, L. G.; DE OLIVEIRA, M. T.; ANDRICOPULO, A. D. Advances and Progress in Chagas Disease Drug Discovery. **Curr Top Med Chem**, 2016.
- FERREIRA, R. S. et al. In silico screening strategies for novel inhibitors of parasitic diseases. **Expert Opin Drug Discov**, v. 6, n. 5, p. 481–489, 2011b.
- FERREIRA, R. S. et al. Historical perspective and human consequences of Africanized bee stings in the Americas. **J Toxicol Environ Health B Crit Rev**, v. 15, n. 2, p. 97–108, 2012.
- FIDALGO, L. M.; GILLE, L. Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs. **Pharm Res**, v. 28, n. 11, p. 2758–2770, 2011.
- Focus In.** . [s.l.: s.n.]. Disponível em:  
<[https://www.tecanannualreport.com/fileadmin/relaunch/annualreport2017/downloads/180424\\_Tecan\\_GB\\_Web\\_EN.pdf](https://www.tecanannualreport.com/fileadmin/relaunch/annualreport2017/downloads/180424_Tecan_GB_Web_EN.pdf)>. Acesso em: 9 out. 2018.
- GASTEIGER, E.; JUNG, E.; BAIROCH, A. SWISS-PROT: connecting biomolecular knowledge via a protein database. **Curr Issues Mol Biol**, v. 3, n. 3, p. 47–55, 2001.
- GAZANION, E. et al. *Leishmania infantum* nicotinamidase is required for late-stage development in its natural sand fly vector, *Phlebotomus perniciosus*. **Int J Parasitol**, v. 42, n. 4, p. 323–327, 2012.
- GONG, H. et al. Identification of bicyclic hexafluoroisopropyl alcohol sulfonamides as retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma (ROR $\gamma$ /ROR $\gamma$ c) inverse agonists. Employing structure-based drug design to improve pregnane X receptor (PXR) selectivity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 28, n. 2, p. 85–93, 15 jan. 2018.
- GONZALEZ-ZULUETA, M. et al. Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. **Cancer Res**, v. 55, n. 20, p. 4531–4535, 1995.
- GOUY, M.; GUINDON, S.; GASCUEL, O. SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building. **Molecular Biology and Evolution**, v. 27, n. 2, p. 221–224, 1 fev. 2010.
- GUEDES, I. A.; DE MAGALHÃES, C. S.; DARDENNE, L. E. Receptor–ligand molecular docking. **Biophysical Reviews**, v. 6, n. 1, p. 75–87, 21 mar. 2014.
- GUIDO, R. V. C. et al. Structure-activity relationships for a class of selective inhibitors of the major cysteine protease from *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 6, p. 964–973, 20 jan. 2008.
- GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. **Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas**, [s.d.].

- HALGREN, T. A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. **Journal of Computational Chemistry**, v. 17, n. 5–6, p. 490–519, abr. 1996.
- HANN, M. M.; LEACH, A. R.; HARPER, G. Molecular Complexity and Its Impact on the Probability of Finding Leads for Drug Discovery. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 41, n. 3, p. 856–864, maio 2001.
- HARDER, E. et al. OPLS3: A Force Field Providing Broad Coverage of Drug-like Small Molecules and Proteins. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 12, n. 1, p. 281–296, 12 jan. 2016.
- HAWKINS, P. C. D.; NICHOLLS, A. Conformer Generation with OMEGA: Learning from the Data Set and the Analysis of Failures. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, n. 11, p. 2919–2936, 26 nov. 2012.
- HELTWEG, B. et al. Antitumor activity of a small-molecule inhibitor of human silent information regulator 2 enzymes. **Cancer Res**, v. 66, n. 8, p. 4368–4377, 2006.
- HESS, B. et al. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. **J Chem Theory Comput**, v. 4, n. 3, p. 435–447, 2008.
- HEVENER, K. E. Computational Toxicology Methods in Chemical Library Design and High-Throughput Screening Hit Validation. In: [s.l.] Humana Press, New York, NY, 2018. p. 275–285.
- HONÓRIO, K. M. et al. Two- and three-dimensional quantitative structure-activity relationships studies on a series of liver x receptor ligands. **Open Med Chem J**, v. 2, p. 87–96, 2008.
- HOPKINS, A. L.; GROOM, C. R. Target analysis: a priori assessment of druggability. **Ernst Schering Res Found Workshop**, n. 42, p. 11–17, 2003.
- HUMPHERYS, D. et al. Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. **Science**, v. 293, n. 5527, p. 95–97, 2001.
- INAMDAR, P. et al. Structure Optimization of Neuraminidase Inhibitors as Potential Anti-Influenza (H1N1Inhibitors) Agents Using QSAR and Molecular Docking Studies. **Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR**, v. 13, n. 1, p. 49–65, 2014.
- IRWIN, J. C. et al. The effect of lipophilicity and dose on the frequency of statin-associated muscle symptoms: A systematic review and meta-analysis. **Pharmacological Research**, v. 128, p. 264–273, fev. 2018.
- IRWIN, J. J. et al. ZINC: a free tool to discover chemistry for biology. **J Chem Inf Model**, v. 52, n. 7, p. 1757–1768, 2012.
- JONES, G. et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking 1 Edited by F. E. Cohen. **Journal of Molecular Biology**, v. 267, n. 3, p. 727–748, 4 abr. 1997.
- JONES, P. A.; BAYLIN, S. B. The epigenomics of cancer. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 683–692, 2007.
- JUBB, H. C. et al. Abstract 3285: COSMIC-3D: Impacts of cancer mutations on protein structure, function, and druggability. **Cancer Research**, v. 78, n. 13 Supplement, p. 3285–3285, 1 jul. 2018.
- KALYAANAMOORTHY, S.; CHEN, Y. P. Modelling and enhanced molecular dynamics to steer structure-based drug discovery. **Prog Biophys Mol Biol**, v. 114, n. 3, p. 123–136, 2014.
- KARPLUS, M.; PETSKO, G. A. Molecular dynamics simulations in biology. **Nature**, v. 347, n. 6294, p. 631–639, 1990.
- KIM, H.-S. et al. SIRT2 maintains genome integrity and suppresses tumorigenesis through regulating APC/C activity. **Cancer cell**, v. 20, n. 4, p. 487–99, 18 out. 2011.
- KITADA, T. et al. Mechanism for epigenetic variegation of gene expression at yeast telomeric heterochromatin. **Genes Dev**, v. 26, n. 21, p. 2443–2455, 2012.
- KRÜGER, A. et al. Molecular Modeling Applied to Nucleic Acid-Based Molecule

- Development. **Biomolecules**, v. 8, n. 3, 27 ago. 2018.
- KUCZERA, K. et al. Free energy of sickling: A simulation analysis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 21, p. 8481–8485, 1990.
- KUCZERA, K.; KURIYAN, J.; KARPLUS, M. Temperature dependence of the structure and dynamics of myoglobin. A simulation approach. **J Mol Biol**, v. 213, n. 2, p. 351–373, 1990.
- LACROIX, C. et al. Identification of Novel Smoothed Ligands Using Structure-Based Docking. **PLoS One**, v. 11, n. 8, p. e0160365, 2016.
- LARA, E. et al. Salermide, a Sirtuin inhibitor with a strong cancer-specific proapoptotic effect. **Oncogene**, v. 28, n. 6, p. 781–791, 8 fev. 2009.
- LEACH, A. R.; BRYCE, R. A.; ROBINSON, A. J. Synergy between combinatorial chemistry and de novo design. **J Mol Graph Model**, v. 18, n. 4–5, p. 358–367, 2000.
- LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design. **Current medicinal chemistry**, v. 12, n. 1, p. 23–49, 2005.
- LIMA, L. R. DE [UNESP]. Estudos de transferência de energia peptídeos-lantanídeos com aplicações em biossensores. 15 maio 2018.
- LIPINSKI, C. A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 1, n. 4, p. 337–341, dez. 2004.
- LIPINSKI, C. A. Rule of five in 2015 and beyond: Target and ligand structural limitations, ligand chemistry structure and drug discovery project decisions. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 101, p. 34–41, 2016.
- MADHAVI SASTRY, G. et al. Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 27, n. 3, p. 221–234, 12 mar. 2013.
- MAI, A. et al. Design, synthesis, and biological evaluation of sirtinol analogues as class III histone/protein deacetylase (Sirtuin) inhibitors. **J Med Chem**, v. 48, n. 24, p. 7789–7795, 2005a.
- MAI, A. et al. 3-(1H-pyrrol-2-yl)-2-oxazolidinones as novel monoamine oxidase type A inhibitors. **Medicinal chemistry (Shāriqah (United Arab Emirates))**, v. 1, n. 2, p. 117–24, mar. 2005b.
- MAKAREWICZ, T.; KAŻMIERKIEWICZ, R. Improvements in GROMACS plugin for PyMOL including implicit solvent simulations and displaying results of PCA analysis. **J Mol Model**, v. 22, n. 5, p. 109, 2016.
- MARCEL L. VERDONK, \*, † et al. Modeling Water Molecules in Protein–Ligand Docking Using GOLD. 2005.
- MARTIN\*, Y. C. A Bioavailability Score. 2005.
- MATTER, H.; SOTRIFFER, C. Applications and Success Stories in Virtual Screening. In: [s.l.: s.n.]. p. 319–358.
- MOLNÁR, L.; KESERÚ, G. M. A neural network based virtual screening of cytochrome P450 3A4 inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 12, n. 3, p. 419–421, 11 fev. 2002.
- MONIOT, S.; SCHUTKOWSKI, M.; STEEBORN, C. Crystal structure analysis of human Sirt2 and its ADP-ribose complex. **J Struct Biol**, v. 182, n. 2, p. 136–143, 2013.
- MORETTI, N. S. et al. Characterization of Trypanosoma cruzi Sirtuins as Possible Drug Targets for Chagas Disease. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 8, p. 4669–4679, 2015.
- MORI, T. et al. Molecular dynamics simulations of biological membranes and membrane proteins using enhanced conformational sampling algorithms. **Biochim Biophys Acta**, v. 1858, n. 7 Pt B, p. 1635–1651, 2016.
- NEITZ, R. J. et al. Lead identification to clinical candidate selection: drugs for Chagas

- disease. **J Biomol Screen**, v. 20, n. 1, p. 101–111, 2015.
- PASTERNAK, A. et al. Discovery and optimization of novel 4-[(aminocarbonyl)amino]-N-[4-(2-aminoethyl)phenyl]benzenesulfonamide ghrelin receptor antagonists. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 19, n. 21, p. 6237–6240, 2009.
- PEARSON, W. R. Selecting the Right Similarity-Scoring Matrix. **Current protocols in bioinformatics**, v. 43, p. 3.5.1-9, 2013.
- PEDRÓ-ROSA, L. et al. Identification of potent inhibitors of the Trypanosoma brucei methionyl-tRNA synthetase via high-throughput orthogonal screening. **J Biomol Screen**, v. 20, n. 1, p. 122–130, 2015.
- POPOVA, M.; ISAYEV, O.; TROPSHA, A. Deep reinforcement learning for de novo drug design. **Science Advances**, v. 4, n. 7, p. eaap7885, 25 jul. 2018.
- RAMACHANDRAN, G. N.; RAMAKRISHNAN, C.; SASISEKHARAN, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. **Journal of Molecular Biology**, v. 7, n. 1, p. 95–99, 1 jul. 1963.
- RITAGLIATI, C. et al. Overexpression of Cytoplasmic TcSIR2RP1 and Mitochondrial TcSIR2RP3 Impacts on Trypanosoma cruzi Growth and Cell Invasion. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 4, p. e0003725, 15 abr. 2015.
- ROCHA, J. R.; FREITAS, R. F.; MONTANARI, C. A. The GRID/CPCA approach in drug discovery. **Expert Opin Drug Discov**, v. 5, n. 4, p. 333–346, 2010.
- RODRIGUEZ, M. et al. Chemistry and biology of chromatin remodeling agents: state of art and future perspectives of HDAC inhibitors. **Curr Med Chem**, v. 13, n. 10, p. 1119–1139, 2006.
- ROTILI, D. et al. Discovery of Salermide-Related Sirtuin Inhibitors: Binding Mode Studies and Antiproliferative Effects in Cancer Cells Including Cancer Stem Cells. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 24, p. 10937–10947, 27 dez. 2012.
- RUDA, G. F. et al. Virtual fragment screening for novel inhibitors of 6-phosphogluconate dehydrogenase. **Bioorg Med Chem**, v. 18, n. 14, p. 5056–5062, 2010.
- RUMPF, T. et al. Selective Sirt2 inhibition by ligand-induced rearrangement of the active site. **Nat Commun**, v. 6, p. 6263, 2015.
- SACCONNAY, L. et al. Structural insights of SIR2rp3 proteins as promising biotargets to fight against Chagas disease and leishmaniasis. **Mol Biosyst**, v. 9, n. 9, p. 2223–2230, 2013.
- SACCONNAY, L. et al. Computational studies on sirtuins from Trypanosoma cruzi: structures, conformations and interactions with phytochemicals. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 2, p. e2689, 2014.
- SACCONNAY, L. et al. 5-Benzylidene-hydantoin is a new scaffold for SIRT inhibition: From virtual screening to activity assays. **Eur J Pharm Sci**, v. 85, p. 59–67, 2016.
- SALUM, L. B.; POLIKARPOV, I.; ANDRICOPULO, A. D. Structure-based approach for the study of estrogen receptor binding affinity and subtype selectivity. **J Chem Inf Model**, v. 48, n. 11, p. 2243–2253, 2008.
- SÁNCHEZ, R.; SALI, A. Comparative protein structure modeling. Introduction and practical examples with modeller. **Methods Mol Biol**, v. 143, p. 97–129, 2000.
- SANTIAGO, C. et al. Allosteric inhibition of aminopeptidase N functions related to tumor growth and virus infection. **Scientific Reports**, v. 7, p. 46045, 10 abr. 2017.
- SATOH, A. et al. DNA methylation and histone deacetylation associated with silencing DAP kinase gene expression in colorectal and gastric cancers. **Br J Cancer**, v. 86, n. 11, p. 1817–1823, 2002.
- SATOH, A. et al. Characteristics of initiation and early events for muscle development in the Xenopus limb bud. **Dev Dyn**, v. 234, n. 4, p. 846–857, 2005.
- SATOH, A.; TANEKO, E. Brownian dynamics simulations of a dispersion composed of two-types of spherical particles: for development of a new technology to improve the visibility of rivers and lakes. **J Colloid Interface Sci**, v. 338, n. 1, p. 236–242,

2009.

SATOH, M.; SATOH, A. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-COA reductase inhibitors and phosphodiesterase type V inhibitors attenuate right ventricular pressure and remodeling in a rat model of pulmonary hypertension. **J Pharm Pharm Sci**, v. 11, n. 2, p. 118s–130s, 2008.

SMITH, D. M. et al. Docking of the proteasomal ATPases' carboxyl termini in the 20S proteasome's alpha ring opens the gate for substrate entry. **Molecular cell**, v. 27, n. 5, p. 731–44, 7 set. 2007.

SNADER, K. M. et al. Pyranenamides: A New Series of Potent Antiallergic Compounds. In: [s.l: s.n.]. p. 145–158.

STERLING, T.; IRWIN, J. J. ZINC 15--Ligand Discovery for Everyone. **J Chem Inf Model**, v. 55, n. 11, p. 2324–2337, 2015.

STROES, E. et al. Anti-PCSK9 Antibody Effectively Lowers Cholesterol in Patients With Statin Intolerance: The GAUSS-2 Randomized, Placebo-Controlled Phase 3 Clinical Trial of Evolocumab. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 63, n. 23, p. 2541–2548, 17 jun. 2014.

SUN, Y. et al. Ligand-based virtual screening and inductive learning for identification of SIRT1 inhibitors in natural products. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 19312, 25 maio 2016.

TAN, K. R.; HWANG, J. Tafenoquine receives regulatory approval in USA for prophylaxis of malaria and radical cure of Plasmodium vivax. **Journal of Travel Medicine**, v. 25, n. 1, 1 jan. 2018.

TELES, A. L. B. et al. Identification, characterization and molecular modelling studies of Schistosoma mansoni Dihydrofolate Reductase inhibitors: From assay development to hit identification. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 18, 9 maio 2018.

TRIPOS. **SYBYL® Expert Molecular Modeling Environment**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <[http://scc.acad.bg/ncsa/articles/library/Library2016\\_Supercomputers-at-Work/InSilico\\_DrugDesign/SYBYL\\_Software.pdf](http://scc.acad.bg/ncsa/articles/library/Library2016_Supercomputers-at-Work/InSilico_DrugDesign/SYBYL_Software.pdf)>. Acesso em: 6 set. 2018.

URBINA, J. A. New advances in the management of a long-neglected disease. **Clin Infect Dis**, v. 49, n. 11, p. 1685–1687, 2009.

URBINA, M. T. [Readability of education and consent forms in assisted reproduction procedures of the Latin American Network of Assisted Reproduction]. **Cir Cir**, v. 80, n. 3, p. 306; author reply 306-7, 2012.

VAJDA, S. et al. Cryptic binding sites on proteins: definition, detection, and druggability. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 44, p. 1–8, 1 jun. 2018.

VAN DER SPOEL, D. et al. GROMACS: fast, flexible, and free. **J Comput Chem**, v. 26, n. 16, p. 1701–1718, 2005.

VAN OSS, C. ; GOOD, R. ; CHAUDHURY, M. . The role of van der Waals forces and hydrogen bonds in “hydrophobic interactions” between biopolymers and low energy surfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 111, n. 2, p. 378–390, 1 jun. 1986.

VERDONK, M. L. et al. Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins**, v. 52, n. 4, p. 609–623, 2003.

VERGNES, B. et al. A proteomics screen implicates HSP83 and a small kinetoplastid calpain-related protein in drug resistance in Leishmania donovani clinical field isolates by modulating drug-induced programmed cell death. **Mol Cell Proteomics**, v. 6, n. 1, p. 88–101, 2007.

VERMA, J.; KHEDKAR, V.; COUTINHO, E. 3D-QSAR in Drug Design - A Review. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 1, p. 95–115, 1 jan. 2010.

VINHAES, M. C.; DIAS, J. C. P. Doença de Chagas no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16, n. suppl 2, p. S7–S12, 2000.

WADDINGTON, C. H. The epigenotype. 1942. **Int J Epidemiol**, v. 41, n. 1, p. 10–13,

2012.

WALLACE, A. C.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. **“Protein Engineering, Design and Selection”**, v. 8, n. 2, p. 127–134, 1 fev. 1995.

WEBB, B.; SALI, A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. **Curr Protoc Bioinformatics**, v. 47, p. 5.6.1-32, 2014.

WEBB, B.; SALI, A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. **Curr Protoc Bioinformatics**, v. 54, p. 5.6.1-5.6.37, 2016.

WERMUTH, C. G. Similarity in drugs: reflections on analogue design. **Drug Discov Today**, v. 11, n. 7–8, p. 348–354, 2006.

WHO. **New Initiative will halt Chagas disease in six years**. **TDR News**TDR News, 1992a.

WHO. **New Initiative will halt Chagas disease in six years**TDR News, 1992b.

WHO. **World Health Organization**, 2016.

WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. Web Server, p. W407–W410, 8 maio 2007.

WILLYARD, C. Neglected diseases see few new drugs despite upped investment. **Nat Med**, v. 19, n. 1, p. 2, 2013.

XU, C. et al. Functional Precision Medicine Identifies Novel Druggable Targets and Therapeutic Options in Head and Neck Cancer. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 24, n. 12, p. 2828–2843, 15 jun. 2018.

YAN, Y. et al. HDock: a web server for protein–protein and protein–DNA/RNA docking based on a hybrid strategy. **Nucleic Acids Research**, v. 45, 2017.

YANG, Z. et al. Structural basis of ligand binding modes at the neuropeptide Y Y1 receptor. **Nature**, v. 556, n. 7702, p. 520–524, 18 abr. 2018.

YU, W.; MACKERELL, A. D.; JR. Computer-Aided Drug Design Methods. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1520, p. 85–106, 2017.

ZHANG, T. et al. SPINE-D: Accurate Prediction of Short and Long Disordered Regions by a Single Neural-Network Based Method. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 29, n. 4, p. 799–813, fev. 2012.



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

---

**9141 - 9230448/1 - Glaucio Monteiro Ferreira**

**Email:** gmf@usp.br  
**Data de Nascimento:** 15/07/1989  
**Cédula de Identidade:** RG - 20.106.834-3 - RJ  
**Local de Nascimento:** Estado do Rio de Janeiro  
**Nacionalidade:** Brasileira  
**Graduação:** Bacharel em Farmácia - Universidade Federal do Espírito Santo - Espírito Santo - Brasil - 2014

---

**Curso:** Doutorado Direto  
**Programa:** Toxicologia e Análises Toxicológicas  
**Data de Matrícula:** 21/01/2015  
**Início da Contagem de Prazo:** 21/01/2015  
**Data Limite para o Depósito:** 21/01/2019  
**Orientador Acadêmico:** Prof(a). Dr(a). Ernani Pinto Junior - 21/01/2015 até 07/04/2015. Email: ernani@usp.br  
**Orientador:** Prof(a). Dr(a). Gustavo Henrique Goulart Trossini - 08/04/2015 até o presente. Email: trossini@usp.br  
**Proficiência em Línguas:** Inglês, Aprovado em 21/01/2015  
**Data de Aprovação no Exame de Qualificação:** Aprovado em 19/09/2016  
**Data do Depósito do Trabalho:**  
**Título do Trabalho:**  
**Data Máxima para Aprovação da Banca:**  
**Data de Aprovação da Banca:**  
**Data Máxima para Defesa:**  
**Data da Defesa:**  
**Resultado da Defesa:**  
**Histórico de Ocorrências:** Primeira Matrícula em 21/01/2015

---

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

**Última ocorrência:** Matrícula de Acompanhamento em 16/07/2018

**Impresso em:** 31/10/2018 18:13:20



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

**9141 - 9230448/1 - Glaucio Monteiro Ferreira**

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5802-3/6	Tópicos Avançados em Toxicologia I	03/03/2015	16/06/2015	15	1	75	B	N	Concluída
FBC5803-3/5	Sistemas de Garantia da Qualidade em Laboratórios de Ensaio	24/03/2015	06/04/2015	30	2	75	A	N	Concluída
FBF5818-1/1	Tópicos Avançados em Fármacos e Medicamentos – Fundamentos e Aplicações de Análises Multivariadas no Planejamento de Fármacos	15/06/2015	21/06/2015	30	2	100	A	N	Concluída
ICB5747-1/1	Proteômica: Um Link entre Biologia, Química, Farmácia e Medicina (Parte I) (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	27/07/2015	09/08/2015	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5784-3/7	Tópicos Avançados em Toxicologia II	04/08/2015	16/11/2015	15	1	90	A	N	Concluída
QBQ5825-10/1	Prática de Ensino de Química e Bioquímica (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	17/08/2015	29/11/2015	45	3	90	A	N	Concluída
FBF5822-1/1	Tópicos Avançados em Fármaco e Medicamentos (Calorimetria e Termodinâmica no Desenho de Novos Fármacos)	02/09/2015	08/09/2015	30	2	100	A	N	Concluída
FBF5805-2/2	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	10/03/2016	19/05/2016	90	6	100	A	N	Concluída
FBF5824-1/1	Introdução à Modelagem Molecular como Ferramenta no Estudo e Desenvolvimento de Moléculas Bioativas	04/07/2016	24/07/2016	90	6	100	A	N	Concluída
6025851-2/1	Tópicos Avançados de Pesquisa (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo)	05/03/2018	11/03/2018	30	2	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
<b>Disciplinas:</b>	0	25	29
<b>Estágios:</b>			
<b>Total:</b>	0	25	29

**Créditos Atribuídos à Tese: 167**

**Conceito a partir de 02/01/1997:**

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

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

**Última ocorrência:** Matrícula de Acompanhamento em 16/07/2018

**Impresso em:** 31/10/2018 18:13:20





# Glaucio Monteiro Ferreira

Bolsista de Doutorado do CNPq

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/7189579305342139>  
Última atualização do currículo em 01/08/2018

Doutorando pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo ( FCF - USP), no Departamento de Toxicologia e Análises Toxicológicas (CAPES - 6). Atualmente desenvolve pesquisa na área de Planejamento racional de fármacos em alvos epigenéticos em *Trypanosoma cruzi*. Graduado em Farmácia pela Universidade Federal do Espírito Santo (UFES - 2014). **(Texto informado pelo autor)**


## Identificação

<b>Nome</b>	Glaucio Monteiro Ferreira
<b>Nome em citações bibliográficas</b>	FERREIRA, G. M.; FERREIRA, GLAUCIO MONTEIRO; FERREIRA, GLAUCIO; FERREIRA, GLÁUCIO M

## Endereço

<b>Endereço Profissional</b>	Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Avenida Professor Lineu Prestes Butantã 05508000 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (28) 999571407
------------------------------	---

## Formação acadêmica/titulação

<b>2015</b>	Doutorado em andamento em Ciências Farmacêuticas (Conceito CAPES 7). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Aplicação de abordagem de SBDD na seleção e avaliação toxicológica de inibidores de sirtuina 2 de <i>T. cruzi</i> , Orientador:  Gustavo Henrique Goulart Trossini. Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil. Palavras-chave: <i>Trypanosoma cruzi</i> ; Sirtuin 2; Epigenetic. Grande área: Ciências da Saúde Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica / Subárea: Química Farmacêutica. Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Modelagem Molecular.
<b>2009 - 2014</b>	Graduação em Farmácia. Universidade Federal do Espírito Santo, UFES, Brasil.
<b>2004 - 2007</b>	Ensino Médio (2º grau). Instituto Federal Fluminense, IFF, Brasil.

## Atuação Profissional

**Universidade de São Paulo, USP, Brasil.**

### Vínculo institucional

<b>2015 - Atual</b>	Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Doutorado, Regime: Dedicção exclusiva.
---------------------	--

### Atividades

<b>2015 - Atual</b>	Pesquisa e desenvolvimento , Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Linhas de pesquisa Aplicação de abordagem de SBDD na seleção e avaliação toxicológica de inibidores de sirtuina 2 de <i>T. cruzi</i>
---------------------	---

**Universidade Federal do Espírito Santo, UFES, Brasil.**

### Vínculo institucional

<b>2013 - 2014</b>	Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Iniciação Científica PIBITI, Carga horária: 20
--------------------	--

## Linhas de pesquisa

1. DERIVADOS TRIAZÓLICOS NUCLEOSÍDICOS: POTENCIAL APLICAÇÃO PARA A INOVAÇÃO TECNOLÓGICA DO TRATAMENTO DO CÂNCER
2. Aplicação de abordagem de SBDD na seleção e avaliação toxicológica de inibidores de sirtuina 2 de *T. cruzi*  
Objetivo: - Construção de modelo tridimensional da Sir2 de *T. cruzi*, por modelagem comparativa; - Estudo de campos de interação molecular, e construção de fármacofores; - Triagem virtual de inibidores de SIR2; - Expressão de SIR2 de *T. cruzi*; - Ensaios de inibição de SIR2 de *T. cruzi* e de SIRT1 (humana), e avaliação de seletividade; - Ensaios de atividade contra *T. cruzi*; - Ensaios de toxicidade dos compostos selecionados..

## Projetos de pesquisa

### 2015 - Atual

Busca por Inibidores Seletivos de Sirtuina 2 empregando Técnicas de Planejamento de Fármacos baseado na Estrutura do Receptor  
Descrição: A doença de Chagas é uma infecção parasitária causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e transmitida principalmente por insetos da subfamília Triatominae. São consideradas como doenças tropicais negligenciadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS). O tratamento atual é baseado em fármacos inorgânicos e/ou de segunda linha e estão relacionados a sérios efeitos adversos devido à toxicidade dessas substâncias. Portanto, existe a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos mais seguros e eficazes contra doenças de Chagas. A enzima Sir2 de tripanossomatídeos foi identificada como um importante alvo biológico relacionado à sobrevivência desses parasitas, sendo assim, considerado um alvo para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos para o tratamento da doença de Chagas. O presente trabalho empregou estratégias de planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor e do ligante com o objetivo de identificar novas substâncias bioativas contra a enzima Sir2 *T. cruzi*. A partir dos experimentos realizados, compostos foram identificados como promissores e estão em fase de aquisição para futuros testes enzimáticos e biológicos..  
Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.  
Alunos envolvidos: Doutorado: (3) .  
Integrantes: Glaucio Monteiro Ferreira - Integrante / Gustavo Henrique Goulart Trossini - Coordenador / Flávio Emery Silva - Integrante.

### 2013 - 2014

DERIVADOS TRIAZÓLICOS NUCLEOSÍDICOS: POTENCIAL APLICAÇÃO PARA A INOVAÇÃO TECNOLÓGICA DO TRATAMENTO DO CÂNCER  
Descrição: Objetivos Gerais Em função da atividade antitumoral de derivados nucleosídeos, e considerando a importância e a necessidade da descoberta de novos fármacos eficazes para a terapia antitumoral, o referido projeto tem como objetivo a síntese de novos triazóis derivados da adenosina (1) e timidina (2) via cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen, também denominada "click chemistry", bem como avaliação in vitro da atividade antitumoral e citotoxicidade. Objetivos Específicos A síntese desses novos derivados nucleosídicos foi planejada na diversidade de aplicações dos derivados triazóis na química medicinal, especialmente como um bioisómero não-clássico do grupo ácido carboxílico. A sua introdução em moléculas biologicamente ativas permite, conforme estudos de QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship), um aumento significativo da lipofilicidade, um fator importante no planejamento de fármacos quando se trata da passagem destes através de biomembranas (PATIL, KUMTHEKAR, NAGARKAR, 2012; HABIBI et al., 2010).  
Síntese dos conjugados triazolo-nucleosídeo (1a-e) obtidos pelo acoplamento do nucleosídeo adenosina (1) com diversos azidos comerciais (a-e), pela reação de cicloadição 1,3-dipolar, envolvendo a estratégia de click chemistry; Síntese dos conjugados triazolo-nucleosídeo (2a-e) obtidos pelo acoplamento do nucleosídeo timidina (2) com diversos azidos comerciais funcionalizados (a-e), pela reação de cicloadição 1,3-dipolar, envolvendo a estratégia de click chemistry; Avaliação in vitro da atividade antitumoral, em linhagens de câncer de origem epitelial. Retrossíntese simplificada dos conjugados (1a-e) e (2a-e)..  
Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.  
Alunos envolvidos: Graduação: (2) .  
Integrantes: Glaucio Monteiro Ferreira - Integrante / Pedro Alves Bezerra Morais - Coordenador / Rhaíra Nazário Ribeiro - Integrante. Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo - Bolsa.

## Áreas de atuação

1. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia.

## Idiomas

<b>Português</b>	Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.
<b>Inglês</b>	Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Lê Razoavelmente, Escreve Pouco.
<b>Espanhol</b>	Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Lê Razoavelmente, Escreve Pouco.

## Produções

### Produção bibliográfica

## Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica ▼

1. TELES, ANDRE LACERDA BRAGA ; SILVA, ROSEANE R. ; KO, MICHELLE ; **FERREIRA, GLAUCIO MONTEIRO** ; PITA, SAMUEL DA ROCHA ; TROSSINI, GUSTAVO HENRIQUE GOULART ; CARVALHO, PAULO ; CASTILHO, MARCELO SANTOS . Identification, characterization and molecular modelling studies of Schistosoma mansoni Dihydrofolate Reductase inhibitors: From assay development to hit identification. CURRENT TOPICS IN MEDICINAL CHEMISTRY **JCR**, v. 18, p. 9, 2018.
2. SILVA, ETYENE JG ; BEZERRA-SOUZA, ADRIANA ; PASSERO, LUIZ FD ; LAURENTI, MÁRCIA D ; **FERREIRA, GLAUCIO M** ; FUJII, DRIELLI GV ; TROSSINI, GUSTAVO HG ; RAMINELLI, CRISTIANO . Synthesis, leishmanicidal activity, structural descriptors and structure-activity relationship of quinoline derivatives. Future Medicinal Chemistry **JCR**, v. 12, p. fmc-2018-0124, 2018.
3. MELLO, JULIANA DA FONSECA REZENDE E ; GOMES, RENAN AUGUSTO ; VITAL-FUJII, DRIELLI GOMES ; **FERREIRA, GLAUCIO MONTEIRO** ; TROSSINI, GUSTAVO HENRIQUE GOULART . Fragment-based drug discovery as alternative strategy to the drug development for neglected diseases. Chemical Biology & Drug Design **JCR**, v. 1, p. 28547936, 2017.
4. PAIVA, FERNANDA ; **FERREIRA, GLAUCIO** ; TROSSINI, GUSTAVO ; PINTO, ERNANI . Identification, In Vitro Testing and Molecular Docking Studies of Microginins? Mechanism of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition. MOLECULES **JCR**, v. 22, p. 1884, 2017.
5. ESPÍRITO-SANTO, RENAN FERNANDES ; MEIRA, CASSIO SANTANA ; COSTA, RAFAEL DOS SANTOS ; SOUZA FILHO, OTÁVIO PASSOS ; EVANGELISTA, AFRANIO FERREIRA ; TROSSINI, GUSTAVO HENRIQUE GOULART ; **FERREIRA, GLAUCIO MONTEIRO** ; VELOZO, EUDES DA SILVA ; VILLARREAL, CRISTIANE FLORA ; PEREIRA SOARES, MILENA BOTELHO . The anti-inflammatory and immunomodulatory potential of braylin: Pharmacological properties and mechanisms by in silico, in vitro and in vivo approaches. PLoS One **JCR**, v. 12, p. e0179174, 2017.

## Resumos expandidos publicados em anais de congressos

1. ★ **FERREIRA, G. M.** ; NUNES, L. G. P. ; SOUZA, F. F. ; OLIVEIRA, M. V. L. ; BRAMBATI, R. A. ; MEIRA, E. F. ; MEIRA, F. D. M. S. ; ZAMPIROLI, A. C. D. . Avaliação da Dispensação de Medicamentos na Farmácia Básica no Município de Alegre-ES. In: II SECFAR - Semana de Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências Agrárias - UFES, 2013, Alegre. Estudos Científicos Aplicados a Novas Tecnologias. Alegre: CAUFES, 2013.
2. FIALHO, V. L. S. ; **FERREIRA, G. M.** ; NUNES, L. G. P. ; OLIVEIRA, M. V. L. . Avaliação do Uso de Drogas pelos Estudantes do Curso de Biologia Licenciatura, Matemática Licenciatura e Zootecnia no CCA-UFES. In: II SECFAR - Semana de Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências Agrárias - UFES, 2013, Alegre. Estudos Científicos Aplicados a Novas Tecnologias. Alegre: CAUFES, 2013.

## Resumos publicados em anais de congressos

1. Vital-Fujii, D. G. ; **FERREIRA, G. M.** ; TROSSINI, G. H. G. ; Juliana da Fonseca Rezende e Mello, . Molecular dynamic simulation and pharmacophore model of parasitic cysteine proteases.. In: American Chemical Society (ACS), 2017. American Chemical Society (ACS), 2017.
2. **FERREIRA, G. M.** ; TROSSINI, G. H. G. ; MALTAROLLO, V. G. ; SILVA, F. E. . Trypanosoma cruzi Sirtuin-2 construction by Modeling threading and Molecular Dynamics.. In: American Chemical Society (ACS), 2017, San Francisco - CA - EUA. American Chemical Society (ACS), 2017.
- 3.

- FERREIRA, G. M.**; TROSSINI, G. H. G. ; PINTO JUNIOR, E. . Molecular modeling and docking of microginin the active site of ACE.. In: Brazilian society of chemistry (SBQ), 2016, Goiânia. Brazilian society of chemistry (SBQ), 2016.
4. **FERREIRA, G. M.**; TROSSINI, G. H. G. ; Juliana da Fonseca Rezende e Mello, ; STEFANI, H. A. . Construction of the CYP51 model of *C. albicans* using Homology Modeling and Molecular Dynamics. In: VIII School of Molecular Modeling in Biological Systems, Petrópolis. CDROM 8th EMMSB, 2016, 2016, Petrópolis - RJ. VIII School of Molecular Modeling in Biological Systems, Petrópolis. CDROM 8th EMMSB, 2016, 2016.
  5. FERRAZ, W. R. ; **FERREIRA, G. M.** ; TROSSINI, G. H. G. ; KRONENBERGER, T. ; Vital-Fujji, D. G. . Construction of the Plasmepsin V (Pm) model of *P. falciparum* using Homology Modeling and Molecular Dynamics.. In: VIII School of Molecular Modeling in Biological Systems, Petrópolis. CDROM 8th EMMSB, 2016, 2016, Petrópolis - RJ. VIII School of Molecular Modeling in Biological Systems, Petrópolis. CDROM 8th EMMSB, 2016, 2016.
  6. MARTINS, J. P. M. ; TROSSINI, G. H. G. ; CASTILHO, M. ; **FERREIRA, G. M.** . ?Use of Molecular Interaction Fields in the Construction of a Pharmacophoric Model for Dihydrofolate Reductase of *Schistosoma mansoni*?. In: VIII School of Molecular Modeling in Biological Systems, Petrópolis. CDROM 8th EMMSB, 2016, 2016, Petrópolis - RJ. VIII School of Molecular Modeling in Biological Systems, Petrópolis. CDROM 8th EMMSB, 2016, 2016.
  7. **FERREIRA, G. M.**; TROSSINI, G. H. G. ; MALTAROLLO, V. G. ; SILVA, F. E. . Construction of *Trypanosoma cruzi* Sirtuin-2 by Modeling threading. In: IV International Symposium on Drug Discovery (IV-ISDD), 2015, Araraquara. IV International Symposium on Drug Discovery (IV-ISDD), 2015.
  8. **FERREIRA, G. M.**; MALTAROLLO, V. G. ; PAULA, H. ; MORAIS, P. A. B. ; TROSSINI, G. H. G. . Molecular Modeling studies on design of *Plasmodium falciparum* thymidylate kinase inhibitors as novel antimalarials.. In: BrazMedChem, 2014, Campos do Jordão. 7º Simpósio Brasileiro em Química Medicinal (BrazMedChem2014), 2014.
  9. ★ **FERREIRA, G. M.**; SOUZA, F. F. . RELATO DE CASO CLINICO: INTERAÇÃO MEDICAMENTOSA ENTRE CETOCONAZOL E MIDAZOLAN. In: I SECFAR, 2012, Alegre. Coletânea da 1a Semana de Ciências Farmacêuticas. ALEGRE - ES: CAUFES, 2012. v. 1. p. 127-128.

## Apresentações de Trabalho

1. **FERREIRA, G. M.**; TROSSINI, G. H. G. . Computational approaches in drug design applied to a epigenetic target. 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
2. ★ **FERREIRA, G. M.**; TROSSINI, G. H. G. ; MALTAROLLO, V. G. ; SILVA, F. E. . Construction of *Trypanosoma cruzi* Sirtuin-2 by Modeling threading. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
3. **FERREIRA, G. M.**; TROSSINI, G. H. G. . Métodos computacionais aplicados ao Planejamento Racional de Fármacos. 2015. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
4. **FERREIRA, G. M.**; MEIRA, E. F. . RISCOS DE PROBLEMAS RELACIONADOS COM MEDICAMENTOS EM IDOSOS DE UMA UNIDADE DA SAÚDE DE ALEGRE ? ES. 2014. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
5. ★ **FERREIRA, G. M.**; MALTAROLLO, V. G. ; De Paula, H. ; MORAIS, P. A. B. . Molecular Modeling studies on design of *Plasmodium falciparum* thymidylate kinase inhibitors as novel antimalarials. 2014. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
6. ★ ARCHANJO, A. B. ; **FERREIRA, G. M.** ; NUNES, L. G. P. ; ALMEIDA, B. R. . PARAMETROS FÍSICOS-QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS DA ÁGUA DA MÁQUINA DE GELO DOS LABORATÓRIOS DO CCA-UFES, ALEGRE-ES.. 2012. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

## Eventos

---

### Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. 2nd Workshop on Drug Design and Neglected Tropical Diseases. 2015. (Congresso).
2. 38º Reunião da Sociedade Brasileira de Química. Docking molecular na busca de inibidores da timidilato quinase de *Plasmodium falciparum* candidatos a antimaláricos. 2015. (Congresso).
3. IV International Symposium on Drug Discovery. Construction of *Trypanosoma cruzi* Sirtuin-2 by Modeling threading. 2015. (Simpósio).
4. BrazMedChem 2014. MOLECULAR MODELING STUDIES ON DESIGN OF PLASMODIUM FALCIPARUM THYMYDYLATE KINASE INHIBITORS AS NOVEL ANTIMALARIALS. 2014. (Simpósio).
5. XX Escola de Verão em Química Farmacêutica e Medicinal (XX EVQFM). 2014. (Encontro).
6. II SECFAR. Avaliação da Dispensação de Medicamentos na Farmácia Básica no Município de Alegre-ES. 2013. (Outra).
7. I SECFAR. RELATO DE CASO CLINICO: INTERAÇÃO MEDICAMENTOSA ENTRE CETOCONAZOL E MIDAZOLAN. 2012. (Congresso).
8. X CONEUFES. 2012. (Encontro).
9. XI ENEF. 2012. (Encontro).
10. XVI INIC, XII EPG, VI INIC Jr. PARAMETROS FÍSICOS-QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS DA ÁGUA DA MÁQUINA DE GELO DOS LABORATÓRIOS DO CCA-UFES, ALEGRE-ES.. 2012. (Simpósio).

### Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. TROSSINI, G. H. G. ; LIMA, E. J. C. ; **FERREIRA, G. M.** ; GATTI, F. M. ; Juliana da Fonseca Rezende e Mello, ; MARTINS, J. P. M. . II Workshop de Jovens Pesquisadores em Química Medicinal. 2017. (Congresso).

## Orientações

---

## Orientações e supervisões concluídas

### Trabalho de conclusão de curso de graduação

1. Jéssica Tiemi Fukushima Kimura. Estudo de QSAR aplicado a inibidores de PLK-2 (Polo-Like Kinase- 2) candidatos a antiparksonianos. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Abi - Farmácia) - Universidade de São Paulo. Orientador: Glaucio Monteiro Ferreira.
2. Rodrigo Soares Siqueira. Desenvolvimento de inibidor enzimático  $\beta$ -secretase (BACE-1), por planejamento de fármaco, para bloqueio no avanço da doença de Alzheimer. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Abi - Farmácia) - Universidade de São Paulo. Orientador: Glaucio Monteiro Ferreira.

## Inovação

---

### Projetos de pesquisa

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 31/10/2018 às 17:10:53

[Imprimir currículo](#)