



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS AMBIENTAIS, QUÍMICAS E FARMACÊUTICAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA QUÍMICA

RAMON MARTINS COGO

ESTUDO DE REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS POTENCIALMENTE INIBIDORES DA CATEPSINA B1 DE *SCHISTOSOMA MANSONI* GUIADO POR VIRTUAL SCREENING

DIADEMA

2021

RAMON MARTINS COGO

ESTUDO DE REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS POTENCIALMENTE INIBIDORES DA CATEPSINA B1 DE *SCHISTOSOMA MANSONI* GUIADO POR VIRTUAL SCREENING

Trabalho de defesa apresentado à Universidade Federal de São Paulo, campus Diadema, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Gonçales Galasse Rando

DIADEMA

2021

Cogo, Ramon Martins

Estudo de reposicionamento de fármacos potencialmente inibidores da catepsina B1 de *Schistosoma mansoni* guiado por *virtual screening* / Ramon Martins Cogo. — Diadema, 2021.

154 f.

Dissertação (Mestrado em Biologia Química) — Universidade Federal de são Paulo – Campus Diadema, 2021.

Orientadora: Daniela Gonçales Galasse Rando

1. Schistosoma mansoni. 2. Catepsina B1. 3. Farmacóforo. 4.

Riboflavina. 5. Virtual screening. 6. Reposicionamento de fármacos

02/09/2021 10:11



Serviço Público Federal Ministério da Educação **Universidade Federal de São Paulo**



PROGRAMA BIOLOGIA QUÍMICA

SEI/Unifesp - 0791483 - ATA DE DEFESA DISSERTAÇÃO E TESE

ATA DE DEFESA DISSERTAÇÃO E TESE nº 0791483/2021/PROGRAMA BIOLOGIA QUÍMICA

Diadema, 20 de agosto de 2021.

Aos vinte dias do mês de agosto do ano de dois mil e vinte e hum, reuniu-se através da plataforma Google Meet às 09h.00min "horas, a Comissão Julgadora para a DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO, solicitada por Ramon Martins Cogo, almo(a) do Programa de Pós-Graduação em Biologia Química, que apresentou dissertação sob o Título: Estudo de reposicionamento de fármacos potencialmente imbidores da Catepsina B1 de Schistosoma mansoni guiado por virtual screening.

A referida Comissão esteve constituída pelos Doutores:

Prof(a). Dr(a). Josué de Moraes - Departamento de Centro de Pós-Graduação - da Universidade de Guarulhos;

Prof(a). Dr(a). Maurício Homem de Mello - Departamento de Farmácia - da Universidade de Brasilia;

Prof(a). Dr(a). João Paulo dos Santos Fernandes - Departamento de Ciências Farmacêuticas - da Universidade Federal de São Paulo;

O(a) Presidente Prof(a). Dr(a). Daniela Gonçales Galasse Rando, inicia a sessão dando a palavra ao(a) candidato(a), que dispõe de um período de tempo entre trinta e quarenta minutos, para expor sua dissertação. A seguir dá a palavra aos Professores para a arguição. Cada examinador(a) dispõe de trinta minutos, no máximo, para arguição, bem como o(a) candidato(a) para as respostas. Tendo o(a) candidato(a) respondido todas as arguições em tempo hábil os membros da Banca Examinadora, emitiram seus Pareceres:

Prof(a). Dr(a) Josué de Moraes	(X)APROVADO() REPROVADO
Prof(a). Dr(a) Maurício Homem de Mello	(X)APROVADO() REPROVADO
Prof(a). Dr(a) João Paulo dos Santos Fernandes	(X)APROVADO() REPROVADO
Prof(a). Dr(a) Daniela Gonçales Galasse Rando (orientadora)	(X)APROVADO() REPROVADO

Em face dos referidos pareceres, a Comissão Julgadora considera o(a) Sr(a) Ramon Martins Cogo habilitado(a) a receber o título de MESTRE EM CIÊNCIAS pela UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO. E por estarem de acordo, assinam a presente ata.

Diadema, 20 de agosto de 2021.

Sugestões e Observações: Realizar pequenas correções sugeridas pela banca.

Sell Occumento assinado eletronicamente por Daniela Gonçales Galasse Rando, Docente, em 24/08/2021, às 20:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 69, § 19, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

Documento assinado eletronicamente por Josue de Moraes, Usuário Externo, em 24/08/2021, às 23:36, conforme horário oficial de Brasília,

https://sei.unifesp.br/sei/controlador.php?acao-documento_imprimir_web&acao_origem-arvore_visualizar&id_documento=875364&intra_sistema=100000... 1/2

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, sem a iluminação do qual eu não poderia exercer este ofício científico que é o conhecer Sua criação. Da mesma forma, dedico a minha família, primeiramente minha mãe, Cristina, sem a qual nada disso seria possível, me apoiando desde o início e estando ao meu lado nos momentos difíceis o que me permitiu seguir até o fim dessa jornada. Ao meu pai, Angelo, pelo apoio que me permitiu ter menos preocupações para me dedicar a este trabalho. À minha irmã, Aline, que sempre me apoiou e foi grande influência para eu buscar a carreira científica. À Sarita, minha namorada e futura esposa, que esteve ao meu lado em todos os momentos, me apoiando, me ajudando estudar, sendo compreensiva com minha rotina de trabalho.

Dedico, também, à Daniela, minha orientadora, a quem chamo com carinho de minha mãe científica, por toda ajuda, paciência, pelos ensinamentos, pela amizade e por me ensinar não apenas a ser um cientista, mas também a crescer como ser pessoa.

AGRADECIMENTO

Agradeço a minha orientadora, Daniela Rando, que tanto me ensinou, direcionou e ajudou durante este trabalho. Aos meus colegas de laboratório pela ajuda e paciência. À agência FAPESP pelo fomento que nos permitiu adquirir uma plataforma de trabalho de modelagem molecular. Por fim, ao Carlos da EDC Tecnologia por ceder seus computadores para que pudéssemos realizar cálculos.

"Seria longo descrever o trabalho que despendi, o trabalho que nunca poupei, pois se tenho algum mérito, considero este o mais elevado: o de ser incansável trabalhador, para o qual todas as horas do dia são horas de obrigação".

(Mário Ferreira dos Santos)

RESUMO

A esqusitossomose é uma doença negligenciada que coloca cerca de 800 milhões de pessoas em risco de contágio e para a qual o tratamento se apoia em um único fármaco, o praziquantel, que já apresenta relatos de resistência em estudos in vitro e in vivo. Na busca de alternativas terapêuticas, a catepsina B1 do Schistosoma mansoni (SmCB1), cisteíno-protease abundante no estômago deste helminto, mostrou-se alvo interessante por estar intrinsecamente relacionada ao processo de digestão de nutrientes e ao desenvolvimento do parasito e, ainda, por levar à cura parasitológica em camundongos quando inibida, apesar disso, pesquisas relacionadas a inibidores ainda são insipidas. Dentre os métodos de busca de ligantes, o virtual screening (VS) tem se destacado, visto possibilitar a investigação teórica do potencial de ação de conjuntos de moléculas. O VS, ainda, associado a estudos de reposicionamento de fármacos pode levar à economia de tempo e dinheiro. Diante disso, o presente estudo teve como intuito investigar fármacos, por meio de VS, acerca de suas potencialidades como inibidores da SmCB1, empregando a biblioteca do Food and Drug Admnistration (FDA) neste estudo de reposicionamento. Concomitantemente, estudos de docking foram realizados a partir de uma série de 20 análogos sintetizados por Jílková et al. (2011) com vistas a compreender suas relações entre a estrutura química e a atividade biológica (REA). Para realizar o VS farmacóforos foram modelados automaticamente mapeando-se interações entre o cristal 50GR e o inibidor WRR-286. Estes modelos foram validados utilizando-se curva ROC ao empregar conjuntos de dados ativos e decoys, buscando AUCs superiores a 0,8. Os melhores modelos foram analisados quanto a suas características e capacidade em classificar corretamente instâncias e, então, empregados no VS. Os resultados do VS foram analisados visualmente em termos de acomodação ao sítio enzimático e os ligantes que apresentam sobreposições atômicas (Clashs) foram excluídos das análises futuras. Os melhores ligantes foram analisados quanto ao seu potencial de reposicionamento segundo dados na literatura. Dentre as moléculas selecionadas, a riboflavina (RBF) apresentou os melhores resultados de simulação, sendo a estrutura de maior frequência empregando-se diferentes farmacóforos como referência para o VS. Estudos de *docking* da RBF apresentaram alta frequência de poses coincidentes, a qual, por sua vez, mostrou-se estável em simulação de dinâmica molecular de 10 ns. Por fim, em estudos in vitro contra S. mansoni, a RBF foi capaz de levar à morte dos vermes bem como à diminuição significativa de motilidade dos parasitos, demonstrando potencial ação esquitossomicida in vitro.

Palavras-chave: Schistosoma mansoni, Catepsina B1, farmacóforo, riboflavina, virtual screening, reposicionamento de fármacos

ABSTRACT

Schistosomiasis is a neglected disease that puts about 800 million people at risk of infection, its treatment is based on a single drug, praziquantel, which has already been reported to be resistant in in vitro and in vivo studies. In the research for therapeutic alternatives, Schistosoma mansoni cathepsin B1 (SmCB1), an abundant cysteine-protease in the stomach of the helminth, proved to be an interesting target because it's intrinsically related to the process of digestion of nutrients and development of the parasite. Also, because when inhibited it leads to parasitological cure in mice. Yet research related to inhibitors is still scarce. Among the research methods for ligands, virtual screening (VS) has stood out as it enables theoretical investigation on the potential action of sets of molecules. Furthermore, VS, associated to the drug repourposing methodology, can save time and money. Therefore, the present study aimed to investigate drugs, through VS, on their potential as SmCB1 inhibitors, using the Food and Drug Administration (FDA) library on the repourposing study. Concomitantly, docking studies were carried out from a serie of 20 analogues synthesized by Jílková et al. (2011) in order to understand the relationship between chemical structure and biological activity (SAR). To perform the VS, pharmacophores were automatically modeled by mapping interactions between the 5OGR crystal and the WRR-286 inhibitor. These models were validated using the ROC curve using active data sets and decoys, seeking AUCs greater than 0.8. The best models were analyzed for their characteristics and ability to correctly classify instances and then used in VS. VS results were visually analyzed in terms of accommodation to the enzymatic site and ligands that presented clashs were excluded from further analysis. The best ligands were analyzed for their repourposing potential according to literature data. Among the selected molecules, riboflavin (RBF) showed the best simulation results, being the structure with the highest frequency using different pharmacophores as a reference for the VS. RBF docking studies showed a high frequency of coincident poses, which, in turn, was stable in a 10 ns molecular dynamics simulation. Finally, in in vitro studies against S. mansoni, RBF was able to lead worms to death as well as cause a significant decrease in parasite motility, being active as an *in vitro* as a potencial schistosomicidal agent.

Keywords: Schistosoma mansoni, cathepsin B1, pharmacophore, riboflavin, virtual screening, drug repurposing

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Distribuição global de esquistossomose em 2018. Figura adaptada de Map:
Distribution of schistosomiasis, worldwide, 2018, WHO, © 201920
Figura 2. Prevalência da esquistossomose – Brasil, 2012. Ministério da Saúde, 2014.21
Figura 3 Ciclo de vida da esquistossomose (Fonte: Centers for disease control and
prevention, CDC)
Figura 4. Estrutura química do praziquantel26
Figura 5. Domínios L e R presentes na SmCB1. Loop de oclusão em ciano30
Figura 6 Estruturas químicas dos inibidores de SmCB1 conhecidos CA074, K11777,
K11017 e WRR-286
Figura 7 Pharmacophore Queries. Imagem autoral produzida no MOE34
Figura 8. Curva ROC e AUC37
Figura 9. Subestrutura empregada no ancoramento das vinilsulfonas Template
Similarity via MOE. A. Estrutura básica; B. Pontos correspondentes aos nitrogênios e
oxigênio de referência para o posicionamento dos ligantes-teste. As cores representam
quesitos (queries) que diferenciam os átomos de acordo sua tipagem e números e tipos de
ligações que realiza em relação a estrutura completa. Essa diferenciação atômica é utilizada
no ancoramente de modo que as estruturas ancoradas que possuam características similares se
sobreponham
Figura 10. Poses obtidas para as 15 vinilsulfonas, mais o WRR-286, por meio do
docking covalente
Figura 11. Exemplo de curva pIC50 versus Pontuação de Ajuste obtida com uma dada
Score Function que permite a extrapolação dos dados de compostos de atividade
desconhecida54
Figura 12. Sítio catalítico e esquema de ataque da SmCB1 às vinilsulfonas (autoria
própria)
Figura 13. Esquema de derivação dos ligantes vinilsulfônicos. A partir de peptídeos
inibidores da SmCB1, Jilkova et al. derivou série de ligantes vinilsulfônicos com substituintes
R1', R1, R2 e R3 que potencialmente interagisse com os sítios S1', S1, S2 e S3,
respectivamente, da enzima. Favor ver arquivo "Apêndice A" para acompanhar substituições
nestas posições. Grupos de "capping" são os grupos protetores dos terminais N e C do
peptídeo

Figura 26. Riboflavina (RBF) em azul, com colchetes indicando os grupos que a compões; cofatores derivados, flavina mononucleotídeo (FMN) em verde, e flavina dinucleotídeo (FAD) em amarelo, indicando qual grupo é adicionado à RBF para compô-los.

Figura 27 Análise da trajetória de dinâmica molecular113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Scaffold dos análogos das vinilsulfonas. Adaptado de Jilkova et al32
Tabela 2 Matriz de confusão36
Tabela 3 Valores de pontuação máximos obtidos com cada uma das Score Functions
empregadas nos estudos de Redocking molecular54
Tabela 4 Média de Pontuação obtida pelo London dG Scoring 55
Tabela 5 Plot Interações 2D e energia das interações realizadas entre o WRR-286 e
50GR
Tabela 6 Pontos de interação para montagem dos farmacóforos manuais68
Tabela 7 Farmacóforos construídos manualmente, contendo 3 características69
Tabela 8 Farmacóforo construído manualmente, contendo 4 características70
Tabela 9. Matriz de confusão e curva ROC com AUC 0.8 por busca conformacional
Fast
Tabela 10. Matriz de confusão e curvas ROC da validação com volume de exclusão
em 4,5 Å e máximo de seis características83
Tabela 11. Ligante de referência WRR-28684
Tabela 12. Farmacóforos84
Tabela 13. Características farmacofóricas
Tabela 14. Aminoácidos e águas correspondentes às interações das características
farmacofóricas
Tabela 15 Sobreposição 50GR X 4I0792
Tabela 16. Resultados do VS94
Tabela 17. Estados de Protonação e Tautoméricos da RBF resultantes do VS104
Tabela 18. Poses das RBF encontradas nos farmacóforos VS104
Tabela 19. Histogramas de Interações da RBF e de suas diferentes poses no VS108
Tabela 20. Resultados de docking RBF110
Tabela 21 Conformações de menor energia da RBF e suas interações com o sítio115
Tabela 22 Resultados <i>in vitro</i> 117

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
	2.1 DOENÇAS NEGLIGENCIADAS	19
	2.2 Epidemiologia	
	2.3 CICLO BIOLÓGICO DO S. MANSONI	22
	2.4 FASES DA DOENÇA	23
	2.4.1 Fase aguda	23
	2.4.1.1 Dermatite cercariana	23
	2.4.1.2 Esquistossomose Aguda	23
	2.4.1.3 Infecção Ativa estabelecida	23
	2.4.2 Fase crônica	24
	2.5 FISIOPATOLOGIA	
	2.6 QUIMIOTERAPIA	
	2.7 DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS	
	2.8 ALVO MACROMOLECULAR CATEPSINA B1	
	2.9 Explorando Farmacóforos	
	2.10 Bases de dados em estudos de VS	
	2.10.1 Curva ROC e AUC	
	2.11 REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS	
3	OBJETIVOS	
4	MATERIAL E MÉTODOS	40
	4.1 SOFTWARES EMPREGADOS	40
	4.2 PREPARAÇÃO DA PROTEÍNA E DOS LIGANTES	40
	4.3 PREPARAÇÃO DAS BIBLIOTECAS	41
	4.3.1 FDA	41
	4.3.2 Binding DB	
	4.4 ESTUDOS DE DOCKING MOLECULAR	
	4.4.1 Redocking por substrutura	
	4.4.2 Redocking Covalente	44
	4.4.3 Redocking GOLD	

4.5	MODELAGEM DOS FARMACÓFOROS SEGUNDO STRUCTURE-BASEI	DRUG
DISCOVERY	45	
4.	.5.1 MOE	
4.	.5.2 Discovery Studio (BIOVIA)	
4.6	Gaussian	46
4.7	DINÂMICA MOLECULAR	46
4.8	ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	47
5 R	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
6 C	CONCLUSÕES	121
8 P	PERPECTIVAS	
9 R	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
10 A	APÊNDICE A	131
11 A	APÊNDICE B	138
11.1	I Farmacóforo 01	
11.2	2 Farmacóforo 05	141
11.3	3 Farmacóforo 08	146
11.4	4 Farmacóforo 09	
11.5	5 Farmacóforo 10	

1 INTRODUÇÃO

As doenças negligenciadas (DNs) abrangem um grupo de doenças infecciosas e parasitárias comuns, mas não exclusivas, de regiões periféricas e com baixo ou nenhum saneamento básico o que, em certos casos, agrava as chances de exposição aos agentes etiológicos dessas doenças. As DNs deixam cerca três bilhões de pessoas em situação de risco e mais de um bilhão são afetadas. (MITRA; MAWSON, 2017)

A nível global, o número de infectados por esquistossomose é mais que o dobro dos atingidos por doença de Chagas e Dengue em conjunto, no entanto, observa-se que o investimento público-privado para o tratamento de helmintíases é muito mais singelo em contraste aos realizados na busca de terapias para doenças decorrentes de cinetoplastídeos (*e.g.* tripanossomíases e leishmanioses) e dengue sendo, no máximo, a metade deste valor. Considerando-se que já, para estas últimas, o valor investido está bem aquém do efetivamente necessário para se lançar um novo fármaco no mercado ou até mesmo para instalar medidas de controle, pode-se concluir o quão negligenciada encontra-se a esquistossomose. (CHOFFNES; RELMAN; MICROBIAL, 2011)

Em complemento, sabe-se que as indústrias farmacêuticas não demonstram interesse em buscar compostos bioativos para o tratamento dessas doenças, visto que o investimento necessário em pesquisas para a investigação de um fármaco não teria o retorno financeiro suficiente para cobrir os gastos do desenvolvimento. (HOUWELING *et al.*, 2016)

No cenário da esquistossomose, há que se considerar, ainda, o uso exclusivo de um único fármaco no tratamento e controle clínico da helmintíase. O praziquantel, apesar de seguro, é ineficaz contra a fase juvenil do parasita. A situação, contudo, é preocupante quando se considera que estudos *in vitro* e *in vivo* revelam a existência de cepas resistentes a este fármaco. Agravante ainda, é o fato, de que com o uso constante e até mesmo profilático do praziquantel, assume-se o risco de que tais cepas tornar-se-ão, com o tempo, as únicas remanescentes. (ABOU-EL-NAGA, 2020; DOENHOFF et al., 2002; QI; CUI, 2013)

Dado o baixo investimento em doenças negligenciadas e, no caso da esquistossomose, a necessidade premente de alternativas farmacológicas para tratar a doença, é crucial buscar por métodos rápidos e baratos de investigação de fármacos. Entre esses métodos estão as ferramentas de desenvolvimento de fármacos assistidas por computador, com as quais podemos acelerar o processo de triagem de moléculas e chegar rapidamente a compostos com chances de se tornar fármacos. Uma das ferramentas úteis para isso é o *Virtual Screening* (VS) que consiste na triagem virtual de compostos listados na literatura e/ou da estrutura conhecida de um alvo farmacológico com o objetivo de buscar novos potenciais fármacos que atuem sobre este alvo.

Associada ao VS a abordagem de reposicionamento de fármacos pode tornar o processo ainda mais eficiente e acelerado, pois os compostos investigados compreendem fármacos comercialmente disponíveis. Ao se comprovar uma aplicação secundária em potencial para algum fármaco, este pode ser rapidamente disponibilizado à população visto as suas características farmacocinéticas e toxicológicas serem conhecidas. Desta forma acelerase o desenvolvimento na mesma medida em que os gastos são reduzidos no processo de investigação de um novo fármaco para o tratamento de DN. (CHENG *et al.*, 2012; MA; CHAN; LEUNG, 2013)

No caso da esquistossomose, visto a problemática em torno do praziquantel, é importante que busquemos fármacos com mecanismos de ação diferentes, evitando-se processos de seleção de cepas resistentes ou de desenvolvimento de resistência cruzada.

Frente a este cenário, um dos alvos poucos explorados para a busca de fármacos contra *S. mansoni* é a catepsina B, presente tanto em seu tegumento (*Sm*CB2) quanto em seu estômago (*Sm*CB1). As catepsinas tegumentais estão sendo estudadas com vistas ao desenvolvimento de vacinas (NELWAN, 2019), porém, as estomacais são menos exploradas e Jilkova *et al.* já demonstraram que é possível curar a parasitose pela inibição dessa enzima. (CORRENTI; BRINDLEY; PEARCE, 2005)

A *Sm*CB1 é muito mais expressiva em abundância que a *Sm*CB2, sendo responsável pela nutrição do parasito, de forma que, quando inibida cessa-se o desenvolvimento do verme por inanição. Além disso, Jílková *et al.* sintetizaram 20 vinilsulfonas análogas bem como obtiveram diferentes estruturas cristalográficas da enzima complexada à três destes compostos. (JÍLKOVÁ et al., 2011)

Fonseca *et al.* também sintetizaram compostos tiossemicarbazídicos que apresentaram ação inibitória contra a *Sm*CB1. Este estudo apenas focado em triagem, contudo, não forneceu qualquer informação cristalográfica ou sobre o mecanismo de ação para que se compreenda as interações entre a enzima e esses ligantes. (FONSECA *et al.*, 2015)

Apesar de ambas as séries de inibidores da *Sm*CB1 supracitadas serem relativamente pequenas, esse conjunto pode ser utilizado para a investigação de potenciais ligantes bioativos. Neste trabalho, exploramos estas duas bibliotecas de compostos para estabelecer e validar modelos farmacofóricos a partir dos quais fosse possível realizar triagens virtuais de novos potenciais fármacos esquistossomicidas.

Mais especificamente, a base virtual de compostos testada engloba fármacos já presentes no mercado nacional e internacional, com vistas ao reposicionamento de fármacos, e assim, objetivando a aceleração do processo de introdução de novas terapias anti-helmínticas.

Vale destacar que, por meio dos resultados aqui pretendidos, não só fármacos podem ser reposicionados, mas também poder-se-ia aplicar suas estruturas químicas no processo de otimização molecular para produção de análogos ainda mais adequados para a terapia antiparasitária.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Doenças negligenciadas

As DNs são doenças infecciosas e parasitárias caracterizadas por afetar países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, embora não exclusivas de tais locais, e que atingem, em geral, as classes sociais menos favorecidas, nas regiões periféricas desses países. Embora acometam mais de um bilhão de pessoas no mundo, não há pesquisas neste setor por parte das grandes indústrias farmacêuticas, já que o investimento necessário para o desenvolvimento de fármacos seria maior do que o retorno financeiro resultante da venda para as populações atingidas. (HOUWELING et al., 2016) O Brasil encontra-se entre os países em desenvolvimento acometidos por uma variedade de doenças classificadas como negligenciadas, dentre as quais, é de interesse do Grupo de Pesquisas Químico-Farmacêuticas da UNIFESP, o GPQFfesp, a esquistossomose.

2.2 Epidemiologia

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) a esquistossomose é uma DN que ocorre em áreas tropicais e subtropicais do globo. Sabe-se que é responsável por 280.000 a 500.000 mortes anuais, cerca de 800 milhões de pessoas em situação de risco e mais de 250 milhões de infectados por *Schistosoma spp*. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018) O *S. haematobium* é a espécie mais comum, sendo encontrada em 54 países da África subsaariana e do Oriente Médio, além do relato de sua presença na Córsega, em 2013, manifestada por meio de um surto de esquistossomose urogenital.

A segunda espécie de importância epidemiológica é o *S. mansoni*, endêmico na África sub-Saariana, no Brasil, nas ilhas do Caribe, em Porto Rico, Suriname e na Venezuela. Já o *S. japonicum* predomina na China e nas Filipinas, com alguns poucos focos conhecidos na Indonésia. Esta espécie costumava ser endêmica no Japão, porém, foi considerada eliminada nos anos de 1970 devido às medidas de controle extensivamente empregadas. Por fim, as espécies remanescentes, *S. guineesis* e *S. intercalatum*, têm baixa prevalência global e são endêmicos no oeste africano e na África Central. O *S. mengoki* se restringe a região sul do Cambodja. (MCMANUS *et al.*, 2018)

A falta de saneamento básico, de água limpa e frente à pouca higiene junto a atividades envolvendo o uso de água, seja para uso recreacional, doméstico ou profissional, coloca crianças, adolescentes e adultos em risco de infecção quando expostos a corpos hídricos contaminados, e, no caso de exposição, se não tratada, a esquistossomose resulta em considerável morbidade e mesmo mortalidade.



Figura 1 Distribuição global de esquistossomose em 2018. Figura adaptada de Map: Distribution of schistosomiasis, worldwide, 2018, WHO, © 2019

Em 2016 a associação *Global Burden of Disease Studies*, apontou que a carga global desta helmintíase estaria estimada em 1.9 milhões anos de vida ajustados pela incapacidade (DALYs — *disability adjusted life years*) e em 2018 esse número foi estimado em 3.3 milhões de DALYs. Estudos anteriores, no entanto, estimaram um valor entre 1.7-4.5 milhões de DALY, enquanto meta análise sugeriu um valor sete vezes maior. (KING; DICKMAN; TISCH, 2005) Essas estimativas elevadas podem ser explicadas pela inclusão, na análise, de aspectos que decorrem do quadro de esquistossomose mas que, geralmente, não são contabilizados nas análises, como por exemplo, a subnutrição, a anemia e o impacto sobre o desenvolvimento infantil (*growth faltering*). (MCMANUS *et al.*, 2018; NELWAN, 2019) A imensa variabilidade das estimativas, ainda, reflete quão pouco uniformizado são os estudos epidemiológicos relacionados à doença e, este aspecto, em si, reflete à negligência por parte de órgãos internacionais relacionados à preservação e saúde das populações.

Historicamente, o *S. mansoni* chegou ao Brasil com os escravos africanos trazidos pelos colonizadores portugueses e é a única espécie relevante à saúde pública brasileira. (KATZ; LMEIDA, 2003) Estima-se que esta parasitose atinja mais de 10 milhões de indivíduos no Brasil, onde áreas endêmicas e de foco abarcam 19 estados. Entre 1990 e 2010

contabilizou-se uma média de 1567 hospitalizações e 527 mortes anuais. Estes números, contudo, podem estar subestimados, visto que muito acometidos da helmintíase nem ao menos procuram os serviços de saúde. Ainda, nacionalmente, a prevalência média nesse período foi de 8%, porém, não há homogeneidade na distribuição espacial da esquistossomose nas áreas endêmicas. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019), (GOMES CASAVECHIA *et al.*, 2018)

Figura 2. Prevalência da esquistossomose - Brasil, 2012. Ministério da Saúde, 2014.



Apesar de suas mortalidade e prevalência relativamente baixas, a esquistossomose, quando comparada a outras doenças que acometem o país, revela a necessidade em aprender com as lições de outras doenças consideradas de pouco impacto e que, nos últimos anos, reapareceram com força atingindo parcela significativa da sociedade brasileira, como é o caso da Chicungunha, do Zica vírus e do vírus da febre Amarela. (DE OLIVEIRA, 2018; LIMA-CAMARA, 2016) Considerar doenças de pouco impacto social como exterminadas ou descuidar das mesmas pode levar à quadros de ressurgimento potencializados.

No caso da esquistossomose, há, ainda, que se considerar o agravante de que, para esta, apenas um fármaco totalmente eficaz está disponível, o que, como veremos, pode ser importante fator de risco para as populações mundiais, particularmente quando se trata de doença causada por parasitos capazes de desenvolver mutações que levem à resistência medicamentosa.

2.3 Ciclo biológico do S. mansoni

O *S. mansoni* possui um ciclo de vida indireto, chamado digenético ou heteróxeno, em oposição aos ciclos de vida direto ou monóxeno que necessitam apenas de um hospedeiro. Assim, o ciclo heteróxeno realiza-se mediante a passagem por dois hospedeiros, um hospedeiro intermediário e outro definitivo.

O ciclo, partindo da eclosão dos ovos e consequente infecção do caramujo Biomphalaria spp., hospedeiro intermediário, e termina e reinicia-se no homem, hospedeiro definitivo, com a maturação dos vermes adultos. No hospedeiro definitivo 0 helminto diferencia-se macho е fêmea em habitando as veias mesentéricas, onde copulam e liberam ovos. Tais ovos, por apresentarem espícula, atravessam os tecidos intestinal e endotelial, lesando-os neste processo, e podendo deslocar-se



Figura 3 Ciclo de vida da esquistossomose (Fonte: Centers for disease control and prevention, CDC)

para o intestino grosso, veia porta ou para o fígado. Se permanecerem no intestino, os ovos são liberados com as fezes.

Em situações sanitárias precárias, as fezes podem ser levadas para a água de riachos e lagoas, seja por maus hábitos de higiene dos afetados, seja por falta de sistema de esgoto adequado.

Nestes cursos d'água e sob o estímulo da luz solar e temperatura do ambiente aquático, esses ovos eclodem, liberando larvas denominadas miracídios as quais, por sua vez, possuem capacidade de infectar o hospedeiro intermediário (Caramujo, *B. glabrata*) no qual se diferenciará em cercarias.

As cercárias são liberadas na água, após semanas de infecção do caramujo, para infecção, pela pele, de novo hospedeiro humano. (JORDAN, PETER, WEBBE, 1969)[,](HAAS; HAEBERLEIN, 2009)[,](CURWEN; WILSON, 2003)

2.4 Fases da doença

2.4.1 Fase aguda

2.4.1.1 Dermatite cercariana

Este quadro clínico, é caracterizado por erupção papular acompanhada de eritema, de edema e de prurido, no local da invasão pela cercária, podendo durar até 5 dias após a infecção. Para penetrar na pele, a larva lança mão de elastases para romper as barreiras dérmicas podendo passar, ainda, pelos folículos pilosos e poros. Nessa passagem algumas larvas morrem, porém, outras tem sucesso atingindo a circulação sanguínea ou por meio dos vasos arteriais ou linfáticos de onde são levadas ao figado para maturação.

Este quadro clínico, se dá em razão de uma primeira infecção pela helmintíase, sendo mais comum em nadadores e viajantes que entram em contato com a águas contaminadas de áreas endêmicas. Contudo, em moradores de regiões endêmicas há a possibilidade de reinfecção num mesmo indivíduo, ocasionando resposta imune mais intensa. Assim, a dermatite cercariana é uma resposta imune inata na pele em reação às cercarias mortas, causando hipersensibilidade e prurido maculopapular, e está relacionada a primeira infecção. A primeira infecção costuma ser mais branda que as posteriores, visto que, uma vez o indivíduo sensibilizado ao agente, a resposta imune não é só mais rápida, mas também mais intensa. (MCMANUS *et al.*, 2018)

2.4.1.2 Esquistossomose Aguda

A fase aguda sintomática da doença, também conhecida como febre de Katayama, ocorre quando a penetração cercariana tem sucesso e progride, então, para a maturação do esquistossômulo. Esta fase ocorre de duas semanas a três meses após a exposição, em indivíduos infectados pela primeira vez. Os sintomas dessa fase da doença ocorrem devido à maturação dos esquistossômulos e à deposição de ovos e, geralmente, são acompanhados de eosinofilia e infiltrados pulmonares transitórios. Em regiões endêmicas da doença essa fase raramente é observada, fenômeno explicado pela sensibilização intrauterina em mães infectadas ou por reiteradas infecções cercarianas, o que leva a uma resposta imune regulatória. (MCMANUS *et al.*, 2018)

2.4.1.3 Infecção Ativa estabelecida

Este estágio da fase aguda é mais frequente em regiões endêmicas visto afetar indivíduos já sensibilizados devido a reiteras infecções cercarianas, desse modo sintomas como dermatite cercariana e febre da Katayama, relacionados a primeiras infecções, não são comumente observados. A infecção torna-se propriamente ativa, portanto, quando há maturação dos vermes adultos e uma deposição de ovos bem estabelecida. Assim, devido à presença dos vermes adultos, essa fase é caracterizada pela excreção de ovos nas fezes e urina do paciente.

Os sintomas nesse estágio, porém, não estão relacionados aos vermes, pois devido a sua capacidade de se camuflar contra o sistema imunológico acabam por não desencadear respostas inflamatórias ou imunológicas. Isso ocorre em razão da superfície do tegumento funcionar como uma barreira ao adsorver uma variedade de proteínas do hospedeiro (antígenos eritrocitários, imunoglobulinas, MHC – classe 1 etc) produzindo, assim, um tipo de camuflagem contra nosso sistema imunológico. (LENZI *et al.*, 2008)

Por outro lado, os sintomas observáveis neste estágio da parasitose são causados pela resposta inflamatória **à presença de ovos** no organismo e da secreção de antígenos solúveis (SEA — *soluble egg antigen*) pelos ovos. Tais antígenos são glicoproteínas cuja função é facilitar a passagem dos ovos das veias mesentéricas, onde são ovipostos, ao lúmen intestinal ou bexiga, de forma a promover a transmissão e perpetuação da espécie. Além disso, esses antígenos induzem à formação de granulomas em torno dos ovos que ficam presos no epitélio intestinal ao tentar realizar essa passagem a partir das veias mesentéricas até ao lúmen intestinal, o que leva ao acúmulo de células inflamatórias em torno dos ovos, a saber, eosinófilos, neutrófilos, macrófagos e linfócitos. (MCMANUS *et al.*, 2018)

Este estágio onde a infecção ativa torna-se estabelecida é característica de crianças e pode ser revertida através do tratamento adequado e eliminação dos vermes adultos. Por outro lado, se não tratada, a resposta imunológica passa a regredir na medida em que a doença atinge a fase crônica.

2.4.2 Fase crônica

A longo prazo, nas áreas endêmicas, as pessoas passam a ter uma diminuição da carga parasitária ao adquirir uma resposta imune parcial. Esta mesma resposta pode levar os vermes maduros à morte por causas naturais após a perda da capacidade de deposição de ovos. Assim, com um número cada vez menor de vermes infecciosos e, consequentemente, da deposição de ovos, a doença regride por si própria.

Novos grânulos tendem a ser menores e menos inflamatórios por consequência de uma regulação imunológica negativa. Os granulomas precedentes tendem a resolver-se e desaparecer na medida em que os ovos que circundam são destruídos, esses granulomas são

então substituídos por tecido fibroso, formando cicatrizes, o que contribui para a redução da severidade dos sintomas. (MCMANUS *et al.*, 2018) Por outro lado, estas pequenas cicatrizes podem interferir com o funcionamento e morfologia dos tecidos afetados, levando a alterações de funções ou morfológicas significativas com o passar do tempo.

Esta involução da patologia, assim, pode ocorrer naturalmente após sucessivas reinfecções que "treinariam" o organismo a responder ao helminto. Todavia, aguardar tais reinfecções não é uma abordagem sanitária aceitável. Mais inteligente, contudo, seria mimetizar este farmacologicamente, ou seja, por meio de compostos bioativos que sejam capazes de diminuir significativamente a postura de ovos, diminuindo a resposta inflamatória e levando os vermes adultos remanescentes à sua morte natural, sem descendentes para dar continuidade à helmintose.

2.5 Fisiopatologia

Os vermes adultos de *S. mansoni* e de *S. haematobium* vivem nas veias mesentéricas e levam à esquistossomose intestinal. Apesar de os sintomas não estarem relacionados aos vermes, estão diretamente atrelados a seus ovos que induzem, como visto, inflamação granulomatosa. Sangramento superficial, decorrente de micro ulcerações, é frequentemente observado e a formação de pseudopólipos pode ser esperada quando, num ciclo de reiteradas ulcerações, o processo inflamatório leva à formação de projeções teciduais. (MCMANUS *et al.*, 2018)

No caso específico do *S. mansoni*, este é carregado para o figado por meio do sangue venoso, ficando preso nos tecidos pré-sinusoidal e periportal após sua passagem pela veia porta hepática. Durante a fase-hepática ocorre a maturação do esquistossômulo nos vasos intra-hepáticos e a cópula dos vermes juvenis e adultos (o desenvolvimento é assíncrono), levando à oviposição no figado. Os ovos são, posteriormente, carregados às veias mesentéricas e baço. Essa deposição de ovos no figado induz resposta inflamatória e formação de granulomas, geralmente no lobo hepático esquerdo.

Quando a infecção ativa é muito intensa a formação dos granulomas é elevada levando ao aumento do figado e do baço, quadro conhecido como hepatoesplenomegalia Este é o sintoma clínico mais característico da fase aguda da doença, mas pode regredir quando a doença atinge a fase crônica.

Uma resposta granulomatosa muito intensa, contudo, pode levar à fibrose do tecido periportal (fibrose de Symmers), havendo deposição de colágeno na veia porta-hepática e oclusão dos vasos intra-hepáticos ramificados a partir da veia porta. Esta condição por si é, frequentemente, irreversível. (LENZI *et al.*, 2008; MCMANUS *et al.*, 2018)

2.6 Quimioterapia

Atualmente o único fármaco disponível no mercado e recomendado pela Organização

Mundial da Saúde para tratamento dessa parasitose é o praziquantel (PZQ) (CIOLI *et al.*, 2014). Esta pirazinoisoquinolina tem sido utilizada nos últimos 30 anos e é administrada em dose única de 600 mg, sendo eficaz contra todas as espécies de *Schistosoma spp* e apresentando perfil de toxicidade mínimo.

Apesar deste perfil farmacológico adequado, o praziquantel é ineficaz contra as formas juvenis do parasito. Outro problema associado é o programa de



Figura 4. Estrutura química do praziquantel.

administração em massa em países afetados como forma de prevenção da doença (OLVEDA; MCMANUS; ROSS, 2016). Esta prática pode ser perigosa pois, em estudos *in vitro* e *in vivo*, o verme demonstra a capacidade de apresentar indivíduos resistentes que, ao serem expostos de forma inadequada ao fármaco (FALLON; DOENHOFF, 1994), podem ser selecionados. Além disso, caso cepas resistentes ocorram em seres humanos ou em caramujos, ao longo do tempo esta poderá ser selecionada acaso a terapia farmacológica continue exclusivamente baseada no praziquantel. (ABOU-EL-NAGA, 2020; QI; CUI, 2013) Um caso de vermes tolerantes ao PZQ já foi observado em humanos em vilas no Senegal e no Egito. Doenhoff *et al.* (2002) isolaram vermes de indivíduos tratados com PZQ mas que não foram curados da parasitose e puderam observar que para levar a mortalidade aos vermes *in vitro* foi necessária uma dose cerca de cinco vezes maior do fármaco. (DOENHOFF et al., 2002) Esta inadequação de emprego associada aos recentes relatos de desenvolvimento de resistência ao seu uso, por parte de vermes adultos, são fatos que têm mobilizado a comunidade científica em buscar novas alternativas terapêuticas para tratamento desta doença. (LAGO *et al.*, 2018)

2.7 Desenvolvimento de Fármacos

O processo de desenvolvimento de novos fármacos conta com ferramentas assistidas por computador na busca de ligantes que apresentariam melhores condições de atingir o desejado *status* de fármaco. Esta abordagem é chamada de CADD – *Computer-Aided Drug Design* e é composta por uma série de metodologias desenvolvidas criteriosamente por meio de cálculos computacionais para simulação de sistemas moleculares que podem auxiliar tanto na prospecção de novos agentes potencialmente ativos, quanto na otimização dos perfis farmacodinâmico (ação), farmacocinético (ADME – Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção) e toxicológico de compostos já reconhecidamente bioativos. (LAVECCHIA; GIOVANNI, 2013)

Segundo Voet *et al.* (2014) quatro diferentes situações iniciais podem ser enfrentadas pelo pesquisador ao iniciar a prospecção por novos ligantes bioativos em estudos farmacofóricos, não obstante, essas situações também valem para os métodos de CADD em geral:

- 1) tanto a estrutura do alvo quanto a dos ligantes são desconhecidas;
- 2) a estrutura da proteína é desconhecida, porém, conhece-se a estrutura dos ligantes;
- 3) tanto a estrutura da proteína como do ligante são conhecidos;
- 4) somente a estrutura da proteína é conhecida.

No primeiro caso é impossível que se consiga trabalhar com CADD devido à escassez de dados, bem como devido ao fato de não se ter sequer uma molécula para fazer uso de sua estrutura e nem a estrutura de um alvo a partir do qual os sítios de ligação ou alostérico poderia ser estudado. Neste caso seriam imprescindíveis ensaios experimentais iniciais, como, por exemplo, ensaios enzimáticos com suficiente variedade de análogos que abrangessem um território químico amplo o bastante para que se possa chegar a pelo menos uma molécula cuja estrutura tenha atividade no alvo. A partir destes resultados, então, estar-se-ia na segunda situação possível, onde a partir da informação estrutural de ligantes conhecidos associada a informações de potencialidade biológica pode-se iniciar a busca de outros compostos que possuam atividade semelhante.

O terceiro cenário potencial na busca de novos agentes bioativos envolve informações sobre a estrutura cristalográfica do alvo potencial obtida em presença de um ligante conhecido e permite a observação direta das interações estabelecidas, a construção de modelos farmacofóricos e, a partir destes, a triagem de novas moléculas com potencial de interação similar.

Por fim, quando somente a estrutura do alvo é conhecida, ou seja, nenhuma informação sobre ligantes encontra-se disponível, a abordagem de estudo de novos bioativos reside em estudar os domínios e sítios do alvo associando-se, a estes, o conhecimento de mecanismos de reconhecimento de ligantes endógenos ou de substratos, quando no caso de

enzimas, da própria macromolécula ou de macromoléculas da família do alvo em estudo, para que, a partir de um conjunto de informações diversas seja possível construir modelos teóricos de interação para direcionar estudos de triagem ou de desenvolvimento. Obviamente, as abordagens que partem de um conjunto mais restrito de informações são as que envolvem o maior risco de erros durante os estudos de simulação computacional e, por esta razão, as que requerem mais atenção, critério e validação experimental, em sequência aos resultados obtidos por meio destas. (VOET *et al.*, 2014)

Dentre as metodologias de CADD encontra-se o VS. (LAVECCHIA; GIOVANNI, 2013) Esta técnica envolve o uso de computadores para triar, teoricamente, bibliotecas de compostos químicos com vistas a encontrar potenciais ligantes para um dado alvo macromolecular. Para tanto, é condição fundamental para estes estudos ou o conhecimento da estrutura molecular do alvo ou o conhecimento de uma série de ligantes análogos que sejam comprovados moduladores deste alvo (por exemplo, inibidores experimentalmente validados).

É uma metodologia vantajosa uma vez que bibliotecas de milhares de estruturas químicas podem ser triadas para selecionar não somente ligantes com maior potencial de interação com o alvo, mas também a seleção de tais ligantes mediante aplicação de critérios de qualidade farmacocinética e toxicológica. Em outras palavras, permitem não somente escolher os melhores ligantes do ponto de vista de interação com o alvo, como também selecionar somente os que teriam maior potencial de absorção via oral, boa distribuição, metabolismo e excreção adequados e, por fim, toxicidade dentro dos limites de segurança para uso humano. (LIONTA *et al.*, 2014) Economiza-se, assim, tempo e dinheiro em termos de obtenção sintética de novos bioativos de forma a focar a síntese somente em moléculas que atenderiam a um perfil farmacológico pré-determinado.

É necessário, como mencionado, o conhecimento ou de uma série de ligantes experimentalmente validados do mesmo ou da estrutura química do alvo macromolecular. (LAVECCHIA; GIOVANNI, 2013)

No primeiro caso, a abordagem é conhecida como *Ligand-Based Virtual Screening* (LBVS), por meio da qual um conjunto de ligantes estruturalmente análogos é comparado em termos de relações entre suas características químicas e das atividades biológicas que apresentam, a partir dessas relações são construídos modelos que descrevam quais as características estruturais importantes para a ação. O melhor modelo estatístico é, então, empregado na varredura de bibliotecas na busca de novos ligantes que satisfaçam as características descritas no modelo. (RIPPHAUSEN; NISIUS; BAJORATH, 2011)

Já no segundo caso, a abordagem de VS é chamada de *Structure-Based Virtual Screening* (SBVS) e necessita não só do conhecimento da estrutura química do alvo macromolecular com o qual se deseja interferir, mas também do conhecimento sobre a natureza e composição do(s) sítio(s) de reconhecimento de moléculas deste alvo, como sítios catalíticos, de reconhecimento de substrato ou ligantes endógenos ou sítios de modulação alostérica. (LIONTA *et al.*, 2014)[•](MA; CHAN; LEUNG, 2013)

No caso da esquistossomose, poucos são os relatos de séries completas e adequadas de compostos que apresentam atividade esquistossomicida relevante. Por outro lado, nos últimos anos, alguns alvos macromoleculares têm sido estudados e validados, bem como descritos estruturalmente por meio de estudos de cristalografía de raios-X.

Uma vez conhecido o alvo, a metodologia de SBVS pode ser aplicada, visto que modelos farmacofóricos podem ser derivados desta estrutura. Se este alvo, tiver sido elucidado na presença de uma molécula de interação, o cenário é ainda mais propício ao desenvolvimento desta metodologia.

Dentre os alvos macromoleculares do *S. mansoni* cuja estrutura química já foi elucidada na presença de um ligante conhecido, está a catepsina B1, que apesar de validada enquanto alvo terapêutico (ABDULLA *et al.*, 2007) está entre os menos explorados em termos busca de novos fármacos. É de interesse imediato deste trabalho, explorar este alvo.

2.8 Alvo Macromolecular Catepsina B1

A catepsina B1 do *S. mansoni* (*Sm*CB1) é uma cisteíno protease que está associada à parede do estômago do *S. mansoni* e que permite que este, uma vez instalado na corrente sanguínea do indivíduo infectado, possa processar proteínas humanas, particularmente a hemoglobina, em abundância no sangue, para garantir os nutrientes essenciais para seu desenvolvimento. Várias outras proteases são expressas com a mesma função neste helminto, porém a catepsina B1 é a mais abundante. (SAJID *et al.*, 2003)

Correnti, Brindley e Pearce demonstraram que parasitos submetidos a supressão dos níveis de *Sm*CB1 por metodologia de RNA de interferência (RNAi) apresentaram pigmentação heme indicativa de digestão da hemoglobina, revelando que a enzima não é essencial para este processo e que outras enzimas também estão envolvidas em sua nutrição. Os parasitos, contudo, demonstraram significativo retardo de crescimento quando comparados ao controle, indicando que a enzima é necessária para o seu desenvolvimento normal. (CORRENTI; BRINDLEY; PEARCE, 2005)

Estudos de inibição da *Sm*CB1, em modelos murinos de infecção por *S. mansoni*, pela vinilsulfona K11777, demonstraram ser efetivos para o controle dos parasitas, levando à cura parasitológica, ou seja, eliminação dos ovos do parasita. O alvo foi confirmado pelo uso de substratos classe específicos e marcação de sítio ativo da enzima. (ABDULLA M, LIM KC,

SAJID M, MCKERROW JH, 2007)

Estruturalmente, a *Sm*CB1 é uma cisteíno-protease que apresenta tríade catalítica composta por Cys100, His270 e Asn290, disposta numa fenda formada entre os domínios L e R da enzima. A presença de um *loop* de oclusão (Figura. 5), o qual é responsável pelo fechamento do acesso ao sítio catalítico e que é característico de todas as proteases da família da papaína, também foi descrito na estrutura da *Sm*CB1. (JÍLKOVÁ et al., 2011)



Figura 5. Domínios L e R presentes na SmCB1. Loop de oclusão em ciano.

A *Sm*CB1 tem sua enzima homóloga humana, a *Hs*CB1, e o grau de identidade entre a enzima do helminto e a enzima humana não é baixo, apresentando um desvio quadrático médio de 0,87 Å para 247 carbonos alfa do esqueleto carbônico. Isto poderia implicar em dificuldade de se encontrar seletividade para ação na enzima do helminto. Jilkova *et al.*, contudo, descrevem diferenças significativas nas estruturas das duas enzimas que poderiam ser exploradas na busca desta seletividade. (JÍLKOVÁ et al., 2011)

Inibidores conhecidos de catepsina B1 são escassos na literatura. Um dos primeiros relatos foi feito por Wasilewski *et al.*, em 1996, onde o grupo empregou dois tipos de inibidores irreversíveis e específicos de cisteíno-proteases com vistas a observar o efeito sobre o processo de degradação de hemoglobina pelo esquistossomo. Constataram que o tratamento com estes inibidores diminuiu significativamente o número de vermes e de ovos produzidos, bem como a hepatomegalia nos animais infectados. Por marcar os inibidores com biotina, os autores puderam, ainda, identificar a *Sm*CB1 como o potencial alvo desses inibidores. (WASILEWSKI, MM, LIMB, KC, PHILLIPS, J., MCKERROW, 1996) Em 1997, Ruppel e Caffrey mostraram que a atividade da catepsina B1 era superior à da catepsina L de esquistossomos e, para os estudos, utilizaram um inibidor de catepsinas humanas, o CA-074. (CR; A., 1997; MURATA *et al.*, 1991)

Estudos com *Trypanosoma cruzi* mostraram, pela primeira vez, o efeito da vinilsulfona K777, hoje conhecida como K11777, como inibidor potente da cisteíno-protease deste parasito e, em 2007, Abdulla *et al.* observaram a eficácia deste mesmo inibidor no tratamento de camundongos infectados com *S. mansoni*, por meio da diminuição significativa do número de ovos e de vermes adultos após o tratamento, bem como o diminuído desenvolvimento da patologia no fígado e no pâncreas das cobaias. (BARR *et al.*, 2005)[•](ABDULLA M, LIM KC, SAJID M, MCKERROW JH, 2007) Tal vinilsulfona parece atuar por se ligar covalentemente às cisteíno-proteases e, por esta razão, é considerada inibidora irreversível destas enzimas.

A partir destes trabalhos, o grupo de Mares *et al.* publica três trabalhos em sequência, dois em 2011 e um 2013. O primeiro de 2011 descreve o *design* de inibidores peptidomiméticos para a *Sm*CB1, enquanto no segundo, de outubro de 2011, são descritos os mecanismos moleculares da ação dos inibidores de *Sm*CB1, por obtenção e análise de cocristais da enzima com três inibidores: o peptidomimético CA-074, e as vinilsulfonas K11017 e K11777 (Figura. 6). (HORN et al., 2011; JÍLKOVÁ et al., 2011) São elucidados, assim, a estrutura da enzima, de seu sítio ativo, e os modos de interação estabelecidos com a enzima pelos três inibidores. Por fim, o terceiro trabalho, de 2013, descreve estudos quânticos que explicam os mecanismos de reação das vinilsulfonas com a enzima. (FANFRLÍK *et al.*, 2013)

No artigo de outubro de 2011, ainda, os pesquisadores propõem uma série de 20 análogos (Tabela 1) que apresentam ligeiras diferenças estruturais em torno do esqueleto vinilsulfona e ensaiam os mesmos sobre a *Sm*CB1 de forma a estabelecer uma relação entre suas estruturas químicas e a atividade inibitória apresentada, porém discutem estas relações de forma bastante preliminar. (JÍLKOVÁ et al., 2011) Além dos ligantes supracitados, outros cristais foram obtidos, tanto com ligantes cocristalizados (50GR, inibidor WRR286 (Figura. 6); 50GQ, inibidor WRR391) como em forma de zimógeno intermediário (4105) e forma madura da *Sm*CB1 (4107).







Tabela 1 Scaffold dos análogos das vinilsulfonas. Adaptado de Jilkova et al.

		R3 N	N H	S R1'	
Nome do Composto	Nome do Composto Posição do substituinte Inibi ção				Inibi ção
Vinilsulfona	R3	R2	R1	R1'	IC50 (nM)
WRR-286	N-Mpip	Phe	Hph	NH-O-CH ₂ -Ph	0,61±0,05
K11017	Mu	Leu	Hph	Ph	1,71±0,13
K11002	Mu	Phe	Hph	Ph	1,73±0,21
WRR-282	N-Mpip	Phe	Hph	CH ₂ -Ph	2,02±0,10
K11777	N-Mpip	Phe	Hph	Ph	2,09±00,08
WRR-285	N-Mpip	Phe	Hph	NH-Ph	2,13±0,03
K11747	N-Mpip	Naphtyl-CH ₂	Hph	Naphtyl	2,50±0,12
AR-198048	N-Mpip	Phe-4-CH ₃	Hph	Ph	6,00±0,21
WRR-284	N-Mpip	Phe	Hph	O-Ph	7,80±0,23
AR-198049	N-Mpip	Phe-3-CF ₃	Hph	Ph	10,5±,05
WRR-145	Cbz	Phe	Ala	Ph	22,9±0,5
WRR-499	N-Mpip	His	Hph	Ph	29,5±0,4
K11006	Mu	Phe	Lys	Ph	33,2±0,3
WRR-483	N-Mpip	Arg	Hph	Ph	48.9±0.4
WRR-359	N-Mpip	R-Phe	R-Hph	O-Ph	114±2
WRR-185	Cbz	Phe	R-Ala	NH-CH(Bz)-COO-CH ₃	126±2
WRR-283	N-Mpip	Phe	Hph	O-CH ₂ -CH ₃	192±3
WRR-200	Cbz	Phe	R-Ala	NH-CH ₂ -Ph-4-C-F ₃	247±4
WRR-347	N-Mpip	Phe	Hph	O-Ph-4-O-CH ₃	747±20
WRR-453	Mu	Phe	Tyr	Ph	11849±101

Desta forma, as pesquisas para a busca de novos inibidores de SmCB1 ainda são insípidas, apresentando vários aspectos que ainda devem ser explorados e compreendidos. Encontrar novos ligantes da enzima, particularmente concentrando os esforços em estruturas de fármacos já inseridos na terapêutica, por exemplo, é um destes pontos que carecem de uma exploração mais aprofundada e, portanto, foco deste trabalho de mestrado.

R1 0 Н 0

2.9 Explorando Farmacóforos

A elucidação de farmacóforos está entre as técnicas computacionais associadas ao VS para a prospecção de novos ligantes bioativos.

O conceito original de farmacóforo data de 1900, nessa época entendia-se que certos grupos funcionais/químicos eram responsáveis pela atividade biológica, e, por conseguinte, foi pensado que as moléculas que apresentavam uma atividade similar apresentavam os mesmos grupos químicos. (EHRLICH, 1909) O termo farmacóforo só veio a ser cunhado em 1960 sendo definido como "uma estrutura molecular que carrega (*phoros*) as características essenciais responsáveis pela atividade biológica do fármaco (*pharmacon*). Assim, o conceito de farmacóforo deixou de ser associado a grupos químicos e passou a significar "padrões de caracteres abstratos".

Desde 1997 a IUPAC definiu farmacóforo como o conjunto de características estéricas e eletrônicas necessárias à atividade biológica de um alvo específico, sendo essas características responsáveis por iniciar ou bloquear a resposta biológica. (VOET *et al.*, 2014) Portanto, a noção essencial de um farmacóforo é um conjunto de características moleculares responsáveis pela atividade biológica, ou, o conteúdo mínimo de informação molecular necessária numa estrutura para que possa ser reconhecida por um alvo. (PICCIRILLO; DO AMARAL, 2018)

Com o tempo o conceito tornou-se altamente relevante no meio da química computacional como etapa essencial de várias das ferramentas assistidas por computador para investigação de fármacos. A modelagem de um farmacóforo depende de certas características moleculares como capacidade de aceitar ou doar (aceptores e doadores, respectivamente) ligação de hidrogênio, presença de regiões aniônicas, catiônicas, aromáticas e hidrofóbicas, além de todas as combinações possíveis de ângulos e distâncias que podem derivar desse conjunto, esse processo chama-se mapeamento farmacofórico. (PIRHADI; SHIRI; GHASEMI, 2013)

Voet *et al.* (2014) explica que o uso desse conjunto de características na modelagem de um farmacóforo pode ser representado de duas maneiras. A primeira destas, mais clássica, é por meio dos chamados *pharmacophore fingerprints*, ou impressões digitais farmacofóricas, onde três ou quatro elementos de interação (forças envolvidas em interações intermoleculares) são estabelecidos como importantes para o desencadeamento de uma dada ação biológica, desde que associados a determinadas distâncias e/ou ângulos (estas informações são apresentadas e armazenados em forma de *strings* binários (sequências de caracteres que

representam características de um objeto) contendo as possibilidades de informações estruturais, de forma que outros ligantes possam ser comparados a partir desse modelo.

0 método outro comumente empregado é o de representação do farmacóforo pharmacophore por query. Neste, as interações em potencial derivam de pontos específicos no sendo cada espaço, uma representada por esferas que abrangem um raio de desvio tolerável. (Figura 7) Cada esfera é representada, ainda, com raio equivalente à sua contribuição



para o comportamento dos ^{Figura 7} Pharmacophore Queries. Imagem autoral produzida no MOE. compostos representados pelo modelo, ou seja, considerando-se os coeficientes que descrevem os pesos daquela característica dentro do modelo farmacofórico. (VOET et al., 2014)

Também neste caso as distâncias e ângulos entre tais esferas são considerados, porém sob forma de coordenadas cartesianas tridimensionais associadas a cada esfera. Essa abordagem também é conhecida como proposição de farmacóforo baseado na estrutura do alvo (SBP – *Structure based pharmacophore*).

O SBP pode ser desenvolvido sob duas diferentes circunstâncias iniciais, quando se têm informações apenas sobre a estrutura macromolecular de estudo ou quando se conhece tanto o alvo quanto ligantes do mesmo.

No primeiro caso, o farmacóforo é produzido com o base nos chamados *hotspots*, aminoácidos do sítio ativo ou alostérico com maior probabilidade de interagir com um ligante. É com base no mapeamento do sítio e utilizando tais pontos de interação possíveis como referência que um farmacóforo puramente baseado na estrutura é modelado. No segundo cenário, o farmacóforo é modelado a partir de um ligante cocristalizando ao alvo, sendo que o mapeamento farmacofórico ocorre por meio de interações conhecidas entre esse alvo e o ligante associado. Dentro do SBP, ainda, características farmacofóricas estéricas e topológicas do alvo podem ser consideradas, inclusive estabelecendo "limites" para estas características. É

o caso da possibilidade de limitação de forma, conhecido como *constraint* de forma, o qual é determinado pela posição das esferas representantes de interações, considerando-se a "forma tridimensional" ou "conformação" espacial que estas assumem no interior da cavidade de reconhecimento. O SBP possibilita, ainda, que um volume de exclusão seja considerado, ou seja, permite que se limite o espaço estérico em que o ligante poderá ser acomodado, simulando a presença dos aminoácidos do sítio ativo, durante os estudos de triagem. (PIRHADI; SHIRI; GHASEMI, 2013)

2.10 Bases de dados em estudos de VS

Com vistas a servir de base para estudos teóricos, modelos farmacofóricos precisam ser previamente validados e, assim, é necessário que estes sejam capazes de discriminar, eficazmente, entre compostos ativos e inativos para uma dada atividade biológica.

Para tanto, lança-se mão de diferentes abordagens estatísticas de desafio destes modelos, dentre os quais, no caso do VS, são mais comumente empregados a análise de curvas ROC e cálculo do fator de enriquecimento. Em ambos os casos, duas bases de dados são importantes para as análises, as de compostos realmente ativos, ou seja, compostos para os quais a atividade sobre o alvo seja não somente comprovada, mas também aferida; e os compostos realmente inativos, ou seja, compostos cuja atividade biológica frente ao alvo não seja esperada e que são empregados como "sondas iscas" ou "decoys", para testar a capacidade do modelo em não os reconhecer como potenciais bioativos.

Como compostos verdadeiramente positivos, ou seja, reconhecidamente inibidores exclusivos da *Sm*CB1, temos os análogos sintetizados por Jilkova *et al.* e Fonseca *et al.*, os quais foram discutidos no item 2.8.

Muitos alvos, contudo, ainda não apresentam um número significativo de ligantes específicos conhecidos, e este é o caso da *Sm*CB1. Nestes casos, vale lançar mão de compostos inibidores ou moduladores conhecidos da classe ou família proteica da qual este alvo faz parte, neste caso, das catepsinas do subtipo B.

Neste contexto, bibliotecas virtuais como a Binding DB, PubMed e a Allosite Potential podem ser empregadas com vistas a selecionar compostos inibidores de classes proteicas. Seletividade frente à enzima específica do verme poderá ser estudada, então, apenas para os compostos selecionados e visando interações com resíduos exclusivos do alvo, por meio de estudos de docking e dinâmica molecular.

Quanto aos *decoys*, estes são grupos de compostos geralmente **supostos** como inativos, os chamados putativos inativos, em contraste com os verdadeiros positivos e negativos, validados experimentalmente, e, portanto, sabidos ativos ou inativos no alvo que está sendo avaliado. Os *decoys* são utilizados na triagem virtual como meio de validação dos farmacóforos modelados e compostos ativos encontrados na triagem por meio da curva de enriquecimento através dos cálculos estatísticos da curva ROC e AUC. (KIRCHMAIR *et al.*, 2008; RÉAU *et al.*, 2018) Há métodos reconhecidos e validados de produção de *decoys*, entre estes a *Database of Useful Decoys Enhanced* (DUD-E), onde é possível fazer uso da codificação SMILES dos compostos ativos para buscar variações estruturais em tais compostos que levariam a análogos presumivelmente inativos. (MYSINGER *et al.*, 2012)

2.10.1 Curva ROC e AUC

A curva ROC (*Receiver Operating Characteristics*) é uma técnica de avaliação de performance de modelos classificadores, a qual permite visualizar e avaliar, organizar e selecionar estes classificadores de acordo com sua capacidade de julgar uma instância dentro de um determinado grupo (p, positivo; n, negativo) por meio de um gráfico bidimensional (Figura. 8) mostrando o limiar entre verdadeiros positivos e falsos positivos. Assim, dentro de um conjunto de amostras há quatro formas de classificar uma instância dentro da matriz de confusão.

Tabela 2 Matriz de confusão

Classe	р	n
Р	Verdadeiros Positivos (TP)	Falsos Positivos (FP)
Ν	Falsos negativos (FN)	Verdadeiros negativos (TN)

Essas classificações dispostas na Tabela 2 são obtidas a partir de dois conjuntos de dados conhecidos, sendo um positivo (p) e outro negativo (n). Ambos os conjuntos são utilizados para avaliar a capacidade do modelo em classificar uma instância de acordo com conjunto de dados de que originalmente faz parte. Assim, ao classificar uma instância, o modelo atribuirá a esta uma classe seja positiva (P) ou negativa (N). Uma instância que pertence à classe P pode ter sido classificada corretamente como verdadeira positiva (TP, *true*)
positive), ou, incorretamente, como falsa positiva (FP, false positive), sendo válido para o total de negativos (N).

Algumas métricas podem ser calculadas a partir da matriz de confusão:

$$TP \ rate = \frac{TP}{P}$$
 — taxa de acerto ou sensibilidade.

$$FP \ rate = \frac{FP}{N}$$
 — taxa de alarmes falsos ou especificidade.

Essas duas métricas serão utilizadas para a construção do espaço ROC, de forma que a avaliação do modelo a partir delas dará origem à curva. Assim, a taxa de verdadeiros positivos, a TP rate, fica disposta no eixo Y do gráfico enquanto a taxa de falsos positivos, a FP rate, é disposta no eixo X. (Fig. 8) No gráfico, as instância são classificas entre 0 e 1. O ponto (0,0) nunca gera classificações positivas, enquanto o ponto (1,1)trata-se de classificar incondicionalmente as instâncias como verdadeiros positivos. Por fim, o ponto (0,1) Figura 8. Curva ROC e AUC





é uma classificação perfeita, onde não são encontrados falsos positivos. (FAWCETT, 2006)

Para avaliar um ou mais classificadores é necessário reduzir a curva ROC a uma valor escalar, a área abaixo da curva (AUC — area under the curve) (Figura. 8). Esta é uma porção da área do espaço ROC, cujos valores vão de 0 a 1, porém, como não há classificação menor do que aleatória, o menor valor possível de classificação é sempre 0,5, o tracejado divisório e que indica a área de um classificador aleatório. (FAWCETT, 2006)

Uma vez validados os modelos farmacofóricos, estes poderão, então, ser aplicados ao VS o qual, no contexto das DNs.

2.11 Reposicionamento de Fármacos

O reposicionamento de fármacos é uma metodologia racional de desenvolvimento de fármacos que se baseia na exploração de novas ações biológicas para fármacos conhecidos e amplamente utilizados na terapêutica, diferente daquela para os quais estão licenciados. (BROWN; PATEL, 2018) Ela tem como principal vantagem a significativa diminuição do tempo de desenvolvimento do fármaco e dos experimentos necessários para recolocação destes no mercado, visto que seus perfis farmacocinéticos e toxicológicos já são conhecidos, muitas vezes, por décadas.

Se, em um estudo de VS, a biblioteca de novos compostos a ser explorada consistir **exclusivamente** de compostos conhecidos da terapêutica, ou seja, fármacos comercializáveis, as chances de se encontrar compostos ligantes que possam ser rapidamente promovidos ao *status* de fármacos aumenta, bem como diminui-se o tempo necessário para se encontrar, de forma efetiva, um novo agente terapêutico. (LAURA SBARAGLINI *et al.*, 2016)[•](MA; CHAN; LEUNG, 2013)

Bibliotecas de fármacos comercialmente disponíveis são bastante comuns em bases de dados moleculares, como é o caso da *Zinc database*. Nesta é fornecida a biblioteca FDA, a qual é constituída de moléculas aprovadas pelo *Food and Drug Administration*, órgão americano de controle sanitário e que, por si só, garante uma boa cobertura dos fármacos disponíveis, visto ser esta uma das mais importantes agências de regulamentação de fármacos do mundo.

Assim, no caso da esquistossomose, uma DN para a qual a necessidade de uma nova entidade terapêutica é imediata, a associação de um estudo de VS ao de reposicionamento de fármacos, considerando uma base como a FDA da *Zinc Database* é bastante vantajosa.

3 OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo geral realizar estudo de VS em biblioteca de fármacos já existentes no mercado, tendo como alvo macromolecular a *Sm*CB1 com vistas a reposicionar potenciais fármacos que apresentem, como segunda aplicação biológica, a capacidade de inibição da referida cisteíno-protease.

Por objetivos específicos, este trabalho pretende:

- 1. Selecionar fármacos que apresentem capacidade de interagir com o sítio catalítico da *Sm*CB1;
- 2. Elencar as opções levantadas de acordo com suas classes terapêuticas atuais;
- Selecionar as melhores opções com base nos perfis farmacocinéticos e toxicológicos adequados para uso na helmintíase;
- 4. Para os fármacos mais promissores pretende-se desenvolver análise de relação entre estrutura química e atividade biológica de forma a destacar as características físico-química mais importantes para a capacidade de interação com o alvo.

Para alcançar tais objetivos, não somente as análises de VS serão realizadas, mas também análises das propriedades físico-químicas de natureza hidrofóbica, eletrônica e estérica.

Por fim, espera-se poder realizar, quando possível, estudos *in vitro* e *in vivo* de atividade esquistossomicida dos fármacos indicados pela associação entre VS e reposicionamento junto ao nosso colaborador especialista em helmintíases, Prof. Dr. Josué de Moraes, coordenador do Núcleo de Pesquisas em Doenças Negligenciadas de da Universidade de Guarulhos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Softwares empregados

Os softwares empregados no desenvolvimento deste trabalho estão listados abaixo, juntamente com sua forma de disponibilização e aquisição:

- Molecular Operating Environment (MOE) (INC, 2019) licença *trial* concedida pela empresa Chemical Computing Group Inc.
- Biovia Discovery Studio licença *trial* por 1 ano fornecida pela empresa Dassault Systémes. Em seguida, este software foi adquirido com verba FAPESP 2019/26686-2 para uso por mais 2 anos.;
- Gaussian 09W licença adquirida com verba FAPESP 2013/01875-0;
- Gaussview 5.0.1 licença adquirida com verba FAPESP 2013/01875-0;
- Maestro Molecular Viewer v. 10.5 licença *freeware* Schrodinger Inc;
- Biovia Draw v. 18.1 licença freeware Dassault Systémes;
- Mona Molecular Filtering and Visualization Tool based on Naomi licença *freeware* para academia– BioSolve it;
- Orange v. 3.26.0 licença *freeware*, University of Ljubljana;
- Marvin Sketch v. 20.11. 0, licença *freeware* para academia ChemAxon Ltd;
- OpenBabel v. 2.4.1– licença *freeware* Open Babel development team.

4.2 Preparação da Proteína e dos ligantes

A estrutura cristalográfica utilizada no presente trabalho foi a de código de entrada no Protein Data Bank (JILKOVA, A. REZACOVA, P. BRYNDA, J. MARES, 2017) 50GR com resolução 1.55 Å, correspondente à enzima Catepsina B1 do *S. mansoni* cocristalizada com o inibidor WRR-286 (URL: https://www.rcsb.org/structure/50GR). Neste cristal, o ligante apresenta-se ligado covalentemente à enzima.

A proteína foi preparada na plataforma de estudos de modelagem molecular Molecular Operating Environment (MOE), empregando-se campo de força AMBER10:EHT e Solvatação R-Field. Primeiramente, a estrutura macromolecular foi inspecionada por meio de busca por erros na proteína e incongruências estruturais, os quais foram corrigidos pelo módulo *"Structure Prepare"* do MOE. Em seguida os hidrogênio da estrutura foram adicionados considerando-se estado de protonação em pH 5.5, em conformidade com os experimentos realizados por Jilkova *et al* e a origem dessas proteases em vesículas no estômago do parasito (JÍLKOVÁ et al., 2011). A estrutura passou, então, por processo de minimização energética, com critério de convergência em 0.01 RMS kcal/mol/A² de diferença energética entre os confôrmeros gerados. Uma vez estabilizada a proteína, realizou-se a quebra manual da ligação covalente entre o carbono beta da estrutura do WRR-286 e a Cys100 da *Sm*CB1, seguida da correção da dupla ligação dentre o carbono alfa e beta na WRR-286 e da adição de hidrogênio ao grupo tiol da Cys100. (FANFRLÍK *et al.*, 2013)

Quanto as estruturas dos ligantes ativos, estes foram desenhados a partir da estrutura cristalográfica do WRR-286, no programa GaussView 5.0.1, otimizando-se as estruturas apenas nas cadeias laterais estruturalmente substituições variantes. De forma geral, a conformação do cristal foi preservada para manutenção da forma tridimensional de reconhecimento destes ligantes. No caso das estruturas derivadas do trabalho de Fonseca *et al.*, estas foram desenhadas a partir do zero, no módulo "*sketch*" do Gaussview 5.0.1. A energia dos compostos foi calculada aplicando-se conjunto de bases HF/631g* e considerando-se campo de força PM3. Estas moléculas foram, então, empregadas como arquivos de entrada para os cálculos de *docking* molecular e de estudos de validação farmacofórica.

4.3 Preparação das Bibliotecas

4.3.1 FDA

A biblioteca de compostos do FDA foi obtida da base molecular ZINC15 (URL: https://zinc.docking.org/), contendo 2100 compostos (quando do acesso em 2019). Esta foi preparada no MOE, empregando-se o módulo "*Wash*", a partir de suas estruturas tridimensionais salvas em mol2 e otimizadas pela remoção de sais, enumeração de tautômeros (num limite máximo de 100) e de diferentes espécies protonadas, considerando-se pH 5.5, e mantendo-se todos os hidrogênios explícitos. A partir das estruturas otimizadas, calculou-se a carga parcial pelo método AMBER10:EHT e solvatação R-Field, seguindo-se, então, de minimização energética com gradiente 0.001 RMS/kcal/A² e simulação curta de dinâmica molecular segundo os critérios de limite de rejeições igual a 100, o que permite especificar quantas tentativas de obter uma conformação serão realizadas antes de se finalizar o cálculo; desvio RMS como 0.005, como ajuste para finalização de cálculo quando o desvio quadrático médio ficar abaixo deste limite; limite de iterações em 100, de forma que esse seria o número máximo de tentativas realizadas para se encontrar uma nova conformação; limite de iteração MM de 10, o qual estabelece o número de passos realizados para realizar a minimização energética do confôrmero; limite de RMSD em 0.25, eliminando-se, assim, conformações

cujo valor de desvio quadrático médio for inferior a esse valor, de forma a manter apenas um representante dentro desta faixa energética; número máximo de confôrmeros obtidos em 100, de forma que a busca conformacional termina para esta entrada ao atingir o limite especificado. (BOLOGA; URSU; OPREA, 2019; FOURCHES; MURATOV; TROPSHA, 2010, 2016)

4.3.2 Binding DB

A biblioteca Biding DB foi obtida no repositório "*The Biding Database*" (URL: https://www.bindingdb.org/bind/index.jsp) (GILSON *et al.*, 2016) onde uma busca foi realizada para encontrar ligantes experimentalmente válidos de catepsinas B em geral, empregando-se, como palavra-chave, "*Cathepsin B1*". Após a busca, um total de 2116 moléculas foram obtidas e preparadas, como descrito no item 3.2.1., para compor uma base de dados do MOE.

Apenas os compostos apresentando valor de Ki mensurado frente à enzima foram considerados. Estes foram submetidos à remoção manual de duplicatas (413 entradas) a partir dos SMILES, segundo os seguintes critérios:

Deletar duplicatas quando:

- 1) As atividades forem muito dispares frente à mesma enzima (> 10 nM)
- Quando as atividades forem apresentadas para enzimas de diferentes organismos (*Homo sapiens x Bos taurus*), e não for possível discernir qual a melhor para emprego nestes estudos.
- Diferentes valores de atividade para a mesma enzima e para o mesmo composto provenientes de um mesmo estudo (avaliado pelo DOI).
- Todos os compostos com atividade apresentada em IC₅₀, visto que elegemos os valores de Ki como dados biológicos de trabalho.

Preservar quando:

- Para uma mesma molécula as atividades forem próximas (< 10 nM de diferença) de forma a considerar faixa de possível variação na atividade experimental.
- Quando as atividades forem idênticas numa mesma enzima (apenas uma das duplicatas será considerada).
- Se entre duas ou mais duplicatas, uma atividade for IC₅₀ e o outro Ki, preserva-se uma das duplicatas considerando-se somente o valor de Ki.

Em todas as etapas os ligantes foram checados quanto a sua correção estrutural e de valores de Ki medidos, para evitar perda de dados, ou erros durante a transposição dos arquivos entre os diferentes programas.

Os compostos apresentando valores de Ki menores que 100 nM foram considerados ativos, e empregados na validação dos modelos farmacofóricos como parte da base de compostos "verdadeiramente ativos", conjuntamente aos compostos de Jilkova *et al.* e de Fonseca *et al.* A preparação dos ligantes foi descrita no item 3.1.

Já para a biblioteca de *decoys*, esta foi construída tendo-se as 20 vinilsulfonas de Jilkova *et al.* como modelo, e calculada com o software *web-based* DUD-E. O uso destas vinilsulfonas como modelo garante a similaridade físico-química com vistas a evitar viés de análogo.

Esta biblioteca foi reunida aos compostos "verdadeiramente negativos", neste caso, 18 compostos de Fonseca *et al.* e os compostos que apresentaram Ki acima de 10 μ M provenientes da *Binding DB*, para formar a biblioteca de "inativos" que foi empregada para testar a qualidade dos modelos farmacofóricos.

Para a etapa de validação de farmacóforos, tanto a biblioteca de "ativos" quanto a de "inativos" foram reunidas como bases moleculares em formato .sdf e inseridas no programa Discovery Studio, para parametrização sob campo de forma MMFF e modelagem dos farmacóforos.

Em razão da aquisição da Plataforma BIOVIA Discovery Studio (DS) os estudos realizados no MOE foram descontinuados. Toda preparação da proteína e bibliotecas foi adaptada para reconhecimento pelo DS, porém os resultados obtidos anteriormente no MOE ainda foram considerados, particularmente para comparativo farmacofórico.

4.4 Estudos de docking molecular

4.4.1 Redocking por substrutura

O protocolo padrão utilizado para os estudos de *docking* foi obtido no MOE. A proteína preparada como descrito no item 4.2. foi utilizada para os estudos de reancoramento do ligante cocristalizado, considerando-se a presença de todas as águas de adsorção do cristal.

A referência ao ancoramento foram os átomos presentes no sítio de reconhecimento do ligante do cristal e um raio de 6 Å.

Para o ancoramento foram consideradas todas as ligações simples como rotacionáveis e o método de ancoramento empregado foi baseado nas informações da subestrutura de interação, no caso o ligante WRR-286 (empregando-os sítios aceptores e doadores de hidrogênio NH e C=O do ligante). Após o ancoramento principal, o programa realiza um refinamento por considerar o ajuste induzido (*Induced Fit*) considerando-se um gradiente de 0.01 kcal/mol entre as poses e empregando-se função de pontuação do tipo score London dG.

Os protocolos de reancoramento do ligante WRR-286 que resultaram em RMSD, da estrutura deste mesmo ligante cocristalizado, menores que 1 Å foram considerados adequados para os estudos de ancoramento das 20 vinilsulfonas sintetizadas por Jilkova *et al.* (2011)

Estas foram, então, ancoradas no cristal e suas pontuações *London DG* coletadas para construção de curva de calibração que permitisse validar os estudos de VS. Esta curva de calibração relacionaria Valor de Pontuação London dG versus valores de pIC₅₀ frente à enzima *Sm*CB1.

4.4.2 Redocking Covalente

Para a realização do protocolo covalente no MOE a proteína anteriormente preparada, como descrito em 4.2., foi inserida no MOE junto ao ligante WRR-286. Para orientar a direção do ancoramento, o enxofre da Cys100 foi selecionado como referência. Em seguida, o método de ancoramento covalente por reação de adição de Michael em vinilsulfonas foi selecionado, que permite a simulação de uma formação de ligação covalente entre alvo e ligante, logo após o ancoramento, uma vez conhecido os átomos envolvidos em tais reações. Por fim, foi realizado um refinamento do complexo formado, na região do sítio ativo, com critério de convergência 0.001, e o complexo teve a pontuação calculada pela função de pontuação London dG.

4.4.3 Redocking GOLD

O protocolo de re*docking* obtido no GOLD utilizou-se da 50GR anteriormente preparada, como descrito em 4.2. Após ser inserida no programa um pré-tratamento, do próprio GOLD, foi realizado de forma que hidrogênios foram adicionados e o ligante cocristalizado foi removido. Assim como nos outros protocolos todas as águas foram mantidas. Para direcionar o ancoramento no sítio ativo utilizou-se como referência o átomo de enxofre da Cys100. A área de ancoramento foi estabelecida em 10 Å e a opção de detectar a cavidade foi ativada. As funções de pontuação utilizadas no *redocking* foram ChemPLP, Goldscore, Chemscore e ASP.

4.5 Modelagem dos Farmacóforos segundo Structure-Based Drug Discovery

4.5.1 MOE

Para a modelagem dos farmacóforos no MOE foram utilizadas as interações entre o ligante WRR-286 e os aminoácidos do sítio ativo do cristal 50GR. Além disso, foram considerados os outros cristais e seus respectivos ligantes análogos cocristalizados (3S3Q, K11017; 3S3R, K11777) para averiguar os *hotspots*, assim como descrito anteriormente por Jilkova *et al.* (Gln-94, Gly-98, Gly-143, Gly-144, Gly-269, His-270, Trp-101, Trp-292). A partir dessas interações no sítio concebemos seis farmacóforos modelados levando em consideração tanto a distância como a energia de interação. Em todos os casos o **volume de exclusão** utilizado foi em um raio 0.7.

4.5.2 Discovery Studio (BIOVIA)

O complexo 50GR anteriormente preparado em 4.2. foi inserido no DS, e os farmacóforos foram obtidos a partir das interações entre ligante e receptor. O complexo foi preparado e reparametrizado no campo de força CHARMPLR, em seguida o ligante foi removido, parametrizado sob o campo de força MMFF e reinserido na plataforma para modelagem do farmacóforo. Nesta etapa, todas as águas foram mantidas durante o cálculo. O número máximo de farmacóforos modelados a partir das interações entre a 50GR e o WRR-286 foi estabelecido em 10, com um mínimo de 4 características e um máximo de 6 características por modelo. O processo de validação foi realizado após busca conformacional pelo método FAST, a partir bibliotecas de "ativos" e "inativos", descritas em 4.3, com máximo de conformações geradas em 100, limite de diferença de energia entre confôrmeros de 20 kcal/mol e método de ajuste rígido. Distância máxima de volume de exclusão foi ajustada para 4,5 Å,

A validação dos farmacóforos propostos automaticamente foi realizada pela construção de curva ROC e por análise de cálculo de "Área sob a Curva" (AUC-ROC: *Area under the Curve*). Valores acima de 0.8 para esta área, foram considerados adequados para seleção dos modelos de referência na triagem virtual.

4.6 Gaussian

As cargas parciais do análogo WRR-286 extraído do cristal 50GR foi calculado pelo método *ab initio* HF/6-31G* (Gauss 5.0.1). O potencial elestrostático foi calculado por meio de cargas do tipo ChelpG e mapeado sob a superfície de Connolly construída para este análogo. Regiões de maior densidade eletrônica e, portanto, negativas, são representadas em vermelho, enquanto as áreas de menor densidade eletrônica e, portanto, regiões de maior desproteção eletrônica são representadas em azul. O valor de densidade eletrônica foi ajustado para uma variação de -7.276e-2 eV a 7.276e-2 eV.

4.7 Dinâmica Molecular

Os estudos de dinâmica molecular foram realizados mais tardiamente neste trabalho e aplicando-se o módulo de simulação do DS e para o composto obtido como melhor hit do VS. Até o momento foi possível simular uma dinâmica curta, de 10 ns, devido à potência de cálculo das máquinas disponíveis no momento. O complexo fármaco-receptor obtido de estudos prévios de *docking* molecular foi utilizado como modelo tridimensional de entrada para o módulo de simulação de DM, submetendo-o às seguintes etapas prévias à simulação de DM propriamente dita:

- Solvatação do complexo com caixa de água de solvatação (*Explicit Periodic Bondary*) ortorrômbica com distância máxima de 7 Å das extremidades e adição de contra-íons quando necessário.
- Minimização preliminar empregando-se o Steepest Descent, com até 1000 passos ou convergência em gradiente de 1 kcal/mol.Å
- Minimização fina empregando-se algoritmo Adopted Basis Newton-Raphson (NR), com até 2000 passos ou convergência em 0,1 kcal/mol.Å.
- 4. Aquecimento do sistema por 10 ps, de 50 a 300 K, com acréscimo de temperatura a cada 50 passos tendo, cada passo, 2 fs.
- Etapa de equilibração do sistema pós-aquecimento considerando-se 50 ps à temperatura de 300K, com cada passo tendo 2 fs cada e trajetória salva na mesma frequência dos passos.

Após esta preparação o complexo foi, então, submetido à simulação de DM de 10 ns, com passos de 2 fs cada e considerando-se temperatura de 300K durante a simulação. O conjunto de ajustes (*ensemble*) NPT foi empregado durante a produção de forma a manter

número de partículas, pressão e temperatura estáveis durante a simulação. As propriedades eletrostáticas entre átomos não ligados foram calculadas considerando-se o método *Particle Mesh Ewald*. Modelo de solvente implícito não foi empregado visto o complexo ter sido inserido já solvatado.

A trajetória da simulação foi construída salvando-se a simulação a cada 2 passos e analisada por meio da verificação dos gráficos de Energia Total do Sistema versus Número de Passos (Et x P), RMSD versus Número de Passos (RMSD x P) e RMSF versus Número de Passos (RMSF x P). As poses foram avaliadas em termos de conformação de menor energia a cada 2,5 ns.

4.8 Ensaios in vitro

Os ensaios biológicos foram realizados pelo Núcleo de Pesquisa em doenças Negligenciadas (NPDN), sob coordenação do Prof. Dr. Josué de Moraes e seguiram as metodologias amplamente validadas e empregadas pelo grupo, conforme descrito nas referências MENGARDA et al., 2020; ROQUINI et al., 2019.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os estudos de VS, como visto, podem ser realizados por uma gama de possíveis abordagens metodológicas.

Em princípio, neste trabalho, propôs-se estas simulações baseando-se em um VS guiado por ancoramento molecular ou *docking* molecular. Nesta abordagem, parte-se do conhecimento da estrutura do alvo (SBVS) mas também do conhecimento de compostos com atividade inibitória reconhecida e que podem ser ancorados teoricamente no sítio catalítico deste alvo, sendo que as melhores poses obtidas são pontuadas de acordo com o ajuste destes ligantes ao sítio.

No caso do programa empregado nesta primeira abordagem, a plataforma MOE, diferentes algoritmos de ancoramento (*Placement*) e de Pontuação de Ajuste (*Score Functions*) estão disponíveis. Algoritmos de ancoramento são os cálculos matemáticos empregados pelo *software* para guiar o computador nas formas de posicionar um dado ligante a um espaço formado na estrutura do alvo, por exemplo, uma cavidade geralmente chamada de sítio ou bolso. Já os algoritmos de pontuação de ajuste são os cálculos matemáticos pelos quais o software é capaz de avaliar a qualidade do ajuste dos ancoramentos obtidos, em termos de aproximação e encaixe ao sítio, bem como em termos das energias envolvidas nas potenciais interações que se estabeleceriam entre alvo e ligante. Desta forma, esta função de pontuação avalia a relativa qualidade das poses obtidas nas simulações de ancoramento.

Para os estudos de *redocking* molecular, os quais não só ajudam a estabelecer o protocolo experimental a ser empregado, como também permitem a validação dos resultados de simulação de outras moléculas, foram triadas as diferentes abordagens de *Placement* e de *Score Functions* disponíveis.

Para tanto, considerou-se, como referência de coordenadas geométricas de partida, o complexo entre a *Sm*CB1 e o WRR-286. Este complexo, retirado do PDB com resolução de 1,55 Å, foi escolhido por ter sido obtido com o melhor dos inibidores conhecidos da enzima.

De início foi testada a possibilidade de realizar-se um *docking* não covalente com as vinilsulfonas em estudo, a despeito de se saber que estas reagem com o sítio catalítico da enzima. Esta abordagem objetivou compreender quais interações poderiam ser responsáveis pela aproximação do ligante ao sítio. Desta forma, seria possível construir um protocolo para busca de ligantes não covalentes do alvo.

De fato, as modificações do alvo e do ligante para estes estudos, nos levariam a uma pose do WRR-286 que já assume a conformação de "reação" com o alvo, porém, com as

ligações covalente ainda não estabelecidas, aproximando-se de um potencial estado de transição deste composto.

Todas as abordagens de *placement* disponíveis na plataforma MOE foram empregadas, porém, somente a *Template Similarity* foi adequada para reproduzir uma única pose ou, ao menos, uma pose de maior frequência para o composto WRR-286.



Figura 9. Subestrutura empregada no ancoramento das vinilsulfonas Template Similarity via MOE. A. Estrutura básica; B. Pontos correspondentes aos nitrogênios e oxigênio de referência para o posicionamento dos ligantes-teste. As cores representam quesitos (*queries*) que diferenciam os átomos de acordo sua tipagem e números e tipos de ligações que realiza em relação a estrutura completa. Essa diferenciação atômica é utilizada no ancoramente de modo que as estruturas ancoradas que possuam características similares se sobreponham.

Por esta abordagem, os ancoramentos são guiados por uma subestrutura básica, fornecida pelo operador, e que é ancorada no sítio, de forma que todas as demais poses irão seguir as coordenadas dos átomos mais pesados presentes na subestrutura ou a projeção de características físico-químicas que se apresentam como potenciais pontos de interação.

Especificamente, neste caso, foi empregada a subestrutura da Figura 9 e o *Template Similarity* foi guiado pelos átomos de oxigênio e nitrogênios presentes na molécula.

Por este método, nem todas as 20 vinilsulfonas em estudo puderam ser ancoradas corretamente ao sítio, mesmo tendo sido possível reancorar o composto de referência, o WRR-286. Mesmo entre os compostos para os quais a simulação de ancoramento reproduziu uma pose de maior ocorrência esta, ainda assim, foi baixa frequência além de gerar pontuações de ajuste com grande variância e não condizentes com a atividade experimental observada (por exemplo, compostos que apresentaram boa atividade, não apresentaram bom ajuste ao modelo do cristal).

Desta forma conclui-se que o protocolo obtido, mesmo reancorando o WRR-286, não pode ser extrapolado para outras moléculas e, assim, sem empregabilidade tanto para a construção da curva de calibração pIC₅₀ versus *Score Function* quanto para os estudos de VS.

Ancoramento pelo método covalente também foi realizado. Neste caso, também os ligantes foram reconstruídos para mimetizar a forma molecular de reconhecimento pela enzima, ou seja, com os ligantes ainda apresentando a dupla ligação em suas estruturas.

Este método permitiu o ancoramento de quase todas as vinilsulfonas, com exceção das WRR-359, WRR-185 e a WRR-200, as quais foram estudadas nas suas configurações R, nos estudos de Jilkova *et al.* e, como tal, não apresentam tridimensionalidade adequada para o reconhecimento nos estudos de docking, partindo-se do cristal 50GR, especificamente. Há que se relembrar aqui que, todos os estudos de docking molecular deste trabalho foram realizados com a proteína rígida o que não permite o Ajuste Induzido pelo ligante.

Desta forma, estes compostos foram excluídos do estudo, pela alta probabilidade de sobreposições atômicas durante as simulações (*clash* estérico).

Também o composto WRR-453 não pode ser ancorado por esta metodologia, porém, há que se ressaltar que este pode ser um resultado esperado para tal análogo visto ter sido ele o de pior desempenho nos estudos enzimáticos *in vitro*.

Para os demais análogos, 15 das 20 vinilsulfonas originais, as simulações levaram a poses próximas à da conformação do WRR-286 cocristalizado no sítio ativo da enzima (Figura 10).

Quanto aos cálculos de valores de pontuação de ajuste, estes podem ser obtido por diferentes funções de pontuação (*Score Functions*).

A plataforma MOE oferece cinco tipos de funções de pontuação básicas (*ASE Scoring, Affinity dG Scoring, Alpha HB Scoring, London dG Scoring e GBVI/WSA dG Scoring*) além da *Electron Density Scoring*, que permite que informações sobre o mapeamento das distribuições de densidade eletrônica sejam consideradas no cálculo de ajuste. (INC, 2019)







Nos estudos de *redocking* molecular, foram triadas todas as cinco funções de pontuação básicas. A Tabela 3 lista os melhores valores de pontuação obtidos com o emprego de cada uma das cinco funções de pontuação testadas.

Tabela 3 Valores de pontuação máximos obtidos com cada uma das Score Functions empregadas nos estudos de Redocking molecular.

Função de Pontuação	Valor de pontuação*	Observação
ASE Scoring	-10.9160 ± 0.121	
Affinity Dg Scoring	-4.8071 ± 0.299	Sem reprodutibilidade de uma pose única nestes
Alpha HB Scoring	$-34,1459 \pm 5,87$	reancoramentos.
GBVI/WSA dG Scoring	-6.7390 ± 0.362	
London dG Scoring	-21.7724 ± 0.492	Melhor pose reprodutível.

*Para a melhor pose obtida em cada uma das triplicatas de ancoramento simulado do complexo SmCB1:WRR-286. Valores representados como média ± desvio padrão.

A função de pontuação "London dG Scoring" foi a que apresentou melhor desempenho no caso dos estudos de *redocking* do complexo SmCB1:WRR-286 e, desta forma, foi eleita para aplicação nos estudos de *docking* molecular das 15 vinilsulfonas em estudo.

Uma vez obtidas tais pontuações, estas seriam plotadas contra os valores conhecidos de atividade biológica mensurada para a série, produzindo uma curva de que não só validaria o protocolo de ancoramento, mas também serviria como critério para seleção dos compostos triados virtualmente. Este gráfico funciona como a curva de calibração de estudos analíticos, permitindo a previsão de valores de atividade biológica para compostos desconhecidos a partir da extrapolação dos valores de pontuação obtidos nas simulações computacionais.



Figura 11. Exemplo de curva pIC₅₀ versus Pontuação de Ajuste obtida com uma dada Score Function que permite a extrapolação dos dados de compostos de atividade desconhecida.

No caso do *docking* covalente, o qual foi o único em que as 15 vinilsulfonas reproduziram a conformação do WRR-286, este foi desenvolvido associado à função de

pontuação *London dG Scoring*. Após a corrida em decuplicata de cada ligante, com 5 conformações possíveis em cada corrida, um grupo de 50 confôrmeros totais por análogo foi obtido. Analisou-se, então, a variância dos valores de pontuação e a qualidade destes em termos de reproduzir o comportamento biológico. A Tabela 4 mostra a média dos valores de pontuação das melhores poses obtidas em cada corrida para cada vinilsulfona em estudo e os valores de pIC50 calculados a partir dos dados experimentais de Jilkova *et al.* (2011)

ANÁLOGO	$M \acute{E} D I A \pm D P$	IC50 (nM)	pIC ₅₀
WRR-286	$-22,1449 \pm 0,583$	0,61±0,05	9,21
K11017	$-14,8127 \pm 0,890$	1,71±0,13	8,77
K11002	$-13,8172 \pm 0,402$	1,73±0,21	8,76
WRR-282	$-14,9917 \pm 0,435$	2,02±0,10	8,69
K11777	$-13,7007 \pm 0,332$	2,09±00,08	8,68
WRR-285	$-14,1553 \pm 0,408$	2,13±0,03	8,67
K11747	$-14,4401 \pm 0,221$	2,50±0,12	8,60
AR-198048	$-13,9702 \pm 0,668$	6,00±0,21	8,22
WRR-284	$-15,9822 \pm 0,3277$	7,80±0,23	8,11
AR-198049	$-14,1263 \pm 0,248$	10,5±,05	7,98
WRR-145	$-11,7734 \pm 0,116$	22,9±0,5	7,64
WRR-499	$-15,3191 \pm 0,306$	29,5±0,4	7,53
K11006	$-15,3195 \pm 0,767$	33,2±0,3	7,48
WRR-483	$-18,2126 \pm 0,217$	48,9±0,4	7,31
WRR-283	$-15,9436 \pm 0,141$	192±3	6,72
WRR-347	$-15,6404 \pm 0,431$	747±20	6,13

Tabela 4 Média de Pontuação obtida pelo London dG Scoring

Como pode ser observado, não foi possível obter uma correlação direta entre os valores de pontuação de ajuste e a atividade biológica experimental destes análogos, de forma que, novamente, esta curva não pode ser obtida para dar continuidade aos estudos de VS, ao menos por meio desta primeira abordagem proposta.

A inibição irreversível da *Sm*CB1 pelas vinilsulfonas foi bem estudada por Fanfrlíke *et al.* em 2013 (FANFRLÍK *et al.*, 2013) e parece ocorrer devido ao ataque nucleofílico ao carbono beta vinílico da vinilsulfona por parte do enxofre da Cys100 da tríade catalítica. Ao se aproximar do sítio ativo, as vinilsulfonas formam, inicialmente, um complexo não covalente com a enzima [E + I] por meio de interação com os aminoácidos Gln94, Gly98, Gly143, Gly144, Gly269, His270, Trp101, Trp292.

O grupo vinílico ligado à sulfona possui o carbono beta parcialmente positivado e ligado a um hidrogênio com caráter ácido devido à ressonância com a função sulfona que atua como grupo retirador de elétrons. Em paralelo, o carbono alfa à sulfona aproxima-se do nitrogênio imidazólico da His270, estabelecendo uma ligação de hidrogênio que será fundamental na catálise da reação do ataque nucleofílico ao carbono beta vinílico.

Esta interação, ainda, aproxima o carbono beta do grupo tiol da Cys100, que em pH fisiológico encontra-se na forma de tiolato reativo. Esta aproximação favorece e inicia o ataque nucleofílico que é acelerado pela doação do hidrogênio da His270 ao carbono alfa vinílico. Assim, os elétrons do tiolato estabelecem uma ligação covalente com carbono beta ao mesmo tempo que a dupla ligação do vinil se desfaz, transferindo os elétrons ao carbono alfa que, por sua vez, os estabilizará com a captação do hidrogênio doado pela His270 da tríade catalítica. Está estabelecida, assim, a ligação covalente irreversível com a *Sm*CB1.





Este mecanismo de interação, seguido de reação com o alvo, pode ser um elemento limitador para as simulações de ancoramento molecular, visto que a força motriz deste mecanismo é a etapa de reação entre o ligante e o alvo, sendo as interações responsáveis pela etapa de aproximação menos importantes ou intensas de forma que se torna difícil simulá-las.

Estudos híbridos de mecânica quântica e métodos semiempíricos associados às simulações poderiam gerar melhores resultados, como foi o caso do trabalho desenvolvido por Fanfrlíke *et al.* (2013) Estes permitiriam considerar-se as variações de carga ou de densidade eletrônica sobre a dupla ligação e a presença da carga negativa sobre o enxofre da Cys100.

A abordagem de pontuação empregando-se a função *Electron Density Scoring*, do MOE, também pode ser opção a ser explorada neste caso. Esta, contudo, não pode ser

aplicada devido ao início dos períodos de isolamento social e, consequente, menor acesso ao MOE durante a pandemia de Covid-19.

Simulações em paralelo empregando os programas Autodock 4.2.6 e Gold v. 5.7.3 também foram realizadas. Os estudos com Autodock foram pouco significativos, visto que a abordagem de *Placement* por meio de algoritmo genético Lamarckiano, que é a base deste programa, levou a ancoramento do WRR-286 no sítio catalítico porém em posicionamentos distantes dos principais resíduos de interação, em cerca de 4 a 5 Å, o que ultrapassa o limite plausível de interações possíveis entre ligante e alvo.

Frente às estas dificuldades, foi necessário repensar a abordagem de base para o desenvolvimento dos estudos de VS, principal objetivo desta proposta. Considerando-se que estão disponíveis as estruturas cristalográficas da *Sm*CB1 com seu melhor inibidor, o WRR-286, em boa resolução, pode-se pensar na abordagem de VS guiado por modelos farmacofóricos obtidos a partir das análises das interações visualizadas no cristal.

Com vistas à esta nova proposta, realizou-se, então, um estudo das interações estabelecidas não só pelo WRR-286, mas também dos compostos K11777 e K11017 com a enzima, por meio dos cristais 3S3R e 3S3Q, respectivamente, para compreender quais os *hotspots* de interação, bem como quais as características poderiam ser empregadas na modelagem de farmacóforos.

Horn *et al.* estudaram minuciosamente a estrutura do zimógeno precursor da *Sm*CB1 e descobriram que, como em várias outras catepsinas B, este era composto da parte enzimática em si e de uma região intramolecular pró-peptídica que atua como inibidora da ação catalítica desta enzima. Por esta razão, este grupo estudou a estrutura deste pró-peptídeo intramolecular e, a partir da mesma, propôs a síntese de diversos fragmentos peptídicos similares que poderiam atuar como inibidores. (HORN *et al.*, 2011)

Em seguida, tanto Jilkova *et al.* (2011) quanto Fanfrlíke *et al.* (2013) derivaram um conjunto de vinilsulfonas peptidomimeticas, além de realizarem considerações sobre as relações entre estrutura química e a atividade inibitória da *Sm*CB1 (Figura. 13). Na construção desta biblioteca de vinilsulfonas considerou-se a potencialidade desta cadeia base em atuar como um ligante irreversível da enzima. Sobre tal base, então, os pesquisadores derivaram substituições para as diferentes regiões de contato com os bolsos presentes na *Sm*CB1.



Figura 13. Esquema de derivação dos ligantes vinilsulfônicos. A partir de peptídeos inibidores da *Sm*CB1, Jilkova et al. derivou série de ligantes vinilsulfônicos com substituintes R1', R1, R2 e R3 que potencialmente interagisse com os sítios S1', S1, S2 e S3, respectivamente, da enzima. Favor ver arquivo "Apêndice A" para acompanhar substituições nestas posições. Grupos de "*capping*" são os grupos protetores dos terminais N e C do peptídeo.

Como tais discussões foram superficiais, neste trabalho realizou-se uma análise um pouco mais aprofundada a partir dos resultados de ambos os grupos, bem como da associação destes à construção de mapas de potencial eletrostático e aos resultados de simulação de ancoramento das vinilsulfonas pelo protocolo covalente.

O primeiro composto a ser testado biologicamente foi o análogo K11777, que apresenta, como grupo R1', um fenil, ligado à vinilsulfona. Este análogo apresentou atividade inibitória da *Sm*CB1 com IC₅₀ de 2,09±0,08 nM, valor este considerado relevante.

Modificações subsequentes nessa região, contudo, revelaram a importância desta para a atividade inibitória em questão. Os análogos WRR-282 (-NH-Ph), WRR-284 (-O-Ph) e WRR-285 (-CH₂-Ph), nos quais a adição de um átomo espaçador aumenta a distância entre o grupo fenil e a função vinilsulfona, levou a atividade igual ou inferior à apresentada pelo K11777, com valores de IC₅₀ superiores ao exibido por este ou relativamente equivalente.

Substituição na posição 4 desta fenila tampouco rendeu análogos mais ativos, levando, ao contrário, à quase perda de atividade inibitória, como no caso do análogo WRR-347. Remoção da fenila e substituição por um grupo alquila, como no análogo WRR-283, também levou à diminuição da atividade inibitória em duas ordens de grandeza.

Esta informação, pouco discutida pelos autores, pode indicar a relevância do sistema aromático para o reconhecimento e atividade biológica das vinilsulfonas.

Por outro lado, quando os pesquisadores sintetizaram e testaram um análogo com um espaçamento de três átomos entre a vinilsulfona e o grupo fenil, o análogo WRR-286, esta modificação levou ao melhor dos inibidores (-NH-O-CH₂-Ph) desta série.

Esta observação cria um conflito com a conclusão proposta pelos autores supramencionados, de que o espaçamento entre grupo vinilsulfona e fenil seria um aspecto de modulação negativa para a atividade visto que, se assim o fosse, WRR-286 não deveria ser um bom ligante. Este aspecto, contudo, foi pouco discutido por estes autores.

Tentando esclarecer este ponto, empregou-se os dados obtidos nos estudos de ancoramento molecular covalente aqui realizados, particularmente com o derivado WRR-286, para tentar elucidar a participação do grupo R1' nas interações com o alvo.

Ao observar esses ancoramentos, nota-se que o anel fenílico estabelece importantes interações hidrofóbicas com o bolso S1' da enzima, o qual é composto por uma diversidade de resíduos apolares, em particular com os resíduos Val 247 e Leu267 (Figura 14, A). O sítio apolar é bem caracterizado pela região representada com superfície colorida segundo hidrofobicidade em marrom na Figura 14, B que, pode-se verificar pela legenda, é indicativa de regiões mais hidrofóbicas

Uma pi-stacking intramolecular e mediada por uma molécula de água de adsorção também estabiliza o complexo em conformação adequada para o encaixe tridimensional no sítio (Figura 14, C).

Outro sítio com características apolares marcantes é o S3, no qual o anel *N*metilpiperazina se acomoda. Este grupo, por conta de seus nitrogênios polares, estabelece, ainda, ligações de hidrogênio com duas águas de adsorção do meio (Figura 14, A).

Ao considerar-se os átomos componentes do grupo espaçante entre a vinilsulfona e o fenil, ainda, pode-se perceber que, em dependência de sua natureza eletrônica, podemos ter uma melhora ou piora na atividade do análogo resultante.

No caso do WRR-282 e do WRR-285 em que os grupos espaçantes são um metileno ou uma amina secundária, respectivamente (-CH₂-Ph e -NH-Ph), o impacto sobre a capacidade inibitória do alvo não foi significante. No caso do análogo WRR-284, por outro lado, onde o grupo espaçante é um átomo de oxigênio, a atividade é reduzida de um IC₅₀ de 2 nM para 6nM, aproximadamente.



Figura 14. Visão do WRR-286 no sítio catalítico da *Sm*CB1. A. Pose de partida, destacando-se o sítio S1', com setas mostrando os resíduos Val246 e Leu267 com destaque para as posições dos sítios de reconhecimento ao redor do sítio catalítico central; B. Giro de 45 graus à direita, mostrando superfície hidrofóbica do sítio S1', em marrom; C. Giro de 90 graus abaixo, a partir da pose de partida, mostrando as interações com águas de adsorção bem como as interações hidrofóbicas. Interações indicadas por linhas hachuradas em lilás: hidrofóbicas; em ciano: interações de hidrogênio com água de adsorção. Figura de autoria própria construída a partir dos dados do Discovery Studio.

Sempre que um átomo de oxigênio promove diferenças significativas em atividade biológica do composto que o contém, é interessante analisar as contribuições eletrônicas deste átomo, visto que ele está entre os elementos mais eletronegativos da tabela periódica.

No caso do composto WRR-284, esta parece ser exatamente a contribuição que estaria induzindo uma diminuição da atividade. Considerando-se a eletronegatividade deste oxigênio do grupo espaçante, bem como dos dois oxigênios do grupo sulfona em si (-SO₂-O-Ph), pode-se prever um efeito retirador de elétrons bastante significativo sobre o sistema aromático, com um deslocamento da nuvem eletrônica em direção ao conjunto -SO₂-O-.

Este deslocamento diminui a capacidade do fenil em realizar interações do tipo hidrofóbicas as quais, como discutido acima, parecem ser importantes para a interação com o bolso S1' do sítio catalítico da enzima.

Figura 15. Comparativo entre os compostos A. WRR-286 e B. WRR-284. Setas laranjas apontam para grupo de interações estabelecidas (ou não) entre ligantes e receptor. Interações representadas pelas linhas hachuradas lilás: hidrofóbicas e ciano: interações de hidrogênio com a molécula de água de adsorção.



Os estudos de ancoramento molecular covalentes mostram que, na verdade, o oxigênio acaba por acomodar o anel no sítio apolar, porém, a interação intramolecular observada no caso do WRR-286, não pode ser observada. Desta forma, o posicionamento tridimensional no sítio acaba por não ser o mais adequado.

Pode-se observar, na Figura 15, B, por exemplo, que enquanto WRR-286 estabelece duas interações hidrofóbicas com o sítio S1', WRR-284 estabelece apenas uma, com a Val247, mas não com a Leu267, o que também pode refletir na perda de atividade exibida por este último composto.

O mesmo efeito desencadeado pelo oxigênio do grupo espaçante pode ter ocorrido com o WRR-347, o qual apresenta, além deste oxigênio, um grupo metóxi substituinte da posição 4 do fenil (O-Ph-4-O-CH₃). Neste caso, contudo, a substituição no anel provoca impedimento estérico para a acomodação no bolso S1' da enzima (Figura 16, B). Como consequência desta acomodação falha, outros dois pontos de impedimento estérico (*clash*) podem também ser observados. O primeiro entre a cadeia principal da vinilsulfona (C α) e o centro do sítio de reconhecimento (Figura 16, A, em destaque amarelo e o segundo, bastante sutil, de um hidrogênio do grupo fenil em R2 sobre o sítio S2 da enzima (Figura 16, C). Esta má acomodação no sítio poderia explicar o alto valor de IC₅₀ deste composto (747±20 nM).



Figura 16. Sobreposições estéricas (*clashs*) observadas na simulação de ancoramento do WRR-347. A. Pose de partida com destaque para clash no centro do sítio catalítico; B. Giro de 90 graus para mostrar o clash entre o grupo metóxi na posição 4 do anel fenil; C. Giro de 180 graus e zoom da região S2 onde ocorre o terceiro *clash* estérico.

Já no caso do WRR-286, o grupo espaçante é composto por amina secundária ligada a um oxigênio (-SO₂-**NH-O-CH₂-Ph**). A despeito da presença do oxigênio neste espaçante, esta configuração, particularmente, tornou-se interessante para a interação com o alvo.

As eletronegatividades do grupo sulfona e do oxigênio do espaçante induzem um deslocamento da nuvem eletrônica de sobre o NH do grupo espaçante, tornando o hidrogênio da amina mais apto a estabelecer interações de hidrogênio, o que poderia ser um fator determinante para a modulação da ação inibitória sobre a *Sm*CB1.

Novamente, os estudos de ancoramento trouxeram luz à esta situação, revelando que, de fato, uma ligação de hidrogênio é estabelecida entre este **NH** e uma água de adsorção que, por sua vez, interage por pi-stacking com o aromático fenil em R1' (Figura 17, A).



Figura 17. Interações com água de adsorção no sítio catalítico da enzima *Sm*CB1. A. Orientação do hidrogênio da amina em direção a água de adsorção; B. Orientação no hidrogênio da amina em direção à His270, simulação de ancoramento; C. Destaque em zoom mostrando interação do tipo pi-stacking com o anel imidazólicos da His270.

Por outro lado, os resultados de simulação de ancoramento deste composto, estudos de *redocking* molecular, mostram que o hidrogênio NH da cadeia espaçante do grupo R1' das vinilsulfonas pode rotacionar no sítio (Figura 17, B, destaque em verde), orientando este hidrogênio em direção ao anel imidazólico da His270, levando a uma interação pi-stacking entre o hidrogênio o bolso S1'. (Figura. 17, C, zoom). Estas interações, novamente, colocam o grupo R1' em proximidade e acomodação adequadas para estabelecer importantes interações pi-stacking e hidrofóbicas no sítio S1' da enzima.

A presença do metileno, ainda, entre o oxigênio do grupo espaçante e o fenil impede a ressonância entre o átomo eletronegativo e o sistema aromático, garantindo a possibilidade de estabelecimento da pi-stacking e das interações hidrofóbicas com o sítio S1'.

Estudos dos mapas de potencial eletrostático deste análogo, comprovam a presença da região densamente positiva concentrada sobre o N desta cadeia espaçante (Figura 18).



Figura 18. Mapa de potencial eletrostático do composto WRR-286 e sua estrutura molecular correspondente. Destaque ao nitrogênio ligado à sulfona, mostrando região de baixa densidade eletrônica (em azul).

A estrutura das vinilsulfonas foi derivada, em primeira instância, da estrutura de ligantes peptídicos conhecidos do alvo. Por esta razão, Jilkova *et al.* exploraram modificações moleculares que mimetizassem as cadeias laterais dos ligantes peptídicos.

Nas posições R1 e R2 (Tabela 1), por exemplo, os pesquisadores variaram os peptideomimeticos explorando cadeias laterais similares à fenilalanina, tirosina, alanina, lisina, arginina, leucina e histidina.

O melhor substituinte encontrado para cadeia R1, por exemplo, foi a homofenilalanina (Hph), visto que todos os análogos com atividade biológica < 10 nM apresentaram este substituinte. Substituições em R1 por cadeias laterais similares às dos aminoácidos lisina (Lys) e tirosina (Tyr) na estrutura dos ligantes levaram a uma diminuição drástica da atividade biológica. Nesse último caso, a substituição de Hph por Tyr levou ao pior composto da série, com IC₅₀ de aproximadamente 12 μ M, em comparação com o composto K11002 (1.73 nM IC₅₀), que apresenta estrutura similar, mas Hph em R1.

Um caso similar foi o do análogo K11006, onde R1 é a cadeia lateral de uma Lys. Nesse caso, não houve, porém, uma queda tão drástica na atividade biológica, resultando num IC₅₀ de 33,2 nM. Como observado por Fanfrlick *et al*, observamos por meio dos estudos de ancoramento molecular que o substituinte equivalente à Lys em R1 leva à repulsão junto ao bolso S1 devido à presença de aminoácidos positivamente carregados nesta região. No caso dos ancoramentos covalentes, a maioria das conformações obtidas resultaram em baixa pontuação decorrente de impedimento estérico entre ligante e enzima.

Quanto a posição R2 tanto as cadeias laterais similares às de fenilanina (K11002) quanto às de leucina (K11017) são altamente efetivas, pois ambos os grupos são hidrofóbicos,

e permitem boa acomodação próximo ao bolso S2, sem impedimento estérico. O sítio S2 em si, contudo, é um sítio mais hidrofílico (Figura 14. A), porém, em continuidade em direção ao sítio catalítico, a presença da Ala271 e a Leu146, além de parte do esqueleto carbônico do Trp101 geram uma região suficientemente hidrofóbica para acomodar estes substituintes dos ligantes peptidomiméticos.

Em comparação ao análogo K11777 a substituição em R2 de Phe por uma benzila (Phe-4-CH₃) no análogo AR-198048 e um triclorometilbenzeno (Phe-4-CF₃) em AR-198049 resultaram numa diminuição da capacidade de inibição em cerca de três a cinco vezes.

Nos estudos de ancoramento molecular, estes grupos não realizaram interações com qualquer aminoácido do bolso S2, além de seu grupamento Hph em R1 não estabelecer qualquer interação na região S1, devido ao mal posicionamento no sítio catalítico.

Situação similar ocorreu com os análogos WRR-499 (R2 = cadeia da His) e WRR-483 (R2 = cadeia da Arg).

No caso dos substituintes em R3, estes mimetizam os grupos de *capping* dos peptídeos que originaram a série de estudo de Jilkova *et al.*, funcionando, na verdade, como proteção ao N-terminal do peptídeo. Os grupos químicos explorados nesta série foram os "radicais" N-metilpiperazinilcarbonil (N-Mpip); O morfolinocarbonil (Mu) e o benziloxicarbonil (Cbz). Tais modificações nesta posição, contudo, não permitiram que se preveja a contribuição dos mesmos para a atividade biológica.

A troca do N-Mpip pelo Mu não parece interferir com a atividade dos compostos em si, como, por exemplo, observado no caso dos compostos K11777 (R3 = N-Mpip) e o K11002 (R3 = Mu) não houve grande diferença de atividade biológica. Compostos carregando ambos os tipos de substituintes se apresentaram tanto entre os mais ativos, quanto entre os menos ativos derivados da série.

A presença do N-Mpip, contudo, parece prevalecer entre os mais ativos.

O emprego de R3 como Cbz em apenas três derivados da série associado ao fato de que dois destes ainda foram obtidos e ensaiados sobre a forma R em sua posição R1, o que, como já comentado acarreta diminuição significativa da potência, tampouco permitiu concluir-se qualquer interferência desta posição para a atividade biológica. Assim sendo, mais análogos deveriam ser sintetizados e estudados com vistas a complementar os estudos de estrutura química e atividade biológica (REA).

A partir dos estudos de REA acima, bem como das análises das simulações de ancoramento molecular e do cristal 50GR, foi possível, então, montar farmacóforos manualmente empregando a plataforma MOE.

Para tanto, estabeleceu-se dois níveis principais de interações possíveis:

- Interações fundamentais, assim chamadas por estabelecerem-se entre o esqueleto vinilsulfônico e o sítio catalítico da *Sm*CB1, e
- Interações acessórias, assim chamadas por estabelecerem-se entre os substituintes nas equivalentes posições R1', R1, R2 e R3 e os bolsos correspondentes na *Sm*CB1.

No que tange aos grupos do esqueleto vinilsulfônico passíveis de participar de interações com o alvo, este foram, para fins de orientação, nomeados como na Figura 19.



Figura 19. Pontos de potencial interações com o alvo. Em destaque laranja, amidas mimetizadoras das ligações peptídicas, em destaque verde, um dos átomos de oxigênio da vinilsulfona, em roxo, interações assessórias em R1' e em R1.

Os pontos de interação A1, A2 e B foram selecionados de acordo a análise estrutural e energética do cristal 50GR na plataforma MOE. Por meio destas análises pode-se medir a energia esperada para as interações entre as funções amidas ou átomos selecionados e os *hotspots* do alvo. (CLARK; LABUTE, 2007)

A1, por exemplo, corresponde à primeira ligação amida seguindo no sentido Nterminal-like para o C-terminal-like do ligante. Pelas análises energéticas (Tabela 5) foi possível verificar uma energia esperada de -3.6 kcal/mol para a interação deste grupo, especificamente por meio do hidrogênio ligado ao N₉, com a Gly144 do alvo. Este nitrogênio atua como **um ponto de doação de ligação de hidrogênio**. Já o O₁₀ da amida não estabelece interações com o alvo e, portanto, foi desconsiderado na modelagem manual dos farmacóforos.



 Tabela 5 Plot Interações 2D e energia das interações realizadas entre o WRR-286 e 50GR

 SOGRA BIOMT operation 1: 50GR.A BIOMT operation 1

Interact	ion Distance	E (kcal/mol)	
, P. Labute; 2D Depiction of Protei	n-Ligand Complexes	, J. Chem. Inf. Model,	47, 1933-1944 (2007)
contour	exposure	exposure	

proximity

Ligar	nd	Recept	or			Interaction	Distance	E (kcal/
N4	9	0	HOH	718	(A)	H-donor	2.97	-5.9
Nl	22	0	GLY	144	(A)	H-donor	3.18	-3.0
N2	42	0	GLY	269	(A)	H-donor	2.93	-2.7
N5	66	0	нон	795	(A)	H-donor	2.86	-3.9
O3	41	Ν	GLY	144	(A)	H-acceptor	2.95	-3.6
N5	66	0	нон	763	(A)	H-acceptor	2.97	-1.1
O 4	83	NE2	GLN	94	(A)	H-acceptor	2.92	-3.4
O 4	83	NE1	TRP	292	(A)	H-acceptor	2.94	-2.6
O5	84	0	нон	735	(A)	H-acceptor	2.75	-2.2

A.M. Clark

No grupo A2, tanto o O_{14} quanto o N_{13} foram selecionados como pontos potenciais de interação, visto que o N_{13} **doa uma ligação de hidrogênio** para a carbonila da Gly269, com energia estimada em -2.7 kcal/mol, enquanto o O_{14} faz interações como **aceptor de ligação de hidrogênio**, também com a Gly144, neste caso, porém, por meio do NH deste resíduo, com energia estimada de -3.6 kcal/mol.

Quanto ao grupo B, correspondente a um dos oxigênios do grupo sulfona, no caso o que se direciona para os aminoácidos que compõe a cavidade (e não para o espaço do sítio) considerou-se seu potencial de estabelecer interações com **dois** aminoácidos do **sítio como aceptor de ligação de hidrogênio**, a saber, a Gln94 (com energia estimada de -3.4 kcal/mol) e o Trp292 (com energia estimada de -2.6 kcal/mol).

Por estas interações e suas potenciais importâncias na fase de aproximação do ligante ao alvo, estes pontos foram selecionados.

Há que se destacar que, nenhum dos carbonos da dupla ligação foram selecionados como pontos de interação, embora seja reconhecida sua grande importância no mecanismo de inibição. Estes átomos, contudo, precisam ser considerados juntamente com suas cargas parciais para que se possa compreender as interações ou potencial de reação deste grupo e, assim, na abordagem de construção manual de farmacóforos, poder-se-ia criar um viés pela necessidade de inserir cargas artificiais para forçar o computador a reconhecer o carbono beta como ponto de interação/reação.

Quanto à escolha das características de interação acessórias, privilegiou-se as interações estabelecidas pelos grupos R1' e R1, os quais mostraram-se, nos estudos de análise de REA acima, os mais significativos para a atividade das vinilsulfonas, ao menos no que tange ao grupo dos 20 compostos analisados. As principais contribuições esperadas nestes pontos foram as interações hidrofóbicas e a presença de sistemas aromáticos nestas posições.

De forma geral, então, os pontos farmacofóricos do ligante, selecionados para a montagem de modelos de interação, estão relacionados na Tabela 6.

rabela o romos de interação para montagem dos farmacororos mandais.		
Posicionamento	Característica de interação	
Região próxima a A1	um ponto de doação de ligação de hidrogênio	
Região próxima a A2	um ponto aceptor de ligação de hidrogênio um ponto de doação de ligação de hidrogênio	
Região próxima a B	dois pontos de acepção de ligação de hidrogênio	
Regiões próximas à R1 e R1'	pontos de interação hidrofóbica e/ou presença de aromáticos	

Tabela 6 Pontos de interação para montagem dos farmacóforos manuais.

Em verde, interação fundamentais, em laranja, interações acessórias.

Uma vez estabelecidas estas características, passou-se para a etapa de decisão de quais e quantas destas deveriam compor os modelos farmacofóricos. Neste caso, as escolhas foram baseadas no preconizado de que bons farmacóforos apresentam um número de características farmacofóricas variando em um mínimo de três e um máximo de sete características por modelo (PICCIRILLO; DO AMARAL, 2018) Foram, então, construídos modelos de partida contendo de três a quatro características farmacofóricas considerando-se somente os pontos de interações fundamentais.

Os farmacóforos sugeridos são elencados nas Tabelas 7 e 8, conjuntamente com as características que os compõem.





Farmacóforo 5 • F1: doador em A1 • F2: doador em A2 • F3: aceptor em B • V1: volume de exclusão

Em todos, considerou-se um volume de exclusão de 0,7 para simular a topologia da proteína e a região em que átomos de ligantes em potencial não devem ocupar devido à presença de átomos do alvo.

Para que possam ser empregados para o VS, estes farmacóforos deveriam ser validados por meio da construção de curvas ROC, onde compostos verdadeiramente positivos e compostos verdadeiramente negativos são empregados para desafiar os modelos e, de acordo com a quantidade de verdadeiros positivos ou negativos discriminados corretamente pelo modelo, é possível verificar sua especificidade, sua seletividade e sua qualidade, esta última, por meio da avaliação da área sob a curva ROC (AUC-ROC). Tais modelos, contudo, não puderam ser validados até o término do tempo de avaliação da plataforma MOE e, frente à aquisição da plataforma DS, partiu-se para a construção dos modelos automaticamente pela aplicação deste último software. Há que se ressaltar, como será discutido adiante, que os farmacóforos manuais não validados, contudo, guardam significativa similaridade com os farmacóforos automaticamente gerados no DS e, assim, terem sido elaborados previamente auxiliou na compreensão da estrutura geral dos farmacóforos realmente empregados nos estudos de VS.

Validação dos farmacóforos manuais construídos no MOE, ainda, poderia ser realizada via DS, porém, como o formato dos arquivos dos dois programas não são compatíveis, os farmacóforos manuais deverão ser reconstruídos do zero para que se realize

Tabela 8 Farmacóforo construído manualmente, contendo 4 características.

esta ação. Assim, pesando-se tempo-beneficio para o desenvolvimento deste trabalho, optouse por empregar os achados dos farmacóforos manuais apenas para fins comparativos com os modelos automaticamente gerados.

As bibliotecas de verdadeiros positivos (VP) e verdadeiros negativos (VN), empregadas na validação, foram construídas a partir de compostos retirados da base de dados Binding Db além dos 20 análogos estudados por Jilkova *et al.* (2011) e 25 compostos provenientes do estudo desenvolvido por Fonseca *et al.* (2015) além de terem sido construídos 1650 *decoys* com o emprego do software web-based DUD-E.

Especificamente, para a biblioteca de VP, esta foi construída, inicialmente com os compostos estudados pelo Jilkova *et al.* (2011), todos os 20 compostos, apesar de um dos análogos apresentar atividade na escala de micromolar, e não em nanomolar como a maioria. Estes compostos representam a classe de análogos, de fato, VP, visto que estão entre o seleto grupo de compostos químicos estudados diretamente sobre a enzima *Sm*CB1. Outra menção na literatura sobre compostos estudados sobre a enzima foi a de Fonseca *et al.* (2015), que sintetizaram uma série de 31 tiossemicarbazonas glicosiladas (ou não) que foram testadas contra a *Sm*CB1 bem como contra a rodesina e a cruzaína, sendo que oito destas apresentaram atividade significativa contra a enzima do *S. mansoni*. Deste grupo, um análogo foi desconsiderado na construção da biblioteca de VP devido à presença de glicosilação em sua estrutura. Desta forma, se fossemos basear a biblioteca VP apenas em compostos com atividade específica sobre a *Sm*CB1, teríamos um grupo de 27 compostos.

Em termos de validação dos modelos farmacofóricos propostos, contudo, este é um número muito reduzido de análogos para testar a capacidade destes modelos em discriminar VP de VN. Tais modelos seriam, nestas circunstâncias, pouco desafiados para reconhecer moléculas ativas.

Para garantir um número suficiente de compostos, resolveu-se ampliar a biblioteca de VP empregando-se inibidores específicos de catepsinas B1, mas não necessariamente seletivos para a do *S. mansoni*.

Obviamente, os farmacóforos validados com VP derivados de inibidores gerais de catepsinas B1, poderão apresentar algum viés que levaria à seleção de compostos menos específicos para a *Sm*CB1. Por esta razão, ao aplicar esta biblioteca, além da análise de qualidade pela curva ROC, serão empregados apenas os farmacóforos que forem capazes de selecionar todas as vinilsulfonas do trabalho de Jilkova *et al.* (2011) como verdadeiros positivos.

Ainda, um trabalho posterior à triagem de modelagem molecular por meio de ancoramento e dinâmica molecular poderá garantir uma seleção adicional dentre os compostos triados, de forma que apenas aqueles que estabeleçam interações com os sítios específicos da *Sm*CB1 sejam, de fato, escolhidos.

Há que se explicar ainda que as vinilsulfonas de referência são compostos que foram planejados com base na estrutura do pró-peptídeo inibidor da estrutura zimogênica desta enzima. Este pró-peptídeo, por sua vez, apresenta uma região de alfa hélice observada **apenas na** *Sm*CB1, e ausente, inclusive, na sua isoforma tegumentar, a *Sm*CB2. Esta alfa hélice, é mimetizada nas estruturas das vinilsulfonas as quais, por sua vez, também apresentaram seletividade de ação para a *Sm*CB1 (JÍLKOVÁ et al., 2011) Neste trabalho, os autores comentam, ainda, que o principal sítio que poderia ser explorado em busca de ligantes específicos para a *Sm*CB1, particularmente quando comparados à *Hs*CB1, seria o bolso S1, região hidrofóbica composta pelos resíduos Gln94, Gly98, Gly144 e Gly269. Por esta razão, esta interação acessória está sendo considerada na modelagem dos farmacóforos manuais.

Este, ainda, será o bolso a ser analisado na segunda etapa de triagem, em busca de compostos seletivos contra a *Sm*CB1, em termos de interações hidrofóbicas e de hidrogênio com os resíduos com compõe o bolso.

O uso de ligantes não específicos para validar os modelos farmacofóricos tampouco implica, no caso deste trabalho, em selecionar compostos que tenham um perfil multialvo ou promíscuo, isto porque, as bibliotecas a serem triadas englobam apenas fármacos existentes no mercado e, assim, que não apresentam efeitos colaterais significativos.

Os inibidores gerais de catepsinas B1 foram, então, retirados da base de dados Binding DB, num total de 2116 compostos e preparados como descrito no item 3.2.1. Destes 2216 compostos, 413 foram entradas duplicadas além dos 1239 compostos que se encaixaram nos critérios de exclusão discutidos na sessão 3. Material e Métodos.

Os 464 compostos da Binding DB restantes foram, então empregados para a construção tanto da biblioteca de VP quanto a de VN.

Compostos que apresentaram Ki < 100 nM, 161 ao todo, foram selecionados para constituírem, juntamente com os compostos de Jilkova *et al.* e das tiossemicarbazonas de Fonseca *et. al.*, um conjunto de 189 compostos.

Os compostos restantes foram aproveitados para compor a biblioteca de VN, tendo sido considerados os derivados que apresentaram Ki>10 μ M, em outras palavras, 101 compostos. Este número de VN, por si, não seria suficiente para a adequada avaliação da capacidade de reconhecimento de compostos inativos.
Então, de forma similar ao realizado com a biblioteca de VP, aumentou-se o número de representantes deste conjunto. Neste caso, contudo, empregou-se o software web-based DUD-E, para a produção de compostos *decoys*.

Os *decoys* são assim chamados por serem compostos cuja atividade biológica esperada não pode ser provocada pelos mesmos, porém, bons *decoys* apresentam características físicoquímicas similares às dos compostos ativos.

O programa DUD-E emprega as estruturas dos compostos ativos, via código SMILES, para produzir compostos similares mais que, presumivelmente, não poderiam apresentar uma atividade biológica. Para tanto, são incluídas em suas estruturas características de difícil obtenção sintética, baixa estabilidade, com menor probabilidade de encaixe a sítios de reconhecimentos de ligantes ativos etc. Não se pode, contudo, garantir que nenhum dos *decoys* produzidos não apresentariam atividade frente à *Sm*CB1. Este é um risco assumido pelo pesquisador ao escolher esta abordagem metodológica. Por outro lado, estudos por meio do uso de *decoys* tem sido amplamente empregados com sucesso pelos pesquisadores da área. (BURGGRAAFF *et al.*, 2020; CLEVES; JAIN, 2020; MORRONE *et al.*, 2020)

Desta forma, a biblioteca de VN foi constituída dos 101 compostos com Ki>10 μ M mais, 18 compostos inativos da biblioteca estudada por Fonseca *et al.* (tiossemicarbazidas e análogos não ativos contra a *Sm*CB1) e 1609 *decoys*, totalizando 1728 VN.

Esta proporção de quase 1:10 entre os compostos das bibliotecas de VP e VN visa reproduzir a situação real em que um composto ativo é geralmente encontrado na natureza, ou seja, em uma quantidade muito menor que a provável quantidade de representantes inativos.

Por fim, com a mesma abordagem metodológica de preparação das bases de validação VP e VN, foi preparada a biblioteca de compostos a serem triados, a saber, a biblioteca denominada FDA retirada da base de dados Zinc.

Esta biblioteca é composta de 2100 fármacos aprovados pelo *Food and Drug Administration* e já se encontra, em sua maioria, bastante "limpa" do ponto de vista de duplicatas e presença de sais. Mesmo assim, ela foi preparada para estes aspectos, bem como foram calculados os potenciais tautômeros, estados de ionização e conformações possíveis, antes de seu emprego nos estudos de VS.

A produção dos estados de ionização das moléculas foi realizada considerando-se pH 5,5, que reproduz as condições do estômago do parasito, onde a *Sm*CB1 exerce a catálise.

O processo seguinte na preparação dessa biblioteca com o cálculo das cargas parciais sob o campo de força AMBER10:EHT. O campo de força AMBER10:EHT parametriza os átomos das moléculas, estabelecendo computacionalmente as características atômicas de cada elemento, esse campo de força associado a teoria de Huckel estendida (Extended Huckel Theory – EHT (GERBER; MÜLLER, 1995)), método quântico semiempírico para calcular os orbitais pi e sigma dos átomos, foram utilizado para o cálculo das cargas parciais considerando as informações semiempíricas das disposições eletrônicas nas moléculas. Por fim, minimização energética nas moléculas sob o campo de força MMFF94, o foi realizada até critério de convergência de 0,001 kcal/mol/A².

O último passo, então, para que se possa empregar a biblioteca FDA para ser triada é a produção de um conjunto de conformações possíveis de cada uma das estruturas presentes na biblioteca, visto que ligantes podem ou não cumprir um modelo farmacofóricos em dependência da conformação que assumem. Conformações diferentes implicam em distâncias e ângulos diferentes entre os átomos de uma estrutura.

Para tanto, foi empregada uma busca conformacional sob o método LowModeMD. Esse método consiste em uma curta dinâmica molecular de 1 ps (picosegundo) sob temperatura constante seguida de uma minimização energética. Assim, à temperatura do sistema, a molécula é movimentada por um curto período e, em seguida, otimizada de forma que para que a conformação resultante desse processo seja conservada é necessário que atinja um desvio quadrático médio de pelo menos 0.25 em relação a conformação de partida ou será considerada uma duplicata e rejeitada. (LABUTE, 2010) O limite estabelecido para essas rejeições foi de 100, de forma que ao atingir o limite estabelecido de tentativas falhas durante o processo, o cálculo encerra e parte do composto seguinte. O número de iterações, ou seja, de tentativas de se obter uma conformação para essas moléculas também foi estabelecido como 100, assim, esse é o número máximo de cálculos totais realizados por processo de obtenção de confôrmeros, o cálculo encerra ao atingir esse limite. Em cada um desses cálculos, após a molécula ser movimentada pela dinâmica, foram realizadas dez tentativas de minimização energética. Acaso a molécula em estudo não apresente desvio quadrático médio de 0.25, com relação à conformação inicial, ela será rejeitada. Por fim, no caso de a molécula atingir os critérios estabelecidos ela é inserida na base de dados. O limite máximo de confôrmeros resultantes desse processo foi estabelecido em 100.

Desta forma, obteve-se uma biblioteca de 225.205 entradas que podem, então, ser triadas utilizando os farmacóforos validados.

Nesta etapa, contudo, os estudos foram interrompidos pela necessidade de isolamento social devido à pandemia de COVID-19, impondo restrições de acesso aos computadores onde a maioria dos programas, até então empregados, encontra-se instalada.

Com vistas a dar continuidade aos experimentos teóricos, foi solicitado à empresa Dassault Systémes o acesso gratuito à plataforma Discovery Studio v. 2020. Esta plataforma é bastante interessante por possuir ferramentas completas para estudos de proteínas, interação proteínas ligantes e dos ligantes em si. O acesso foi concedido sobre a premissa de desenvolver-se estudos não só na área de DNs, mas também relacionadas à SARS-CoV-2, vertente esta que está sendo explorada pelo grupo desde então.

Como as plataformas MOE e DS trabalham com arquivos de extensões distintas, algumas das etapas de preparação para os cálculos no MOE não puderam ser aproveitadas e, portanto, tiveram que ser refeitas.

Além disto, esta plataforma permite a derivação automática de modelos farmacofóricos a partir de estruturas cristalográficas conhecidas. Esta abordagem é associada à validação concomitante dos modelos gerados, de forma que os modelos gerados sempre são liberados acompanhados dos resultados do estudo de validação por meio de construção de curva ROC.

Para os cálculos de VS no Discovery, o cristal 50GR preparado na plataforma MOE, foi reparametrizado com emprego do campo de força CHARMm. O ligante WRR-286 foi removido do cristal, parametrizado sob campo de força MMFF e reinserido ao arquivo da proteína para análise do complexo.

Parametrização das bibliotecas VP, VN e FDA também foi realizada com emprego do campo de força MMFF. No caso da FDA, porém, esta foi empregada como arquivo "sdf" proveniente da etapa de minimização energética, anterior à simulação de dinâmica molecular para busca conformacional. Este arquivo permite parametrização mais rápida do conjunto e, o próprio Discovery realiza a busca conformacional previamente à triagem.

Desta forma, tendo-se os arquivos todos preparados e organizados, foi efetuada a primeira construção automática de farmacóforos, segundo as seguintes condições: produção de farmacóforos com 4 a 6 características, dentro de um limite de 10 farmacóforos obtidos na presença das águas de adsorção do cristal. O processo de validação foi realizado após busca conformacional pelo método FAST, com máximo de conformações geradas em 100, limite de diferença de energia entre confôrmeros de 20 kcal/mol e método de ajuste rígido. Distância máxima de volume de exclusão foi ajustada para 6,0 Å, a qual permite ajustes dos ligantes da base de validação do modelo de maneira mais adequada ao mesmo tempo que considera a topologia do sítio da proteína em estudo.

Sem este ajuste de volume de exclusão, não foi possível gerar farmacóforos em potencial. Os farmacóforos obtidos nestes estudos preliminares estão listados na Figura 20 - A

que traz, ainda, informações sobre o processo de validação de cada farmacóforo, sob a forma de suas curvas ROC. (Figura 20 - B).

É possível observar que, por este método, foi possível construir 10 farmacóforos, porém apenas quatro destes apresentaram valores de Sensibilidade de Especificidade moderadamente adequados. A qualidade dos modelos é medida pelo cálculo da área sob a curva ROC.

Neste caso, os melhores modelos foram os:

Modelo 1 > Modelos 6 = 9 > Modelo 2

Ao analisar a quantidade de falsos positivos identificados pela aplicação dos quatro "melhores" modelos, pode-se verificar que estes não estão identificando corretamente os compostos positivos, classificando uma grande quantidade de compostos como positivos quando, na verdade, estes são provenientes da biblioteca VN. Este desequilíbrio fica claro ao observarmos a taxa de reconhecimento de "Falsos Positivos", muito maior do que o tamanho da biblioteca total de ativos (193 compostos).

A própria forma das curvas ROC obtidas demonstram que estas ainda não estão totalmente bem definidas levando a um baixo valor de AUC (Figura 20, B. *Quality: Poor*), significando que estes resultados são próximos da aleatoriedade e, portanto, os modelos ainda não estão sendo corretamente construídos e validados partindo-se dos ajustes operacionais propostos.

A

		Vali	dation with	Known Activ	ves/Inactive	s		
Pharmacophore	Total	Total	True	True	False	False	Sensitivity	Specificity
	Actives	Inactives	Positives	Negatives	Positives	Negatives		
Pharmacophore_1	193	1741	154	1154	587	39	0,79793	0,66284
Pharmacophore_2	193	1741	127	1309	432	66	0,65803	0,75187
Pharmacophore_3	193	1741	157	963	778	36	0,81347	0,55313
Pharmacophore_4	193	1741	133	1197	544	60	0,68912	0,68754
Pharmacophore_5	193	1741	133	1106	635	60	0,68912	0,63527
Pharmacophore_6	193	1741	141	1149	592	52	0,73057	0,65997
Pharmacophore_7	193	1741	152	797	944	41	0,78756	0,45778
Pharmacophore_8	193	1741	170	679	1062	23	0,88083	0,39001
Pharmacophore_9	193	1741	142	1149	592	51	0,73575	0,65997
Pharmacophore_10	193	1741	151	948	793	42	0,78238	0,54451



Figura 20. Farmacóforos propostos nos estudos preliminares com o Discovery Studio, acompanhados das curvas ROC e valores estatísticos associados.

Com vistas a melhoria do protocolo de validação, alterou-se o método de ajuste dos ligantes aos se testar os modelos farmacofóricos produzidos. No primeiro caso, o ajuste foi realizado de forma rígida, até para diminuir o tempo de cálculo do sistema. Neste segundo momento, contudo, alterou-se o modo de ajusto para o flexível, pelo qual o ligante se acomoda ao farmacóforo por meio de ajuste fino uma vez posicionado no sítio. Este procedimento, no entanto, resultou em piora da curva ROC e poucas foram as curvas que

atingiram uma AUC igual ou superior a 0.7, nosso limite de corte e aceitação de qualidade de uma curva ROC conforme indicado em literatura (Figura 21) (PICCIRILLO; DO AMARAL, 2018).

Validation with Known Actives/Inactives														
Pharmacophore	Total Actives	Total Inactives	True Positives	True Negatives	False Positives	False Negatives	Sensitivity	Specificity	AUC ROC					
Pharmacophore_01	193	1741	90	1606	135	103	0,46632	0,92246	0.692					
Pharmacophore_02	193	1741	105	1574	167	88	0,54404	0,90408	0.728					
Pharmacophore_03	193	1741	85	1606	135	108	0,44041	0,92246	0.679					
Pharmacophore_04	193	1741	106	1580	161	87	0,54922	0,90752	0.732					
Pharmacophore_05	193	1741	103	1583	158	90	0,53368	0,90925	0.725					
Pharmacophore_06	193	1741	75	1623	118	118	0,38860	0,93222	0.660					
Pharmacophore_07	193	1741	58	1644	97	135	0,30052	0,94428	0.623					
Pharmacophore_08	193	1741	59	1636	105	134	0,30570	0,93969	0.623					
Pharmacophore_09	193	1741	75	1633	108	118	0,38860	0,93797	0.663					
Pharmacophore_10	193	1741	55	1655	86	138	0,28497	0,95060	0.618					

Figura 21. Tabela resultante da corrida de farmacóforo com emprego de ajuste flexível.

Apesar deste resultado não ser útil para o VS, houve uma melhora considerável na especificidade dos modelos farmacofóricos. A alteração do método de ajuste para flexível permitiu os modelos considerarem os ligantes negativos como de fato negativos, apresentando uma taxa de identificação superior a 90% para todos os casos, como pode ser observado pela coluna "*Specificity*".

Há ainda, contudo, um número considerável de falsos positivos e pode-se considerar três situações que podem estar levando a estes resultados.

A primeira é a de que a estratégia aqui empregada na tentativa de mimetizar as condições em que um ligante possível é encontrado na quimio-diversidade natural do planeta pode ter levado a uma superestimação dos compostos negativos, classificando-os como positivos. Daí o aumentado número de falsos positivos. Este resultado seria, então, derivado do desequilíbrio entre as bibliotecas VN e VP, onde a última é quase 10 vezes inferior em número de representantes que a primeira.

A segunda possibilidade seria a de que parte dos *decoys* produzidos pelo software DUD-E tenham, de fato, capacidade de apresentar alguma atividade sobre a *Sm*CB1. Neste caso, o viés é conhecido como viés do falso negativo, em que há compostos positivos entre os *decoys*, o que subestima a performance do modelo. Esta situação é prevista quando do uso de

decoys "produzidos" e não retirados de alguma base de dados. Neste caso, cabe ao operador estar ciente e atentar para esta possibilidade.

Por fim, numa terceira situação, de forma muito similar à segunda hipótese, também os compostos retirados da Binding DB, para construção da biblioteca de VN, poderiam não ser de fato "negativos". Na construção desta biblioteca considerou-se os compostos que apresentavam Ki >10 μ M, uma faixa de atividade inibitória de enzimas considerada, geralmente, muito elevada para compostos, de fato, com valor terapêutico. Por esta razão, então, foram considerados "negativos". Ainda assim, nada garante que mesmo com uma elevada constante de inibição, estes compostos não possam estar sendo identificados pelo software como potenciais positivos, o que então justificaria a alta taxa de "falsos positivos".

Para aferir tais hipóteses, reconstruiu-se a biblioteca de VN das seguintes formas:

1ª reconstrução: biblioteca produzida somente a partir do uso do software DUD-E e partindo-se da estrutura básica dos análogos vinilsulfônicos. Nesta biblioteca então, não haveriam compostos retirados da Binding DB e, a terceira hipótese poderia ser testada.

2ª reconstrução: a biblioteca acima foi submetida a uma "clusterização" por meio de análise hierárquica de similaridade (HCA) e apenas 10% dos compostos totais foram selecionados de forma a ter-se a mesma representatividade entre cada ramo do dendograma obtido. Neste caso, então, a primeira hipótese é que estaria sendo testada, pois desta forma as bibliotecas de VP e VN estariam balanceadas, com 193 e 174 compostos cada, respectivamente. Na verdade, esta abordagem permite, ainda, uma avaliação concomitante da hipótese 3, pois nesta tampouco haveria representantes da Binding DB.

 3^{a} reconstrução: a biblioteca de VN foi constituída apenas com os compostos da Binding DB, sem derivados produzidos pelo software DUD-E, perfazendo um total de 120 inativos, apresentando valores reportados de Ki >10 µM. Neste caso, a segunda hipótese é que seria testada, pois nesta não se tem representantes de *decoys* produzidos. Neste caso, ainda, tentou-se alcançar o equilíbrio entre as bibliotecas VP e VN e, para tanto, reduziu-se a biblioteca de VP somente aos compostos com Ki < 5 nM. Desta foram, a biblioteca VP ficou constituída de 125 compostos. Novamente, a hipótese um também, então, seria concomitantemente testada. Os primeiros farmacóforos construídos e validados a partir da biblioteca de VN resultante da primeira reconstrução, ou seja, constituída apenas dos *decoys* DUD-E não levaram a alteração dos resultados obtidos com a biblioteca de VN completa, ou seja, composta do conjunto de *decoys* e compostos da Binding DB. Variações de modo de ajuste dos compostos ao sítio, durante a validação, entre rígido e flexível, bem como de outros parâmetros de cálculo não levaram a qualquer melhoria do perfil da curva ROC ou nos demais dados estatísticos. Pelo contrário, os valores se mostraram inferiores aos obtidos nas análises prévias.

Frente a este quadro, a biblioteca VN foi, então, submetida à análise de HCA com emprego do software Orange 3.26.0. Deste modo, foram selecionados uma quantidade de compostos representantes de cada grupo para que, ao fim, fosse constituída uma biblioteca correspondente a cerca de 10% de seu tamanho original para que estivesse balanceada com os compostos ativos.

Validation with Known Actives/Inactives													
Pharmacophore	Total Actives	Total Inactives	True Positives	True Negatives	False Positives	False Negatives	Sensitivity	Specificity	AUC ROC				
Pharmacophore_01	193	174	90	156	18	103	0,46632	0,89655	0.673				
Pharmacophore_02	193	174	105	152	22	88	0,54404	0,87356	0.712				
Pharmacophore_03	193	174	85	155	19	108	0,44041	0,89080	0.659				
Pharmacophore_04	193	174	106	152	22	87	0,54922	0,87356	0.714				
Pharmacophore_05	193	174	103	154	20	90	0,53368	0,88506	0.708				
Pharmacophore_06	193	174	75	159	15	118	0,38860	0,91379	0.653				
Pharmacophore_07	193	174	58	160	14	135	0,30052	0,91954	0.611				
Pharmacophore_08	193	174	59	161	13	134	0,30570	0,92529	0.614				
Pharmacophore_09	193	174	75	160	14	118	0,38860	0,91954	0.656				
Pharmacophore_10	193	174	55	163	11	138	0,28497	0,93678	0.609				

Figura 22. Tabela resultante da corrida de farmacóforo com emprego da biblioteca de decoys DUD-E após análise e separação por HCA. Método de produção dos confôrmeros foi o Fast e modo de ancoramento flexível.

O protocolo foi realizado nas mesmas condições do anterior, sob o método de ajuste flexível. Foi possível observar que não houve alteração significativa na AUC, pois, apesar de o número de falsos positivos sofrer redução, o número de falsos negativos se manteve elevado. Isto também se reflete em modelos com uma baixa sensibilidade aos positivos (vide coluna "*Sensitivity*" e Figura. 22).

Esse mesmo cálculo foi refeito, contudo, com busca conformacional no método *Best*, possuindo uma cobertura muito mais ampla do espaço conformacional do que o método *Fast*.

Validation with Known Actives/Inactives														
Pharmacophore	Total Actives	Total Inactives	True Positives	True Negatives	False Positives	False Negatives	Sensitivity	Specificity	AUC ROC					
Pharmacophore_01	193	174	103	154	20	90	0,53368	0,88506	0.701					
Pharmacophore_02	193	174	107	152	22	86	0,55440	0,87356	0.716					
Pharmacophore_03	193	174	101	155	19	92	0,52332	0,89080	0.697					
Pharmacophore_04	193	174	107	152	22	86	0,55440	0,87356	0.718					
Pharmacophore_05	193	174	106	155	19	87	0,54922	0,89080	0.719					
Pharmacophore_06	193	174	87	156	18	106	0,45078	0,89655	0.677					
Pharmacophore_07	193	174	76	159	15	117	0,39378	0,91379	0.651					
Pharmacophore_08	193	174	81	157	17	112	0,41969	0,90230	0.656					
Pharmacophore_09	193	174	81	157	17	112	0,41969	0,90230	0.666					
Pharmacophore_10	193	174	72	161	13	121	0,37306	0,92529	0.648					

Figura 23. Tabela resultante da corrida após HCA dos decoys DUD-E pelo método Best.

Neste caso houve uma sútil melhora nos valores de AUC (Figura. 23). Ao observar-se, porém, as demais estatísticas, como, por exemplo, valores de sensibilidade, número de falsos positivos e número de falsos negativos em ambas as Figuras 22 e 23 nota-se que estas pouco variaram nos dois casos, e, assim, conclui-se que a modificação do espaço conformacional construído durante a validação de FAST para BEST não levou a alterações significativas de fato.

A biblioteca de VN construída sem a presença de *decoys* produzidos via DUD-E, então, foi testada. Neste caso, contudo e como antedito, também se modificou, em paralelo, o número de representantes da biblioteca de ativos de forma a manter o equilíbrio dos dois conjuntos de dados.

De fato, houve uma queda no número de falsos negativos nos melhores modelos com AUC superior a 0.7. (Figura 24) Porém a sensibilidade continuou baixa, mostrando que os modelos teriam baixa capacidade de discernir verdadeiros positivos.

Validation with Known Actives/Inactives														
Pharmacophore	Total Actives	Total Inactives	True Positives	True Negatives	False Positives	False Negatives	Sensitivity	Specificity	AUC ROC					
Pharmacophore_01	125	120	71	89	31	54	0,56800	0,74167	0.658					
Pharmacophore_02	125	120	84	82	38	41	0,67200	0,68333	0.703					
Pharmacophore_03	125	120	67	91	29	58	0,53600	0,75833	0.649					
Pharmacophore_04	125	120	84	85	35	41	0,67200	0,70833	0.707					
Pharmacophore_05	125	120	82	82	38	43	0,65600	0,68333	0.691					
Pharmacophore_06	125	120	63	97	23	62	0,50400	0,80833	0.658					
Pharmacophore_07	125	120	49	100	20	76	0,39200	0,83333	0.607					
Pharmacophore_08	125	120	52	96	24	73	0,41600	0,80000	0.608					
Pharmacophore_09	125	120	56	99	21	69	0,44800	0,82500	0.641					
Pharmacophore_10	125	120	46	104	16	79	0,36800	0,86667	0.609					

Figura 24. Tabela resultante da corrida na ausência dos decoys e redução no número de compostos da Binding dB.

Frente à piora nos valores de sensibilidade, optou-se por retornar ao uso da biblioteca completa, pois os estudos anteriores à esta abordagem resultavam em valores de sensibilidade melhores, porém, com elevado número de falsos positivos.

Partiu-se, então, para modificações em critérios de cálculo dos farmacóforos, como por exemplo, sobre os critérios de volume de exclusão, de 6.0 para 5.0, compreendendo uma área mais justa do sítio ativo, bem como sobre o número máximo de características farmacofóricas, de 6 para 5, foram realizadas (Tabela 9). Como mencionado, foi preservada as bibliotecas VN e VP iniciais.

Após os ajustes nas condições de cálculo, em quase todos os farmacóforos obtidos a especificidade aumentou e os compostos negativos passaram a ser identificados quase que em totalidade. No entanto, ainda esteve presente a dificuldade de os modelos não serem sensíveis o suficiente para classificar alguns positivos corretamente, tratando-os como falsos negativos, em praticamente todos os casos metade dos positivos foi tratado como falso negativo.

		Valio	lation wit	h Known A	ctives/Ina	ctives			
Pharmacophore	Total Actives	Total Inactives	True Positives	True Negatives	False Positives	False Negatives	Sensitivity	Specificity	AUC ROC
Pharmacophore_01	193	1741	107	1560	181	86	0,55440	0,89604	0.722
Pharmacophore_02	193	1741	107	1571	170	86	0,55440	0,90235	0.725
Pharmacophore_03	193	1741	109	1562	179	84	0,56477	0,89719	0.735
Pharmacophore_04	193	1741	106	1572	169	87	0,54922	0,90293	0.722
Pharmacophore_05	193	1741	91	1584	157	102	0,47150	0,90982	0.691
Pharmacophore_06	193	1741	94	1595	146	99	0,48705	0,91614	0.701
Pharmacophore 07	193	1741	95	1590	151	98	0,49223	0,91327	0.705
Pharmacophore_08	193	1741	44	1656	85	149	0,22798	0,95118	0.589
Pharmacophore_09	193	1741	110	1258	483	83	0,56995	0,72257	0.654
Pharmacophore_10	193	1741	169	1085	656	24	0,87565	0,62321	0.807

Tabela 9. Matriz de confusão e curva ROC com AUC 0.8 por busca conformacional Fast.

O farmacóforo 10 desta análise, contudo, apresentou uma AUC > 0.8, valor de melhor qualidade que foi possível obter até então, associado a alto valor de sensibilidade. Neste caso, porém, novamente observa-se um elevado valor de falsos positivos.

Pode-se pensar que este farmacóforo seja sensível o suficiente para identificar 87% do total de ativos como verdadeiro positivos, mas, ao mesmo tempo, permite a identificação de compostos da biblioteca contendo os *decoys* da DUD-E como ativos, os chamados falsos positivos. Novamente, isto pode indicar a presença de análogos com características estruturais suficientes ou para confundir o modelo, ou para exibir uma atividade inesperada. Este é o viés do falso negativo.

Uma vez observado que uma diminuição na extensão do volume de exclusão acabou por levar à obtenção de pelo menos um modelo farmacofórico com AUC > 0.8 durante a validação antedita (Tabela 9), optou-se por realizar um novo protocolo, porém, com volume de exclusão a 4.5 Å, em contrapartida o limite máximo de características foi alterado de cinco para seis, como originalmente considerado, e a geração de confôrmeros foi para BEST e o ajuste como flexível.

Esses ajustes de cálculo em conjunto às bibliotecas corrigidas levaram aos melhores modelos obtidos até então (Tabela 10), nove dos dez modelos obtidos possuindo AUC > 0.8.



Tabela 10. Matriz de confusão e curvas ROC da validação com volume de exclusão em 4,5 Å e máximo de seis características.

Apesar de não serem resultados ótimos, estes foram os melhores modelos possíveis obtidos até então. Decidiu-se, então, por prosseguir os estudos de triagem fazendo uso dos

mesmos visto que praticamente todos os modelos possuem AUC > 0.8, com exceção do modelo 6. Além disso, os valores de sensibilidade e especificidade tornaram-se mais equilibrados, estando os modelos capazes de caracterizar em média 82% dos compostos positivos corretamente e em média 66% dos negativos corretamente.

Para dar início aos estudos de VS, porém, foi realizada uma análise visual dos modelos obtidos e seus resultados de validação contrastados, de forma que pudessem ser selecionados os melhores modelos da série.



Tabela 11. Ligante de referência WRR-286

A nomenclatura das características farmacofóricas subsequentes foram derivadas de sua numeração estrutural de acordo com o átomo de referência ao qual a característica corresponde. Quando a característica farmacofórica derivar de um dos grupamentos cíclicos seu nome será derivado do Rn, substituinte correspondente a posição no esqueleto do ligante.

Doador de Ligação de Hidrogênio (magenta) = HBDon-*n* Aceptor de Ligação de Hidrogênio (verde) = HBAc-*n* Aromático/Hidrofóbico (ciano) = Hyd-R*n* Sendo *n* o número correspondente ou do átomo ou do substituinte R. Em cinza está representado o volume de exclusão.

As esferas menores representam o ponto de interação no ligante enquanto as esferas maiores o fazem nos resíduos, em conjunto há vetores representando direção e sentido da interação, e sendo o modulo o centro das esferas. (Tabela 12)









Como pode-se observar na Tabela 13, cada farmacóforo possui 6 características, as quais derivam de um conjunto de nove características possíveis consideradas pelo programa para esses modelos. As características gerais consideradas foram: três doadores de ligação de hidrogênio (09, 13 e 21), três aceptores de ligação de hidrogênio (14, 19, 20) e três características aromáticas/hidrofóbicas (R2, R1 e R1').

Tabela 13. Características farmacofóricas													
PH01	HBDon-09	HBDon-13	HBAc-14	HBAc-19	HBAc-20	HBDon-21	-						
PH02	HBDon-09	HBDon-13	HBAc-14	HBAc-19	HBAc-20	HBDon-21	-						
PH03	HBDon-09	HBDon-13	-	HBAc-19	HBAc-20	HBDon-21	Hyd-R2						
PH04	HBDon-09	HBDon-13	-	HBAc-19	HBAc-20	HBDon-21	Hyd-R1'						
PH05	HBDon-09	HBDon-13	-	HBAc-19	HBAc-20	HBDon-21	Hyd-R1						
PH06	HBDon-09	HBDon-13	HBAc-14	HBAc-19	-	HBDon-21	Hyd-R2						
PH07	HBDon-09	HBDon-13	HBAc-14	HBAc-19	-	HBDon-21	Hyd-R1'						
PH08	HBDon-09	HBDon-13	HBAc-14	HBAc-19	-	HBDon-21	Hyd-R1						
PH09	HBDon-09	HBDon-13	-	HBAc-19	HBAc-20	HBDon-21	Hyd-R2						
PH10	HBDon-09	HBDon-13	-	HBAc-19	HBAc-20	HBDon-21	Hyd-R1'						

Características que estão igualmente presentes em todos os modelos foram destacadas em azul.

Como pode-se observar na tabela 13 todos os farmacóforos apresentaram quatro, das nove características gerais, fixas e consensuais, sendo referentes às contribuições dos grupos químicos nas posições 9, 13, 19 e 21. As cinco características gerais restantes variaram entre os modelos, de modo que pode-se concluir que as quatro primeiras características podem ser consideradas relevantes para a interação com o alvo. Das nove características, todas as que são doadoras de ligação de hidrogênio foram consideradas importantes, enquanto apenas uma característica de acepção de ligação de hidrogênio está presente em todos os modelos. O conjunto de características variantes ou acessórias é composto das três características aromáticas/hidrofóbicas e duas características de acepção de ligação de hidrogênio (14 e 20).

Deve-se considerar, ainda, os resíduos, representados pelas esferas maiores nos modelos, envolvidos nas interações com o ligante e considerados em razão da importância do sentido da interação. Para facilitar a visualização destes pontos, a Tabela 14 lista os resíduos do alvo macromolecular e quais as características farmacofóricas os representam, considerando-se cada um dos modelos farmacofóricos em estudo.

PH-Char	HBDon-09	HBDon-13	HBAc-14	HBAc-19	HBAc-20	HBDon-21	HYD
PH-01	GLY144	GLY269	GLY143	HOH735	GLN94	HOH795	-
PH-02	GLY144	GLY269	GLY143	HOH735	TRP292	HOH795	-
PH-03	GLY144	GLY269	-	HOH735	GLN94	HOH795	LEU146
₽Н_0/	GI V144	GI V269	_	НОН735	GI N94	нон795	LEU267
1 11-04	OL I I++	GL1207	-	11011755	OLIV)4	1101175	VAL247
PH-05	GLY144	GLY269	-	HOH735	GLN94	HOH795	HOH795
PH-06	GLY144	GLY269	GLY143	HOH735	-	HOH795	LEU146
рн 07	GI V144	CI V260	CI V1/3	НОН735		HOH705	LEU267
111-07	OL I I++	UL 1 209	ULTI45	11011/33	-	11011795	VAL247
PH-08	GLY144	GLY269	GLY143	HOH735	-	HOH795	HOH795
PH-09	GLY144	GLY269	-	HOH735	TRP292	HOH795	LEU146
DH 10	CI V144	CI V260		НОН725	TDD202	HOH205	LEU267
PH-10 GL Y 144		UL 1209	-	поп/33	1 NF 292	поп/93	VAL247

Tabela 14. Aminoácidos e águas correspondentes às interações das características farmacofóricas

Alguns farmacóforos, porém, possuem as mesmas características eletrônicas e, apesar disso, uma dessas características eletrônicas, possui variação no sentido, significando uma interação diferente. Isso ocorre em razão de cada característica farmacofórica representar uma abstração de uma interação do ligante com determinado resíduo.

Assim, o que ocorre nesse caso é uma seleção de interação, em razão de um mesmo oxigênio do grupo sulfona realizar duas interações, uma com a Gln94 e outra com Trp292. Dessa forma, a característica que está orientada para cima nas figuras corresponde à uma interação com a Gln94 e a que está orientada para baixo à uma interação com o Trp292. (Tabela 12, PH-01 e PH-02).

Essas duas interações são consideradas importantes na orientação do ligante de referência WRR-286 no sítio, de forma que foram ambas consideradas. Por outro lado, a proteína não é considerada durante o VS de modo que tão somente a posição das características abstratas pode ser considerada no que diz respeito à capacidade classificatória dos modelos.

Essa diferença observada para HBAc-20 levou à alteração da qualidade dos modelos farmacofóricos cuja única diferença é o sentido dessa interação, como pode ser verificado em sua validação (Tabela 10). A curva ROC pontua o PH-01 como **0.823**, o PH-02 como **0.816**; o PH-03 como **0.807**, o PH-09 como **0.809**; e, o PH-04 como **0.810** e o PH-10 como **0.812**. Apenas no caso do PH-01 a pontuação mais elevada foi conferida ao modelo cujo HBAc-20

tem sentido em direção à Gln94, nos outros dois casos o sentido orientado à Trp292 obteve maior pontuação AUC, o que significaria, em termos de ROC, que são modelos melhores.

O PH-05, também possui característica HBAc-20 com sentido em direção à Gln94. Este é modelo é similar ao PH-04, devido ao HBAc-20 com sentido em direção à Gln94, tendo como diferença sua característica aromática, a qual, em vez de Hyd-R1' é Hyd-R1. O PH-05, porém, além de uma característica aromática diferente, possui uma AUC 0,815, sendo superior em capacidade classificatória ao PH-04.

Quanto a característica HBAc-14, presente em cinco modelos (PH-01, PH-02, PH-06, PH-07, PH-08), pode-se observar que esta compromete a qualidade dos modelos no que diz respeito a classificação das moléculas negativas, aumentando, portanto, o número de falsos positivos. Sendo preferíveis, nesse aspecto, farmacóforos que possuem HBAc-20, com exceção, porém, do PH-08.

O PH-08 é similar ao PH-05 tanto em termos de características gerais quanto de AUC, sendo de 0,816 para o PH08 e de 0,815 para o PH-05. A diferença entre os modelos é presença de HBAc-14 e ausência de HBAc-20 no PH-08, sendo o oposto no PH-05. (Tabela 13) Essa diferença também se apresenta na capacidade classificatória caracterizando-se por certa oposição no que diz respeito a sensibilidade e especificidade No PH-08 verifica-se maior sensibilidade do que o PH-05, e, portanto, maior capacidade de classificar corretamente os compostos positivos. Já no caso do PH-05 a especificidade é maior do que a do PH-08, de forma que o modelo classifica corretamente um maior número de moléculas negativas. (Tabela 10).

Em termos de características aromáticas, todos os modelos que as carregam, independente da variação, possuem uma capacidade similar de classificação, e, portanto, serão consideradas apenas as características HBAc-20 e HBAc-14 para a discriminar os melhores modelos que serão utilizados no VS.

Desse modo, partindo das análises anteriores, e considerando as diferenças entre os modelos, foram selecionados para o VS:

PH-01) Tanto por ser o farmacóforo com maior AUC da série, quanto, por dentro do conjunto que possui suas características ser o melhor. **PH-05, 09 e 10)** São os modelos de melhor sensibilidade e especificidade da série, sendo os que contém a característica HBAc-20;

e, por fim, **PH-08**) este modelo foi selecionado por possuir HBAc-14 e por contrapor o PH-05.

Após a seleção dos modelos farmacófóricos a serem utilizados no VS deu-se início às triagens da biblioteca do FDA. O protocolo utilizado na triagem contou com os farmacóforos PH-01, PH-05, PH-08, PH-09 e PH-10 e a biblioteca do FDA preparada como descrito anteriormente. Os ligantes da biblioteca do FDA foram submetidos a geração conformacional pelo método FAST, em vistas do tempo de cálculo computacional, com um limite máximo de 255 conformações geradas a partir do arquivo de entrada e descartando as conformações existentes anteriormente, o limite de energia por conformação gerada foi mantido em 20 kcal/mol, como padrão. O número mínimo e máximo de características a serem consideradas por modelo triado foi estabelecido como 4 e 6 respectivamente, de forma que um ligante que se adequasse a qualquer combinação variante de quatro características até as 6 totais fosse considerado pelo modelo durante o mapeamento; o limite de subconjuntos possíveis a serem produzidos foi estabelecido como 100, resultando em 22 subconjuntos possíveis considerados pelo programa. O método de acomodação dos ligantes ao modelo foi estabelecido como flexível, em concordância com o protocolo de validação dos modelos. Os resultados foram programados para serem ordenados por valor de acomodação ao farmacóforo (Fit Value), este valor resulta do mapeamento da comparação entre o ligante e o farmacóforo, de forma que quando mais próxima a característica do ligante estiver do centro da esfera de característica do farmacóforo maior é o valor pontuação. (PAL et al., 2019)

Após a triagem empregando os seis modelos inicialmente considerados, todos os compostos apontados como potencialmente ligantes foram submetidos a uma análise visual, considerando-se seu posicionamento e interações dentro do sítio de reconhecimento. Foi observado que uma boa parte dos ligantes retornados apresentavam sobreposições atômicas aos resíduos do alvo macromolecular ao serem alocados no sítio, particularmente em regiões vizinhas que não são consideradas pelo volume de exclusão.

A dificuldade de acomodação ao sítio não ocorre, porém, em razão de uma alteração conformacional ocasionada pelo WRR-286, como se pode observar na Tabela 15. Os sítios de ligação da 50GR e da 4I07, forma madura da *Sm*CB1 cristalizada sem qualquer ligante, são muito semelhantes como descreve Jílková *et al.* (JÍLKOVÁ et al., 2014) Para avaliar, então, se haviam quaisquer alterações conformacionais nos sítios os cristais foram sobrepostos por meio da plataforma Discovery Studio. Observou-se que as diferenças entre os sítios são poucas, havendo além disso um desvio quadrático médio de 0,342 Å entre 4I07 e a 50GR,

sendo que um desvio de até 1,5 Å é aceitável. (TOKARSKI; HOPFINGER, 1997; TURRA et al., 2012)



Tabela 15 Sobreposição 50GR X 4I07

Por outro lado, essa invasão pode ter ocorrido em razão de o volume de exclusão considerado no modelo não ser suficientemente completo para ser uma mimetização topológica exata do sítio enzimático. Em complemento, o ligante se acomoda ao farmacóforo em qualquer posição possível no espaço contanto que evite o volume de exclusão e cumpra as características farmacofóricas do modelo. Podendo suas características corresponderem ao farmacóforo sem, no entanto, serem capazes de naquela mesma posição adequarem-se ao sítio enzimático em razão da superfície do ligante ultrapassar o limite da superfície enzimática.

Esse efeito resultou em uma série de ligantes que, apesar de cumprirem o modelo e terem excelentes *Fit Values*, não poderiam ser considerados na análise teórica devido ao nível

de invasão do sítio e de suas vizinhanças nas poses em que foram mapeados. Para alguns ligantes, porém, pode-se considerar um limite de erro aceitável equivalente a uma metila pensando na dinâmica do sistema que poderia levar à acomodação do alvo ao ligante e vice-versa.

Os resultados do VS estão dispostos na Tabela 16. Todos os ligantes da FDA apontados como potenciais ligantes da *Sm*CB1 no estudo de VS em cada modelo farmacofórico e que não apresentaram sobreposições estéricas ou estiveram dentro do limite de invasão estabelecido, estão destacados em vermelho com fundo azul, e apenas eles foram considerados nas análises finais. Os fármacos selecionados para cada modelo estão listados na parte inferior da tabela 16. A presença desses resultados em mais de um modelo foi destacada em vermelho com fundo vermelho. Os *Fit Values* correspondentes a cada ligante estão ao lado, e os com fundo laranja correspondem aos valores dos ligantes selecionados.

Dentre os fármacos selecionados alguns foram encontrados por mais de um farmacóforo (PH): a riboflavina (RBF) foi consenso entre os PH-01, PH-05, PH-08 e PH-10; a paromomicina foi consenso entre os PH-01, PH-08 e PH-09; o lexidronam foi consenso entre os PH-01 e PH-09; e, o formoterol foi consenso entre os PH-08 e PH10. Outros fármacos foram encontrados por apenas um farmacóforo: o sorbitol foi encontrado pelo PH-01; duas estatinas, a rosuvastatina e a fluvastatina foram encontradas pelo PH-05, enquanto outra estatina, a atorvastatina, foi encontrada pelo PH-08; epirubicina, foi encontrada pelo PH-05; belinostat e bortezomibe foram encontradas pelo PH-08; afatinibe, lapatinibe e piceid foram encontrados pelo PH-09; e, fosamprenavir e indinavir foram encontrados pelo PH10. Os resultados das conformações e sua adequação ao farmacóforo estão dispostos no **Anexo 1**.

Tabela 16. Resultados do VS.

Fit Value	4,68959	4,62875	4,42474	4,39098	4,1578	4,02961	3,96117	3,95813	3,95556	3,9295	3,92934	3,90755	3,88493	3,88051	3,84649	3, 79129	3,78104	3,75579	3,66981	3,54961	3,53938	3,5361							
PH10	Promomicina	Doxorrubicina	RBF	Doxorrubicina	Doxorrubicina	Doxorrubicina	Acarbose	Pitavastatina	Promomicina	Formoterol	Promomicina	Lactulose	Amicacina	Atorvastatina	Doxorrubicina	RBF	Epirubicina	Fosamprenavir	RBF	Indinavir	Doxorrubicina	Piceid	RBF	Formoterol	Fosamprenavir	Indinavir			
Fit Value	4,16902	3,9638	3,92216	3,91766	3,88996	3,85245	3,83949	3,82938	3,82644	3,81309	3,78166	3,77055	3,76992	3,72319	3,71991	3,69259	3,68872	3,61171	3,60095	3,49739	3,3524	3,22312							
PH09	Cidofovir	Formoterol	Acarbose	Glicose	Atorvastatina	Cefeprozil	Paromomicina	Lapatinibe	Lexidronam	Paromomicina	Edoxaban	Venetoclax	Afatinibe	Atorvastatina	Piceid	Piceid	Atorvastatina	Piceid	Afatinibe	Famotidina	Piceid	Clorexidina	Atorvastatina	Paromomicina	Lapatinibe	Lexidronam	Afatinibe	Piceid	Clorexidina
Fit Value	4,62607	4,48873	4,36644	4,25758	4,02207	3,97034	3,95869	3,95628	3,92366	3,92212	3,91833	3,81927	3,81309	3,80831	3,7882	3,76434	3,73006	3,71666	3,70074	3,68366	3,56735	3,55786							
PH08	Streptomicina	RBF	Dapaglifozina	RBF	RBF	RBF	RBF	Streptomicina	Lexidronam	RBF	Sorbitol	RBF	Paromomicina	Rosuvastatina	RBF	Belinostat	Atorvastatina	Formoterol	Doxorrubicina	Bortezomibe	RBF	RBF	RBF	Paromomicina	Belinostat	Formoterol	Bortezomibe		
Fit Value	4,90069	4,6319	4,59469	4,4852	4,48464	4,45312	4,27415	3,96364	3,94684	3,94462	3,93437	3,92752	3,91905	3,9177	3,91542	3,91346	3,90565	3,89943	3,87535	3,84921	3,80848	3,79808							
PH05	RBF	Anfotericina B	Doxiciclina	RBF	RBF	RBF	RBF	Epirubicina	Fluvastatina	Poromomicina	Rosuvastatina	RBF	Bicalutamida	Bicalutamida	RBF	Poromomicina	Ácido Cítrico	Natamicina	RBF	RBF	Idarrubicina	RBF	RBF	Epirubicina	Fluvastatina	Rosuvastatina	Bicalutamida		
Fit Value	4,66822	4,65438	4,62607	4,62363	4,49732	4,49512	4,14169	3,96333	3,95869	3,95628	3,9533	3,94036	3,93853	3,92366	3,92345	3,91833	3,90836	3,90519	3,86361	3,8379	3,81309	3,75892							
PH01	Tobramicina	Lexidronam	Streptomicina	Lexidronam	Azacitidina	Acarbose	Paromomicina	Paromomicina	RBF	Streptomicina	Acarbose	Lexidronam	Trissilicato de Magnésio	Lexidronam	Acarbose	Sorbitol	Lexidronam	Sorbitol	Paromomicina	Epirubicina	Paromomicina	Metotrexato	Lexidronam	Paromomicina	RBF	Sorbitol			

Alguns dos fármacos selecionados no VS, porém, não podem ser classificados como passíveis de reposicionamento e foram excluídos das análises.

Os antineoplásicos, epirubicina, belinostat, bortezomibe, afatinibe e lapatinibe, por não serem seletivos e, portanto, apresentarem elevada toxicidade, não poderiam ser considerados bons compostos na linha de reposicionamento de fármacos. Por outro lado, eles não precisam ser de todo ignorados. É sabido que antiparasitários possuem ação antineoplásica *in vitro* e *in vivo* (ALAVI; EBRAHIMI SHAHMABADI, 2021), se a recíproca também puder ser aferida a estrutura química de tais fármacos poderiam ser utilizadas para encontrar outros compostos, seja por meio de modelos farmacofóricos ou por estudos QSAR, que, porém, não sejam citotóxicos ou antimitóticos e que sejam passíveis de atuar em enzimas como a *Sm*CB1.

O lexidronam ou samário lexidronam é um radioisótopo utilizado como analgésico para o tratamento de dor crônica devido a câncer. Este composto é injetado por via intravenosa preferencialmente em regiões onde o câncer atingiu os ossos. As características desse fármaco, por si só, já impossibilitam seu reposicionamento, sendo ele, também, excluído das seguintes análises.

A clorexidina, uma biguanida, é utilizada como antisséptico tópico. Não há relatos na literatura quanto a efeitos antiparasitários em razão de ser utilizada apenas topicamente. Por outro lado, seria possível indagar se possui atividade cercaricida ou de sua potencial atividade como profilático contra a forma infectante do *S. mansoni*. Em estudos, por exemplo, com a metformina, também da classe das biguanidas, Panic *et al.* (2014) demonstraram que esta interfere no desenvolvimento e reprodução dos parasitos, em camundongos imunodeficientes e demonstraram a incapacidade dos vermes em adquirir nutrientes, não tendo sido possível, no entanto, explicar o mecanismo envolvido. (PANIC et al., 2014) Vemos que a inibição da *Sm*CB1 leva aos mesmos fenômenos de incapacitação de desenvolvimento e reprodução por meio de inanição, a relação entre a metformina e a *Sm*CB1, porém, é, aqui, meramente especulativa a título de citar a potencialidade das biguanidas e precisaria ser avaliada em termos de atividade enzimática.

A paromomicina é um antibiótico aminoglicosídeo utilizado no tratamento de amebíase intestinal, além disso é utilizado como adjuvante para manutenção de encefalopatia hepática. (DAVIDSON; DEN BOER; RITMEIJER, 2009) A nível hepático, a paromomicina

é utilizada como adjuvante no tratamento de encefalopatia hepática diminuindo a produção de amônia produzida por bactérias. (PATIDAR; BAJAJ, 2013) Além das atividades antibacteriana e atuação como adjuvante a paromomicina possui ação reconhecida contra leishmania, tanto visceral (LV) quanto cutânea (LC). (SOSA et al., 2019; WIWANITKIT, 2012) O tratamento para a LV é realizado de forma intravenosa, enquanto que para a LC o uso é tópico, com eficácia comparável à anfotericina B. (DAVIDSON, 2017; KUHLMANN; FLECKENSTEIN, 2017) Cabe dizer que a anfotericina B também esteve presente em nossos resultados do VS para *Sm*CB1 por se adequar ao farmacóforo e foi excluído dos estudos em razão da sobreposição aos átomos do sítio de reconhecimento, não se sabe, no entanto, se seria capaz de levar à uma mudança conformacional suficiente ao sítio enzimático.

O que torna difícil pensar sobre um reposicionamento da paromomicina é sua baixa absorção via oral, atuando somente no intestino do indivíduo. O uso intravenoso não é interessante do ponto de vista do reposicionamento de fármacos, porém, ainda pode-se estudar os efeitos deste fármaco *in vitro* e aferir sua capacidade antiesquistossoma e em outras fases de desenvolvimento do parasito. Pode-se, como para outros fármacos encontrados nesse estudo, avaliar sua estrutura e formas de interação com a proteína para investigar outros compostos potencialmente capazes de inibir a *Sm*CB1.

O sorbitol é um poliol (álcool de açúcar) encontrado numa gama de plantas, frutas e vegetais com propriedades diuréticas, laxativas e catárticas. O sorbitol não absorvido retém água no intestino grosso por meio da pressão osmótica estimulando, assim, o movimento peristáltico. É, além disso, utilizado como adoçante e atua em diversos produtos como substituto alimentar em razão da cariogenicidade de outras substâncias, como a sacarose. (GREMBECKA, 2015; KRENZELOK, 1987) Shapiro *et al.* (1982), mostrou que o D-sorbitol 6-fostato é capaz de inibir a fosfoglicose isomerase do *S. mansoni* interferindo no mecanismo regulador da glicólise no parasito (SHAPIRO; TALALAY, 1982). Não há, até o presente momento, estudos *in vitro* ou *in vivo*, no parasita para que se possa inferir sua atividade anti-helmíntica além da supracitada inibição da fosfoglicose isomerase pelo sorbitol-6-fostato. O sorbitol em si mesmo, porém, não possui atividade antiparasitária conhecida, cabendo citar que o grupamento fosfato pode ser essencial à atividade conhecida na enzima supracitada. Além disso, sendo um composto glicosilado pode ser considerado de difícil absorção intestinal, o que não seria viável em termos de reposicionamento para a esquistossomose.

A clorexidina, uma biguanida, é utilizada como antisséptico tópico. Não há relatos na literatura quanto a efeitos antiparasitários em razão de ser utilizada apenas topicamente. Por outro lado, seria possível indagar se possui atividade cercaricida ou de sua potencial atividade como profilático contra a forma infectante do *S. mansoni*. Em estudos, por exemplo, com a metformina, também da classe das biguanidas, Panic *et al.* demonstraram que esta interfere no desenvolvimento e reprodução dos parasitos, em camundongos imunodeficientes e demonstraram a incapacidade dos vermes em adquirir nutrientes, não tendo sido possível, no entanto, explicar o mecanismo envolvido. (PANIC et al., 2014) Vemos que a inibição da *Sm*CB1 leva aos mesmos fenômenos de incapacitação de desenvolvimento e reprodução por meio de inanição, a relação entre a metformina e a *Sm*CB1, porém, é, aqui, meramente especulativa a título de citar a potencialidade das biguanidas e precisaria ser avaliada em termos de atividade enzimática.

O formoterol é um agonista dos receptores adrenérgicos B2 utilizado como broncodilatador para manutenção de doenças pulmonares obstrutivas crônicas como enfisema, bronquite e asma. (BARTOW; BROGDEN, 1998; BERGER, 2006; FAULDS; HOLLINGSHEAD; GOA, 1991) A nível molecular o formoterol atua estimulando a adenilato ciclase responsável por converter ATP em AMP cíclico, o qual, em níveis elevados nas células dos brônquios, ocasiona o relaxamento dessa musculatura lisa, levando a dilatação das vias aéreas. (TESCHEMACHER; LEMOINE, 1999) Não há, até o momento, estudos na literatura de ensaios do formoterol em *S. mansoni*, talvez em razão de ser um fármaco inalatório e por ser um fármaco caro, o que não seria viável no caso de uma DN.

O piceid ou polidatina é um derivado do resveratrol, polifenil encontrado em uvas, sendo o derivado de maior presença nos sucos de uva. (ROMERO-PÉREZ et al., 1999) O resveratrol é conhecido por diminuir o risco de cardiopatias, atuar como um quimiopreventivo ao câncer, ter propriedades antiinflamatórias, antivirais e neuroprotetoras (KNIGHT; CASELDINE; BOYKOFF, 2010) apesar disso não há muitas informações quanto aos efeitos biológicos do piceid na literatura.

Em termos de atividade sobre o *S. mansoni*, o resveratrol mostra-se tanto capaz de aumentar a atividade do praziquantel (GOUVEIA et al., 2019) sobre parasito, quanto de atenuar os danos ao figado ao diminuir a expressão de genes relacionados a fibrose (CHEN et al., 2019), por fim, também age atenuando o estresse oxidativo em animais infectados. (SOLIMAN et al., 2017) Apesar de não haver estudos sobre o piceid como agente

esquistossomicida na literatura para o resveratrol a situação é diferente, sendo este mais explorado em termos de atividades e podendo abrir caminho para o estudo de seu análogo.

No caso dos antiretrovirais inibidores de protease do HIV-1, a saber, o fosemprenavir, pró-fármaco do amprenavir, e do indinavir, sabe-se que houve uma diminuição de incidência de enteroparasitoses em indivíduos portadores do HIV em países desenvolvidos. Alfonso et al. (2011) reuniram estudos in vitro e in vivo em Plasmodium falciparum, Leishmania spp, Toxoplasma gondii e protozoários vaginais e intestinais que demonstram a efetividade dessa classe de fármacos contra esses parasitas. (ALFONSO; MONZOTE, 2011) Não há, no entanto, estudos, in vitro ou in vivo, relacionando essa classe ao S. mansoni. Apesar de não se saber se tais fármacos possuem atuação no parasito, pode-se considerar um problema direto quando ao reposicionamento desses fármacos em razão de que possuem hepatotoxicidade, o que não é interessante no caso da esquistossomose em razão de o indivíduo já possuir danos ao figado devido a hepatomegalia. O mecanismo pelo qual os inibidores de protease do HIV causam danos ao figado não é bem conhecido, e esses danos são considerados clinicamente raros e podem, além disso, estar associados a coinfecção por hepatite ("Fosamprenavir", 2012; "Indinavir", 2012). Acredita-se, porém, que os metabólitos resultantes da ação do citocromo P450 sobre os antivirais podem, na verdade, ser os responsáveis pelos danos hepáticos observados. Apesar desta problemática, deve-se avaliar se esses antiretrovirais poderiam atuar na SmCB1 em baixa concentração, de modo que o risco danos hepáticos seriam consideravelmente reduzidos, e, além disso, os antiretrovirais são fármacos fornecidos gratuitamente no Brasil pelo Sistema único de Saúde (SUS), o que poderia ser aproveitado em caso de reposicionamento de fármacos. Outra abordarem seria estudar a estrutura desses fármacos na busca de compostos otimizados que possam atuar nessa enzima sem ou com menor risco de causar toxicidade ao indivíduo.

A fluvastatina, rosuvastatina e atorvastatina são estatinas que atuam na via do mevalonato inibindo a HMG-CoA redutase (HMGR), enzima responsável pela conversão da HMG-CoA em mevalonato. Essa classe de fármacos é utilizada principalmente no controle do colesterol em casos de doenças cardiovasculares, possuindo, no entanto, outros potenciais usos terapêuticos como antiinflamatório, anticâncer e desordens do sistema imune.

Rojo-Arreola *et al.* (2014) demonstraram que as estatinas têm potencial esquistossomicida por meio de testes *in vitro*, avaliando o efeito de seis compostos dessa classe, a saber, atorvastatina, sinvastatina, fluvastatina, lovastatina, rosuvastatina e

pravastatina. (ROJO-ARREOLA et al., 2014) O mecanismo proposto para esta ação, contudo, foi a ação sobre a isoforma da Hidroximetilglutaril Coenzima A redutase do verme, *Sm*HMGCoa-redutase, tendo sido os parasitos encubados por seis dias e avaliados quanto ao grau de severidade de dano tecidual, entre zero e quatro. A sinvastatina demonstrou ser o mais potente inibidor da enzima, enquanto a pravastatina não apresentou qualquer efeito. Lovastatina. atorvastatina, rosuvastatina, fluvastatina atingiram o grau três de severidade de dano já a uma concentração de 20 μ M, e dois para os outros representantes em concentrações de 20, 10, 5 e 1 μ M, sendo o grau de severidade, para a lovastatina, também dois nas demais concentrações.

Outro ponto a se salientar é que as estatinas levaram à diminuição na produção de ovos além de afetarem sua maturação nas fêmeas. (ALENCAR et al., 2016). Em um trabalho mais antigo, de Araújo *et al.* (2008) os autores mostram que tanto a oxamniquina quanto a lovastatina reduziram em cerca de 90% a oviposição, levando, também, a ausência de ovos intra-uterinos. Ademais, sabe-se que os ovos do parasito reduzem o colesterol sérico (LA FLAMME et al., 2007), sendo antiga, também, a noção de que a via do mevalonato é essencial não só à produção e maturação dos ovos, mas, também, para a sobrevivência dos parasitos (CHEN; FOSTER; BENNETT, 1990; VANDEWAA et al., 1989) Neste contexto, os autores fizeram, ainda, estudos de inibição de RNAi para aferir se estes poderiam levar à interferência com a *Sm*CB1, o que não foi constatado. (ARAÚJO et al., 2008) Há que se considerar, contudo, que como mencionado na introdução deste texto, a *Sm*CB1 não é a única enzima envolvida na nutrição do parasita e sua inibição não induz, de fato, morte do parasito, mas sim atraso no seu desenvolvimento o qual, por sua vez, resultaria na cura parasitológica visto serem, os vermes imaturos, incapazes de realizar oviposição.

Alencar *et al.* (2016) mostraram, ainda, que as estatinas ocasionam degradação do tegumento do parasito além de interferir com sua motilidade. Apesar de as estatinas assumirem uma pose similar à da WRR-286 (Figura. 25) e, também, estarem no sítio em poses similares entre si, mesmo quando encontradas por modelos farmacofóricos diferentes (Figura. 25 – PH-05, A e B; PH-09, C) não é possível afirmar ou apontar que as estatinas de fato sejam, de fato, capazes de interferir com a *Sm*CB1 sem estudos experimentais.



Figura 25. Poses resultantes do VS para estatinas em contraste ao WRR-286 (Imagem de autoria própria produzida no Maestro 10.5)

A) fluvastatina em verde; B) rosuvastatina em ciano; C) atorvastatina em amarelo, laranja e vermelho; WRR-286 em azul escuro.

Contudo, Altaf *et al.*, demonstraram que a rosuvastatina é capaz de levar a infraregulação da catepsina B em estudos sobre a função do gene NLRP3 no processo de inflamação da aterosclerose coronária. (ALTAF et al., 2015) Bai *et al.*, ainda, estudando o mecanismo do NLRP3 em casos de doença de Parkinson e Alzheimer, observaram que a ativação desse inflamassoma é mediada por estresse oxidativo, além de demonstrarem que essa ativação se dá pela supraregulação de catepsina B, e que a inibição genética ou farmacológica dessa enzima interfere na via do NLRP3 (BAI et al., 2018)

Apesar disso, não se pode afirmar que esse seja o mesmo mecanismo pelo qual as estatinas possam atuar no *S. mansoni*, mesmo que parcialmente, ainda mais quando outros estudos já demonstraram a interferência na via do mevalonato. É necessário, portanto, que

sejam realizados ensaios enzimáticos que demonstrem ou indiquem se as estatinas podem interagir com as catepsinas B do parasito.

A riboflavina (RBF) é uma vitamina hidrossolúvel do complexo B, mais conhecida como vitamina B2. É composta por uma cadeia lateral poli-hidroxilada similar ao ribitol e um grupo isoaloxazina comum entre as flavinas.

É encontrada em leite, ovos, carnes e vegetais, tendo como característica a coloração amarelada fluorescente, em razão da ressonância que ocorre no grupamento isoaloxazina. A RBF participa do processo de respiração celular como flavina mononucleotídeo (FMN), cofator com um grupamento fosfato ligado ao éster da cadeira ribitol, funcionando como como grupo prostético de diversas oxirredutases.

Além da FMN, outra estrutura que depende da RBF para ser sintetizada é o dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD), cuja estrutura resulta da ligação entre a FMN e uma adenosina mono fosfato (AMP), gerando um cofator, capaz de sofrer reações redox e de atuar na cadeia de transporte de elétrons. (Fig. 27)(GIANCASPERO et al., 2015)

Figura 26. Riboflavina (RBF) em azul, com colchetes indicando os grupos que a compões; cofatores derivados, flavina mononucleotídeo (FMN) em verde, e flavina dinucleotídeo (FAD) em amarelo, indicando qual grupo é adicionado à RBF para compô-los.



A captação de RBF ocorre de forma mais abundante por meio da dieta, mas esta vitamina pode ser também biossintetizada por bactérias do intestino grosso, muito embora em menores quantidades. De todas as formas, a RBF do trato gastrointestinal humano pode ser absorvida tanto em sua forma livre quanto já nas formas de FMN e FAD, as quais, mesmo

que associadas a proteínas, são rapidamente clivadas e separadas da estrutura proteica no estômago devido às drásticas condições de pH. No intestino delgado, as FMN e FAD são hidrolisadas por meio de fosfatases inespecíficas, produzindo RBF livre, podendo ser absorvida em todas as regiões do intestino sendo, contudo, a absorção mais expressiva no intestino delgado A quantidade de RBF no intestino grosso, porém, variará com a dieta do indivíduo visto que, como mencionado, as quantidades derivadas da síntese bacteriana são geralmente menores. Dietas ricas em vegetais levam, por exemplo, à maiores quantidades de RBF disponível do que dietas proteicas. (POWERS, 2003; SAID, 2011; SAID et al., 2000)

Como mencionado, a RBF é absorvida principalmente no intestino delgado e parcialmente no intestino grosso, mas, em ambos os casos, a RBF é transportada do lúmen intestinal para o meio intracelular por meio de transportadores específicos e denominados hRFT-2. Esses transportadores são Na⁺ independentes e saturáveis, sendo afetados apenas pelo pH do meio. (GIANCASPERO et al., 2015; SAID et al., 2000; YAMAMOTO et al., 2009).

Ao adentrar os enterócitos a RBF sofre ação da riboflavina quinase, levando-a novamente até FMN e esta, por sua vez, sofre ação da FAD sintetase, que adiciona AMP ao FMN. Os cofatores serão, então, associados às proteínas celulares ou, se em sua forma livre (obtidas por nova hidrólise até RBF), será enviada para a corrente sanguínea via receptores hRFT-1. Tendo adentrado a corrente sanguínea a RBF pode ser transportada ligada a albumina, IgG e/ou IgA e será armazenada no intestino, fígado, coração e rins. Por fim, todo excesso de RBF absorvida é excretado pela urina ou transformada em 7-hidroximetilriboflavina e lumiflavina. Por outro lado, como os transportadores são saturáveis, parte da RBF não absorvida pode ser excretada nas fezes. (HAACK et al., 2012; POWERS, 2003; YONEZAWA et al., 2008)

Doenças associadas à RBF envolvem a sua deficiência. A nível hematológico a RBF parece atuar na hematopoiese. Spector *et al.* ofereceram uma ração deficiente em RBF a cães de experimentação e observaram que estes desenvolveram anemia microcítica e hipocromica, além de decréscimo de componentes dos glóbulos vermelhos. Powers (2003) cita também estudos realizados em humanos e que a deficiência de RBF levou à hipoplasia eritróide e reticulopenia. (POWERS, 2003; SPECTOR et al., 1943) Essa condição parece estar atrelada a perda de ferro e a suplementação de RBF leva a melhora do quadro clínico. Bou-Abdallah *et al.* indicam uma relação entre a ferritina e FMN, de modo que o processo

redutivo do ferro na ferritina não ocorreria corretamente na ausência da flavinas redutoras. (BOU-ABDALLAH et al., 2018)

A RBF, ainda, tem papel importante na maturação do trato gastrointestinal. Em estudos envolvendo camundongos em fase de desmame, uma dieta deficiente em RBF levou à disrupção na maturação do órgão, mesmo quando a vitamina era administrada via intraperitoneal. Sua deficiência também é associada a doenças cardiovasculares, câncer e quadros neurodegenerativos. (POWERS, 2003)

A RBF não atua apenas mantendo as condições metabólicas e de desenvolvimento normais do organismo. Sanches *et al.* demonstraram as propriedades antiinflamatórias e antioxidantes da vitamina em caso de isquemia hepática, onde a RBF levou a atenuação do estresse oxidativo/nitrosativo, redução dos níveis de oxido nítrico, além de diminuir a inflação local no figado de camundongos. Bertollo *et al.* observaram, ainda, um efeito antinociceptivo e capacidade de inibir a formação de tecido fibroso. Estes efeitos parecem estar atrelados a capacidade da RBF em interferir na síntese de citocitas inflamatórias como TNF- α ; IL-1 β , INF, entre outros. (BERTOLLO et al., 2006; SANCHES et al., 2014)

Em relação ao *S. mansoni* não há estudos específicos na literatura que tratem diretamente da relação entre a RBF e o parasito. Os estudos existentes envolvem os cofatores e citam apenas FAD, porém, tratando-se da inibição de proteínas que atuam no sistema defesa do parasito contra espécies reativas de oxigênio (ROS), em razão da alta suscetibilidade dos vermes a estas espécies sendo, inclusive, um meio pelo qual as células do sistema imune reduzem o número de parasitos em fase juvenil. (ASHOORI; SAEDISOMEOLIA, 2014; HUANG, 2012) A RBF, porém, por sua propriedade como antioxidante não conseguiria levar à eliminação do parasito por meio do mecanismo antedito.

Em nossos estudos de VS, a RBF apareceu 24 vezes sendo apontada como potencial ligante do alvo por quatro dos cinco modelos utilizados, principalmente, por PH-05 e PH-08, e de forma mais modesta nos PH-01 e PH-10, sendo encontrada, ainda, uma vez pelo PH-01 e três vezes pelo PH-10. Os modelos PH-05 e PH-08, como mencionado, poderiam ser utilizados de forma complementar devido a sua capacidade complementar de classificação. Ainda, a RBF foi a única entre os compostos encontrados e que foram selecionados a obter o maior *Fit Value* em mais de um dos estudos (Tab. 16). As estruturas encontradas para a RBF variaram em estados de protonação e tautômero, estando presente

quatro variações (Tabela 17) da molécula dentre elas, a denominada Mol_14, obtida como resultado em maior frequência e mais bem pontuada para ajuste aos farmacóforos testados. Esta foi, portanto, utilizada nos estudos posteriores. As poses encontradas durante o VS para a RBF estão dispostas na Tabela 18.



Tabela 17. Estados de Protonação e Tautoméricos da RBF resultantes do VS

Tabela 18. Poses das RBF encontradas nos farmacóforos VS.



WRR 286 - Referência





PH-08 01 02 03











Estudo de frequência de interações entre a RBF e a 50GR (Tabela 19) foi realizado com as poses, presentes na Tabela 18, encontradas para este ligante no VS. Este método de análise calcula as interações entre um ou vários ligantes e átomos, resíduos ou cadeias do receptor, fornecendo uma tabela estatística dessas interações. (BIOVIA, 2021)



Tabela 19. Histogramas de Interações da RBF e de suas diferentes poses no VS
Em termos de interações realizadas entre o sítio da *Sm*CB1 e a RBF em suas diversas poses, pode-se notar que ela interage com todos os *hotspots* de interação observados para ligantes da enzima como o WRR-286, a saber, Gln34, Gly98, Gly143, Gly144, Gly269, His270, Trp 101 e Trp292 (Tabela 20 – *Favorable*). Além desses pontos mais importantes citados por Jilková *et al.* (2011) e observados no estudo farmacofórico manual realizado neste trabalho, a RBF realiza interações com dois aminoácidos pertencentes à tríade catalítica, Cys100 e His270, mas não com a Asp290. Cabe dizer que geralmente este último membro não participa das catálises.

Em relação às interações realizadas pelo WRR-286 (Gln94, Gly98, Cys100, Trp101, Glu142, Gly143, Gly144, Leu 146, Val247, Leu247, Leu267, Gly 269, Ala271, Trp292, e em termos de interações com águas HOH718, HOH735, HOH795, HOH832) a RBF não realiza interações com a Leu146, Ala271, HOH718 e HOH832, por outro lado isso é suprido pela existência de interações com Ile193, Leu 252, HOH558 e HOH763.

Os gráficos presentes na Tabela 20 mostram a frequência com que a RBF, em suas diferentes poses, interage com um determinado aminoácido, classifica essas interações como favoráveis, desfavoráveis, interações de hidrogênio, de carga e hidrofóbicas. Quando observamos nos gráficos e contrastamos as tabelas de interações favoráveis e desfavoráveis, verifica-se que a Gly269 apesar de ser o resíduo que apresenta mais interações favoráveis, também é o que apresenta mais interações desfavoráveis, além da HOH795. Valores aproximados de frequência entre interações favoráveis e desfavoráveis ocorrem também com a Gly144.

Isso, porém, pode ser caracterizado como um produto da acomodação rígida dos ligantes resultantes do VS ao sítio da *Sm*CB1. Interações desfavoráveis geralmente são classificadas assim em razão de estarem muito próximas. Outras possibilidades, como no caso da carga (Gly142) é não haver complementaridade de carga, ou, também, de doadores e aceptores de ligação de hidrogênio.

As águas são parte importante do sistema e é sua proximidade da RBF inserida no sítio que ocasiona essa classificação como interação desfavorável. Há que se pensar, contudo, que num sistema móvel, a acomodação destas interações desfavoráveis é bastante provável sendo consequência do ajuste induzido. É interessante apontar que Jilková *et al.* (2021) descreve as interações com as águas como uma rede de solvatação, em razão de essas quatro águas de adsorção, com as quais as moléculas interagem no sítio, realizarem também interações com outras águas, formando uma rede que auxilia na estabilidade do ligante na cavidade, o que não

ocorre somente no caso do WRR-286 mas também de outros análogos. (JÍLKOVÁ et al., 2021)

Estudo de *docking* foi realizado partindo-se da conformação de melhor pontuação *FitValue* obtida no VS. Apesar de, como dito anteriormente, não ter sido possível obter uma curva de calibração para outros análogos vinilsulfônicos, o protocolo foi passível de utilização para o composto WRR-286. Este mesmo protocolo, descrito em 4.4.3, foi, então, utilizado para realizar os docking da RBF. Considerando-se a estrutura Mol_14, mais frequente e bem pontuada nos resultados de VS. Para o cálculo foi utilizada a proteína anteriormente preparada, todas as águas foram mantidas, a Cys100 foi utilizada como referência, a dimensão da cavidade foi estabelecida para 10 Å e a função de detectar cavidade foi selecionada. As funções de pontuação utilizadas para pontuar a corrida foram Goldscore, ChemPLP e ASP. A frequência de poses, melhor pontuação nas corridas e médio dos três melhores resultados (TOP3) então descritas na Tabela 20.







100% de frequência Melhor pontuação: 25.6887 Média TOP3: 25.3896

Para avaliar o comportamento dinâmico da RBF em complexo com a *Sm*CB1 foi realizada uma curta simulação de dinâmica molecular (DM), por 10 ns. para tanto, a *Sm*CB1 teve todas as águas derivadas da cristalização removidas e em seguida o sistema foi solvatado com uma caixa d'água ortorrômbica, contra-íons adicionados e o sistema minimizado antes de ser inserido no procedimento em cascata de simulação de DM.

A cascata de DM consistiu em duas etapas sequenciais de minimização energética, seguida de simulação de aquecimento do sistema de 50 a 300 K, equilibração do mesmo à esta temperatura e, por fim, produção da DM em si, considerando o sistema solvatado (solvente explícito), e ensemble NPT.

No primeiro estágio de minimização energética o algoritmo *Steepest Descent* (SD) é aplicado. Este algoritmo é utilizado inicialmente para solucionar contatos fracos sem ocasionar grandes distorções na estrutura de forma a encontrar um mínimo energético local. O cálculo foi realizado em 1000 passos com RMS de 1.0. No segundo estágio utilizou-se o algoritmo *Adopted Basis Newton-Raphson* (NR), geralmente utilizado após a resolução inicial dos contatos fracos pelo SD e partindo, assim, dos resultados de uma minimização anterior, sendo aplicado em coordenadas do subespaço vetorial da molécula de forma que a maior contribuição para a otimização geométrica é realizada pelo SD. O do NR cálculo foi realizado em 2000 passos com gradiente RMS 0.1. Os valores utilizados não podem ser demasiado elevados em razão de poder induzir distorção irreal da proteína, o que descaracterizaria a dinâmica.

Após a minimização energética é necessário passar pelo estágio de aquecimento do sistema, visto que quando minimizamos uma proteína é como se está se encontrasse numa temperatura próxima de zero, assim, o estágio de aquecimento é utilizado para elevar gradualmente a temperatura do sistema até a que se deseja trabalhar. O cálculo de

112

aquecimento do sistema foi realizado a cada 10 picossegundos (ps), com um tempo de 2 femtossegundos (fs) por passo e partindo de uma temperatura inicial de 50K até atingir a temperatura de 300K. A velocidade de ajuste da temperatura ocorreu a cada 50 passos.

Com o sistema aquecido inicia-se o estágio de equilibração, necessário para que o sistema esteja em equilíbrio na temperatura atingida, de forma que a energia do sistema esteja adequadamente distribuída em todos os graus de liberdade. Assim, equações de movimento são empregadas até que a estrutura esteja estável na temperatura estabelecida. Para a fase de equilibração utilizou o tempo de simulação de 50 ps, cada passo estando estabelecido em 2 fs numa faixa de temperatura de 300K com velocidade de frequência de ajuste desta a cada 50 passos.

Com o sistema equilibrado pode-se dar início a fase de produção da dinâmica molecular. Esta fase corro sob um conjunto de variáveis termodinâmicas dentro de dada temperatura. Para tanto realizou-se uma produção de 10 nanosegundos (ns), com passos de 2fs e coleta de informações para construção da trajetória nesta mesma frequência A temperatura do sistema ficou estabelecida na faixa de 300K com variáveis termodinâmicas de temperatura e pressão constantes. A DM total de 10 ns foi realizada partindo-se dos arquivos "*restart*" gerados a cada "minidinâmica" de 10 ps, por mais 9 simulações além da DM original. Os resultados de cada corrida foram unidos em um único arquivo trajetória que foi analisado para compreensão de aspectos estruturais, físico-químicos e energéticos do sistema em movimento.

Os resultados obtidos mostram que, já a 10 ns, o sistema se mostra relativamente estável, com um gradiente de energia total médio de 1,105 kcal/mol e de RMSD de 1,7 Å, como mostram os gráficos das Figuras 27 A e B.

Também foi considerada a variação da compactação da proteína ao longo da simulação de DM e, pode ser observado, por meio das medidas de Raio de Giro (YANG et al., 2017), que a proteína se manteve relativamente estável ao longo dos 10 ns, com variação de 2 Å no raio de giro total e ao longo dos eixos da estrutura (Figura 27 C). Há que se considerar, contudo, que um maior tempo de simulação poderia levar a uma maior estabilização do sistema e, este procedimento está, no momento, sendo executado pelo grupo, pois o tempo de máquina requerido é bastante superior ao disponível até a finalização deste documento.





A) Energia total durante a trajetória de 10 ns. As faixas vermelhas visam destacar o máximo e mínimo atingidos pelo complexo durante a fase de produção. B) Desvio RMSD durante a trajetória de 10 ns. As faixas vermelhas visam destacar o desvio mínimo e máximo durante a fase de produção. C) Raio de giro durante a trajetória de 10 ns.

A flutuação dos resíduos ao longo da trajetória foi, também, analisada por se considerar os valores de RMSF ao longo dos 10 ns e pode-se observar que os principais aminoácidos envolvidos em interações de hidrogênio ou hidrofóbicas identificados nos estudos de docking molecular, não são os que mais se movimentam ao longo da DM, mostrando que a presença do ligante pode levar a uma estabilização da proteína em uma conformação predominante. Os resíduos mais móveis incluíram His181, Lys183, Pro188, Lys192, Glu249, Asn253, Lys255, Lys260, Thr263, Glu265 e Lys282.



Figura 28 A) Desvio RMSF durante a trajetória de 10 ns. B) Proteína com coloração B-factor após trajetória de 10 ns. Tons ciano-esverdeados indicam pouca movimentação e trons amarelos, laranjas e avermelhados indicam movimentação elevada.

Pela análise dos valores de B-factor sobre a proteína, ainda, é possível verificar que as regiões que interagem com a RBF permanecem mais imóveis que regiões vizinhas ou mais afastadas da proteína, indicada pela coloração ciano-esverdeada. Regiões com maior flutuação aparecem nas colorações amarela e vermelha, como no N-terminal e algumas alças da estrutura (Figura 28 B).

Para compreender, contudo, se a interação com o ligante leva à maior estabilização da proteína, os dados acima precisariam ser confrontados com dados provenientes da simulação de DM da proteína isoladamente de forma que evidencie-se as interferências do ligante sobre a estrutura proteica. Esta abordagem do estudo encontra-se em desenvolvimento.

Outra abordagem realizada foi o estudo de interações da RBF em suas conformações de menor energia a cada 2,5 ns da trajetória total. As conformações estão dispostas na Tabela 21.



Tabela 21 Conformações de menor energia da RBF e suas interações com o sítio.

Estão dispotas nos frames 2240, 3020, 6640 e 7930 a conformação de menor energia e as interação realizadas pela RBF com o sítio catalítico da *Sm*CB1 a cada faixa de 2,5 ns da dinâmica molecular. As setas vermelhas no gráfico indicam os frames correspondentes às estruturas anteriores.

Os resíduos com os quais a RBF interage em suas conformações de menor energia são a Gln94, Gly98, Glu 142, Gly143, Ser191, Ile193, Leu267, Gly268 e Gly269. Dentre os quais a Gln94, Gly98, Gly143, Gly269 estão entre os resíduos pertencentes ao conjunto de *hotspots*.

A interação de maior frequência ocorre com a Ile193, já descrita anteriormente na análise de frequência de interações na Tabela 19 e que não está presente para a WRR-286. Em segundo lugar interação com a Glu142, também presente nas análises de frequência na Tabela 19, se repete em três das quatro conformações, mostrando-se relevante.

A RBF também interage com a Gly269 em duas das conformações apresentadas, quando não, interage com aminoácidos próximos como a Gly 268, e a Leu 267, está última sendo parte também das interações realizadas pela WRR-286. Interação com a Ser191 realizada pela RBF não é observada para a WRR-286, no entanto, a WRR-286 realiza interação com o Trp292, que não foi observado nas conformações de menor energia para a RBF, mas é próximo a Ser191.

Está abordagem, contudo, não revela a totalidade dos contatos existentes entre a RBF e a *Sm*CB1 e, também, não revela entre estes quais os de maior frequência durante toda trajetória de DM. Trata-se, porém, de uma abordagem preliminar, sendo necessária uma DM mais longa para a confirmação dos resultados obtidos, estudo que está em desenvolvimento.

Por fim, com vistas a testar a real potencialidade da RBF em exercer uma atividade esquistossomicida foram realizados ensaios in vitro para esta atividade biológica com o auxílio do grupo colaborador do trabalho, o Núcleo de Pesquisas em Doenças Negligenciadas, coordenado pelo Prof. Dr. Josué de Moraes. Os resultados obtidos são elencados na Tabela 22.

Grupo	Período de infecção (h)	Vermes mortos (%) [*]		Redução da motilidade (%)			
			-	Trivial		Significativa	
		Μ	F	Μ	F	Μ	F
	Imediato	0	0	0	0	0	0
Controle	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
	Imediato	0	0	0	0	0	0
0.5% DMSO	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
	Imediato	100	100	0	0	100	100
Praziquantel	24	100	100	0	0	100	100
2 μM	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
	Imediato	0	0	0	0	0	0
Riboflavina	24	100	100	0	0	100	100
50 µM	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
	Imediato	0	0	0	0	0	0
Riboflavina	24	30	100	0	0	30	100
25 μΜ	48	60	100	0	0	60	100
	72	60	100	0	0	60	100
	Imediato	0	0	0	0	0	0
Riboflavina	24	30	60	0	0	30	60
12.5 μM	48	30	100	0	0	30	100
	72	30	100	0	0	30	100
	Imediato	0	0	0	0	0	0
Riboflavina	24	0	0	0	0	0	0
6.25 μM	48	0	30	0	0	0	30
	72	0	30	0	0	0	30

Ensaio realizado em triplicata.

A atividade da RBF foi avaliada em parasitos adultos, macho e fêmea, nas concentrações de 50 μ M, 25 μ M, 12.5 μ M e 6.25 μ M, em triplicata. O ensaio foi monitorado nos períodos imediato, 24h, 48h e 72h e avaliado em termos de mortalidade e motilidade, esta última classificando a redução da motilidade em significativa ou trivial.

Nos ensaios a RBF não exerceu qualquer efeito imediato sobre os parasitos em qualquer das concentrações avaliadas. No entanto, a 50 µM ocasionou a morte de todos os

vermes num período de 24h. Para avaliar IC₅₀ o ensaio seguinte foi realizado a 25 μ M. Neste caso verifica-se que há divergência na atividade da RBF sob os vermes machos e fêmeas. A RBF ocasionou a morte de todas as fêmeas num período de 24h sob tal concentração. Os machos, porém, tiveram 30% de mortalidade, enquanto outros 30% sofreram redução de motilidade significativa nas 24h iniciais, ambos os valores subiram para 60% nos períodos de 48h e 72h.

Sob uma nova abertura de concentração na faixa de 12.5 μ M, observa-se novamente o mesmo efeito, porém, com uma redução inicial de atividade da RBF também sobre as fêmeas, havendo 30% de mortalidade e 30% de redução significativa na mortalidade no período de 24h. No entanto, nos períodos seguintes uma mortalidade de 100% foi novamente observada. No caso dos machos, houve redução significativa de motilidade para 30% dos parasitos em todos os períodos de monitoria, enquanto houve mortalidade de outros 30%.

Por fim, quando a concentração foi novamente reduzida à 6.25 μ M não houve mais atividade observável em relação aos machos em nenhum período do ensaio. As fêmeas também não foram afetadas nas primeiras 24h, porém, 30% de mortalidade foi observada enquanto outros 30% sofreram redução significativa de motilidade nos períodos subsequentes de 48h e 72h.

Pode-se levantar uma hipótese para explicar essa divergência de perfil exibida entre os vermes adultos nos ensaios *in vitro* da RBF, a partir dos estudos realizados por Liu *et al.* (2014) envolvendo a expressão gênica da complexa rede de proteases do *S. japonicum*. Suas análises envolveram as fases de desenvolvimento do parasito desde os ovos, passando pela cercaria, esquistossômulo e fase adulta dos vermes, avaliando também a diferença de expressão entre machos e fêmeas. (LIU et al., 2014)

Liu *et al.* (2014) encontrou uma gama de proteases que são ou predominantes nas fêmeas ou relativamente mais expressivas nas fêmeas do que nos machos, a saber, serino-proteases, aspartato-proteases e cisteína-proteases, dentre elas, eminentemente as catepsinas A (CAX69725.1), B (P43157.1), C (AAC32040.1), D (AAW24549.1) e L (AAW25356, CAX70514.1, sjp_0027020). Algumas dessas proteases não se mostram relevantes para nossa análise em razão de serem absolutamente predominantes nas fêmeas, como as catepsinas L, e não poderiam justificar o perfil presente nos estudos *in vitro*.

Outras, como as catepsinas D e A são aspartato-proteases e serina-proteases, respectivamente, e, portanto, filogenética, química e estruturalmente distantes da cisteínaproteases. É evidente que, apesar de partindo de um inibidor específico de catepsinas B1 de *S*. *mansoni*, como o WRR-286, poderia ser tangível apontar que outro inibidor, ainda mais uma vitamina, seria capaz de interferir com estas proteases. Não há até o momento, porém, qualquer relato na literatura que relacione a RBF a qualquer uma dessas catepsinas, inclusive a catepsina C.

Ahn *et al.* (2020) demonstraram que a RBF apresenta a mesma capacidade exibida para as estatinas e observada e relatada por Bai *et al.* (2018), mais especificamente a rosuvastatina, de ser capaz de interferir na expressão do inflamassoma NLRP3, o que explica sua atividade antiinflamatória. Bai *et al.* (2018), ainda, demonstraram que é por meio da inibição da catepsina B que ocorre essa disrupção na expressão do NLPR3. (AHN; LEE, 2020; BAI et al., 2018) Estes dados, em conjunto, são um forte indicativo da capacidade inibitória da RBF.

Assim, em termos de catepsinas B de *S. mansoni*, foi demonstrado por Liu *et al.* (2014) que a *Sj*CB1 e a *Sm*CB1 são filogeneticamente próximas em termos moleculares. Além disso, no que diz respeito ao perfil de expressão gênica da *Sj*CB1, quantificado por meio de rtPCR, esta pode ser caracterizada como tendo uma expressão progressivamente crescente desde o ovo até a fase adulta, sendo infrarregulada nos ovos, normalmente regulada nas cercarias, exibindo um padrão inalterado de expressão no *heatmap* apresentado por Liu *et al.*, e, por fim suprarregulada nos vermes adultos. O que, porém, diverge é que o gene que codifica a *Sj*CB1 é quantitativamente mais expresso nas fêmeas do que nos machos.

Os parasitos, porém, não expressam apenas esse tipo de catepsina B. A *Sj*CB2 e a *Sm*CB2 também são filogeneticamente próximas, mas, diferentemente das catepsinas B1, estas são expressas no tegumento dos parasitos. A *Sj*CB2, no entanto, exibe um padrão divergente de expressão em relação a *Sj*CB1 no que diz respeito às fases de desenvolvimento do parasito. A *Sj*CB2 é menos infrarregulado nos ovos do que nas cercarias, onde passa a ser mais expressiva, de forma idêntica a *Sj*CB1 nos esquistossomulos. Na fase adulta, porém, a expressão do gene nos machos é suprarregulado, enquanto nas fêmeas o padrão é oposto, ou seja, a *Sj*CB2 é pouco expressa em vermes fêmeas.

Assim, a atuação da RBF sobre a *Sm*CB1 acaba por ganhar evidências que fortalecem a hipótese levantada nesse trabalho.

Em termos de reposicionamento de fármaco a RBF, como uma vitamina, não oferece problemas importantes a serem considerados ou previsíveis por sua terapêutica atual. Não há toxicidade para a vitamina B2, ademais a mesma não se acumula no organismo, sendo excretada pela urina na medida em que não é convertida em seus cofatores e utilizada. Além disso, a RBF, possuindo atividade antiinflamatória, antioxidante, antinociceptiva e ainda sendo atuante na redução de formação de tecido fibroso poderia auxiliar no quadro clínico dos indivíduos infectados. A esquistossomose também está associada a anemia por perda de ferro, sendo a RBF, então, um possível agente no mecanismo de liberação de ferro das ferretinas, pode atuar como auxiliar na recuperação dos quadros anêmicos dos indivíduos infectados.

A RBF, portanto, tem potencial não só para auxiliar na cura clínica (cura dos sintomas) mas também de levar à cura parasitológica (desaparecimento dos vermes) visto que, em razão de sua maior atividade esquistossomicida sobre as fêmeas a RBF acabaria por interromper o ciclo biológico, o que inclui a oviposição, sendo os ovos os grandes responsáveis pelos sintomas decorrentes dessa doença.

Mais estudos, porém, ainda são necessários para avaliar se a captação de RBF é suficiente para, de fato, levar a cura, além de uma comprovação de atividade direta sobre a *Sm*CB1.

6 CONCLUSÕES

Pode-se concluir, dos resultados alcançados neste trabalho, que estudos de *docking* realizados na parte inicial deste trabalho permitiram uma análise mais aprofundada da REA entre os análogos vinilssulfônicos e a *Sm*CB1. A partir do estudo de REA foi possível modelar farmacóforos manuais similares aos obtidos, posteriormente, de forma automática, servindo a REA, além disso, como método complementar de análise desses últimos em termos de significância biológica das características presentes no modelo. Estudos de validação dos farmacóforos levaram a uma série de modelos com AUC > 0,8, suficientemente capazes de classificar compostos ativos e inativos numa proporção de 1:10 mimetizando as condições em que um composto ativo é encontrado na natureza, numa faixa de erro aceitável.

Por meio do VS foi possível selecionar fármacos da biblioteca do FDA com **potencial** capacidade de interagir com o sítio catalítico da *Sm*CB1, atuando como inibidores desta enzima. Os melhores resultados, selecionados por *fit value* e em termos de acomodação à cavidade enzimática, após serem elencados de acordo com sua classe terapêutica atual foram selecionados conforme seus perfis farmacocinético e toxicológico e considerando o uso para a helmintíase.

A RBF, em destaque neste estudo, mostrou-se capazes de interagir com *hotspots* da cavidade enzimática considerando-se as conformações obtidas por meio do VS. Além disso, obteve alta frequência em estudos de *docking* para três funções de pontuação diferentes e, também, mostrou-se capaz de estabilizar a enzima já a 10 ns em estudos de dinâmica molecular. A RBF, por fim, ao ser avaliada em ensaios *in vitro* mostrou-se ativa e capaz de causar a morte dos parasitos, com perfil de maior atividade sobre as fêmeas do que sobre os machos. Esta divergência no perfil exibida nos vermes adultos durantes os ensaios *in vitro* com a RBF pode ser associada ao estudo realizado por Liu *et al.* (2014), onde este demonstra a expressão da *Sm*CB1 é suprarregulada nas fêmeas, porém, muito menos expressa nos machos. Assim, a atuação da RBF sobre a *Sm*CB1 acaba por ganhar evidências que fortalecem a hipótese levantada nesse trabalho.

8 PERPECTIVAS

Os próximos passos deste estudo envolvem a conclusão dos estudos de dinâmica molecular, de forma que seja possível produzir uma trajetória de 100 ns bem como caracterizar o uso da RBF em estudos *in vivo* e, quiça, caracterizá-la como potencial agente terapêutico. Neste contexto há necessidade de se determinar as doses necessárias para atingir ação em organismos vivos, bem como os parâmetros farmacocinéticos dentro desta concentração requerida para a atividade esquistossomicida.

Compõe, ainda, as perspectivas deste trabalho realizar os estudos de ação direta sobre a enzima alvo, em si, por meio de estudos de cinética enzimática. Estes já estão em preparação, aguardando apenas a expressão da enzima em território brasileiro, trabalho este que conta com o apoio do grupo do Prof. Conor Caffrey e do Prof. Wagner Batista. Tão logo a tenhamos disponível, será possível dar continuidade a estes estudos.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLA M, LIM KC, SAJID M, MCKERROW JH, C. C. Schistosomiasis Mansoni: Novel Chemotherapy Using a Cysteine Protease Inhibitor. **PLoS Medicine**, v. 4, n. 1, p. 130–138, 2007.

ABDULLA, M. H. et al. Schistosomiasis mansoni: Novel chemotherapy using a cysteine protease inhibitor. **PLoS Medicine**, v. 4, n. 1, p. 0130–0138, 2007.

ABOU-EL-NAGA, I. F. Schistosoma mansoni sarco/endoplasmic reticulum Ca2+ ATPases (SERCA): role in reduced sensitivity to praziquantel. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 52, n. 5, p. 397–408, 17 out. 2020.

AHN, H.; LEE, G.-S. Riboflavin, vitamin B2, attenuates NLRP3, NLRC4, AIM2, and non-canonical inflammasomes by the inhibition of caspase-1 activity. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 19091, 5 dez. 2020.

ALAVI, S. E.; EBRAHIMI SHAHMABADI, H. Anthelmintics for drug repurposing: Opportunities and challenges. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 29, n. 5, p. 434–445, maio 2021.

ALENCAR, A. C. M. DE B. et al. Simvastatin and artesunate impact the structural organization of adult Schistosoma mansoni in hypercholesterolemic mice. **Experimental Parasitology**, v. 167, p. 115–123, ago. 2016.

ALFONSO, Y.; MONZOTE, L. HIV Protease Inhibitors: Effect on the Opportunistic Protozoan Parasites. **The Open Medicinal Chemistry Journal**, v. 5, p. 40–50, 9 mar. 2011.

ALTAF, A. et al. NLRP3 inflammasome in peripheral blood monocytes of acute coronary syndrome patients and its relationship with statins. **Coronary Artery Disease**, v. 26, n. 5, p. 409–421, ago. 2015.

ARAÚJO, N. et al. Oxamniquine, praziquantel and lovastatin association in the experimental Schistosomiasis mansoni. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 450–454, ago. 2008.

ASHOORI, M.; SAEDISOMEOLIA, A. Riboflavin (vitamin B 2) and oxidative stress: a review. **British Journal of Nutrition**, v. 111, n. 11, p. 1985–1991, 14 jun. 2014.

BAI, H. et al. Cathepsin B links oxidative stress to the activation of NLRP3 inflammasome. **Experimental Cell Research**, v. 362, n. 1, p. 180–187, 2018.

BARR, S. C. et al. A Cysteine Protease Inhibitor Protects Dogs from Cardiac Damage during Infection by Trypanosoma cruzi. v. 49, n. 12, p. 5160–5161, 2005.

BARTOW, R. A.; BROGDEN, R. N. Formoterol. Drugs, v. 55, n. 2, p. 303-322,

1998.

BERGER, W. E. The use of inhaled formoterol in the treatment of asthma. Annals of Allergy, Asthma & Immunology, v. 97, n. 1, p. 24–33, jul. 2006.

BERTOLLO, C. M. et al. Characterization of the antinociceptive and antiinflammatory activities of riboflavin in different experimental models. **European Journal of Pharmacology**, v. 547, n. 1–3, p. 184–191, out. 2006.

BIOVIA, D. S. Discovery StudioSan DiegoDassault Systèmes, , 2021.

BOLOGA, C. G.; URSU, O.; OPREA, T. I. How to prepare a compound collection prior to virtual screening. **Methods in Molecular Biology**, v. 1939, n. January, p. 119–138, 2019.

BOU-ABDALLAH, F. et al. Reductive Mobilization of Iron from Intact Ferritin: Mechanisms and Physiological Implication. **Pharmaceuticals**, v. 11, n. 4, p. 120, 5 nov. 2018.

BROWN, A. S.; PATEL, C. J. A review of validation strategies for computational drug repositioning. **Briefings in Bioinformatics**, v. 19, n. 1, p. 174–177, 2018.

BURGGRAAFF, L. et al. Successive Statistical and Structure-Based Modeling to Identify Chemically Novel Kinase Inhibitors. Journal of chemical information and modeling, v. 60, n. 9, p. 4283–4295, 28 set. 2020.

CHEN et al. Improvement of Mitochondrial Activity and Fibrosis by Resveratrol Treatment in Mice with Schistosoma japonicum Infection. **Biomolecules**, v. 9, n. 11, p. 658, 25 out. 2019.

CHEN, G.-Z.; FOSTER, L.; BENNETT, J. Antischistosomal action of mevinolin: evidence that 3-hydroxy-methylglutaryl-coenzyme a reductase activity in Schistosoma mansoni is vital for parasite survival. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 342, n. 4, out. 1990.

CHENG, T. et al. Structure-based virtual screening for drug discovery: A problemcentric review. **AAPS Journal**, v. 14, n. 1, p. 133–141, 2012.

CHOFFNES, E. R.; RELMAN, D. A.; MICROBIAL, F. The Causes and Impacts of Neglected Tropical and Zoonotic Diseases. Washington, D.C.: National Academies Press, 2011.

CIOLI, D. et al. Schistosomiasis control: Praziquantel forever? Molecular and Biochemical Parasitology, v. 195, n. 1, p. 23–29, 2014.

CLARK, A. M.; LABUTE, P. 2D Depiction of Protein–Ligand Complexes. Journal of Chemical Information and Modeling, v. 47, n. 5, p. 1933–1944, 24 set. 2007.

CLEVES, A. E.; JAIN, A. N. Structure-and Ligand-Based Virtual Screening on DUD-

E + : Performance Dependence on Approximations to the Binding Pocket. 2020.

CORRENTI, J. M.; BRINDLEY, P. J.; PEARCE, E. J. Long-term suppression of cathepsin B levels by RNA interference retards schistosome growth. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 209–215, 2005.

CR, C.; A., R. Cathepsin B-like activity predominates over cathepsin L-like activity in adult Schistosoma mansoni and S. japonicum. **Parasitology research**, v. 83, n. 6, p. 632–635, 1997.

CURWEN, R. S.; WILSON, R. A. Invasion of skin by schistosome cercariae: Some neglected facts. Trends in Parasitology, v. 19, n. 2, p. 63–66, 2003.

DAVIDSON, R. N. Leishmaniasis. In: Infectious Diseases. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 1059-1064.e1.

DAVIDSON, R. N.; DEN BOER, M.; RITMEIJER, K. Paromomycin. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 103, n. 7, p. 653–660, jul. 2009.

DE OLIVEIRA, R. G. Meanings of neglected diseases in the global health agenda: The place of populations and territories. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 23, n. 7, p. 2291–2302, 2018.

DOENHOFF, M. J. et al. Resistance of Schistosoma mansoni to praziquantel: is there a problem? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 5, p. 465–469, set. 2002.

EHRLICH, P. Über den jetzigen Stand der Chemotherapie. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, v. 42, n. 1, p. 17–47, jan. 1909.

FALLON, P. G.; DOENHOFF, M. J. Drug-Resistant Schistosomiasis: Resistance to Praziquantel and Oxamniquine Induced in Schistosoma Mansoni in Mice is Drug Specific. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, n. 1, p. 83–88, 1 jul. 1994.

FANFRLÍK, J. et al. Quantum Mechanics-Based Scoring Rationalizes the Irreversible Inactivation of Parasitic Schistosoma mansoni Cysteine Peptidase by Vinyl Sulfone Inhibitors. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, n. 48, p. 14973–14982, 5 dez. 2013.

FAULDS, D.; HOLLINGSHEAD, L. M.; GOA, K. L. Formoterol. **Drugs**, v. 42, n. 1, p. 115–137, jul. 1991.

FAWCETT, T. An introduction to ROC analysis. **Pattern Recognition Letters**, v. 27, n. 8, p. 861–874, jun. 2006.

FONSECA, N. C. et al. Synthesis of a Sugar-Based Thiosemicarbazone Series and Structure-Activity Relationship versus the Parasite Cysteine Proteases Rhodesain, Cruzain, and Schistosoma mansoni Cathepsin B1. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 59, n. 5, p. 2666–2677, maio 2015.

Fosamprenavir. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31643343>.

FOURCHES, D.; MURATOV, E.; TROPSHA, A. Trust, but verify: On the importance of chemical structure curation in cheminformatics and QSAR modeling research. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 50, n. 7, p. 1189–1204, 2010.

FOURCHES, D.; MURATOV, E.; TROPSHA, A. Trust, but Verify II: A Practical Guide to Chemogenomics Data Curation. Journal of Chemical Information and Modeling, v. 56, n. 7, p. 1243–1252, 2016.

GERBER, P. R.; MÜLLER, K. MAB, a generally applicable molecular force field for structure modelling in medicinal chemistry. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 9, n. 3, p. 251–268, jun. 1995.

GIANCASPERO, T. A. et al. Remaining challenges in cellular flavin cofactor homeostasis and flavoprotein biogenesis. **Frontiers in Chemistry**, v. 3, n. APR, p. 1–14, 22 abr. 2015.

GILSON, M. K. et al. BindingDB in 2015: A public database for medicinal chemistry, computational chemistry and systems pharmacology. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D1045–D1053, 2016.

GOMES CASAVECHIA, M. T. et al. Systematic review and meta-Analysis on Schistosoma mansoni infection prevalence, and associated risk factors in Brazil. **Parasitology**, v. 145, n. 8, p. 1000–1014, 2018.

GOUVEIA, M. J. et al. The antioxidants resveratrol and N-acetylcysteine enhance anthelmintic activity of praziquantel and artesunate against Schistosoma mansoni. **Parasites** & Vectors, v. 12, n. 1, p. 309, 20 dez. 2019.

GREMBECKA, M. Sugar alcohols—their role in the modern world of sweeteners: a review. **European Food Research and Technology**, v. 241, n. 1, p. 1–14, 28 jul. 2015.

HAACK, T. B. et al. Impaired riboflavin transport due to missense mutations in SLC52A2 causes Brown-Vialetto-Van Laere syndrome. Journal of Inherited Metabolic Disease, v. 35, n. 6, p. 943–948, 3 nov. 2012.

HAAS, W.; HAEBERLEIN, S. Penetration of cercariae into the living human skin: Schistosoma mansoni vs. Trichobilharzia szidati. **Parasitology Research**, v. 105, n. 4, p. 1061–1066, 2009. HORN, M. et al. Mapping the Pro-Peptide of the Schistosoma mansoni Cathepsin B1 Drug Target: Modulation of Inhibition by Heparin and Design of Mimetic Inhibitors. **ACS Chemical Biology**, v. 6, n. 6, p. 609–617, 17 jun. 2011.

HOUWELING, T. A. J. et al. Socioeconomic Inequalities in Neglected Tropical Diseases: A Systematic Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 5, p. 1–28, 2016.

HUANG, H. The Redox Biology of Schistosome Parasites and Applications for Drug Development. **Current Pharmaceutical Design**, p. 3595–3611, 2012.

INC, C. C. G. Molecular Operating Environment. 2019.

Indinavir. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31643985>.

JILKOVA, A. REZACOVA, P. BRYNDA, J. MARES, M. **wwPDB: 50GR**. Disponível em: https://www.wwpdb.org/pdb?id=pdb 000050gr>. Acesso em: 4 nov. 2020.

JÍLKOVÁ, A. et al. Structural Basis for Inhibition of Cathepsin B Drug Target from the Human Blood Fluke, Schistosoma mansoni*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 41, p. 35770–35781, 14 out. 2011.

JILKOVÁ, A. et al. Activation Route of the Schistosoma mansoni Cathepsin B1 Drug Target: Structural Map with a Glycosaminoglycan Switch. **Structure**, v. 22, n. 12, p. 1786– 1798, dez. 2014.

JÍLKOVÁ, A. et al. Druggable Hot Spots in the Schistosomiasis Cathepsin B1 Target Identified by Functional and Binding Mode Analysis of Potent Vinyl Sulfone Inhibitors. **ACS Infectious Diseases**, v. 7, n. 5, p. 1077–1088, 14 maio 2021.

JORDAN, PETER, WEBBE, G. Human schistosomiasis. London: William Heinemann Medical Books Ltd., 1969.

KATZ, N.; LMEIDA, K. Esquistossomose, Xistosa, Barriga D'água. Cienc. Cult, v. 55, n. 1, p. 38–41, 2003.

KING, C. H.; DICKMAN, K.; TISCH, D. J. Reassessment of the cost of chronic helmintic infection: a meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis. **The Lancet**, v. 365, n. 9470, p. 1561–1569, abr. 2005.

KIRCHMAIR, J. et al. Evaluation of the performance of 3D virtual screening protocols: RMSD comparisons, enrichment assessments, and decoy selection - What can we learn from earlier mistakes? Journal of Computer-Aided Molecular Design, v. 22, n. 3–4, p. 213–228, 2008.

KNIGHT, J.; CASELDINE, C.; BOYKOFF, M. T. Biological Effects of Resveratrol. **Geographical Journal**, v. 176, n. 3, p. 267–269, 2 ago. 2010.

KRENZELOK, E. Sorbitol — a safe and effective cathartic. Annals of Emergency Medicine, v. 16, n. 6, p. 729–730, jun. 1987.

KUHLMANN, F. M.; FLECKENSTEIN, J. M. Antiparasitic Agents. In: Infectious Diseases. Fourth Edi ed. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 1345-1372.e2.

LA FLAMME, A. C. et al. Chronic exposure to schistosome eggs reduces serum cholesterol but has no effect on atherosclerotic lesion development. **Parasite Immunology**, v. 29, n. 5, p. 259–266, maio 2007.

LABUTE, P. LowModeMD—Implicit Low-Mode Velocity Filtering Applied to Conformational Search of Macrocycles and Protein Loops. Journal of Chemical Information and Modeling, v. 50, n. 5, p. 792–800, 24 maio 2010.

LAGO, E. M. et al. Antischistosomal agents: state of art and perspectives. Future Medicinal Chemistry, v. 10, n. 1, p. 89–120, jan. 2018.

LAURA SBARAGLINI, M. et al. Neglected Tropical Protozoan Diseases: Drug Repositioning as a Rational Option. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 19, p. 2201–2222, 2016.

LAVECCHIA, A.; GIOVANNI, C. Virtual Screening Strategies in Drug Discovery: A Critical Review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 23, p. 2839–2860, 1 jun. 2013.

LENZI, H. L. et al. Migração e Desenvolvimento de Schistosoma mansoni no Hospedeiro Definitivo. In: Schistosoma mansoni & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2008. p. 87–145.

LIMA-CAMARA, T. N. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 50, p. 1–7, 2016.

LIONTA, E. et al. Structure-based virtual screening for drug discovery: principles, applications and recent advances. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 16, p. 1923–1938, 2014.

LIU, S. et al. Expression Profile of the Schistosoma japonicum Degradome Reveals Differential Protease Expression Patterns and Potential Anti-schistosomal Intervention Targets. **PLoS Computational Biology**, v. 10, n. 10, p. e1003856, 2 out. 2014.

MA, D. L.; CHAN, D. S. H.; LEUNG, C. H. Drug repositioning by structure-based virtual screening. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 5, p. 2130–2141, 2013.

MCMANUS, D. P. et al. Schistosomiasis. Nature Reviews Disease Primers, v. 4, n. 1, p. 13, 9 dez. 2018.

MENGARDA, A. C. et al. Antiparasitic activity of piplartine (piperlongumine) in a mouse model of schistosomiasis. Acta Tropica, v. 205, n. December 2019, p. 105350, 2020.

MITRA, A. K.; MAWSON, A. R. Neglected tropical diseases: Epidemiology and global burdenTropical Medicine and Infectious Disease, 2017. Disponível em: http://www.mdpi.com/2414-6366/2/3/36

MORRONE, J. A. et al. Combining Docking Pose Rank and Structure with Deep Learning Improves Protein-Ligand Binding Mode Prediction over a Baseline Docking Approach. Journal of chemical information and modeling, v. 60, n. 9, p. 4170–4179, 28 set. 2020.

MURATA, M. et al. Novel epoxysuccinyl peptides Selective inhibitors of cathepsin B, in vitro. **FEBS Letters**, v. 280, n. 2, p. 307–310, 25 mar. 1991.

MYSINGER, M. M. et al. Directory of Useful Decoys, Enhanced (DUD-E): Better Ligands and Decoys for Better Benchmarking. Journal of Medicinal Chemistry, v. 55, n. 14, p. 6582–6594, 26 jul. 2012.

NELWAN, M. L. Schistosomiasis: Life Cycle, Diagnosis, and Control. Current Therapeutic Research, v. 91, n. 24, p. 5–9, 2019.

OLVEDA, D. U.; MCMANUS, D. P.; ROSS, A. G. P. Mass drug administration and the global control of schistosomiasis: Successes, limitations and clinical outcomes. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 29, n. 6, p. 595–608, 2016.

PAL, S. et al. Ligand-based Pharmacophore Modeling, Virtual Screening and Molecular Docking Studies for Discovery of Potential Topoisomerase I Inhibitors. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 17, p. 291–310, 2019.

PANIC, G. et al. Repurposing drugs for the treatment and control of helminth infections. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance, v. 4, n. 3, p. 185–200, dez. 2014.

PATIDAR, K. R.; BAJAJ, J. S. Antibiotics for the treatment of hepatic encephalopathy. **Metabolic Brain Disease**, v. 28, n. 2, p. 307–312, 8 jun. 2013.

PICCIRILLO, E.; DO AMARAL, A. T. Virtual screening of bioactive compounds: Concepts and aplications. **Quimica Nova**, v. 41, n. 6, p. 662–677, 2018.

PIRHADI, S.; SHIRI, F.; GHASEMI, J. B. Methods and Applications of Structure Based Pharmacophores in Drug Discovery. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 9, p. 1036–1047, 2013.

POWERS, H. J. Riboflavin (vitamin B-2) and health. The American Journal of Clinical Nutrition, v. 77, n. 6, p. 1352–1360, 1 jun. 2003.

QI, L.; CUI, J. A Schistosomiasis Model with Praziquantel Resistance. Discrete Dynamics in Nature and Society, v. 2013, p. 1–13, 2013.

RÉAU, M. et al. Decoys selection in benchmarking datasets: Overview and perspectives. Frontiers in Pharmacology, v. 9, n. JAN, 2018.

RIPPHAUSEN, P.; NISIUS, B.; BAJORATH, J. State-of-the-art in ligand-based virtual screening. **Drug Discovery Today**, v. 16, n. 9–10, p. 372–376, 2011.

ROJO-ARREOLA, L. et al. Chemical and Genetic Validation of the Statin Drug Target to Treat the Helminth Disease, Schistosomiasis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e87594, 29 jan. 2014.

ROMERO-PÉREZ, A. I. et al. Piceid, the Major Resveratrol Derivative in Grape Juices. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 47, n. 4, p. 1533–1536, abr. 1999.

ROQUINI, D. B. et al. Promethazine exhibits antiparasitic properties in vitro and reduces worm burden, egg production, hepatomegaly, and splenomegaly in a schistosomiasis animal model. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 63, n. 12, 2019.

SAID, H. M. et al. Riboflavin uptake by human-derived colonic epithelial NCM460 cells. American Journal of Physiology - Cell Physiology, v. 278, n. 2 47-2, p. 270–276, 2000.

SAID, H. M. Intestinal absorption of water-soluble vitamins in health and disease. **Biochemical Journal**, v. 437, n. 3, p. 357–372, 1 ago. 2011.

SAJID, M. et al. Functional expression and characterization of Schistosoma mansoni cathepsin B and its trans-activation by an endogenous asparaginyl endopeptidase. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 131, n. 1, p. 65–75, 2003.

SANCHES, S. C. et al. Riboflavin (vitamin B-2) reduces hepatocellular injury following liver ischaemia and reperfusion in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 67, p. 65–71, maio 2014.

SHAPIRO, T. A.; TALALAY, P. Schistosoma mansoni: Inhibition of glucosephosphate isomerase and glycolysis by sugar phosphates. **Experimental Parasitology**, v. 54, n. 2, p. 196–201, out. 1982.

SOLIMAN, R. H. et al. Resveratrol ameliorates oxidative stress and organ dysfunction in Schistosoma mansoni infected mice. **Experimental Parasitology**, v. 174, p. 52–58, mar. 2017.

SOSA, N. et al. Topical paromomycin for New World cutaneous leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 5, p. e0007253, 2019.

SPECTOR, H. et al. THE RÔLE OF RIBOFLAVIN IN BLOOD REGENERATION. Journal of Biological Chemistry, v. 150, n. 1, p. 75–87, set. 1943.

TESCHEMACHER, A.; LEMOINE, H. Kinetic analysis of drug-receptor interactions

of long-acting beta2 sympathomimetics in isolated receptor membranes: evidence against prolonged effects of salmeterol and formoterol on receptor-coupled adenylyl cyclase. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, v. 288, n. 3, p. 1084–92, mar. 1999.

TOKARSKI, J. S.; HOPFINGER, A. J. Constructing Protein Models for Ligand–Receptor Binding Thermodynamic Simulations: An Application to a Set of Peptidometic Renin Inhibitors. Journal of Chemical Information and Computer Sciences, v. 37, n. 4, p. 779–791, jul. 1997.

TURRA, K. M. et al. Molecular modeling approach to predict a binding mode for the complex methotrexate-carboxypeptidase G2. Journal of Molecular Modeling, v. 18, n. 5, p. 1867–1875, 25 maio 2012.

VANDEWAA, E. A. et al. Physiological role of HMG-CoA reductase in regulating egg production by Schistosoma mansoni. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, v. 257, n. 3, p. R618–R625, 1 set. 1989.

VOET, A. et al. Pharmacophore modeling: advances, limitations, and current utility in drug discovery. Journal of Receptor, Ligand and Channel Research, v. 7, p. 81, nov. 2014.

WASILEWSKI, MM, LIMB, KC, PHILLIPS, J., MCKERROW, J. Cysteine protease inhibitors block schistosome hemoglobin degradation in vitro and decrease worm burden and egg production in vivo. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 81, p. 179–189, 1996.

WIWANITKIT, V. Interest in paromomycin for the treatment of visceral leishmaniasis (Kala-azar). **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 8, p. 323–328, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Schistosomiasis and soiltransmitted helminthiases: numbers of people treated in 2017. v. 93, n. 50, p. 681–692, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Schistosomiasis. Fact sheet 115.

YAMAMOTO, S. et al. Identification and Functional Characterization of Rat Riboflavin Transporter 2. Journal of Biochemistry, v. 145, n. 4, p. 437–443, 3 jan. 2009.

YANG, L. et al. Binding of hydroxylated polybrominated diphenyl ethers with human serum albumin: Spectroscopic characterization and molecular modeling. Luminescence, v. 32, n. 6, p. 978–987, set. 2017.

YONEZAWA, A. et al. Identification and functional characterization of a novel human and rat riboflavin transporter, RFT1. American Journal of Physiology-Cell Physiology, v. 295, n. 3, p. C632–C641, set. 2008.

Encarte com estruturas dos análogos de Jilková et al. (2011)



Nome do Composto		Inibição								
Vinilsulfona	R3	R2	R1	R1'	IC50 (nM)					
WRR-286	N-Mpip	Phe	Hph	NH-O-CH ₂ -Ph	0.61±0.05					
K11017	Mu	Leu	Hph	Ph	1.71±0.13					
K11002	Mu	Phe	Hph	Ph	1.73±0.21					
WRR-282	N-Mpip	Phe	Hph	CH2-Ph	2.02 ± 0.10					











11 APÊNDICE B

11.1 Farmacóforo 01


























11.4 Farmacóforo 09





Afatinibe





3,76992







11.5 Farmacóforo 10

