



Universidade Federal do Rio de Janeiro  
*Campus* Professor Aloísio Teixeira  
Curso de Farmácia



Docking molecular e estudo da relação estrutura atividade de potenciais inibidores da enzima Purina Nucleosídeo Fosforilase de *Trichomonas vaginalis*

Mayara Louback Klein

Macaé  
Novembro de 2014

Mayara Louback Klein

Docking molecular e estudo da relação estrutura atividade de potenciais inibidores da enzima Purina Nucleosídeo Fosforilase de *Trichomonas vaginalis*.

Monografia Apresentada ao  
Curso de Farmácia da  
Universidade Federal do Rio de  
Janeiro como um dos requisitos  
para a obtenção do título de  
Farmacêutico.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Magdalena Nascimento Rennó.

Macaé  
Novembro de 2014

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus por ter me sustentado e mostrado como seguir esse caminho que me levou a concluir mais uma etapa da minha vida.

Aos meus queridos e amados pais, Luiz Carlos e Ana Márcia, por todo amor e dedicação que sempre tiveram comigo, investindo em mim o seu melhor. Meu eterno agradecimento pelos momentos em que estiveram ao meu lado, me apoiando e me fazendo acreditar que essa conquista era possível.

Ao meu amado marido Geovane, por todo amor, carinho, compreensão e cumplicidade que me cercaram durante toda essa trajetória, me apoiando nos momentos difíceis e comemorando comigo em todas as alegrias.

Aos meus irmãos, Luiz Filipe e Emily, por todo apoio e carinho durante toda essa caminhada.

Aos meus avós e tios, em especial, à minha tia Rosi, que se fez presente em todos os momentos, me aconselhando e sempre me motivando com seus ensinamentos.

À minha querida orientadora, Magdalena Nascimento Rennó, por ser um exemplo no qual tentei me espelhar desde o segundo período de faculdade e que muito me ensinou durante toda a realização desse trabalho. Muito obrigada pela sua dedicação, exigência, disponibilidade e apoio que tornaram possível a conclusão desta monografia.

Aos amigos que fiz durante o curso, pela verdadeira amizade que construímos, por toda a companhia ao longo desses tantos anos, que tornaram essa trajetória singular.

Aos meus amigos de Nova Friburgo, que durante esse tempo tiveram que compreender a minha ausência.

Aos colegas do Laboratório de Modelagem Molecular e Pesquisa em Ciências Farmacêuticas (LaMCiFar), por todos os momentos compartilhados em nosso ambiente de pesquisa.

À Professora Paula Abreu, por ter sido minha co-orientadora em outros projetos que muito contribuíram para minha formação.

Aos demais professores e colaboradores do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro – *Campus* Aloísio Teixeira.

À Fundação Educacional de Macaé, por ter concedido uma bolsa durante parte da minha iniciação científica.

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica / UFRJ (PIBIC), por ter concedido uma bolsa de iniciação durante a execução deste trabalho.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b>	Estrutura química do metronidazol	5
<b>Figura 2</b>	Estrutura química de derivados nitroimidazólicos utilizados no tratamento da tricomoníase A) tinidazol B) secnidazol;	6
<b>Figura 3</b>	Reação bioquímica catalisada pela enzima Purina Nucleosídeo Fosforilase.	8
<b>Figura 4</b>	Estruturas químicas dos principais substratos da enzima PNP. A) Adenosina B) Inosina C) Guanosina.	9
<b>Figura 5</b>	Estruturas químicas de potenciais inibidores da enzima PNP. A) 2-desoxi-inosina; B) 7-desaguanina; C) 2-mercapto-4(3H)-quinazolinona; D) 8-azaguanina; E) Formicina A; F) SerMe-Immucillin H; G) DadMe-Immucillin A.	10
<b>Figura 6</b>	Estruturas químicas de fármacos. A) Alopurinol; B) 5-Fluoracil.	11
<b>Figura 7</b>	A) Estrutura 3D da enzima PNP de <i>T. vaginalis</i> em complexo com o inibidor DadMe-immucillin A; B) Estrutura 3D da enzima PNP de <i>H. sapiens</i> em complexo com o inibidor SerMe-immucillin H.	21
<b>Figura 8</b>	Classificação do tipo dos resíduos de aminoácidos que compõem o sítio ativo da enzima e PNP de <i>T. vaginalis</i> , classificados de acordo com o tipo. Os resíduos polares foram representados na cor amarela, os não-polares na cor cinza.	23
<b>Figura 9</b>	Classificação dos tipos de resíduos de aminoácidos que compõem o sítio ativo da enzima e PNP de <i>H. sapiens</i> , classificados de acordo com o tipo. Os resíduos polares foram representados na cor amarela, os não-polares na cor cinza, os ácidos na cor vermelha e os básicos na cor azul.	24
<b>Figura 10</b>	Risco de mutagenicidade, tumorigenicidade, efeito irritante e efeito na reprodução de potenciais inibidores da enzima PNP de <i>H. sapiens</i> .	31
<b>Figura 11</b>	Perfil <i>druglikeness</i> dos fármacos e potenciais inibidores da enzima PNP.	32
<b>Figura 12</b>	Perfil <i>drugscore</i> dos fármacos e potenciais inibidores da enzima PNP.	33

<b>Figura 13</b>	A) Visualização da estrutura tridimensional da enzima PNP de <i>T. vaginalis</i> com a sobreposição entre a conformação do imucillin A obtida com o redocking (AMARELO) e a estrutura do cristal (azul). B) Sobreposição entre a conformação do imucillin A obtida com o <i>redocking</i> (amarelo) e a estrutura do cristal (azul).	35
<b>Figura 14</b>	Análise das interações do ligante DADMe-immucillin A com os aminoácidos do sítio ativo da enzima PNP de <i>T. vaginalis</i> .	35
<b>Figura 15</b>	A) Visualização da estrutura tridimensional da enzima PNP de <i>H. sapiens</i> com a sobreposição entre a conformação do SerMe-immucillin H obtida com o redocking (AMARELO) e a estrutura do cristal (azul). B) Sobreposição entre a conformação do SerMe-immucillin H obtida com o <i>redocking</i> (AMARELO) e a estrutura do cristal (AZUL).	37
<b>Figura 16</b>	Análise das interações do ligante imucilina-H com os aminoácidos do sítio ativo da enzima PNP de <i>H. sapiens</i> .	38
<b>Figura 17</b>	Resultado do <i>docking</i> para o substrato inosina nas enzimas PNP de <i>H. sapiens</i> (A) e PNP de <i>T. vaginalis</i> (B).	40
<b>Figura 18</b>	Resultado do <i>docking</i> molecular realizado com o inibidor 2-desoxi-inosina. A) Enzima PNP de <i>H. sapiens</i> B) Enzima PNP de <i>T.vaginalis</i> .	44
<b>Figura 19</b>	Resultado do <i>docking</i> molecular realizado com o inibidor 7-desazaguanina. A) Enzima PNP de <i>H. sapiens</i> . B) Enzima PNP de <i>T.vaginalis</i> .	45
<b>Figura 20</b>	Resultado do <i>docking</i> molecular realizado com o inibidor MQU. A) Enzima PNP de <i>H. sapiens</i> . B) Enzima PNP de <i>T.vaginalis</i> .	46
<b>Figura 21</b>	Resultado do <i>docking</i> molecular realizado com o inibidor 8-azaguanina. A) Enzima PNP de <i>H. sapiens</i> . B) Enzima PNP de <i>T.vaginalis</i> .	47
<b>Figura 22</b>	Resultado do <i>docking</i> molecular realizado com o inibidor formicina A. A) Enzima PNP de <i>H. sapiens</i> . B) Enzima PNP de <i>T.vaginalis</i> .	48
<b>Figura 23</b>	Resultado do <i>docking</i> molecular realizado com o fármaco alopurinol. A) Enzima PNP de <i>H. sapiens</i> B) Enzima PNP de <i>T.vaginalis</i> .	49
<b>Figura 24</b>	Resultado do <i>docking</i> molecular realizado com o fármaco 5-fluorouracil. A) Enzima PNP de <i>H. sapiens</i> B) Enzima PNP de <i>T.vaginalis</i> .	50

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b>	Interações estabelecidas entre os resíduos de aminoácidos e o ligante nas enzimas PNP de <i>T. vaginalis</i> e PNP de <i>H. sapiens</i> .	22
<b>Tabela 2</b>	Classificação e características dos resíduos de aminoácidos que compõem o sítio ativo da enzima PNP de <i>T. vaginalis</i> .	25
<b>Tabela 3</b>	Classificação e características dos resíduos de aminoácidos que compõem o sítio ativo da enzima PNP de <i>H. sapiens</i> .	27
<b>Tabela 4</b>	Estruturas químicas de potenciais inibidores e substratos da enzima PNP.	28
<b>Tabela 5</b>	Comparação dos descritores estereoelétricos dos fármacos: peso molecular (PM), lipofilicidade, solubilidade, área de superfície, número de grupamentos doadores e aceptores de ligações de hidrogênio, número de ligações rotacionáveis na estrutura, volume e número de violações da regra de Lipinski.	30
<b>Tabela 6</b>	Descrição dos resíduos de aminoácidos que interagiram com o ligante DadMe-immucillin A no <i>redocking</i> na enzima PNP de <i>T. vaginalis</i> .	36
<b>Tabela 7</b>	Descrição dos resíduos de aminoácidos que interagiram com o ligante SerMe-immucillin H no <i>redocking</i> na enzima PNP de <i>H. sapiens</i> .	38
<b>Tabela 8</b>	Interações obtidas através do docking molecular substratos adenosina, inosina e guanosina com a enzima PNP de <i>T. vaginalis</i> e PNP de <i>H. sapiens</i> .	41
<b>Tabela 9</b>	Interações obtidas através do <i>docking</i> molecular dos potenciais inibidores com a enzima PNP de <i>T. vaginalis</i> e PNP de <i>H. sapiens</i> .	43

## Lista de Abreviações

<b>DST</b>	Doença Sexualmente Transmissível
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>PFOR</b>	Piruvato Ferredoxina Oxido-Redutase
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>HIV</b>	Vírus de Imunodeficiência Humana
<b>PNP</b>	Purina Nucleosídeo Fosforilase
<b>dGTP</b>	2-desoxiguanosina trifosfato
<b>Pi</b>	Fosfato Inorgânico
<b>MQU</b>	2-mercapto-4(3H)-quinazolinona
<b>TvPNP</b>	Purina Nucleosídeo Fosforilado de <i>Trichomonas vaginalis</i>
<b>HsPNP</b>	Purina Nucleosídeo Fosforilado de <i>Homo sapiens</i>
<b>PDB</b>	Protein Data Bank
<b>LogP</b>	Lipofilicidade
<b>LogS</b>	Solubilidade
<b>RMSD</b>	Desvio da Raiz Quadrada Média



## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1. A Tricomoníase .....	1
1.2. O parasita: <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	2
1.3. O Diagnóstico da Tricomoníase .....	3
1.4. O Tratamento da Tricomoníase .....	5
1.5. A Tricomoníase e o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) .....	6
1.6. A enzima Purina Nucleosídeo Fosforilase (PNP) .....	7
1.7. Substratos e inibidores da enzima Purina Nucleosídeo Fosforilase .....	9
1.8. A Modelagem Molecular .....	12
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>13</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
3.1. Objetivo geral .....	15
3.2. Objetivos Específicos .....	15
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>16</b>
4.1. Escolha do Alvo Molecular .....	16
4.2. Comparação entre a PNP humana e a PNP de <i>T. vaginalis</i> .....	16
4.3. Análise Conformacional dos Inibidores e substratos .....	17
4.4. Docking Molecular .....	18
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>20</b>
5.1. Escolha do Alvo Molecular .....	20
5.2. Comparação entre a PNP humana e a PNP de <i>T. vaginalis</i> .....	20
5.3. Análise conformacional dos potenciais inibidores da enzima PNP .....	27
5.4. <i>Docking</i> Molecular .....	34
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>52</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>53</b>

## Resumo

Nos últimos anos a incidência de doenças sexualmente transmissíveis (DST) vem aumentando progressivamente. Neste contexto, insere-se a tricomoníase, uma doença parasitária sexualmente transmissível, causada pelo protozoário, da espécie *Trichomonas vaginalis*. Por sua alta prevalência, é muito importante o diagnóstico correto da doença, assim como seu tratamento efetivo uma vez que, o risco de transmissão do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) pode ser exacerbado na presença da tricomoníase. Sendo assim, o *T. vaginalis* age como um co-fator no processo epidemiológico do HIV. Desta forma, estabelecer um alvo molecular efetivo para o tratamento da tricomoníase é de grande importância. Nesse contexto, insere-se a Purina Nucleosídeo Fosforilase (PNP), que é uma enzima chave no processo de desenvolvimento do parasita. Diante disso, o objetivo deste trabalho é avaliar *in silico* as interações de fármacos com atividade antitumoral disponíveis no mercado que têm como alvo a enzima PNP de *Homo sapiens*, comparando-as com a enzima PNP do microorganismo *T. vaginalis* e através do entendimento destas interações e da exploração das diferenças entre as enzimas, propor possíveis agentes para a quimioterapia contra este protozoário bem como os mecanismos de ação destes. Foram realizados estudos de relação estrutura atividade, análise conformacional e propriedades físico-químicas de diferentes inibidores, como também estudos de ancoramento molecular, para avaliar as diferenças destes compostos com ambas as enzimas e desta forma, estudar a viabilidade destes para atuarem no tratamento da tricomoníase. A partir dos resultados obtidos, sugere-se que as enzimas PNP humana e de *T. vaginalis* apresentam significativas diferenças estruturais tornando-se possível o desenvolvimento de moléculas seletivas para a enzima do parasita. Esse trabalho é de grande importância, uma vez que o tratamento da tricomoníase atualmente é realizado apenas com o fármaco metronidazol e o desenvolvimento de novos fármacos pode auxiliar reduzindo os riscos de reações adversas advindas do tratamento.

Palavras-chave: Tricomoníase, inibidor enzimático, Docking Molecular, Modelagem Molecular.

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças parasitárias vêm sendo prejudiciais ao homem e seus animais domésticos desde os tempos mais remotos. Hoje no mundo, muitos países têm controlado essas doenças dentro de suas fronteiras, porém os mesmos parasitas continuam causando mortes entre os países menos desenvolvidos (SILVA *et al.*, 2002). Nos últimos anos a incidência de doenças sexualmente transmissíveis (DST) vem aumentando progressivamente. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 340 milhões de novos casos de DST curáveis são detectados por ano em todo o mundo, e cerca de 10 a 12 milhões destes acontecem no Brasil (OMS, 2011; MACIEL *et al.*, 2004).

### 1.1. A Tricomoníase

A tricomoníase é uma doença sexualmente transmissível causada pelo parasita do gênero *Trichomonas vaginalis*, que acomete homens e mulheres geralmente entre 15 a 45 anos, sendo considerada a DST de origem não viral mais comum do mundo, por ter prevalência de cerca de 180 milhões de casos principalmente no gênero feminino (BRASIL, 2006; FEITOSA & CONSOLARO, 2005; HARDICK *et al.*, 2003; HUPERTH *et al.*, 2005; ALMEIDA *et al.*, 2010; PETRIN *et al.*, 1998; WHO, 2011).

Alguns fatores podem ser determinantes na prevalência da tricomoníase, tais quais, acesso à saúde, hábitos de higiene, idade, atividade sexual, acometimento por outras doenças sexualmente transmissíveis, fatores socioeconômicos, gravidez, uso de drogas e também o número de parceiros sexuais de um indivíduo associado ao não uso de preservativos (PETRIN *et al.*, 1998; SWYGARD *et al.*, 2004; MICHAEL *et al.*, 2006).

As manifestações clínicas da tricomoníase são bem amplas e dependem de fatores individuais estando relacionadas também ao grau de infecção pelo parasito, podendo ser: corrimento abundante, prurido, dor pélvica, sintomas urinários, tais como dor ao urinar e aumento da frequência urinária, hiperemia da mucosa, entre outras (MACIEL *et al.*, 2004; BRASIL, 2006).

A tricomoníase acomete principalmente mulheres em idade reprodutiva, onde o parasita infecta principalmente o epitélio escamoso do trato genital e a doença pode-se apresentar desde a forma assintomática, até uma forma severa de infecção

denominada vaginite, onde o sintoma mais comum é o corrimento mucopurulento que varia de cor e consistência de acordo com cada paciente (BARRIO *et al.*, 2002; LEHKER & ALDERETE, 2000.). As mulheres grávidas acometidas pela doença apresentam um alto risco de apresentarem complicações durante a gestação, tais quais, parto prematuro, baixo peso ao nascer, endometite pós-parto, feto natimorto e morte neonatal (COTCH *et al.*, 1997; MACIEL *et al.*, 2004). Além disso, a existência de riscos de transmissão a recém-nascidas com corrimento vaginal vem sendo relatada (HOFFMAN *et al.*, 2003; MACIEL *et al.*, 2004).

Entre os homens, àqueles com idade entre 16 e 22 anos são geralmente os mais suscetíveis à infecção por *T. vaginalis*. Nesses indivíduos é possível realizar uma classificação quanto ao tipo e grau de infecção, onde se pode ter: estado assintomático, estado agudo e doença sintomática leve. Nos casos em que os sintomas são aparentes, observa-se geralmente disúria, corrimento escasso, ulceração peniana, prurido e ardência após a relação sexual (PETRIN *et al.*, 1998).

## **1.2. O parasita: *Trichomonas vaginalis***

O agente etiológico causador da tricomoníase é um parasita do gênero *Trichomonas*, descrito em 1836 pelo médico francês Alfred Donné (ALMEIDA *et al.*, 2010; FEITTOSA & CONSOLARO, 2005). O organismo humano pode ser hospedeiro de três diferentes espécies do parasita do gênero *Trichomonas*, mas estas possuem locais de infecção específicos, como o *Trichomonas tenax*, que infecta a cavidade oral, o *Trichomonas hominis*, que infecta o trato intestinal e o *Trichomonas vaginalis*, capaz de infectar o trato geniturinário sendo o causador da tricomoníase (WANG, 2000; FEITTOSA & CONSOLARO, 2005; PETRIN *et al.*, 1998; MACIEL *et al.*, 2004; REY, 2002)

O *T. vaginalis* varia de tamanho e forma, podendo apresentar de 10 a 30 µm de comprimento e 5 a 12 µm de largura. Em geral apresenta-se no formato piriforme, elipsoide ou oval (PETRIN *et al.*, 1998; NEVES *et al.*, 2004). É anaeróbio facultativo, podendo crescer na ausência de oxigênio em pH entre 5 e 7,5 e em temperaturas entre 20 e 40°, sendo suas principais fontes de energia e nutrientes, a glicose, a maltose e a galactose. Em condições restritas, a utilização de aminoácidos como a treonina, a arginina e a leucina se faz essencial para a manutenção da vida

(MACIEL *et al.*, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2010; FEITTOSA & CONSOLARO, 2005; PETRIN *et al.*, 1998).

O *T. vaginalis* é um flagelado com cinco flagelos, sendo quatro anteriores e um apoiado na membrana ondulante que auxilia na locomoção do parasita oferecendo maior mobilidade. Em condições desfavoráveis de crescimento, pode se apresentar na forma arredondada internalizando o flagelo (PETRIN *et al.*, 1998; MACIEL *et al.*, 2004).

O parasita possui um ciclo de vida simples, apresentando-se somente na forma trofozoíta, não possuindo a forma cística (MACIEL *et al.*, 2004). Desta forma, divide-se por fissão binária, ocasionando o aumento da população no trato urogenital. Em geral, após a puberdade os valores normais de pH são entre 3,8 e 4,5, nesse ambiente o *T. vaginalis* não é encontrado, desta forma, pode-se afirmar que o aumento do pH local está diretamente relacionado com a maior atividade do parasita, sendo entre 6,0 e 6,3 o pH ótimo para seu desenvolvimento (REY, 2002; FEITTOSA & CONSOLARO, 2005).

### **1.3. O Diagnóstico da Tricomoniase**

Por apresentar sintomas semelhantes aos de outras doenças sexualmente transmissíveis, o diagnóstico da tricomoníase não deve ser baseado unicamente na clínica, sendo o diagnóstico laboratorial de grande importância, com a finalidade de realizar o tratamento correto e controlar a propagação da infecção (MICHAEL *et al.*, 2006).

O diagnóstico da tricomoníase pode ser realizado através de diferentes métodos laboratoriais, tais como, exame direto ou a fresco, exame de Papanicolau, cultura, aglutinação, métodos imunológicos (ELISA) e técnicas moleculares de diagnóstico como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (RADONJIC *et al.*, 2006).

O exame direto ou a fresco do conteúdo vaginal ao microscópio é de fácil interpretação e realização, apesar de possuir baixa sensibilidade. Colhe-se uma gota do corrimento, coloca-se sobre a lâmina com uma gota de solução fisiológica e observa-se ao microscópio, buscando o parasita flagelado movimentando-se ativamente entre as células epiteliais e os leucócitos. A tricomoníase pode alterar o resultado da citologia oncológica, diante disso, nos casos em que são identificadas

alterações morfológicas celulares, deve-se realizar o tratamento e repetir a citologia para avaliar se há persistência dessas alterações (BRASIL, 2002).

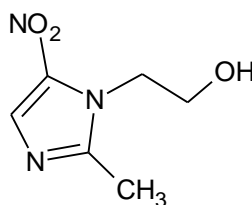
Além disso, a realização do teste de pH vaginal frequentemente mostra valores acima de 4,5, uma vez que durante o crescimento, o parasita tende a produzir aminas ocasionando o aumento do pH do meio, deixando um ambiente propício ao seu desenvolvimento (SENA *et al.*, 2007; BRASIL, 2002).

Em casos em que há a suspeita da infecção por *T. vaginalis*, mas os exames a fresco e o esfregaço insistem em apresentar resultados negativos, sugere-se a cultura celular, que é fundamental ainda que seja mais difícil de ser realizada, por requerer um meio específico e maior custo, conhecido como meio de Diamond e condições de anaerobiose (BRASIL, 2002). Além dos altos custos, o método de cultura não é utilizado rotineiramente por requerer um maior tempo para a identificação do parasito (MICHAEL *et al.*, 2006).

O exame Papanicolau é muito utilizado em diversos procedimentos ginecológicos e é bastante empregado no diagnóstico da tricomoníase. O esfregaços de pacientes com tricomoníase podem ser bem variados, desde pacientes sem nenhuma reação inflamatória estando ausentes as alterações celulares, até esfregaços com abundância de leucócitos oriundos do processo inflamatório que por vezes, são capazes de dificultar o diagnóstico citológico tanto funcional quanto oncológico (FEITTOSA & CONSOLARO, 2005; SILVA FILHO & LONGATTO FILHO, 2000).

#### 1.4. O Tratamento da Tricomoníase

O tratamento da tricomoníase é realizado com quimioterápicos nitroimidazólicos, compostos heterocíclicos com um grupo nitro na quinta posição do anel imidazol, sendo o principal representante deste grupo e primeira opção no esquema terapêutico da tricomoníase, o pró-fármaco metronidazol (Figura 1). O metronidazol é um bactericida potente e tem uma excelente atividade contra bactérias anaeróbicas e protozoários de metabolismo anaeróbio, como a *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis* e *Giardia lamblia*, sendo os causadores das respectivas patologias: amebíase, tricomoníase e giardíase (ANVISA, 2014; DRUGBANK 4.0).



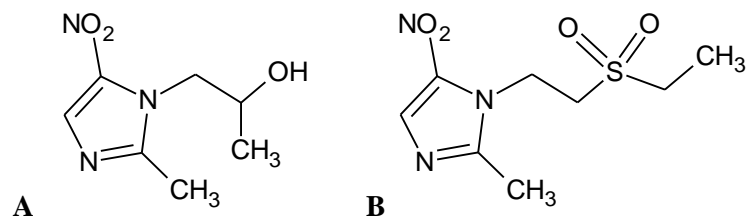
**Figura 1:** Estrutura química do metronidazol

Por ser um pró-fármaco, seu mecanismo de ação envolve inicialmente sua redução química no meio intracelular dos microorganismos através da ação da enzima Piruvato Ferredoxina Oxido-Redutase (PFOR), desta forma dá origem a intermediários reativos, que são capazes de ligar-se covalentemente ocasionando danos à estrutura do DNA do parasita que resulta na morte do microorganismo (TOWNSON *et al.*, 1994; EDWARDS, 1993).

Em organismos aeróbicos a resistência ao metronidazol é natural, uma vez que a presença de oxigênio pode promover competição pela enzima PFOR diminuindo a ativação do fármaco. Já em micro-organismos anaeróbicos, a resistência ao fármaco pode ser adquirida através de fatores como a diminuição da entrada do fármaco no parasito, a existência de bombas de efluxo e da diminuição da atividade da enzima PFOR (LIU *et al.*, 2000; BEINERT *et al.*, 1997).

O esquema terapêutico para o tratamento da tricomoníase envolve em sua primeira escolha, a administração única de 2g de metronidazol via oral ou múltipla de 500 mg durante 7 dias. Como segunda opção, tem-se a administração única de 2 g de tinidazol (ANVISA, 2004)

Além do metronidazol, outros compostos derivados nitroimidazólicos vem sendo utilizados para o tratamento da tricomoníase, tais como, o tinidazol e o secnidazol, (Figura 2). Nesse contexto, há grande riscos de organismos resistentes ao metronidazol, apresentarem também resistência ao tinidazol e ao secnidazol, fazendo com que doses mais altas tenham que ser administradas, aumentando assim a possibilidade de aparecimento de efeitos tóxicos advindos de ambos os fármacos em questão (LIU *et al.*, 2000).



**Figura 2:** Estrutura química de derivados nitroimidazólicos utilizados no tratamento da tricomoníase A) tinidazol B) secnidazol;

### 1.5. A Tricomoníase e o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)

Além dos prejuízos causados aos indivíduos que apresentam tricomoníase, existe uma relação direta entre a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e o parasita *Trichomonas vaginalis*. O risco de transmissão do HIV pode ser muito maior na presença da tricomoníase, sendo assim, o *T. vaginalis* age como um cofator no processo epidemiológico do HIV, sendo estimados que cerca de 24% das infecções por HIV são atribuíveis à infecção por *T. vaginalis* (FEITOSA & CONSOLARO, 2005; SORVILLO *et al.*, 2001).

Além das ulcerações que podem provocar pontos hemorrágicos nas mucosas facilitando a entrada do HIV diretamente na corrente sanguínea, a infecção por *T. vaginalis* provoca uma resposta imune local com inflamação do epitélio vaginal e da exocérvice em mulheres e da uretra nos homens, essa resposta inflamatória induz a migração de leucócitos, linfócitos TCD4<sup>+</sup> e macrófagos, que permitem que o HIV tenha acesso, aumentando assim, a exposição de pacientes HIV-negativos ao vírus. (SORVILLO *et al.*, 2001; MACIEL *et al.*, 2004).

A transmissão do vírus por indivíduos HIV-positivos também pode ser maior na presença da infecção por *T. vaginalis*. Uma vez que, de forma similar, os pontos de ulceração e hemorragia podem ser maiores, aumentando assim, o número de



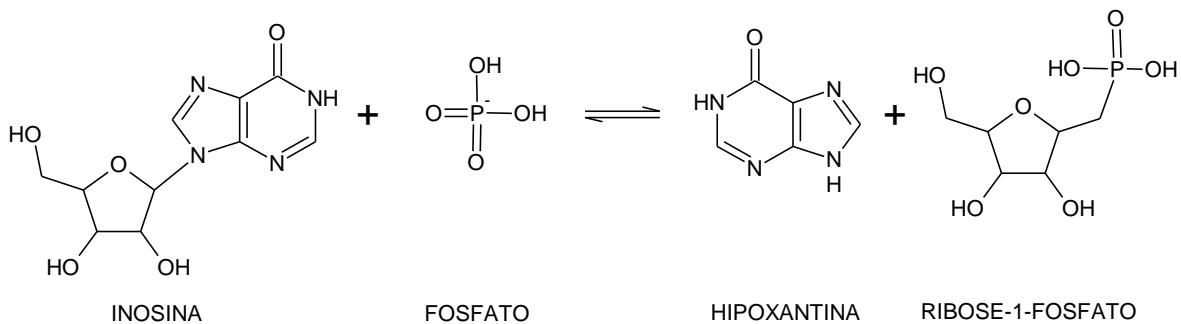
linfócitos e macrófagos infectados na região genital, tendo por consequência a expansão da transmissão do HIV e o aumento de até oito vezes da transmissão para um parceiro sexual não infectado (SORVILLO *et al.*, 2001; MACIEL *et al.*, 2004).

### **1.6. A enzima Purina Nucleosídeo Fosforilase (PNP)**

Uma das enzimas que vem sendo apontada como chave no processo de desenvolvimento de parasitas como o *T. vaginalis*, é a enzima purina nucleosídeo fosforilase (PNP) (MUNAGALA & WANG, 2003). O termo nucleosídeo foi empregado pela primeira vez por Levene e Jacobs em 1909, estando associado aos ácidos nucleicos (SOARES *et al.*, 2001).

A manutenção do DNA e RNA, bem como a sobrevivência dos seres vivos depende de moléculas essenciais denominadas nucleosídeos purínicos. Essas moléculas podem ser advindas de duas diferentes vias de obtenção. Nos seres humanos, a via predominante é denominada via de síntese, ou via *de novo*, onde, através de precursores e energia, a síntese dessas moléculas se torna possível. Já os protozoários parasitas dependem exclusivamente da recuperação dessas moléculas através da denominada via de salvação, onde as bases provenientes de células mortas, bem como DNA e RNA não mais utilizados, são reciclados para uma futura reutilização (DA SILVEIRA *et al.*, 2004; GHÉRARDI & SARCIRON, 1974). Desta forma, a interrupção dessa via pode ser considerada importante para expor o microorganismo a condições extremas para sua sobrevivência, uma vez que dependem da via de salvação de purinas a partir do hospedeiro.

A PNP catalisa a fosforilação da ligação N-ribosídica de nucleosídeos purínicos e de desoxinucleosídeos, gerando a base purínica e ribose (ou desoxirribose) 1-fosfato (AZEVEDO *et al.*, 2003) (Figura 3). Em mamíferos substratos mais utilizados são a inosina, a guanosina e a 2-desoxiguanosina. A PNP é específica para nucleosídeos purínicos na configuração beta e exibe preferência para nucleosídeos contendo análogos ribosil de estereoisômeros de arabinose e xilose. Além disso, a PNP quebra a ligação glicosídica com a inversão da configuração para produzir ribose 1-fosfato, como demonstrado pelo mecanismo catalítico (AZEVEDO *et al.*, 2003; PARKS *et al.*, 1972; SCHRAMM, 1998; STOECKLER *et al.*, 1980; PORTER, 1992).



**Figura 3:** Reação bioquímica catalisada pela enzima Purina Nucleosídeo Fosforilase.

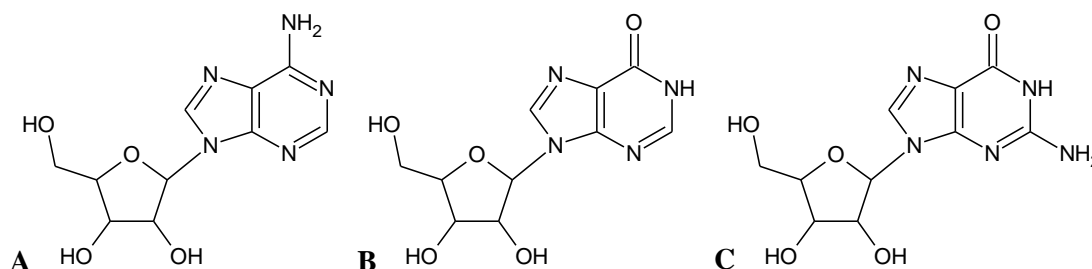
A enzima Purina Nucleosídeo Fosforilase também está presente em organismos humanos, onde pode-se observar que uma deficiência genética da mesma resulta na depleção seletiva de células T. Isso ocorre devido ao fato de a PNP humana ser a única enzima que degrada 2-desoxiguanosina em células T. Em baixas concentrações dessa enzima a 2-desoxiguanosina não é degradada, sendo convertida a 2-desoxiguanosina trifosfato (dGTP) que se acumula nos tecidos. Em altos níveis, a dGTP pode causar uma inibição alostérica da enzima ribonucleotídeo difosfato redutase, que impede a replicação normal de DNA necessária para a replicação das células T (EVANS *et al.*, 2000; HARSHFIELD, *et al.*, 1995; MARKERT *et al.*, 1991; THELANDER, *et al.*, 1979; SNYDER *et al.*, 1997; BOEHNCKE, *et al.*, 1994).

Neste sentido, muitos fármacos estão sendo estudados objetivando a inibição desta enzima para o tratamento de distúrbios imunológicos, incluindo doenças autoimunes do tipo IV como a artrite reumatóide, psoríase, doenças intestinais e inflamatórias, esclerose múltipla, distúrbios de proliferação de células T como rejeição a órgãos transplantados, linfoma de células T, e leucemia de células T.

Além disso, inibidores de PNP podem ser usados para evitar a fosforilação de fármacos antivirais e anticâncer, promovendo o aumento da meia-vida desses compostos, visto que vários destes fármacos mimetizam nucleosídeos de purina naturais e podem, por isso, ser fosforilados pela HsPNP antes de completar sua função terapêutica (BZOWSKA *et al.*, 2000).

### 1.7. Substratos e inibidores da enzima Purina Nucleosídeo Fosforilase

A PNP catalisa, na presença de um fosfato inorgânico (Pi), a clivagem reversível de ligações N-ribosídicas de nucleosídeos de purinas e desoxinucleosídeos como a guanósina formada a partir da guanina e a inosina formada a partir da hipoxantina (FIGURA 4) (KALCKAR, 1945).



**Figura 4:** Estruturas químicas dos principais substratos da enzima PNP. A) Adenosina B) Inosina C) Guanósina.

Muitos compostos vêm sendo projetados objetivando a inibição da enzima Purina Nucleosídeo Fosforilase (EVANS *et al.*, 2000; BZOWSKA *et al.*, 2000), tais como, 2-desoxi-inosina, 7-desazaguanina, 2-mercapto-4(3H)-quinazolinona, 8-azaguanina, formicina A, DADMe-immucillin A e SerMe-immucillin H (Figura 5).

O composto 2-desoxi-inosina é um análogo de nucleosídeo formado por uma hipoxantina ligada a 2'-desoxirribose através de uma ligação  $\beta$ -N9-glicosídica (DRUGBANK 4.0).

O composto 7-desazaguanina é um derivado de desazaguaninas, que por sua vez, são compostos que vêm sendo testados na inibição da enzima PNP humana para o tratamento de leucemias de células T e de proliferação de células T (THOMSON, 2001).

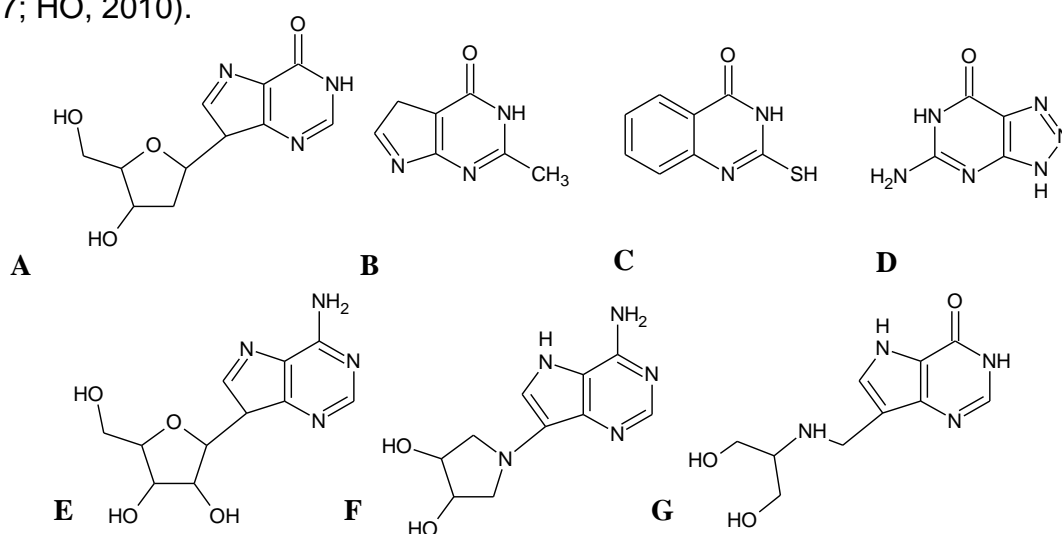
O 2-mercapto-4(3H)-quinazolinona (MQU) é um composto derivado de quinazolinona, que são compostos cuja estrutura proporciona uma grande

diversidade de atividades biológicas incluído a inibição da enzima PNP, desta forma, inibidores projetados a partir destes compostos podem inibir de forma irreversível a enzima PNP (SHARMA *et al.*, 2011; TIMMERS *et al.*, 2008).

O 8-azaguanina é um composto análogo da base nitrogenada guanina, sendo um conhecido inibidor da biossíntese de purinas (DRUGBANK 4.0).

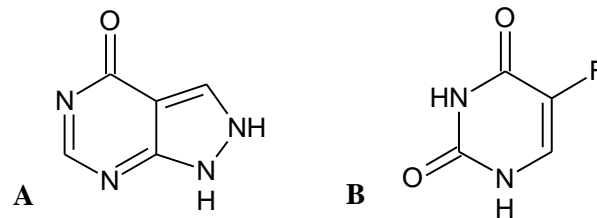
A formicina A é um análogo da adenosina, isolado em 1964 (HORI *et al.*, 1964; WIERZCHOWSKI *et al.*, 1980) que vem sendo estudado por inibir a enzima PNP do microorganismo *Escherichia coli*, que por sua vez, apresenta grande semelhança com a enzima PNP do protozoário *T. vaginalis* e, desta forma, pode ser uma alternativa para o tratamento da tricomoníase (MUNUGALA & WANG, 2002).

Muitos compostos análogos de estados de transição da inosina vêm sendo desenvolvidos desde o final da década de 90 (MILES *et al.*, 1998; LEWANDOWICZ *et al.*, 2003). Dentre esses compostos está o Immucillin H, que vem sendo utilizado para o tratamento de leucemia linfóide crônica de células B e de células T, e é um fármaco com biodisponibilidade oral comercializado com o nome Forodesine<sup>®</sup> (BIOCRYST, 2014). Os compostos derivados de immucillin são de alta potência na inibição da enzima PNP humana, mas apresentam alto custo e toxicidade (POSTIGO, 2008). Diante disso, o estudo de análogos estados de transição do immucillin H podem contribuir para o planejamento de novos compostos com menor toxicidade. Nesse contexto, inserem-se os análogos de estado de transição do immucillin H, SerMe-Immucillin H e DADMe-Immucillin A (RINALDO-MATTHIS, 2007; HO, 2010).



**Figura 5:** Estruturas químicas de potenciais inibidores da enzima PNP. A) 2-desoxi-inosina; B) 7-desaguanina; C) 2-mercapto-4(3H)-quinazolinona; D) 8-azaguanina; E) Formicina A; F) SerMe-Immucillin H; G) DadMe-Immucillin A.

Alguns fármacos existentes no mercado são estruturalmente semelhantes aos potenciais inibidores da PNP, tais quais, o alopurinol e o 5-fluoracil (FIGURA 6). Desta forma, apresentam um potencial em tornar-se um possível inibidor da PNP, traçando assim, uma nova rota para o tratamento da tricomoníase.



**Figura 6:** Estruturas químicas de fármacos. A) Alopurinol; B) 5-Fluoracil.

O alopurinol é um agente uricosúrico indicado para o tratamento da hiperuricemia associada a gota primária ou secundária. Também é indicado, para o tratamento da nefropatia úrica primária ou secundária, com ou sem os sintomas de gota, hiperuricemia induzida por quimioterapia e cálculos renais recorrentes. Seu mecanismo de ação envolve a inibição da enzima xantina oxidase através de seu metabólito ativo, o oxipurinol, bloqueando a conversão da xantina em ácido úrico, provocando a diminuição da produção de ácido úrico. Além disso, o Alopurinol também facilita a incorporação de hipoxantina e xantina no DNA e no RNA, isso ocorre através de uma retro-inibição da síntese *de novo* de purinas e uma diminuição nas concentrações de ácido úrico de soro como resultado tem-se um aumento na concentração de nucleotídeos (DRUGBANK 4.0).

O fármaco 5-fluoracil é um análogo da pirimidina que é um antimetabolito antineoplásico. Interfere diretamente na síntese de DNA através do bloqueio da conversão da timidilato sintetase de ácido desoxiuridílico de ácido timidílico. É indicado o tratamento tópico de várias queratoses actínicas ou solares. Também é utilizado no tratamento de carcinomas de células basais superficiais quando os métodos convencionais não são viáveis. Além disso, através da via injetável, está indicado no tratamento paliativo de alguns tipos de câncer, incluindo o de cólon, esôfago, estômago, reto, mama, trato biliar, estômago, cabeça e pescoço, do colo do útero, pâncreas, células renais, e carcinóide (DRUGBANK 4.0).

### 1.8. A Modelagem Molecular

A modelagem molecular é uma técnica computacional que vem sendo empregada no estudo, desenvolvimento e descoberta de candidatos a fármacos (MONTANARI, 2000). Compreende um conjunto de ferramentas para a construção, edição e análise de sistemas moleculares complexos que podem ser fundamentais no planejamento de compostos bioativos (BARREIRO *et al.*, 1997).

O desenvolvimento de fármacos a partir de modificações estruturais de moléculas já existentes vem sendo estabelecido relacionando a influência de mudanças estruturais específicas nos efeitos biológicos, como o formato e o tamanho da cadeia carbônica, o grau e a natureza da substituição e a estereoquímica do composto protótipo (WALTERS *et al.* 1998). Diante disso é o conhecimento de novas biomacromoléculas que agem como receptores formando complexos com moléculas bioativas e através desse reconhecimento molecular é vista a resposta biológica e é determinada a seletividade desses receptores (BARREIRO *et al.*, 1997).

## 2. JUSTIFICATIVA

A tricomoníase é uma doença sexualmente transmissível (DST) causada pelo parasita *Trichomonas vaginalis*, que acomete homens e mulheres geralmente entre 15 a 45 anos, sendo considerada a DST de origem não viral mais comum do mundo, por ter uma prevalência de cerca de 180 milhões de casos principalmente no gênero feminino (BRASIL, 2006; FEITOSA & CONSOLARO, 2005; HARDICK *et al.*, 2003; HUPERTH *et al.*, 2005; ALMEIDA *et al.*, 2010; PETRIN *et al.*, 1998; WHO, 2011)

Muitos prejuízos estão associados ao acometimento da população por essa parasitose, tais quais, complicações durante a gestação, como, parto prematuro, baixo peso ao nascer, endometrite pós-parto, feto natimorto, morte, como também, vem sendo relatada a existência de riscos de transmissão a recém-nascidas com corrimento vaginal (COTCH *et al.*, 1997; MACIEL *et al.*, 2004; HOFFMAN *et al.*, 2003; MACIEL *et al.*, 2004). Além disso, o risco de transmissão do HIV pode ser muito maior na presença da tricomoníase, sendo assim, o *T. vaginalis* age como um cofator no processo epidemiológico do HIV, sendo estimados que, cerca de 24% das infecções por HIV são atribuíveis à infecção por *Trichomonas vaginalis* (FEITOSA & CONSOLARO, 2005; SORVILLO *et al.*, 2001).

Atualmente, o fármaco de escolha para o tratamento da tricomoníase é o metronidazol, que além dessa patologia é amplamente empregado em diferentes indicações aumentando a chance de aparecimento de resistência do parasito ao fármaco. A resistência ao metronidazol já é relatada desde 1962 e os casos de resistência vem aumentando com o passar dos anos (ROBINSON, 1962; SORVILLO *et al.*, 2001). Diante disso, é de fundamental importância que novos estudos sejam realizados para o desenvolvimento de novos tratamentos para a tricomoníase, uma vez que desta forma, pode haver uma redução significativa da transmissão do HIV (FEITOSA & CONSOLARO, 2005; BOWDEN e GARNETT, 2000; ADUSARKODIE *et al.*, 2004).

Desta forma, o estudo de alvos moleculares e a aplicação da modelagem molecular, podem contribuir para um tratamento efetivo com menores prejuízos aos indivíduos acometidos pela tricomoníase. A modelagem molecular é uma técnica computacional quem vem sendo empregada no estudo, desenvolvimento e descoberta de candidatos a fármacos (MONTANARI, 2000). Nesse contexto, insere-se a PNP, que vem sendo apontada como chave no processo de desenvolvimento

de parasitas, tais como o *T. vaginalis*. No entanto, tal enzima também é encontrada em humanos e tem sido usada como um alvo molecular para o tratamento de câncer e outros distúrbios imunológicos (SOARES *et al.*, 2001; EVANS *et al.*, 2000; HARSHFIELD, *et al.*, 1995; MARKERT *et al.*, 1991; THELANDER, *et al.*, 1979; SNYDER *et al.*, 1997; BOEHNCKE *et al.*, 1994).

Diante disso, este estudo visa avaliar a enzima Purina Nucleosideo Fosforilase como potencial alvo molecular para a quimioterapia antiparasitária contra tricomoníase humana, como também analisar as diferenças estruturais entre ambas as enzimas, a fim de estabelecer potenciais fármacos mais seletivos para a quimioterapia parasitária.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo estudar a enzima Purina Nucleosídeo Fosforilase como potencial alvo molecular para a quimioterapia antiparasitária contra tricomoníase humana.

#### 3.2. Objetivos Específicos

Realizar o estudo *in silico* das possíveis interações da enzima PNP de *Trichomonas vaginalis* com compostos e fármacos disponíveis no mercado, que têm como alvo a enzima PNP;

Avaliar, através da modelagem molecular, possíveis interações entre a enzima e o ligante;

Realizar o estudo *in silico* de interação dos ligantes nas enzimas PNP humana e de *T. vaginalis*;

Estudar as diferenças entre a interação enzima-ligante apresentadas para os compostos co-cristalizados com a enzima PNP humana e de *T. vaginalis*;

Realizar o estudo da relação estrutura atividade (SAR), análise conformacional e propriedades das físico-químicas dos ligantes;

Estudar *in silico* a interação dos inibidores e substratos com as enzimas PNP humana e de *T. vaginalis*, através de *docking* molecular.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Escolha do Alvo Molecular

Inicialmente realizou-se uma busca bibliográfica para o conhecimento das estruturas 3D e características dos alvos moleculares que poderiam ser estudados para o tratamento da tricomoníase humana.

O alvo molecular escolhido foi a enzima Purina Nucleosídeo Fosforilase do protozoário *Trichomonas vaginalis* (TvPNP). Através do banco de dados Drug Bank 4.0 (<http://www.drugbank.ca/>), foi realizada a busca de fármacos que tem como alvo molecular a enzima humana (HsPNP) e a partir desta triagem, analisar as características apresentadas pelo mesmo e a possibilidade de modificações moleculares para a utilização no tratamento da tricomoníase. Para este estudo (*in silico*) utilizou-se ferramentas computacionais para a obtenção dos dados.

### 4.2. Comparação entre a PNP humana e a PNP de *T. vaginalis*

A partir da escolha do alvo molecular foi realizado o estudo para se verificar as diferenças entre as duas enzimas, PNP humana e PNP de *T. vaginalis*, usando o programa *Swiss PDB Viewer* versão 4.1.0. Para a realização desse estudo, foi feita uma triagem virtual no banco de dados Protein Data Bank (PDB), onde foram escolhidos a sequência FASTA das proteínas depositadas com os códigos PDB ID: 3K8Q e 2I4T das enzimas humana e do protozoário *T. vaginalis*, respectivamente..

Utilizou-se o servidor LigPlot (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/Generate.html>) para realizar as análises das interações estabelecidas entre ambas as enzimas e seus respectivos ligantes co-cristalizados, obtidos do PDB.

Além disso, também foram estudadas as propriedades físico-químicas dos resíduos que compõem o sítio ativo de cada uma das enzimas, a fim de se estabelecer diferenças que sejam significativas para uma molécula apresentar seletividade para a enzima do parasito.

### 4.3. Análise Conformacional dos Inibidores e substratos

Os ligantes (substrato e inibidor) foram submetidos à análise conformacional utilizando-se cálculos de mecânica molecular (MMFF), empregando o programa de modelagem molecular Spartan10 (Wavefunction Inc. Irvine CA), obtendo-se a conformação de menor energia, empregando-se em seguida, com a otimização geométrica dos compostos, o método semi-empírico RM1. Em seguida, as estruturas foram submetidas ao cálculo *ab initio* (*Single-Point*) em que se calculam os parâmetros eletrônicos de um arranjo único dos átomos, utilizando o método Hartree-Fock na base 6-31G\*, e desta forma foi possível obter parâmetros estereo-eletrônicos e geométricos que podem estar correlacionados com a atividade biológica, tais como: volume molecular, momento dipolo, energia de HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital*) e de LUMO (*Lowest unoccupied molecular Highest occupied molecular orbital*), além do mapa de potencial eletrostático, mapas de distribuição dos orbitais e de densidade de HOMO e LUMO de cada composto.

Também foi realizado o estudo das propriedades físico-químicas através do programa Osiris Property Explorer (SANDER, 2001) uma vez que a solubilidade, LogP (lipofilicidade) estão relacionadas a absorção dos fármacos e permeabilidade através das membranas biológicas. Também foram realizados cálculos de *drug-score*, *druglikeness* e de toxicidade *in silico*, através dos potenciais riscos de cada molécula apresentar efeitos de mutagenicidade, tumorigenicidade, irritação e sobre o efeito reprodutivo, que são calculados através de um banco de dados de fragmentos estruturais que já apresentaram possíveis efeitos toxicológicos, e realiza-se a comparação com a estrutura da molécula em questão. O perfil *druglikeness* é calculado com base em um banco de dados de fármacos comercializados, onde é realizada a comparação estrutural fornecendo valores baseados na semelhança estrutural, logP e peso molecular da molécula com fármaco. Já o *drug-score* fornece uma pontuação de 0-1 para predizer o potencial de uma molécula se tornar um fármaco (SANDER, 2001).

Além disso, foram calculados propriedades da área superficial polar e o número de ligações rotáveis, doadores e aceptores de ligações de hidrogênio, parâmetros também relacionados à capacidade da substância de permear as membranas biológicas, para a aplicação da “Regra dos Cinco” de Lipinski (LIPINSKI, 2004), que avalia a probabilidade de uma substância ser um bom candidato a fármaco por via

oral, através do programa Molinspiration (<http://www.molinspiration.com.cgi-bin/properties>).

#### 4.4. Docking Molecular

Os estudos de *docking* e *redocking* molecular foram realizados utilizando o programa AutoDock 4.2 e a interface gráfica AutoDockTools (ADT) (MORRIS *et al.*, SANNER, 1999). O AutoDock é um conjunto de ferramentas que permitem a predição da interação entre ligante-macromolécula. Para identificar as possíveis combinações ligante-macromolécula (MORRIS *et al.*, 1998; HUEY *et al.*, 2007). Inicialmente, obteve-se o arquivo fasta da enzima PNP de *T. vaginalis* (código PDB I: 2I4T) e da enzima PNP de *H. sapiens* (código PDB ID: 3K8Q) no banco de dados Protein Data Bank e, com o auxílio do programa *Swiss PDB Viewer* a sequência da proteína foi separada do ligante obtendo-se dois arquivos com extensão .pdb que foram salvos para a realização dos dockings no programa Autodock 4.2. Então, no programa Autodock 4.2 foram gerados os formatos \*.pdbqt para a enzima e para o ligante, dando continuidade aos estudos.

Previamente aos estudos de *docking*, foram realizados estudos de *redocking* molecular, que consiste em realizar a separação do ligante da sequência da proteína e posteriormente submetê-los ao *docking* molecular, com a finalidade de se obter a validação dos parâmetros a serem utilizados, através do cálculo do desvio médio da raiz quadrada (RMSD), que é um parâmetro que avalia a semelhança da conformação obtida através do *docking* realizado com a conformação original presente na estrutura cristalográfica, onde valores de RMSD inferiores a 2Å são considerados aceitos (RODRIGUES *et al.*, 2012).

A partir da determinação e validação do *grid*, tornou-se possível proceder com os estudos de *docking* molecular com os possíveis inibidores obtidos a partir do banco de dados DrugBank 4.0, no sítio ativo da enzima PNP humana e de *T. vaginalis*, para posteriormente explorar as diferenças dos dois sítios ativos para o planejamento de moléculas bioativas para a quimioterapia antiparasitária.

Desta forma, os ligantes (substrato e inibidor) foram submetidos à minimização no programa Spartan10 (Wavefunction Inc. Irvine CA), obtendo-se um arquivo de saída no formato .mol2, então, procedeu-se com os estudos de *docking*

molecular empregando-se os mesmos parâmetros validados no *redocking* e os arquivos .pdbqt da enzima e .mol2 referente ao ligante.

Inicialmente foram calculados mapas de grade empregando-se o programa AutoGrid4. Esses mapas são calculados considerando cada tipo de átomo do ligante e um mapa para interações eletrostáticas. Para tal procedimento foi criado um arquivo de parâmetros de entrada (formato \*.gpf, *grid parameter file*) em que foi delineada uma caixa de grade de dimensões 40x40x40 pontos e espaçamento 0,375Å envolvendo inteiramente o sítio catalítico da enzima e centralizada no ligante. Os parâmetros de entrada para o programa AutoDock foram ajustados através do programa AutoDock Tools e gerados no formato \*.dpf, *docking parameter file*. Desta forma, foram obtidos os arquivos finais permitindo a execução do programa AutoDock.

Os arquivos obtidos foram analisados com o programa AutoDock Tools e também com o programa SPDBV, onde puderam ser observadas características, tais como, ligações de hidrogênio e outras interações estabelecidas entre o ligante e os resíduos do sítio ativo, posicionamento do ligante no sítio ativo de acordo com a posição original no cristal, permitindo o cálculo do desvio da raiz quadrada média (RMSD), que é um parâmetro que avalia a semelhança da conformação obtida através do *docking* realizado com a conformação original presente na estrutura cristalográfica, para que desta forma, os parâmetros fossem validados, sendo considerados confiáveis para que o *docking* com os ligantes escolhidos pudesse ser realizado.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

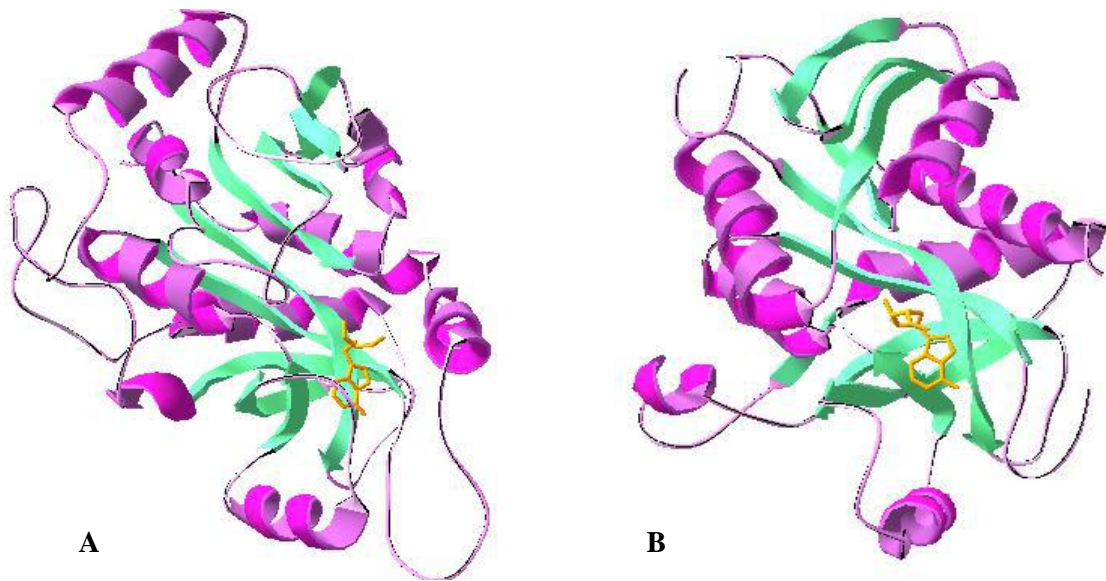
### 5.1. Escolha do Alvo Molecular

Após a busca bibliográfica com o objetivo de conhecer possíveis alvos moleculares para o tratamento da tricomoníase, foi escolhida, a enzima Purina Nucleosídeo Fosforilase (PNP) do protozoário *Trichomonas vaginalis*, uma vez que esta é uma enzima chave no processo de sobrevivência de muitos microorganismos patogênicos. A enzima PNP também está presente no organismo humano e diante disso, optou-se por realizar estudos comparativos entre ambas as enzimas, com a finalidade de se conhecer melhor as características que as diferenciam e, com base nestas diferenças, obter maior seletividade para potenciais inibidores dessas enzimas.

### 5.2. Comparação entre a PNP humana e a PNP de *T. vaginalis*

A partir da análise de ambas as enzimas, foram possíveis observar diferenças entre as mesmas, tais diferenças podem ser importantes para a seletividade de candidatos a fármacos para a inibição destas enzimas.

As diferenças estruturais observadas entre as duas enzimas foram as seguintes: a enzima PNP de *T. vaginalis* apresenta 236 resíduos de aminoácidos e em sua estrutura quaternária apresenta-se como um hexâmero, ou seja, seis monômeros ligados, pois desta forma favorece o enovelamento que confere menor energia para a proteína (MUNUGALA & WANG, 2002). Esta enzima possui cerca de dez folhas beta e sete alfa-hélices em sua estrutura secundária; a enzima PNP de *Homo sapiens* apresenta 288 resíduos de aminoácidos enovelados de forma a se apresentarem como um trímero, possui cerca de dez folhas beta e nove alfa hélices em sua estrutura secundária (Figura 7).



**Figura 7:** A) Estrutura 3D da enzima PNP de *T. vaginalis* em complexo com o inibidor DadMe-immucillin A; B) Estrutura 3D da enzima PNP de *H. sapiens* em complexo com o inibidor SerMe-immucillin H.

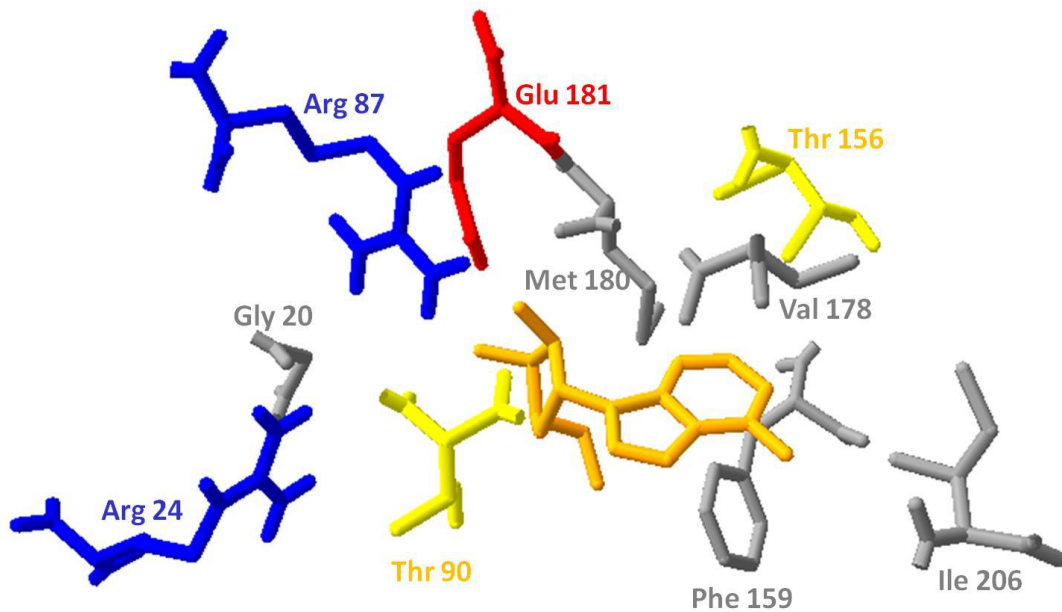
A partir do estudo sobre as características das duas enzimas, foi realizado com a utilização do servidor LigPlot o estudo das interações apresentadas entre estas macromoléculas co-cristalizadas com os seus respectivos inibidores. Desta forma, foi possível identificar os resíduos de aminoácidos que estabelecem interações de até 4 Ångstrons de distância e observar as diferenças de interações entre as duas enzimas com seus ligantes. Conforme mostra a Tabela 1, a seguir, pode-se observar que os inibidores destas enzimas apresentam interações com os resíduos de aminoácidos, evidenciando assim os resíduos que compõem o sítio ativo das mesmas, conforme dados da literatura (RINALDO-MATTHIS, 2007; HO, 2010).

**Tabela 1:** Interações estabelecidas entre os resíduos de aminoácidos e o ligante nas enzimas PNP de *T. vaginalis* e PNP de *H. sapiens*.

Organismo	Tipo de interações	Resíduos
<i>Homo sapiens</i>	Ligações de Hidrogênio	His 257; Trp 295; Tyr 88; Val 203 ; Met 219; Glu 201; Asn 243;
	<i>Van der Walls</i>	Ala 116; Trp 116; Val 260; Gly 218; Met 219; Phe 200; Val 245; Gly 118; Ala 117; Thr 242
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Ligações de Hidrogênio	His 4; Phe 159; Phe 181; Arg 87; Met 180; Trp 251; Ser 203;
	<i>Van der Walls</i>	Met 64; Thr 90; Phe 159; Glu 159; Gly 92; Ile 206; Cys 91;

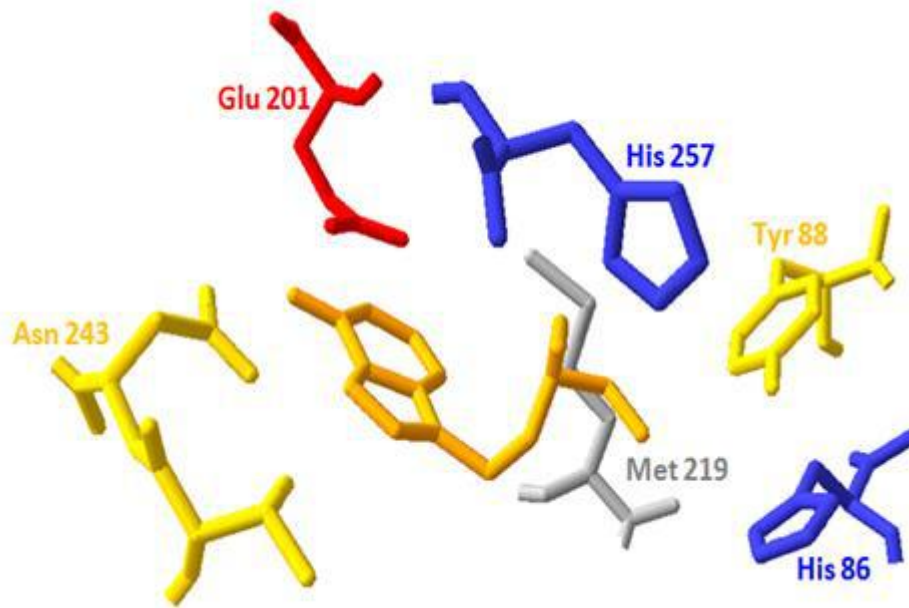
Através do programa *Swiss PDB Viewer* foi possível analisar os resíduos do sítio ativo de cada uma das enzimas, como descrito na literatura. Foi possível observar significativas diferenças físico-químicas entre os resíduos de aminoácidos que compõem o sítio ativo destas enzimas, uma vez que, estes podem ser classificados em grupos distintos de acordo com as características que apresentam, podendo ser: resíduos polares, não-polares, básicos e ácidos. A enzima PNP de *T. vaginalis* (FIGURA 8), possui seu sítio ativo formado pelos resíduos de aminoácidos Phe 159, Val 178, Met 180, Ile 206, Thr 90, Glu 181, Arg 24, Arg 87 e Gly 20, que são, em sua maioria de caráter não-polar, com exceção dos resíduos Thr 90 e Thr 156 que são de caráter polar, os resíduos de Arginina que são de caráter básico e resíduo Glu 181 que possui caráter ácido (Tabela 2) (RINALDO-MATTHIS, 2007).





**Figura 8:** Representação dos resíduos de aminoácidos que compõem o sítio ativo da enzima e PNP de *T. vaginalis*, classificados de acordo com o tipo. Os resíduos polares foram representados na cor amarela, os não-polares na cor cinza.

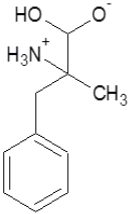
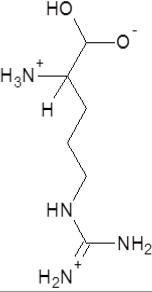
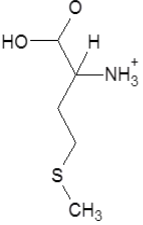
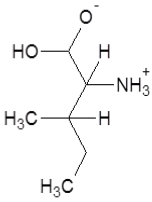
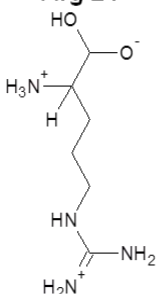
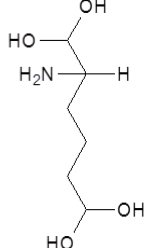
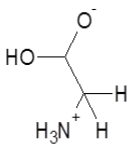
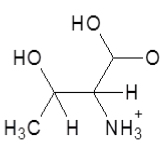
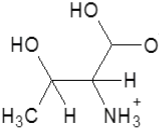
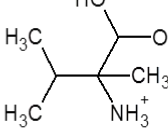
Em contra partida, como descrito na literatura, a enzima PNP de *H. sapiens*, apresenta seu sítio ativo formado pelos resíduos Tirosina 88 e Asparagina 243, que são resíduos polares com forte tendência de formação de ligações de hidrogênio, resíduos de Histidina que possuem características básicas e os resíduos dos aminoácidos Glutamina 201 e Metionina 219 que são respectivamente ácido e não-polar, evidenciando assim as diferenças entre ambas as enzimas, permitindo a promoção da seletividade de fármacos baseando-se nas distinções observadas (Figura 9)(HO, 2007).



**Figura 9:** Representação dos tipos de resíduos de aminoácidos que compõem o sítio ativo da enzima e PNP de *H. sapiens*, classificados de acordo com o tipo. Os resíduos polares foram representados na cor amarela, os não-polares na cor cinza, os ácidos na cor vermelha e os básicos na cor azul.

Como observado, os sítios ativos das enzimas são distintos devido às características dos resíduos de aminoácidos que os compõem. A Tabela 2 apresenta as estruturas e características dos resíduos de aminoácidos que compõem o sítio ativo da enzima PNP de *T. vaginalis*, e através desta, pode-se ter uma melhor visualização das propriedades físico-químicas destes resíduos. Nota-se que cinco dos dez resíduos de aminoácidos presentes apresentam caráter apolar, tais como: Phe 159, Met 180, Ile 206, Gly 20 e Val 178, que possuem individualmente, três grupos aceptores de ligação de hidrogênio (nON) e quatro grupos doadores de ligações de hidrogênio (nOHNH), dois resíduos com caráter polar, sendo eles: Thr 90 e Thr 156, que apresentam quatro grupos aceptores de ligações de hidrogênio e cinco grupos doadores de ligações de hidrogênio, dois resíduos com caráter básico, Arg 87 e Arg 24, com seis grupos aceptores de ligações de hidrogênio e nove grupos doadores de ligação de hidrogênio e um resíduo ácido, Glu 181, que possui cinco grupos aceptores de ligações de hidrogênio e seis grupos doadores de ligações de hidrogênio. Desta forma, sugere-se que esses resíduos são de grande importância para a atividade da enzima pois contribuem de forma significativa para que ligações de hidrogênio possam ser estabelecidas entre a macromolécula e o ligante.

**Tabela 2:** Classificação e características dos resíduos de aminoácidos que compõem o sítio ativo das enzimas PNP de *T. vaginalis*.

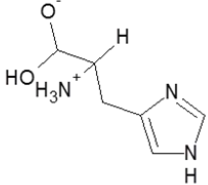
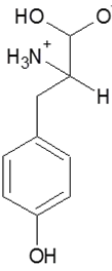
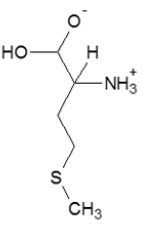
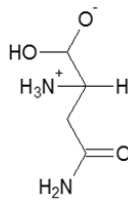
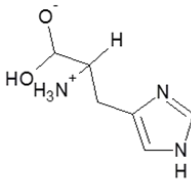
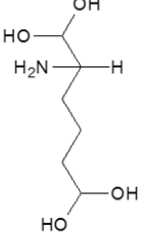
Resíduos de Aminoácidos da Enzima PNP de <i>T. vaginalis</i>			
Aminoácido	Característica	Aminoácido	Característica
<p><b>Phe 159</b></p> 	<p>Apolar nON: 3 nOHNH: 4</p>	<p><b>Arg 87</b></p> 	<p>Básico nON: 6 nOHNH: 9</p>
<p><b>Met 180</b></p> 	<p>Apolar nON: 3 nOHNH: 4</p>	<p><b>Ile 206</b></p> 	<p>Apolar nON: 3 nOHNH: 4</p>
<p><b>Arg 24</b></p> 	<p>Básico nON: 6 nOHNH: 9</p>	<p><b>Glu 181</b></p> 	<p>Ácido nON: 5 nOHNH: 6</p>
<p><b>Gly 20</b></p> 	<p>Apolar nON: 3 nOHNH: 4</p>	<p><b>Thr 90</b></p> 	<p>Polar nON: 4 nOHNH: 5</p>
<p><b>Thr 156</b></p> 	<p>Polar nON: 4 nOHNH: 5</p>	<p><b>Val 178</b></p> 	<p>Apolar nON: 3 nOHNH: 4</p>

nON: número de grupos aceptores de ligação de hidrogênio.  
nOHNH: número de grupos doadores de ligação de hidrogênio.

A Tabela 3 apresenta as estruturas e características dos resíduos de aminoácidos que compõem o sítio ativo da enzima PNP de *H. sapiens*, onde se podem visualizar as propriedades físico-químicas desses resíduos, observando a presença de dois resíduos básicos, His 86 e His 257, com cinco grupos aceptores de ligações de hidrogênio e cinco grupos doadores de ligações de hidrogênio, dois resíduos de caráter polar, Tyr 88, que possui quatro grupos aceptores de ligações de hidrogênio e cinco grupos doadores, e Ans 243, que por sua vez apresenta cinco grupos aceptores e seis grupos doadores de ligações de hidrogênio, um resíduo de caráter apolar, Met 219, com três grupos aceptores e quatro doadores de ligação de hidrogênio e um resíduo de caráter ácido, Glu 201, com cinco grupos aceptores e seis grupos doadores de ligações de hidrogênio. Desta forma, sugere-se que estes grupos aceptores e doadores são essenciais para o estabelecimento de ligações de hidrogênio que auxiliam na formação de um complexo enzima-substrato.

Quando comparadas as Tabelas 2 e 3, sugere-se que a enzima PNP de *T. vaginalis* tem condições de estabelecer um maior número de ligações de hidrogênio e outras interações com diferentes inibidores e substratos devido ao maior número de resíduos de aminoácidos que compõem seu sítio ativo e as diferentes propriedades destes, que propiciam uma maior oferta de grupamentos aceptores e doadores de ligações de hidrogênio, quando comparados aos resíduos que compõem o sítio ativo da enzima PNP de *H. sapiens*.

**Tabela 3:** Classificação e características dos resíduos de aminoácidos que compõem o sítio ativo das enzimas PNP de *H. sapiens*.

Resíduos de Aminoácidos da Enzima PNP de <i>H. sapiens</i>			
Aminoácido	Característica	Aminoácido	Característica
<p><b>His 86</b></p> 	<p>Básico nON: 5 nOHNH: 5</p>	<p><b>Tyr 88</b></p> 	<p>Polar nON: 4 nOHNH: 5</p>
<p><b>Met 219</b></p> 	<p>Apolar nON: 3 nOHNH: 4</p>	<p><b>Asn 243</b></p> 	<p>Polar nON: 5 nOHNH: 6</p>
<p><b>His 257</b></p> 	<p>Básico nON: 5 nOHNH: 5</p>	<p><b>Glu 201</b></p> 	<p>Ácido nON: 5 nOHNH: 6</p>

nON: número de grupos aceptores de ligação de hidrogênio.

nOHNH: número de grupos doadores de ligação de hidrogênio.

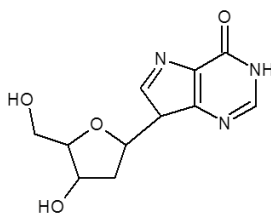
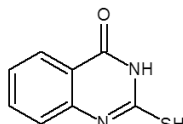
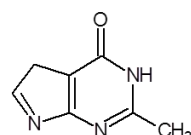
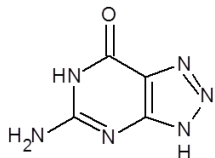
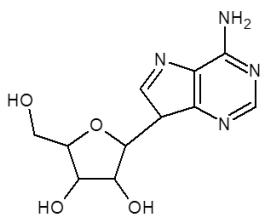
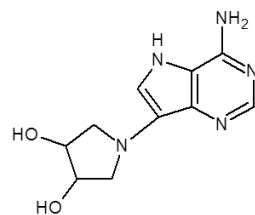
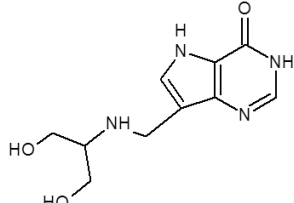
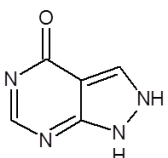
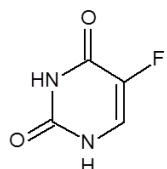
### 5.3. Análise conformacional dos potenciais inibidores da enzima PNP

A partir da escolha dos potenciais inibidores da enzima PNP humana, foi realizado o estudo da relação estrutura-atividade a partir de suas respectivas estruturas químicas. Muitos inibidores vêm sendo projetados com o objetivo de inibir da enzima PNP Humana, a saber: 2-desoxi-inosina, 7-desazaguanina, 2-mercapto-4(3H)-quinazolinona, 8-azaguanina, formicina A, DadMe-immucillin A e Ser-Me-immucillin-H (Tabela 4) (EVANS *et al.*, 2000; BZOWSKA *et al.*, 2000).

Adicionalmente, foram estudados alguns outros fármacos já existentes no mercado por serem estruturalmente semelhantes aos potenciais inibidores da PNP,

tais como, o alopurinol e o 5-fluoracil, pois podem apresentar potencial em tornar-se possíveis inibidores da enzima PNP (Tabela 4).

**Tabela 4:** Estruturas químicas de potenciais inibidores da enzima PNP.

Potenciais inibidores da enzima PNP		
2-desoxi-inosina 	MQU 	7-deazaguanina 
8-azaguanina 	Formicina A 	DadMe-immucillin A 
SerMe-immucillin H 	Alopurinol 	5-Fluoruracil 

Através de estudos realizados no programa Spartan<sup>10</sup> foram obtidos os resultados referentes à análise conformacional e propriedades físico-químicas dos potenciais inibidores para estas enzimas. Analisando as conformações das moléculas propostas foram escolhidas aquelas que apresentaram menor energia e procedeu-se com as minimizações onde se pode observar que o fármaco que apresentou melhor valor de solubilidade, foi o 2-desoxi-inosina, apesar de ter violado um aspecto da “Regra dos 5 de Lipinski”, uma vez que apresenta um número maior de grupos aceptores de ligações de hidrogênio do que o determinado por Lipinski para uma boa absorção oral. Dentre os fármacos co-cristalizados com as enzimas, o Ser-Me-immucillin-H não violou a nenhuma das “Regras de Lipinski” e apresentou cLogP -1,59 e LogS -0,84 sendo os melhores valores de lipofilicidade e de solubilidade quando comparados ao immucillin-A (Tabela 5).

Os fármacos e inibidores também foram avaliados quanto à biodisponibilidade oral, de acordo com os parâmetros determinados pela “Regra dos Cinco de Lipinski”, que compõem um conjunto de regras que norteiam a avaliação da biodisponibilidade oral de um fármaco. A “Regra de Lipinski” é descrita como sendo a molécula: apresentar massa molecular menor ou igual a 500 Da; possuir número de átomos aceptores de ligação de hidrogênio menor ou igual 10; possuir número de grupos doadores de ligação de hidrogênio (grupos OH ou NH) menor ou igual 5; apresentar Log do coeficiente de partição óleo/água (cLog P) menor ou igual a 5. Desta forma, a avaliação da biodisponibilidade oral foi realizada utilizando dados obtidos com o programa Molinspiration (<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>), onde pode-se concluir que os potenciais inibidores da enzima PNP apresentaram valores teóricos de uma boa biodisponibilidade oral uma vez que obedeceram a todas as regras estabelecidas por Lipinski, excetuando-se apenas aos compostos 2-desoxi-inosina e DadMe-immucillin-A, que obedeceram a pelo menos três das quatro regras.

O resultado obtido corrobora com dados experimentais, pois por exemplo, o alopurinol é um fármaco comercializado no Brasil com o nome de Zyloric<sup>®</sup>, produzido pela Aspen Pharma, como medicamento referência, com a apresentação de comprimidos de 100 ou 300 mg, com a indicação para a redução da formação de urato e/ou ácido úrico, nas principais manifestações de depósito dessas duas substâncias, que ocorre em indivíduos com artrite gotosa e nefrolitíase ou naqueles que apresentam um risco clínico potencial (ANVISA, 2014).

Essa avaliação pode ser melhor observada na Tabela 5, com o parâmetro “nviolations”, que determina o número de violações da regra de Lipinski (LIPINSKI, 2004).

**Tabela 5:** Comparação dos descritores estereoeletrônicos dos fármacos: peso molecular (PM), lipofilicidade, solubilidade, área de superfície, número de grupamentos doadores e aceptores de ligações de hidrogênio, número de ligações rotacionáveis na estrutura, volume e número de violações da regra de Lipinski.

	cLogP	LogS	PM	TPSA	nON	nOHNH	nRot	Nviolations	Volume
<b>2-desoxi-inosina</b>	-5,16	0,29	412	206,336	14	5	6	1	298,022
<b>MQU</b>	1,6	-3,22	180	84,81	3	2	0	0	151,37
<b>7-deazaguanina</b>	-0,91	-2,19	150	83,27	5	4	0	0	124,122
<b>8-azaguanina</b>	-0,78	-1,99	152	113,61	7	4	0	0	115,702
<b>Formicina A</b>	-1,45	-2,75	281	139,551	9	5	2	0	235,092
<b>SerMe-Immucillin H</b>	-1,59	-0,84	252	114,028	7	5	5	0	208,550
<b>DadMe-Immucillin A</b>	-1,99	-1,04	265	140,309	8	7	2	1	225,723
<b>Alopurinol</b>	-2,78	-1,54	136	74,437	5	2	0	0	108,677
<b>5-Fluorouracil</b>	-3,08	-0,57	134	65,724	4	2	0	0	96,913

cLogP: Lipofilicidade

LogS: Solubilidade

PM: Peso Molecular

TPSA: Área de Superfície

nON: número de grupos aceptores de ligação de hidrogênio.

nOHNH: número de grupos doadores de ligação de hidrogênio.

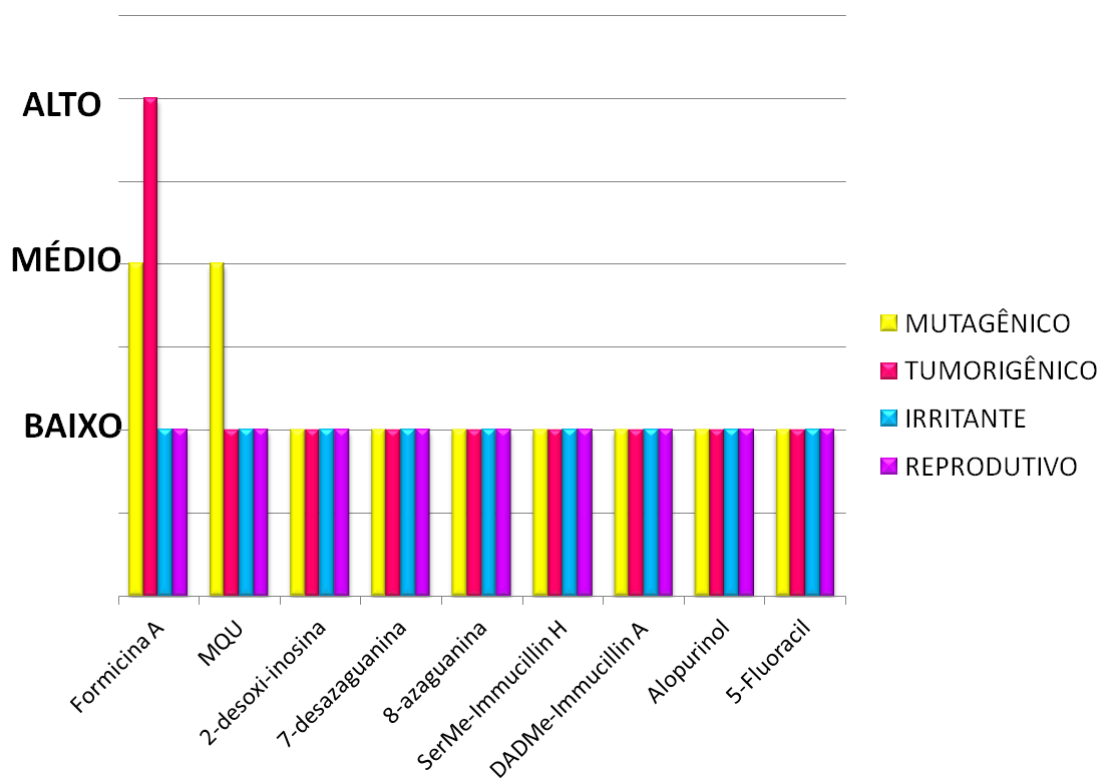
nRot: Ligações rotacionáveis

nViolations: Número de violações à “Regra dos Cinco” de Lipinski.

Foi realizada a avaliação da toxicidade dos fármacos analisados e para isso, empregou-se o programa *Osiris Property Explorer* (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/drugScore.html>). Os resultados obtidos puderam ser observados para os efeitos mutagênico, tumorigênico, irritante e reprodutivo em três diferentes níveis de severidade, podendo ser: alto risco, médio risco e baixo risco.

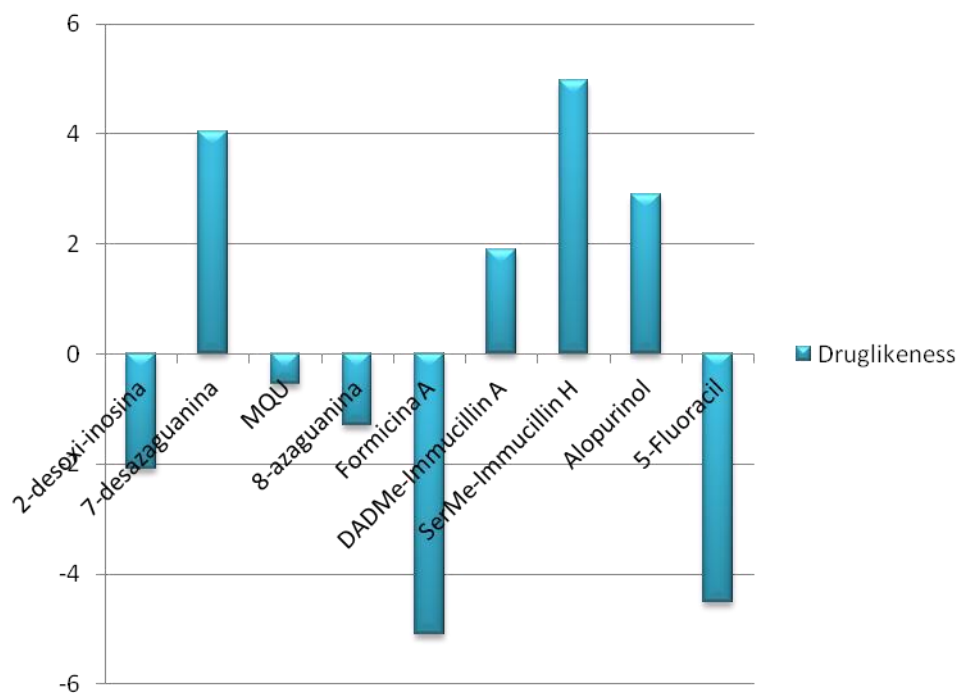


Pode-se observar que todas as moléculas analisadas apresentaram baixo risco de toxicidade *in silico*, com exceção da formicina A e do MQU, que apresentaram médio risco para o efeito mutagênico e, além disso, a formicina A também apresentou alto risco para o efeito tumorigênico, sendo desta forma, considerada a molécula com mais possibilidade de apresentar toxicidade, dentre as demais analisadas no presente estudo. Estes resultados são apresentados no gráfico a seguir:



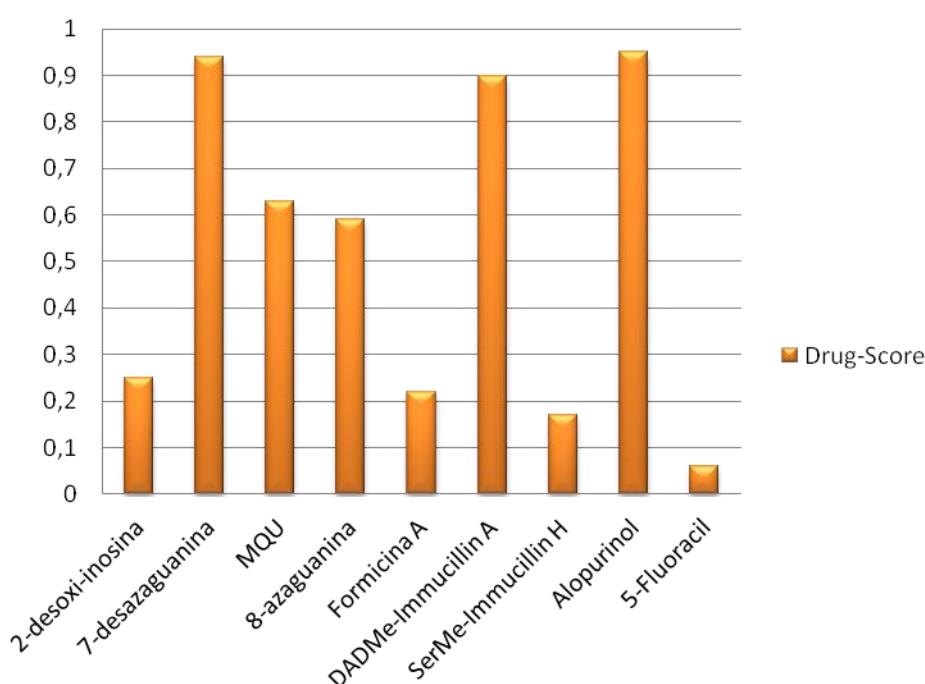
**Figura 10:** Risco de mutagenicidade, tumorigenicidade, efeito irritante e efeito na reprodução de potenciais inibidores da enzima PNP de *H. sapiens* obtidos com o programa *Osiris Property Explorer*.

Observando os resultados obtidos com o perfil *druglikeness*, pode-se perceber que apenas três compostos apresentaram bons valores, são eles: 7-desazaguanina, DADMe-Immucillin A e SerMe-Immucillin H, evidenciando assim, que estes apresentam semelhanças estruturais com fármacos já existentes no mercado. Dentre os fármacos, apenas o alopurinol apresentou bons valores de *druglikeness*, como já era esperado, já o 5-fluoracil, não apresentou bom valores nessa avaliação (Figura11).



**Figura 11:** Perfil *druglikeness* dos fármacos e potenciais inibidores da enzima PNP obtido com o programa *Osiris Property Explorer*.

Através do cálculo de *drug-score* é possível prever o potencial que uma molécula tem em se tornar um fármaco através de uma pontuação que vai de 0-1. Observando os resultados obtidos apresentados na figura 12, pode-se perceber que a maior parte dos potenciais inibidores apresentaram uma boa pontuação, com exceção da 2-desoxi-inosina e da formicina A. Dentre os fármacos analisados, o Alopurinol apresentou uma pontuação elevada, como já era esperado, por ser um fármaco já existente no mercado, em contra partida, o fármaco 5-fluoracil apresentou uma pontuação de 0,06, sendo considerada muito baixa.



**Figura 12:** Perfil *drugscore* dos fármacos e potenciais inibidores da enzima PNP obtido com o programa *Osiris Property Explorer*.

Através do estudo dos perfis de *druglikeness* e *drugscore*, pode ser observado que os compostos 7-desazaguanina e DADMe-Immucillin A apresentaram bons resultados, demonstrando que apresentam potencial em se tornarem fármacos futuramente. Também foi possível observar que o fármaco alopurinol se mostrou com excelente pontuação, como já era esperado, por ser um fármaco já comercializado e com biodisponibilidade oral.

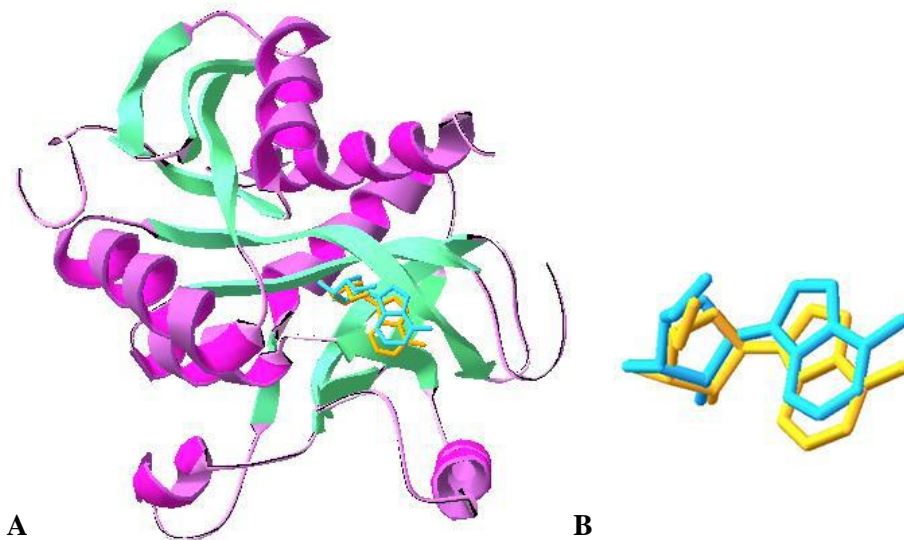
Já o fármaco 5-fluoracil, não apresentou um bom perfil nos estudos em questão, apesar do resultado, este fármaco já é comercializado no Brasil com o nome de Fluoruracila<sup>®</sup> com apresentação de solução injetável 250 mg/10 ml ou pomada de uso tópico 50mg/g, com o nome comercial de Efurix<sup>®</sup>, sendo indicado

para o tratamento de tumores malignos como os localizados no reto, cólon, mama, estômago, pâncreas, fígado (tumores primários), útero (especialmente colo do útero), ovário e bexiga e também para o tratamento de ceratose actínica (solar ou senil), doença de Bowen, epitelomas baso celulares superficiais simples ou múltiplos, lesões pré-malignas (ANVISA, 2014).

#### 5.4. *Docking* Molecular

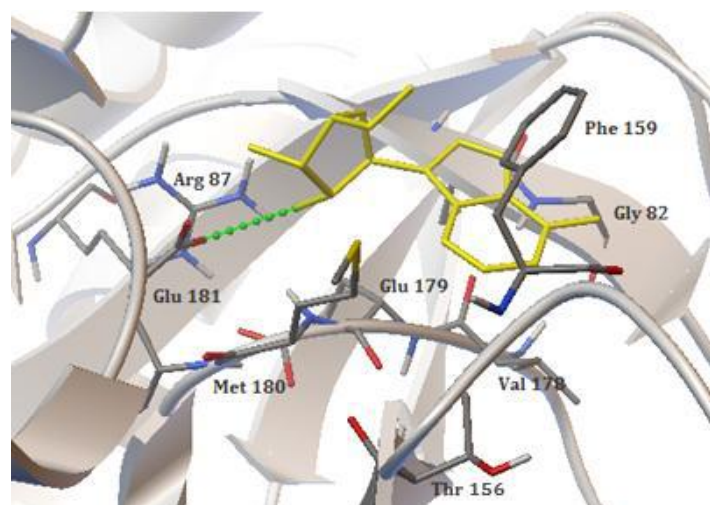
Os estudos de *docking* molecular foram realizados através do programa autodock 4.0. Previamente ao estudos de *docking*, foram realizados os estudos de *redocking* molecular, com o objetivo de validar os parâmetros, que serem utilizados no *docking* molecular. Então, realizou-se o *redocking* de ambas as proteínas com os inibidores co-cristalizados. Iniciou-se com a retirada dos ligantes das estruturas das proteínas e para cálculo do *grid*, foram usadas as dimensões de 40x40x40 Å, e com espaçamento de 0,375 Å, e foram calculados os mapas para os tipos de átomos presentes usando o *Autogrid 4*.

Com isso foram obtidas as melhores conformações dos dois inibidores com seus respectivos cristais, onde foi possível avaliar que os parâmetros encontrados foram ideais para a realização do *docking* molecular através do cálculo do desvio médio da raiz quadrada (RMSD), que é um parâmetro que avalia a semelhança da conformação obtida através do *docking* realizado com a conformação original presente na estrutura cristalográfica, onde valores de RMSD inferiores a 2Å são considerados aceitos (RODRIGUES *et al.*, 2012). Para a enzima PNP de *T. vaginalis* foram obtidas 50 conformações em três diferentes clusters, onde a conformação que se comportou de forma mais semelhante ao DadMe-immucillin A em sua posição original no cristal foi a primeira conformação do cluster de menor energia (-6,53KJ), obtendo-se um valor de RMSD de 0,82Å (Figura 13), que torna o parâmetro utilizado aceitável.



**Figura 13:** A) Visualização da estrutura tridimensional da enzima PNP de *T. vaginalis* com a sobreposição entre a conformação do DadMe-immucillin A obtida com o *redocking* (AMARELO) e a estrutura do cristal (azul). B) Sobreposição entre a conformação do imucillin A obtida com o *redocking* (amarelo) e a estrutura do cristal (azul).

Com o complexo obtido através do *redocking* foi possível visualizar as interações realizadas entre o ligante e os resíduos de aminoácidos da enzima PNP de *T. vaginalis*, tais como: Arg 87, Cys 91, Gly 92, Thr 156, Phe 159, Val 178, Glu 179 e Glu 181. Onde destaca-se a ligação de hidrogênio formada com o resíduo Glu 181, e as interações observadas com os resíduos Arg 87, Thr 156, Phe 159 e Val 178 por serem características da interação com o sítio ativo da enzima, como mostrado na Figura 14, corroborando com dados da literatura (Tabela 6) (RINALDO-MATTHIS, 2007)



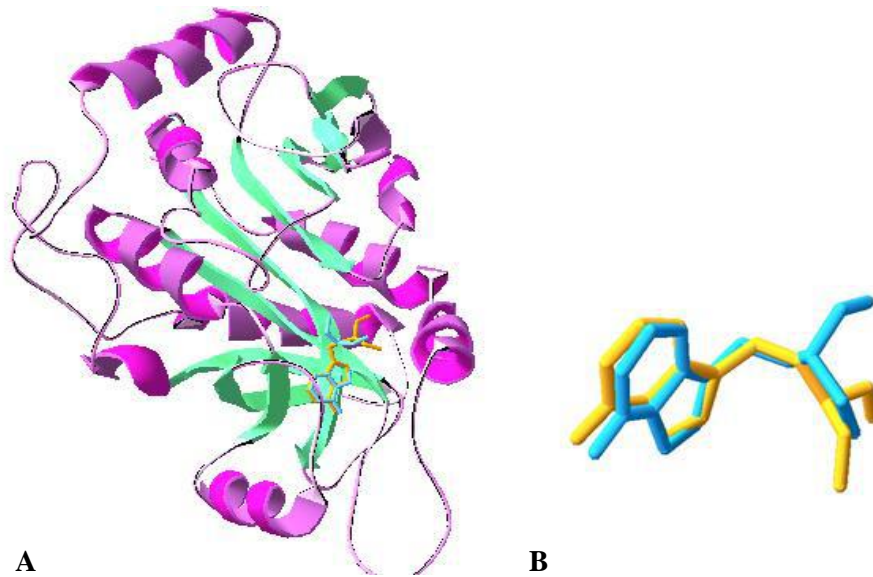
**Figura 14:** Análise das interações do ligante DadMe-immucillin A com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da enzima PNP de *T. vaginalis*.

Segundo Rinaldo-Matthis *et al.* (2007), com o complexo formado entre a enzima PNP de *T. vaginalis* e o inibidor DadMe-immucillin A, há o estabelecimento de uma série de interações, dentre elas há a formação de uma ligação de hidrogênio entre o resíduo Glu 181 e a porção ribose do inibidor DadMe-immucillin A, isto pode ser evidenciado na Tabela 6, onde estão descritas as interações estabelecidas, bem como a distância de cada uma delas, obtidas através do *redocking* do ligante DadMe-immucillin A com a enzima PNP de *T. vaginalis*. Observa-se que a ligação de hidrogênio estabelecida entre o resíduo Glu 181 e o O-2 da porção ribosídica do ligante DadMe-immucillin A tem cerca de 2,500 Å de distância. Adicionalmente pode-se reafirmar que os parâmetros utilizados com o *redocking* podem ser empregados no *docking*, uma vez que, além do RMSD obtido estar dentro dos critérios de aceitação, também nota-se que interações semelhantes àsquelas observadas com o cristal podem ser visualizadas, fornecendo assim, um resultado próximo aos resultados originais do cristal obtido da interação da macromolécula com o inibidor.

**Tabela 6:** Descrição dos resíduos de aminoácidos que interagiram com o ligante DadMe-immucillin A no *redocking* na enzima PNP de *T. vaginalis*.

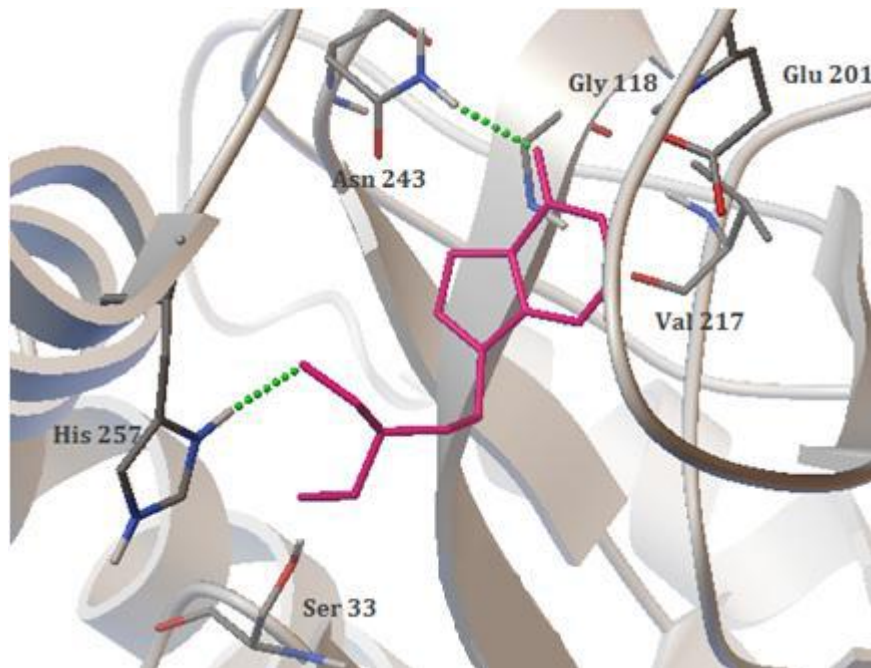
Resíduo	Distância
Glu 181	2,500
Arg 87	2,740
Cys 91	3,280
Gly 92	2,730
Thr 156	3,560
Phe 159	3,060
Val 178	3,430
Glu 179	3,630

Com a enzima PNP de *H. sapiens* foram obtidas 50 conformações em dois diferentes clusters, onde a conformação que se comportou de forma mais semelhante ao SerMe-immucillin H em sua posição original do cristal foi a primeira conformação do cluster de menor energia (-6,72KJ), obtendo-se um valor de RMSD de 1,13Å (Figura 15), que torna o parâmetro utilizado aceitável.



**Figura 15:** A) Visualização da estrutura tridimensional da enzima PNP de *H. sapiens* com a sobreposição entre a conformação do SerMe-immucillin H obtida com o *redocking* (AMARELO) e a estrutura do cristal (azul). B) Sobreposição entre a conformação do SerMe-immucillin H obtida com o *redocking* (AMARELO) e a estrutura do cristal (AZUL).

Com o complexo obtido através do *redocking* foi possível visualizar as interações realizadas entre o ligante e os resíduos de aminoácidos da enzima PNP de *H. sapiens*, tais como: Ser 33, Gly 118, Glu 201, Val 217, Asn 243, His 257, Val 260. Dentre estas interações, as ligações de hidrogênio estabelecidas foram: Ser 33, Asn 243, His 257, e Val 260, onde destacam-se as ligações com os resíduos Ans 243 e His 257, e a interação com o resíduo Glu 201 por serem características da interação com o sítio ativo da enzima, como mostrado na Figura 16, corroborando com dados da literatura (Tabela 7) (HO, 2010).



**Figura 16:** Análise das interações do ligante imucilina-H com os aminoácidos do sítio ativo da enzima PNP de *H. sapiens*.

Na Tabela 7, podem ser observadas todas as interações realizadas entre os resíduos de aminoácidos da enzima PNP de *H. sapiens* e o ligante SerMe-immucillin H, bem como a distância de cada interação. Desta forma, pode-se observar que houve a formação de uma ligação de hidrogênio entre o resíduo His 257 e o O5 do ligante com a distância de aproximadamente 2,022 Å , como descrito na literatura (HO, 2010).

**Tabela 7:** Descrição dos resíduos de aminoácidos que interagiram com o ligante SerMe-immucillin H no *redocking* na enzima PNP de *H. sapiens*.

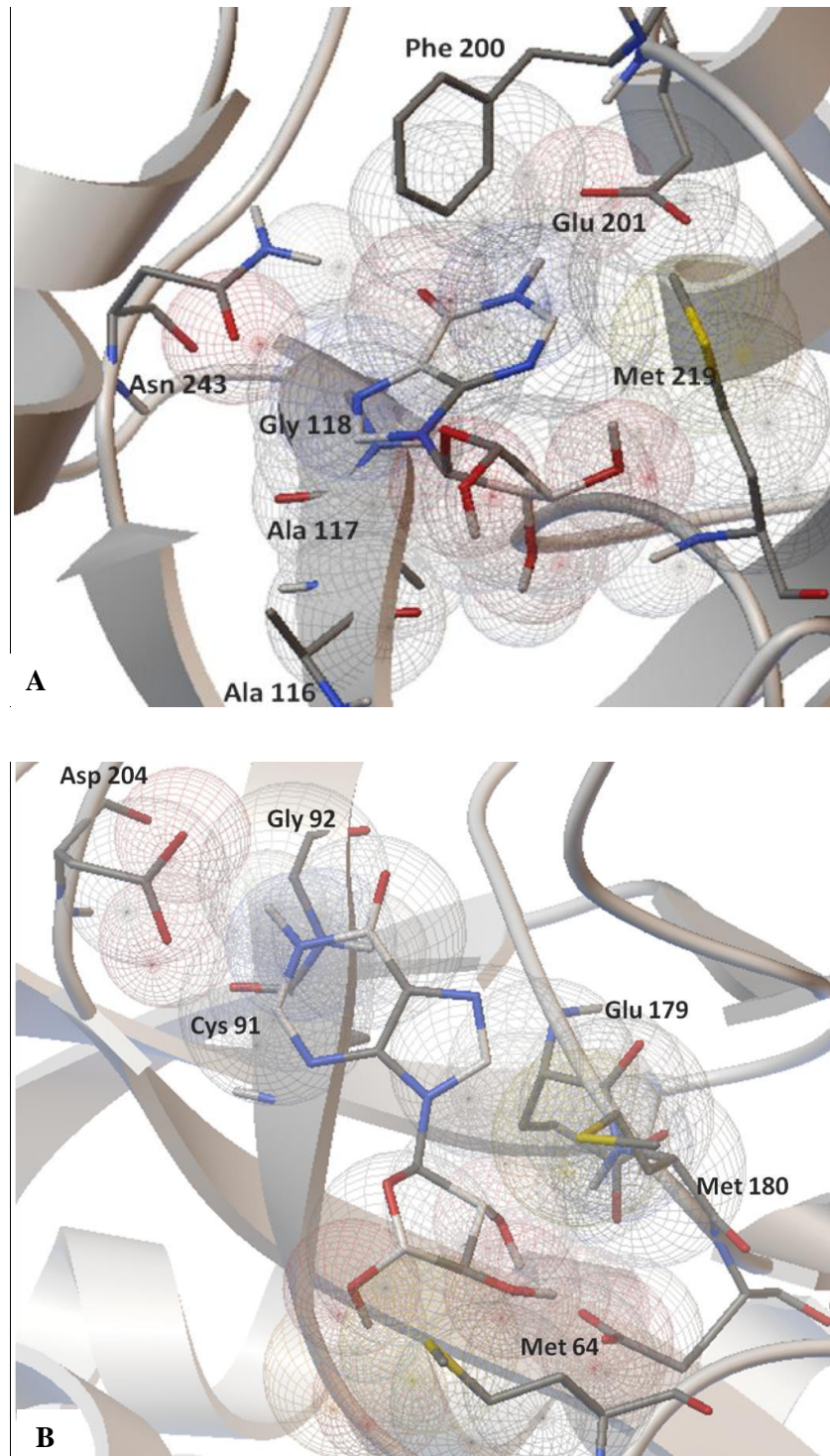
Resíduo <i>HsPNP</i>	Distância <i>HsPNP</i>
<b>Ser 33</b>	1,840
<b>Asn 243</b>	2,130
<b>His 257</b>	2,022
<b>Val 260</b>	2,130
<b>Gly 118</b>	3,250
<b>Glu 201</b>	2,930
<b>Val 217</b>	3,960

Pode-se observar que a enzima PNP de *T. vaginalis* estabeleceu mais interações com o ligante do que a enzima PNP de *H. sapiens*, incluindo ligações de hidrogênio. Isso pode ser devido ao fato do sítio ativo da enzima do protozoário



apresentar propriedades físico-químicas mais favoráveis à interação com o ligante DadMe-immucillin A.

A partir dos resultados obtidos com os estudos de *docking* entre os substratos adenosina, inosina e guanosina e as enzimas PNP de *H. sapiens* e *T. vaginalis*, foi possível observar as interações destas enzimas com cada substrato. Quando observada a energia de ligação do complexo enzima-substrato, nota-se que o complexo que obteve a melhor energia de ligação foi o obtido com a enzima PNP de *H. sapiens* e o substrato inosina, com uma energia equivalente a -3,85, seguido do complexo obtido com a enzima PNP de *T.vaginalis* e o substrato inosina, com energia de -3,34, diante disso, sugere-se que o substrato preferencial para ambas as enzimas é a inosina, corroborando com dados da literatura (Figura 17) (AZEVEDO *et al.*, 2003; DOS SANTOS *et al.*, 2003).



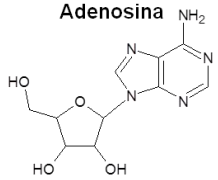
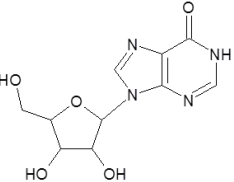
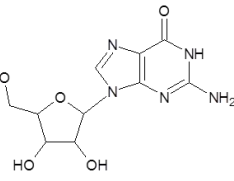
**Figura 17:** Resultado do *docking* para o substrato inosina nas enzimas PNP de *H. sapiens* (A) e PNP de *T. vaginalis* (B) mostrando as interações de hidrogênio e esferas de Van der Walls estabelecidas entre as enzimas e o substrato inosina.

Ao realizar a comparação entre o complexo formado da enzima PNP de *T. vaginalis* e o substrato guanosina e o complexo obtido com este mesmo substrato com a enzima PNP de *H. sapiens*, sugere-se que o complexo formado com a enzima

do protozoário é mais favorável biologicamente, apresentando energia de ligação em torno de -2,58, enquanto com a enzima humana a energia é de -1,19.

Observando as interações estabelecidas entre ambas as enzimas e o substrato adenosina, sugere-se que o complexo formado não é o preferencial, uma vez que as energias de ligação são mais altas, quando comparados ao substrato preferencial inosina, corroborando com a literatura (Tabela 8) (AZEVEDO *et al.*, 2003; DOS SANTOS *et al.*, 2003). Apesar disso, em estudos realizados por Munagala & Wang, pode-se sugerir que o substrato adenosina é de grande importância como precursor no processo de obtenção de bases purínicas (MUNAGALA & WANG, 2003).

**Tabela 8:** Interações obtidas através do docking molecular substratos adenosina, inosina e guanósina com as enzima PNP de *T. vaginalis* e PNP de *H. sapiens*.

Substrato	PNP Humana			PNP <i>T. vaginalis</i>		
	Resíduos	Distância	Energia de Ligação	Resíduos	Distância	Energia de Ligação
<p><b>Adenosina</b></p> 	Thr 90 Met 64 Phe 159 Tyr 160 Ser 203	1,860 3,490 3,660 2,180 2,600	-1,95	Ser 33 Tyr 88 Pro 198 Met 219 His 257 Val 260	1,920 3,320 3,030 3,280 2,270 3,490	1,16
<p><b>Inosina</b></p> 	Met 180 Glu 181 Glu 181 Asp 204 Met 64 Gly 92 Glu 179	1,820 2,230 1,740 2,730 2,320 3,410 3,760 3,590	-3,85	Glu 201 Met 219 Asn 243 Ala 116 Ala 117 Gly 118 Phe 200	1,920 2,340 2,170 3,060 3,060 2,960 3,610	-3,34
<p><b>Guanosina</b></p> 	Ser 203 Asp 204 Asp 204 Thr 90 Cys 91 Gly 92 Val 178 Glu 179	2,210 1,860 2,240 3,510 3,230 1,870 1,950 3,620	-1,19	Tyr 88 Pro 198 Pro 198 Ser 33 Phe 200 Met 219 His 257 Val 260	1,760 2,730 2,740 2,730 3,660 2,880 2,010 2,670	-2,58

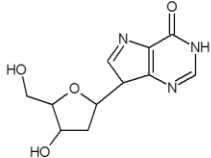
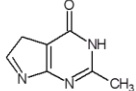
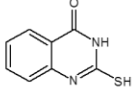
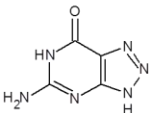
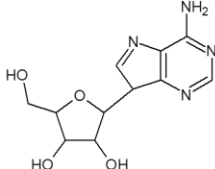
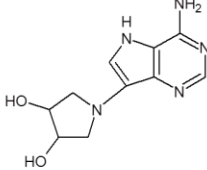
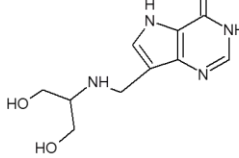
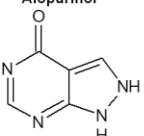
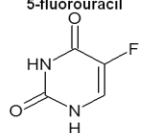
Analisando os resultados obtidos com os estudos de *docking* entre os inibidores e as enzimas PNP de *H. sapiens* e *T. vaginalis*, foi possível observar que

o inibidor que apresentou a menor energia de ligação em ambas as enzimas foi o DadMe-immucillin A (Tabela 9).

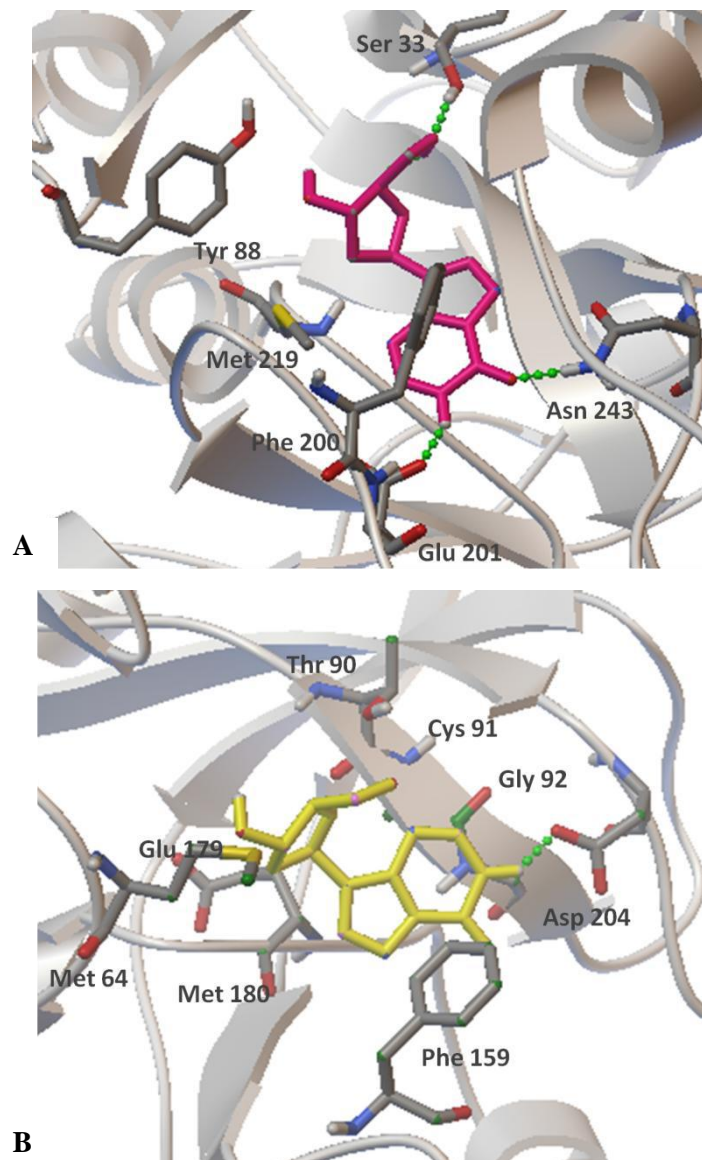
Quando avaliados em relação a energia de ligação, comparando o DadMe-immucillin A e o SerMe-immucillin H no *docking* na enzima PNP de *T. vaginalis*, há uma significativa diferença nos valores de energia de ligação obtidos, sugerindo assim, que o DadMe-immucillin A apresenta uma maior facilidade em ligar-se à enzima, isso poder ser atribuído ao fato de sua estrutura permite uma maior oferta de interações, como observado em sua estrutura demonstrada na Tabela 9.

Quando observadas as constantes de inibição, nota-se que o SerMe-immucillin H promove uma inibição cerca de oito vezes maior na enzima do protozoário quando comparada à enzima humana, enquanto o DadMe-immucillin A apresenta inibição quatro vezes maior na enzima do protozoário. Sabendo-se que os dados obtidos são qualitativos para a constante de inibição. Os demais inibidores comportam-se de forma semelhante em ambas as enzimas, sugerindo que estudos de planejamento de fármacos que promovam modificações estruturais nos inibidores SerMe-immucillin H e DadMe-immucillin A podem favorecer a especificidade de ambos para a enzima do protozoário, permitindo assim uma nova rota no tratamento da tricomoníase.

**Tabela 9:** Interações obtidas através do *docking* molecular dos potenciais inibidores com a enzima PNP de *T. vaginalis* e PNP de *H. sapiens*.

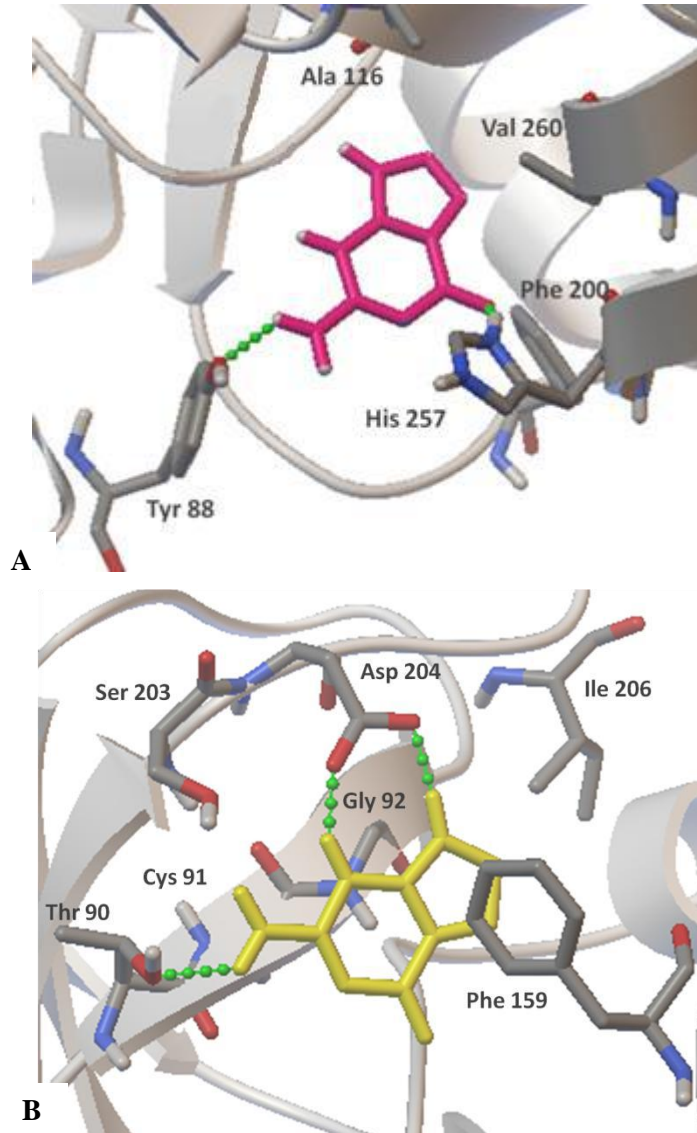
Inibidor	PNP <i>H. sapiens</i>				PNP <i>T. vaginalis</i>			
	Resíduos	Distância	Energia de Ligação	K <sub>i</sub> (mM)	Resíduos	Distância	Energia de Ligação	K <sub>i</sub> (mM)
<p><b>2-desoxi-inosina</b></p> 	Ser 33 Glu 201 Asn 243 Tyr 88 Phe 200 Met 219	1,953 1,866 1,836 2,380 4,000 3,900	-3,01	6,24	Asp 204 Asp 204 Met 65 Thr 90 Cys 91 Gly 92 Phe 159 Glu 179 Met 180	1,688 2,540 3,870 2,440 3,550 3,190 3,840 3,200 3,820	-2,86	8,07
<p><b>7-desazaguanina</b></p> 	Tyr 88 His 257 Ala 116 Phe 200 Val 260	2,025 2,110 2,980 3,250 3,120	-2,12	28,02	Thr 90 Ser 203 Asp 204 Asp 204 Cys 91 Gly 92 Phe 159 Ile 206	2,070 2,460 1,313 1,853 3,600 3,630 3,680 3,460	-2,33	19,48
<p><b>2-mercapto-4(3H)-quinazolinona</b></p> 	Glu 201 Glu 201 Asn 243 Ala 116 Val 195 Phe 200 Val 217 Gly 218 Met 219 Thr 242 Val 260	2,026 1,840 2,065 3,300 3,290 3,570 3,230 3,150 2,860 3,060 3,650	-3,74	1,82	Ser 203 Asp 204 Asp 204 Thr 90 Gly 92 Phe 159 Glu 179 Met 180	2,147 1,708 2,161 3,030 3,690 3,530 3,500 3,550	-3,41	3,19
<p><b>8-azaguanina</b></p> 	Glu 201 Glu 201 Glu 201 Thr 242 Asn 243 Ala 117 Gly 118 Phe 200 Val 245	2,003 1,768 2,510 2,460 1,838 3,860 3,720 3,660 2,830	-2,95	6,85	Asp 204 Asp 204 Phe 159 Ile 206	1,934 1,822 1,930 3,920	-2,87	7,94
<p><b>Formicina A</b></p> 	Tyr 88 Pro 198 Ser 199 Phe 200 His 257 Val 260	2,188 2,170 3,240 3,160 2,290 3,500	-1,31	109,9	Tyr 90 Ser 203 Asp 204 Cys 91 Gly 92 Phe 159	2,116 2,040 1,645 3,850 3,210 2,610	-1,53	75,49
<p><b>DadMe-immucillin A</b></p> 	Met 219 Asn 243 His 86 Tyr 88 Ala 116 Gly 118 Phe 200 Val 217 Gly 218	2,197 1,766 3,030 3,060 2,820 2,460 3,090 3,310 3,010	-7,28	4,6	Glu 181 Arg 87 Cys 91 Gly 92 Thr 156 Phe 159 Val 178 Glu 179	2,050 2,740 3,280 2,730 3,560 3,060 3,430 3,630	-6,53	16,35
<p><b>SerMe-immucillin H</b></p> 	Ser 33 Asn 243 His 257 Val 260 Gly 118 Glu 201 Val 217	1,840 2,130 2,022 2,130 3,250 2,930 3,960	-6,72	11,81	Met 180 Arg 87 Thr 90 Cys 91 Phe 156 Val 178 Glu 179 Glu 181 Ile 206	2,213 2,680 3,590 3,500 3,650 3,360 2,770 2,620 3,530	-0,32	91,85
<p><b>Alopurinol</b></p> 	Ser 33 His 257 Tyr 88 Phe 200 Val 260	1,950 1,944 1,890 3,170 3,200	-1,75	52,47	Phe 159 Tyr 160	3,850 1,760	-1,61	66,2
<p><b>5-fluorouracil</b></p> 	Glu 201 Asn 243 Asn 243 Gly 118 Gly 218 Val 217 Val 245	1,820 2,182 1,870 3,010 3,070 3,150 3,170	-2,46	15,68	Thr 90 Ser 203 Asp 204 Cys 91 Gly 92 Val 178 Glu 179	2,060 1,820 2,010 3,970 2,820 2,750 3,140	-2,51	14,47

O resultado do *docking* realizado com o inibidor 2-desoxi-inosina na enzima PNP de *H. sapiens* mostra que são estabelecidas duas ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos que compõem o sítio ativo da mesma, sendo eles: Glu 201 e Asn 243, enquanto com a enzima PNP de *T. vaginalis* nenhuma das ligações de hidrogênio formadas são relatadas como característica do sítio ativo da enzima, mas outras interações relatadas como tais são observadas, são elas: Thr 90, Phe 159 e Met 180 (Figura 18).



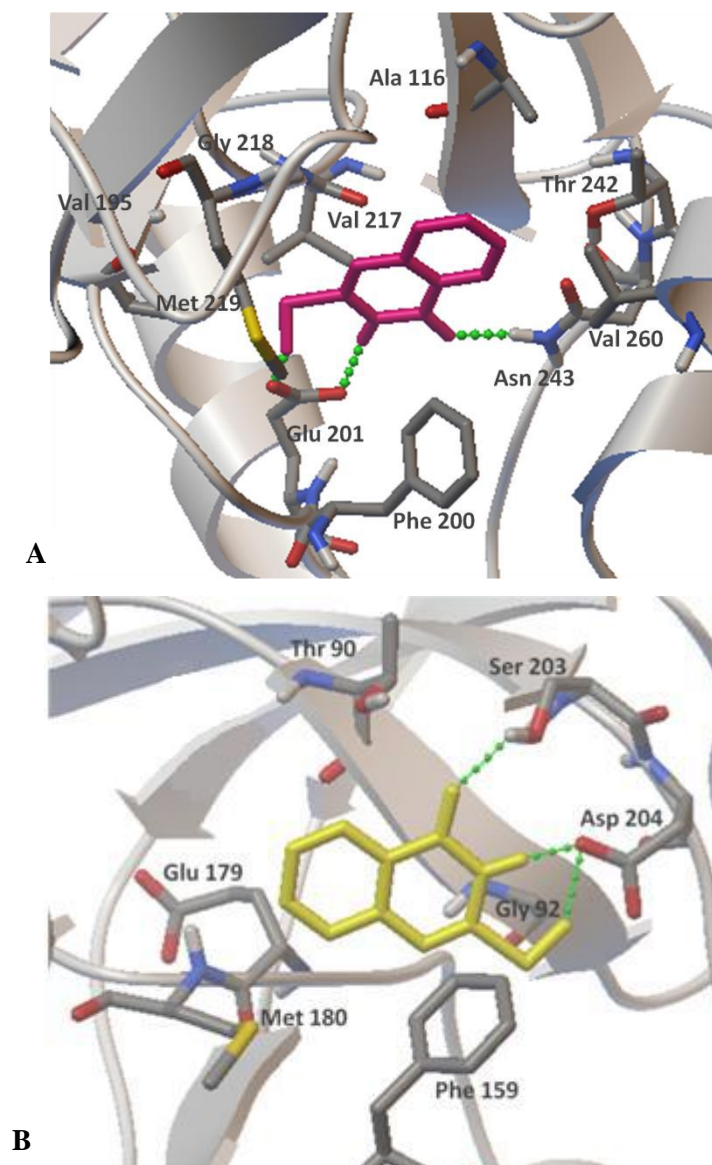
**Figura 18:** Resultado do *docking* molecular realizado com o inibidor 2-desoxi-inosina. A) Enzima PNP de *H. sapiens* B) Enzima PNP de *T. vaginalis*.

Com o inibidor 7-desazaguanina, observa-se a formação de duas ligações de hidrogênio características do sítio ativo da enzima humana, sendo estas formadas com os resíduos Tyr 88 e His 257. Já com a enzima de *T. vaginalis*, observa-se a formação de apenas uma ligação de hidrogênio com o resíduo Thr 90 do sítio ativo, mas observam-se outras interações com os resíduos Phe 159 e Ile 206 (Figura 19).



**Figura 19:** Resultado do *docking* molecular realizado com o inibidor 7-desazaguanina. A) Enzima PNP de *H. sapiens* B) Enzima PNP de *T.vaginalis*.

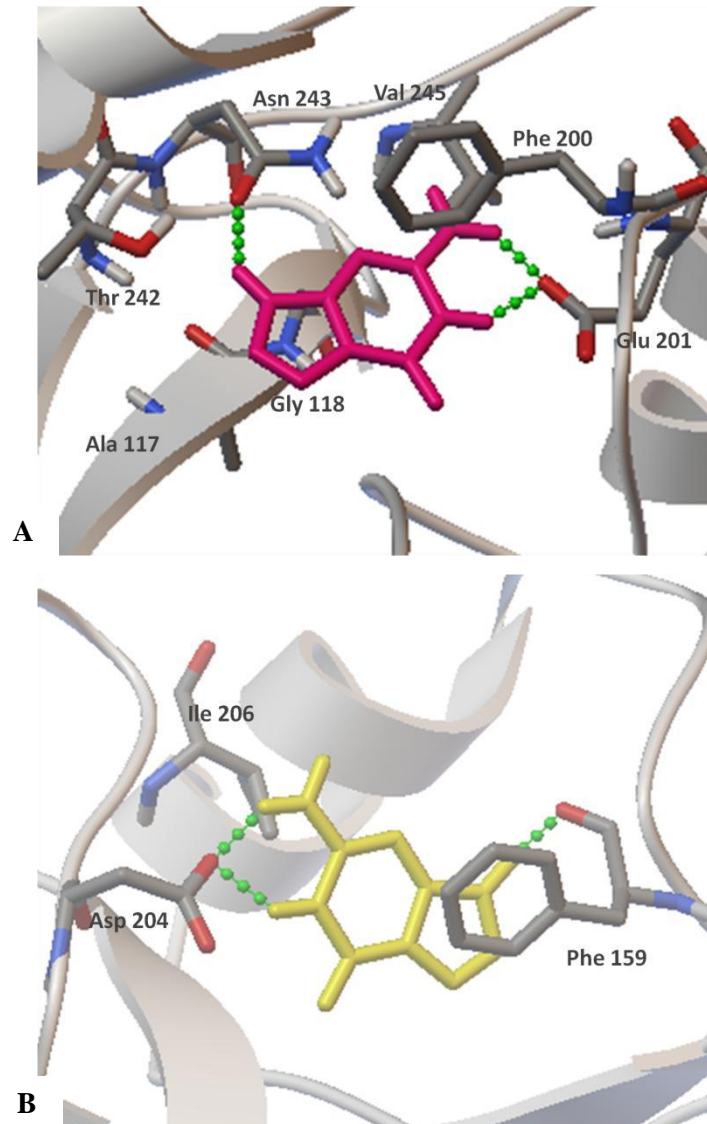
A partir dos resultados obtidos com o inibidor MQU nenhuma ligação de hidrogênio com resíduo do sítio ativo da enzima do protozoário é observada, mas outras interações podem ser observadas, sendo estas estabelecidas com os seguintes resíduos do sítio ativo: Met 180, Thr 90 e Phe 159. Já com a enzima humana, observam-se a formação de duas ligações de hidrogênio com resíduos do sítio ativo, sendo eles: Glu 201 e Asn 243, como também outras interações moleculares com o resíduo Met 219 (Figura 20).



**Figura 20:** Resultado do *docking* molecular realizado com o inibidor MQU. A) Enzima PNP de *H. sapiens* B) Enzima PNP de *T. vaginalis*.

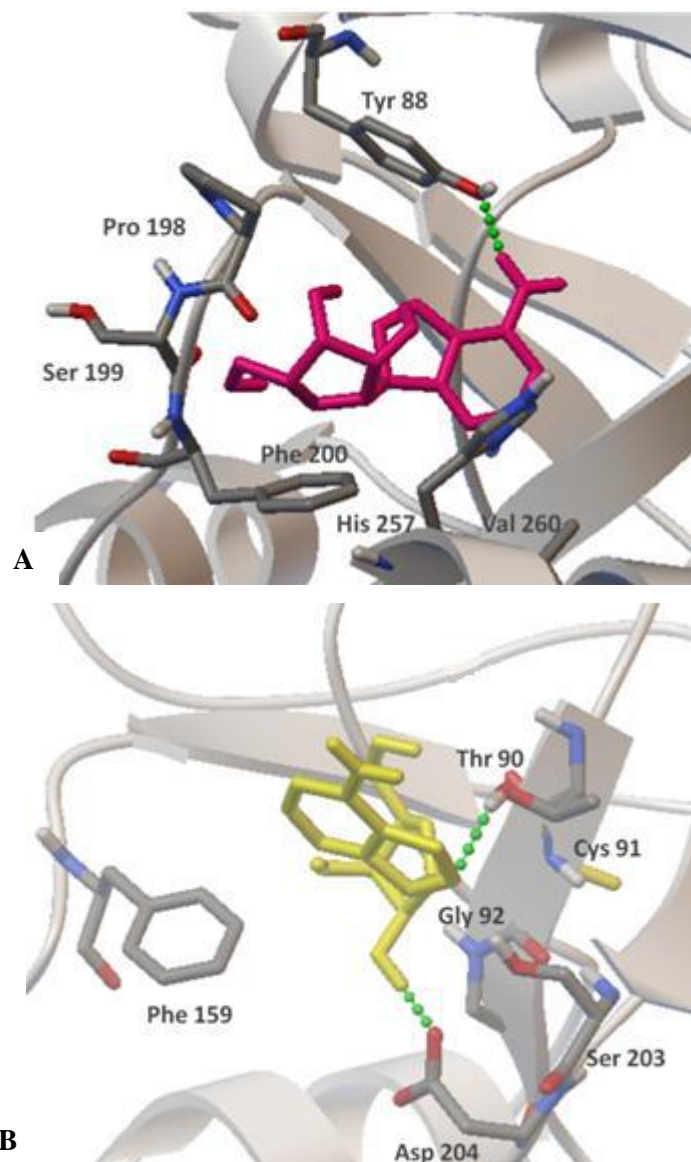


Com o inibidor 8-azaguanina, nota-se a formação de uma ligação de hidrogênio com o resíduo Phe 159 e outra interação molecular com o resíduo Ile 206, sendo ambos do sítio ativo da enzima do protozoário. Já com a enzima humana, tem-se a formação de três ligações de hidrogênio, sendo duas delas com o resíduo Glu 201 e uma com o resíduo Asn 243, sendo ambos constituintes do sítio ativo da enzima PNP de *H. sapiens* (Figura 21).



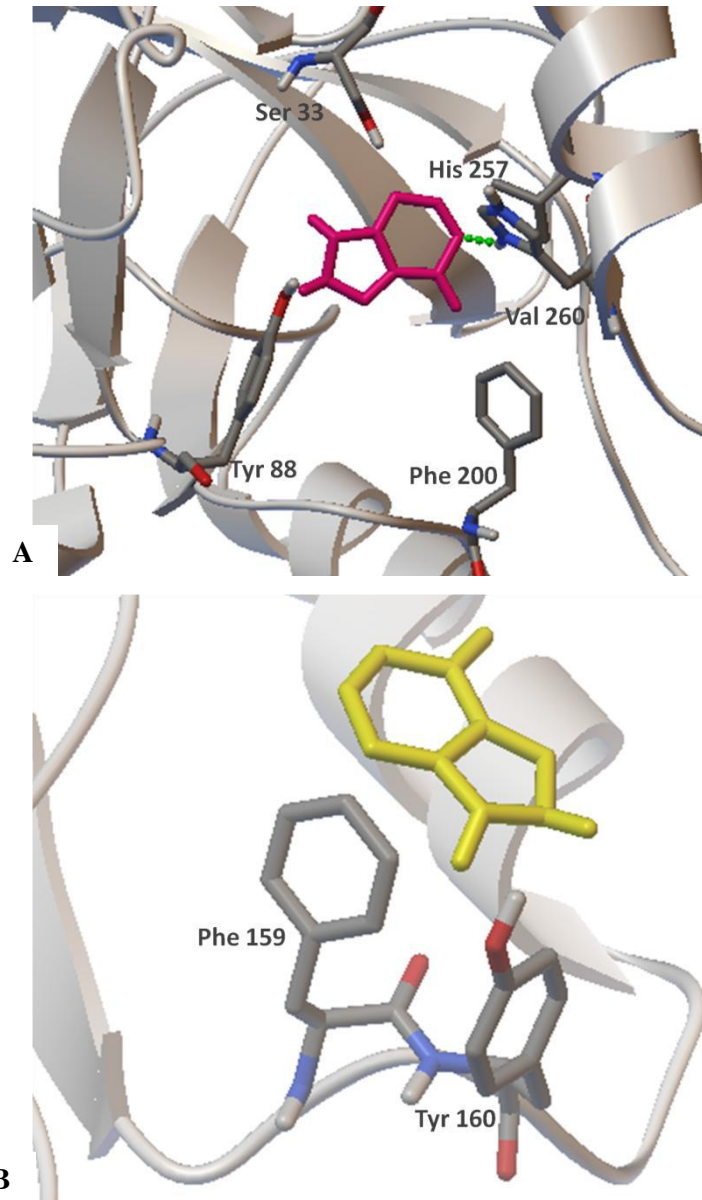
**Figura 21:** Resultado do docking molecular realizado com o inibidor 8-azaguanina. A) Enzima PNP de *H. sapiens* B) Enzima PNP de *T. vaginalis*.

A partir da análise do *docking* realizado com o inibidor Formicina A, observa-se a formação de uma ligação de hidrogênio com o resíduo Tyr 90 e outras interações com o resíduo Phe 159, sendo ambos os resíduos, característicos do sítio ativo da enzima PNP de *T. vaginalis*. De forma semelhante, com a enzima humana, pode-se observar o estabelecimento de uma ligação de hidrogênio com o resíduo Tyr 88 e outra interação molecular com o resíduo His 257, que compõem o sítio ativo da enzima (Figura 22).



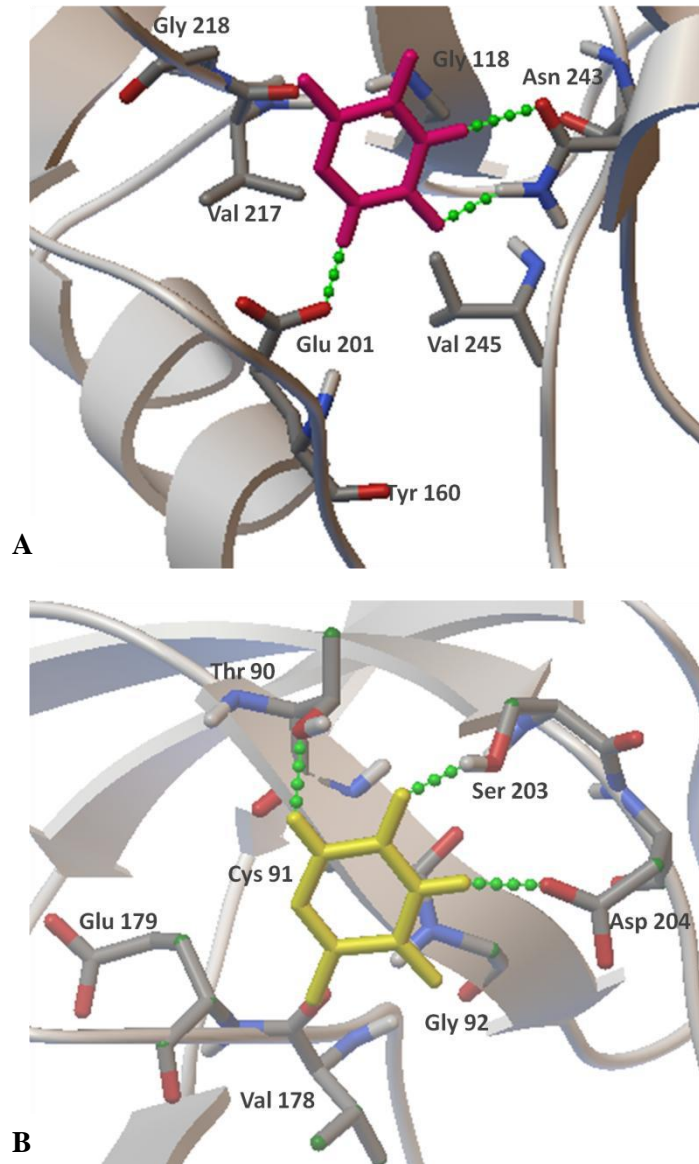
**Figura 22:** Resultado do docking molecular realizado com o inibidor Formicina A. A) Enzima PNP de *H. sapiens* B) Enzima PNP de *T.vaginalis*.

Das duas interações estabelecidas entre o fármaco alopurinol e a enzima PNP do protozoário, apenas uma é realizada com resíduo de aminoácido característico do sítio ativo, sendo este, o resíduo Phe 159. Já com a enzima humana, pode-se observar uma ligação de hidrogênio com o resíduo His 257 e uma outra interação com o resíduo Tyr 88, sendo ambos resíduos característicos do sítio ativo da enzima humana (Figura 23).



**Figura 23:** Resultado do docking molecular realizado com o fármaco alopurinol. A) Enzima PNP de *H. sapiens* B) Enzima PNP de *T. vaginalis*.

Observando os resultados de *docking* obtidos com o fármaco 5-fluorouracil, observa-se a formação de uma ligação de hidrogênio com o resíduo Thr 90, bem como uma interação molecular com o resíduo Val 178, sendo ambos, resíduos constituintes do sítio ativo da enzima do protozoário. Já com a enzima humana, foram observadas a formação de duas ligações de hidrogênio, sendo estas com os resíduos Glu 201 e Asn 243, que compõem o sítio ativo da mesma (Figura 24).



**Figura 24:** Resultado do docking molecular realizado com o fármaco 5-fluorouracil. A) Enzima PNP de *H. sapiens* B) Enzima PNP de *T.vaginalis*.

Com a análise dos resultados obtidos através dos estudos de *docking* molecular realizados com os inibidores, puderam ser observadas as distintas formas de interação entre as enzimas e seus ligantes. Onde nota-se que os compostos que estabeleceram o maior número de interações com resíduos do sítio ativo da enzima TvPNP, foram o 2-desoxi-inosina e o MQU, apesar de não terem obtidos os melhores valores de energia de ligação e constante de inibição. Desta forma, nota-se a necessidade de estudos experimentais serem realizados com ambas as enzimas e os inibidores, para que dessa forma os resultados teóricos possam ser confirmados.

## 6. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos, pode-se concluir que a comparação realizada no presente estudo entre as enzimas PNP de *Homo sapiens* e de *Trichomonas vaginalis* foi satisfatória, uma vez que, foram visualizadas significativas diferenças estruturais e físico-químicas entre ambas as enzimas. Sugere-se que estas diferenças podem contribuir para o planejamento de fármacos com maior seletividade baseando-se nas características individuais destas enzimas.

Através da análise das propriedades farmacocinéticas dos potenciais inibidores e fármacos, pode-se dizer que os mesmos obedeceram a “Regra dos Cinco” de Lipinski, excetuando-se apenas os compostos 2-desoxi-inosina e DadMe-immucillin-A.

Com a análise dos resultados obtidos através dos estudos de *docking* molecular realizados com os substratos, sugere-se que a inosina é o substrato preferencial tanto da enzima PNP de *Trichomonas vaginalis* quanto da enzima PNP humana. Adicionalmente, a partir dos estudos de *docking* realizados com os inibidores, puderam ser observadas as distintas formas de interação entre as enzimas e seus ligantes. Nesse contexto, nota-se a necessidade de estudos experimentais serem realizados com ambas as enzimas e os inibidores, para que dessa forma os resultados teóricos possam ser confirmados.

Diante dos resultados apresentados, espera-se que o estudo tenha contribuído para a compreensão das diferenças entre as enzimas PNP Humana e do protozoário *Trichomonas vaginalis*, bem como as formas de interação com os inibidores, de forma a colaborar com o planejamento de compostos que estabeleçam interações favoráveis com o sítio ativo da TvPNP e desta forma, cooperar com uma rota alternativa para o tratamento da tricomoníase.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADU-SARKODIE, Y; OPOKU, B.K.; DANSO, K.A.; WEISS, H.A.; MABEY, D.. Comparison of latex agglutination, wet preparation, and culture for the detection of trichomonas vaginalis. **Sex Trans Inf.** v 80, p 201-203, 2004.

ALMEIDA, M.S.; ARGOLO, D.S.; ALMEIDA JR., J.S.; PINHEIRO, M.S.; DE BRITO, A.M.G. Tricomoniase: prevalência no gênero feminino em Sergipe no biênio 2004 - 2005. **Ciência & Saúde Coletiva**, v 15, p 1417-1421, 2010.

Bulário Eletrônico. ANVISA. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Medicamentos/Assunto+de+Interesse/Bulas+e+Rotulos+de+medicamentos/Como+acessar+o+Bulario+Eletronico+-+Cidad+ao+-+Profissionais>> Acesso em: 12 de Agosto, 2014.

Antimicrobianos: Bases Teóricas e Uso Clínico. ANVISA. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_web/modulo1/nitroimidazolicos.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/nitroimidazolicos.htm)> Acesso em: 2 de Abril, 2014.

JR. DE AZEVEDO W. F., CANDURI F., SANTOS D. M. dos, PEREIRA J. H., DIAS M. V. B., SILVA R. G., MENDES M. A., BASSO L. A., PALMA M. S., SANTOS D. S. Structural basis for inhibition of human PNP by immucillin-H. **Biochem Biophys Res Commun**, v 309 (4), p 917-22, 2003.

BARRIO, A.G.; RUIZ, J.J.N.; PEREIRA, D.M.; GALLELO, E.R.; FERNANDEZ, E.R.; ESCARIO, J.A. Biological Variability in Clinical Isolates of Trichomonas vaginalis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v 97 (6), p 893-896, 2002.

BEINERT, H.; HOLM, R.H.; MÜNCH, E. Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. **Science**, v 277, p 653-659, 1997

BIOCRYST PHARMACEUTICALS. **Forodesine**. 2014. Disponível em: <http://www.biocryst.com/forodesine>. Acesso em: 07 Nov. 2014, 23:50.

BOEHNCKE, W-H.; GILBERTSEN, R. B.; HEMMER, J.; STERRY, W.; Evidence for a pathway independent from 2'-deoxyguanosine and reversible by IL-2 by which purine nucleoside phosphorylase inhibitors block T-cell proliferation. **Scand J. Immunol**, v 39 (3), p 327-332, 1994.

BOWDEN, F. J.; GARNETT, G. P. Trichomonas vaginalis epidemiology: parameterising and analysing a model of treatment interventions. **Sex. Transm. Inf.** v 76, p 248-256, 2000.

BRASIL. **Manual de Controle de Doenças Sexualmente Transmissíveis**. 2006.

BZOWSKA, A.; KUKIKOWSKA, E.; SHUGAR, D. Purine Nucleoside Phosphorylases: properties, functions and clinical aspects. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 88, 349-425, 2000.

DA SILVEIRA, N.J.F.; UCHÔA, H.B.; CANDURI, F.; PEREIRA, J.H.; JR CAMERA, J.C.; BASSO, L.A.; PALMA, M.C.; SANTOS, D.S.; JR DE AZEVEDO, W.F. Structural bioinformatics study of PNP from *Schistosoma mansoni*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v 322, p 100-104, 2004.

DOS SANTOS, D.M.; CANDURI, F.; PEREIRA, J.H.; DIAS, M.V.B.; SILVA, R.G.; MENDES, M.A.; PALMA, M.S.; BASSO, L.A.; JR DE AZEVEDO, W.F.; SANTOS, D.S. Crystal structure of human purine nucleoside phosphorylase complexed with acyclovir. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v 308, p 553-559, 2003.

DrugBank 4.0: shedding new light on drug metabolism. Law V, Knox C, Djoumbou Y, Jewison T, Guo AC, Liu Y, Maciejewski A, Arndt D, Wilson M, Neveu V, Tang A, Gabriel G, Ly C, Adamjee S, Dame ZT, Han B, Zhou Y, Wishart DS. **Nucleic Acids Res.** 2014

EDWARDS, D. I. Nitroimidazole drugs – action and resistance mechanisms. Mechanisms of action. **J. Antimicrob. Chemother.** v 31, p 9-20, 1993.

FEITOSA, C. F.; CONSOLARO, M.E.L. Tricomoníase: aspectos gerais e diagnóstico pela colpocitologia de papanicolaou. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, v 9 (3), p 199-206, 2005.

GUÉRARDI, A.; SARCIRON, M.A. Molecules targeting the purine salvage pathway in apicomplexan parasites. **Trends in Parasitology**, v 23, p 649-660, 1974.

HERSHFELD, M. S.; MITCHELL. B.S. **The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease**. Nova York: McGraw-Hill Inc 1995.

HARDICK, J. et al. Use of roche lightcycler instrument in a real-time PCR for *Trichomonas vaginalis* in urine samples from females and males. **J. Clin. Microbiol.** v 41 (12), p 5619-5622, 2003.

HO, M.; SHI, W.; RINALDO-MATTHIS, A.; TYLER, P.C.; EVANS, G.B.; CLINCH, K.; ALMO, S.C.; SCHARMM, V.L. Four generations of transition-state analogues for human purine nucleoside phosphorylase. **Biochemistry**, v 107 (11), p 4805-4812, 2010.

HORI, M.; ITO, E.; YAKITA, T.; KOYAMA, G.; TAKEUCHI, T.; UMEZAWA, H. A new antibiotic, formycin. **J. Antibiotcs**, v 17, p 96-99, 1964.

HUPPERT, J.S.; BATEIGER, B.E.; BRASLINS, P.; FELDMAN, J.A.; HOBBS, M.M.; SANKEY, H.Z.; SENA, A.C.; WENDEL, K.A. Use of an immunochromatographic assay for rapid detection of *Trichomonas vaginalis* in vaginal specimens. **J. Clin. Microbiol.** v 43 (2), p 684-87, 2005.

JR PARKS, R.E.; AGARWAL, R.P. The Enzymes. **Academic Press**, p 483-514, 1972.



KALCKAR, H. M. Enzymatic synthesis of a nucleoside. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 158, p 723-724, 1945.

LEHKER, M.W.; ALDERETE, J.F. Biology of tricomoniasis. **Curr Open Infect Dis**, v 13, p 37-45, 2000.

LEWANDOWICZ, A.; TYLER, P.C.; EVANS, G.B.; FURNEAUX, R.H.; SCHARAMM, V.L. Achieving the ultimate physiological goal in transition state analogue inhibitors for purine nucleoside phosphorylase. **Biochemistry**, v 278 (34) , p 31465-8, 2003.

LIPINSKI, C.A. Lead and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. **Drug Discovery Today: Technologies**, v 1, p 337-341, 2004.

LIU, S. M., BROWN, D. M., O'DONOGHUE, P., UPCROFT, P. & UPCROFT, J.A. Ferredoxin involvement in metronidazole resistance of *Giardia duodenalis*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 108, p. 137-140, 2000.

MACIEL, G.P.; TASCA, T.; DE CARLI, G.A. Aspectos clínicos, patogênese e diagnóstico de *Trichomonas vaginalis*. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v 40 (3), p 152-60, 2004.

MARKERT, M.L. Purine nucleoside phosphorylase deficiency. **Immunodeficiency. Rev.** v 3 (1), p 45-81.

MICHAEL, R.V.; BORGES, F.P.; WILTUSCHINIG, R.C.M.; NEVES, F.G.; RIBEIRGO, J.; VIEIRO, R.C.; VIEIRA, P.B.; BOHNS, G.R.; TASCA, T.; DE CARLI, G.A. A Prevalência da Tricomonose em mulheres residentes na Vila de Papeleiros em Porto Alegre, RS. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v 38, p 127-130, 2006.

MILES, R.W.; TYLER, P.C.; FURNEAUX, R.H.; BAGDASSARIAN, C.K.; SCHARAMM, V.L. One-third-the-sites transition-state inhibitors for purine nucleoside phosphorylase. **Biochemistry**, v 37 (24), p 8615-8621, 1998.

MORRIS, G.M.; GOODSELL, D.S.; HALLIDAY, R.S.; HUEY, R.; HART, W.E.; BALEW, R.K.; OLSON, A.J. Automated docking using a Lamarckian Genetic Algorithm and empirical binding free energy function. **J. Comput. Chem.** v 19, p 1639-1662, 1998.

MUNUGALA, N.R.; WANG, C.C. The purine nucleoside phosphorylase from *Trichomonas vaginalis* is a homologue of the bacterial enzyme. **Biochemistry**, v 41 (20), p10382-9, 2002.

MUNAGALA, N.R.; WANG, C.C. Adenosine is the primary precursor of all purine nucleotides in *Trichomonas vaginalis*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v 127, p 143-149, 2003.

NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

PAPANICOLAOU, G. N.; TRAUT, H. F. A new procedure for staining vaginal smears. **J. Obst. Gyn.**, v 42, p 193, 1941.

PETRIN, D. et al. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. **Clin. Microb. Revi.** v 11 (2), p 300-317, 1998.

PORTER, D.J.T. Purine Nucleoside phosphorylase, Kinect mechanism of the enzyme from calf spleen. **J. Biol. Chem.**, v 267, p 7342-7351, 1992.

POSTIGO, M.P. **Planejamento racional de inibidores da enzima Purina nucleosídeo fosforilase de *Schistosoma mansoni***. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

RADONJIC, I.V.; DZAMIC, A.M.; MITROVIC, S.M.; ARSENIJEVIC, V.S.A.; POPADIC, D.M.; ZEE, I.F.K. Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection: The sensitivities and specificities of microscopy, culture and PCR assay. **European Jornal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v 126, p 116-120, 2006.

REY, L. **Bases da parasitologia médica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2002.

RINALDO-MATTHIS, A.; WING, C.; GHANEM, M.; DENG, H.; WU, P.; GUPTA, A.; TYLER, P.C.; EVANS, G.B.; FURNEAUX, R.H.; ALMO, S.C.; WANG, C.C.; SCHRAMM, V.L. Inhibition and structure of *Trichomonas vaginalis* purine nucleoside phosphorylase with picomolar transition state analogues. **Biochemistry**, v 46 (3), p 659-668, 2007.

RODRIGUES, R.P.; MANTOANI, S.P.; DE ALMEIDA, JR.; PINSETTA, F.R. SEMIGHINI, E.P.; DA SILVA, V.B.; DA SILVA, C.H.O. Estratégias de triagem virtual no planejamento de fármacos. **Rev. Virtual de Quim**, v 4 (6), p 739-776, 2012.

THELANDER, L.; REICHARD, P. **Annu. Rev. Biochem.** 1979, 48,133±158.

TOWNSON, S. M.; BOREHAM P. F. L.; UPCROFT P.; UPCROFT, J. A. Resistance to nitroheterocyclic drugs. **Acta Trop**, v 56, p 173-194, 1994.

SANNER, M.F. Python: a programming language for software integration and development. **J. Mol Graphics Mod.**, v 17, p 57-61, 1999.

SANDER, T. Actelion Pharmaceuticals Ltd., Gewerbestrasse 16, 4123 Allschwil, Switzerland;

SCHARMM, V.L. Enzymatic transition states and transition state analogs designs. **Annu. Rev. Bioche**, v 67, p 693-720, 1998.

SHARMA, P.C.; KAUR, G.; PAHWA, R.; SHARMA, A.; RAJAK, H. Quinazolinone analogs as potential therapeutic agents. **Curr Med Chem**, v 18 (31), p 4786-812, 2011.

SILVA FILHO, A.M.; LONGATTO FILHO, A. Colo Uterino & Vagina: Processos Inflamatórios. **Revinter**, p 35-54, 2000.

SILVA, R. A. M. S.; SEIDL, A.; RAMIREZ, L.; DÁVILA, A. M. R. *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*: biologia, diagnóstico e controle – Corumbá: Embrapa Pantanal, 2002.

SNYDER, F. F.; JENUTH, J. P.; MABLY, E. R.; MANGAT, R. K. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 1997, 94, 2522-2527.

SOARES, M.C.; DE SOUZA, M.C.B.V.; FERREIRA, V.F. Estratégias para a síntese de desoxinucleosídeos. **Química Nova**, v 24 (2), p 206-219, 2001.

SORVILLO, F.; SMITH, L.; KERNDT, P.; ASH, L. *Trichomonas vaginalis*, HIV and Africans-Americans. **Emerging Infectious Diseases**, v 7, p 927-932, 2001.

STOECKELER, J.D.; CAMBOR, C.; JR PARKS, R.E. Human erythrocytic purine nucleoside phosphorylase: reaction with sugar-modified nucleosides substrates. **Biochemistry**, v 19, p 102-107, 1980.

TIMMERS, L.F.S.M.; CACERES, R.A.; VIVAN, A.L.; GAVA, L.M.; DIAS, R.; DUCATI, R.G.; BASSO, L.A.; SANTOS, D.S.; JR DE AZEVEDO, W.F. Structural studies of human purine nucleoside phosphorylase: Towards a new specific empirical scoring function. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v 479, p 28-38, 2008.

THOMSON, A.W. **Therapeutic Immunosuppression**. 1ª Edição. Holanda: Springer Science & Business Media, 2001. 512 p.

WANG J. Primary care update for Ob/Gyns. **J. Trichomoniasis**. v 7, p148-153, 2000.

WIERZCHOWSKI, J.; KUSMIEREK, J.; GIZIEWICZ, J.; SALVI, D.; SHUGAR, D. Analogs of formycins A and B: synthesis and some properties of methyl derivatives of 7-amino and 7-keto pyrazolo(4,3-d)pyrimidines. **Acta Biochimica Polonica**, v 27 (1), p 35-56, 1980.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections: overview and estimates. Geneva, WHO, p 27-29, 2011.