



Universidade Federal do Rio de Janeiro

Campus Professor Aloísio Teixeira

Curso de Farmácia



Modelagem Molecular da Interação de Análogos da Ribavirina com Inosina Monofosfato Desidrogenase (IMPDH)

Kamilla Trajano da Silva

Macaé

2015

Kamilla Trajano da Silva

Título: Modelagem Molecular da Interação de Análogos da Ribavirina com Inosina Monofosfato Desidrogenase (IMPDH).

Monografia Apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro – *Campus* Professor Aloísio Teixeira – como um dos requisitos para obtenção do título de farmacêutico.

Orientadores: Nelilma Correia Romeiro e Paula Alvarez Abreu.

Macaé

Julho de 2015

Silva, Kamilla Trajano da
Modelagem Molecular da Interação de Análogos da Ribavirina com
Inosina Monofosfato Desidrogenase (IMPDH)/ Macaé, RJ, 2015

Orientadoras: Prof^a Nelilma Correia Romeiro e Prof^a Paula Alvarez Abreu

65 páginas

Trabalho de Conclusão de Curso da graduação de Farmácia –
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Macaé, 2015.

1. *Cryptosporidium spp.* 2. *IMPDH*. 3. *Modelagem molecular*.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que permitiu que tudo isso acontecesse ao longo da minha vida, e não somente nestes cinco anos como universitária, mas em todos os momentos. Ele é o maior mestre que alguém pode conhecer.

À Universidade Federal do Rio de Janeiro *campus* Professor Aloísio Teixeira e ao corpo docente pelos conhecimentos que me foram transmitidos, ação que oportunizou a janela onde hoje vislumbro um horizonte profissional.

À minha mãe Maria do Socorro, heroína que sempre me apoiou com amor, carinho e dedicação nas horas difíceis de desânimo e cansaço. Ao meu pai Ronaldo que me fortaleceu nas dificuldades e sempre acreditou no meu potencial.

Aos meus colegas de classe pelo carinho e apoio nas dificuldades. Todos serão inesquecíveis.

Aos amigos que fiz durante esses anos, principalmente Anne Peixoto, Juliana Simões e Thaiany Mello. Obrigada pelo carinho, pelos momentos de alegria, pela paciência e a convivência.

Aos amigos que mesmo distante se mostraram presentes, principalmente a Monique, Larissa, Andressa e Nathália, sempre com palavras de incentivo, carinho e amizade.

À minha querida orientadora de Iniciação Científica Prof^a. Dr^a. Nelilma Romeiro pelos quatro anos de orientação, pela dedicação, amizade, companheirismo, momentos de alegria e conhecimentos oferecidos. Sem o seu incentivo, alegria e positivismo não teria dado certo.

À Prof^a. Dr^a. Paula Abreu como co-orientadora, pelas dicas, atenção, dedicação e paciência durante a ausência da minha orientadora.

Ao Prof^o. Rodrigo Souza pela colaboração que foi importante para o início e a construção deste trabalho.

À banca, por ter aceitado participar e avaliar esse trabalho.

Ao PIBIC, FUNEMAC, LASSBIO e LICC pelas contribuições financeiras e de conhecimento.

É difícil agradecer todas as pessoas que de algum modo, nos momentos alegres e apreensivos fizeram ou fazem parte da minha vida, mas agradeço a todos de coração que fizeram tornar realidade esse sonho profissional e pessoal.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Molécula de Nitazoxanida	16
Figura 2. Ciclo de vida do <i>Cryptosporidium</i>	18
Figura 3. Biossíntese de AMP e GMP	19
Figura 4. Ribavirina e análogos	20
Figura 5. Vias <i>de novo</i> e de salvamento para a biossíntese de purinas	21
Figura 6. Estruturas de fármacos inibidores de IMPDH humana usados na clínica e inibidores competitivos da IMPDH	23
Figura 7. Alinhamento das enzimas IMPDH h e IMPDH Cp	30
Figura 8. Trocas de aminoácidos dos sítios ativos da IMPDH h (A) e IMPDH Cp (B) considerados de maior relevância para estudos de planejamento racional de inibidores seletivos	33
Figura 9. Ribavirina monofosfatada com a proteína IMPDH h . Os resíduos que interagem com a molécula estão em branco (carbono), azul (nitrogênio) e vermelho (oxigênio)	34
Figura 10. Ribavirina monofosfatada no sítio ativo da IMPDH Cp . Os resíduos que interagem com a molécula estão em branco (carbono), nitrogênio (azul) e vermelho (oxigênio)	34
Figura 11. Melhor modo de ligação obtido para a Ribavirina Monofosfato com a IMPDH h (C = amarelo) sobreposta no cristal (C = verde), como observado por difração de raios-X , e o melhor complexo da Ribavirina obtido por <i>docking</i> com o programa GOLD 4.1.2. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização	36
Figura 12. Interações da ribavirina monofosfato com os resíduos do sítio ativo da IMPDH h .	36

- Figura 13.** Melhor modo de ligação obtido para o IMP com a IMPDH C_p (C= rosa) sobreposta no cristal (C= azul), como observado por difração de raios-X, e o melhor complexo da Ribavirina obtido por *docking* com o programa GOLD 4.1.2. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização **37**
- Figura 14.** Interações do IMP com os resíduos do sítio ativo da IMPDH C_p **38**
- Figura 15.** Média dos valores de *Fitness Score* obtidos por *docking* das moléculas da série não fosfatadas com a IMPDH h e IMPDH C_p obtidos nos estudos de *Docking*, com o programa GOLD 4.1.2. RVMP = Ribavirina Monofosfato e RV= Ribavirina **39**
- Figura 16.** Melhor modo de ligação da Molécula 5 da série não fosfatada (C = azul) com IMPDH h (A) e com a IMPDH C_p (C = amarelo) (B) obtido por *docking* com o programa GOLD 4.1.2. Ligações de hidrogênio pontilhado (amarelo) e resíduo de aminoácidos envolvidos em legendas brancas. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização **40**
- Figura 17.** Melhor modo de ligação da Molécula 3 da série não fosfatada (C = rosa) com IMPDH h (A) e IMPDH C_p (C = laranja) (B) obtida por *docking* com o programa GOLD 4.1.2. Ligações de hidrogênio pontilhadas (amarelo) e resíduos de aminoácidos envolvidos em legendas brancas. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização **41**
- Figura 18.** Média dos valores de *Score* obtidos por *docking* das moléculas deste estudo com IMPDH h e IMPDH C_p , no programa GOLD 4.1.2 **42**
- Figura 19.** Melhor modo de ligação da Molécula 3 da série monofosfatadas com IMPDH h (C = roxo) (A) e IMPDH C_p (C = marrom) (B) obtida por *docking* com o programa GOLD 4.1.2. As ligações de hidrogênio em linhas tracejadas (amarelas), interagindo com resíduos (átomo de carbono em cinza). Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização **43**
- Figura 20.** Melhor modo de ligação da molécula 4 da série das moléculas monofosfatadas com IMPDH h (C = rosa) (A) e IMPDH C_p (C = verde escuro) **44**

(B) obtida por *docking* com o programa GOLD 4.1.2. Ligações hidrogênio pontilhadas (amarelo) e resíduos de aminoácidos envolvidos em legendas brancas. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização

Figura 21. Moléculas propostas com modificações moleculares a partir da molécula 3 (série das moléculas monofosfatadas) **47**

Figura 22. Médias dos valores de *Fitness Score* obtidas por 5 corridas de *docking* das moléculas monofosfatadas e moléculas monofosfatadas modificadas deste estudo com IMPDH C_p e IMPDH h **48**

Figura 23. Melhor modo de ligação obtido para a molécula 3 modificada (Mol3a - C = roxo) com IMPDH h (A) e com IMPDH C_p (Mol3a - C = verde escuro) (B). As ligações de hidrogênio tracejadas (amarelas), interagindo com resíduos (átomos de carbono em cinza). Os átomos de hidrogênio foram omitidos para uma melhor visualização **49**

Figura 24. Melhor modo de ligação obtido para a molécula 3 modificada (Mol3b - C = marrom) com IMPDH h (A) e com IMPDH C_p (Mol3b - C = azul claro) (B). As ligações de hidrogênio tracejadas (amarelas), interagindo com resíduos (átomos de carbono em cinza). Os átomos de hidrogênio foram omitidos para uma melhor visualização **50**

Figura 25. Melhor modo de ligação obtido para a molécula 3 modificada (Mol3c - C = laranja) com IMPDH h (A) e com IMPDH C_p (Mol3b - C = laranja) (B). As ligações de hidrogênio tracejadas (amarelas), interagindo com resíduos (átomos de carbono em cinza). Os átomos de hidrogênio foram omitidos para uma melhor visualização **51**

Figura 26. Melhor modo de ligação obtido para a molécula 3 modificada (Mol3d - C = laranja) com IMPDH h (A) e com IMPDH C_p (Mol3d - C = rosa) (B). As ligações de hidrogênio tracejadas (amarelas), interagindo com resíduos (átomos de carbono em cinza). Os átomos de hidrogênio foram omitidos para uma melhor visualização. **52**

Figura 27. Melhor modo de ligação obtido para a molécula 3 modificada (Mol3e - C = verde escuro) com IMPDH h (A) e com IMPDH C_p (Mol3e - C = laranja) (B). As ligações de hidrogênio tracejadas (amarelas), interagindo com resíduos (átomos de carbono em cinza). Os átomos de hidrogênio **53**

foram omitidos para uma melhor visualização

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. . Volume dos análogos da Ribavirina não fosfatados e fosfatados (Å^3)	35
Tabela 2. Tabela 2. Valores de RMSD do <i>redocking</i> para as respectivas proteínas de estudo	35
Quadro 1. Estruturas de raios-X da IMPDHh e IMPDHCp que foram utilizadas neste estudo, disponíveis no PDB	28

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

Å	Angstrom
IMPDH _h	Inosina Monofosfato Desidrogenase Humana
IMPDHC _p	Inosina Monofosfato Desidrogenase de <i>Cryptosporidium</i>
RMSD	Raiz do Desvio quadrático médio
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
VDW	Van der Waals
KDa	Quilodalton
Mol3a	Molécula 3 modificada a
Mol3b	Molécula 3 modificada b
Mol3c	Molécula 3 modificada c
Mol3d	Molécula 3 modificada d
Mol3e	Molécula 3 modificada e
IMP	Inosina-5'-monofosfato
RVP	Ribavirina Monofosfatada
MPA	Ácido Micofenólico
MMF	Micofenolato de Mofetila
MZR	Mizoribina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
AMP	Adenosina Monofosfato
GMP	Guanosina monofosfato
GTP	Guanosina Trifosfato
PRPP	5-fosforibosil-1-pirofosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
NAD	Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídio
NADH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídio Hidrogenase
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
PM3	<i>Parameterized Model number 3</i>
AM1	<i>Austin Model 1</i>
ALA	Alanina
CYS	Cisteína
ASP	Ácido Aspártico
GLU	Ácido Glutâmico
PHE	Fenilalanina
GLY	Glicina
HIS	Histidina
ILE	Isoleucina
LYS	Lisina
LEU	Leucina
MET	Metionina
ASN	Asparagina
PRO	Prolina
GLN	Glutamina
ARG	Arginina
SER	Serina
THR	Treonina
VAL	Valina
TRP	Triptofano

SUMÁRIO

1. Introdução	15
1.1 <i>Criptosporidiose</i>	16
1.2 A Enzima 5'-Inosina Monofosfato Desidrogenase (IMPDH)	18
1.3 Vias de Obtenção de guanina	21
1.4 Modelagem Molecular	24
1.4.1 <i>Docking</i> molecular	25
2. Justificativa	26
3. Objetivos	27
3.1 Objetivos gerais	27
3.2 Objetivos específicos	28
4. Metodologia	28
4.1 Metodologia geral	28
4.2 Estudo Comparativo das Estruturas da IMPDH _h e IMPDH _{Cp}	29
4.2.1 Alinhamento das Estruturas 3D de IMPDH _h e IMPDH _{Cp}	29
4.2.2 Análise dos Volumes dos Sítios Ativos de IMPDH _h e IMPDH _{Cp} e da Ribavirina Monofosfato e Análogos	30
4.3 Validação do <i>Docking</i> Molecular: <i>Redocking</i>	30
4.3.1 <i>Docking</i> Molecular com os Análogos da Ribavirina	31
4.3.2 Propostas de Modificações Moleculares Baseadas no <i>Docking</i> Molecular	32
4.3.3 <i>Docking</i> Molecular das Moléculas Propostas	32
5. Resultados e Discussão	32

5.1 Estudo Comparativo das Estruturas da IMPDH h e IMPDH Cp	32
5.1.1 Alinhamento das Estruturas 3D de IMPDH h e IMPDH Cp	32
5.1.2 Análise dos Volumes dos Sítios Ativos de IMPDH h e IMPDH Cp e da Ribavirina Monofosfato e Análogos	34
5.2 <i>Docking</i> Molecular	35
5.2.1 Validação do <i>Docking</i> Molecular: <i>Redocking</i>	35
5.2.2 <i>Docking</i> Molecular com os Análogos da Ribavirina	38
5.2.2.1 Análise das interações com a série de moléculas não-fosfatadas	39
5.2.2.2 Análise das interações com a série de moléculas monofosfatadas	42
5.2.2.3 Comparação das interações com a série de moléculas não fosfatadas	45
5.2.2.4 Comparação das interações com a série de moléculas monofosfatadas	46
5.2.3 Propostas de Modificações Moleculares Baseadas no <i>Docking</i> Molecular	47
5.2.4 <i>Docking</i> Molecular das Moléculas Propostas	47
5.2.4.1 Análise do <i>docking</i> com as moléculas propostas	49
5.2.4.2 Comparação das moléculas propostas com a série das moléculas não fosfatadas e fosfatadas	54
6. Conclusões	56
7. Referências Bibliográficas	56

RESUMO

Cryptosporidium spp. é uma das causas principais do “ciclo vicioso” de diarreia e desnutrição em países em desenvolvimento, sendo um provável agente de bioterrorismo. O parasita obtém nucleotídeos de guanina pela via “*de novo*” através da ação da enzima Inosina Monofosfato Desidrogenase (IMPDH), que é importante para o crescimento e diferenciação celular e modulação da imunidade. Até o presente momento, não foram identificados fármacos contra esta enzima, embora vários inibidores tenham sido descritos. Devido à sua importância, em especial para pacientes imunodeprimidos, a IMPDH é um alvo atraente para o desenvolvimento de fármacos contra infecções por *Cryptosporidium spp.* O objetivo deste trabalho é investigar por *docking* molecular as interações de análogos da Ribavirina, inibidor de IMPDH, com a enzima de *Cryptosporidium* (IMPDH_{Cp}) e de humanos (IMPDH_h), visando o planejamento de novas moléculas seletivas para a enzima de *Cryptosporidium*, com potencial aplicação terapêutica nas infecções por este protozoário. Realizou-se o *docking* molecular para avaliar as interações dos análogos da Ribavirina com a enzima de *Cryptosporidium* (IMPDH_{Cp}) e comparou-se com a de humanos (IMPDH_h). Nos estudos de *docking* foram testados oito análogos da Ribavirina que foram fornecidos pelo grupo do professor Souza, as mesmas substâncias monofosfatadas e cinco moléculas planejadas neste estudo. Os resultados de afinidade de ligação teórica (*scores*) foram obtidos no programa GOLD 4.1.2. Dentre as moléculas monofosfatadas, 3 e 4 apresentaram maior potencial para seletividade para a IMPDH_{Cp} devido aos maiores valores de *scores* em comparação com os resultados obtidos para a IMPDH_h. A inspeção visual das interações dos ligantes com a enzima IMPDH foi realizada no Pymol 0.99 e Discovery Studio 4.0 utilizando-se os melhores modos de ligação dos complexos proteína-ligante originados dos estudos de *docking* molecular. Na série de moléculas monofosfatadas, as moléculas 3 e 4, que possuem um grupo amida e outro hidrazina, se destacaram como provavelmente mais seletivas para a IMPDH de *Cryptosporidium*. Para ambas as séries observaram-se interações intermoleculares importantes para afinidade e especificidade entre ligante e proteína, principalmente as ligações hidrogênio, com destaque para o resíduo MET 302, que interagiu com a molécula 3, que é a mais promissora. A partir desta molécula foram planejadas mais cinco moléculas visando maior seletividade para IMPDH_{Cp}, entretanto, a molécula 3 continuou sendo aquela que apresentou maior seletividade de acordo com os nossos estudos. Este estudo pode orientar a proposta de novas moléculas, mais seletivas para a enzima de *Cryptosporidium*.

Palavras-chave: *Cryptosporidium spp.*, Modelagem Molecular, Inosina Monofosfato Desidrogenase (IMPDH).

ABSTRACT

Cryptosporidium spp. is a major cause of the "vicious cycle" of diarrhea and malnutrition in developing countries, and a likely bioterrorism agent. The parasite obtains guanine nucleotides via "de novo" through the action of the enzyme Inosine Monophosphate Dehydrogenase (IMPDH), which is important for cell growth and differentiation and modulation of immunity. To date, there have not been identified drugs against this enzyme, although several inhibitors have been described. Due to its importance, especially for immunocompromised patients, IMPDH is an attractive target for drug development against infection by *Cryptosporidium spp.* The objective of this study is to investigate molecular interactions of Ribavirin analogs and an IMPDH inhibitor, by docking with the enzyme from *Cryptosporidium* (IMPDHCp) and human (IMPDHh), in order to plan new selective molecules towards the enzyme from *Cryptosporidium*, with potential therapeutic application in infections caused by this protozoan. Docking was performed to evaluate the interactions of Ribavirin analogs with the enzyme from *Cryptosporidium* (IMPDHCp) and compared with the human one (IMPDHh). Eight Ribavirin analogs that were synthesized were tested in the docking studies, along with the same substances in their monophosphate form and five molecules planned in this study. The theoretical binding affinity results (scores) were obtained with GOLD 4.1.2 program. Among the monophosphate molecules, 3 and 4 exhibited greater potential for selectivity against IMPDHCp due to higher score values compared with the results obtained for IMPDHh. Visual inspection of the interactions of ligands with IMPDH was performed in PyMOL 0.99 and Discovery Studio 4.0 using the best binding mode of the protein-ligand complexes generated from molecular docking studies. In the series of monophosphate molecules, molecules 3 and 4, which have amide and hydrazine groups, respectively, stood out as probably more selective for IMPDH from *Cryptosporidium*. For both series important interactions have been observed for affinity and specificity between ligand and protein, especially hydrogen bonds with emphasis on the MET 302 residue, that interacted with molecule 3, which is the most promising one in the series. Using this molecule as a reference, five molecules were planned, searching greater selectivity for IMPDHCp. However, molecule 3 remained as the most selective, according to our studies. This study can direct the synthesis of new molecules, more selective for the enzyme from *Cryptosporidium*.

Keywords: *Cryptosporidium spp.*, Molecular Modeling, Inosine Monophosphate Dehydrogenase (IMPDH).

1 INTRODUÇÃO

Parasitas do gênero *Cryptosporidium* foram descobertos em 1907 (KOYAMA, 2005). Entretanto, somente em 1976 os primeiros casos humanos de criptosporidiose foram notificados, com o advento da epidemia de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) (DILLINGHAM, 2002). Por volta da década de 80 e 90, este parasita se tornou amplamente reconhecido como um patógeno humano (O'CONNOR, 2011). *Cryptosporidium parvum* é uma das causas mais comuns de doenças infecciosas transmitidas pela água (FAYER, 2004), podendo infectar o sistema gastrointestinal ou extra intestinais de mamíferos, incluindo seres humanos (MORGAN-RYAN, 2002), sendo causa freqüente de diarréias (GORLA, 2014).

A doença é auto-limitante em adultos saudáveis, mas pode ser crônica e fatal em indivíduos imunocomprometidos (KOTLOFF *et al.*, 2013). Oocistos podem ser adquiridos com relativa facilidade, e o abastecimento de água é facilmente acessível. Assim, há também a preocupação de que estes organismos possam ser usados maliciosamente (HAGEN, 2013). As infecções podem ocorrer quando somente 1-10 oocistos são ingeridos. Oocistos com 4 esporozoítos são liberados no intestino, onde as infecções são localizadas predominantemente no jejuno e íleo, mas podem estender-se a outras partes do trato gastrointestinal em pacientes imunocomprometidos. A vesícula biliar e o envolvimento de outros órgãos também ocorrem em aproximadamente 20% dos pacientes imunocomprometidos (GORLA, 2014). O parasita reside dentro de um vacúolo parasitário que se projeta para fora do citoplasma do hospedeiro para o lúmen intestinal. As vias de absorção de nutrientes e absorção de drogas, seja direto do lúmen intestinal ou através da célula hospedeira, são em grande parte desconhecidas (REHG, 1993).

A transmissão zoonótica desempenha um papel importante na epidemiologia de *Cryptosporidium spp.* (XIAO, 2008). Foram encontrados casos de criptosporidiose em fezes de cães saudáveis (FIGUEIREDO *et al.*, 2004), em gatos (THOMPSON *et al.*, 2008), em bovinos (CACCIO *et al.* 2005), em ovinos (FÉRES, 2009), suínos (JOHNSON *et al.*, 2008) e em animais aquáticos (Hanks *et al.*, 2005). O *Cryptosporidium spp.* tem sido detectado em alimentos, como mariscos (JOHNSON,1995), mexilhões, ostras (FAYER, 1999), leite (GELLETLIE, 1997), alface (MONGE, 2003) e até alimentos industrializados (MILLARD, 1994). Os sintomas característicos dessa enfermidade são a diarréia crônica em pessoas com

sistemas imunitários enfraquecidos (MAC KENZIE, 1994), desidratação acentuada, dor abdominal, perda de peso (FAYER, 2004), má absorção de medicamentos antirretrovirais e expectativa de vida reduzida (PANTENBURG, 2009). Oocistos infectantes são ambientalmente resistentes e são suficientemente pequenos para penetrar as barreiras físicas de tratamento de água. Oocistos de *C. parvum* são altamente resistentes à maior parte dos métodos de tratamento de água, assim os surtos ocorrem com regularidade, mesmo em países desenvolvidos do mundo (HLAVSA, *et al.*, 2011).

Apesar de centenas de antiparasitários e antimicrobianos terem sido avaliados para atividade anti-*cryptosporidium*, as opções atuais de tratamento são limitadas a uma droga aprovada, a nitazoxanida (Figura 1), o que acelera a resolução dos sintomas em pacientes imunocompetentes (ROSSIGNOL, 2006). Além disso, são administrados fluídos e eletrólitos de reposição para evitar a desidratação. Os sintomas da criptosporidiose aguda podem ser graves, mas geralmente são limitados a 1-2 semanas de duração, quando, geralmente, os pacientes desenvolvem imunidade protetora, e a doença se resolve espontaneamente (FAYER, 2004). Infelizmente, o alvo terapêutico da nitazoxanida (ANNITA®) ainda não foi identificado, o que torna mais difícil o desenvolvimento de novos fármacos (GORLA, 2014).

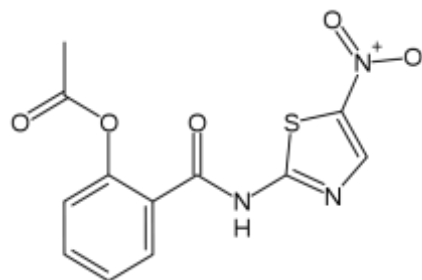


Figura 1. Molécula de Nitazoxanida (ANNITA®).

1.1 Criptosporidiose

Cryptosporidium spp. existem em muitas fases de desenvolvimento intracelulares e extracelulares (Figura 2). O ciclo de vida pode ser dividido em seis grandes fases de desenvolvimento: excistância (a liberação de infectantes esporozoítos), merogonia (multiplicação assexuada dentro das células hospedeiras),

gametogonia (a formação de micro e macrogametas), fertilização (a união de micro e macrogametas), a formação da parede do oocisto (para produzir o estágio resistente ambientalmente e responsável pela transmissão da infecção de um hospedeiro para outro), e esporogonia (a formação de esporozoítos infecciosos) (BOUZID, 2013).

Espécies de *Cryptosporidium* têm um ciclo de vida monoxeno concluído no trato gastrointestinal de um único hospedeiro. Durante todo o ciclo, as diferentes formas estão confinadas às superfícies apicais de células hospedeiras. As formas infectantes chegam às superfícies apicais por um processo pouco compreendido e tornam-se internalizadas dentro de um compartimento intracelular, mas extracitoplasmático, separadas do citoplasma por uma camada densa de elétrons que parece ser predominantemente de origem do hospedeiro (BARTA, 2006). O parasita é localizado dentro de um compartimento fechado da membrana plasmática da célula hospedeira, como descrito no vacúolo parasitóforo (THOMPSON, 2005), onde é protegido do ambiente hostil do intestino e é alimentado com energia e nutrientes pela célula hospedeira através de uma organela alimentadora (TZIPORI, 2002). Também tem sido relatado que o *C. parvum* pode ter fases extracelulares da vida semelhantes às gregarinas (ROSALES, 2005), embora não hajam estudos subsequentes que confirmem este dado.

A infecção é iniciada pela ingestão de oocistos, por água ou comida contaminada ou por contato direto pessoa-a-pessoa ou animal para pessoa (DILLINGHAM, 2002). Oocistos realizam a excitação no intestino delgado (O'CONNOR, 2011) e liberam quatro esporozoítos infecciosos (Figura 2) (BOUZID, 2013) que se ligam a e invadem a membrana da borda em escova de células epiteliais intestinais. A replicação ocorre dentro de um vacúolo parasitóforo, em um nicho intracelular mas extracitoplasmático, via ciclos assexuados e sexuais. Durante o ciclo assexuado, merozoítos são liberados, invadem as células adjacentes e perpetuam este ciclo ou diferenciam-se em estágios sexuais que se fundem para formar zigotos. Amadurecidos, oocistos de paredes espessas são liberados no ambiente externo, ou oocistos de paredes finas se rompem no lúmen intestinal, liberando esporozoítos que iniciam um novo ciclo de replicação. Acredita-se que estes oocistos autoinfectantes de paredes finas podem contribuir para a perpetuação da infecção em pacientes com HIV / SIDA (O'CONNOR, 2011)

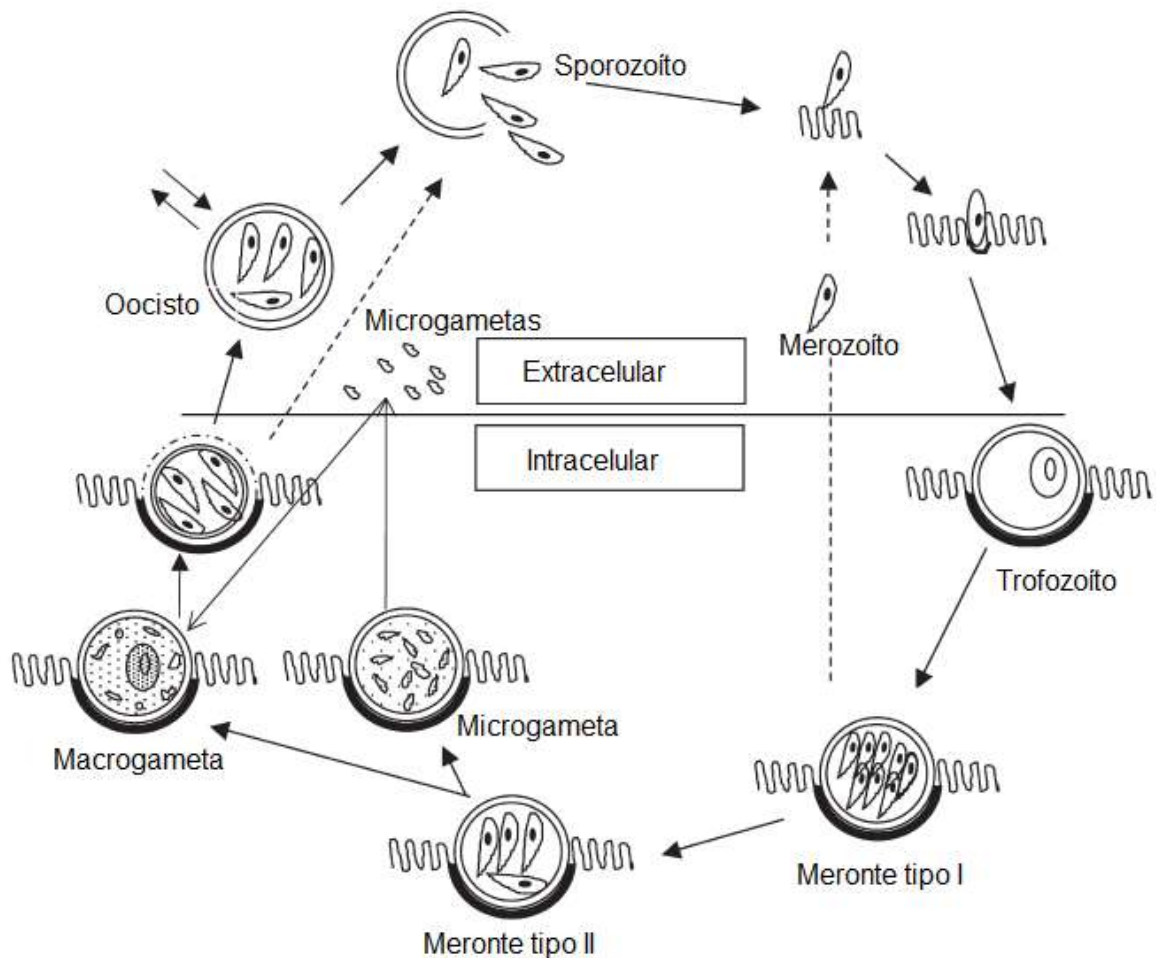


Figura 2. Ciclo de vida do *Cryptosporidium*.

1.2 A Enzima 5'-Inosina Monofosfato Desidrogenase (IMPDH)

A enzima 5' Inosina Monofosfato Desidrogenase (IMPDH, do inglês *Inosine Monophosphate Dehydrogenase*), tem sido identificada como uma enzima chave na biossíntese de nucleotídeos de purina. A IMPDH humana é um tetrâmero constituído por 56 KDa. Ela catalisa a redução do dinucleotídeo nicotinamida-adenina (NAD⁺) dependente de inosina-5'-monofosfato (IMP) em xantossina 5'-monofosfato (XMP) (Figura 3). Este é um passo limitante da velocidade na síntese *de novo* de nucleótidos de guanina (SHU, 2008). Esta enzima é um alvo promissor porque *Cryptosporidium* invoca IMPDH_{Cp} para a biossíntese de nucleotídeos de guanina (GORLA, 2014).

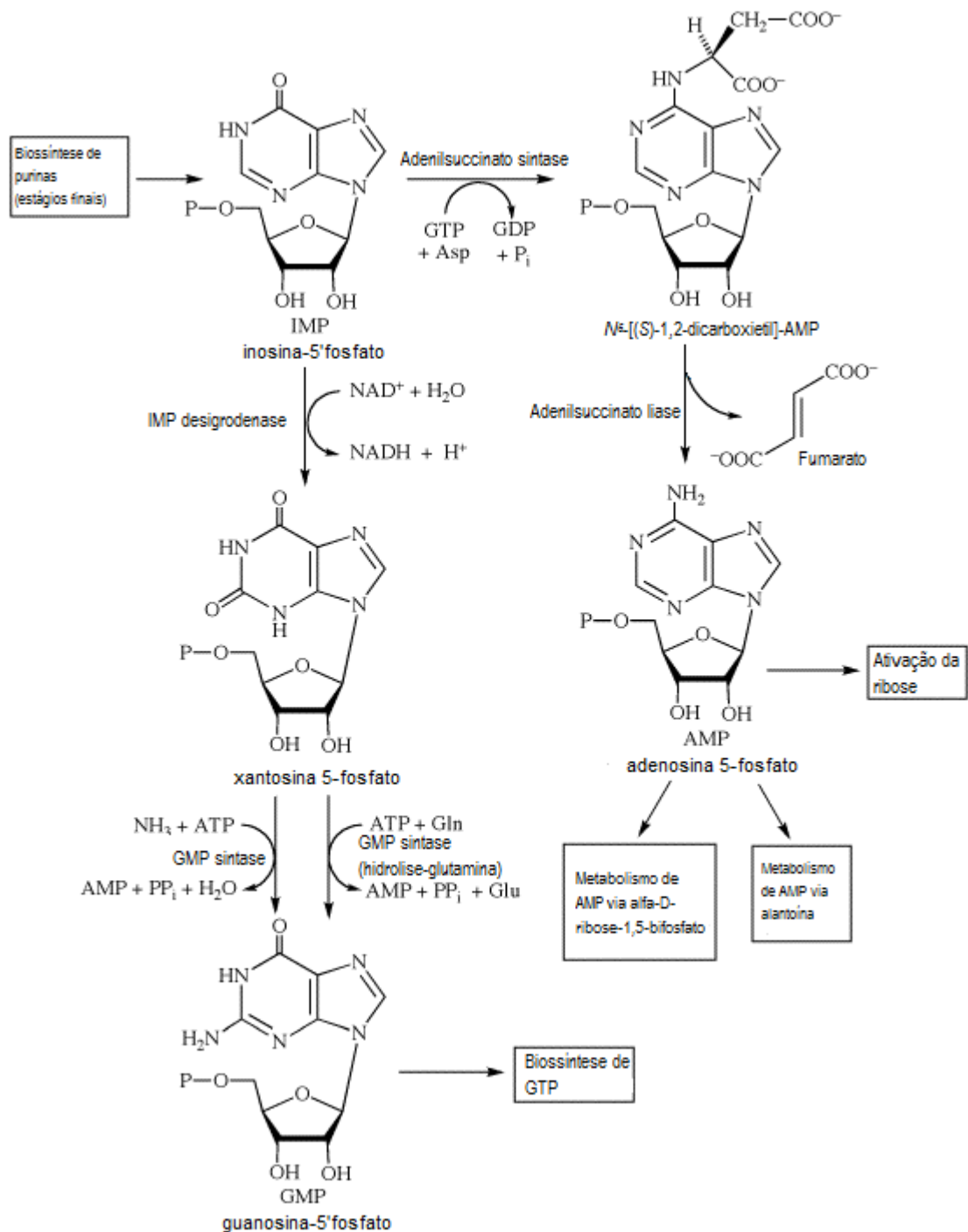


Figura 3. Biossíntese de AMP e GMP (IUBMB, 2001)

A IMPDH é onipresente em eucariotos e bactérias. As formas procarióticas partilham 30-40% de identidade de sequência com a enzima humana (ARMISTEAD, 2000). Duas isoformas de IMPDH humana, designadas tipo I e tipo II, foram identificadas e sequenciadas. Cada uma delas tem 514 aminoácidos e partilham 84% de identidade da sequência (ARMISTEAD, 2000). As enzimas IMPDH_h e IMPDH_{Cp} mostraram 46% de identidade e 62% de similaridade com a IMPDH_h tipo II.

A disponibilidade de estruturas de raios-X de IMPDH facilita o estudo de isoformas e a descoberta de inibidores espécie-seletivos e o consequente desenho de novos fármacos. Dados de raios-X proporcionam a topologia global da enzima, a localização do sítio ativo e as informações detalhadas de como substrato e inibidores interagem, incluindo os principais resíduos de aminoácidos no interior da cavidade de ligação. Atualmente, há 15 estruturas de cristal de IMPDH de oito espécies disponíveis no *Protein Data Bank* (RCSB) (BERMAN *et al.*, 2000).

A Ribavirina (Figura 4) tem como um dos seus alvos a IMPDH, que está envolvida na modulação da imunidade e, por isso, os pacientes com sistemas imunes enfraquecidos sofrem de doença crônica persistente que muitas vezes põe as suas vidas em risco. Os efeitos antivirais da ribavirina parecem específicos para certos tipos de células. Esta variação provavelmente surge por várias razões, incluindo variações de células específicas no metabolismo da ribavirina, assim como fatores de vírus específicos (UMEJIEGO, 2004).

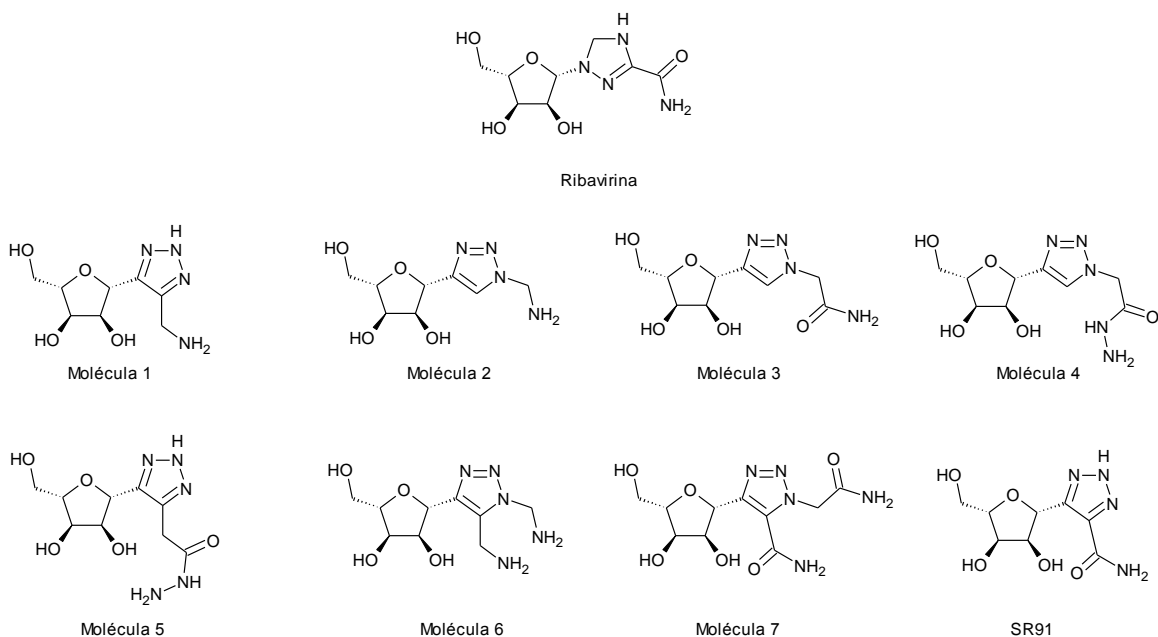


Figura 4. Ribavirina e análogos.

Apesar do impacto relevante na saúde pública causado pela criptosporidiose (NEWMAN, 1994), os esforços para desenvolver tratamentos novos e mais eficazes para esta doença são reduzidos (TZIPORI, 2008). Há um número de razões para isso, mas a falta de métodos de cultura de tecidos apropriados e modelos animais para avaliar candidatos a fármacos é atualmente o obstáculo mais proeminente. A conclusão da seqüência do genoma de *C. parvum* destacou a falta de alvos

convencionais de fármacos, atualmente indicados para o controle e tratamento de outros parasitas protistas. Para superar este desafio, tem sido desenvolvida uma triagem para avaliar a atividade antiparasitária de inibidores de IMPDH_{Cp} (ABRAHAMSEN, 2004).

Devido à sua importância especial para pacientes imunodeprimidos, a IMPDH é um alvo atraente contra *Cryptosporidium spp.* Neste contexto, o grupo do professor Rodrigo O. M. A. Souza e colaboradores sintetizaram uma série de análogos da Ribavirina (moléculas que serão usadas nesse estudo) (Figura 4), visando à obtenção de inibidores de IMPDH de *Cryptosporidium* com potencial terapêutico.

1.3 Vias de obtenção da guanina

As vias de biossíntese de nucleotídeos fornecem os precursores de DNA e RNA e são importantes para a descoberta de alvos para fármacos. Estudos genômicos recentes sugerem que *Cryptosporidium parvum* usa um conjunto de enzimas das vias biossintéticas de nucleotídeos. Enquanto a maioria dos parasitas protozoários utiliza purinas a partir do hospedeiro e sintetizam pirimidinas *de novo*, *C. parvum* depende do hospedeiro para obter purina e pirimidina. *C. parvum* obtém adenosina a partir da via celular da adenosina quinase para a produção de AMP. O AMP forma o nucleotídeo de adenina ou é convertido em GMP pela ação sequencial de AMP desaminase, inosina 5'-monofosfato desidrogenase (IMPDH) e GMP Sintase (SHARLING *et al.*, 2010).

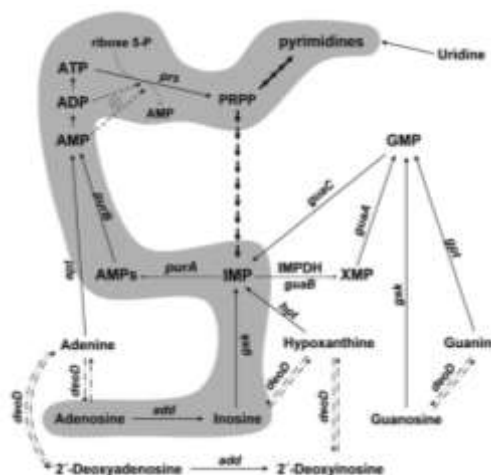


Figura 5. Vias *de novo* e de salvamento para a biossíntese de purinas.

A inibição de IMPDH pela ribavirina monofosfato causa a diminuição do GTP. O IMP é o último precursor comum de ambos nucleotídeos guanilato e adenilato e também serve como um substrato para a adenilossuccinato (AMPS) sintase, que compromete IMP para a biossíntese dos nucleotídeos adenilato (Figura 5). Fontes de IMP dão início à síntese *de novo* a partir do 5-fosforibosil-1-pirofosfato (PRPP), regenerando AMP e GMP, bem como realizando a recuperação da hipoxantina e inosina por fosforibolização e fosforilação, respectivamente. A inibição de IMPDH esgota o reservatório de guanilato celular e é antiproliferativa (PIMKIN, 2009).

Também tem sido sugerido que, no caso dos poliovírus e talvez outros vírus de RNA, a Ribavirina pode ter um efeito mutagênico letal após a sua incorporação (através do seu trifosfato) no genoma de RNA viral. Este processo de incorporação é catalisado pela RNA polimerase. A incorporação deste nucleotídeo, que não é natural, ao RNA viral, força o RNA do vírus à acumulação letal de erros. Isto é amplificado adicionalmente pela redução de reservatório de GTP causada pela inibição de IMPDH pela ribavirina monofosfato. A razão para isto é uma diminuição no reservatório de GTP celular, a qual é susceptível ao aumento da frequência de incorporação de ribavirina trifosfato porque a mesma atua como um análogo do GTP (SHU, 2008).

O *C. parvum* não possui as enzimas necessárias para sintetizar bases purínicas e é, portanto, altamente suscetível à inibição de qualquer passo nesta via. Os inibidores de IMPDH ribavirina e ácido micofenólico (MPA) bloqueiam o desenvolvimento de *C. parvum* em cultura de tecidos e a ribavirina é eficaz em modelo de camundongos recém-nascidos, o que valida a enzima IMPDH, como um alvo para o tratamento de criptosporidiose. Além disso, IMPDH é um alvo bem conhecido para inibidores antivirais e terapia imunossupressora.

Alguns compostos, tal como os seus monofosfatos, são inibidores competitivos de IMPDH com relação ao substrato IMP (Figura 6). Exemplos incluem ribavirina, 3-deazaguanosina, EICAR (5-etinil-1- β -D-ribofuranosil-imidazol-4-carboxamida), mizoribina (5-hidróxi-1- β -D-ribofuranosil-1H-imidazol-4-carboxamida), 6-cloropurina ribosídeo e 2-vinilinosinas (SHU, 2008). Alguns desses inibidores de IMPDH humana já estão em uso clínico, por exemplo, Micofelato de Mofetila (MMF) (MAJD, 2014), Mizoribina (MZR) (CAO, 2014) e Tiazofurina (HEDSTROM, 1999) (Figura 6). Assim, espera-se que o desenho de inibidores específicos de IMPDH de *C. parvum* seja grandemente facilitado pela capacidade de se utilizar o

conhecimento sobre programas de desenvolvimento de fármacos já existentes, para a enzima humana.

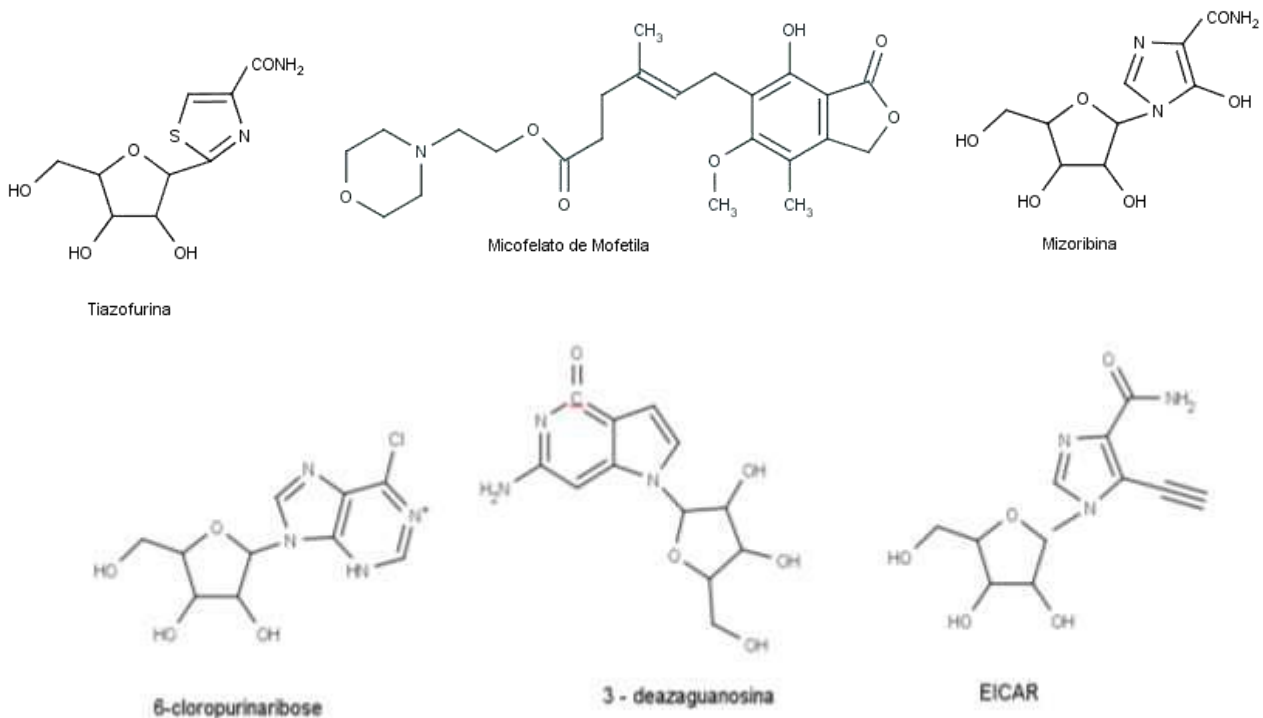


Figura 6. Estruturas de fármacos inibidores de IMPDH humana usados na clínica e inibidores competitivos da IMPDH.

O MMF, produto do fungo *Penicillium*, originalmente isolado em 1886, impede a proliferação de linfócitos B por uma via inibitória da divisão celular. O principal objetivo para a adição de MMF aos regimes de imunossupressão é reduzir a frequência de rejeição aguda do enxerto renal, tendo sido aprovado pelo FDA para esta finalidade em junho de 1995 (DIAS, 2014). Esse fármaco tem ação na redução da síntese de nucleotídeos, reduzindo a síntese de purinas. O MMF é um potente inibidor da enzima Inosina Monofosfato Desidrogenase (IMPDH), reduzindo a proliferação celular. Os linfócitos T e B dependem predominantemente da via de síntese de purinas para sua proliferação. Desse modo, a ação do MMF resulta numa potente inibição da atividade linfocitária (NORONHA *et al.*, 1997).

A Mizoribina (MZR) inibe a síntese de purinas e foi desenvolvida no Japão há 20 anos. O modo de ação da MZR é muito similar ao MMF, envolvendo seletividade e inibição da IMPDH na via *de novo* na síntese de nucleotídeos de purinas, com supressão da proliferação de linfócitos T e B (YOKOTA, 2002 e KAWASAKI, 2009;).

Até o momento tem sido usado com sucesso, e sem sérios efeitos adversos, no tratamento de transplante renal recente, síndrome necrótica, imunoglobulina e lúpus nefrítico. De um ponto de vista clínico, MZR inibe competitivamente IMPDH, diferentemente do MMF (TANAKA, 2015).

A Tiazofurina é um nucleósideo antitumoral que é convertido, em células sensíveis, ao metabólito ativo tiazol-4-carboxamida adenina dinucleotídeo, um análogo de NAD, que inibe potentemente a IMPDH, levando a uma diminuição da concentração de GTP (VITALE, 1997) e inibição do crescimento de várias linhagens celulares tumorais humanas (DAMARAJU, 2005).

1.4 Modelagem Molecular

Na química medicinal moderna, estudos de modelagem molecular com as biomacromoléculas-alvo podem auxiliar na proposição de novos derivados funcionais e análogos sintéticos de produtos naturais e outras micromoléculas obtidas por síntese orgânica, sendo de extrema valia por suas características multidisciplinares. Nesse contexto, o *docking* molecular tem sido aplicado à descoberta de novos ligantes de alvos terapêuticos validados, partindo, por exemplo, da triagem virtual de um banco de dados de estruturas moleculares tridimensionais selecionadas (ligantes). Esta ferramenta tem revelado novos arcabouços moleculares de origem sintética e de produtos naturais, assim como tem auxiliado na otimização da atividade de compostos-protótipos, aumentando a afinidade e a especificidade entre receptor e ligante (RODRIGUES, 2012).

A modelagem molecular desempenha um papel importante em todos os passos da descoberta e otimização de ligantes. Várias técnicas assistidas por computador, pesquisa de bancos de dados e de encaixe em estruturas 3D de proteínas foram desenvolvidas ao longo do tempo. Se apenas as estruturas ligantes estão disponíveis, mas nenhuma estrutura 3D do alvo biológico, como até recentemente foi o caso de todas as proteínas incorporadas à membrana, a geração de modelos farmacofóricos 2D ou 3D e a pesquisa em bases de dados estruturais são o método de escolha (KUBINYI, 2006).

1.3.1 *Docking* molecular

A previsão dos modos de ligação e afinidades de compostos quando interagem com o sítio de ligação da proteína-alvo está no centro do desenho de fármacos baseado na estrutura, utilizando-se a técnica de *docking* molecular. O número de algoritmos disponíveis para *docking* proteína-ligante é relevante (VERDONK, 2003). A maioria das abordagens considera a proteína rígida e permite a flexibilidade do ligante. A principal característica de um bom programa de *docking* é a sua capacidade de reproduzir os modos de ligação experimentais do ligante.

Para testar isto, o ligante é retirado da estrutura de raios-X do seu complexo de proteína-ligante e acoplado de volta ao seu local de ligação sendo esta técnica denominada *redocking* que é, fundamentalmente, um método de validação que determina se o algoritmo de *docking* molecular é capaz de recuperar a posição cristalográfica utilizando simulação computacional (FRIESNER *et al.*, 2004). O modo de ligação resultante do *redocking* é, então, comparado com o modo de ligação experimental, e a raiz do desvio quadrático médio (*Root Mean Square Deviation*, RMSD) entre os dois é calculada. Quanto mais próximo de zero, mais semelhantes são os modos de ligação. O *redocking* é considerado bem sucedido se o RMSD é inferior a um determinado valor, que é, geralmente, 2,0 Å (DE OLIVEIRA, 2011).

Recentemente, apontou-se que, para estabelecer o índice de sucesso de um programa de *docking*, é necessário que seja construído cuidadosamente um conjunto amplo de complexos de proteínas e ligantes. Um importante uso de programas de *docking* da proteína-ligante é a triagem virtual, em que grandes bibliotecas de compostos são encaixadas em um sítio de ligação do alvo (VERDONK, 2003).

A Triagem Virtual compreende várias técnicas computacionais que já demonstraram sua eficiência na descoberta de estruturas interessantes. Várias etapas diferentes servem para reduzir rapidamente o número de potenciais candidatos a partir de centenas de milhares ou mesmo milhões de estruturas a um tamanho administrável, por exemplo, pela primeira aplicação de filtros simples (peso molecular, área de superfície polar, número de ligações rotacionáveis, regra de cinco de Lipinski, regras de ligação-afinidade, redes neurais de fármaco-afinidade), seguidos de geração de farmacóforos (FERREIRA, 2011).

O número de potenciais candidatos pode ser reduzido por um filtro que verifica a presença de todas as características farmacofóricas necessárias

(KUBINYI, 2006). Outra característica de um bom programa de *docking* é a capacidade da função de *score* para marcar e classificar ligantes de acordo com suas afinidades de ligação experimentais. Para testar isso, as afinidades de ligação previstas, ou classificação, são representadas graficamente contra as afinidades de ligação experimentais; o indicador chave para a qualidade das afinidades preditas é o desvio padrão s para os cálculos com base nos modos de ligação experimentais dos ligantes. Boas funções de *score*, adequadas para o *docking*, dão valores de cerca de 8 kJ / mol, o que corresponde a cerca 1,5 ordens da grandeza da afinidade (VERDONK, 2003).

Um problema da metodologia de *docking* é a baixa confiabilidade das funções de *scoring*, pois não depende apenas do *score*, mas também de outros fatores, para classificar os resultados de *docking* como bons ou ruins. Extensas comparações de diferentes programas de *docking* e funções de *scoring* para redescobrir ligantes conhecidos dentro de bancos de dados em 3D fornecem evidências de que não existe uma solução única para o problema. Determinadas combinações de *docking* e *scoring* são adequados para um alvo, e não para outro alvo. Consenso de *scoring*, que é a utilização simultânea de diferentes funções de *scoring* tem sido proposto para resolver este problema. No entanto, para os programas mais comuns, a qualidade dos resultados obtidos parece depender mais da experiência e habilidade do modelador do que das opções usadas. Funções de *scoring* também tendem a superestimar a afinidade de moléculas grandes e, portanto, uma inspeção posterior de todos os resultados de *docking* é de extrema importância (KUBINYI, 2006).

2. JUSTIFICATIVA

As doenças de veiculação hídrica, sobretudo aquelas causadas pelos protozoários intestinais, emergiram como um dos principais problemas de saúde pública nos últimos 25 anos, apesar da adoção de regulamentos e medidas cada vez mais restritivos em países como Estados Unidos e Reino Unido, e dos avanços em tecnologia de tratamento (DOWBOR, 2005). Após 1980, os protozoários parasitas *Cryptosporidium spp.* emergiram como os principais contaminantes associados à veiculação hídrica: no mínimo, 325 surtos epidêmicos associados aos protozoários parasitas e transmitidos pela água foram reportados, globalmente.

(KARANIS, 2007). As espécies de *Cryptosporidium* (n=165; 50,8%) causaram a maioria dos surtos. Os surtos de criptosporidiose atingidos foram de 436.232 até 2002 (FRANCO, 2007).

No Brasil, ressalte-se a inexistência de dados devidamente documentados e comprovados sobre a ocorrência de surtos de criptosporidiose de transmissão hídrica (www.cve.saude.sp.gov.br). Os surtos descritos até o momento, em sua maioria, referem-se a episódios que aconteceram entre crianças que freqüentam creches, com via de transmissão por contato interpessoal (GONÇALVES, 2006).

O papel dos antiparasitários para criptosporidiose permanece controverso (MASUR, 2008). A busca inicial de agentes eficazes *in vitro* não foi satisfatória, pois a doença é auto-limitante em muitos casos. Assim, estudos controlados são importantes no estabelecimento da eficácia. Infelizmente, nenhuma droga antiparasitária provou ser eficaz em pacientes imunocomprometidos que se beneficiariam de um regime eficaz de drogas. Uma meta-análise recente de ensaios de medicamentos antiparasitários em criptosporidiose observou melhora significativa de não doentes com AIDS, utilizando a nitazoxanida, mas não há nenhuma evidência clara da eficácia para outros antiparasitários em criptosporidiose ou para nitazoxanida em doentes com AIDS (ABUBAKAR I, 2007).

A partir destas informações da literatura, espera-se que, neste trabalho, as estruturas 3D das proteínas, determinadas experimentalmente, possam auxiliar no planejamento racional de fármacos usando ferramentas da modelagem molecular comparativa para desenvolvimento de ligantes alvos seletivos, tendo como base a ribavirina e propor novos fármacos para utilização no combate à criptosporidiose. Isso pode representar um avanço e inovação nas pesquisas de fármacos eficazes no tratamento contra o *Cryptosporidium*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

O objetivo deste trabalho é investigar por *Docking* Molecular possíveis interações de análogos da ribavirina, inibidor de IMPDH, com a enzima de *Cryptosporidium* (IMPDHCp) e de humanos (IMPDHh), visando o planejamento de novas moléculas seletivas para a enzima de *Cryptosporidium*, com potencial aplicação terapêutica nas infecções laterais observadas principalmente em pacientes imunodeprimidos. Estes estudos representam uma “triagem farmacológica

virtual” e têm sido utilizados com sucesso em vários programas modernos de planejamento de substâncias bioativas (RODRIGUES, 2012).

3.2 Objetivos Específicos

. Neste contexto, os objetivos específicos são:

- 1) Modelagem molecular de ligantes sintéticos, visando propor substâncias para testes biológicos, utilizando o planejamento baseado na estrutura da proteína-alvo;
- 2) Triagem virtual por modelagem molecular entre a IMPDH_h e IMPDH_{Cp} e os análogos de ribavirina, visando analisar e identificar os melhores análogos para a inibição seletiva da IMPDH_{Cp};
- 3) Propor novos análogos para síntese e avaliação biológica.

4. METODOLOGIA

4.1 Geral

Estruturas obtidas por difração de raios-X de cristais das proteínas-alvo deste trabalho estão disponíveis no banco de dados de proteínas do RCSB (*Protein Data Bank*, PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb/>) (BERMAN *et al.*, 2000). A Ribavirina (RVP) e a Inosina Monofosfato (IMP) foram extraídos do cristal e a construção dos análogos da Ribavirina e as otimizações foram feitas pelo método semi-empírico AM1 no Spartan Pro (wavefunction Inc) e baseadas na estereoquímica da Ribavirina, que foi utilizada como referência. As proteínas que foram utilizadas nos estudos de *docking* encontram-se descritas no Quadro 1.

Quadro 1. Estruturas de raios-X da IMPDH_h e IMPDH_{Cp} que foram utilizadas neste estudo, disponíveis no PDB.

Proteína	Código no PDB	Resolução (Å)	Citação
IMPDH _h	1NF7	2,65	RISAL <i>et al.</i> Para ser publicado
IMPDH _{Cp}	3KHJ	2,80	MCPHERSON <i>et al.</i> , 2010

Nos estudos de *docking* para a análise de possíveis modos de interação e a investigação das interações atômicas predominantes neste processo, foi aplicada a metodologia de *docking* do programa GOLD 4.1.2 (VERDONK *et al.*, 2003). O programa GOLD utiliza um algoritmo genético na busca de uma população de possíveis soluções utilizando operadores genéticos (mutações, cruzamentos e migrações) para obter uma população final, trabalhando com a otimização de uma função de *Fitness* pré-definida. (JONES *et al.*, 1997).

Neste trabalho, foi utilizada a função GOLDScore, que é uma função baseada em campo de força e é constituída de quatro componentes:

- S(hb_ext): energia de ligação de hidrogênio do complexo proteína-ligante;
- S(vdw_ext): energia de *van der waals* do complexo proteína-ligante;
- S(vdw_int): energia de *van der waals* do ligante;
- S(hb_int): energia de ligação de hidrogênio intramolecular do ligante.

O termo de *score* vdw_ext é multiplicado por um fator de 1,375 quando o *score* total é calculado. Isto é uma correção empírica para induzir o complexo proteína-ligante ao contato hidrofóbico. O resultado final é multiplicado por -1 para fornecer *scores* positivos, derivados de termos da energia potencial, dados em kcal/mol (ANNAMALA, 2007).

O campo de força (mecânica molecular) utilizado no programa GOLD é o Tripos 5.2 Force Field (CLARK,1989).

4.2 Estudo Comparativo das Estruturas da IMPDHh e IMPDHCp

4.2.1 Alinhamento das Estruturas 3D de IMPDHh e IMPDHCp

Visando ter melhor conhecimento acerca das diferenças estruturais dos sítios ativos da enzima humana (IMPDHh) e de *Cryptosporidium* (IMPDHCp) foi realizado um alinhamento das estruturas cristalográficas da IMPDHh e da IMPDHCp (códigos PDB 1NF7 e 3KHJ, respectivamente) no programa Pymol 0,99 e Discovery Studio (ACCELRYS, Ltd.). Estes estudos são complementares e permitem que se aprofunde o conhecimento acerca das características moleculares necessárias para que as enzimas reconheçam seus ligantes, dependendo não somente da região do

sítio ativo (catalítico) como também de suas vizinhanças (resíduos de aminoácidos auxiliares).

4.2.2 Análise dos Volumes dos Sítios Ativos de IMPDHh e IMPDHCp e da Ribavirina Monofosfato e Análogos

Os volumes dos sítios ativos das IMPDHs foram analisados no servidor *Pocket Finder* (<http://www.modelling.leeds.ac.uk/qsitefinder/>), utilizando-se as proteínas IMPDHh e IMPDHCp supra citadas. As visualizações foram realizadas no Pymol 0,99 para Windows (DELANO, 2002). No Discovery Studio 4.0 (ACCELRYS, 2013), foram feitas as figuras da proteína no modo “*surface*” com a molécula de Ribavirina no sítio ativo para ilustrar a diferença no volume das cavidades de ligação nas duas enzimas.

4.3 Validação do Docking Molecular: Redocking

No estudo de *redocking*, foram utilizadas as estruturas cristalográficas da IMPDH de *Cryptosporidium*, código PDB 3KHJ, em complexo com Inosina monofosfato (IMP) e a estrutura cristalográfica da IMPDH humana (Figura 7), código PDB 1NF7, em complexo com a Ribavirina monofosfato (RVP).

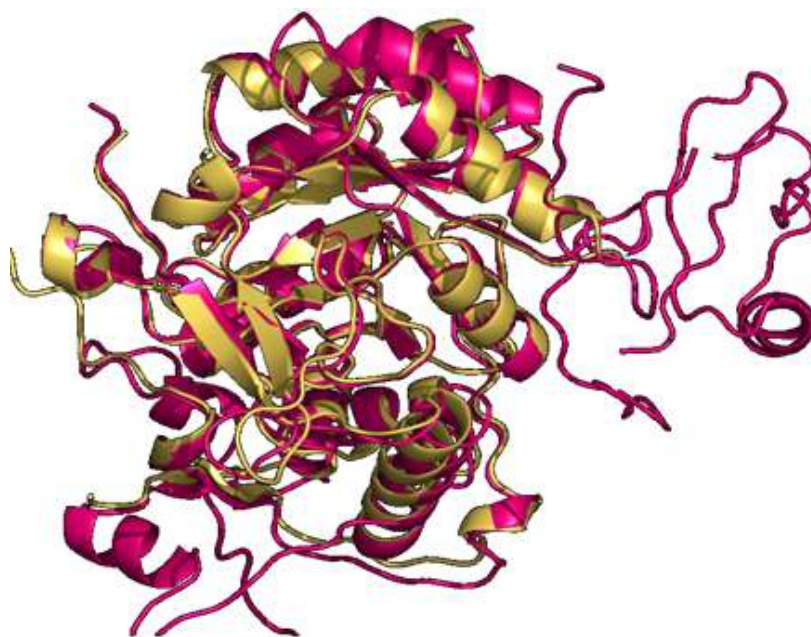


Figura 7. Alinhamento das enzimas IMPDHh e IMPDHCp.

Nesses estudos foram utilizados os parâmetros para o raio de definição do sítio de ligação de 10 Å a partir do átomo de nitrogênio número 2167 de SER 329 para a enzima humana e o átomo de nitrogênio número 1598 de SER 217 para a enzima de *Cryptosporidium*, visualizados no programa Weblab Viwerlite 4.0 (DELALAMO, 2003). Os valores de RMSD foram calculados no Discovery Studio 3.1 e as visualizações foram feitas no Pymol 0,99.

4.3.1 *Docking* Molecular com os análogos da Ribavirina

Nesses, estudos foram utilizados os mesmos parâmetros para a definição do sítio de ligação descritos no item anterior (4.3). Para os estudos iniciais de *docking*, foi selecionada a Ribavirina, inibidor da enzima IMPDHh, como molécula de referência. A estrutura da mesma foi extraída do complexo obtido por raios-X (código 1NF7), os átomos de hidrogênio foram adicionados e a estrutura foi otimizada pelo método AM1 (DEWAR, 1985) com o programa Spartan Pro (wavefunction Inc.). O grupo monofosfato foi adicionado no Spartan Pro e as moléculas foram otimizadas pelo método semi-empírico Parameterized Model number 3 (PM3) (STEWART, 1991). Os análogos Mol 1, Mol 2, Mol 3, Mol 4, Mol 5, Mol 6, Mol 7 e SR91 foram construídos e otimizados pela mesma metodologia. Na molécula 6 há grupos ionizáveis (-NH₂) em pH 7,4 e a mesma foi protonada com o auxílio do Marvin Beans 5.2.6 (CHEMAXON, 2009) tendo sido modelada então nas formas neutra e carregada. Nesse processo, foram geradas as moléculas 6a, 6b e 6c, com diferentes graus de protonação.

Nesse processo, a estratégia de fosforilação molecular foi usada, pois a Ribavirina é fosforilada intracelularmente pela Adenosina Quinase, entre outras (DIXIT e PERELSON, 2006; WU *et al.*, 2005), no grupamento hidroxila na posição 5', levando aos metabólitos de Ribavirina mono-, di-, e trifosfatos. O efeito dessa fosforilação parece ser a diminuição no reservatório de GTP celular, provavelmente aumentando a frequência de incorporação da Ribavirina trifosfato porque ela atua como um análogo do GTP (SHU, 2008). Nesse estudo, introduzimos apenas um grupo fosfato através do programa Spartan Pro (wavefunction Inc.), para comparação com a forma mono-fosfatada da Ribavirina nos cristais. Em seguida, as moléculas foram otimizadas pelo método semi-empírico PM3 (STEWART, 1989).

As moléculas que apresentaram os maiores valores de *score* utilizando a função GOLDScore, (maiores *scores* = maior afinidade teórica), e maior número de

interações (ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, etc.), foram selecionadas para serem propostas modificações posteriores. As visualizações dos resultados foram feitas no programa Pymol, versão 0.99, para Windows (DELANO, 2002). Finalmente, foram realizadas 5 corridas de cálculos no programa GOLD 4.1.2 (VERDONK, 2003) para IMPD H_h e IMPD H_{Cp} e feitas as médias das corridas para cada molécula avaliada, visando verificar a consistência dos valores de *Fitness score* e dos melhores modos de ligação obtidas.

4.3.2 Propostas de Modificações Moleculares Baseadas no Docking Molecular

As propostas para modificações moleculares foram baseadas em reações orgânicas simples, no método de interconversão de grupos funcionais, neste caso do grupo amida. A sugestão de interconversão gerou cinco moléculas distintas, análogas da molécula 3. Esses análogos apresentam radicais piperidina, morfolina, piperazina, dimetil amida e dietilamida. A inclusão dos grupos propostos baseou-se em prováveis interações com o resíduo GLU 329 da IMPDH de *Cryptosporidium*.

4.3.3 Docking Molecular das Moléculas Propostas

Nos estudos de *docking* das moléculas propostas a partir da molécula 3 foram utilizadas as mesmas metodologias descritas anteriormente para todas as outras moléculas desse trabalho.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudo Comparativo das Estruturas da IMPD H_h e IMPD H_{Cp}

5.1.1 Alinhamento das Estruturas 3D de IMPD H_h e IMPD H_{Cp}

O objetivo do alinhamento tridimensional (3D) é observar a posição/conformação de resíduos estruturalmente equivalentes, levando em conta características estruturais comuns, tais como, elementos de estrutura secundária e resíduos catalíticos (SANTOS FILHO, 2003). O mapeamento dos aminoácidos do sítio ativo (sítio catalítico) da IMPD H_{Cp} (Figura 8) mostrou exemplos de resíduos de aminoácidos que não são conservados, em comparação com a enzima humana (IMPD H_h). Em destaque, na Figura 8, as trocas de aminoácidos consideradas mais significativas na comparação entre os sítios ativos.

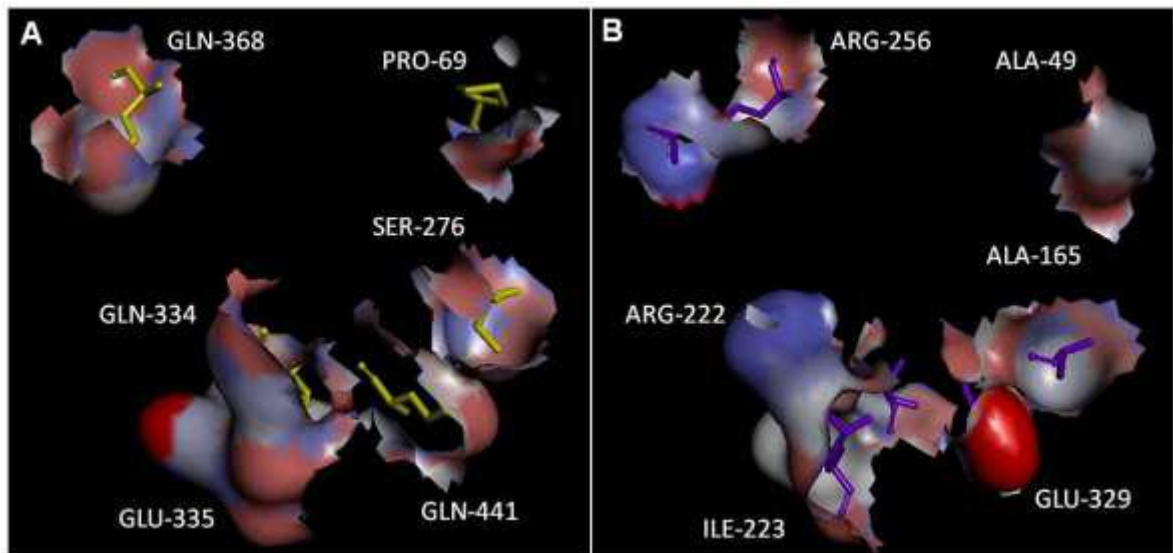


Figura 8. Trocas de aminoácidos dos sítios ativos da IMPDH h (A) e IMPDH cp (B) considerados de maior relevância para estudos de planejamento racional de inibidores seletivos.

Pela Figura 8 pode ser observado que as diferenças de aminoácidos mais importantes entre IMPDH h e IMPDH cp são as trocas PRO69ALA49; SER276ALA165; GLN334ARG222; GLU335ILE223; GLN368ARG256 e GLN441GLU329. Tais trocas são consideradas importantes por envolverem a mudança no ambiente eletrostático das enzimas, provavelmente influenciando as interações com ligantes.

Os resíduos de aminoácidos de maior destaque são o Glutamato na posição 329 (GLU329) da IMPDH cp , que é um grupo carregado negativamente no pH fisiológico, enquanto que na enzima humana o resíduo de aminoácido correspondente é uma Glutamina na posição 441 (GLN441), que é um grupo amida, considerado neutro em pH fisiológico, embora também polar (Figura 8). O mesmo ocorre na troca GLN334ARG222, onde um grupo neutro dá lugar a um grupo com carga positiva. Porém, há outras substituições que podem ser exploradas nas vizinhanças do mesmo, como as trocas GLN277HIS166; SER327PRO215; ILE332THR220; MET386ILE274 e LEU389ILE277 (dados não tabelados).

5.1.2 Análise dos Volumes dos Sítios Ativos de IMPDHh e IMPDHcp e da Ribavirina Monofosfato e Análogos

Os resíduos do sítio ativo foram observados no Pymol, versão 0.99, para Windows (DELANO, 2002) e comparados com os diversos sítios propostos pelo programa. O sítio que foi apontado com o maior volume é exatamente aquele em que a Ribavirina se encaixa. O volume do sítio ativo da IMPDHh foi de 646\AA^3 (Figura 9).

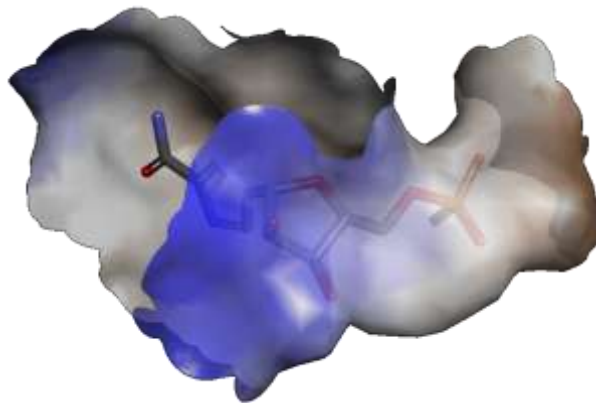


Figura 9. Ribavirina monofosfatada com a proteína IMPDHh. Os resíduos que interagem com a molécula estão em branco (carbono), azul (nitrogênio) e vermelho (oxigênio).

A segunda proteína que foi analisada foi a IMPDHcp, com volume de 472\AA^3 (Figura 10). Ao compararmos o volume dos sítios ativos observamos que o volume do sítio da IMPDHh é maior que o sítio ativo da IMPDHcp. Esses dados são importantes para o planejamento racional de moléculas seletivas para IMPDHcp.

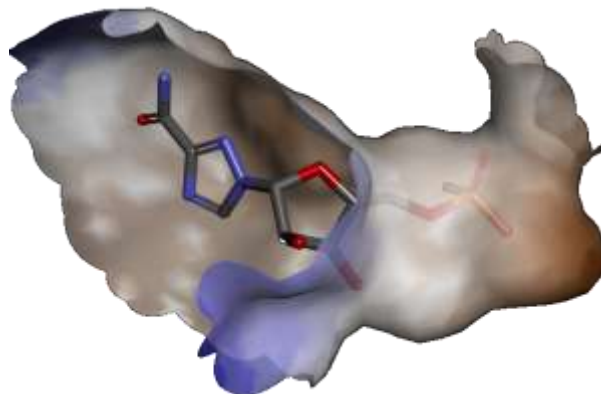


Figura 10. Ribavirina monofosfatada no sítio ativo da IMPDHcp. Os resíduos que interagem com a molécula estão em branco (carbono), nitrogênio (azul) e vermelho (oxigênio).

As moléculas selecionadas neste trabalho não possuem o mesmo volume da Ribavirina, ou seja, vão se encaixar de maneiras diferentes nos sítios ativos. A observação dos mesmos leva-nos a inferir que essa diferença pode influenciar na afinidade pela IMPDHs (Tabela 1). Nesse trabalho, os análogos estudados apresentaram volumes moleculares superiores ao da Ribavirina, variando de 58,57 a 102,35 Å³.

	Série das moléculas não fosfatadas	Série das moléculas monofosfatadas
Ribavirina	54,09	92,42
SR91	54,09	63,52
Mol 1	62,79	73,26
Mol 2	67,93	82,71
Mol 3	72,42	73,36
Mol 4	58,57	81,05
Mol 5	71,14	67,20
Mol 6 (a)	76,89	91,06
Mol 6 (b)	-----	91,06
Mol 6 (c)	-----	102,35
Mol 7	74,41	87,11

Tabela 1. Volume dos análogos da Ribavirina não fosfatados e fosfatados (Å³).

5.2 Docking Molecular

5.2.1 Validação do Docking Molecular: Redocking

Em simulações de *docking* os melhores resultados geram valores de RMSD abaixo de 1,5 Å. No *redocking* os resultados obtidos foram valores inferiores a 1,5 Å RMSD, concluindo-se que o mesmo foi bem sucedido para IMPDHh e IMPDHCp, validando a metodologia selecionada para os estudos com os análogos da Ribavirina (Tabela 2).

Ligante	Proteína	Átomo de Referência/Resíduo	RMSD (Å)
RVP	1NF7	N = 2167 / SER 329	0,56
IMP	3KHJ	N = 1598 / SER 217	0,28

Tabela 2. Valores de RMSD do *redocking* para as respectivas proteínas de estudo.

A Figura 11 mostra a melhor modo de ligação obtido para a ribavirina monofosfato com a IMPDHh. De acordo com o resultado, as mesmas interações observadas para esta molécula no cristal foram mantidas, mostrando que o programa foi eficiente em achar a conformação bioativa desta molécula.

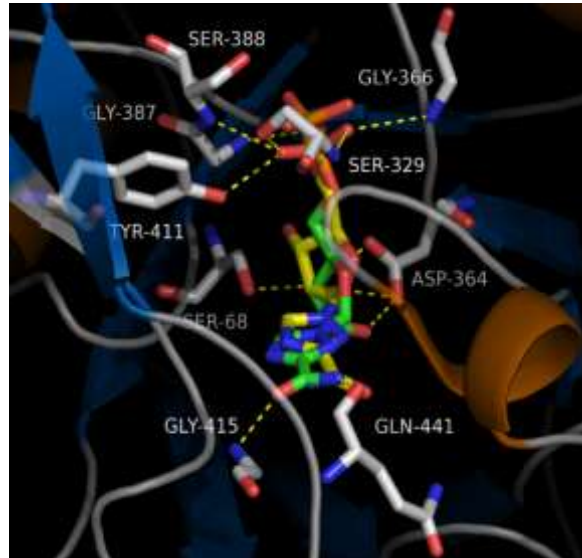


Figura 11. Melhor modo de ligação obtido para a Ribavirina Monofosfato com a IMPDHh (C= amarelo) sobreposta no cristal (C= verde), como observado por difração de raios-X , e o melhor complexo da Ribavirina obtido por *docking* com o programa GOLD 4.1.2. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização.

Pode-se observar que a mesma interage com os resíduos SER 276, GLY 275, SER 48, ASP 252, SER 217 E GLY 254, MET 302, GLU 329 como demonstrado no esquema do *Ligplot* em 2D (Figura 12).

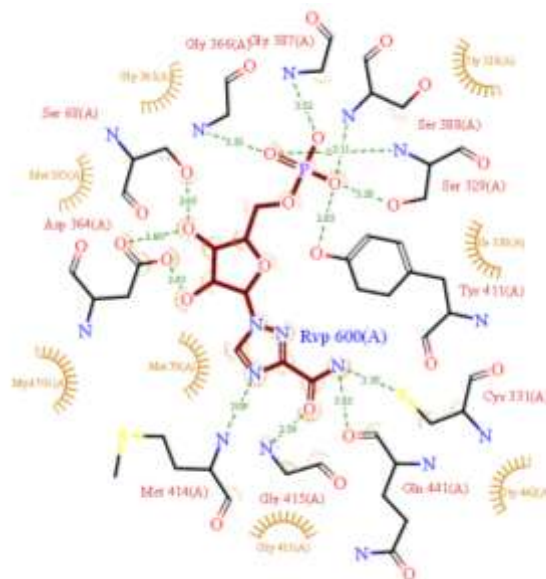


Figura 12. Interações da ribavirina monofosfato com os resíduos do sítio ativo da IMPDHh.

A Figura 13 mostra a melhor modo de ligação obtido para a Inosina Monofosfato com a IMPDH α .

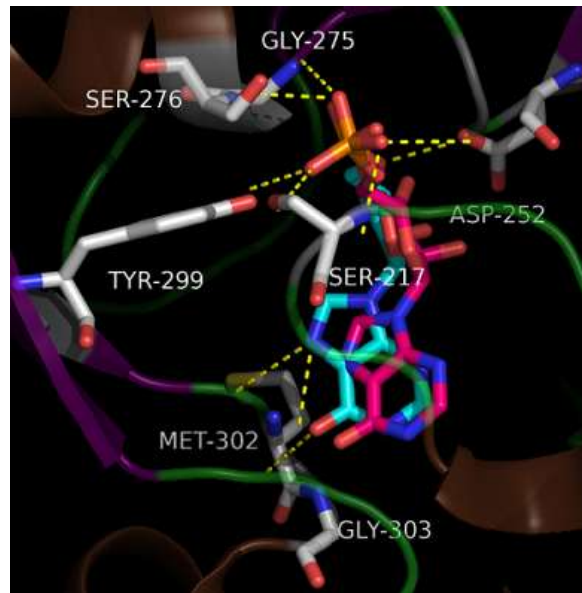


Figura 13. Melhor modo de ligação obtido para o IMP com a IMPDH α (C= rosa) sobreposta no cristal (C= azul), como observado por difração de raios-X, e o melhor complexo da Ribavirina obtido por *docking* com o programa GOLD 4.1.2. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização.

De acordo com o resultado, as mesmas interações observadas para esta molécula no cristal foram mantidas, mostrando que o programa também foi eficiente em achar a conformação bioativa desta molécula. Pode-se observar que IMP interage com os resíduos SER 217, GLY 275, ASP 252, E GLY 303, MET 302, SER 276, TYR 299 como demonstrado no esquema do *Ligplot*, em 2D (Figura 14).

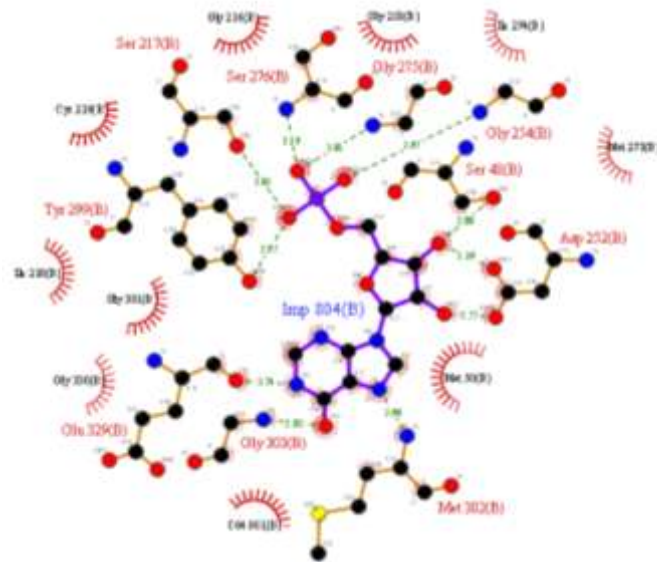


Figura 14. Interações do IMP com os resíduos do sítio ativo da IMPDH C_p

5.2.2 Docking Molecular com os Análogos da Ribavirina

No Pymol, versão 0.99, para Windows (DELANO, 2002), foram analisadas as interações (ligações de hidrogênio e VDW) dos ligantes com as enzimas IMPDHs a partir das melhores modos de ligação dos complexos proteína–ligante geradas no *docking* com o programa GOLD 4.1.2 (VERDONK, 2003). As análises foram feitas com as duas séries (não fosfatadas e monofosfatadas). O foco principal para essas análises foi para as moléculas que tiveram melhor interação com a enzima de *Cryptosporidium*. A partir do *docking* molecular foi gerado um gráfico com a média de todas as corridas com as moléculas desse estudo (Figura 15).

Na Figura 15, é possível verificar que a molécula 5 apresenta maior potencial de seletividade para a IMPDH C_p devido à maior média de *Score* (afinidade de ligação teórica) em comparação com o valor obtido para a IMPDH h . A segunda molécula de maior seletividade teórica pela média de *score* foi a molécula 3.

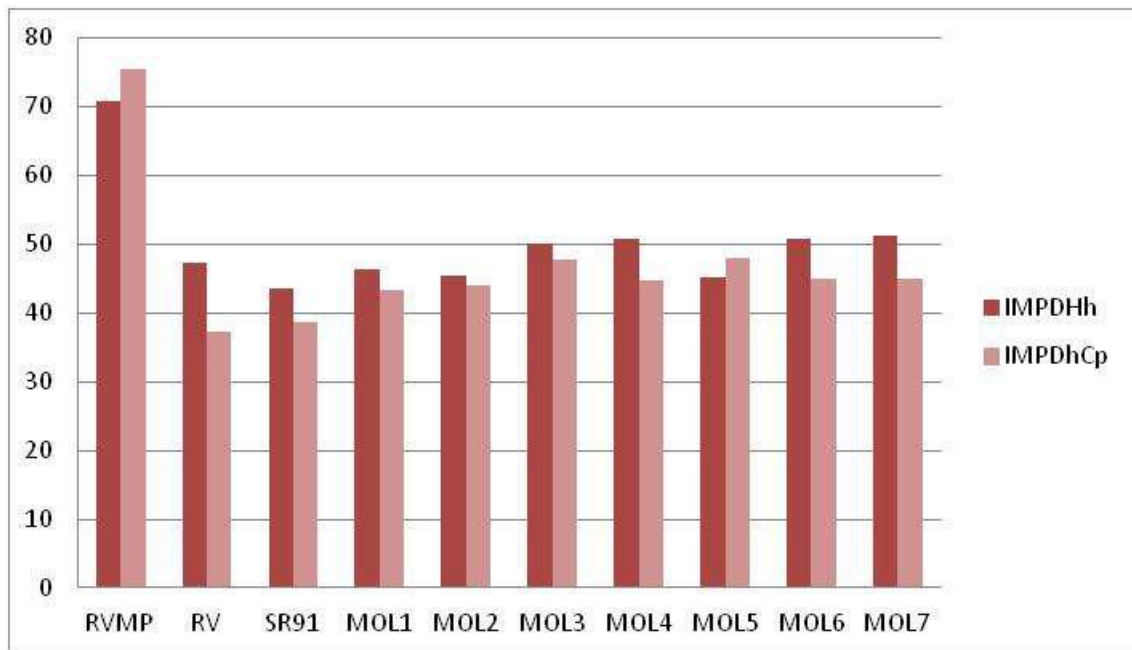


Figura 15. Média dos valores de *Fitness Score* obtidos por *docking* das moléculas da série não fosfatadas com a IMPDHh e IMPDHcp obtidos nos estudos de *Docking*, com o programa GOLD 4.1.2. RVMP = Ribavirina Monofosfato e RV= Ribavirina

5.2.2.1 Análise das interações com a série de moléculas não-fosfatadas

Nos estudos com IMPDHh (Figura 16, A) e a molécula 5, foram observadas interações por ligação de hidrogênio com o resíduo ILE 367, na qual o grupo carbonila da cadeia peptídica da ILE 367 faz uma ligação de hidrogênio com a hidroxila ligada ao carbono na posição 5' da pentose. A hidroxila na posição 4 da pentose faz ligação de hidrogênio com a cadeia lateral do aminoácido SER 329, a hidroxila da cadeia lateral de TYR 411 faz ligação de hidrogênio com as hidroxilas nas posições 3 e 4 da pentose e a hidroxila da cadeia lateral da SER 68 faz ligação de hidrogênio com os nitrogênios 2 e 3 do anel triazólico da molécula 5. Além dessas interações há outras prováveis interações de VDW com os resíduos MET 386, GLY 366, ILE 330 e PRO 69 que se encontram nas vizinhanças dos sitio ativo.

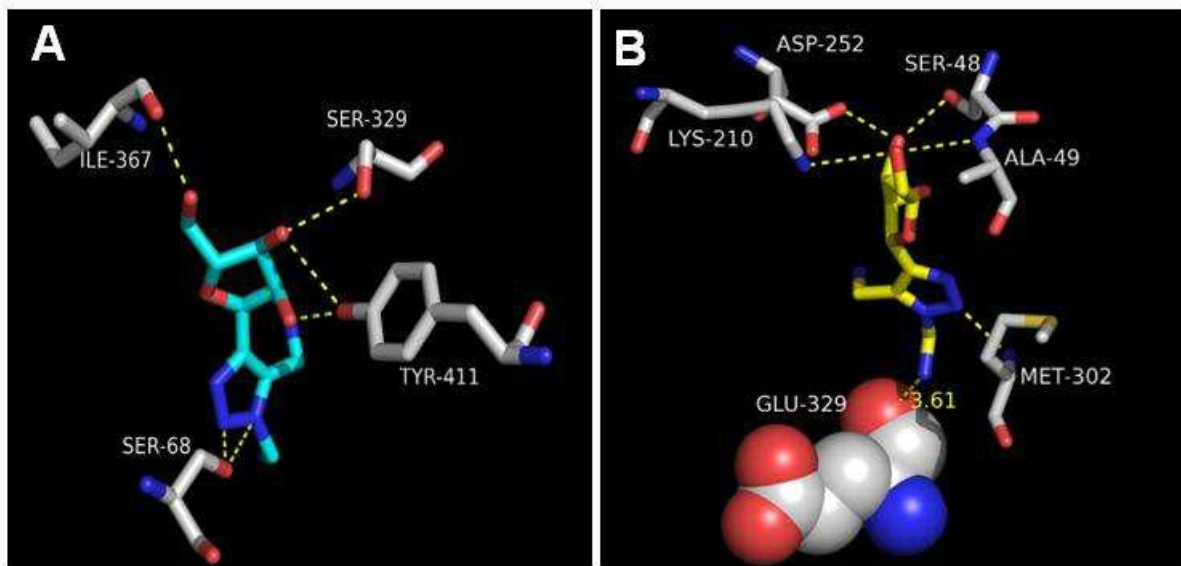


Figura 16. Melhor modo de ligação da Molécula 5 da série não fosfatada (C = azul) com IMPDHh (A) e com a IMPDHcp (C = amarelo) (B) obtido por *docking* com o programa GOLD 4.1.2. Ligações de hidrogênio pontilhado (amarelo) e resíduo de aminoácidos envolvidos em legendas brancas. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização.

No estudo com a enzima IMPDHcp (Figura 16, B) foram observadas interações por ligações de hidrogênio envolvendo a amina da cadeia peptídica do resíduo MET 302 e o nitrogênio da posição 2 do anel triazólico, o grupo amina do esqueleto peptídico da ALA 49 interage com o oxigênio da hidroxila ligado ao carbono da posição 4 da pentose, a hidroxila da cadeia lateral da SER 48 faz uma ligação de hidrogênio com a hidroxila na posição 3 da pentose, a amina carregada positivamente da cadeia lateral da LYS 210 interage com o oxigênio da hidroxila ligada ao carbono da posição 4 da pentose e o grupo carboxilato da cadeia lateral da ASP 252 faz uma ligação de hidrogênio com a hidroxila na posição 3 da pentose. Além dessas interações polares, há contribuições dos resíduos GLY 301 e ILE 218 por interações de VDW.

Nos estudos com a molécula 3 e IMPDHh (Figura 17, A) foram observadas interações por ligação de hidrogênio entre o grupo amina do esqueleto peptídico da GLY 387, o nitrogênio 3 do anel triazólico e a carbonila da amida. A hidroxila da cadeia lateral da SER 68 faz uma interação com o oxigênio na posição 5' da pentose e com a hidroxila ligada ao carbono na posição 4 da pentose. Além disso, a hidroxila ligada ao carbono na posição 5' da pentose faz ligação de hidrogênio com os nitrogênios carregados positivamente da cadeia lateral da ARG 322. O grupo

carboxilato da cadeia lateral do ASP 364 faz ligação de hidrogênio com a hidroxila na posição 5' da pentose. Finalmente, o grupo amino do esqueleto peptídico de GLY 365 faz ligação de hidrogênio com o nitrogênio da posição 2 do anel triazólico, o grupo amino da cadeia peptídica de LEU 389 faz uma ligação de hidrogênio com a carbonila da amida e o grupo amino peptídico da SER 388 faz uma ligação de hidrogênio com a carbonila da amida da molécula 3, não fosfatada.

Com a enzima IMPDHCp (Figura 17, B) foram observadas interações por ligações de hidrogênio envolvendo o grupo carboxilato da cadeia lateral do ASP 252 e as hidroxilas das posições 4 e 5' da pentose. O grupo hidroxila da cadeia lateral de SER 48 faz uma ligação de hidrogênio com a hidroxila da posição 4 da pentose e com a hidroxila ligada ao carbono na posição 5' da pentose. Finalmente, o nitrogênio carregado positivamente da cadeia lateral da LYS 210 interage com a hidroxila da pentose na posição 3 e o grupo carbonila do esqueleto peptídico do resíduo ASP 163 interage com a amida da molécula 3 e com a hidroxila na posição 3 da pentose. Além dessas interações, há outras contribuições prováveis por interações de VDW dos resíduos SER 164, MET 302, ALA 140, ILE 218, MET 5.

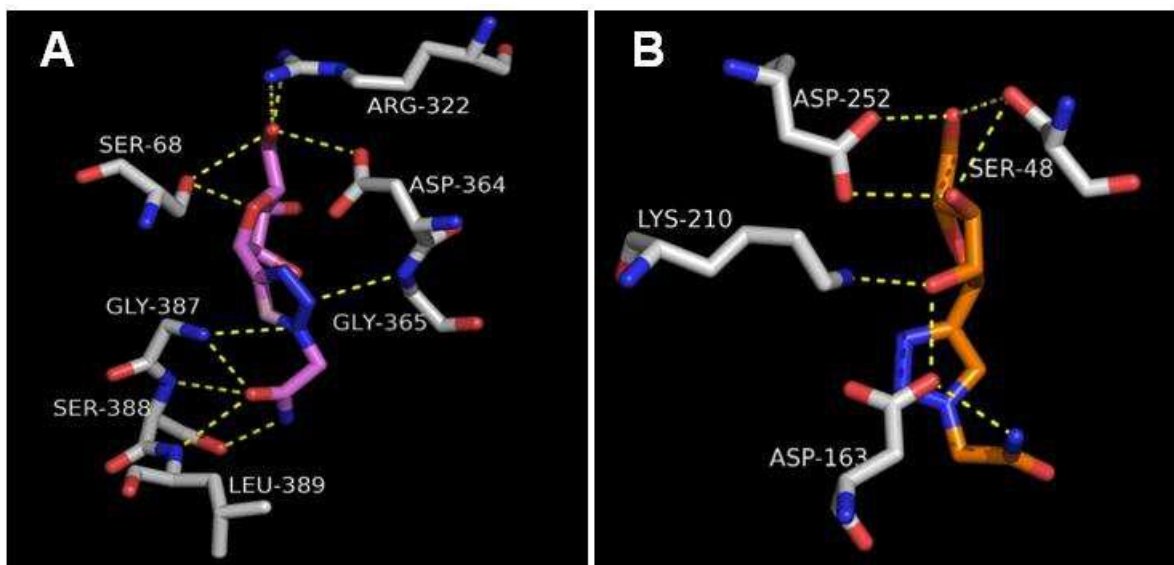


Figura 17. Melhor modo de ligação da Molécula 3 da série não fosfatada (C = rosa) com IMPDHh (A) e IMPDHCp (C = laranja) (B) obtida por *docking* com o programa GOLD 4.1.2. Ligações de hidrogênio pontilhadas (amarelo) e resíduos de aminoácidos envolvidos em legendas brancas. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização.

5.2.2.2 Análise das interações com a série de moléculas monofosfatadas

As moléculas deste estudo foram ancoradas à proteína IMPDHh e IMPDHCp, visando à comparação com o modo de ligação no cristal observado para a Ribavirina, composto de referência. Os maiores valores de *score* foram obtidos para as moléculas 3 e 4, propondo-se que estas sejam teoricamente mais seletivas para a IMPDHCp, que é o objetivo desse trabalho. A Figura 18 mostra os resultados de *Fitness Scores* obtidos para as moléculas da série das moléculas monofosfatadas.

Neste gráfico é possível verificar que as moléculas 3 e 4 apresentam maior potencial para seletividade para a IMPDHCp devido à maior média de *Score* (afinidade de ligação teórica) em comparação com o valor obtido para a IMPDHh. A segunda molécula mais seletiva, teoricamente, é a molécula 4, pela média de *score*. Além das médias, foram observados também o valor de diferença para a média de *scores* para a IMPDHh.

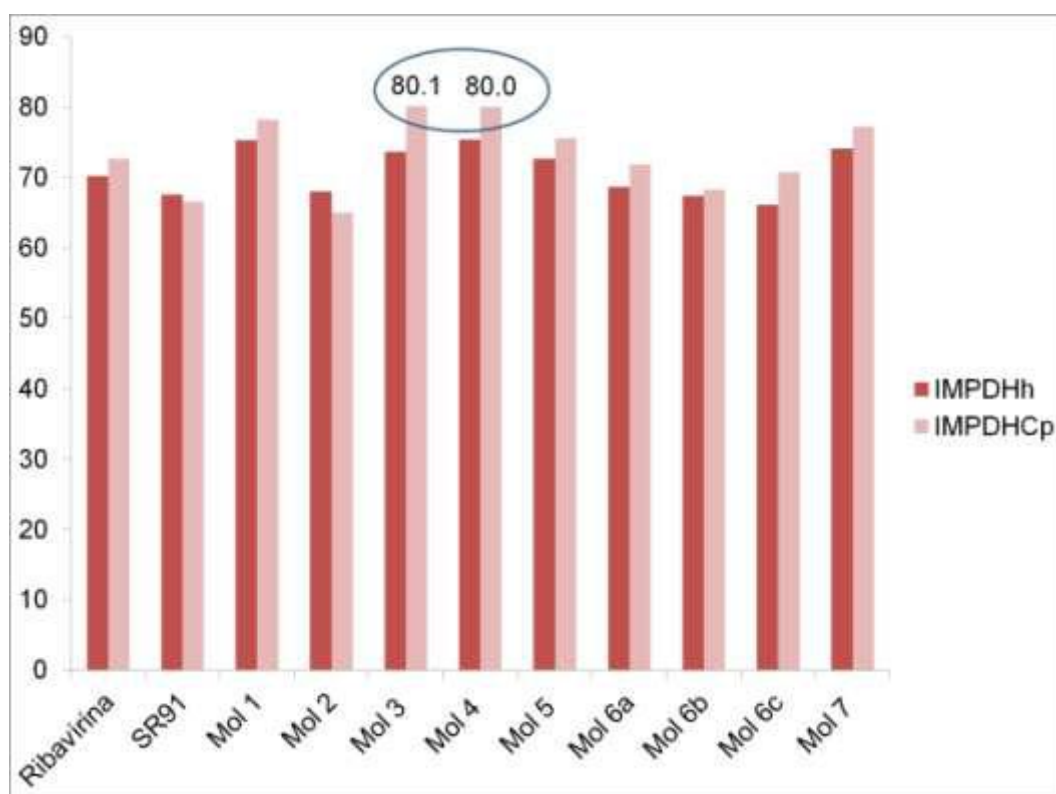


Figura 18. Média dos valores de *Score* obtidos por *docking* das moléculas deste estudo com IMPDHh e IMPDHCp, no programa GOLD 4.1.2.

Na Figura 19A, podem ser observadas interações da molécula 3, monofosfatada, e a IMPDHh, com destaque para os resíduos LEU 389, SER 329,

ILE 367, TYR 411, GLY 387, SER 388 e GLY 366, que formam uma rede de ligações de hidrogênio com o grupo fosfato. O grupo carboxilato da ASP 364 faz ligação de hidrogênio com a hidroxila da posição 3 da pentose, o grupo carbonila do esqueleto peptídico da GLN 441 faz ligação de hidrogênio com a amida da molécula 3 e o grupo amino do esqueleto peptídico da GLY 415 faz ligação de hidrogênio com a carbonila. Finalmente, o oxigênio da cadeia lateral da SER 68 faz ligação de hidrogênio com a hidroxila de posição 3 da pentose. Além dessas interações há outras possíveis contribuições dos resíduos GLY 413, GLY 328, nas vizinhanças dos sítio ativo, por interações de VDW.

Com a enzima IMPDHC_p (Figura 19B) foram observadas interações por ligações de hidrogênio entre o grupo carbonila do esqueleto peptídico do ASP 252 e a hidroxila da posição 3 da pentose. Também foi observada uma rede de ligações de hidrogênio envolvendo GLY 254, SER 276, GLY 275, TYR 299 e SER 217 e os átomos de oxigênio do grupo fosfato. Além disso, o grupo amino peptídico da MET 302 faz ligação de hidrogênio com o nitrogênio da posição 2 do anel triazólico da molécula 3. Finalmente, além dessas interações há outras contribuições de VDW envolvendo os resíduos ILE 274 GLY 216, ILE 218 e GLY 301.

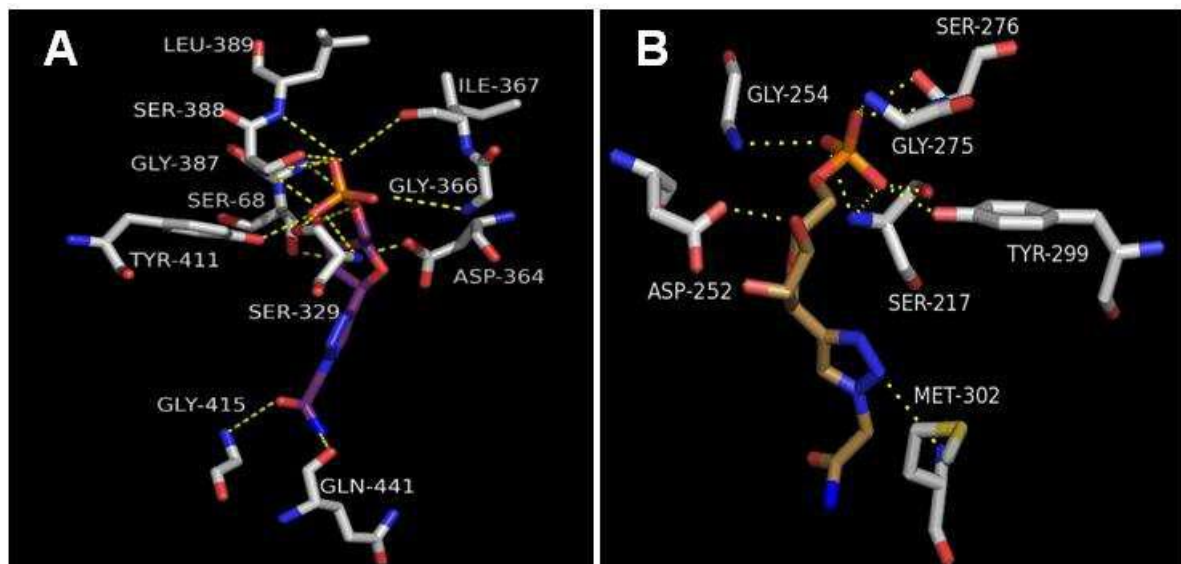


Figura 19. Melhor modo de ligação da Molécula 3 da série monofosfatadas com IMPDH_h (C = roxo) (A) e IMPDHC_p (C = marrom) (B) obtida por *docking* com o programa GOLD 4.1.2. As ligações de hidrogênio em linhas tracejadas (amarelas), interagindo com resíduos (átomo de carbono em cinza). Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização.

Nos estudos com a molécula 4, monofosfatada, e IMPDH_h (Figura 20, A) foram observadas interações por ligação de hidrogênio do oxigênio da cadeia lateral

da THR 333 e o nitrogênio da hidrazina. Novamente, também foi observada uma rede de ligações de hidrogênio envolvendo SER 329, TYR 411, SER 388, GLY 287 e ILE 367 e o grupamento fosfato. Além disso, o grupo hidroxila da cadeia lateral de SER 68 faz ligação de hidrogênio com o oxigênio na posição 3 da pentose e o grupo carboxilato da cadeia lateral de ASP 364 faz uma interação por ligação de hidrogênio com o grupo hidroxila ligado à pentose na posição 3. Além dessas interações, também há outras contribuições adicionais de VDW com o resíduo ILE 330, que se encontra nas vizinhanças dos sitio ativo.

Novamente, com a enzima IMPDH_{Cp} (Figura 20, B) foram observadas interações por rede de ligações de hidrogênio entre GLY 254, SER 276, GLY 275 TYR 299, SER 217 e o grupamento fosfato. Adicionalmente, o grupo amino do esqueleto peptídico de MET 302 faz ligação de hidrogênio com o nitrogênio na posição 2 do anel triazólico, o grupo amino do esqueleto peptídico da GLY 303 faz ligação de hidrogênio com a carbonila da hidrazida, a cadeia lateral do THR 221 faz ligação de hidrogênio com um dos nitrogênios da hidrazida, a carboxila da cadeia lateral do ASP 252 faz ligação de hidrogênio com os oxigênios das hidroxilas localizados nas posições 3 e 4 da pentose. Finalmente, além dessas, há outras contribuições por interações de VDW envolvendo os resíduos GLY 301 E ILE 218.

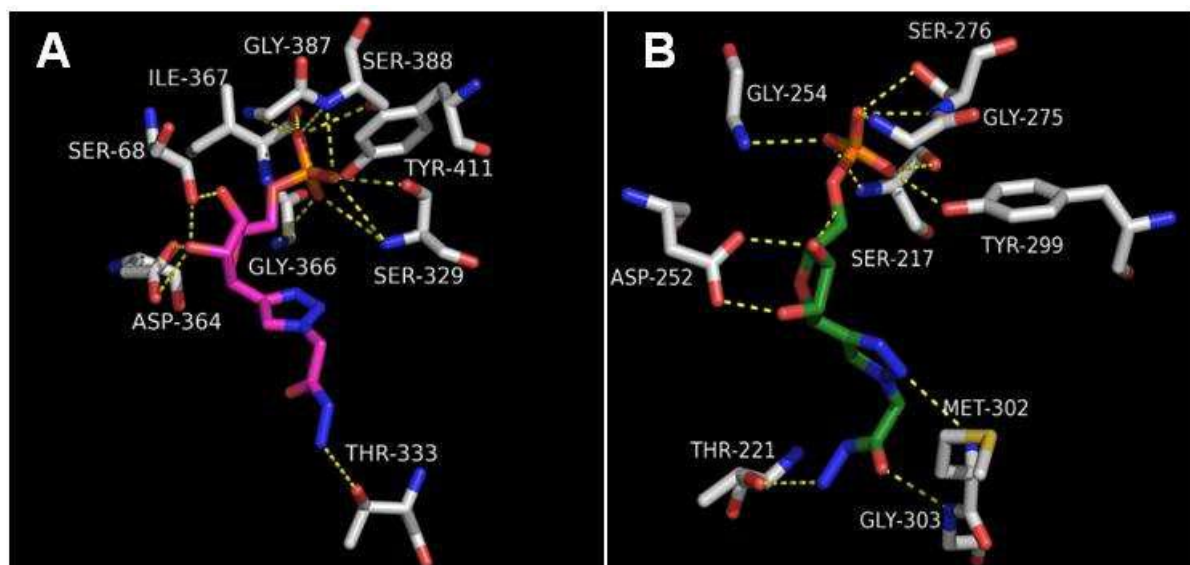


Figura 20. Melhor modo de ligação da molécula 4 da série das moléculas monofosfatadas com IMPDH_h (C = rosa) (A) e IMPDH_{Cp} (C = verde escuro) (B) obtida por *docking* com o programa GOLD 4.1.2. Ligações hidrogênio pontilhadas (amarelo) e resíduos de aminoácidos envolvidos em legendas brancas. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização.

5.2.2.3 Comparação das interações na série de moléculas não fosfatadas

Os resultados obtidos pelo *docking* dos análogos da Ribavirina mostraram que a molécula 5 da série das moléculas não fosfatadas obteve melhor valor de *score* para a enzima IMPDHC_p, a enzima de interesse, em comparação com a molécula 5 da série das moléculas não fosfatadas para a enzima humana. Essa afinidade provavelmente se deu devido ao maior número de interações por ligação de hidrogênio da molécula 5 com a enzima de *Cryptosporidium*. Os resíduos LYS 210, ASP 252, SER 48, ALA 49 foram observados para interações de ligação de hidrogênio da molécula 5 com a IMPDHC_p e foram os mais próximos da região mais interna da cavidade de encaixe da molécula, enquanto que, para a mesma molécula, porém com a enzima IMPDH_h foram observadas interações com os resíduos LYS 367, SER 329 E TYR 411, ou seja, um menor número de interações na cavidade interna do sítio. MET 302, resíduo de caráter hidrofóbico, faz uma interação com o nitrogênio da posição 2 no anel triazólico, porém é provável que essa interação não seja a de maior contribuição para melhor afinidade teórica da molécula 5. Porém, pode-se pressupor que o maior número de interações de VDW na interação da molécula 5 com a IMPDH_h não seja favorável em comparação a com a IMPDHC_p, que tem uma contribuição menor.

A molécula 3 da série das não fosfatadas foi classificada como segundo maior valor de média de *score* para a enzima do *Cryptosporidium*. A mesma interage por ligações de hidrogênio com os resíduos ASP 252, SER 48, LYS 210 que estão mais localizados na cavidade mais interna do sítio ativo, enquanto que o ASP 163 encontra-se mais próximo da parte mais externa do sítio ativo e talvez não contribua muito com a afinidade do ligante pelo sítio ativo. O grupo carbonila do esqueleto peptídico do resíduo ASP 163 interage com a amida e com a hidroxila na posição 3 de pentose. Essa interação tem caráter polar que pode ter grande contribuição para a afinidade teórica, mas não maior que observado para a molécula 5. Além disso, os resíduos SER 164, MET 302, ALA 140, ILE 218, MET 50 contribuem para a afinidade com interações de VDW, que são mais fracas que as interações por ligação de hidrogênio.

5.2.2.4 Comparação das interações na série de moléculas monofosfatadas

Os resultados obtidos pelo *docking* dos análogos da Ribavirina mostraram que a molécula 3, da série das moléculas monofosfatadas, obteve melhor valor de *score* para a enzima IMPDH_{Cp}, em comparação com a enzima humana. No estudo com IMPDH_{Cp}, os resíduos ASP 252, GLY 254, SER 276, GLY 275, TYR 299 e SER 217 interagem por ligações de hidrogênio com a molécula 3. Esses resíduos possuem cadeias laterais polares e hidrofóbicas que podem contribuir energeticamente para a melhor afinidade. Essa molécula faz um maior número de interações por ligações de hidrogênio com a IMPDH_h, mas provavelmente essa não seja a principal contribuição para melhor afinidade, já que a molécula 3 com a IMPDH_{Cp} faz um menor número de ligações de hidrogênio e tem maior afinidade teórica. Os resíduos ILE 274, GLY 216, ILE 218, GLY 301 podem ser relevantes para interações de VDW, além dos resíduos SER 48, MET 273, ASN 191, GLY 303, GLU 329, THR 220, THR 221, THR 220, CYS 219, ILE 255 que se encontram nas vizinhanças do sítio ativo e podem fazer interações do tipo polares, ionizáveis ou ligações de hidrogênio, não mostradas. Esse número é muito maior do que para a interação com IMPDH_h que envolve os resíduos MET 386, MET 385, CYS 331, THR 333, ILE 330, MET 414, GLY 442 e MET 70. Portanto, esses dados parecem justificar a maior afinidade teórica da molécula 3 para IMPDH_{Cp}.

A molécula 4 foi classificada como segundo maior valor de média de *score* para a enzima do *Cryptosporidium* da série de moléculas monofosfatadas. Ambas as enzimas apresentam o mesmo número de interações por ligações de hidrogênio e isso sugere que não são apenas as interações por ligações de hidrogênio que favorecem a afinidade pela enzima de *Cryptosporidium*, mas também por interações mais fracas, como por VDW. Os resíduos da enzima IMPDH_h THR 333, SER 329, TYR 411, SER 388, GLY 387, SER 68, ILE 367, GLY 366, ASP 364 e ILE 330 participam de interações por ligação de hidrogênio, além de ter sido observada contribuição de VDW pelo resíduo ILE 330 de cadeia lateral hidrofóbica. Os resíduos da IMPDH_{Cp} GLY 254, SER 276, GLY 275, TYR 299, SER 217, MET 302, GLY 303, THR 221, ASP 252 interagem por ligação de hidrogênio e há contribuição de VDW dos resíduos GLY 301 e ILE 218. Provavelmente, isso favorece a maior afinidade teórica pela IMPDH_{Cp}.

As moléculas 3 e 4 são muito semelhantes em relação aos resíduos de interação por ligação de hidrogênio. Porém a diferença está na interação da

molécula 4 com os resíduos GLY 303 e THR 221 que se encontram mais próximos à cavidade de entrada do sitio ativo. Além disso, o número de resíduos que fazem interações por VDW com a molécula 3 é muito maior que para molécula 4, e, mesmo sendo interações intermoleculares mais fracas, são importantes para a afinidade do ligante. A partir disso, pode-se sugerir modificações moleculares para melhorar a afinidade da molécula 3 pela enzima IMPDH C_p .

5.2.3 Propostas de Modificações Moleculares Baseadas no Docking Molecular

Os estudos iniciais de *docking* resultaram em duas moléculas teoricamente mais seletivas para a IMPDH C_p . A partir desses resultados foram propostas modificações que geraram cinco novas moléculas utilizando a estratégia da interconversão de grupos funcionais (Figura 21).

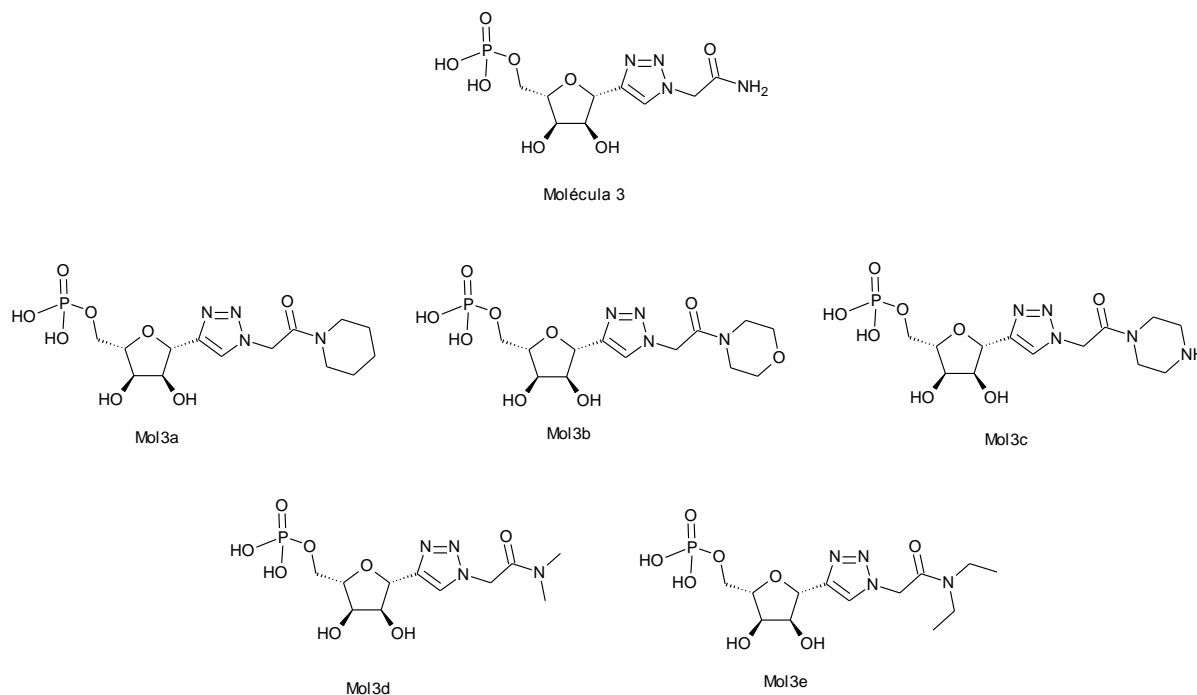


Figura 21. Moléculas propostas com modificações moleculares a partir da molécula 3 (série das moléculas monofosfatadas).

5.2.4 Docking Molecular das Moléculas Propostas

As moléculas mais seletivas a partir do *docking* molecular foram as moléculas 3 e 4. A molécula 3 sendo a de maior valor de média de *score* foi modificada para observar se poderia apresentar maior seletividade teórica pela enzima do IMPDH C_p . A proposta seria induzir a interação com o resíduo de glutamato (GLU 329) que foi

identificado como resíduo não conservado na IMPDH_{Cp}, buscando também interagir com os resíduos nas vizinhanças do sítio catalítico.

Na figura 22, observa-se um gráfico da média de valores de *scores* das moléculas desse estudo e as moléculas modificadas a partir da molécula 3. É possível observar que a diferença de média é muito pequena entre as moléculas 3 e 4. Porém, ao compararmos a diferença de afinidade teórica pela enzima IMPDH_h é possível notar que há maior afinidade da molécula 3 pela IMPDH_{Cp} do que pela IMPDH_h. Esse dado levou à proposição de modificações moleculares na molécula 3, levando à obtenção de análogos com maior potencial de seletividade para a IMPDH_{Cp}.

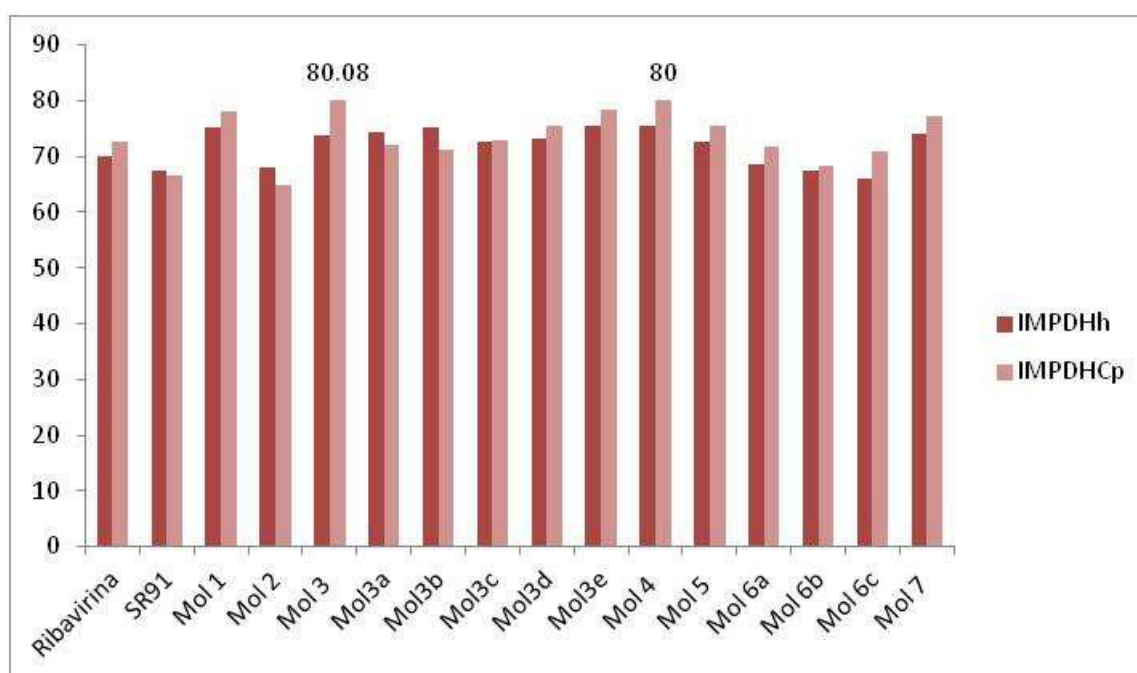


Figura 22. Médias dos valores de *Fitness Score* obtidas por 5 corridas de *docking* das moléculas monofosfatadas e moléculas monofosfatadas modificadas deste estudo com IMPDH_{Cp} e IMPDH_h.

Na série de moléculas monofosfatadas, as moléculas 3 e 4, que possuem um grupo amida e outro hidrazina, respectivamente, se destacaram como provavelmente mais seletivas para a IMPDH de *Cryptosporidium*. Para ambas as séries observou-se que o número interações por ligações hidrogênio e VDW parecem ser um dos fatores que mais influenciam a afinidade teórica para as enzimas.

5.2.4.1 Análise do docking moléculas com as moléculas propostas

Na série das moléculas propostas, foram analisadas apenas moléculas monofosfatadas devido às melhores interações observadas anteriormente. Na figura 23, A, observa-se que a molécula 3a faz interações do tipo ligações de hidrogênio com a enzima IMPDHh. Os resíduos LEU 389, SER 388, GLY 387, SER 329, GLY 366, ILE 367 e TYR 411 fazem ligações de hidrogênio com os oxigênios do grupo fosfato. Além disso, observaram-se ligações de hidrogênio envolvendo o oxigênio da cadeia lateral da SER 68 e as hidroxilas das posições 3 e 4 da pentose, o nitrogênio da amida do GLN 441 e o oxigênio do anel morfolina, e o grupamento carboxilato da cadeia lateral da ASP 364 com a hidroxila da posição 4 da pentose (Figura 23, A).

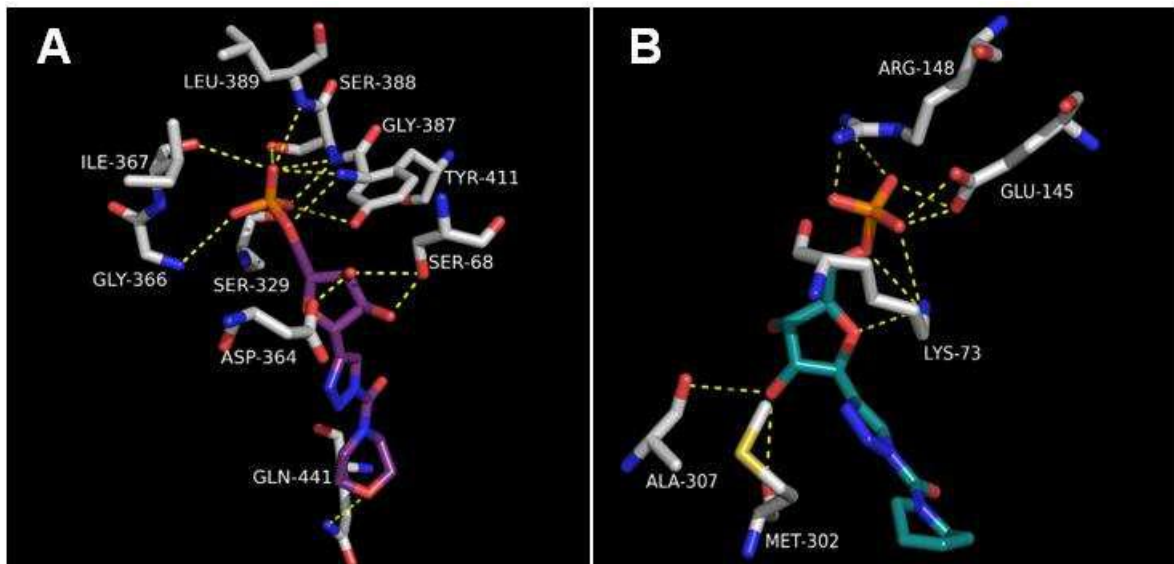


Figura 23. Melhor modo de ligação obtido para a molécula 3 modificada (Mol3a - C = roxo) com IMPDHh (A) e com IMPDHcp (Mol3a - C = verde escuro) (B). As ligações de hidrogênio tracejadas (amarelas), interagindo com resíduos (átomos de carbono em cinza). Os átomos de hidrogênio foram omitidos para uma melhor visualização.

Com IMPDHcp e a molécula 3a (Figura 23, B), também foi observada a rede de ligações de hidrogênio, envolvendo ARG 148, GLU 145 e LYS 73 e o grupo fosfato. LYS 73 também faz ligação de hidrogênio com o oxigênio do anel pentose na posição 1 e com o oxigênio do éster fosfato. Além disso, observou-se ligação de hidrogênio envolvendo o oxigênio da carbonila do esqueleto peptídico de ALA 307 e a hidroxila na posição 3 da pentose, o mesmo tendo sido observado com MET 302.

A molécula 3a teve mais afinidade teórica pela enzima humana do que para a enzima de *Cryptosporidium* provavelmente pelo maior número de ligações de

hidrogênio na cavidade interna do sítio ativo da IMPDHh , enquanto que para a IMPDH C_p esse numero de interações foi menor. Além disso, uma maior contribuição pode ser pelo maior numero de interações de VDW com os resíduos da IMPDHh ILE 330, THR 333, GLY 442, CYS 331, SER 276, GLY 413, GLY 328 e GLY 365, enquanto que para a IMPDH C_p foi observado esse tipo de interação apenas com ASP 163.

Na figura 24, A podem ser observados os resíduos da IMPDHh que interagem com a mol3b. GLN 441 faz uma ligação de hidrogênio com o oxigênio da morfolina através do grupo amino da amida da cadeia lateral. A rede de ligações de hidrogênio envolvendo o grupo fosfato do ligante é composta por SER 329, TYR 411, SER 388, LEU 389 ILE 367 e GLY 387. Esse último aminoácido também faz ligação de hidrogênio com o oxigênio do grupo éster fosfato. Além disso, a hidroxila da cadeia lateral da SER 68 faz interação com os oxigênios das hidroxilas nas posições 3 e 4 da pentose, o mesmo ocorrendo com ASP 364.

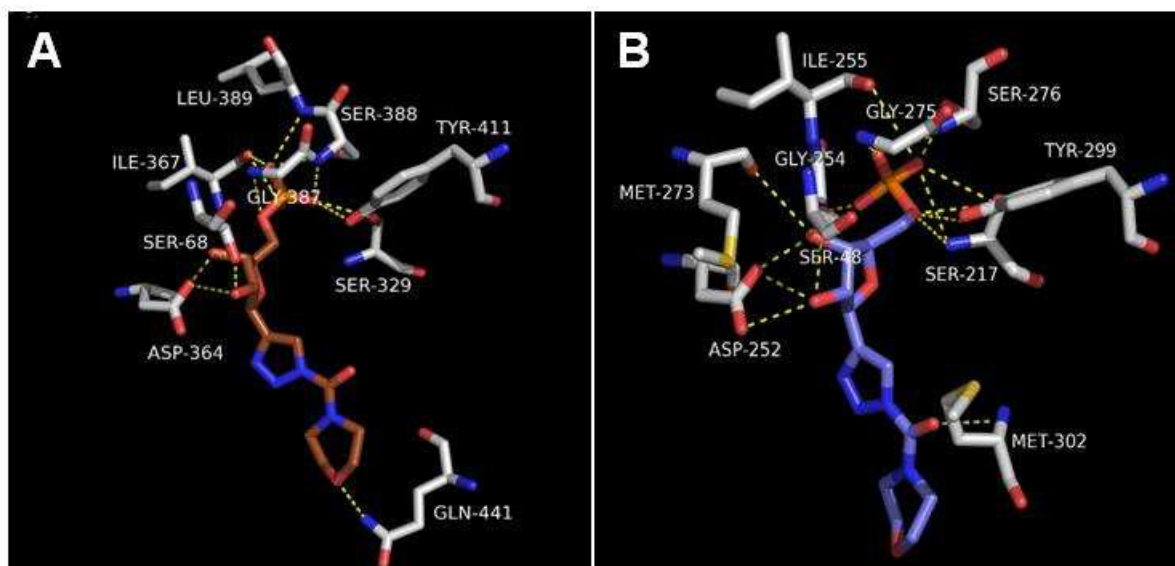


Figura 24. Melhor modo de ligação obtido para a molécula 3 modificada (Mol3b - C = marrom) com IMPDHh (A) e com IMPDH C_p (Mol3b – C = azul claro) (B). As ligações de hidrogênio tracejadas (amarelas), interagindo com resíduos (átomos de carbono em cinza). Os átomos de hidrogênio foram omitidos para uma melhor visualização.

Vários resíduos do sítio ativo da enzima IMPDH C_p (Figura 24, B) fazem interação por ligação de hidrogênio com a molécula 3b, mostrando um maior número de interações do que com a humana. Entretanto, isso não parece favorecer a interação com a IMPDH C_p , provavelmente devido ao maior numero de interações de VDW com os resíduos SER 276, GLY 415, GLY 442, PRO 69, ILE 330, GLY 328 da

enzima humana, enquanto que para a enzima do *Cryptosporidium* são observadas interações apenas com os resíduos SER 48, CYS 219, MET 50, ALA 165 e ILE 218.

As interações por ligação de hidrogênio que a IMPDH_{Cp} (Figura 24, B) faz com a molécula 3b são com MET 302, em que a amina do esqueleto peptídico interage com a carbonila da amida próximo ao anel morfolínico. O grupo carboxilato da ASP 252 faz interação com as hidroxilas das posições 3 e 4 ligadas à pentose e a carbonila do esqueleto peptídico de MET 273 faz ligação de hidrogênio com a hidroxila na posição 4 da pentose e a hidroxila da cadeia lateral de SER 217 faz quatro interações envolvendo o oxigênio do grupo éster fosfato e oxigênios do grupo fosfato. Nessa rede de interações com o fosfato também estão envolvidos os resíduos TYR 299, SER 276, GLY 275, ILE 255 e GLY 254.

Na figura 25, A, podem ser observadas interações por ligação de hidrogênio entre LEU 389, ILE 367, GLY 366, GLY 387, SER 388, SER 329 e TYR 411 e o grupo fosfato da molécula **3c**. Interações adicionais desse tipo envolvem a hidroxila da cadeia lateral de SER 68 e as hidroxilas nas posições 3 e 4 ligadas à pentose; entre o grupo carboxilato da cadeia lateral de ASP 364 e a hidroxila ligada ao carbono na posição 3 da pentose e, finalmente, entre a hidroxila da cadeia lateral da THR 333 e o nitrogênio do anel piperazina.

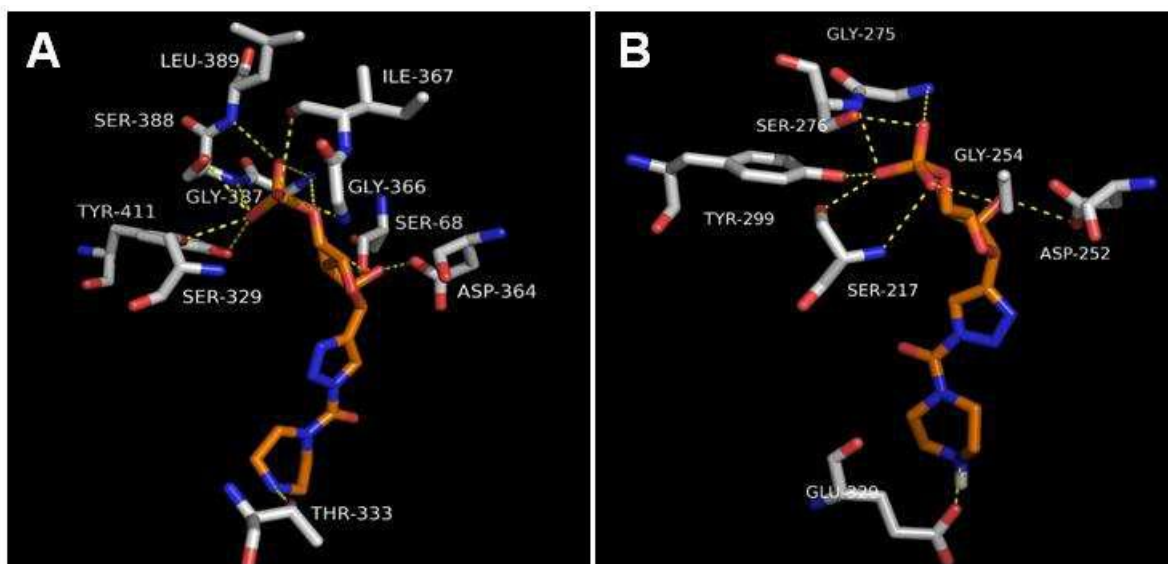


Figura 25. Melhor modo de ligação obtido para a molécula 3 modificada (Mol3c – C = laranja) com IMPDH_h (A) e com IMPDH_{Cp} (Mol3b – C = laranja) (B). As ligações de hidrogênio tracejadas (amarelas), interagindo com resíduos (átomos de carbono em cinza). Os átomos de hidrogênio foram omitidos para uma melhor visualização.

Nos estudos com a enzima do *Cryptosporidium* e a molécula 3c (Figura 25, B) observa-se uma rede de ligações de hidrogênio entre os resíduos SER 276, GLY 254, GLY 275, TYR 299 e SER 217 e o grupo fosfato. Além disso, o carboxilato da cadeia lateral de ASP 252 faz uma ligação de hidrogênio com a hidroxila na posição 3 da pentose e, conforme planejado, o átomo de nitrogênio protonado da piperazina, interage com o resíduo GLU 329. Entretanto, cabe ressaltar que a molécula 3c foi a de menor média de *score* dentre as moléculas propostas, o que ocorre, provavelmente, pelo menor número de ligações de hidrogênio na cavidade mais interna do sitio ativo. Além disso, o número de resíduos contribuindo por interações de VDW com a molécula 3c na IMPDH C_p (MET 302, ALA 165, THR 221, GLY 303, GLY 216, MET 50 e ILE 218) é menor do que para IMPDH h (GLY 442, ILE 332, SER 416, SER 276, GLY 415, MET 414, ARG 322, ILE 330 e GLY 328).

Na figura 26, A, podem ser observadas interações por ligação de hidrogênio entre os resíduos da IMPDH h LEU 389, SER 388, GLY 387, SER 329, ILE 367 e TYR 411, com o grupo fosfato da molécula 3d. Adicionalmente, a hidroxila da cadeia lateral de SER 68 faz interação com as hidroxilas nas posições 3 e 4 da pentose e o grupo carboxilato da ASP 364 faz ligação de hidrogênio com a hidroxila da posição 3 da pentose.

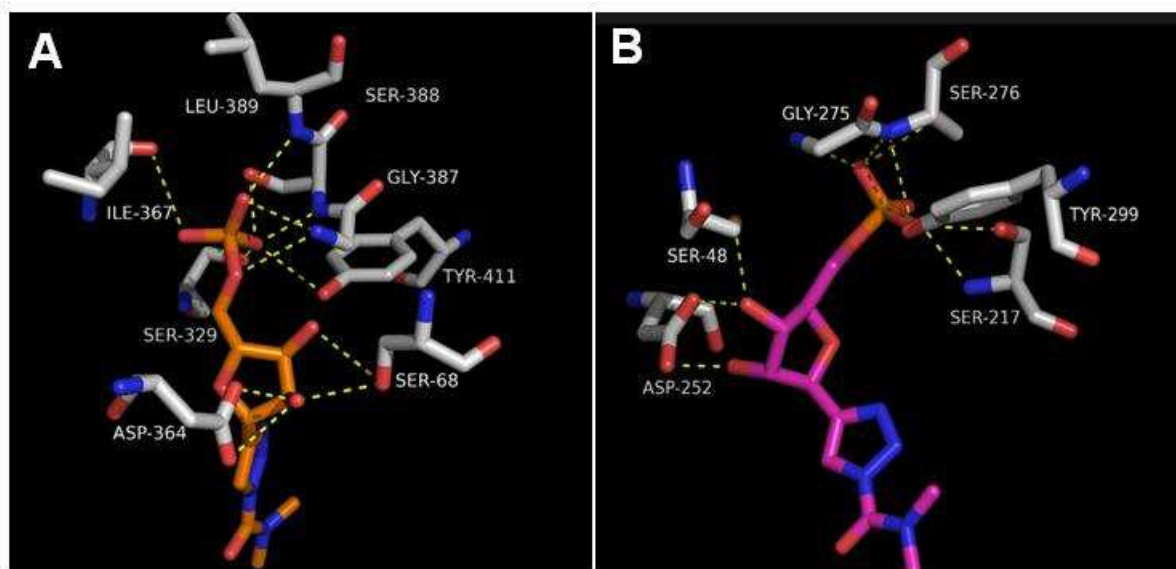


Figura 26. Melhor modo de ligação obtido para a molécula 3 modificada (Mol3d – C = laranja) com IMPDH h (A) e com IMPDH C_p (Mol3d – C = rosa) (B). As ligações de hidrogênio tracejadas (amarelas), interagindo com resíduos (átomos de carbono em cinza). Os átomos de hidrogênio foram omitidos para uma melhor visualização.

A molécula 3d, entre as moléculas propostas, foi a segunda melhor para a IMPDH C_p . Na Figura 23B, pode ser observada uma rede de ligações de hidrogênio envolvendo SER 276, GLY 254, SER 217, GLY 275 e TYR 299 e o grupo fosfato. Adicionalmente, o carboxilato da cadeia lateral da ASP 252 faz uma ligação de hidrogênio com a hidroxila na posição 3 da pentose e a hidroxila da cadeia lateral de SER 48 faz uma interação com o oxigênio na posição 4 da pentose.

O numero de resíduos da IMPDH C_p (THR 221, ILE 218, MET 302, GLY 301, GLY 303, GLY 330, SER 304, MET 50, ILE 274, GLY 216) que fazem interações de VDW com a molécula 3d é muito maior do que os resíduos da IMPDH h (THR 333, GLY 442, GLN 441, GLY 415, ILE 330, MET 414). O que parece suportar a hipótese de que essas interações têm boa influência sobre a afinidade teórica.

Na figura 27A podem ser observadas ligações de hidrogênio entre os resíduos LEU 389, SER 388, GLY 387, TYR 411 e ILE 367 da enzima IMPDH h e o grupo fosfato da molécula 3e. Adicionalmente, a hidroxila da cadeia lateral de SER 68 faz interação com as hidroxilas ligadas à pentose nas posições 3 e 4 e o grupo carboxilato da cadeia lateral do ASP 364 faz interação com a hidroxila ligada à posição 3 da pentose.

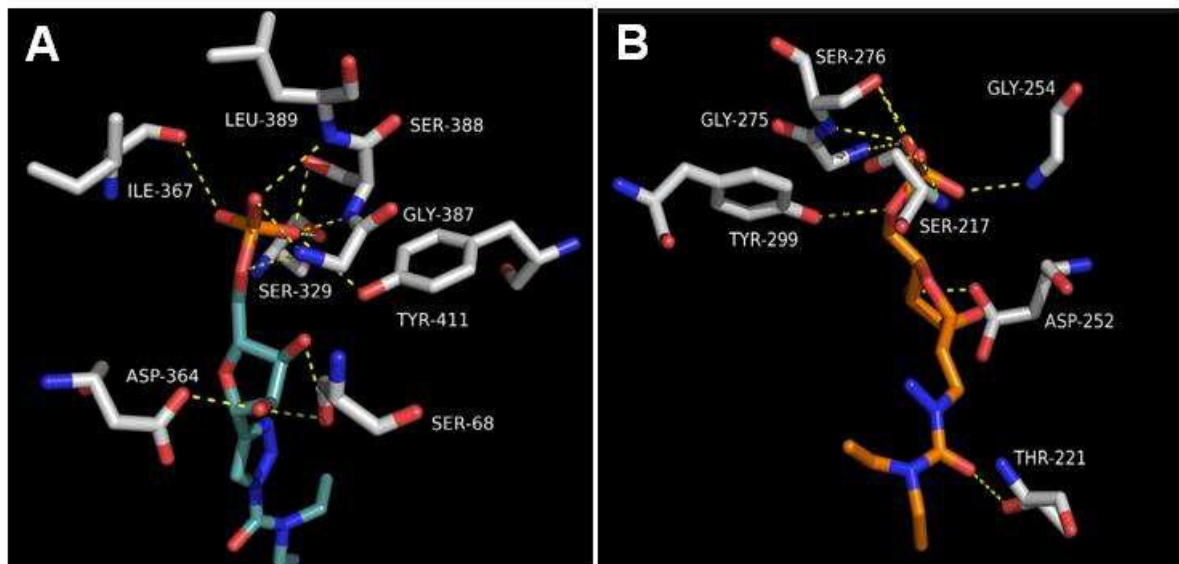


Figura 27. Melhor modo de ligação obtido para a molécula 3 modificada (Mol3e - C = verde escuro) com IMPDH h (A) e com IMPDH C_p (Mol3e - C = laranja) (B). As ligações de hidrogênio tracejadas (amarelas), interagindo com resíduos (átomos de carbono em cinza). Os átomos de hidrogênio foram omitidos para uma melhor visualização.

A molécula 3e, que possui o grupo dietil-amida, foi a de melhor média de score para a enzima IMPDHC_p (Figura 27, B), em comparação com a IMPDHC_h. As interações da molécula 3e com a enzima de *Cryptosporidium* também envolveram uma rede de ligações de hidrogênio entre GLY 275, SER 276, GLY 254 e SER 217. A hidroxila da cadeia lateral de TYR 411 faz interação com a carbonila da dietil-amida, e o grupo carboxilato da cadeia lateral da ASP 252 faz uma ligação de hidrogênio com a hidroxila na posição 4 da pentose. As moléculas 3d e 3e interagem com a IMPDHC_p de modo bem semelhante, provavelmente por possuírem grupos dimetil-amida (3d) e dietil-amida (3e), semelhantes em termos de hidrofobicidade. A diferença está na interação com o resíduo SER 48 para a molécula 3d e os resíduos GLY 254, THR 221 E GLY 275 para a molécula 3e, o que justifica sua melhor média, provavelmente porque possui dois átomos de carbono a mais, aumentando as interações de VDW.

5.2.4.2 Comparação das moléculas propostas com a série das moléculas não fosfatadas e fosfatadas

Os resíduos que interagem com as moléculas modificadas são muito semelhantes de uma molécula para a outra, sugerindo que, primeiramente, o número de ligações de hidrogênio influencia na afinidade e, em segundo lugar, não menos importantes, as interações por VDW. A ordem decrescente de afinidade para a enzima IMPDHC_p para as moléculas propostas são mol3e > mol3d > mol3b > mol3a > mol3c.

A mol3e teve maior afinidade dentre as moléculas propostas, mas não maior que a molécula 3, monofosfatada. Os resíduos SER 217, ASP 252, GLY 254, MET 302, SER 276, TYR 299 fazem interação do tipo ligação de hidrogênio com a molécula 3 monofosfatada e esse resíduos são os mesmos de ligação com o composto bioativo de referência, a Ribavirina. Essa observação sugere que por isso a molécula 3 monofosfatada tenha maior afinidade pela enzima IMPDHC_p.

Observou-se também que alguns dos resíduos que fazem interação por VDW com a IMP foram mostrados também na interação com a molécula 3 monofosfatada (GLY 216, ILE 274, GLY 301 E ILE 218). Já em comparação com a molécula 5 da série das não monofosfatadas, a mesma não apresenta o grupamento fosfato que é de suma importância para a afinidade das moléculas desse estudo para a enzima de *Cryptosporidium* e os resíduos ASP 252, SER 48, ALA 49 e MET 302 que são os

mesmo resíduos que interagem com a IMP, mas o resíduo LYS 210 não. Além disso, as contribuições por VDW são muito menores, correspondendo apenas aos resíduos GLY 301 e ILE 218.

A mol3d que foi classificada dentre as moléculas propostas como tendo a segunda maior afinidade, tem interação com os resíduos SER 217, ASP 252, SER 276 e TYR 299, que também são encontrados no sítio ativo catalítico. Porém, SER 48 não faz parte desse sítio. Sugere-se que o fator que deve influenciar essa sua afinidade pelo sítio catalítico da IMPDH_{Cp} deve estar relacionado às interações de VDW com os resíduos THR 221, GLY 301, GLY 330, MET 50, ILE 274, GLY 216 e ILE 218, que também estão presentes na interação com IMP do *Ligplot*. Porém, não foi observada maior afinidade que para a molécula 3 da série monofosfatadas.

A molécula 3b foi classificada como a terceira de maior afinidade pela enzima de *Cryptosporidium* dentre as moléculas propostas, mas não melhor que a molécula 3 da série das monofosfatadas e muito menor que a molécula 5 da série das não fosfatadas. Os resíduos ASP 252, MET 302, SER 217, TYR 299, SER 276, GLY 275 e GLY 254 que interagem com a mol3b fazem parte do sítio catalítico ou estão próximos, como no caso da MET 273, com exceção de ILE 255. Além disso, há pequenas contribuições por VDW dos resíduos CYS 219, MET 50, ILE 218, que estão próximos ao sítio e podem contribuir para maior afinidade em relação à molécula 3, que faz interações por ligação de hidrogênio com a maioria dos resíduos do sítio ativo e tem grande contribuição pelas interações de VDW, além de ter o grupamento fosfato que a molécula 5 da série das não fosfatadas não tem.

Mol3a foi a quarta de maior afinidade dentre as moléculas propostas. Os resíduos de interação com a enzima do *Cryptosporidium* foram SER 276, GLY 254, SER 217, ASP 252, GLY 275 TYR e 299, sendo que todos fazem parte do sítio catalítico. Porém não foi uma das melhores moléculas com destaque de afinidade. Mais uma vez, as interações de VDW parecem ter grande importância na afinidade dessa molécula. Essa molécula não teve melhor afinidade comparada à molécula 3 monofosfatada, mas obteve melhor afinidade teórica que a molécula 5 não fosfatada.

A mol3c foi a quinta melhor em afinidade teórica dentre as moléculas propostas. Os resíduos de interação do tipo ligação de hidrogênio foram SER 276, GLY 254, SER 217, ASP 252, GLY 27 e TYR 299, que fazem parte do sítio catalítico. Porém, foi a menos seletiva entre as propostas, o que sugere que há outros resíduos que influenciam na afinidade teórica.

6. CONCLUSÕES

Os resultados do *redocking* da Ribavirina monofosfato e da Inosona monofosfato com a IMPDH_h e com a IMPDH_{Cp} foram satisfatórios, pois foram observadas as mesmas interações dos cristais obtidos no PDB.

Na série de moléculas não fosfatadas, destacaram-se as moléculas 5 e 3 e na série das moléculas monofosfatadas, as moléculas 3 e 4, provavelmente mais seletivas para a IMPDH de *Cryptosporidium*. A partir das médias das “corridas” de *docking*, observou-se que os valores de *fitness scores* para as moléculas 3 e 4 se destacaram na inibição de IMPDH_{Cp}. O número de ligações de hidrogênio para a molécula 3 é igual ao da molécula 4, porém o número de interações de VDW sugere maior seletividade para IMPDH_{Cp}. A investigação dos pesos dados aos *scores* para as duas enzimas mostra contribuições iguais por ligações de hidrogênio, mas um maior número de interações de VDW, e por isso a molécula 3 tem mais afinidade pela IMPDH_{Cp}.

Na comparação de todas as moléculas deste estudo com a molécula 3 da série das monofosfatadas é possível observar que os resíduos SER 276, GLY 254, ASP 252, SER 217 estão presentes, interagindo com as moléculas de melhor afinidade para a enzima IMPDH_{Cp}. Porém, os resíduos MET 302 E TYR 299 estão presentes apenas nas moléculas 4 e 3 monofosfatadas, sugerindo o desenho de novos análogos das moléculas propostas que interajam com esses resíduos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMSEN, Mitchell S. et al. Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. **Science**, v. 304, n. 5669, p. 441-445, 2004.
 - ABUBAKAR, Ibrahim I. et al. Prevention and treatment of cryptosporidiosis in immunocompromised patients. **The Cochrane Library**, 2007.
 - ACCELRY'S Software Inc., Discovery Studio 4.0, San Diego: Accelrys Software Inc., 2013.
-

- ALTSCHUL, Stephen F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- ANNAMALA, M. K., ET. AL. Docking of phosphonate and trehalose analog inhibitors into M. tuberculosis mycolyltransferase Ag85C: Comparison of the two scoring fitness functions GOLDScore and ChemScore, in the GOLD software. **Bioinformatics**, 1, 339–350 ,2007
- ARMISTEAD, David M. et al. **Inhibitors of IMPDH enzyme**. U.S. Patent n. 6,054,472, 25 abr. 2000.
- BARTA, John R.; THOMPSON, RC Andrew. What is Cryptosporidium? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. **Trends in parasitology**, v. 22, n. 10, p. 463-468, 2006.
- BERMAN, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H. & Bourne, P. E. The protein data bank. **Nucleic Acids Research**, 28(1), 235-242.
- BOUZID, Maha et al. Cryptosporidium pathogenicity and virulence. **Clinical microbiology reviews**, v. 26, n. 1, p. 115-134, 2013.
- CAO, Shinuo et al. Mycophenolic Acid, Mycophenolate Mofetil, Mizoribine, Ribavirin, and 7-Nitroindole Inhibit Propagation of Babesia Parasites by Targeting Inosine 5'-Monophosphate Dehydrogenase. **Journal of Parasitology**, 2014.
- CHEMAXON, Marvin. ChemAxon. 2013.
- CLARK, G. R., et. Al... Structure of a bis-amidinium derivative of hoechst 33258 complexed to dodecanucleotide d(CGCGAATTCGCG)₂: the role of hydrogen bonding in minor groove drug-DNA recognition. **Nucleic Acids Research**, 25, 1510-1515, 1997
- DAMARAJU, Vijaya L. et al. Role of human nucleoside transporters in the cellular uptake of two inhibitors of IMP dehydrogenase, tiazofurin and benzamide riboside. **Molecular Pharmacology**, v. 67, n. 1, p. 273-279, 2005.
- DE AZEVEDO, Jr; WALTER, F. MolDock applied to structure-based virtual screening. **Current Drug Targets**, v. 11, n. 3, p. 327-334, 2010.

- DE OLIVEIRA LOPES, Fernando Nakatani. ALGORITMOS PARA CÁLCULO DE ESTRUTURA MOLECULAR, 2011
- DEL ALAMO, J. A. et al. MIT microelectronics WebLab. **Lab on the Web**, p. 49-87, 2003.
- DELANO, Warren L. Pymol: An open-source molecular graphics tool. **CCP4 Newsletter On Protein Crystallography**, v. 40, p. 82-92, 2002.
- DEWAR, Michael JS et al. Comments on a comparison of AM1 with the recently developed PM3 method. **Journal of Computational Chemistry**, v. 11, n. 4, p. 541-542, 1990.
- DEWAR, Michael JS et al. Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. **Journal of the American Chemical Society**, v. 107, n. 13, p. 3902-3909, 1985.
- DIAS, Paulo Henrique Goulart Fernandes. Efeitos da imunossupressão com tacrolimus e micofenolato mofetil na histologia e na função renal de ratos com rim único submetidos à esquiemia e reperfusão. 2014.
- DILLINGHAM, Rebecca A.; LIMA, Aldo A.; GUERRANT, Richard L. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 10, p. 1059-1066, 2002.
- DIXIT, N. M.; PERELSON, A. S. The metabolism, pharmacokinetics and mechanisms of antiviral activity of ribavirin against hepatitis C virus. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 63(7-8), 832-42, 2006.
- DOWBOR, Ladislau. **Administrando a água como se fosse importante: gestão ambiental e sustentabilidade**. Editora Senac São Paulo, 2005.
- FAYER, R.; LEWIS, E. J.; TROUT, J. M. et al. Cryptosporidium parvum in oysters from commercial harvesting sites in the Chesapeake bay. **Emerging Infectious Diseases**. v. 5, n. 5, p. 706-710, 1999.
- FAYER, Ronald. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. **Veterinary Parasitology**, v. 126, n. 1, p. 37-56, 2004.

- FÉRES, F. C. Ocorrência e caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. em cordeiros na região de Araçatuba –SP, Avaliação da Transferência da Imunidade Passiva. 2009. Araçatuba, 70f. Dissertação (Mestrado em Ciências Animal) – Curso de Pósgraduação em Ciências Animal, Universidade Estadual Paulista, “Júlio de Mesquita Filho” campus Araçatuba-SP
- FERREIRA, Rafaela S; GLAUCIUS, Oliva; ANDRICOPULO, Adriano D. Integração das técnicas de triagem virtual e triagem biológica automatizada em alta escala: oportunidades e desafios em P&D de fármacos. **Química Nova**, São Paulo , v. 34,n. 10, p. 1770-1778, 2011.
- FIGUEIREDO, H. C. P.; PEREIRA JUNIOR, D. J.; NOGUEIRA, R. B.; COSTA, P. R. S. Excreção de oocistos de *Cryptosporidium parvum* em cães saudáveis das cidades de Lavras e Viçosa, Estado de Minas Gerais, Brasil. **Ciência Rural**, v.34, n. 5, p. 1625-1627, 2004.
- FRANCO, Regina Maura Bueno. Protozoários de veiculação hídrica: relevância em saúde pública. **Revista Panamericana de Infectologia**, v. 9, n. 4, p. 36-43, 2007
- FRIESNER, R. A., et al. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 47, p. 1739-1749, 2004.
- GELLETLIE, R.; STUART, J.; SOLTANPOOR, N. et al. *Cryptosporidium* associated with school milk. **The Lancet**, v. 350, n. 9083, p. 1005-1006, 1997.
- GONÇALVES, Elenice Messias do Nascimento et al. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium hominis* associated with diarrhea outbreak in a day care unit in São Paulo. **Clinics**, v. 61, n. 2, p. 119-126, 2006.
- GORLA, Suresh Kumar et al. Validation of IMP dehydrogenase inhibitors in a mouse model of cryptosporidiosis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 3, p. 1603-1614, 2014.
- GUEX, Nicolas; PEITSCH, Manuel C. SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, v. 18, n. 15, p. 2714-2723, 1997.

- HAGEN, Ralf Matthias; LODERSTAEDT, U.; FRICKMANN, H. An evaluation of the potential use of *Cryptosporidium* species as agents for deliberate release. **Journal of the Royal Army Medical Corps**, p. jramc-2013-000186, 2013.
- HALL, Tom A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: **Nucleic Acids Symposium Series**. 1999. p. 95-98.
- HEDSTROM, Lizbeth. IMP dehydrogenase: mechanism of action and inhibition. **Current Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 545-560, 1999.
- HLAVSA, M. C. et al. Surveillance for waterborne disease outbreaks and other health events associated with recreational water---United States, 2007--2008. **Morbidity and mortality weekly report. Surveillance Summaries (Washington, DC: 2002)**, v. 60, n. 12, p. 1-32, 2011.
- HUGHES-HANKS, J. M.; RICKARD, L. G.; PANUSKA, C. et al. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp in five marine species. **The Journal of Parasitology**, v. 91, n. 5, p. 1255-1228, 2005.
- IUBMB. Disponível em: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/reaction/misc/purine3.html> .Acesso em: 20 de julho. 2001.
- JOHNSON, D. C.; REYNOLDS, K. A.; GERBA, C. P. et al. Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* genotypes in marine waters. **Water Science and Technology**. v. 31, n. 5-6, p. 439-442, 1995.
- JOHNSON, J.; BUDDLE, R.; REID, S. et al. Prevalence of *Cryptosporidium* genotypes in pre and post-weaned pigs in Australia. **Experimental Parasitology**. v. 119, n. 3, p. 418-421, 2008.
- JONES, Gareth et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of Molecular Biology**, v. 267, n. 3, p. 727-748, 1997.
- KAMAR, N. et al. Renal function and histology in kidney transplant patients receiving tacrolimus and sirolimus or mycophenolate mofetil. **Experimental and clinical transplantation: official journal of the Middle East Society for Organ Transplantation**, v. 4, n. 2, p. 532-536, 2006.

- KAPLAN, Jonathan E. et al. Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents. **MMWR Recomm Rep**, v. 58, n. RR-4, p. 1-207, 2009.
 - KARANIS, Panagiotis; KOURENTI, Christina; SMITH, Huw. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. **Journal of Water and Health**, v. 5, n. 1, p. 1-38, 2007.
 - KAWASAKI, Yukihiro. Mizoribine: a new approach in the treatment of renal disease. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2009, 2009.
 - KOTLOFF, Karen L. et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. **The Lancet**, v. 382, n. 9888, p. 209-222, 2013.
 - KUBINYI, Hugo. Success stories of computer-aided design. **Computer Applications in Pharmaceutical Research and Development**, v. 2, p. 377, 2006.
 - MAC KENZIE, William R. et al. A massive outbreak in Milwaukee of Cryptosporidium infection transmitted through the public water supply. **New England Journal of Medicine**, v. 331, n. 3, p. 161-167, 1994.
 - MACPHERSON, Iain S. et al. The structural basis of Cryptosporidium-specific IMP dehydrogenase inhibitor selectivity. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 4, p. 1230-1231, 2010.
 - MAHMOUDI, M. R. et al. Development of sensitive detection of Cryptosporidium and Giardia from surface water in Iran. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 6, n. 3, p. 43, 2011.
 - MAJD, Nazanin et al. A Novel Therapeutic Target for Treatment of Malignant Brain Tumors (P7. 268). **Neurology**, v. 82, n. 10 Supplement, p. P7. 268-P7. 268, 2014.
-
- MILLARD, P. S.; GENSHEIMER, K. F.; ADDISS, D. G. et al. An outbreak of cryptosporidiosis from fresh-pressed apple cider, **Journal of the American Medicine Association**, v. 272, n. 10, p. 1592-1196, 1994.

- MONGE, R.; CHINCHILLA, M. Presence of *Cryptosporidium* oocysts in fresh vegetables. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 2, p. 202- 203, 2003.
- MORGAN-RYAN, UNA M. et al. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 49, n. 6, p. 433-440, 2002.
- NEWMAN, Robert D. et al. Household epidemiology of *Cryptosporidium parvum* infection in an urban community in northeast Brazil. **Annals of Internal Medicine**, v. 120, n. 6, p. 500-505, 1994.
- NISSINK, J. Willem M. et al. A new test set for validating predictions of protein–ligand interaction. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 49, n. 4, p. 457-471, 2002.
- NORONHA, I.L. et al. Micofenolato mofetil (MMF) em transplante de órgãos, **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, São Paulo, v.19, n.4, p. 398-406, 1997.
- O'CONNOR, Roberta M. et al. Cryptosporidiosis in patients with HIV/AIDS. *Aids*, v. 25, n. 5, p. 549-560, 2011.
- OLBOYLE, Noel M. et al. Open Babel: An open chemical toolbox. **Journal of Cheminformatics**, v. 3, p. 33, 2011
- PANTENBURG, Birte; CABADA, Miguel M.; WHITE JR, A. Clinton. Treatment of cryptosporidiosis. **Expert Review of anti-infective therapy**, v. 7, n. 4, p. 385-391, 2009.
- PANTOJA, Eduarda Ozorio; DE AZEVEDO JUNIOR, Walter Figueira. Uso de abordagens in silico para identificação de inibidores da enzima acetilcolina esterase (EC 3.1. 1.7), 2011
- PIMKIN, Maxim; PIMKINA, Julia; MARKHAM, George D. A regulatory role of the Bateman domain of IMP dehydrogenase in adenylate nucleotide biosynthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 12, p. 7960-7969, 2009.
- REHG, J. New potential therapies for cryptosporidiosis: an analysis of variables affecting drug efficacy. **Folia Parasitologica**, v. 41, n. 1, p. 23-26, 1993.

- REIS, Esther Camilo dos. Docking e análise do modo de ligação de três moléculas pequenas, um benzimidazol e dois compostos de crômio, nos sulcos do DNA 5'-CGCGAATTCGCG-3'. 2008. xii, 84 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências de Bauru, 2008
 - RODRIGUES, Ricardo P. et al. Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, p. 739-776, 2012.
-
- ROSALES, M. J. et al. Extracellular like-gregarine stages of *Cryptosporidium parvum*. **Acta tropica**, v. 95, n. 1, p. 74-78, 2005.
 - ROSSIGNOL, Jean-François et al. Effect of Nitazoxanide in Diarrhea and Enteritis Caused by *Cryptosporidium* Species. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 4, n. 3, p. 320-324, 2006.
 - SANTOS FILHO, Osvaldo Andrade; ALENCASTRO, Ricardo Bicca de. Modelagem de proteínas por homologia. **Química Nova**, v. 26, n. 2, p. 253-259, 2003.
 - SCHULZ-GASCH, Tanja; STAHL, Martin. Scoring functions for protein-ligand interactions: a critical perspective. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 1, n. 3, p. 231-239, 2004.
 - SELASSIE, C. D.; ABRAHAM, D. J. Burger's medicinal chemistry and drug discovery. **Drug Discovery**, v. 1, 2003.
 - SHARLING, Lisa et al. A screening pipeline for antiparasitic agents targeting *Cryptosporidium* inosine monophosphate dehydrogenase. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 8, p. e794, 2010.
 - SHU, Qingning; NAIR, Vasu. Inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) as a target in drug discovery. **Medicinal Research Reviews**, v. 28, n. 2, p. 219-232, 2008.
 - STEWART, J. J. P. Optimization and Application of Magnesium Parameters for PM3. **Journal of Computational Chemistry**, v. 12, p. 320-328, 1991.
-
- STUDIO, Discovery. Accelrys Inc. **San Diego, CA, USA**, 2013.

- TANAKA, Hiroshi; TSURUGA, Kazushi; IMAIZUMI, Taddatsu. Mizoribine in the treatment of pediatric-onset glomerular disease. **World Journal of Pediatrics**, v. 11, n. 2, p. 108-112, 2015.
- THOMPSON, R. C. A. et al. Cryptosporidium and cryptosporidiosis. **Advances in parasitology**, v. 59, p. 77-158, 2005.
- THOMPSON, R. C. A.; PALMER, C. S.; O'HANDLEY, R. The public health and clinical significance of Giardia and Cryptosporidium in domestic animals. **The Journal Veterinary**, v. 177, n. 1, p. 18-25, 2008.
- TZIPORI, S.; WIDMER, G. A hundred-year retrospective on cryptosporidiosis. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 4, p. 184-189, 2008.
- TZIPORI, Saul; WARD, Honorine. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 10, p. 1047-1058, 2002.
- UMEJIEGO, Nwakaso N. et al. Cryptosporidium parvum IMP Dehydrogenase IDENTIFICATION OF FUNCTIONAL, STRUCTURAL, AND DYNAMIC PROPERTIES THAT CAN BE EXPLOITED FOR DRUG DESIGN. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 39, p. 40320-40327, 2004.
- VERDONK, Marcel L. et al. Improved protein–ligand docking using GOLD. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 52, n. 4, p. 609-623, 2003.
- VITALE, Marco et al. IMP dehydrogenase inhibitor, tiazofurin, induces apoptosis in K562 human erythroleukemia cells. **Cytometry**, v. 30, n. 1, p. 61-66, 1997.
- WU J. Z.; Larson, G.; Walker, H.; Shim, J. H.; Hong, Z. Phosphorylation of ribavirin and viramidine by adenosine kinase and cytosolic 5'-nucleotidase II: Implications for ribavirin metabolism in erythrocytes. **Antimicrobial Agents Chemotherapy** v. 49, n. 6, p. 2164-71, 2005.
- XIAO, Lihua; FAYER, Ronald. Molecular characterisation of species and genotypes of Cryptosporidium and Giardia and assessment of zoonotic transmission. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 11, p. 1239-1255, 2008.

- YOKOTA, Shumpei. Mizoribine: mode of action and effects in clinical use. **Pediatrics International**, v. 44, n. 2, p. 196-198, 2002.