

Artigo

Toxoplasmose: Perspectivas no Estudo de Novos Alvos Terapêuticos**Mancini, D. T.; Assis, L. C.; Ramalho, T. C.;*** da Cunha, E. F. F.; França, T. C. C.

Rev. Virtual Quim., 2012, 4 (4), 434-455. Data de publicação na Web: 13 de agosto de 2012

<http://www.uff.br/rvq>**Toxoplasmosis: Perspectives on the Study of New Therapeutic Targets**

Abstract: *Toxoplasma gondii* is an intracellular parasite responsible for causing the disease known as toxoplasmosis. This protozoan is easily found in nature and can cause infections in birds and mammals. Currently the toxoplasmosis treatment presents some limitations since the drugs used show low efficiency and can cause serious side-effects. Based on these therapeutic limitations arises the need for design and discovering more potent and selective new drugs against toxoplasmosis. In this context, the computational medicinal chemistry has been used as an important tool in the discovery of new therapeutic targets in the causative agents of several diseases, including toxoplasmosis. This work aims to quickly discuss some new molecular targets such as adenosine kinase, dihydrofolatereductase and thymidylate synthase enzymes, which have been exploited by computational techniques (*docking* and comparative modeling) in order to direct the planning of new drugs against toxoplasmosis.

Keywords: Toxoplasmosis; computational chemistry; therapeutic targets.

Resumo

O *Toxoplasma gondii* é um parasita intracelular responsável por causar a doença conhecida como Toxoplasmose. Esse protozoário é facilmente encontrado na natureza e pode causar infecções em aves e mamíferos. O tratamento da toxoplasmose apresenta algumas limitações uma vez que os medicamentos utilizados apresentam uma baixa eficiência e podem causar graves efeitos colaterais. Com base nestas limitações terapêuticas surge a necessidade do planejamento e descoberta de novos fármacos mais potentes e seletivos contra a toxoplasmose. Neste contexto, a química medicinal computacional vem sendo utilizada como uma importante ferramenta para a descoberta de novos alvos terapêuticos em agentes causadores de diversas doenças, inclusive a toxoplasmose. O presente trabalho tem como objetivo apresentar e discutir alguns desses alvos moleculares, como as enzimas adenosina quinase, di-hidrofolato redutase e timidilato sintase, que foram estudadas por técnicas computacionais (ancoramento molecular e modelagem comparativa) com o intuito de direcionar o planejamento de novos fármacos contra a toxoplasmose.

Palavras-chave: Toxoplasmose; química computacional; alvos terapêuticos.

* Universidade Federal de Lavras, Departamento de Química, Laboratório de Química Computacional, CEP: 37200-000, Lavras-MG, Brasil.

✉ teo@dqi.ufla.br

DOI: [10.5935/1984-6835.20120033](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20120033)

Toxoplasmose: Perspectivas no Estudo de Novos Alvos Terapêuticos

Daiana T. Mancini,^a Leticia C. Assis,^a Teodorico C. Ramalho,^{a,*} Elaine F. F. da Cunha,^a
Tanos C. C. França^b

^aUniversidade Federal de Lavras, Departamento de Química, Laboratório de Química Computacional, CEP: 37200-000, Lavras-MG, Brasil.

^bInstituto Militar de Engenharia, Laboratório de Modelagem Aplicada a Defesa Química e Biológica, CEP: 22290-270, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

* teo@dqi.ufla.br

Recebido em 23 de junho de 2012. Aceito para publicação em 10 de agosto de 2012

1. Toxoplasmose

- 1.1. Ciclo biológico do *T. gondii*
- 1.2. Transmissão e Infecção
- 1.3. Diagnóstico e Tratamento

2. Materiais e métodos

- 2.1. Modelagem por homologia
- 2.2. Estudos por ancoramento molecular

3. Resultados e discussão

- 3.1. Modelagem por homologia das enzimas *TgDHFR* e *TgTS*
- 3.2. Estudos por ancoramento molecular entre análogos de pirimidina e as enzimas *TgDHFR* e *TgTS*
- 3.3. Estudos por ancoramento molecular entre análogos da benziltioinosina e a enzima adenosina quinase de *T. gondii*
- 3.4. Proposta de um novo candidato a fármaco contra Toxoplasmose

4. Considerações Finais

1. Toxoplasmose

A toxoplasmose é uma das zoonoses mais comuns em todo o mundo.¹ Estima-se que a soro prevalência desta enfermidade na população humana adulta no Brasil esteja entre 50 e 83%.² É uma doença causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, descoberto quase ao mesmo tempo por Nicolle e Manceaux, na Tunísia,³ e por Splendore, no Brasil, em 1908.³

O *T. gondii* é um protozoário intracelular pertencente ao filo Apicomplexa, responsável por causar infecção em grande parte dos mamíferos e pássaros no mundo todo.⁴ Sua distribuição é

influenciada por fatores climáticos, socioeconômicos, hábitos culturais e regiões geográficas.^{5,6}

O parasita apresenta diferentes formas durante o seu ciclo biológico, como: taquizoítos, bradizoítos e oocistos. Os taquizoítos caracterizam-se na forma proliferativa presente durante a fase aguda da infecção, enquanto que os bradizoítos, denominados formas císticas, são encontrados durante a fase crônica da infecção. Já os oocistos são produzidos nas células intestinais dos felinos e eliminados imaturos junto com as fezes.⁷

1.1. Ciclo biológico do *T. gondii*

O ciclo biológico do *T. gondii* é do tipo heteroxeno⁸, pois ocorre em duas fases distintas: sexuada e assexuada (Figura 1). É um ciclo bastante complexo e necessita de dois tipos de hospedeiro: o intermediário e o definitivo.⁹

Os hospedeiros definitivos são os felinos, geralmente os gatos, que são infectados principalmente pela ingestão de carne de animais contaminados pelo parasita.¹⁰

No organismo do felino o cisto tissular infectante reproduz-se sexuadamente formando ovos chamados oocistos que são excretados através das fezes para o meio ambiente. Após algum tempo em condições propícias, esses oocistos sofrem esporulação, tornando-se infectantes.¹⁰ Esse ciclo ocorre somente no epitélio do intestino delgado dos felinos.¹⁰ Portanto um gato jovem e não imune, contaminado pelas formas infectantes do protozoário, desenvolverá o ciclo sexuado.^{11,12}

Os hospedeiros intermediários são todos os outros animais domésticos e silvestres, inclusive o homem.⁹ Os humanos contraem a infecção através da

ingestão de oocistos maduros contendo esporozoítos, bradizoítos ou taquizoítos. Os oocistos podem ser encontrados na água, alimentos contaminados e/ou carne crua.^{11,12}

Algumas horas após serem ingeridas, as formas infectantes já estão no interior das células do novo hospedeiro, iniciando o processo de reprodução assexuada por endodiogenia (uma forma específica de divisão assexuada na qual duas células filhas são formadas no interior da célula-mãe),¹⁰ e produzindo novos taquizoítos (fase proliferativa), que são liberados através da ruptura da célula parasitada, e invadem novas células. Essa difusão do parasita no organismo acontece através de taquizoítos livres na linfa ou no sangue que acarretarão um quadro polissintomático, cuja gravidade depende da quantidade de formas infectantes adquiridas do protozoário e da sensibilidade do hospedeiro.^{11,12}

A fase aguda da doença é caracterizada pela fase inicial da infecção. Nesta etapa, a evolução poderá levar à morte do hospedeiro, principalmente fetos ou indivíduos com o sistema imunológico comprometido, podendo diminuir e cessar pelo aparecimento da resposta imune específica.^{11,12}

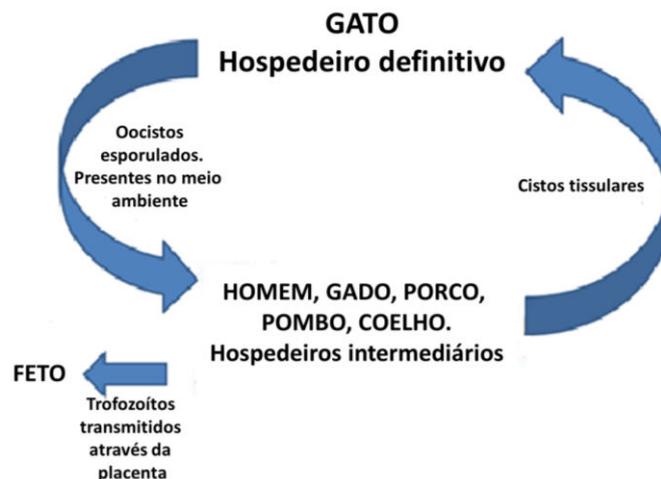


Figura 1. Ciclo de vida do *T. gondii*

1.2. Transmissão e infecção

A transmissão da doença pode ocorrer pela ingestão de carnes cruas ou mal cozidas contendo os cistos do parasita, pelo consumo de água e/ou comida contaminadas com o oocisto¹³ e por transmissão da gestante ao feto, conhecida como forma congênita.^{14,15}

A infecção nos humanos ocorre na maioria dos

casos sem sintomas reconhecidos. Entretanto, quando o paciente tem as defesas imunológicas diminuídas, os sintomas da doença podem se manifestar.^{13,16} Em pacientes com AIDS, a encefalite causada pelo protozoário é a causa mais comum de lesão do sistema nervoso central.^{17,18}

No período da gravidez, a infecção pelo *T. gondii* pode acarretar sérios problemas, como aborto, malformação neonatal, morte neonatal ou deficiência

congenita grave.^{19,20} No Brasil, estudos com pacientes grávidas revelam uma soro prevalência que varia de 42% a 90%, em que o risco de infecção fetal é menor no primeiro trimestre e maior no terceiro trimestre gestacional.^{21,22}

Grande parte das infecções congênitas é assintomática, ou seja, as crianças no momento do nascimento não apresentam sintomas, porém, os neonatos infectados podem apresentar sequelas em algum momento da vida, principalmente complicações do tipo ocular (retinocoroidite) ou do sistema nervoso central.²³

1.3. Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico da toxoplasmose é bastante complicado, já que os sinais clínicos e sintomas são variados e imitam os de uma variedade de outras doenças.^{20,24} Métodos sorológicos são frequentemente utilizados para se diagnosticar a doença, porque permitem detectar a presença de imunoglobulinas anti-*T.gondii* (IgG, IgM, IgA) que aparecem após a infecção.²⁵

Elevados níveis de IgG no sangue, indicam que o paciente já foi exposto ao parasita, porém não é possível diferenciar entre uma infecção recente ou uma infecção que ocorreu no passado, pois este anticorpo persistirá em um nível baixo ao longo da vida do paciente. Já a presença do anticorpo IgM

confirma uma infecção aguda e o seu grau de elevação pode ser utilizado para diferenciar quando ocorreu a infecção pelo parasita.^{26,27}

Os fármacos mais utilizados atualmente para o tratamento da toxoplasmose são a pirimetamina (que é um análogo da pirimidina) (Daraprim®), a sulfadiazina (Triglobe®), o trimetoprima-sulfametoxazol (Bactrim®) e a clindamicina (Dalacin®) (Figura 2).²⁸⁻³⁰ A pirimetamina e a trimetoprima agem inibindo a ação da enzima di-hidrofolato redutase (DHFR), importante para a biossíntese de DNA e RNA.^{31,32} As sulfonamidas inibem a enzima di-hidropteroato sintase (DHPS),^{33,34} ou seja, são análogos estruturais e antagonistas competitivos do ácido *p*-aminobenzóico (PABA), que é utilizado pelos parasitas para a biossíntese do ácido fólico.^{33,35} Já a clindamicina inibe a biossíntese proteica, ligando-se a subunidade 50S do ribossomo.³⁶

A combinação de pirimetamina e sulfadiazina apresenta uma maior atividade contra *T. gondii* do que quando esses fármacos são utilizados isoladamente.³¹ Outras sulfas podem ser utilizadas como a sulfapirazina, a sulfametazona e a sulfamerazina.³¹ Entretanto, esses fármacos utilizados para o tratamento são pouco eficientes e aproximadamente 50% dos pacientes não respondem bem à terapia.^{37,38} Além disso, podem acarretar vários efeitos colaterais. Com base neste contexto, torna-se necessária a descoberta de novos alvos terapêuticos e o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da toxoplasmose.^{37,38}

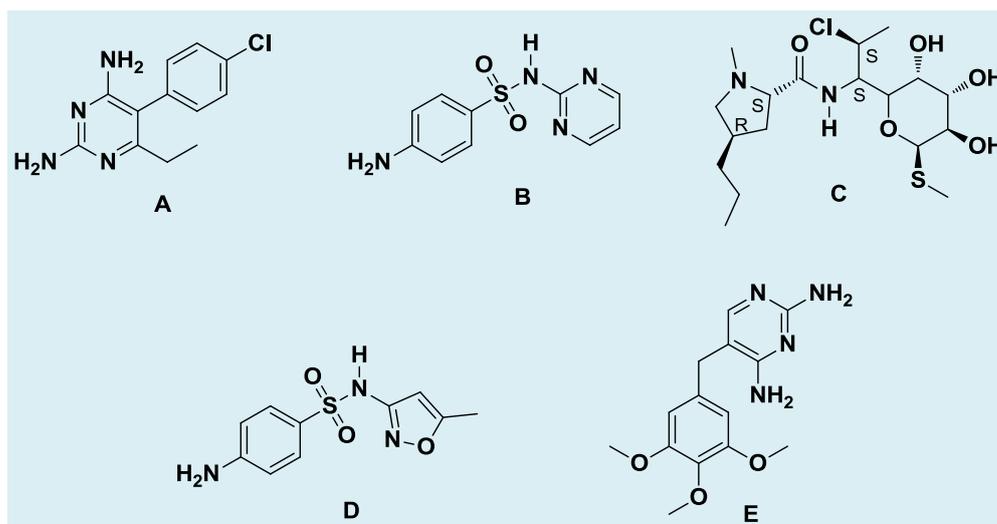


Figura 2. Estruturas químicas da pirimetamina (Daraprim®)(A), da sulfadiazina (Triglobe®)(B) da clindamicina (Dalacin®)(C), do sulfametoxazol(D) e da trimetoprima(E)

1.3.1. Alternativas para o desenvolvimento de novos fármacos contra toxoplasmose

Estudos envolvendo processos evolutivos de reconhecimento molecular em sistemas biológicos são muito importantes durante o planejamento de um fármaco, pois proporcionam o entendimento de algumas propriedades físico-químicas como potência, afinidade e seletividade. Com isso, as ferramentas biotecnológicas associadas aos métodos de química medicinal computacional ganham papel importante no desenvolvimento de novas moléculas com atividade biológica.³⁹

Atualmente algumas ferramentas teóricas vêm sendo utilizadas para propor novos alvos moleculares para o tratamento de diversas doenças. Estudos por modelagem molecular como, por exemplo: QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationship*),⁴⁰⁻⁴² Modelagem Comparativa,⁴³ Dinâmica Molecular,^{43,44} Docking,⁴⁰⁻⁴⁶ e QM/MM (*Quantum Mechanics/Molecular Mechanics*)^{45,46} vêm sendo desenvolvidos no intuito de explorar alvos moleculares (enzimas) e direcionar o planejamento de novos candidatos a fármacos mais potentes e seletivos para o tratamento de diversas doenças, inclusive a toxoplasmose.⁴⁰ Dentre os alvos que vem sendo considerados no planejamento de novos fármacos contra a toxoplasmose merecem destaque a adenosina quinase (AK), a di-hidrofolato redutase (DHFR) e a timidilato sintase (TS) do *T. gondii*.

No presente trabalho são apresentados resultados de estudos de modelagem molecular por homologia e ancoramento molecular de análogos da benziltioinosina como potenciais inibidores da AK de *T. gondii* (TgAK) e de derivados de pirimidinas como

potenciais inibidores da DHFR-TS de *T. gondii*. (TgDHFR-TS)

1.3.1.1. Adenosina quinase do *T.gondii* e análogos dabenziltioinosina (BTI)

Uma característica que distingue o *T. gondii* do seu hospedeiro humano é sua incapacidade de biossintetizar purinas “de novo”.⁴⁷ Diferente do seu hospedeiro, o parasita recupera precursores purinérgicos através da AK (EC.2.7.1.20), uma enzima que converte adenosina em adenosina monofosfato (AMP) (Figura 3). A partir daí todos os outros nucleotídeos purinérgicos podem ser biossintetizados.⁴⁸ Assim, a inibição da atividade da TgAK interromperá a rota de recuperação (“salvage”) das purinas no parasita (Figura 4), oferecendo vários potenciais alvos para a quimioterapia antiparasitária.

É descrito na literatura que análogos da benziladenosina são substratos para a TgAK, mas não para a AK humana (*HssAK*).^{49,50} Em 2004, Yadav et al. descreveram alguns análogos da benziltioinosina (BTI) que atuam como substratos da TgAK, sendo seletivamente tóxicos para o parasita, mas não para o hospedeiro humano (Tabela 1).⁵¹

Na literatura existem poucos estudos de modelagem molecular envolvendo a TgAK. Entretanto, um recente estudo utilizando ferramentas teóricas de ancoramento molecular e QSAR teve como objetivo investigar o modo de interação de análogos da BTI no sítio ativo dessa enzima com o intuito de propor modificações estruturais de forma a aumentar a potência e seletividade destes análogos.⁴⁰

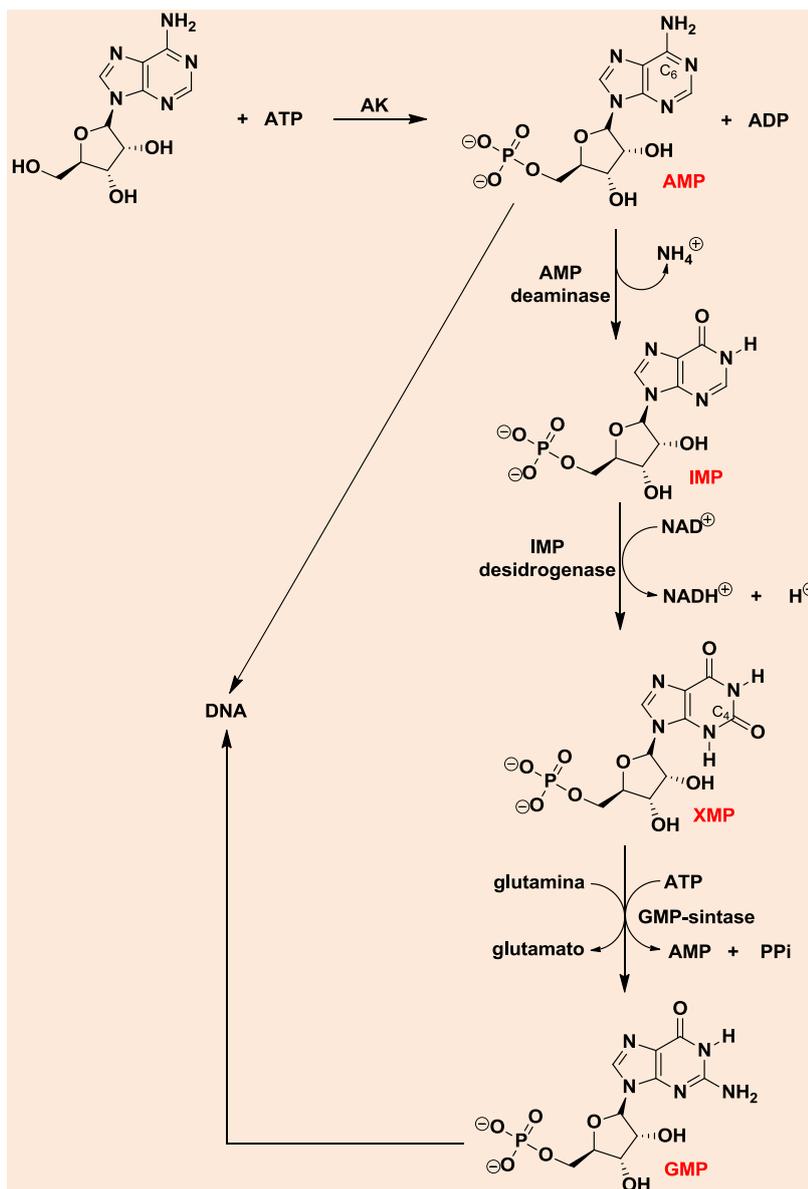
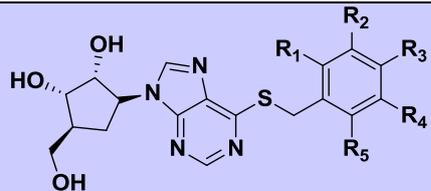


Figura 3. Ciclo de reações envolvendo a AK. A AK é uma 5'fosfotransferase que utiliza ATP como doador de fosfato. Ela converte adenosina em adenosina monofosfato (AMP). Em seguida, a AMP desaminase remove o grupamento amina do C_6 da AMP, deixando um grupo carbonila para formar a Inosina 5'monofosfato (IMP). A IMP é então, oxidada a Xantosina 5'monofosfato (XMP) pela enzima IMP desidrogenase. A XMP é utilizada para a biossíntese da Guanosina 5'monofosfato (GMP) através da enzima GMP-sintase que substitui o grupo carbonila por uma amina no C_4 . GMP e AMP são necessárias para a biossíntese de DNA



Figura 4. Vias de recuperação de purinas. As vias de salvamento desses nucleotídeos se resumem em duas reações: A (1) é catalisada pela enzima adenosina fosforribosil transferase (APRTase), onde a adenosina livre reage com o grupo 5- fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP) formando a adenina nucleotídeo correspondente (AMP) e pirofosfato (PPi). Já a reação (2) é catalisada pela enzima guanina fosforribosil transferase (GPRTase), onde a guanina reage com o grupo PRPP formando GMP e PPi

Tabela 1. Análogos da BTI e seus respectivos valores experimentais de IC₅₀^{51,52} frente à TgAK.


Compostos	IC ₅₀ (μ M)
BTI (R ₁ , R ₂ , R ₃ , R ₄ , R ₅ = H)	9,3
<i>o</i> -Flúor-BTI (R ₁ ou R ₅ = F)	8,2
<i>o</i> -Cloro-BTI (R ₁ ou R ₅ = Cl)	6,7
<i>o</i> -Metil-BTI (R ₁ ou R ₅ = CH ₃)	7,7
<i>m</i> -Nitro-BTI (R ₂ ou R ₄ = NO ₂)	6,2
<i>m</i> -Metil-BTI (R ₂ ou R ₄ = CH ₃)	8,2
<i>m</i> -Triflúormetil-BTI (R ₂ ou R ₄ = CF ₃)	8,7
<i>p</i> -Flúor-BTI (R ₃ = F)	10,3
<i>p</i> -Cloro-BTI (R ₃ = Cl)	8,11
<i>p</i> -Bromo-BTI (R ₃ = Br)	14,3
<i>p</i> -Ciano-BTI (R ₃ = CN)	4,3
<i>p</i> -Nitro-BTI (R ₃ = NO ₂)	12,0
<i>p</i> -Metil-BTI (R ₃ = CH ₃)	7,8
<i>p</i> -Metoxi-BTI (R ₃ = OCH ₃)	3,5
<i>p</i> -Triflúormetoxi-BTI (R ₃ = OCF ₃)	24,8
<i>p</i> - <i>tert</i> -Butil-BTI [R ₃ = C(CH ₃) ₃]	23,3
<i>p</i> -Acetoxi-BTI (R ₃ = COOCH ₃)	15,0
2,4-Dicloro-BTI (R ₁ e R ₃ = Cl)	7,3
3,4-Dicloro-BTI (R ₂ e R ₃ = Cl)	10,4
2-Cloro-6-flúor-BTI (R ₁ = Cl e R ₅ = F)	8,7
2,4,6-trimetil-BTI (R ₁ , R ₃ e R ₅ = CH ₃)	31,1

1.3.1.2. Di-hidrofolato redutase e Timidilato sintase do *T. gondii* e análogos de pirimidina

Dois outros importantes alvos moleculares que vêm sendo investigados para a quimioterapia de doenças infecciosas são as enzimas DHFR⁵³⁻⁵⁵ e TS,⁵⁴⁻⁵⁶ uma vez que estão envolvidas na proliferação celular.⁵⁵

A DHFR é a enzima responsável pela redução do di-hidrofolato a tetra-hidrofolato (Figura 5), uma molécula muito importante para o funcionamento do

organismo, uma vez que serve como cofator para diversos processos metabólicos, influenciando assim, na biossíntese de purinas, timidina e vários aminoácidos.⁵⁷

Já a enzima TS, catalisa a metilação redutiva da deoxiuridina monofosfato (dUMP) para formar deoxitimidina monofosfato (dTMP) com a utilização do N^{5,10}-metilenotetra-hidrofolato como doador do grupo metila. Esta reação fornece o di-hidrofolato e o timidilato (Figura 6), necessários para a biossíntese de DNA.⁵⁸

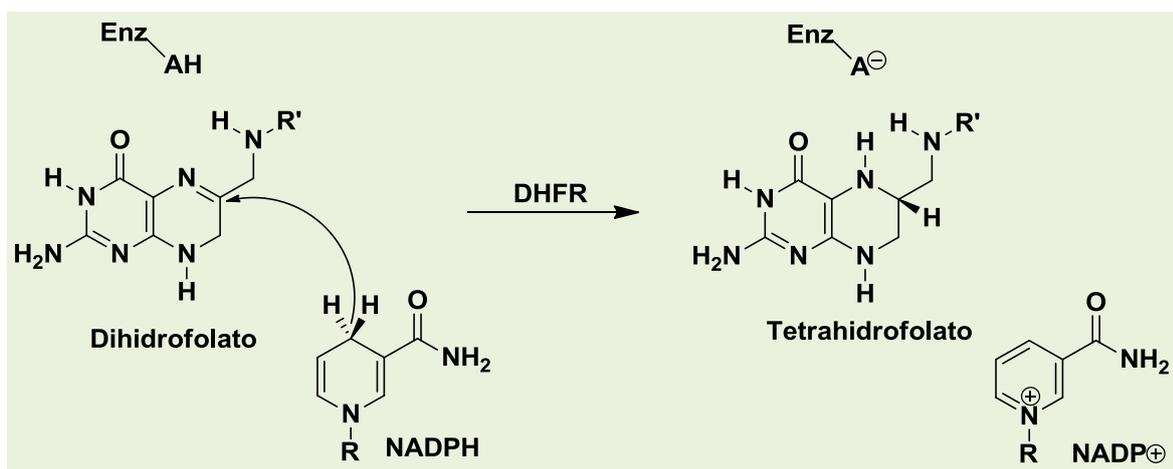


Figura 5. Ciclo catalítico da DHFR. R = adenina-dinucleotídeo 2-fosfato e R' = *p*-aminobenzol-glutamato

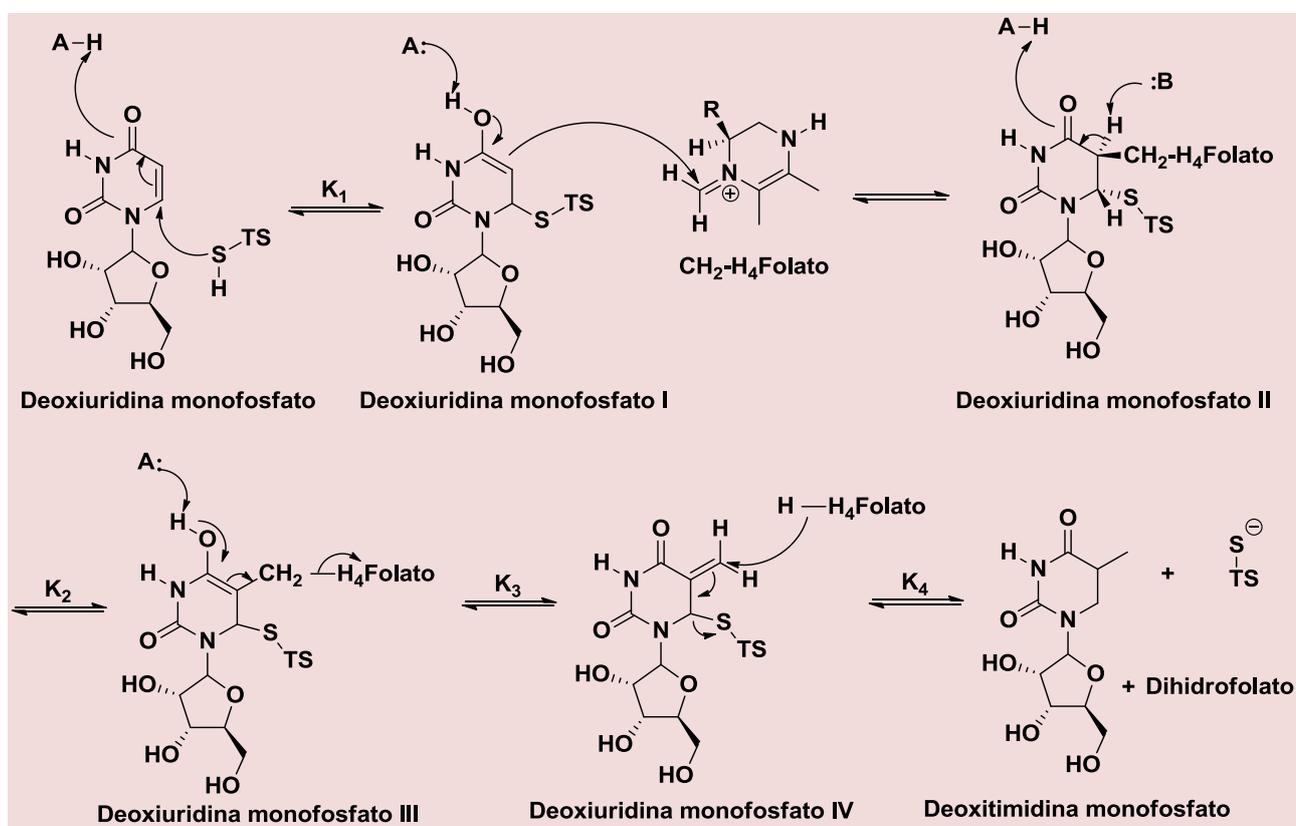
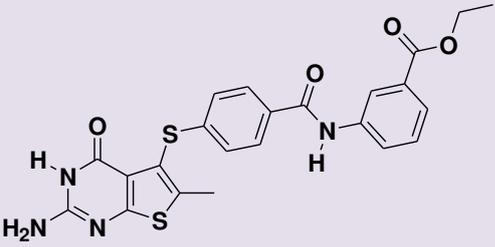
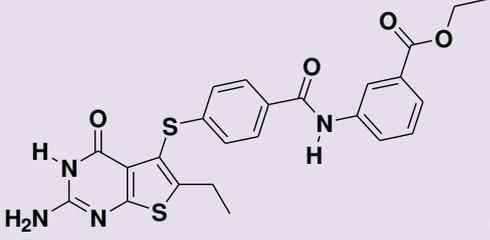
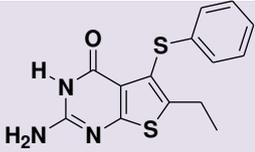
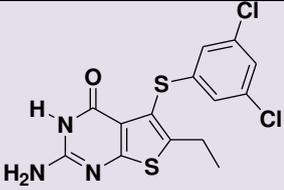
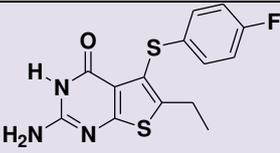
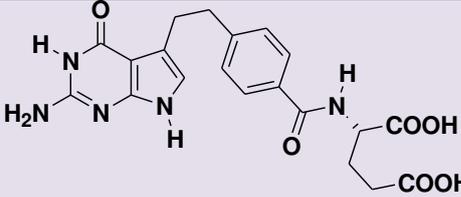
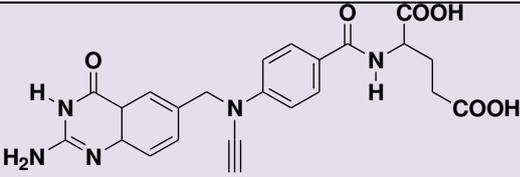
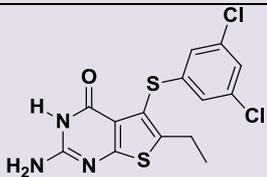


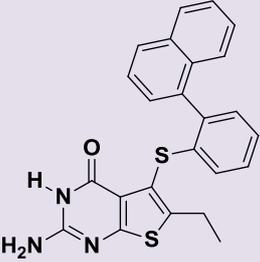
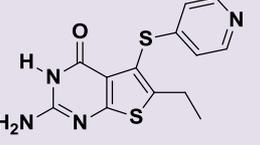
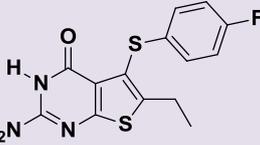
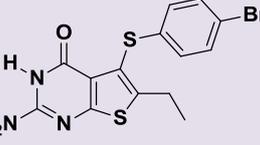
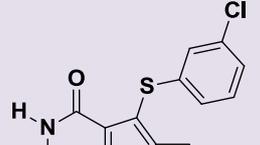
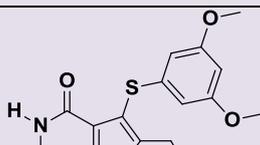
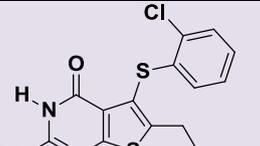
Figura 6. Ciclo catalítico da TS. H₄Folato = tetra-hidrofolato

As enzimas TS e DHFR são expressas individualmente, sendo assim, são monofuncionais. Porém, em protozoários, elas existem como uma enzima bifuncional (DHFR-TS), expressada como um único polipeptídeo.⁵⁸ Como estas duas enzimas influenciam na biossíntese de DNA, diversos estudos mostraram a importância destes alvos em

quimioterapias contra doenças parasitárias.⁵³⁻⁵⁶ Em 2009, Gengje et al. descreveram alguns análogos de pirimidinas que atuam como potentes inibidores da TgDHFR-TS (Tabela 2).⁵⁵

Tabela 2. Análogos de pirimidina e seus respectivos valores experimentais de IC_{50}^{55} frente à TgDHFR e TgTS

Composto	TgDHFR	TgTS
	IC_{50} (μ M)	
 (1)	0,008	0,036
 (2)	0,0021	0,090
 (3)	0,033	8,400
 (4)	0,014	1,600
 (5)	0,025	2,600
 (6)	0,430	2,800
 (7)	0,220	0,430
 (8)	0,014	1,600

Composto	TgDHFR	TgTS
	IC ₅₀ (μM)	
 (9)	0,008	1,100
 (10)	0,017	1,700
 (11)	0,025	2,600
 (12)	0,013	2,200
 (13)	0,012	1,800
 (14)	0,024	2,300
 (15)	0,027	2,500

2. Materiais e métodos

2.1. Modelagem comparativa

As estruturas tridimensionais das enzimas *TgDHFR* e da *TgTS*, foram construídas através da técnica de modelagem comparativa.⁵⁹ A modelagem iniciou-se com a procura sistemática por moldes no *Protein*

Data Bank (PDB)⁶⁰, utilizando o servidor BLAST⁶¹⁻⁶² como ferramenta de busca. A sequência molde selecionada para construir a *TgDHFR* foi a 2FZJ (DHFR de rato com resolução de 2,00 Å e fator R = 0,234). Para a *TgTS* utilizou-se como molde a 1JU6 (TS humana, com resolução de 2,89 Å e fator R = 0,239). Uma vez definidos os moldes, realizou-se o alinhamento das sequências monoméricas das enzimas alvo, com as sequências monoméricas das enzimas molde previamente em formato FASTA,

utilizando o site ExPASy.⁶³

A validação dos modelos gerados foi realizada através do gráfico de Ramachandran,⁶⁴ no qual foi possível analisar a distribuição dos ângulos torcionais da cadeia principal Φ e ψ , responsáveis pela qualidade estereoquímica da proteína. Usando o programa *Swiss-Pdb Viewer*⁶⁵ foi possível obter os valores do Z-score (RMSD) entre as enzimas *TgDHFR/2FZJ* e *TgTS/1JU6*, que foram de 3,12Å e 1,33Å, respectivamente. Após a construção e validação dos modelos, os cofatores NADP (nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato) e UMP (uridina monofosfato) foram adicionados às enzimas *TgDHFR* e *TgTS*, respectivamente. Este procedimento também foi realizado utilizando o programa *Swiss-PdbViewer*.⁶⁵

2.2. Estudos por ancoramento molecular

As estruturas tridimensionais dos inibidores estudados no presente trabalho foram construídas com o programa *PC Spartan Pro*⁶⁶ e suas cargas atômicas parciais calculadas pelo método semi-empírico AM1. As moléculas foram ancoradas nos sítios ativos das estruturas tridimensionais da *TgAK* (código PDB:⁶⁰ 1LII), da *TgDHFR* e da *TgTS* usando o programa *Molegro Virtual Docker* (MVD⁶⁷) de acordo com o mesmo procedimento adotado por Josa et al.⁶⁸ e em trabalhos anteriores de nosso grupo de pesquisa.⁴¹⁻⁴⁶

O sítio de ligação da *TgAK* foi restrito ao cristal

(adenosina),^{47,69} e os resíduos de aminoácidos próximos a um raio de aproximadamente 12 Å do cristal foram considerados flexíveis para melhores resultados. Já os resíduos dos sítios ativos da *TgDHFR* e da *TgTS* foram obtidos de acordo com os alinhamentos das Figuras 7 e 8 e levando em consideração alguns trabalhos descritos na literatura.⁷⁰⁻⁷³ Devido à natureza estocástica do algoritmo de ancoramento, foram feitas em torno de 20 corridas para cada composto, com 30 poses (conformação e orientação do ligante) retornadas para a análise das interações enzima-ligante e das sobreposições com os ligantes dentro de cada cristal. A melhor conformação de cada ligante foi selecionada de acordo com sua posição no sítio ativo e o valor de energia. As conformações selecionadas foram utilizadas para a análise das interações com os resíduos do sítio ativo. Durante o estudo de ancoramento molecular foram utilizados ligantes muito ativos e pouco ativos (de acordo com os resultados de IC₅₀) nos sítios ativos das enzimas *TgDHFR*, *TgTS* e *TgAK*, isso com o objetivo de descartar falsos positivos.

A função *MolDockscoring* usada pelo MVD⁶⁷ é derivada do *piecewise linear potential* (PLP), um potencial simplificado cujos parâmetros são ajustados a estruturas proteína-ligante e funções de escore de ligação e adicionalmente estendidas no método genético evolucionário para ancoramento molecular, com um novo termo para ligações hidrogênio e novos esquemas de carga. Os valores das funções de ancoramento, E_{escore} são definidos pela equação 1:

$$E_{\text{escore}} = E_{\text{inter}} + E_{\text{intra}} \quad \text{Eq. 1}$$

$$E_{\text{inter}} = \sum_i E_{\text{ligante}} \sum_i E_{\text{proteína}} \left[E_{\text{PLP}}(r_{ij}) + 332,0 \frac{q_i q_j}{4r_{ij}^2} \right] \quad \text{Eq. 2}$$

Onde:

E_{PLP} é o “piecewise linear potential”, que usa dois conjuntos diferentes de parâmetros. Um para aproximação do termo estérico (van der Waals) entre átomos e outro potencial para a ligação hidrogênio. O segundo termo descreve as interações eletrostáticas

entre átomos sobrepostos. É o potencial de Coulomb com uma constante dielétrica que depende da distância [$D(r) = 4r$]. O valor numérico 332,0 ajusta a unidade de energia eletrostática em Kcal por molécula.⁶⁷

E_{intra} é a energia interna do ligante dada pela Eq. 3:

$$E_{\text{intra}} = \sum_{i=\text{ligante}} \sum_{j=\text{ligante}} E_{\text{PLP}}(r_{ij}) + \sum_{\text{ligacoes flexiveis}} A[1 - \cos(m\theta - \theta_0)] + E_{\text{choque}} \quad \text{Eq. 3}$$

O primeiro termo (dupla soma) é a soma entre todos os pares de átomos no ligante exceto os pares

de átomos conectados por duas ligações. O segundo termo é o termo de energia torsional, onde θ é o

ângulo torsional da ligação. A média das contribuições da energia torsional de vibração é utilizada se várias torsões forem determinadas. O último termo, E_{choque} estabelece uma penalidade de 1000 se a distância entre dois átomos pesados (distantes por mais de duas ligações) for menor que 2,0 Å, ignorando conformações de ligantes inviáveis.⁶⁷

3. Resultados e discussão

3.1. Modelagem comparativa das enzimas *TgDHFR* e *TgTS*

As seqüências monoméricas primárias da *TgDHFR* e da enzima molde foram alinhadas utilizando o servidor BLAST.^{61,62} Com o resultado do alinhamento (Figura 7), foi possível observar que a enzima alvo apresentou 36,4% de identidade sequencial com a enzima molde. Com o resultado do alinhamento da *TgTS* (Figura 8) foi possível observar que a enzima alvo apresentou 64,7% de identidade sequencial com

a enzima molde. Estes resultados são válidos, já que de acordo com a literatura, modelos confiáveis apresentam valores de identidade superiores a 30%.^{63,74}

O gráfico de Ramachandram gerado durante a validação do modelo da *TgDHFR* apresentou 95,7% dos resíduos em regiões favoráveis (Figura 9A), o que é considerado muito bom para modelos gerados por homologia.⁷⁵ É importante observar no gráfico que alguns resíduos de aminoácidos se encontram em regiões não permitidas, porém, de acordo com o alinhamento (Figura 7) verificou-se que estes aminoácidos não fazem parte do sítio ativo da enzima, não interferindo assim, nos cálculos de ancoramento.

Já para o modelo *TgTS*, o gráfico de Ramachandram apresentou 99,6% dos resíduos em regiões favoráveis, o que também é considerado muito bom para modelos gerados por homologia.⁷⁵ De acordo com a Figura 9B, o resíduo de aminoácido Asn257 se encontra em uma região não permitida, porém, verificou-se que este aminoácido também não faz parte do sítio ativo da enzima.

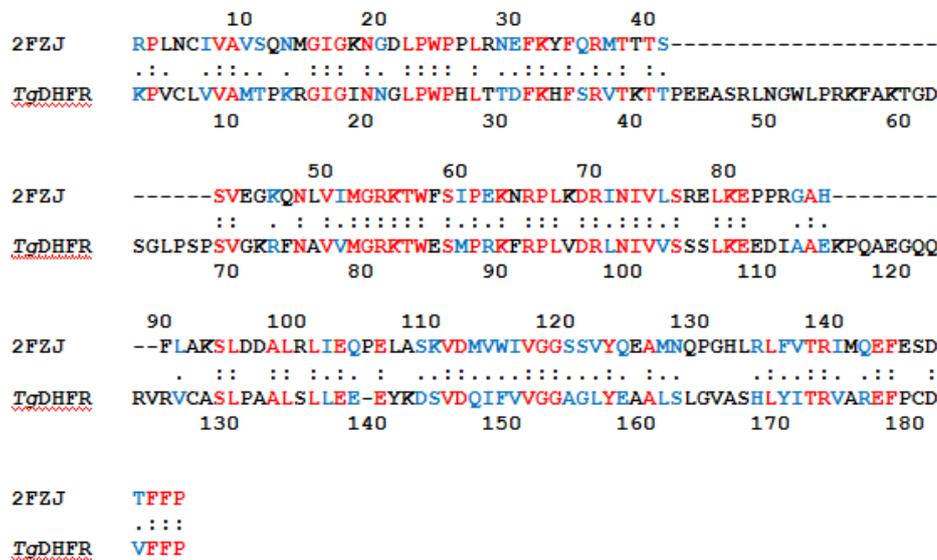


Figura 7. Alinhamento simples entre a *TgDHFR* e a 2FZJ. Os resíduos de aminoácidos em vermelho são idênticos, os resíduos em azul são semelhantes e os resíduos em preto não apresentam identidade significativa

proteína e o ligante (E_{Elet}); (e) energia eletrostática com $r > 4,5 \text{ \AA}$ entre a proteína e o ligante ($E_{EletLong}$); e (f) energia de impedimento espacial entre a proteína e o ligante (E_{Est}). Regressão linear múltipla foi usada

para correlacionar os valores dos termos de energia independentes com os valores de pIC_{50} através da seguinte equação:

$$pIC_{50} = C + C_1E_H + C_2E_{Lig-Cof} + C_3E_{Intra} + C_4E_{Elet} + C_5E_{EletLong} + C_6E_{Est} \quad \text{Eq. 4.}$$

em que C , C_1 , C_2 , C_3 , C_4 , C_5 e C_6 são os coeficientes obtidos da regressão multivariada.

O valor de R^2 obtido para a enzima *TgTS* foi de 0,77. A equação 5 foi estabelecida com 14 compostos (1-7 e 9-15).

$$pIC_{50} = 12,033 + 0,134E_H + 0,010E_{Lig-Cof} + 0,244E_{Intra} + 0,864E_{Elet} + 1,000E_{EletLong} + 0,026E_{Est} \quad \text{Eq. 5}$$

O termo $E_{Lig-Cof}$ contribui mais significativamente para a potência dos compostos, pois a magnitude do seu coeficiente de regressão é 0,300. O composto **6** (apresenta substituinte metoxila nas posições 2 e 5 do anel), por exemplo, é o menos potente desta série e apresenta, quando comparado aos outros compostos, o menor valor para este coeficiente (Tabela 3).

Analisando-se as interações do tipo ligação hidrogênio formadas entre a *TgTS* e os inibidores verificou-se que todos os compostos interagem com Asp263 e com o cofator através do anel pirimidina. A Figura 10 apresenta o composto **1** ancorado no sítio ativo da *TgTS*.

Tabela 3. Valores experimentais de pIC_{50}^{55} e energia (Kcal.mol^{-1}) obtidos do ancoramento com *TgTS*

Compostos	pIC_{50}	E_H	$E_{Lig-Cof}$	E_{Intra}	E_{Elet}	$E_{EletLong}$	E_{Est}
1	7,444	-5,263	-22,714	4,864	-1,367	-2,446	-65,849
2	7,046	-5,955	-24,124	1,848	-1,684	-2,091	-32,918
3	5,076	-2,5	-18,348	-0,070	0	-4,316	-63,087
4	5,658	-5,066	-22,957	-1,738	-3,623	-0,173	-71,087
5	6,000	-2,500	-9,041	-2,083	-2,062	-1,987	-71,334
6	4,638	-4,937	-35,658	-4,928	-2,701	-0,940	-65,631
7	6,000	-4,630	-28,358	-3,107	-3,322	-0,101	-48,040
9	5,959	-4,987	-34,711	3,414	-2,036	-1,684	-76,360
10	5,770	-5,407	-24,046	0,367	-2,880	-0,930	-65,520
11	5,585	-5,119	-27,901	-1,600	-2,335	-1,458	-65,316
12	5,658	-5,000	-5,494	-2,203	-2,212	-1,252	-61,962
13	5,745	-5,498	-31,185	-2,259	-2,096	-1,516	-66,318
14	5,638	-4,667	-32,538	-4,825	-2,621	-0,678	-56,939
15	5,602	-4,960	-11,552	-1,457	-3,653	0	-72,552

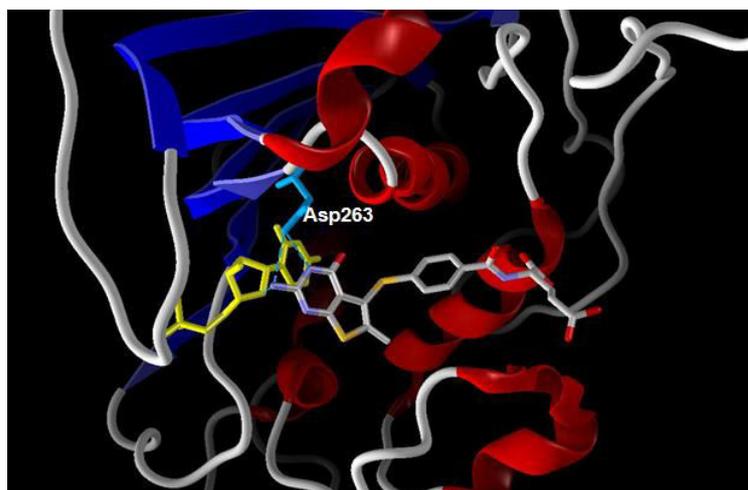


Figura 10. Composto **1** ancorado no sítio ativo da *TgTS*. Em amarelo está representado o cofator e em azul o resíduo de aminoácido. O tracejado azul representa a ligação hidrogênio

O valor de R^2 para a enzima *TgDHFR* foi um pouco maior que para *TgTS*, 0,83. A equação 6 foi estabelecida com 14 compostos (**1-3 e 5-15**).

Assim como na enzima *TgTS*, o termo $E_{Lig-Cof}$ contribui mais significativamente para a potência dos compostos, com uma magnitude de 0,113. O composto **11** (apresenta um átomo de flúor na posição 4 do anel), por exemplo, é um dos menos potentes desta série e apresenta o menor valor para este coeficiente (Tabela 4).

Analisando-se as ligações hidrogênio estabelecidas entre os inibidores e a *TgDHFR* observou-se: (i) todos os compostos interagem com Asp31 e Thr171; (ii) somente os compostos **1, 2, 5 e 14** interagem com Ser36; (iii) somente os compostos **1 e 2** interagem com Lys40; (iv) somente o composto **5** interage com Arg97. A figura 11 apresenta o composto **1** ancorado no sítio ativo da *TgDHFR*.

$$pIC_{50} = 7.608 - 0.006E_H + 0.113E_{Lig-Cof} + 0.034E_{Intra} - 0.042E_{Elet} + 0.014E_{EletLong} - 0.012E_{Est}$$

Eq. 6

Tabela 4. Valores experimentais de pIC_{50}^{55} e energia ($kcal\ mol^{-1}$) obtidos do ancoramento com *TgDHFR*

Compostos	pIC_{50}	E_H	$E_{Lig-Cof}$	E_{Intra}	E_{Elet}	$E_{EletLong}$	E_{Est}
1	8,097	-6,261	-12,000	-5,242	-1,999	-2,578	-128,790
2	8,678	-6,614	-9,566	0,000	-2,127	-2,426	-139,375
3	7,481	-6,137	-11,64	-11,112	-2,608	-2,171	-112,301
5	8,060	-8,466	-11,935	-4,684	-5,179	-2,233	-120,566
6	7,854	-2,208	-11,494	-11,262	-2,445	-2,377	-128,214
7	8,092	-6,158	-10,338	-9,440	-5,275	0,000	-114,74
8	7,854	-6,140	-9,975	-11,930	-4,062	-1,016	-118,956
9	8,076	-4,272	-10,259	-2,643	-0,662	-3,530	-130,076
10	7,770	-2,516	-12,005	-8,301	-4,040	-0,997	-112,796
11	7,602	-6,145	-13,193	-7,7457	-2,595	-2,346	-109,183
12	7,886	-5,653	-10,644	-12,444	-2,591	-2,276	-106,486
13	7,921	-2,392	-11,347	-11,830	-2,504	-2,243	-118,006
14	7,620	-6,757	-13,151	-9,208	-1,904	-2,335	-119,290
15	7,569	-2,359	-11,370	-11,340	-2,454	-2,219	-114,767

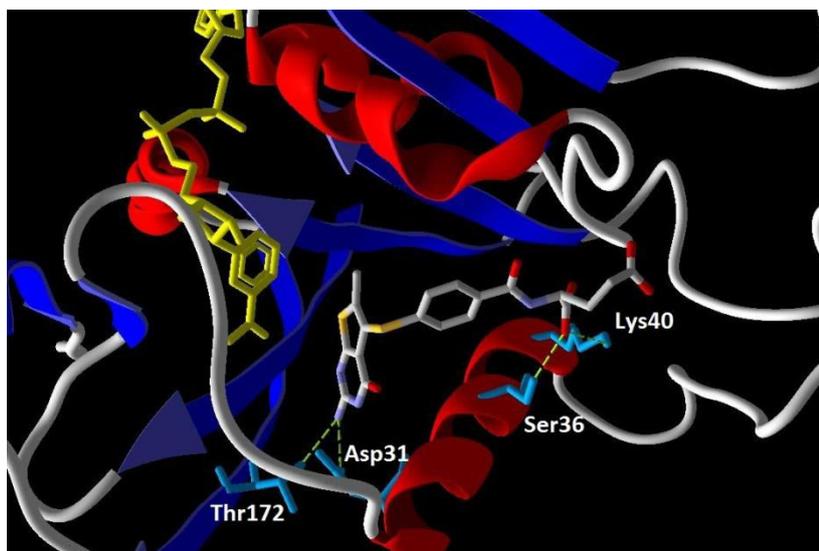


Figura 11. Composto **1** ancorado no sítio ativo da *TgDHFR*. Em amarelo está representado o cofator e em azul os resíduos de aminoácidos. O tracejado verde representa ligação hidrogênio

3.3. Estudos por ancoramento molecular entre análogos da benziltioinosina e a enzima adenosina quinase de *T. gondii*

Alguns análogos de BTI apresentados na Tabela 1 foram ancorados na *TgAK* obtida do PDB,⁶⁰ conforme descrito na metodologia, e os resultados teóricos obtidos foram avaliados e comparados com base nos resultados experimentais descritos por Yadav et al.⁵¹

As melhores poses obtidas para cada molécula no sítio ativo da *TgAK* foram comparadas com a adenosina (substrato natural da enzima) cristalizada com a *TgAK*. As energias de interação intermolecular e de ligação hidrogênio ligante-enzima foram calculadas para melhor se entender quais são as variações entre os modos de interação dos compostos no sítio ativo da enzima e verificar quais os fatores que são responsáveis pela atividade dos análogos BTI. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Valores experimentais de IC_{50} , (μM)^{51,52}, energia de interação intermolecular ($Kcal\ mol^{-1}$) proteína/compostos BTI e ligação hidrogênio ($kcal\ mol^{-1}$) obtidos do ancoramento

Inibidores	$IC_{50}(\mu M)$	Energia de interação ($kcalmol^{-1}$)	Energia de ligação de hidrogênio ($kcalmol^{-1}$)
<i>p</i> -metil-BTI	7,8	-175,71	-20,13
<i>p</i> - <i>tert</i> -butil-BTI	23,3	-104,26	-11,12
2-cloro-6-flúor-BTI	8,7	-162,46	-15,57

Como pode ser visto na Tabela 5, o menor valor de IC_{50} corresponde a um menor valor de energia de interação intermolecular (energia mais estável), assim como, o maior valor de IC_{50} corresponde também a um maior valor de energia de interação intermolecular (energia menos estável), ou seja, os dados teóricos obtidos do ancoramento na *TgAK* estão de acordo com os resultados experimentais descritos por Yadav et al.^{51,52}

O *p*-metil-BTI apresenta um valor mais estável de energia de interação, ou seja, possui uma maior

interação com o sítio ativo da *TgAK* e, conseqüentemente, um maior potencial de inibição. Já o *p*-*tert*-butil-BTI apresenta uma energia de interação menos estável que os outros, ou seja, possui uma menor interação com o sítio ativo e com isso um menor potencial inibitório.

Com o ancoramento foi possível observar que o *p*-metil-BTI (Figura 12A) e o 2-cloro-6-flúor-BTI (Figura 12C) foram os inibidores que melhor se posicionaram (sobreposição e orientação dos anéis) no interior do sítio ativo, com relação à adenosina. Já o *p*-*tert*-butil-

BTI (Figura 12B) não possui uma boa sobreposição no ligante ativo (adenosina) e nem uma conformação satisfatória.

Outro aspecto importante de se analisar são as ligações hidrogênio que cada ligante realiza com a

enzima, assim, torna-se mais fácil de visualizar quais são os resíduos de aminoácidos que estão interagindo mais fortemente com os ligantes (Tabela 6).

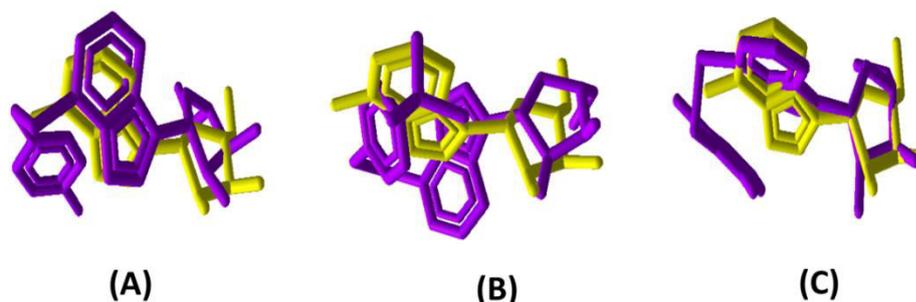


Figura 12. Sobreposições dos compostos BTI depois do ancoramento. A adenosina é mostrada em amarelo e em roxo os inibidores *p*-metil-BTI (A); *p*-*tert*-butil-BTI (B) e 2-cloro-6-flúor-BTI (C)

Tabela 6. Valores de comprimento de ligação (Å) e das energias das ligações hidrogênio e resíduos de aminoácidos com os quais as ligações são formadas

Inibidores	Comprimento de ligação (Å)	Energia de ligação Hidrogênio (kcal mol ⁻¹)	Resíduos de aminoácidos
<i>p</i>-metil-BTI	2,75	-2,50	Asn20
	2,49	-1,63	Asn73
	3,04	-2,50	Ser70
	2,48	-1,46	Ser70
	3,55	-0,17	Ser70
	3,44	-0,09	Ser70
	3,14	-2,32	Thr140
	3,35	-1,25	Gly69
	2,97	-0,74	Asp24
	2,82	-2,50	Asp24
	2,99	-2,50	Asp318
3,09	-2,50	Tyr169	
<i>p</i>-<i>tert</i>-butil-BTI	2,61	-2,50	Tyr169
	2,61	-2,50	Cys127
	2,38	-0,65	Cys127
	2,52	-1,83	Asp24
	2,39	-0,29	Gly69
	3,41	-0,84	Gly69
	2,88	-2,50	Asn314
2-cloro-6-flúor-BTI	3,45	-0,76	Tyr169
	3,55	-0,23	Tyr169
	3,13	-2,34	Ser70
	2,60	-2,50	Ser70
	3,22	-1,88	Ser70
	3,07	-2,50	Cys127
	2,56	-2,19	Asp24
	2,76	-2,50	Asp24
	3,47	-0,67	Asn73

Observa-se que o *p*-metil-BTI apresenta em geral, 12 interações de hidrogênio com os aminoácidos que estão próximos ao sítio ativo da enzima, em seguida vem o 2-cloro-6-flúor-BTI, fazendo 9 interações e por último o *p*-*tert*-butil-BTI com 7 interações (Tabela 6).

Observa-se na Tabela 5, que as ligações mais estáveis que o *p*-metil-BTI realiza, são com os aminoácidos Asn20; Asp24; Ser70; Tyr169 e Asp318. Já o *p*-*tert*-butil-BTI apresenta suas ligações mais estáveis com os aminoácidos Cys127; Tyr169 e Asn314 e o 2-cloro-6-flúor-BTI com os aminoácidos Asp24; Ser70 e Cys127.

Como pode ser visto na Figura 13, o *p*-metil-BTI realiza quatro ligações hidrogênio com o resíduo Ser70, onde a ligação mais estável é feita a partir do nitrogênio 3 do composto BTI com o grupo OH deste aminoácido. Essa molécula também forma duas

ligações hidrogênio com o resíduo Asp24, onde a mais estável é feita a partir do oxigênio 2' da ribose. Outras ligações significativas são observadas entre o resíduo Asn20 e o nitrogênio 1 do *p*-metil-BTI, entre o resíduo Asp318 e o oxigênio 3' da ribose e entre o resíduo Tyr169 e o oxigênio 5' da ribose.

O 2-cloro-6-flúor-BTI forma três ligações hidrogênio com o resíduo Ser70 (Figura 14), onde a ligação mais estável é feita a partir do oxigênio 4' da ribose. Outras ligações significativas são observadas entre os resíduos Asp24 e Cys127 e o oxigênio 2' da ribose (Figura 14).

O *p*-*tert*-butil-BTI forma ligações hidrogênio significativas entre o nitrogênio 7 e o resíduo Tyr169 (Figura 15), entre o nitrogênio 1 e o resíduo Cys127 e entre o oxigênio 5' da ribose e o resíduo Asn314 (Figura 15).

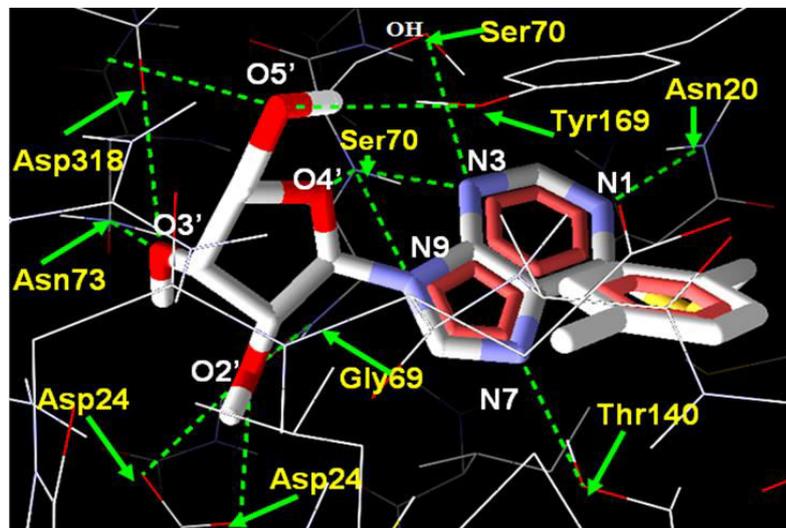


Figura 13. *p*-metil-BTI ancorado na TgAK. Os aminoácidos que fazem ligação hidrogênio estão destacados

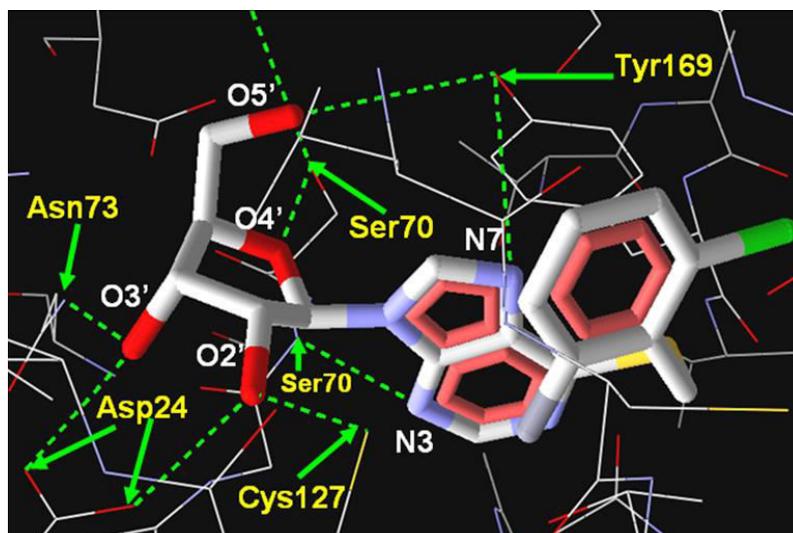


Figura 14. 2-cloro-6-flúor-BTI ancorado na TgAK. Os aminoácidos que fazem ligação hidrogênio estão destacados

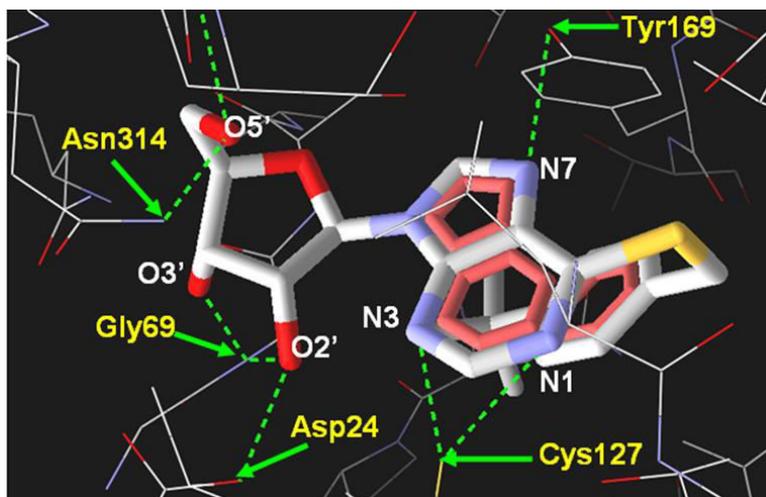


Figura 15. *p*-*tert*-butil-BTI ancorado na TgAK. Os aminoácidos que fazem ligação hidrogênio estão destacados

Observou-se que o *p*-metil-BTI apresenta um maior número de ligações hidrogênio com o sítio ativo da enzima (Tabela 6, Figura 13) o que sugere, mais uma vez, sua maior atividade em relação aos outros compostos.

Todas essas ligações mais estáveis mencionadas acima correspondem aos valores de $-2,5 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ que estão em negrito na Tabela 6.

3.4. Proposta de um novo candidato a fármaco contra Toxoplasmose

Levando em consideração os estudos de ancoramento entre os análogos BTI no sítio ativo da TgAK foi possível observar que o *p*-Metil-BTI apresentou uma melhor interação seguido do 2-cloro-6-flúor-BTI (Tabelas 5 e 6). É importante observar na Tabela 1 que o *o*-Flúor-BTI e o *o*-Cloro-BTI apresentam valores de IC_{50} próximos, porém, estudos prévios⁴⁰ envolvendo estes compostos e a enzima AK mostraram que o *o*-Flúor-BTI apresenta uma maior interação no sítio ativo da enzima. Baseado nisto, foi possível propor um novo candidato a fármaco⁴⁰ contra toxoplasmose. O composto "A" cuja estrutura é mostrada na Figura 16.

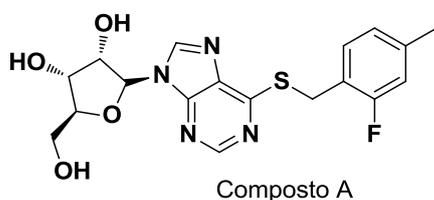


Figura 16. Estrutura proposta de um novo inibidor para a TgAK

4. Considerações Finais

No cenário atual ainda existe uma grande necessidade de se encontrar novos alvos terapêuticos para o tratamento de doenças negligenciadas, já que os medicamentos utilizados até o momento apresentam algumas limitações como baixa eficácia e alta toxicidade. Várias pesquisas envolvendo a modelagem molecular vêm sendo desenvolvidas no intuito de explorar alvos moleculares que estão envolvidos em processos metabólicos importantes em parasitas. A utilização de ferramentas teóricas para o planejamento de novos candidatos a fármacos contra doenças parasitárias têm mostrado ótimos resultados e tem sido amplamente utilizada em pesquisas em todo o mundo. Neste contexto, a química medicinal computacional vem sendo utilizada como uma importante ferramenta na descoberta de novos alvos terapêuticos em agentes causadores de diversas doenças, inclusive a toxoplasmose. Os resultados obtidos sugerem que as enzimas TgAK e TgDHFR-TS podem se tornar alvos para o tratamento da toxoplasmose e que os análogos da benziltioinosina e pirimidina atuam como potentes inibidores destas enzimas.

Referências Bibliográficas

- Albuquerque, G. R.; Munhoz, A. D.; Teixeira, M.; Flausino, W.; de Medeiros, S. M.; Lopes, C. W. G. *Pesq. Vet. Bras.* **2011**, *31*, 287. [CrossRef]
- Oréfice, F.; Cunha Filho, R.; Barboza, A. L.; Oréfice, J. L.; Calucci, D. *Rev. Bras. Oftalmol.* **2010**, *69*, 184. [CrossRef]

- ³ Weiss, L. M.; Dubey, J. P. *Int. J. Parasitol.* **2009**, *39*, 895. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴ Brandão de Mattos, C. C.; Spegiolin, L. C. J. F.; Meira, C. S.; Silva, T. C.; Ferreira, A. I. C.; Nakashima, F.; Pereira-Chioccola, V. L.; de Mattos, L. C. *São Paulo Med. J.* **2011**, *129*, 261. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵ Tenter, A. M.; Heckerth, A. R.; Weiss, L. M. *Int. J. Parasitol.* **2000**, *30*, 1217. [CrossRef] [PubMed]
- ⁶ Dias, R. C. F.; Lopes-Mori, F. M. R.; Mitsuka-Breganó, R.; Dias, R. A. F.; Tokano, D. V.; Reiche, E. M. V.; Freire, R. L.; Navarro, I. T. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* **2011**, *53*, 185. [CrossRef]
- ⁷ Silva, R. C.; Langoni, H. *Parasitol. Res.* **2009**, *105*, 893. [CrossRef] [PubMed]
- ⁸ Silva, A. V.; Silva, R. C.; Zamprogna, T. O.; Lucas, T. M. *Sci. Med.* **2010**, *20*, 120. [Link]
- ⁹ Filha, E. S.; Oliveira, S. M. *O Biológico* **2009**, *71*, 13. [Link]
- ¹⁰ Prado, A. A. F.; Almeida, G. F.; Gontijo, L. S.; Torres, M. L. M. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer – Goiânia*. Disponível em: <<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2011a/agrarias/toxoplasmose.pdf>>. Acesso em: 14 março 2012.
- ¹¹ Kawazoe, U. Em *Parasitologia Humana*; Neves, D. P. ed., 11a. ed., Atheneu: São Paulo, 2005.
- ¹² da Silva, F. A.; Tiyo, R.; Rosada, C. T. M. *Uningá Review* **2010**, *22*. [Link]
- ¹³ Dubey, J. P.; Ferreira, L. R.; Martins, J.; McLeod, R. *Parasitology* **2012**, *139*, 1. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁴ Lopes, F. M.; Gonçalves, D. D.; Mitsuka-Breganó, R.; Freire, R. L.; Navarro, I. T. *Braz. J. Infect. Dis.* **2007**, *11*, 496. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁵ Bichara, C. N. C.; Canto, G. A. C.; Tostes, C. L.; Freitas, J. J. S.; Carmo, E. L.; Póvoa, M. M.; Silveira, E. C. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2012**, *45*, 122. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁶ Remington, J. S.; McLeod, R.; Thulliez, P.; Desmonts, G. Em *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*; Remington, J. S., Klein, J. S., Wilson, C. B.; Baker, C. J., eds.; Elsevier Saunders: Philadelphia, 2006, 947-1091. [CrossRef]
- ¹⁷ Kim, Y. A.; Sharon, A.; Chu, C. K.; Rais, R. H.; Al Safarjalani, O. N.; Naguib, F. N.; el Kouni, M. H. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *73*, 1558. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁸ Klepser, M. E.; Lepser, T. B. *Drugs* **1997**, *53*, 40. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁹ Kravetz, J. D.; Federman, D. G. *Am. J. Med.* **2005**, *118*, 212. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁰ Wu, K.; Chen, X. G.; Li, H.; Yan, H.; Yang, P. L.; Lun, Z. R.; Zhu, X. Q. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2009**, *64*, 261. [CrossRef] [PubMed]
- ²¹ Figueiró-Filho, E. A.; Lopes, A. H.; Senefonte, F. R.; Souza Júnior, V. G.; Botelho, C. A.; Figueiredo, M. S.; Duarte, G. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* **2005**, *27*, 442. [CrossRef]
- ²² Pessanha, T. M.; Carvalho, M.; Pone, M. V. S.; Júnior, S. C. G. *Rev. Paul. Pediatr.* **2011**, *29*, 341. [CrossRef]
- ²³ Fromont, E. G.; Riche, B.; Rabilloud, M. *BMC Infect. Dis.* **2009**, *9*, 1. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁴ Hurt, C.; Tammaro, D. *Am. J. Med.* **2007**, *120*, 911. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁵ Béla, S. R.; Silva, D. A. O.; Cunha-Júnior, J. P.; Pirovani, C. P.; Chaves-Borges, F. A.; Carvalho, F. R.; Oliveira, T. C.; Mineo, J. R. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2008**, *62*, 245. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁶ Jones, J. L.; Lopez, A.; Wilson, M. *Am. Fam. Physician* **2003**, *67*, 2131. [PubMed]
- ²⁷ Kaye, A. J. *Pediatr. Health Care* **2011**, *25*, 355. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁸ Guex-Crosier, Y. *Int. J. Med. Sci.* **2009**, *6*, 140. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁹ da Cunha, E. F. F.; Mancini, D. T.; Ramalho, T. C.; Fonseca, E. M. B.; Oliveira, A. A. *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 1787. [CrossRef]
- ³⁰ Soheilian, M.; Ramezani, A.; Azimzadeh, A.; Sadoughi, M. M.; Dehghan, M. H.; Shahghadami, R.; Yaseri, M.; Peyman, G. A. *Ophthalmology* **2011**, *118*, 134. [CrossRef] [PubMed]
- ³¹ Diniz, E. M. A.; Vaz, F. A. C. *Rev. Assoc. Med. Bras.* **2003**, *49*, 10. [CrossRef]
- ³² Ataíde, D. S. T.; Esmanhoto, L. D. K.; Helmer, K. A.; Guerra, I. R. C.; Guimarães, C. C. G.; Moritz, S. *An. Bras. Dermatol.* **2003**, *78*, 749. [CrossRef]
- ³³ Marques, L. L.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil, 2007. [Link]
- ³⁴ Chambers, H. F.; Sande, M. A.; *Goodman and Gilman*, 6a. ed., McGraw Hill: México, 1996.
- ³⁵ Woods, D. D.; Fildes, P. *Chem. Ind.* **1940**, *59*, 133.
- ³⁶ Santos, J. B.; Almeida, O. L. S.; Silva, L. M.; Barreto, E. R. M. *An. Bras. Dermatol.* **2011**, *86*, 50. [CrossRef] [PubMed]

- ³⁷ el Kouni, M. H. *Curr. Pharm. Des.* **2007**, *13*, 581. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁸ Yu, L.; Gao, Y. F.; Li, X.; Oiao, Z. P.; Shen, J. L. *Parasitol. Res.* **2009**, *104*, 377. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁹ Guido, R. V. C.; Andricopulo, A. D.; Oliva, G. *Estud. Av.* **2010**, *24*, 81. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁰ da Cunha, E. F. F.; Mancini, D. T.; Ramalho, T. C. *Med. Chem. Res.* **2012**, *21*, 590. [[CrossRef](#)]
- ⁴¹ Deeb, O.; Alfalah, S.; Freitas, M. P.; Cunha, E. F. F.; Ramalho, T. C. *J. Biophys. Chem.* **2012**, *3*, 58. [[CrossRef](#)]
- ⁴² Oliveira, A. A.; da Cunha, E. F. F.; Ramalho, T. C. *Lett. Drug Des. Discov.* **2009**, *6*, 554. [[CrossRef](#)]
- ⁴³ Mancini, D. T.; Matos, K. S.; Cunha, E. F. F.; Assis, T. M.; Guimarães, A. P.; França, T. C. C.; Ramalho, T. C. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2012**, *30*, 125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁴ Guimarães, A. P.; Oliveira, A. A.; da Cunha, E. F. F.; Ramalho, T. C.; França, T. C. C. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2011**, *28*, 455. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁵ Ramalho, T. C.; Caetano, M. S.; Josa, D.; Pereira, G. H.; Freitas, E. A.; da Cunha, E. F. F. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2011**, *28*, 907. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁶ Matos, K. S.; Mancini, D. T.; da Cunha, E. F. F.; Kuca, K.; Franca, T. C. C.; Ramalho, T. C. *J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, *22*, 1999. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁷ Cook, M. J.; Delucas, L. J.; Chattopadhy, D. *Protein Sci.* **2000**, *9*, 704. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁸ Reddy, M. C. M.; Palaninathan, S. K.; Shetty, N. D.; Owen, J. L.; Watson, M. D.; Sacchettini, J. C. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 27334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁹ El Kouni, M. H. *Pharmacol. Ther.* **2003**, *99*, 283. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁰ Al Safarjalani, O. N.; Naguib, F. N. M.; El Kouni, M. H. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 3247. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵¹ Yadav, V.; Chu, C. K.; Rais, R. H.; Al Safarjalani, O. N.; Guarcello, V.; Naguib, F. N. M.; El Kouni, M. H. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1987. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵² Rais, H. R.; Al Safarjalani, O. N.; Yadav, V.; Guarcello, V.; Kirk, M.; Chu, C. K.; Naguib, F. N. M.; El Kouni, M. H. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *69*, 1409. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵³ Pelphrey, P. M.; Popov, V. M.; Joska, T. M.; Beierlein, J. M.; Bolstad, E. S. D.; Fillingham, Y. A.; Wright, D. L.; Anderson, A. C. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 940. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁴ França, T. C. C.; Medeiros, A. L. R.; Santos, E. C. P.; Santos-Filho, O. A.; Figueroa-Villar, J. D. *J. Braz. Chem. Soc.* **2004**, *15*, 450. [[CrossRef](#)]
- ⁵⁵ Gangjee, A.; Li, W.; Kisliuk, R. L.; Cody, V.; Pace, J.; Piraino, J.; Makin, J. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 4892. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁶ Somnath, W.; Jaywant, D.; Shaha, S. Y.; Ramrao, C. *Drug Invention Today* **2011**, *3*, 183. [[Link](#)]
- ⁵⁷ Doron, D.; Major, D. T.; Kohen, A.; Thiel, W.; Wu, X. *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7*, 3420. [[CrossRef](#)]
- ⁵⁸ Doan, L. T.; Martucci, W. E.; Vargo, M. A.; Atreya, C. E.; Anderson, K. S. *Biochemistry* **2007**, *46*, 8379. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁹ Santos-Filho, O. A.; Alencastro, R. B. *Quím. Nova* **2003**, *26*, 253. [[CrossRef](#)]
- ⁶⁰ Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne P. E. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶¹ Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403. [[PubMed](#)]
- ⁶² Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schaffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 3389. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶³ Sítio da ExPasy Bioinformatics Resource. Disponível em: <<http://au.expasy.org/>>. Acesso em: 22 novembro 2011.
- ⁶⁴ Ramachandran, G. N.; Sasisekharan, V. *Adv. Protein. Chem.* **1968**, *23*, 283. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁵ Guex, N.; Peitsch, M. C. *Electrophoresis* **1997**, *18*, 2714. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁶ Hehre, W. J.; Deppmeier, B. J.; Klunzinger, P. E. PC SPARTAN Pro. Wavefunction, Inc., Irvine, 1999.
- ⁶⁷ Thomsen, R.; Christensen, M. H. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁸ Josa, D.; da Cunha, E. F. F.; Ramalho, T. C.; Souza, T. C. S.; Caetano, M. S. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2008**, *25*, 373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁹ Schumacher, M. A.; Scott, D. M.; Mathews, I. I.; Ealick, S. E.; Roos, D. S.; Ullman, B.; Brennan, R. G. *J. Mol. Biol.* **2000**, *298*, 875. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷⁰ Cody, V.; Pace, J.; Rosowsky, A. *Acta Cryst. D* **2008**, *D64*, 977. [[CrossRef](#)]
- ⁷¹ Cody, V.; Pace, J.; Chisum, K.; Rosowsky, A. *Proteins* **2006**, *65*, 959. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷² Gangjee, A.; Lin, X.; Kisliuk, R. L.; McGuire J. J. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 7215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

⁷³ Sayre, P. H.; Finer-Moore, J. S.; Fritz, T. A.; Biermann, D.; Gates, S. B.; MacKellar, W. C.; Patel, V. F.; Stroud, R. M. *J. Mol. Biol.* **2001**, *313*, 813. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

⁷⁴ Kufareva, I.; Rueda, M.; Katritch, V. GPCR Dock

2010 participants; Stevens, R. C.; Abagyan, R. *Structure* **2011**, *19*, 1108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

⁷⁵ Laskowski, R. A.; Macarthur, M. W.; Moss, D. S.; Thornton, J. M. *J. Appl. Cryst.* **1993**, *26*, 283. [[CrossRef](#)]