

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**CRIAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MODELOS FARMACOFÓRICOS PARA  
IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAL INIBIDOR DA ENZIMA 14- $\alpha$ -  
DEMETILASE**

SUELLEN DOS REIS

ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>. Dra. Lílian Sibelle Campos Bernardes  
COORIENTADORA: Dra. Lara Almida Zimmermann

FLORIANÓPOLIS

2019

Suellen dos Reis

**CRIAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MODELOS FARMACOFÓRICOS PARA  
IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAL INIBIDOR DA ENZIMA 14- $\alpha$ -DEMETILASE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia – Centro de Ciências da Saúde – CCS, da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Lílian S. C. Bernardes

Coorientadora: Dra. Lara A. Zimmermann

FLORIANÓPOLIS

2019

Suellen dos Reis

**CRIAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MODELOS FARMACOFÓRICOS PARA  
IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAL INIBIDOR DA ENZIMA 14- $\alpha$ -DEMETILASE**

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Farmacêutica” e aprovado em sua forma final pelo Curso de Farmácia.

Florianópolis, 29 de novembro de 2019

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Mareni Rocha Farias  
Coordenadora do Curso de Farmácia

Banca Examinadora

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Lilian Sibelle Campos Bernardes  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Dr Ricardo Ferreira Affeldt  
Avaliador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Karin Silva Caumo  
Avaliadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Reis, Suellen dos  
CRIAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MODELOS FARMACOFÓRICOS PARA  
IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAL INIBIDOR DA ENZIMA 14-?  
DEMETILASE / Suellen dos Reis ; orientadora, Lílian Sibelle  
Campos Bernardes, coorientadora, Lara Almida Zimmermann,  
2019.  
47 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências  
da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. enzima esterol 14-?-demetilase. 3.  
ceratite por Acanthamoeba. 4. planejamento de fármacos. 5.  
farmacóforo. I. Bernardes, Lílian Sibelle Campos . II.  
Zimmermann, Lara Almida . III. Universidade Federal de  
Santa Catarina. Graduação em Farmácia. IV. Título.

Dedico este trabalho à Deus, que em seu sublime amor fez arder o fogo do Espírito Santo em meu coração e me conduziu até este momento.

*“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, por que o mundo pertence a quem se atreve. E a vida é muito bela para ser insignificante.”*

Charles Chaplin

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus que me deu coragem e força para vencer as adversidades durante essa jornada. Que guiou meus passos para este caminho de felicidade.

Aos meus pais que são meus amores. Que sempre estiveram presentes, apostando no meu sucesso, acreditando que eu posso mais e me apoiando incondicionalmente. Ao meu pai que me ensina acima de tudo a ser independente e a sonhar. E a minha mãe que me ensina o valor de lutar pelo que se acredita.

A toda a minha família, ao qual sou profundamente grata por fazer parte. Em especial aos meus avós, Ari, Iolanda e Judite, pelo carinho e aconchego. A minha Tia Tatiana, que é muito mais que tia e madrinha, é uma mãe escolhida para a minha vida. Aos meus primos, de maneira especial à Mariana, Matheus e Vinícius pelos momentos de alegria, risadas e conselho. Vocês são incríveis.

A Universidade Federal de Santa Catarina, pelo fomento ao ensino e pesquisa. Ao curso de Graduação em Farmácia e ao Departamento de Ciências Farmacêuticas.

A minha orientadora Professora Doutora Lílian Sibelle Campos Bernardes, pelo seu sim, pelas conversas valiosas e sabedoria, e por servir de inspiração profissional. Da mesma forma, agradeço à Doutora Lara Almida Zimmermann, minha coorientadora, pela dedicação e prontidão em ajudar. Sem nosso trabalho em equipe este projeto não seria desenvolvido.

A todos do Laboratório de Química Farmacêutica e Medicinal, Rafael, Daniel, Lucas, Pâmela, Victor, Carol, Lucas Pradi, Camila, Cássio, pelo acolhimento e todos os momentos de alegria que fazem do nosso laboratório um lugar especial.

Aos membros da banca, pelo aceite em avaliar este trabalho e pelas valiosas contribuições para o melhoramento do mesmo.

A Stella, Flávia, Mariana, Maria de Fátima, Beatriz pela dádiva da amizade, pelos momentos de alegria e apoio, por todos os conselhos e momentos de reflexão. Vocês são sopro de alegria nos momentos de dificuldade e com quem eu adoro compartilhar alegrias. Em especial, agradeço a Taíze, a quem pude contar todos esses anos de graduação em Farmácia. Minha companheira de estudos intermináveis, com quem compartilhei a agonia de esperar uma nota de prova, o

equilíbrio de emoções que somos uma para a outra e a quem hoje admiro, por ver a farmacêutica incrível que você já é.

A todos que não mencionei, mas que de alguma forma contribuíram durante a minha jornada até aqui. Os meus mais sinceros agradecimentos.

E ao tio Sérgio que nos deixou este ano, mas que sempre lembrarei por seu sorriso alegre e sua vontade de ajudar aos outros.



## RESUMO

A ceratite por *Acanthamoeba* é uma infecção crônica da córnea, rara, com potencial de causar cegueira permanente, gerando a incapacitação. Esta doença parasitária acomete usuários de lentes de contato associada a má higienização do estojo e lentes ou uso de água contaminada, todavia pode apresentar risco a população em geral quando com lesões prévias da córnea. Atualmente, os fármacos disponíveis para o esquema terapêutico não apresentam eficácia e segurança desejada contra o parasito *Acanthamoeba* spp. O protozoário apresenta duas formas evolutivas: o cisto e o trofozoíto. Os cistos resistentes podem levar a recorrência da infecção e extensão do tratamento. A enzima esterol 14- $\alpha$ -demetilase está localizada na membrana do protozoário, e auxilia na síntese de ergosterol, assim como em outros gêneros. O fomento em pesquisa e desenvolvimento de compostos para o tratamento da ceratite amebiana é imprescindível, visando a substituição dos medicamentos hoje utilizados, contando com ferramentas computacionais e estudo racional baseado nas características físico-químicas e farmacocinéticas de compostos. Neste sentido, o projeto tem como objetivo criar e validar modelos farmacofóricos, com ferramentas computacionais, visando identificar potenciais inibidores da enzima esterol 14- $\alpha$ -demetilase (CYP51) na busca por um fármaco eficaz para o tratamento da ceratite por *Acanthamoeba*. Foram desenvolvidos e validados 5 modelos de farmacóforo baseados em: (A) inibidores da 14- $\alpha$ -demetilase ativos para *Acanthamoeba* spp.; (B) inibidores da 14- $\alpha$ -demetilase ativos de *Trypanosoma cruzi*; (C) inibidores da 14- $\alpha$ -demetilase ativos para *Acanthamoeba* spp. e *Trypanosoma cruzi*. Os resultados serão utilizados para estudos posteriores de triagem virtual.

**Palavras-chave:** *Acanthamoeba* spp.; ceratite por *Acanthamoeba*; enzima esterol 14- $\alpha$ -demetilase; CYP51; planejamento de fármacos; farmacóforo.

## ABSTRACT

*Acanthamoeba* keratitis is a rare chronic corneal infection with the potential to cause permanent blindness, leading to disability. This parasitic disease affects contact lens wearers associated with poor case and lens cleaning or the use of contaminated water, but may pose a risk to the general population with previous corneal damage. Currently, drugs available for the therapeutic scheme do not have the desired efficacy and safety against the parasite *Acanthamoeba* spp. The protozoan presents two evolutionary forms: the cyst and the trophozoite. Resistant cysts may lead to recurrence of infection and length of treatment. The enzyme sterol 14- $\alpha$ -demethylase is located on the protozoan membrane and assists in the synthesis of ergosterol as well as in another genus. Fostering research and development of compounds for the treatment of amoebic keratitis is essential, aiming to replace the drugs used today, with computational tools and rational study based on the physicochemical and pharmacokinetic characteristics of compounds. In this sense, the project aims to create and validate pharmacophoric models, with computational tools, aiming to identify potential inhibitors of the enzyme sterol 14- $\alpha$ -demethylase (CYP51) in the search for an effective drug for the treatment of *Acanthamoeba* keratitis. Five pharmacophore models were developed and validated based on: (A) 14- $\alpha$ -demethylase inhibitors active for *Acanthamoeba* spp.; (B) active *Trypanosoma cruzi* 14- $\alpha$ -demethylase inhibitors; (C) 14- $\alpha$ -demethylase inhibitors active for *Acanthamoeba* spp. and *Trypanosoma cruzi*. The results will be used for further virtual screening studies.

**Keywords:** *Acanthamoeba* spp.; *Acanthamoeba* keratitis; enzyme sterol 14- $\alpha$ -demethylase; CYP51; *drug design*; pharmacoforo.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Representação da cascata de patogênese da ceratite por <i>Acanthamoeba</i> .....	19
Figura 2 Representação esquemática da formação de cisto de <i>Acanthamoeba</i> spp. e o retorno ao estado de trofozoíto .....	21
Figura 3 Estruturas dos fármacos utilizados para o tratamento da ceratite por <i>Acanthamoeba</i> .....	21
Figura 4 Estruturas químicas de derivados azóis utilizados para o tratamento da ceratite por <i>Acanthamoeba</i> .....	22
Figura 5 Esquema da via de reação da enzima para a formação de esteroides com participação da esteroide 14- $\alpha$ -demetilase .....	24
Figura 6 Delineamento de estudo de fármacos conforme a necessidade de recursos terapêuticos para doença alvo .....	27
Figura 7 Representação dos fármacos voriconazol e posaconazol inseridos como compostos mais ativos no programa <i>Pharmagist</i> . .....	33
Figura 8 Representação do farmacóforo gerado pelo <i>Pharmit</i> com base nas estruturas para inibidores da 14- $\alpha$ -demetilase ativos para <i>Acanthamoeba</i> spp.....	37
Figura 9 Representação dos farmacóforos gerados pelo <i>Pharmit</i> com base nas estruturas para inibidores da 14- $\alpha$ -demetilase ativos para <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	39
Figura 10 Representação dos farmacóforos gerados pelo <i>Pharmit</i> com base nas estruturas para inibidores da 14- $\alpha$ -demetilase ativos para <i>Acanthamoeba</i> spp. e <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	41

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Pontuação e <i>features</i> do farmacóforo gerado para o protozoário <i>Acanthamoeba</i> spp.....	34
Quadro 2 Pontuação e <i>features</i> do farmacóforo gerado para o protozoário <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	35
Quadro 3 Pontuação e <i>features</i> do farmacóforo gerado para os protozoários <i>Acanthamoeba</i> spp. e <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	36
Quadro 4 Representação das características físico-químicas do farmacóforo gerado para inibidores da 14- $\alpha$ -demetilase ativos para <i>Acanthamoeba</i> spp.....	37
Quadro 5 Representação das características físico-químicas do farmacóforo gerado para inibidores da 14- $\alpha$ -demetilase ativos para <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	38
Quadro 6 Representação das características físico-químicas do farmacóforo gerado para inibidores da 14- $\alpha$ -demetilase ativos para <i>Acanthamoeba</i> spp. e <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	40

## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1	Cálculo da sensibilidade dos modelos farmacofóricos desenvolvidos.....	31
Equação 2	Cálculo da especificidade dos modelos farmacofóricos desenvolvidos.....	32
Equação 3	Cálculo do fator de enriquecimento EF.....	32
Equação 4	Cálculo do fator de enriquecimento EF para compostos <i>training set</i> .....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NADPH - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

$\Delta$ 14 – Carbono 14

$\Delta$ 14, 15 – Carbono 14 e Carbono 15

CYP51 – Citocromo P 51 ou esterol 14- $\alpha$ -demetilase

EF – Fator de Enriquecimento

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	18
2.1 CERATITE POR <i>Acanthamoeba</i> spp.....	18
2.2 ALVO MOLECULAR.....	22
2.3 ESTUDO <i>in silico</i> .....	25
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	29
3.1 OBJETIVO GERAL.....	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	30
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	33
5.1 CONSTRUÇÃO DO FARMACÓFORO.....	33
5.2 VALIDAÇÃO DO FARMACÓFORO.....	36
<b>6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b> .....	42
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	43

## 1 INTRODUÇÃO

O delineamento do estudo de um novo fármaco é direcionado de acordo com a necessidade do desenvolvimento de novas alternativas de tratamento para uma determinada doença. Esse processo pode ser motivado pela ineficácia demonstrada na terapia existente ou escassez de recurso terapêutico. O desenvolvimento de um fármaco pode iniciar a partir de uma molécula já elucidada, empregando-a como terapia em determinada patologia; Bem como por meio de um estudo detalhado da patofisiologia desencadeada pela doença, buscando um fármaco que se adeque ao tratamento (BARREIRO; FRAGA, 2008).

O cenário atual evidencia que o desenvolvimento de novos fármacos compreende um processo dispendioso, que gera um gasto em torno de 1 bilhão de dólares, e duradouro, podendo ser estendido por cerca de 12 a 15 anos. Isto porque são muitas as etapas que envolvem este processo até a geração de um composto ativo ideal para utilização terapêutica (HUGHES *et al.*, 2011; LOMBARDINO; LOWE, 2004).

A fim de tornar mais dinâmico e racional o desenvolvimento de fármacos, estudos *in silico* emergem como um auxílio para este processo. Seu emprego no planejamento de fármacos é fundamental para as etapas pré-clínicas, contribuindo desde o estudo prévio do alvo molecular até etapas posteriores, como por exemplo, (i) a elaboração de um modelo farmacofórico, o qual corrobora para o conhecimento de propriedades estéricas e eletrônicas necessárias para estabelecer interações intermoleculares ótimas entre alvo molecular e composto em desenvolvimento e (ii) a predição teórica das propriedades físico-químicas, como tamanho molecular, logP e doadores e aceptores de ligação de hidrogênio, os quais contribuem para determinação das propriedades farmacocinéticas (BRAGA; ANDRADE, 2013; BUCKLE *et al.*, 2013; LIPINSKI, 2004). Uma vez elaborado o farmacóforo, a triagem virtual contempla os estudos previamente desenvolvidos, com o emprego de bancos de moléculas sintéticas e/ou naturais e a validação do modelo, objetivando a identificação de moléculas (*hits*) capazes de interagir com alta afinidade e seletividade com alvo molecular selecionado (MIGNANI *et al.*, 2018; VUORINEN; ODERMATT; SCHUSTER, 2015; VUORINEN; SCHUSTER, 2015).

A partir do exposto, o trabalho foi direcionado para elaboração de um farmacóforo a fim de identificar um potencial inibidor da enzima 14- $\alpha$ -demetilase, uma



enzima presente na *Acanthamoeba* spp. A seguir, será apresentada uma revisão da literatura a respeito da doença ceratite por *Acanthamoeba*, informações sobre o protozoário, o tratamento atual, o alvo molecular selecionado para a pesquisa, bem como o delineamento do estudo a ser realizado.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 CERATITE POR *Acanthamoeba* spp.

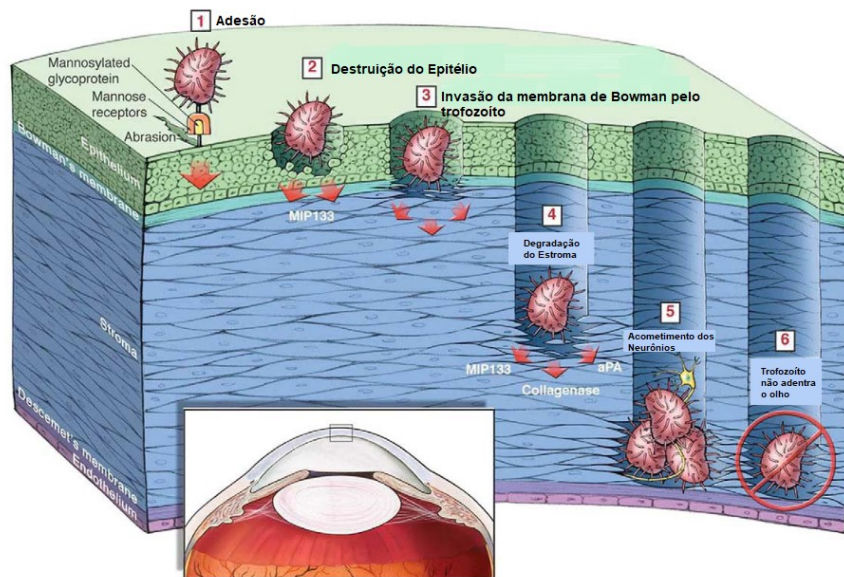
Ao longo de quatro décadas, a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos vem se reinventando e se moldando, principalmente com o advento das ferramentas computacionais. A descoberta de novos tratamentos para doenças ou condições clínicas exige cada vez mais a interdisciplinaridade. A química medicinal está intimamente entrelaçada com este processo, pelo domínio do conhecimento relacionado à estrutura do fármaco, da relação desta com o alvo biológico proposto para ação e com as propriedades físico-químicas da molécula. Todavia, é primordial o conhecimento prévio da doença, englobando os mecanismos fisiológicos, a sintomatologia, os agentes etiológicos, diagnóstico, tratamento já existente, tudo isso para que de fato seja obtida uma proposta de recurso terapêutico (LOMBARDINO; LOWE, 2004; PATRICK, 2013).

Doenças que geram opacidade na córnea compreendem cerca de 5% das causas de cegueira no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007). A perda da integridade da córnea leva a um prejuízo na passagem da luz através do epitélio, que por sua vez torna-se esbranquiçado, diminuindo a acuidade visual até a perda completa do sentido (MINISTÉRIO BRASILEIRO DA SAÚDE, 2019). As infecções neste tecido estão entre os fatores que podem levar à essa perda de visão. Em usuários de lente de contato, os principais causadores de infecções são os pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp. e protozoários, como *Acanthamoeba* spp. (GIESE; WEISSMAN, 2002; KHAN, 2006).

A ceratite gerada pela ação do protozoário *Acanthamoeba* spp. é uma infecção ocular rara, porém de grande importância mundial devido ao risco de diminuição da acuidade visual ou até mesmo perda total da visão (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2017). Tem como mecanismo de patogênese (Figura 1) a adesão da *Acanthamoeba* spp. na célula corneal do hospedeiro, seguida da secreção extracelular de proteases e culmina na fagocitose, possibilitando a morte celular e dano tecidual (CLARKE; NIEDERKORN, 2006; LORENZO-MORALES *et al.*, 2013; VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007).

Figura 1 Representação da cascata de patogênese da ceratite por *Acanthamoeba*

(1) Adesão do trofozoíto nos receptores de manose, em resposta ao dano no epitélio (córnea); (2) A exposição do receptor de manose permite ao trofozoíto secreção de MIP 133; (3) Trofozoíto invade membrana de Bowman e invade o estroma; (4) Trofozoíto secreta uma série de proteases; (5) Eventualmente os trofozoítos invadem a região ao entorno de nervos, o que gera intensa dor; (6) A ceratite por *Acanthamoeba* spp. raramente invade a parte interna dos olhos. Abreviaturas: MIP 133, proteína manose induzida de 133-kDa.



Fonte: CLARKE; NIEDERKORN, 2006

Os principais sintomas desencadeados em função da infecção por *Acanthamoeba* spp. são: dor ocular intensa, vermelhidão, visão embaçada ou escurecida, fotofobia, sensação de corpo estranho nos olhos e lacrimejamento. Estes sintomas podem se estender por semanas ou até meses (CLARKE; NIEDERKORN, 2006; KHAN, 2006; LORENZO-MORALES *et al.*, 2013). A falta de especificidade dos sintomas culmina na dificuldade do diagnóstico e implica diretamente no fator decisivo de manutenção da acuidade visual do indivíduo afetado (LORENZO-MORALES *et al.*, 2013; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007).

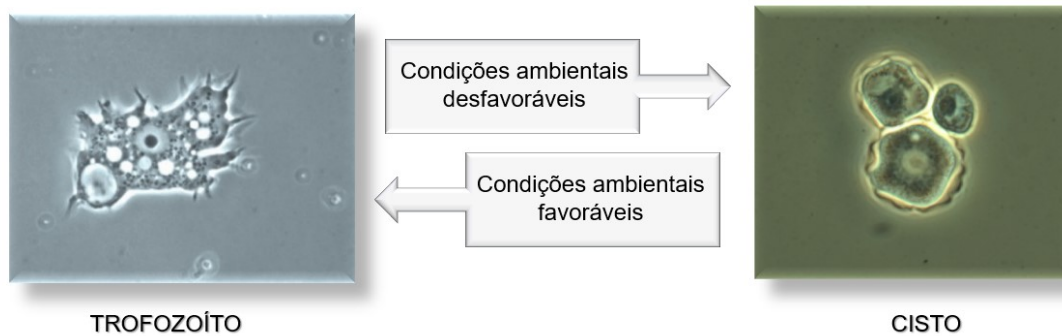
Desde o primeiro relato, em 1974, os casos de infecção por *Acanthamoeba* spp. aumentaram com o passar das décadas (KHAN, 2006). Supõe-se que este aumento esteja relacionado com a melhora dos métodos de diagnóstico, bem como o aumento do uso de lentes de contato (FABRES *et al.*, 2018) e disseminação do genótipo T4 de *Acanthamoeba* spp., envolvido na maioria dos casos de ceratite e encefalite gerados por este protozoário (CAUMO *et al.*, 2014; KHAN, 2006;

VERÍSSIMO et al., 2013). Os usuários de lentes de contato compreendem um grupo de risco para desenvolvimento da doença. Nos Estados Unidos são estimados que 85% dos casos de ceratite amebiana ocorrem em usuários de lentes de contato. Em países em desenvolvimento, a incidência é de 1 a 33 casos por milhão de usuários de lentes de contato (BAIG, 2018; CDC, 2017). A *Acanthamoeba* spp. invade a córnea por meio de aberturas de caráter físico, com o mínimo de abrasão, no epitélio da córnea. O uso de lentes de contato pode facilitar a inoculação direta do parasito no tecido ocular auxiliando no mecanismo de infecção por proporcionar trauma mecânico ou por hipóxia na córnea em uso prolongado (CARNT; STAPLETON, 2016; CDC, 2017; CLARKE; NIEDERKORN, 2006; KHAN, 2006; LORENZO-MORALES *et al.*, 2013; MORIYAMA; HOFLING-LIMA, 2008).

*Acanthamoeba* é um protozoário de vida livre e anfizoico, ou seja, capaz de se viver em organismos vivos ou hospedeiros, bem como no ambiente. É ubíquo e durante seu ciclo de vida se apresenta na forma vegetativa de trofozoíto ou na forma resistente de cisto (CARNT; STAPLETON, 2016; CAUMO *et al.*, 2014; CDC, 2017a; KHAN, 2006; LORENZO-MORALES *et al.*, 2013).

Os cistos podem sobreviver por anos mantendo a patogenicidade do parasito (figura 2). Isto porque os trofozoítos podem emergir dos cistos quando as condições ambientais, como temperatura, pH e dessecação, são favoráveis para a manutenção da vida deste parasito, permitindo assim o carregamento destes a organismos susceptíveis, perpetuando sua transmissão (CARNT; STAPLETON, 2016; KHAN, 2006). A capacidade de resistência desta forma de vida e sua perpetuação podem ser demonstradas mesmo em contato com agentes antimicrobianos e produtos de desinfecção de lentes de contato (DUDLEY; JARROLL; KHAN, 2009).

Figura 2 Representação esquemática da formação de cisto de *Acanthamoeba* spp. e o retorno ao estado de trofozoíto

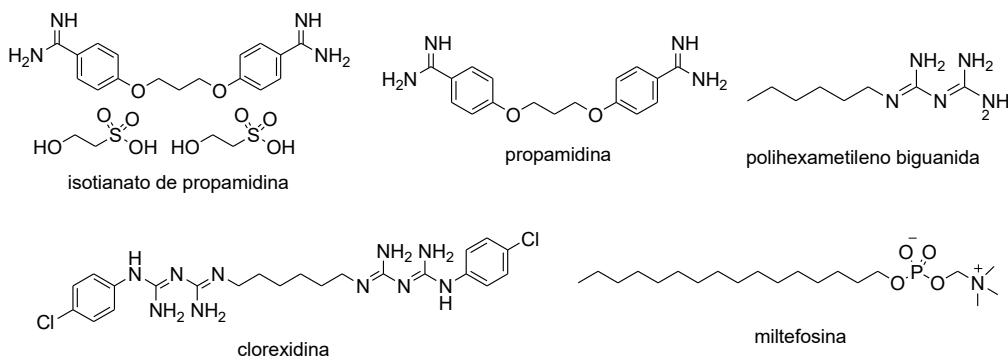


Fonte KHAN, 2006.

Até o momento, não existe tratamento considerado eficaz contra ceratite por *Acanthamoeba* (LORENZO-MORALES *et al.*, 2013, 2016). O tratamento atual consiste no uso de agentes antimicrobianos tópicos como isotionato de propamidina, polihexametileno biguanida, clorexidina e neomicina, apresentados na figura 3 (KUMAR; LLOYD, 2002; SEAL, 2003; SIFAOU *et al.*, 2018; SZENTMÁRY *et al.*, 2019).

A literatura propõe que a utilização isolada dos agentes antimicrobianos citados é inadequada, devido ao desenvolvimento de resistência da *Acanthamoeba* spp. frente a estes agentes (HAY *et al.*, 1994; VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007). LEE e colaboradores em 2007, reportaram ainda que polihexametileno biguanidas e clorexidina possuem ação letal sobre as amebas, bem como sobre os ceratócitos oculares, resultando em toxicidade celular (LEE *et al.*, 2007).

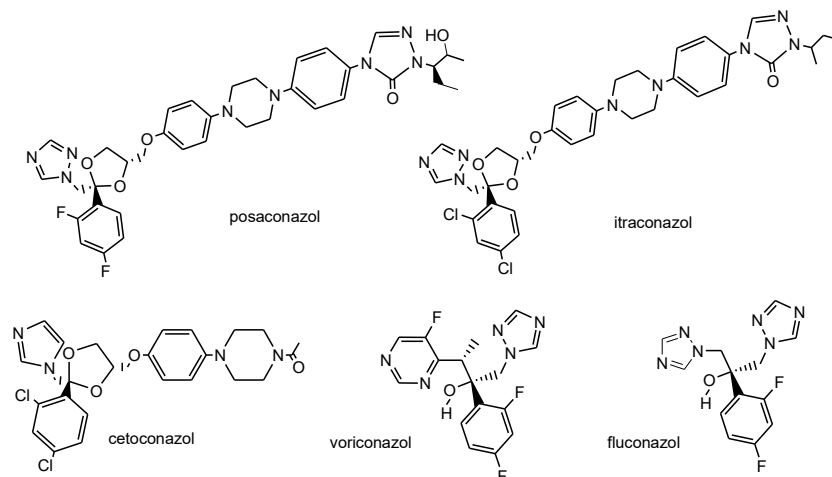
Figura 3 Estruturas dos fármacos utilizados para o tratamento da ceratite por *Acanthamoeba*



Fonte: a autora

A utilização de agentes de tratamento da classe dos azóis, tais como itraconazol, miconazol, cetoconazol, imidazol e voriconazol, representados na figura 4, mostraram-se eficazes no tratamento de ceratite amebiana, tanto com tratamento tópico, como o oral. Adicionalmente, o imidazol e o voriconazol mostraram resultados de eficácia contra ambas as formas de vida da *Acanthamoeba* spp., encorajando o uso destes agentes como alternativa de tratamento (LAMB *et al.*, 2015; LEPESHEVA; FRIGGERI; WATERMAN, 2018a; MARTÍN-NAVARRO *et al.*, 2013; THOMSON *et al.*, 2017; VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007).

Figura 4 Estruturas químicas de derivados azóis utilizados para o tratamento da ceratite por *Acanthamoeba*



Fonte: a autora

## 2.2 ALVO MOLECULAR

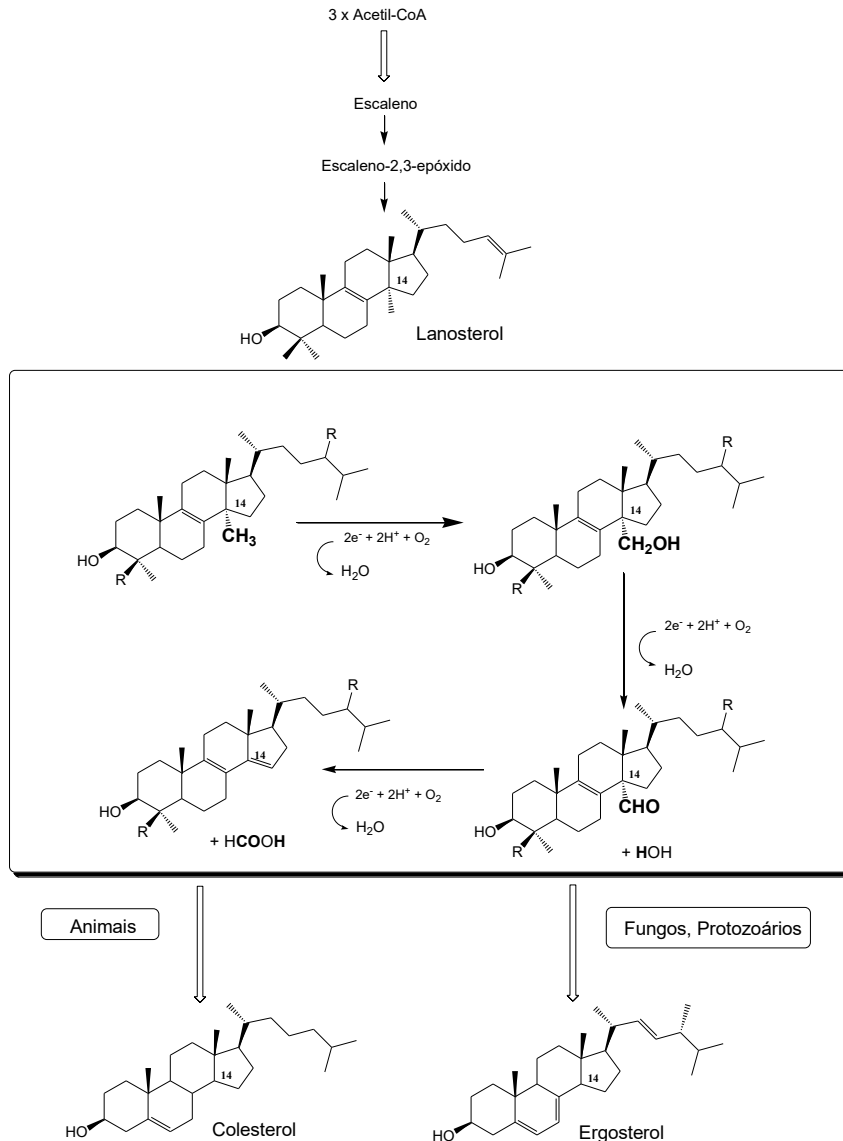
Para compreender a ação de um fármaco a nível molecular, faz-se necessário o conhecimento da fisiopatologia da doença em questão e assim a seleção de um alvo molecular. Sabe-se que alvos moleculares em sua maioria são proteínas, enzimas, proteínas de transporte, de sustentação e podem estar localizadas na membrana celular e citoplasma. Possuem, então, centenas de resíduos de aminoácidos que estão presentes em toda a sua estrutura, inclusive em seu sítio ativo e contam com moléculas para interação nestes sítios, permitindo ativação ou inativação da enzima e geração de uma resposta bioquímica, compreendendo a farmacodinâmica (BARREIRO; FRAGA, 2008; PATRICK, 2013).

Nesse sentido, utilizando certos compostos antifúngicos azólicos como alternativa de tratamento da doença ceratite por *Acanthamoeba* obteve-se ação inibitória da enzima esterol 14- $\alpha$ -demetilase (CYP51) (LORENZO-MORALES *et al.*, 2013). A enzima é contemplada pela literatura como objeto de estudo em diversos agentes infecciosos como espécies do gênero *Trypanosoma* spp., *Aspergillus* spp., *Candida* spp., *Mycobacterium* spp. e *Acanthamoeba* spp. (LEPESHEVA; FRIGGERI; WATERMAN, 2018a; LEPESHEVA; WATERMAN, 2007). A esterol 14- $\alpha$ -demetilase em *Acanthamoeba* spp., situa-se na membrana do protozoário, participando da via que culmina a síntese do ergosterol. Este esteroide é um componente essencial de estrutura de membrana, desempenhando funções de sustentação, fluidez, permeabilidade e distribuição de componentes proteicos, enzimáticos e bem como outros (LEPESHEVA; WATERMAN, 2007).

A esterol 14- $\alpha$ -demetilase, assim como as demais demetilases, formam um conjunto de enzimas pertencentes ao citocromo P450 que se conservaram ao longo da evolução (LEPESHEVA; FRIGGERI; WATERMAN, 2018a; LEPESHEVA; WATERMAN, 2004). Na representação da figura 5, tem-se que na via de síntese do ergosterol, como em fungos e protozoários, a esterol 14- $\alpha$ -demetilase desempenha papel catalítico, tanto regio- como estereoespecífico, por meio da remoção oxidativa do grupamento metílico situado no carbono 14, em posição alfa. A reação é possível devido a geração de produtos precedentes, como o lanosterol e norlanosterol. Para que a sequência de reações ocorra, uma molécula de oxigênio e duas de NADP são requeridos. A primeira etapa da reação tem como produto o 14- $\alpha$ -carboxialcool após a ação da primeira molécula de oxigênio e, gerando sucessivamente devido à oxidação, o 14 $\alpha$ -carboxialdeído. A segunda e última etapa tem como objetivo a remoção do grupamento 14- $\alpha$ -aldeído, sendo liberado como ácido fórmico do  $\Delta$ 14, propiciando rearranjo eletrônico que culmina em ligação dupla entre  $\Delta$ 14, 15 (LEPESHEVA; WATERMAN, 2007).

Figura 5 Esquema da via de reação da enzima para a formação de esteroides com participação da esterol 14- $\alpha$ -demetilase

Por meio de um composto inicial gera-se o lanosterol. A enzima esterol 14- $\alpha$ -demetilase passa a realizar uma série de reações de oxidação para a geração de Colesterol em animais e o Ergosterol em fungos e protozoários.



Fonte LEPESHEVA; FRIGGERI; WATERMAN, 2018; LEPESHEVA; WATERMAN, 2011.

Dentre as famílias de plantas, bactérias, animais, protozoários, fungos e demais, a esterol 14- $\alpha$ -demetilase possui uma variação em sua sequência de resíduos de aminoácidos. Segundo LEPESHEVA e WATERMAN (2007) há similaridade dentre os resíduos de aminoácidos presentes na enzima entre as famílias. Comparando a similaridade da sequência enzimática dentre os gêneros, as CYP51s de ameba (*Acanthamoeba polyphaga*) e tripanossomatídeos (*Trypanosoma cruzi* e *Leishmania*



*infantum*) compreende cerca de 33%. Quando comparado a *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*, a similaridade chega a 46%. Já, comparando tripanissomatídeos e fungos, passa a ser de 25% (LEPESHEVA; FRIGGERI; WATERMAN, 2018a).

Com relação ao reino *Mammalia*, a CYP51 está inserida na sequência gênica, porém este gene permanece não-funcional, um pseudogene (LEPESHEVA; WATERMAN, 2007). Sabe-se que as células de mamíferos são menos sensíveis a azóis do que células fúngicas e que a principal enzima responsável pela síntese de colesterol é a  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilglutaril-Coenzima A (HMG-CoA) (NELSON, D. L. & COX, 2008). Tendo em vista a diferença dos produtos finais da via de produção de esteroides (*Acanthamoeba* spp.: ergosterol; humanos: colesterol), a CYP51 tem sido explorada como um potencial alvo na tentativa de desenvolvimento de fármacos específicos para o tratamento de infecções por *Acanthamoeba* spp., como a ceratite amebiana (SMITH; KORN, 1968; LAMB *et al.*, 2015; THOMSON *et al.*, 2017; KIDANE *et al.*, 2017; LEPESHEVA; FRIGGERI; WATERMAN, 2018).

Ao passo que há a necessidade de estudo da esterol 14- $\alpha$ -demetilase como alvo terapêutico para o tratamento de ceratite por *Acanthamoeba*, na literatura não contém a estrutura cristalográfica da CYP51 do protozoário do gênero *Acanthamoeba* spp. As buscas revelam a presença de esterol 14- $\alpha$ -demetilase para organismos como *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Naegleria fowleri*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum*, assim como outras enzimas presentes na *Acanthamoeba* spp. Desta forma, o estudo *in silico* para o desenvolvimento de fármacos será conduzido pela construção de farmacóforo baseado em ligantes descritos na literatura.

### 2.3 ESTUDO *in silico*

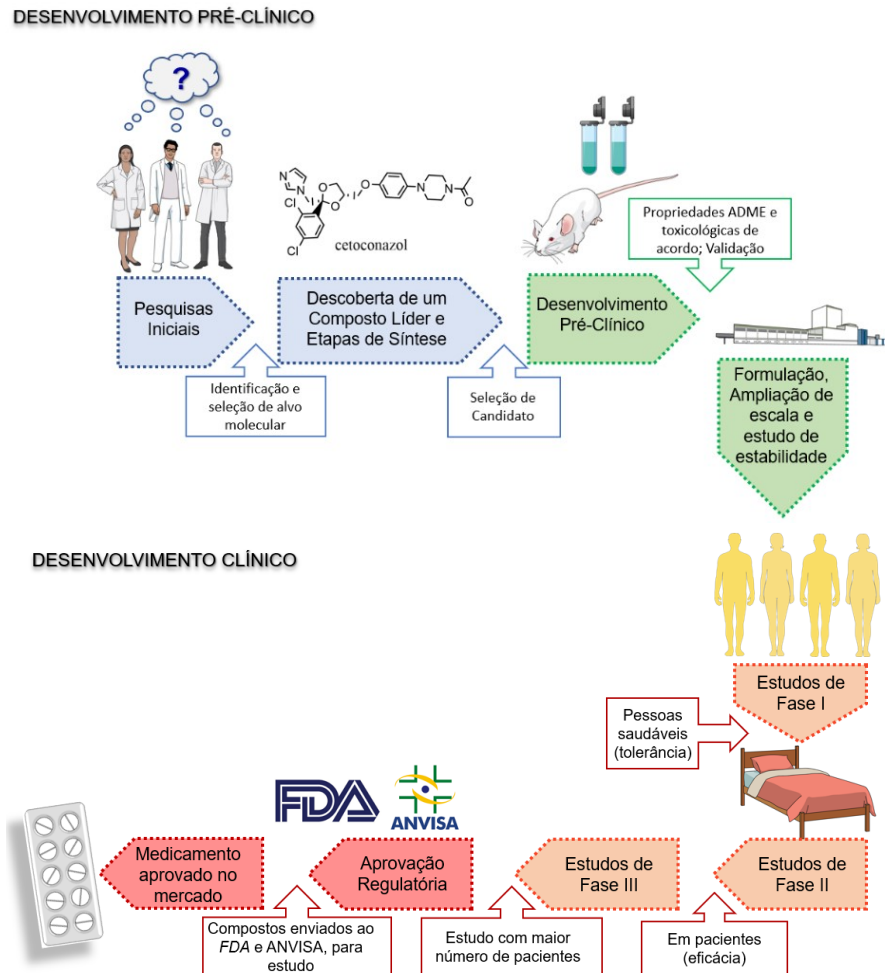
Com o estudo do genoma humano através do Projeto Genoma, a utilização de análise por meio da robótica em estudo *in vitro*, como é o caso do *High-throughput screening* (HTS), o desenvolvimento da técnica de Raio-X na cristalografia de alvos moleculares, a utilização de métodos computacionais para o desenvolvimento racional de novas moléculas e a ressonância magnética nuclear (*em inglês Nuclear magnetic resonance - NMR*) para seu estudo, o planejamento de fármacos tornou-se dinâmico e inteligente. Demonstra que apesar de dispendioso e duradouro, tornou-se

fundamental quando o intuito é a obtenção de novos compostos para demanda terapêutica (BARREIRO; FRAGA, 2008; PATRICK, 2013).

O desenvolvimento de um novo fármaco é desenhado em etapas que utilizam como base uma doença alvo, em um contexto de estudos pré-clínicos, esquematizado na figura 6. Um estudo computacional é realizado nas primeiras etapas a fim de gerar compostos complementares ao alvo terapêutico de forma a teoricamente compreender moléculas seletivas e efetivas ao alvo, os denominados compostos líderes, configurando assim o estudo *in silico*. A seleção de compostos líderes dá início à etapa de desenvolvimento pré-clínico, envolvendo bioensaios *in vitro* e *in vivo* em animais. Uma vez que os compostos selecionados apresentem perfis farmacodinâmicos e farmacocinéticos adequados, são encaminhados para os estudos clínicos em pacientes. Por fim, os compostos que obtiverem êxito na fase clínica são avaliados pelos órgãos regulatórios para sua aprovação de acordo com a regulamentação de cada país (BARREIRO; FRAGA, 2008; GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010).

Figura 6 Delineamento de estudo de fármacos conforme a necessidade de recursos terapêuticos para doença alvo

Abreviação: ADME – Administração, Distribuição, Metabolização, Excreção; FDA - *Food and Drug Administration* (órgão de regulamentação de saúde nos Estados Unidos); ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária.



Fonte HUGHES *et al.*, 2011; LOMBARDINO; LOWE, 2004.

Tomando como foco o estudo *in silico*, existem diferentes metodologias que auxiliam no desenvolvimento de novos fármacos. Uma vez identificado o alvo molecular, é importante elaborar um modelo farmacofórico, ou seja, conhecer quais as propriedades estéricas e eletrônicas necessárias para que um composto estabeleça uma ótima interação com este alvo, favorecendo assim a atividade biológica (BRAGA; ANDRADE, 2013; BUCKLE *et al.*, 2013). Uma vez elaborado, o farmacóforo pode ser utilizado para estudos de triagem virtual, utilizando diferentes bancos de moléculas sintéticas e/ou naturais. A triagem virtual é um método

computacional utilizado para identificação de moléculas (*hits*) capazes de interagir com alta afinidade e seletividade com alvo molecular selecionado (MIGNANI *et al.*, 2018; VUORINEN; ODERMATT; SCHUSTER, 2015; VUORINEN; SCHUSTER, 2015).

A construção de um farmacóforo pode ser feita baseada na estrutura de ligantes já conhecidos ou com base na estrutura do alvo molecular. Quando a estrutura cristalográfica do alvo terapêutico está disponível na literatura o modelo farmacofórico pode ser criado por complementariedade no complexo estrutural, analisando características de interação química com resíduos de aminoácido no sítio ativo e exploração volume espacial do alvo. Uma busca pelas interações chave no sítio ativo deve ser realizada em um primeiro momento e, posteriormente, segue-se para análise das demais características químicas e espaciais (BRAGA; ANDRADE, 2013; YANG, 2010).

De outra forma, a modelagem de um farmacóforo pode ser alcançada com base no estudo de ligantes do alvo biológico de estudo, já descritos pela literatura. Nesta abordagem, é possível avaliar as propriedades químicas e estéricas de um conjunto de ligantes de forma a definir as principais características que compõem o farmacóforo e, posteriormente, é feito o aprimoramento deste. Com este perfil de estudo, é possível realizar ensaios de triagem virtual, a partir de bibliotecas de compostos, para identificação de moléculas que se encaixem nas características do farmacóforo e, a partir daí, prever as interações moleculares que estas moléculas poderão estabelecer com o alvo molecular. (BRAGA; ANDRADE, 2013; HEIN; ZILIAN; SOTRIFER, 2010; KIM *et al.*, 2017; YANG, 2010).

Sendo assim, este trabalho propõe a realização de estudo *in silico* para elaboração de um modelo de farmacóforo baseado em estruturas de compostos que sejam inibidores da enzima 14- $\alpha$ -demetilase, e posterior triagem virtual para identificação de compostos líderes e/ou fragmentos que possam ser protótipos para desenvolvimento de fármacos para o tratamento de ceratite por *Acanthamoeba*.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Criar e validar um modelo farmacofórico para identificar possíveis inibidores da enzima 14- $\alpha$ -demetilase por meio de estudos *in silico*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar inibidores da enzima 14- $\alpha$ -demetilase descritos na literatura;
- Construir as estruturas dos ligantes selecionados no formato 2D e converter as para o formato 3D;
- Criar modelos farmacofóricos utilizando a plataforma *Pharmagist*;
- Aprimorar e validar os modelos farmacofóricos criados utilizando a plataforma *Pharmit*.

## 4 METODOLOGIA

*Hardware* e especificações de *software*: O estudo *in silico* foi realizado em um processador *Intel Pentium Core i7* com *Windows 10*.

O modelo farmacofórico foi elaborado e validado a partir de inibidores da enzima 14- $\alpha$ -demetilase já descritos na literatura. Inicialmente, o levantamento bibliográfico foi realizado nas bases de dados *SciFinder*, *Web of Science*, *PubMed* e *ScienceDirect*, bem como nas quimiotecas *ChEMBL* (DAVIES et al., 2015; GAULTON et al., 2017) e *BINDING Database* (GILSON et al., 2016) para construção de uma biblioteca de compostos.

Para a seleção dos artigos, não houve limitação de período e as palavras-chave utilizadas foram “14-alfa-demethylase inhibitors”, “CYP51 inhibitors”, “*Acanthamoeba* inhibitors”, “*Acanthamoeba* azois”, “*Acanthamoeba* CYP51”, “*Acanthamoeba* CYP51 inhibitors”, “*Trypanosoma cruzi* inhibitors”, “*Trypanosoma cruzi* CYP51”, “*Trypanosoma cruzi* inhibitors CYP51”. Como critérios de seleção dos artigos foram considerados os que possuíam presença de estudos *in vitro* com a enzima 14- $\alpha$ -demetilase *Acanthamoeba* spp. ou 14- $\alpha$ -demetilase de *Trypanosoma cruzi* e valores de atividade biológica mensurados, como por exemplo IC<sub>50</sub> que a concentração do composto inibidor necessário para inibir 50% da atividade da CYP51, e a Ki usado para descrever o efeito de compostos inibidores reversíveis sobre a atividade da enzima CYP51 (CARDOSO; CASS, 2008).

Estes compostos fazem parte do banco de compostos “*training set*”. Foram divididos em: (A) inibidores da 14- $\alpha$ -demetilase ativos para *Acanthamoeba* spp.; (B) inibidores da 14- $\alpha$ -demetilase ativos de *Trypanosoma cruzi*; (C) inibidores da 14- $\alpha$ -demetilase ativos para *Acanthamoeba* spp. e *Trypanosoma cruzi*. As estruturas foram desenhadas separadamente em formato 2D, por meio do programa *ChemBio Draw® Ultra*, obtendo-se o código *SMILES*, respectivamente. A partir deste código, utilizou-se da ferramenta de acesso *online CORINA* (CORINA, 2019) para a transformação das estruturas em formato 3D. E, por fim, a geração das estruturas em “\*sybyl mol2 formato” no programa *DS Visualizer – Discover Studio 2019*, bem como compactado o arquivo em formato “\*zip”.

A geração do modelo de farmacóforo foi desenvolvida por meio do programa *PharmaGist* (SCHNEIDMAN-DUHOVNY et al., 2008), de acesso livre. Para a inserção

do arquivo em formato “\*zip” no programa, foi considerado a molécula mais ativa dentre os inibidores de *Acanthamoeba* spp., compreendendo o voriconazol, bem como a mais ativa para o *Trypanosoma cruzi*, compreendendo o posoconazol. Características como, número de candidatos de farmacóforo gerados, o valor de *score* decorrente da sobreposição espacial de moléculas e a quantidade de moléculas sobrepostas por grupo, foram considerados para a seleção do farmacóforo que melhor representasse a diversidade estrutural, aproximando-se mais da realidade de ligação na enzima.

A etapa posterior refere-se ao refinamento e validação do farmacóforo, realizado por meio do programa *Pharmit* (SUNSERI; KOES, 2016), também de acesso livre. Para validação, utilizou-se o banco de compostos teste “*training set*” construído anteriormente, esses compostos foram adicionados na base de dados *DUDE-E* (*decoys*) e consideradas as propriedades físico-químicas, gerou-se *decoys*. Ao final o banco de compostos “*training set*” foi incluído na plataforma *Pharmit* com nomenclatura “Suelen”.

A validação prosseguiu contando com os modelos de farmacóforo selecionados, os quais tiveram suas características (*features*) excluídas ou adicionadas, assim como o aumento ou diminuição espacial das mesmas. A qualidade do modelo foi determinada pelo cálculo de sensibilidade (Equação 1) e especificidade (Equação 2) e, cálculo e comparação do fator de enriquecimento (EF) (BRAGA; ANDRADE, 2013), que é a relação entre o número de moléculas ativas encontradas entre todos os *hits* encontrados (rendimento de ativos), dividido pela participação de ativos no banco de dados (Equação 3) (GUNDERTOFTE; JORGENSEN, 2000). Na triagem virtual da validação teórica, o número de ativos corretamente identificados pelo modelo (NP), o número total de positivos no banco (TP), o número de inativos não encontrados pelo modelo (NN) e o número total de inativos no banco (TI).

$$\text{Sensibilidade} = \frac{(NP)}{(TP)}$$

Equação 1 Cálculo da sensibilidade dos modelos farmacofóricos desenvolvidos. NP: número de ativos corretamente identificados pelo modelo; TP: número total de positivos no banco.

$$\textit{Especificidade} = \frac{(NN)}{(TI)}$$

Equação 2 Cálculo da especificidade dos modelos farmacofóricos desenvolvidos. NN: número de inativos não encontrados pelo modelo; TI: número total de inativos no banco.

$$\textit{Fator de Enriquecimento (EF)} = \frac{(VP)/(TPN)}{(TP)/(TDB)}$$

Equação 3 Cálculo do fator de enriquecimento EF. VP: número total de compostos ativos encontrados; TPN: número total de ativos e inativos encontrados; TP: número total de ativos no banco de dados de ativos. TDB: número total de compostos nos bancos de dados.



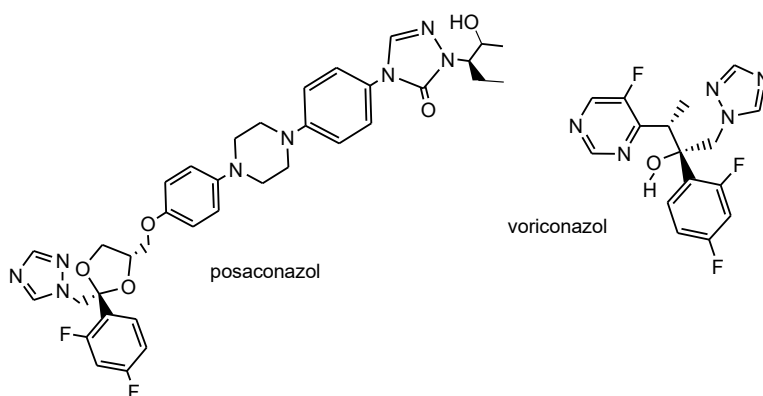
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a seleção dos inibidores da enzima estero 14- $\alpha$ -demetilase, descritos na literatura, utilizou-se da similaridade da sequência enzimática da CYP51 dentre os gêneros *Acanthamoeba* spp. e tripanossomatídeos, que compreende cerca de 33%, para compor o estudo *in silico*.

### 5.1 CONSTRUÇÃO DO FARMACÓFORO

Na construção de um farmacóforo, inseriu-se na plataforma *Pharmagist* moléculas para cada grupo, compreendendo em: (A) inibidores da 14- $\alpha$ -demetilase ativos para *Acanthamoeba* spp.; (B) inibidores da 14- $\alpha$ -demetilase ativos de *Trypanosoma cruzi*; (C) inibidores da 14- $\alpha$ -demetilase ativos para *Acanthamoeba* spp. e *Trypanosoma cruzi*. O programa levou em consideração a flexibilidade das estruturas, no que diz respeito aos diversos confôrmeros de cada molécula. A indicação de molécula mais ativa como inibidor da 14- $\alpha$ -demetilase foi proposta, levando em conta o fármaco azólico voriconazol (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2019; LAMB *et al.*, 2015; LEPESHEVA; FRIGGERI; WATERMAN, 2018a) para o protozoário *Acanthamoeba* spp. e para o *Trypanosoma cruzi*, o fármaco azólico posaconazol (DOYLE *et al.*, 2010; HARGROVE *et al.*, 2013).

Figura 7 Representação dos fármacos voriconazol e posaconazol inseridos como compostos mais ativos no programa *Pharmagist*.



Fonte: a autora

Estes inibidores foram essenciais para que, ao realizar a sobreposição das estruturas, o *Pharmagist* comparasse as características das demais moléculas inclusas com o voriconazol e posaconazol, respectivamente, tendo em vista que para

*Acanthamoeba* spp. não há informação sobre o sítio de ligação dos inibidores na enzima CYP51 e que o estudo baseou-se somente nas características físico-químicas e estruturais dos ligantes descritos em literatura.

A seleção de farmacóforo para o grupo baseado em inibidores da 14- $\alpha$ -demetilase ativos para *Acanthamoeba* spp., ocorreu de duas formas: (1) a escolha do farmacóforo foi por melhor valor de *score* dentre todas as possibilidades de farmacóforo; (2) a seleção ocorreu por maior *score* dentro do grupo com maior número de moléculas sobrepostas. Tendo isso em vista, o resultado da sobreposição e estruturas para inibidores da 14- $\alpha$ -demetilase ativos para *Acanthamoeba* spp. contou com três estruturas, voriconazol, itraconazol e fluconazol, e gerou somente um modelo de farmacóforo, com *score* de 24.495 Jmol e conta com cinco características (*features*): duas propriedades de aromaticidade, dois aceptores de hidrogênio e um polo positivo (Quadro 1). Para este modelo, o composto considerado como pivô foi o itraconazol. Uma razão a ser considerada para a escolha do itraconazol pelo programa *Pharmagist* como base de comparação molecular para gerar o farmacóforo, ao invés do voriconazol, seria a sua maior rigidez estrutural (DROR *et al.*, 2009).

Quadro 1 Pontuação e *features* do farmacóforo gerado para o protozoário *Acanthamoeba* spp.

Nº de moléculas sobrepostas	3
Score	24.495 Jmol
<i>Features</i>	5
Aromático	2
Aceptor de ligação de hidrogênio	2
Positivo	1

A seleção do farmacóforo para o grupo inibidores da 14- $\alpha$ -demetilase ativos de *Trypanosoma cruzi* basearam-se nos mesmos critérios para a escolha do farmacóforo anterior. Frente a isto, o programa conseguiu sobrepor 32 moléculas, dentre as 85 selecionadas do banco de dados de “*training set*”, e utilizou da estrutura do posaconazol como pivô. Dois modelos de farmacóforo foram selecionados. O primeiro, de maior *score*, dentre todas as possibilidades de modelos de farmacóforo para inibidores da 14- $\alpha$ -demetilase ativos de *Trypanosoma cruzi*, obteve 56.685 Jmol

e sobreposição de 4 moléculas. O mesmo conta com doze características (*features*): quatro propriedades de aromaticidade, um perfil de hidrofobicidade, três doadores de hidrogênio, três aceptores de hidrogênio e um polo positivo (Quadro 2). Foi selecionado, utilizando o segundo critério, o farmacóforo com maior *score* dentre o grupo com maior número de moléculas sobrepostas. Este conta com *score* de 32.527 Jmol e cinco moléculas consideradas para a sobreposição. Suas características (*features*) são cinco: três propriedades de aromaticidade, um doador de hidrogênio e um polo positivo.

Quadro 2 Pontuação e *features* do farmacóforo gerado para o protozoário *Trypanosoma cruzi*.

Farmacóforo	A	B
N° de moléculas sobrepostas	4	5
Score	56.685 Jmol	32.527 Jmol
<i>Features</i>	12	5
Aromático	4	3
Hidrofobicidade	1	0
Doadores	3	1
Aceptor	3	0
Positivo	1	1

Por fim, a seleção do farmacóforo para o grupo inibidores da 14-alfa-demetilase ativos de *Acanthamoeba* spp. e *Trypanosoma cruzi* resultou na seleção de dois modelos de farmacóforo, por meio da sobreposição de 32 estruturas, de um total enviado para o programa de 95 estruturas. O farmacóforo de maior *score* dentre todas as possibilidades de modelos de farmacóforo para inibidores da 14- $\alpha$ -demetilase ativos de *Acanthamoeba* spp. e *Trypanosoma cruzi* obteve valor de 52.480 Jmol e sobreposição de três moléculas. O mesmo conta com doze características (*features*): quatro propriedades de aromaticidade, um perfil de hidrofobicidade, três doadores de hidrogênio, três aceptores de hidrogênio e um polo positivo (Quadro 3). Utilizando o critério de seleção por maior *score* dentro do grupo com maior número de moléculas sobrepostas, o segundo farmacóforo adquirido conta com *score* de 34.500 Jmol, seis moléculas sobrepostas e 5 características: três propriedades de aromaticidade, um acceptor de hidrogênio e um polo positivo.

Quadro 3 Pontuação e *features* do farmacóforo gerado para os protozoários *Acanthamoeba* spp. e *Trypanosoma cruzi*.

Farmacóforo	C	D
N° de moléculas sobrepostas	3	6
Score	52.480 Jmol	34.500 Jmol
<i>Features</i>	12	5
Aromático	4	3
Hidrofobicidade	1	0
Doadores	3	0
Aceptor	3	1
Positivo	1	1

## 5.2 VALIDAÇÃO DO FARMACÓFORO

Com intuito de aprimoramento dos modelos de farmacóforo obtidos, utilizou-se a plataforma *Pharmit* para a etapa de validação. As moléculas encontradas através da pesquisa inicial em literatura, o “*training set*”, resultaram em 148 compostos. Estes foram adicionadas em uma base de dados *DUDE-E (decoys)*, para que fossem gerados confôrmeros inativos de cada molécula ativa encontrada, enriquecendo assim a análise, visto que desta forma a triagem de moléculas se aproxima da realidade. Sendo assim, para os compostos ativos fruto de busca na literatura e os 7.400 confôrmeros gerados pelo *DUDE-E (decoys)* foi gerado um fator de enriquecimento (EF) (Equação 4).

$$\text{Fator de Enriquecimento (EF)} = \frac{(148)/(148)}{(148)/(7.548)} = 51$$

Equação 4 Cálculo do fator de enriquecimento EF para compostos *training set*.

O próximo passo foi a inclusão destes compostos na plataforma *Pharmit* como uma quimioteca, com nomenclatura “Suelen”. Os modelos de farmacóforos escolhidos anteriormente foram incluídos no *Pharmit* e assim mudanças de inclusão e exclusão das características foram realizadas. O modelo de farmacóforo gerado com base nas estruturas para inibidores da 14- $\alpha$ -demetilase ativos para *Acanthamoeba* spp. conseguiu filtrar 53.195 *hits*, sendo que dentre estes há moléculas ativas e inativas, e alcançou-se um EF de 2.1. Os *features* remanescentes para este modelo farmacofórico depois de feito o refinamento manual foram: um acceptor de hidrogênio

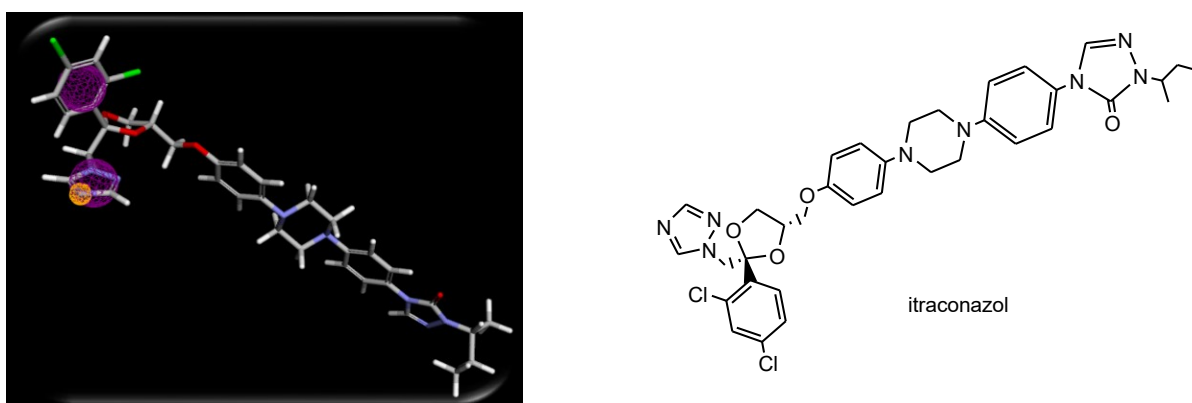
(x 7,33; y -4.254; z 0.201), dois aromáticos (x 9.53; y 0.01; z -0.649) e (x 6.923; y -3.265; z 0.516).

Quadro 4 Representação das características físico-químicas do farmacóforo gerado para inibidores da 14- $\alpha$ -demetilase ativos para *Acanthamoeba* spp.

Score	24.495 Jmol
Aceptor	1
Aromaticidade	2
EF	2,1
Número de compostos filtrados	53.195
Característica dos compostos	Ativos e inativos

Figura 8 Representação do farmacóforo gerado pelo *Pharmit* com base nas estruturas para inibidores da 14- $\alpha$ -demetilase ativos para *Acanthamoeba* spp.

As esperas roxas, representam aromaticidade. E a laranja, aceptores de ligação de hidrogênio. Ao lado representado a estrutura do fármaco itraconazol em formato 2D, para fins comparativos.



Fonte: a autora

Para o modelo de farmacóforo A (Quadro 2), gerado com base nas estruturas para inibidores da 14- $\alpha$ -demetilase ativos para *Trypanosoma cruzi*, detectou 44 moléculas *hits*, todas ativas, alcançando um EF de 50,6. Segundo o cálculo de especificidade e sensibilidade, foram gerados resultados de 1 e 0,29, respectivamente. Para este resultado, as características físico-químicas remanescentes foram: três doadores de hidrogênio (x 3.311; y -4.223; z 1.244), (x

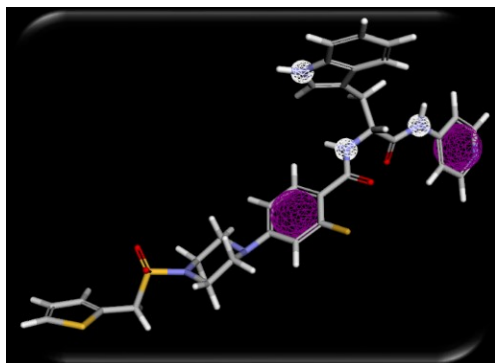
3.488; y 0.032; z 0.338) e (x 7.009; y 1.137; z 0.392), dois aromáticos (x -0.013; y 0.857; z -0.621) e (x 8.353; y 3.578; z 0.472). Assim como, para o modelo de farmacóforo B gerado para inibidores da 14- $\alpha$ -demetilase ativos para *Trypanosoma cruzi* detectou 344 moléculas *hits*. Dentre estas, somente 23 eram ativas. Para este resultado, as características físico-químicas remanescentes foram: um doador de hidrogênio (x 3.488; y 0.032; z 0.338), um íon positivo (x 3.311; y -4.223; z 1.244) e dois aromáticos (x 4.229; y -3.581; z 0.954) e (x -0.013; y 0.857; z -0.621).

Quadro 5 Representação das características físico-químicas do farmacóforo gerado para inibidores da 14- $\alpha$ -demetilase ativos para *Trypanosoma cruzi*.

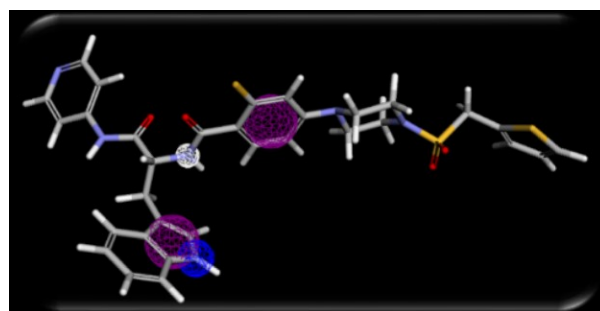
Farmacóforo	A	B
Score	56.685 Jmol	32.527 Jmol
Doadores	3	1
Íon positivo	0	1
Aromaticidade	2	2
EF	50,6	18,5
Número de compostos filtrados	44	344
Característica dos compostos	Todos ativos	Ativos e Inativos
Compostos encontrados	Ativo 88; Ativo 84; Ativo 10; Ativo 112; Ativo 93; Ativo 9; Ativo 92; Ativo 91; Ativo 90; Ativo 87; Ativo 89	Ativo 35; Ativo 31; Ativo 37; Ativo 123; Ativo 78; Ativo 53; Ativo 113; Ativo 28; Ativo 42; Ativo 44; Ativo 118; Ativo 122; Ativo 33; Ativo 126; Ativo 116; Ativo 129; Ativo 120; Ativo 11; Ativo 33; Ativo 125; Ativo 82; Ativo 7; Ativo 1

Figura 9 Representação dos farmacóforos gerados pelo *Pharmit* com base nas estruturas para inibidores da 14- $\alpha$ -demetilase ativos para *Trypanosoma cruzi*

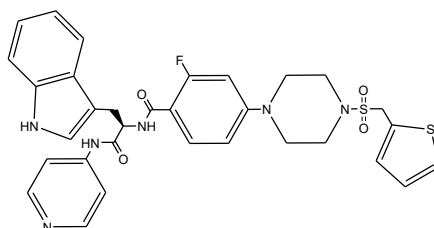
As esperas roxas, representam aromaticidade. As brancas, doadores de ligação de hidrogênio. E, a azul, representa íon positivo. Ao lado representado a estrutura de um composto ativo contra a enzima CYP51 que compõe o Banco de Compostos em formato 2D, para fins comparativos.



Farmacóforo A



Farmacóforo B



Fonte: a autora

Por fim, o modelo de farmacóforo C (Quadro 3), gerado com base nas estruturas para inibidores da 14- $\alpha$ -demetilase ativos para *Acanthamoeba* spp. e *Trypanosoma cruzi*, detectou 23 moléculas *hits*, todas ativas, alcançando um EF de 50,6. Segundo o cálculo de especificidade e sensibilidade, foram gerados resultados de 1 e 0,15, respectivamente. Para este resultado, as características físico-químicas remanescentes foram: três doadores de hidrogênio (x 5.633; y - 4.601; z -0.603), (x 3.735; y 0.292; z -0.129) e (x 6.934; y -1.534; z 0.103), dois aromáticos (x 0.118; y 0.125; z -0.986) e (x 7.755; y -4.057; z 0.957). Assim como, para o modelo de farmacóforo D gerado para inibidores da 14- $\alpha$ -demetilase ativos para *Acanthamoeba* spp. e *Trypanosoma cruzi*, detectou 108 moléculas *hits*. Dentre estas, somente 8 eram ativas e o EF alcançado foi de 23,8. Para este resultado, as características físico-químicas remanescentes foram: um aceptor de hidrogênio (x 8.15; y -5.273; z 1.368),

um íon positivo (x 5.633; y 4.601; z -0.603) e dois aromáticos (x 5.224; y 3.706; z 0.006) e (x 7.755; y -4.057; z 0.957).

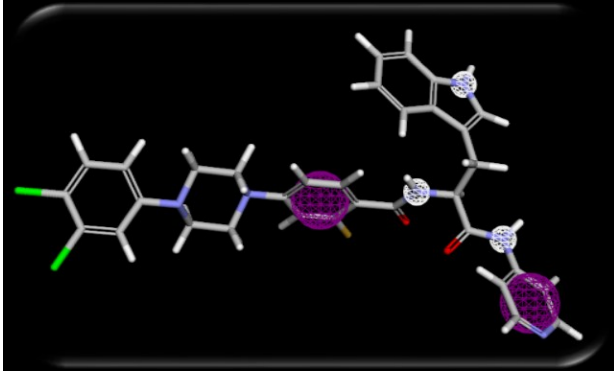
Quadro 6 Representação das características físico-químicas do farmacóforo gerado para inibidores da 14- $\alpha$ -demetilase ativos para *Acanthamoeba* spp. e *Trypanosoma cruzi*.

Farmacóforo	C	D
Score	52.480 Jmol	34.500 Jmol
Aceptores	0	1
Doadores	3	0
Íon positivo	0	1
Aromaticidade	2	2
EF	50,6	23,8
Número de compostos filtrados	23	108
Característica dos compostos	Todos ativos	Ativos e Inativos
compostos encontrados	Ativo 88; Ativo 84; Ativo 10; Ativo 112; Ativo 93; Ativo 9; Ativo 90; Ativo 87; Ativo 89	Ativo 126; Ativo 129; Ativo 42; Ativo 99; Ativo 28; Ativo 102; Ativo 44; Ativo 53

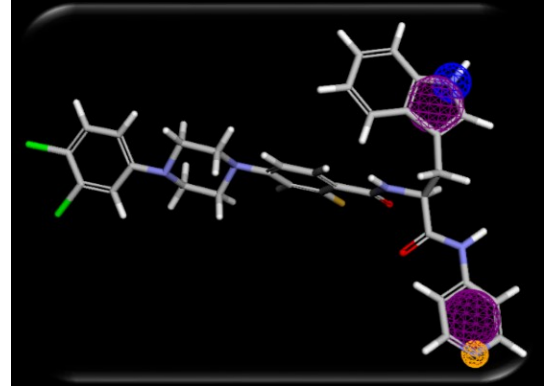


Figura 10 Representação dos farmacóforos gerados pelo *Pharmit* com base nas estruturas para inibidores da 14- $\alpha$ -demetilase ativos para *Acanthamoeba* spp. e *Trypanosoma cruzi*

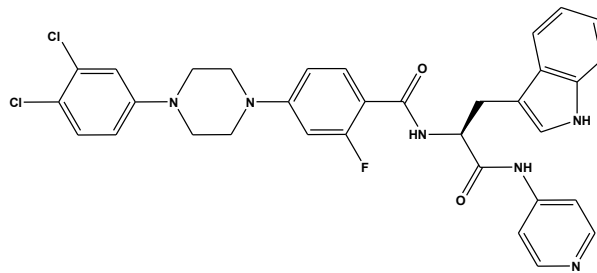
As esperas roxas, representam aromaticidade. As brancas, doadores de ligação de hidrogênio. A laranja, aceptores de ligação de hidrogênio E, a azul, representa íon positivo. Ao lado representado a estrutura de um composto ativo contra a enzima CYP51 que compõe o Banco de Compostos em formato 2D, para fins comparativos.



Farmacóforo C



Farmacóforo D



Fonte: a autora

## 6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Por meio do presente estudo, foram obtidos 5 farmacóforos para inibidores da enzima 14- $\alpha$ -demetilase, correspondendo um para o protozoário *Acanthamoeba spp*, dois para o protozoário *Trypanosoma cruzi* e dois correspondendo a ambos os protozoários.

Os modelos de farmacóforos gerados serão utilizados em estudos de triagem virtual, a fim de identificar compostos *hits* e/ou fragmentos que apresentem possível atividade inibitória sobre a enzima 14- $\alpha$ -demetilase. A partir daí, será feita a predição das propriedades físico-químicas dos mesmos com intuito de selecionar os mais promissores para realização dos ensaios biológicos frente à enzima. Aqueles que forem ativos serão utilizados como protótipos para o planejamento de novas moléculas com atividade e propriedades físico-químicas melhoradas.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, C. H. et al. 4D-QSAR: Perspectives in drug design. **Molecules**, v. 15, n. 5, p. 3281–3294, 2010.
- ANDRICOPULO, A. D.; SALUM, L. B.; ABRAHAM, D. J. Structure-based drug design strategies in medicinal chemistry. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 9, n. 9, p. 771–90, 2009.
- BAIG, A. M. Torn from the headlines: role of public awareness and bench- to-bedside research in prevention and treatment of Acanthamoeba keratitis. **Eye**, p. 1–4, dez. 2018.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. 2ª Edição ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- BRAGA, R. C.; ANDRADE, C. H. Assessing the performance of 3D pharmacophore models in virtual screening: how good are they? **Current topics in medicinal chemistry**, v. 13, n. 9, p. 1127–38, 1 maio 2013.
- BUCKLE, D. R. et al. **Glossary of terms used in medicinal chemistry Part II (IUPAC recommendations 2013)**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2013. v. 48
- CAPORUSCIO, F.; TAFI, A. Pharmacophore Modelling: A Forty Year Old Approach and its Modern Synergies. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 17, p. 2543–2553, 2011.
- CARDOSO, Carmen Lúcia; CASS, Marcela C. de Moraes e Quezia B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. **Química Nova**. São Paulo, p. 175-187. 2 dez. 2008. Disponível em: <[http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol32No1\\_175\\_32RV07488.pdf](http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol32No1_175_32RV07488.pdf)>. Acesso em: 1 dez. 2019.
- CARNT, N.; STAPLETON, F. Strategies for the prevention of contact lens-related Acanthamoeba keratitis: A review. **Ophthalmic and Physiological Optics**, v. 36, n. 2, p. 77–92, 2016.
- CAUMO, K. S. et al. Proteomic profiling of the infective trophozoite stage of Acanthamoeba polyphaga. **Acta Tropica**, v. 140, p. 166–172, 2014.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Acanthamoeba Keratitis Fact Sheet for Healthcare Professionals. 2017. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/acanthamoeba/index.html>>. Acesso em: 27 outubro 2019.
- CLARKE, D. W.; NIEDERKORN, J. Y. The pathophysiology of Acanthamoeba keratitis. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 4, p. 175–180, 2006.
- DAVIES, M. et al. ChEMBL web services: Streamlining access to drug discovery data and utilities. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. W1, p. W612–W620, 2015.

- DOYLE, P. S. et al. A nonazole CYP51 inhibitor cures Chagas' disease in a mouse model of acute infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 6, p. 2480–2488, 2010.
- DROR, O. et al. Novel Approach for Efficient Pharmacophore-Based Virtual Screening: Method and Applications. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, n. 10, p. 2333–2343, 26 out. 2009.
- DUDLEY, R.; JARROLL, E. L.; KHAN, N. A. Carbohydrate analysis of *Acanthamoeba castellanii*. **Experimental Parasitology**, v. 122, n. 4, p. 338–343, ago. 2009.
- FABRES, L. F. et al. Virulent T4 *Acanthamoeba* causing keratitis in a patient after swimming while wearing contact lenses in Southern Brazil. **Acta Parasitologica**, v. 63, n. 2, p. 428–432, 2018.
- GAULTON, A. et al. The ChEMBL database in 2017. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D945–D954, 2017.
- GAURAV, A.; GAUTAM, V. Structure-based three-dimensional pharmacophores as an alternative to traditional methodologies. **Journal of Receptor, Ligand and Channel Research**, v. 7, p. 27–38, 2014.
- GIESE, M. J.; WEISSMAN, B. A. Contact lens associated corneal infections. Where do we go from here? **Clinical and Experimental Optometry**, v. 85, n. 3, p. 141–148, 2002.
- GILSON, M. K. et al. BindingDB in 2015: A public database for medicinal chemistry, computational chemistry and systems pharmacology. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D1045–D1053, 2016.
- GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 81–98, 2010.
- GUNDERTOFTE, K.; JORGENSEN, F. S. **Molecular Modeling and Prediction of Bioactivity**. Copenhagen: Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York, 2000.
- GUNER, O. History and Evolution of the Pharmacophore Concept in Computer-Aided Drug Design. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 2, n. 12, p. 1321–1332, 2005.
- HARGROVE, T. Y. et al. Complexes of *trypanosoma cruzi* Sterol 14 $\alpha$ -Demethylase (CYP51) with Two Pyridine-based Drug Candidates for Chagas Disease: Structural basis for pathogen selectivity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 44, p. 31602–31615, 2013.
- HAY, J. et al. Drug resistance and *Acanthamoeba* Keratitis: The quest for alternative antiprotozoal chemotherapy. **Eye (Basingstoke)**, v. 8, n. 5, p. 555–563, 1994.
- HEIN, M.; ZILIAN, D.; SOTRIFFER, C. A. Docking compared to 3D-pharmacophores: The scoring function challenge. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 7, n. 4, p. e229–e236, 2010.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, D. et al. Evaluation of the sensitivity to chlorhexidine, voriconazole and itraconazole of T4 genotype *Acanthamoeba* isolated from Mexico. **Experimental Parasitology**, v. 197, n. 1, p. 29–35, 2019.

HUGHES, J. P. et al. Principles of early drug discovery. **British Journal of Pharmacology**, v. 162, n. 6, p. 1239–1249, 2011.

KHAN, N. A. *Acanthamoeba*: Biology and increasing importance in human health. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 4, p. 564–595, 2006.

KIDANE, M. E. et al. Sterol methyltransferase a target for anti-amoeba therapy: towards transition state analog and suicide substrate drug design. **Journal of Lipid Research**, v. 58, n. 12, p. 2310–2323, 2017.

KIM, S. H. et al. Comparison of Three-Dimensional Ligand-based Pharmacophores among 11 Phosphodiesterases (PDE 1 to PDE 11) Pharmacophores. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 38, n. 9, p. 1033–1037, 2017.

KUMAR, R.; LLOYD, D. Recent Advances in the Treatment of *Acanthamoeba* Keratitis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, n. 4, p. 434–441, ago. 2002.

LAMB, D. C. et al. Azole Antifungal Agents To Treat the Human Pathogens *Acanthamoeba castellanii* and *Acanthamoeba polyphaga* through Inhibition of Sterol 14 $\alpha$ -Demethylase (CYP51). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 8, p. 4707–4713, 2015.

LEE, J. E. et al. Cysticidal effect on *Acanthamoeba* and toxicity on human keratocytes by polyhexamethylene biguanide and chlorhexidine. **Cornea**, v. 26, n. 6, p. 736–741, 2007.

LEPESHEVA, G. I.; FRIGGERI, L.; WATERMAN, M. R. CYP51 as drug targets for fungi and protozoan parasites: Past, present and future. **Parasitology**, v. 145, n. 14, p. 1820–1836, 2018a.

LEPESHEVA, G. I.; FRIGGERI, L.; WATERMAN, M. R. CYP51 as drug targets for fungi and protozoan parasites: Past, present and future. **Parasitology**, v. 145, n. 14, p. 1820–1836, 2018b.

LEPESHEVA, G. I.; WATERMAN, M. R. CYP51—the omnipotent P450. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 215, n. 1–2, p. 165–170, fev. 2004.

LEPESHEVA, G. I.; WATERMAN, M. R. Sterol 14 $\alpha$ -demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1770, n. 3, p. 467–477, 2007.

LEPESHEVA, G. I.; WATERMAN, M. R. Structural basis for conservation in the CYP51 family. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1814, n. 1, p. 88–93, 2011.

LIPINSKI, C. A. Lead- and drug-like compounds: The rule-of-five revolution. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 1, n. 4, p. 337–341, 2004.

LOMBARDINO, J. G.; LOWE, J. A. The role of the medicinal chemist in drug discovery - Then and now. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 10, p. 853–862, 2004.

LORENZO-MORALES, J. et al. Acanthamoeba keratitis: An emerging disease gathering importance worldwide? **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 4, p. 181–187, 2013.

LORENZO-MORALES, J. et al. Therapeutic targets and investigated treatment strategies in Acanthamoeba keratitis. **Expert Opinion on Orphan Drugs**, v. 4, n. 10, p. 1069–1073, 2016.

MADHAVAN, T. A Review of 3D-QSAR in Drug Design. **Journal of the Chosun Natural Science**, v. 5, n. 1, p. 1–5, 2013.

MARTÍN-NAVARRO, C. M. et al. Evaluation of the in vitro activity of commercially available moxifloxacin and voriconazole eye-drops against clinical strains of Acanthamoeba. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 251, n. 9, p. 2111–2117, 19 set. 2013.

MIGNANI, S. et al. Present drug-likeness filters in medicinal chemistry during the hit and lead optimization process: how far can they be simplified? **Drug Discovery Today**, v. 23, n. 3, p. 605–615, mar. 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASILEIRO. **Córnea**. 2019. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/doacao-de-orgaos/cornea>>. Acesso em: 27 jun. 2019.

MORIYAMA, P.; HOFLING-LIMA, A. Ceratites microbianas relacionadas a lente de contato Contact lens-associated microbial keratitis. **Arq Bras Oftalmol**, v. 71, n. 6, p. 32–6, 2008.

NELSON, D. L. & COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. (5th Edict ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2008.

PATRICK, G. L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. 5ª Edição ed. United Kingdom: Oxford University Press, 2013.

SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D. et al. PharmaGist: a webserver for ligand-based pharmacophore detection. **Nucleic acids research**, v. 36, n. Web Server issue, p. 223–228, 2008.

SEAL, D. V. Acanthamoeba keratitis update - Incidence, molecular epidemiology and new drugs for treatment. **Eye**, v. 17, n. 8, p. 893–905, 2003.

SIFAUI, I. et al. Toxic effects of selected proprietary dry eye drops on Acanthamoeba. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 8520, dez. 2018.

SUNSERI, J.; KOES, D. R. Pharmit: interactive exploration of chemical space. **Nucleic acids research**, v. 44, n. W1, p. W442–W448, 2016.

SZENTMÁRY, N. et al. Acanthamoeba keratitis – Clinical signs, differential diagnosis

and treatment. **Journal of Current Ophthalmology**, v. 31, n. 1, p. 16–23, 2019.

THOMSON, S. et al. Characterisation of sterol biosynthesis and validation of 14 $\alpha$ -demethylase as a drug target in *Acanthamoeba*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2017.

VERÍSSIMO, C. D. M. et al. Infection in a rat model reactivates attenuated virulence after long-term axenic culture of *Acanthamoeba* spp. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 7, p. 832–835, 2013.

VISVESVARA, G. S.; MOURA, H.; SCHUSTER, F. L. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 1–26, jun. 2007.

VUORINEN, A.; ODERMATT, A.; SCHUSTER, D. Reprint of “in silico methods in the discovery of endocrine disrupting chemicals”. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 153, p. 93–101, 2015.

VUORINEN, A.; SCHUSTER, D. Methods for generating and applying pharmacophore models as virtual screening filters and for bioactivity profiling. **Methods**, v. 71, n. C, p. 113–134, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Initiative for the Elimination of Avoidable Blindness: Action Plan 2006-2011. **WHO Press**, p. 1–87, 2007.

YANG, S. Y. Pharmacophore modeling and applications in drug discovery: Challenges and recent advances. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 11–12, p. 444–450, 2010.