



STAES 22'

Seminário de Tecnologias Aplicadas em Educação e Saúde

Proposta metodológica para o Ensino de ferramentas computacionais aplicadas ao planejamento de fármacos

Tainá L. Reis¹, Diego R. C. da Matta¹, André L. B. Teles^{1,2}

¹Universidade do Estado da Bahia, Depto. de Ciências da Vida, Curso Farmácia, Brasil

²Universidade do Estado da Bahia, Depto. de Ciências da Vida, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGFARMA), Brasil

Email de contato: tainna_lessa@outlook.com

Resumo

As competências do profissional farmacêutico que envolvem a pesquisa de novos medicamentos têm tomado lugar de destaque. Uma técnica amplamente empregada para reduzir custos e potencializar a chance de sucesso nesse processo consiste na modelagem molecular computacional (*in silico*). Dada a importância dessas ferramentas na formação do farmacêutico, o presente trabalho objetivou relatar a aplicação de uma metodologia didática de aulas práticas que ilustram sua aplicação no contexto de um componente curricular do curso de Farmácia. Em sala, equipes de 3 a 4 alunos foram formadas e foi solicitado a cada equipe a seleção de um alvo farmacológico. As coordenadas atômicas do alvo em complexo com um inibidor foram obtidas pelos discentes a partir do Protein Data Bank, que procederam com a submissão do complexo cristalográfico ao servidor PDB2PQR para adição de átomos de hidrogênio à estrutura do alvo. As coordenadas do inibidor co-cristalizado foram utilizadas para a delimitação do espaço para um acoplamento molecular, executado pelo programa *on-line* DockThor. A avaliação da performance do DockThor foi realizada através do *redocking* (re-acoplamento) e investigação da sua capacidade em discriminar ligantes ativos de não ativos. Por fim, os estudantes propuseram novas moléculas candidatas a fármacos e avaliaram sua afinidade frente ao alvo, através do protocolo discutido, comparando os resultados com o ligante cristalizado ao alvo. Concluiu-se que a metodologia se mostrou útil para ilustrar a aplicação de ferramentas *in silico* no ensino de competências referentes a Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos para o Curso de Farmácia.

Palavras-chave: farmácia, profissional, formação, planejamento, método *in silico*

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil vive um movimento de intensa reestruturação da profissão farmacêutica, o que envolve a formação e a prática dos profissionais da saúde em favor do bem-estar e da qualidade de vida das pessoas (CONAMA, 2017). Todavia, além de estabelecer e otimizar o elo entre o paciente e o medicamento no processo saúde doença, o perfil do profissional farmacêutico engloba todas as etapas que envolvem o medicamento, desde o seu planejamento até



STAES 22'

Seminário de Tecnologias Aplicadas em Educação e Saúde

sua dispensação, logo, toda essa multiplicidade de competências que são exigidos para o exercício da profissão guia os componentes curriculares da graduação na formação dos estudantes.

Nesse contexto, as competências que envolvem o planejamento de novos medicamentos têm recebido grande destaque, o que em grande parte se deve a recente demanda por vacinas para o enfrentamento da COVID-19. Outro avanço recente que ilustra a importância e avanço nessa área, consiste na Tirzepatida, um composto muito promissor que promete revolucionar o tratamento do diabetes mellitus tipo 2, no combate à resistência microbiana, dentre outras (SABE *et al.*, 2021).

No processo de desenvolvimento de um novo fármaco, uma abordagem amplamente utilizada envolve a tentativa de modulação de alvos terapêuticos/farmacológicos, fundamentais para a progressão da doença. Pequenas moléculas candidatas a novos fármacos são então projetadas e testadas frente a estrutura alvo em questão. Essa estratégia foi utilizada, por exemplo, durante o planejamento do anti-hipertensivo propranolol, desenvolvido por James Black e colaboradores, que teve como base a premissa de que antagonistas seletivos de receptores b-adrenérgicos teriam propriedades hipotensoras. Dessa forma, partindo da estrutura da adrenalina, agonista natural do alvo, como protótipo, Black formulou a hipótese de modificá-la estruturalmente de maneira a obter antagonistas seletivos (BARREIRO, 2015, p. 184).

Todavia, testes laboratoriais para identificação de substâncias moduladoras dos alvos farmacológicos são muito dispendiosos, de forma que o conhecimento de técnicas que otimizem esse processo de testagem é fundamentais para redução dos custos dessas etapas e, portanto, igualmente importantes que o profissional farmacêutico tenha domínio sobre suas possibilidades. Uma das técnicas mais empregadas para potencializar a descoberta de novas substâncias ativas no desenvolvimento de fármacos, e reduzir os custos do processo, consiste em métodos de modelagem molecular computacionais, também denominados de métodos *in silico*. Uma grande vantagem da aplicação dessa técnica consiste na possibilidade de simulações de interações entre candidatos a novos fármacos e seu alvo farmacológico de forma teórica no computador, permitindo a triagem, planejamento e priorização de candidatos a fármacos a serem encaminhados para os testes em bancada, aumentando as chances de identificação de atividade farmacológica (RODRIGUES *et al.*, 2012; BARREIRO *et al.*, 1997).

Exemplo do sucesso do emprego da estratégia *in silico* na descoberta de fármacos resultaram em medicamentos quimioterápicos disponíveis para o tratamento do câncer, a exemplo do Darolutamida, um potente antiandrogênico utilizado no tratamento do câncer de próstata (LIU, S. *et al.*, 2018) e do Fedratinib, um inibidor da tirosina quinase usado na clínica para tratar doenças mieloproliferativas (CONSTANTINESCU, 2009).

A abordagem *in silico* de simulação e predição da afinidade e interações químicas entre pequenas moléculas candidatas a fármacos e a estrutura do alvo farmacológico segue a linha do Planejamento de Fármacos Baseado na Estrutura do Receptor (do inglês, *Structure Based Drug Design* – SBDD). A técnica *in silico* denominada de acoplamento ou, do inglês, *Docking* molecular é a abordagem mais amplamente utilizada em trabalhos nessa temática (TEMML, KUTIL, 2021). Diversos programas de acoplamento molecular estão atualmente disponíveis para utilização, a exemplo do Autodock 4.2 (KNEGTEL; KUNTZ; OSHIRO, 1997), Autodock Vina (TROTT.; OLSON; 2010), Glide (RUDDEN; DEGIACOMI, 2019), GOLD (RUDDEN; DEGIACOMI, 2019), dentre outros. Alguns reviews de avaliação de programas de acoplamento destacam a boa performance de programas como GOLD, cuja licença para a utilização é paga (WANG *et al.*, 2016).



STAES 22'

Seminário de Tecnologias Aplicadas em Educação e Saúde

O programa DockThor tem também sido destaque pela sua utilização em trabalhos focando inclusive o planejamento de fármacos contra alvos terapêuticos do SARS-CoV-2 (GUEDES et al, 2021).

A utilização dessa técnica de forma integrada no processo de otimização de propriedades moleculares de compostos candidatos a fármacos é um exemplo de abordagem muito utilizada. Nessa estratégia, os dados obtidos do acoplamento molecular são validados mediante avaliação biológica com testes *in vitro* frente ao alvo farmacológico, o que conecta os experimentos teóricos com a observação prática. Diversos exemplos da aplicação exitosa de programas de acoplamento na otimização de compostos protótipos são descritos, a exemplo do uso do programa GOLD para otimização de candidatos a antiinflamatórios frente a estudos contra a ciclooxigenase, cujos dados foram validados por ensaios celulares (CHEUNG et al, 2018). Pode-se citar também o emprego do programa Sybyl na otimização de candidatos a fármacos contra HIV frente a estudos contra a transcriptase reversa, cujos dados foram validados mediante ensaios enzimáticos (MAI et al, 2001).

Dada a importância do emprego dos métodos *in silico* para o planejamento de fármacos, se fundamenta a magnitude em demonstrar sua aplicabilidade no ambiente acadêmico para a formação do profissional farmacêutico. Nessa perspectiva, um desafio encontrado é como abordar, de forma eficiente, essas ferramentas e ilustrar sua aplicação no planejamento de fármacos, visando a capacitação crítica do estudante de Farmácia. Diante do exposto, no presente trabalho apresentamos uma proposta metodológica de aulas práticas com o objetivo de ilustrar a utilização das técnicas *in silico* aplicadas no planejamento de fármacos, no contexto de um componente curricular do curso de graduação em Farmácia.

2. METODOLOGIA

No presente estudo, a metodologia didática proposta para exemplificar a utilização de técnicas *in silico* no planejamento de fármacos foi aplicada às turmas de discentes do componente curricular Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos do Curso de Bacharelado em Farmácia da Universidade do Estado da Bahia, durante os semestres letivos 2021.2 e 2022.1. Os alunos foram divididos em equipes de 3 a 4 componentes e foi solicitado a cada equipe a seleção de um alvo farmacológico de uma lista pré-definida, dentre os salvos disponíveis na área “Targets” da plataforma DUD-E (SILVA et al (2019); <http://pdb2pqr.com.br>), para melhor delimitação e direcionamento. Foi solicitado a cada equipe a preparação de uma apresentação explicando a patologia envolvida com o alvo escolhido, a necessidade de novos fármacos para a referida patologia bem como as razões que tornam o alvo promissor para o desenvolvimento de um novo fármaco.

Após isso, considerando a abordagem de Planejamento de Fármacos Baseado na Estrutura dos Ligantes (LBDD, do inglês Ligand Based Drug Design), as coordenadas do alvo farmacológico foi obtida do Protein Data Bank (PDB) (HAMILTON (1971); <https://www.rcsb.org/>). A seleção da estrutura do alvo farmacológico no PDB seguiu o código identificador sugerido pelo DUD-E na área “Targets” da plataforma (MYSINGER et al (2012); <http://dude.docking.org/>), uma vez que a estrutura contém um ligante co-cristalizado, cujas coordenadas e estrutura química são utilizadas em etapas posteriores.



STAES 22'

Seminário de Tecnologias Aplicadas em Educação e Saúde

Para prosseguimento, os alunos foram orientados a submeter a estrutura do alvo farmacológico obtido do PDB à plataforma PDB2PQR (JURRUS, 2018; <https://server.poissonboltzmann.org/pdb2pqr>) para adição de átomos de hidrogênio, uma vez que a estrutura oriunda do PDB é fornecida sem tais átomos. Também foi solicitado aos discentes que identificassem na literatura a informação do pH do meio biológico específico no qual o alvo farmacológico está inserido, para registrar essa informação na plataforma PDB2PQR no momento da adição dos átomos de hidrogênio.

O programa PDB2PQR, por sua vez, consiste numa plataforma que automatiza importantes processos necessários à preparação de estruturas químicas para simulações de interações biomoleculares. Para o presente caso, utilizamos a capacidade do programa de adicionar átomos de hidrogênio e definição de estados de protonação dos aminoácidos dos alvos moleculares, sob o pH informado. Como resultado, um arquivo na extensão .PQR é gerado pelo programa. Esse formato de arquivo consiste numa variação do formato PDB, que contém todas as informações do formato PDB além de diversas informações adicionais como dados de cargas atômicas que, embora não utilizadas no presente trabalho, são úteis em diversas outras aplicações, como em cálculos de dinâmica molecular. (JURRUS, 2018).

O arquivo da estrutura do alvo farmacológico contendo os átomos de hidrogênio fornecido na extensão .pqr foi posteriormente convertido para o formato .pdb através do servidor BioComp (<https://datascience.unm.edu/tomcat/biocomp/convert>), formato compatível como programa de acoplamento utilizado.

De posse da estrutura do alvo farmacológico preparada para os cálculos de acoplamento, o programa Chimera (PETTERSEN et al, 2004; <https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/download.html>) foi na sequência utilizado para delimitação das coordenadas espaciais do sítio de ligação a ser considerado para os cálculos de acoplamento molecular posteriores. Estas, por sua vez, foram definidas a partir das coordenadas do ligante co-cristalizado à estrutura do alvo farmacológico. Para tanto, o arquivo contendo as coordenadas do ligante foi obtido no site do PDB, na página referente à estrutura do alvo, no campo *Small molecules* e na opção *Download Instance Coordinates*". O arquivo do ligante no formato .mol2 obtido com os passos acima é aberto no programa Chimera (PETTERSEN et al, 2004; <https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/download.html>) simultaneamente com a estrutura preparada do alvo farmacológico, permitindo utilizar as coordenadas do ligante para a delimitação das coordenadas de acoplamento no Chimera através do módulo *Surface/binding analysis>Autodock Vina*.

A etapa seguinte consistiu na realização dos cálculos de acoplamento molecular, o quais foram desenvolvidos através do programa *on-line* DockThor (GUEDES et al, 2021; <https://www.dockthor.lncc.br/v2/>). O primeiro cálculo de acoplamento foi realizado para o próprio ligante presente na estrutura cristalográfica. Para tal, os alunos são orientados a fornecer os arquivos da proteína após a preparação, do ligante co-cristalizado obtido do PDB (HAMILTON, 1971; <https://www.rcsb.org/>), bem como das coordenadas de acoplamento obtidas com o Chimera (PETTERSEN et al, 2004; <https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/download.html>). A partir dos resultados desse primeiro cálculo com o ligante co-cristalizado, se comparou a pose do ligante gerada no cálculo de acoplamento com a pose biológica do mesmo ligante, conforme encontrada na estrutura cristalográfica (*redocking*). O desvio entre as duas geometrias foi mensurado através do valor de RMSD, com auxílio da própria plataforma do DockThor (GUEDES et al, 2021; <https://www.dockthor.lncc.br/v2/>).



A partir disso, os alunos foram orientados a levantar uma lista de 5 compostos ativos e 50 inativos (decoys) a partir do servidor DUD-E (MYSINGER et al (2012); <http://dude.docking.org/>) a fim de avaliar a capacidade do programa de acoplamento em identificar as coordenadas dos átomos do ligante no Dockthor (GUEDES et al (2021); <https://www.dockthor.lncc.br/v2/>). A partir dos resultados, se simulou, em menor escala, a avaliação da performance do software no reconhecimento e diferenciação entre compostos ativos e inativos, através da equação 1, de percentual de recuperação de compostos ativos. Na sequência, foi solicitado aos alunos que propusessem novas moléculas candidatas a fármacos a partir de modificações na estrutura do ligante co-cristalizado à estrutura do seu alvo farmacológico no PDB. A proposta era que as modificações realizadas explorassem melhor o sítio de ligação na estrutura do receptor. Para tanto, os alunos foram orientados a observar no módulo “3D view” da página do PDB (<https://www.rcsb.org/3d-view/3CEN>) referente à estrutura cristalográfica utilizada, as interações que ocorrem entre o ligante o receptor para propor as alterações solicitadas.

Equação 1

$$\% \text{ de recuperação de compostos ativos} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de compostos ativos entre os 10 melhores pontuados}}{\text{N}^\circ \text{ total de compostos ativos presentes}}$$

Os alunos desenharam de forma bidimensional os compostos propostos no programa MarvinChemAxon (<https://marvinjs-demo.chemaxon.com/latest/demo.html>), converteram os arquivos para coordenadas 3D, salvaram os arquivos no formato mol2 e submeteram ao acoplamento molecular pelo Dockthor (GUEDES et al, 2021; <https://www.dockthor.lncc.br/v2/>). As interações entre o novo ligante e o receptor pela pose de acoplamento foram comparadas às interações ligante-receptor presentes na estrutura cristalográfica. Adicionalmente, foi solicitado aos alunos que avaliassem teoricamente a biodisponibilidade oral do novo composto proposto através do servidor SwissADME.ch (<http://www.swissadme.ch/>). Ao final da disciplina, cada equipe foi convidada a apresentar os resultados obtidos nas etapas executadas, até o candidato a novo fármaco proposto.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A título de exemplo para o presente trabalho, vamos ilustrar os resultados obtidos de uma das equipes da turma que cursou o componente “Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos” no semestre letivo 2022.1. Os alunos integrantes da equipe elegeram o Fator XA de coagulação como alvo terapêutico, uma enzima envolvida no processo fisiológico da cascata de coagulação sanguínea, sendo explorada como alvo para ação anticoagulante em doenças trombóticas, onde a hemostasia fica comprometida. Nesse quadro, distúrbios de oclusão das vênulas, arteríolas e capilares podem gerar trombos. Dependendo do tamanho do trombo, há risco de entupimento e evolução para a condição de embolia pulmonar (FRANCO, 2001).

De forma resumida, o processo de coagulação decorrente de lesões estruturais (injúria vascular) ou alterações bioquímicas (liberação de citocinas) envolve complexas interações entre proteases plasmáticas e seus cofatores, que culminam na gênese da enzima trombina que, por proteólise, converte o fibrinogênio solúvel em fibrina insolúvel (FERREIRA et al, 2010).

As classes de medicamentos disponíveis para o tratamento de disfunções do sangue são os inibidores plaquetários, anticoagulantes e trombolíticos. Segundo Clark et al (2013), os inibidores plaquetários inibem a ciclo-oxigenase-1 (COX-1) ou bloqueiam os receptores de GP IIb/IIIa ou

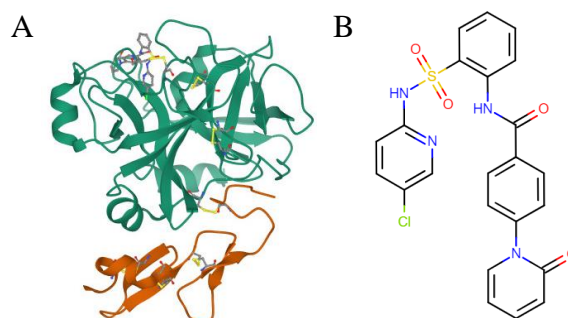


ADP, interferindo, assim, no sinal que promove a aglutinação plaquetária. Representantes da classe são o ácido acetilsalicílico e clopidogrel. Os fármacos anticoagulantes inibem a ação dos fatores de coagulação (os inibidores de trombina, como a heparina e os fármacos heparina-relacionados) ou interferem na síntese dos fatores de coagulação (os antagonistas da vitamina K, como a varfarina). Os fármacos trombolíticos ativam a conversão do plasminogênio em plasmina, uma serina-protease que hidrolisa fibrina e, assim, dissolve coágulos. Representantes desta classe são o estreptoquinase e alteplase.

As etapas de coagulação tanto pela via extrínseca (que envolve elementos pouco frequentes no espaço intravascular) quanto intrínseca (iniciada por componentes presentes no intravascular) convergem na ativação do Fator XA da coagulação (FRANCO, 2001), desencadeando a geração de trombina e, subsequentemente, formação de fibrina (FERREIRA et al, 2010). Devido a importância do Fator XA ativado no processo de coagulação, essa enzima tem sido um alvo farmacológico amplamente explorado e os anticoagulantes mais recentes introduzidos no mercado incluem inibidores dessa enzima, como rivaroxabana (Xarelto), apixabana (Eliquis) e a edoxabana (Lixiana, Savaysa).

A partir da definição do alvo e defesa da sua importância pelos estudantes, estes seguiram para obtenção no Protein Data Bank das coordenadas atômicas da estrutura cristalográfica do Fator X de coagulação ativado (Fator XA), a qual encontrava-se co-cristalizada ao fármaco inibidor baseado no grupo antranilamida. Com o código identificador 3CEN no PDB, o grupo descreveu brevemente a estrutura da proteína em complexo com o fármaco, a qual foi elucidada através de difração de raio-X sob resolução de 1,6 Å, sendo constituída por duas cadeias, uma leve com 234 aminoácidos e uma pesada com 52 resíduos. A cadeia leve contém domínio GLA (gama-carboxiglutâmico) e dois domínios EGF1-EGF2 (semelhantes a fator de crescimento epidérmico). (CORTE et al, 2008).

Figura 1. Informações referentes à estrutura cristalográfica do Fator XA em complexo com inibidor baseado no grupo antranilamida (PDB: 3CEN). (A) - Representação 3D da enzima Fator XA. A cadeia pesada da estrutura está representada na cor verde e a cadeia leve, na cor laranja. (B) - Estrutura química do inibidor co-cristalizado.



Rivaroxabano, o fármaco mais conhecido da classe, é um composto derivado da oxazolidiona que inibe diretamente o fator XA e tem posologia única diária. O rivaroxabano liga-se diretamente ao centro ativo do FXa e bloqueia a interação com o seu substrato. Dessa forma, a inibição do FXa atenua a formação de trombina — mas deixa imune a trombina existente, capaz de manter a hemóstase primária — e previne a conversão de fibrinogênio em fibrina. (FLATO, 2011; SILVA, 2012).



STAES 22'

Seminário de Tecnologias Aplicadas em Educação e Saúde

Prosseguindo, através do módulo 3D View do PDB, os discentes analisaram visualmente a estrutura do alvo molecular a nível tridimensional, com ênfase na complementaridade molecular entre fármaco e receptor, permitindo melhor compreensão das principais interações intermoleculares realizadas entre ligante e receptor para identificação dos grupos farmacofóricos do fármaco. Na sequência, a estrutura do complexo fármaco-receptor foi recuperada do servidor PDB2PQR (DOLINSKY, T.J. *et al*, 2007; <https://server.poissonboltzmann.org/pdb2pqr>) após adição dos átomos de hidrogênio sob pH 7,0, a qual foi encaminhada juntamente a estrutura 3D do inibidor acoplado obtida no PDB ao programa Chimera para a delimitação do espaço de acoplamento molecular. Dessa forma, as coordenadas do ligante foram utilizadas para delimitação do espaço de procura do *docking*, cujos valores encontrados foram = tamanho X (12.1517); Y (11.1237) e Z (15.1804) e centro X (7.88097); Y (41.3361) e Z (61.0568).

De posse das estruturas da proteína e do ligante e das coordenadas do espaço de procura do cálculo de acoplamento, os alunos executaram o primeiro cálculo de acoplamento com a estrutura do inibidor baseado no grupo antranilamida frente ao sítio catalítico do Fator XA, através do programa DockThor (GUEDES, I.A *et al* (2021); <https://www.dockthor.lncc.br/v2/>). Através de discussões com a turma, foi esclarecido que a técnica de acoplamento ou *docking* molecular, por sua vez, consiste na aplicação de algoritmos e funções de pontuação para predição teórica da pose ou geometria de ligação de um determinado ligante frente a um sítio catalítico, bem como da sua afinidade frente ao alvo farmacológico em questão, respectivamente. Discussões ao longo da disciplina foram necessárias para esclarecer os conceitos dessa técnica, bem como dos desafios inerentes, uma vez que se trata de um método passível de resultados inexatos e que carece de testes e validações, antes da sua aplicação para o fim almejado. A capacidade de predição dos modos de ligação e afinidade de compostos que interagem com o sítio do ligante de uma proteína é um dos maiores desafios do desenvolvimento de fármacos (RODRIGUES *et al*, 2012).

Prosseguimos então para análise dos primeiros resultados do cálculo de acoplamento, onde se investigou primeiramente a capacidade do programa em reproduzir a pose biológica do inibidor acoplado no sítio de ligação da enzima, conforme estrutura cristalográfica (redocking). Assim, o RMSD (do inglês, Root Mean Square Deviation, cuja tradução para o português é Raiz Quadrada do Desvio Quadrático Médio), que é um parâmetro que considera o desvio entre a orientação cristalográfica e a orientação obtida pelo cálculo de acoplamento, obteve o valor de 2,4 Å. Quando o RMSD é inferior a 2Å, costuma-se julgar que a solução encontrada pelo programa é satisfatória (MIZUTANI *et al.*, 2006). Considerando os objetivos do presente trabalho, consideramos o valor obtido pela equipe como aceitável. Adicionalmente, o dado do acoplamento revelou um escore ou afinidade de -9640 Kcal/mol atribuído pela função de pontuação do programa ao inibidor acoplado frente ao Fator XA. Dessa forma, se considerou que o programa foi capaz de identificar a pose biológica do fármaco frente ao Fator XA.

Prosseguindo com a avaliação da performance do programa, se procurou investigar se o mesmo é capaz de atribuir corretamente as afinidades de ligantes ativos e inativos frente ao alvo farmacológico, por meio da atribuição do escore de acoplamento. Rodrigues *et al* (2012) explica que a função de pontuação ou escore tem como propósito classificar os compostos por afinidade, facilitando assim, a diferenciação entre ligantes promissores e moléculas não-ligantes.

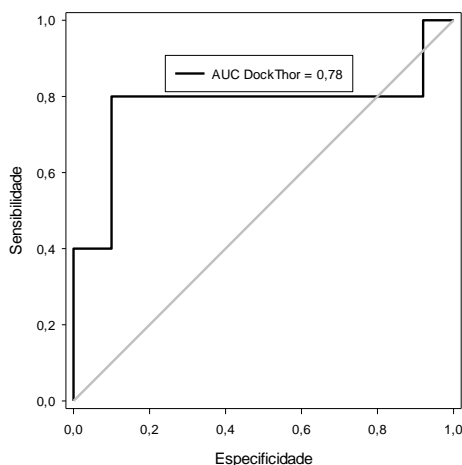
Para avaliar se o escore atribuído pelo programa fazia sentido biológico (ou seja, melhores e piores escores sendo atribuído para ligantes e Decoys, respectivamente), o poder de discriminação entre compostos reconhecidamente ativos e compostos inativos (decoys) foi determinado. Para tanto,



compostos ativos (5) e inativos (50) obtidos no banco de dados DUD-E foram submetidos ao acoplamento molecular no DockThor frente ao sítio catalítico do Fator XA. Ao todo, 55 moléculas foram usadas para testar a performance do programa frente a diferenciação das mesmas a partir dos dados de afinidade. Essa etapa permitiu a identificação de 4 dos 5 compostos ativos entre as 10 primeiras moléculas em ordem de afinidade ao Fator XA, conforme predição pelo programa, representando, nesse teste simplificado, uma taxa de 80% de recuperação, com escores de afinidade entre -10.387 Kcal/mol até -8.832 Kcal/mol.

Para validar em termos estatísticos a performance do programa de acoplamento em discriminar, para o alvo em questão, compostos bioativos de *decoys*, os dados de afinidade gerados nos cálculos foram submetidos à análise da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*), uma ferramenta útil para avaliar a sensibilidade e especificidade de métodos discriminatórios em química medicinal (LÄTTI, NIINIVEHMAS, PENTIKÄINEN, 2016). Na referida análise, a área sob a curva (AUC) apresentou valor de 0,78 (figura X). Valores de AUC iguais a 0,5 indicam métodos aleatórios quanto ao poder discriminatório, enquanto uma AUC de 1,0 representa um método discriminatório perfeito. Ferramentas *in silico* com valores de AUC acima de 0,7 obtidos em testes similares são consideradas adequadas, sendo aplicadas para identificação de potenciais compostos bioativos (MASCARENHAS et al, 2020).

Figura 2 - Curva ROC a partir dos dados de afinidade preditos pelo programa DockThor para decoys e ativos frente ao sítio catalítico do Fator XA. A linha diagonal representa um modelo que não seria melhor do que uma seleção aleatória (AUC 0,50).



Os resultados dessas análises permitiram ilustrar aspectos importantes para validação de uma técnica *in silico* de identificação de compostos ativos, mostrando inclusive que o programa é passível de erros, uma vez que um dos cinco compostos ativos não foi identificado entre os primeiros compostos em ordem de afinidade. Assim, esses dados permitem ilustrar que se trabalha com a investigação da probabilidade do programa de acoplamento identificar compostos promissores úteis para o planejamento de fármacos. Foi esclarecido também aos discentes que essa mesma análise precisaria ser refeita na proporção de 50 decoys para cada composto ativo para replicar o recomendado em literatura (<http://dude.docking.org/targets/fa10>)

Após a demonstração simplificada da avaliação do programa de acoplamento, a última etapa consistiu na proposição de potenciais compostos ativos pela equipe de alunos. Nesse sentido, no



processo de planejamento, a equipe focou em conservar os grupos aromáticos e átomos com um par de elétrons desemparelhados do inibidor baseando em, envolvendo testes com piridina, pirrol, tiofeno e furano, totalizando quatro propostas (figura 3). Os resultados dos cálculos de acoplamento dos compostos propostos revelaram que dois destes tiveram scores de afinidade de -9.476 Kcal/mol e -9.475 Kcal/mol, respectivamente, valores muito próximos ao do inibidor co-cristalizado (-9640 Kcal/mol).

Figura 3 - Estrutura dos compostos propostos pela equipe como candidatos a inibidores do Fator XA

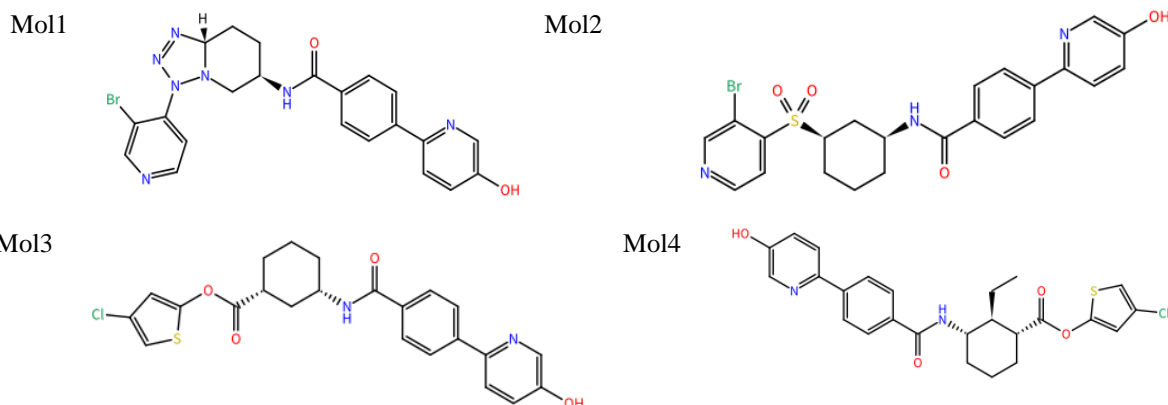


Tabela 1 - E_{score} dos protótipos desenvolvidos pela equipe após docking

| Protótipo | Score de afinidade |
|-----------|--------------------|
| Mol1 | -8910 |
| Mol2 | -9026 |
| Mol3 | -9476 |
| Mol4 | -9475 |

Tabela 2 – Proporção entre compostos ativos e sua taxa de recuperação

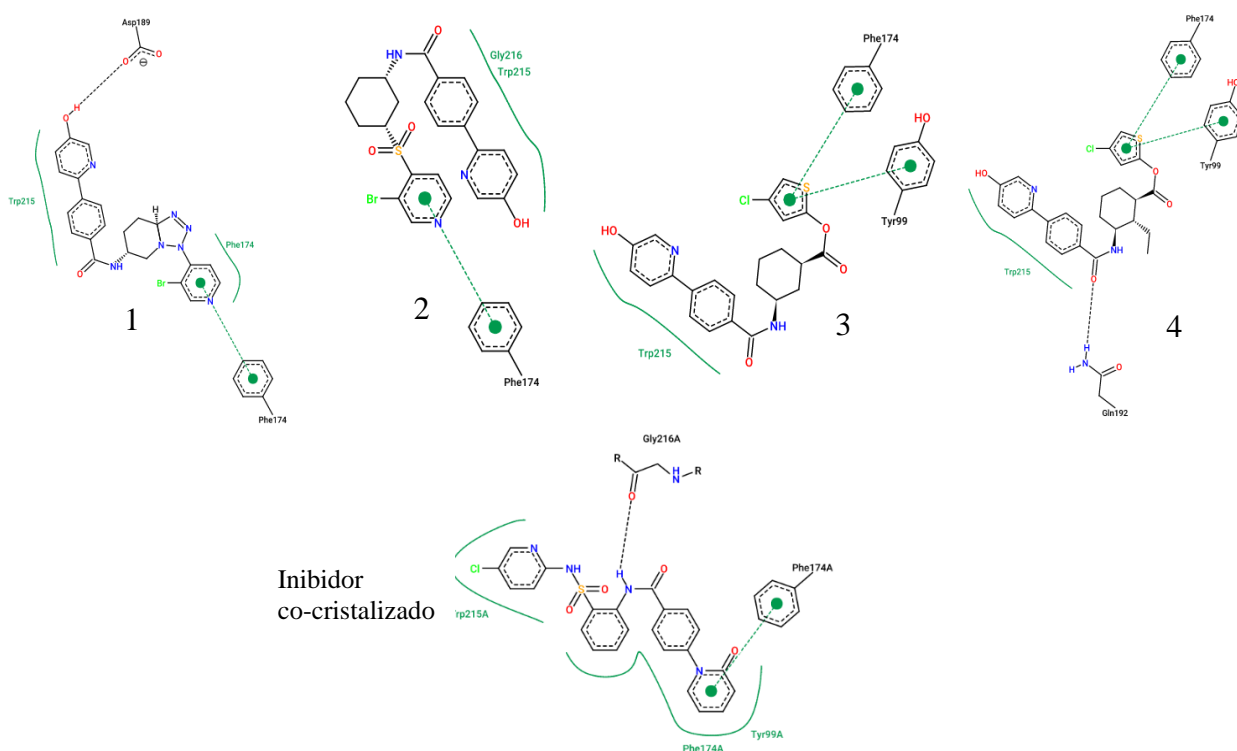
| Numeração | Qtde. de ativos | Recuperação (%) |
|-----------|-----------------|-----------------|
| 5 | 2 | 40 |
| 11 | 4 | 80 |
| 17 | 4 | 80 |
| 22 | 4 | 80 |
| 28 | 4 | 80 |
| 33 | 4 | 80 |
| 39 | 4 | 80 |
| 44 | 4 | 80 |
| 50 | 4 | 80 |
| 55 | 5 | 100 |

As poses de interação dos compostos propostos pela equipe com o FatorXA sugeridas pelo programa de acoplamento revelam algumas informações interessantes. A porção fenilbenzamida presente tanto no inibidor cristalográfico quanto nos protótipos 1 a 4 mantém interações hidrofóbicas com o triptofano 215 (figura 4), dado que demonstra que o programa foi capaz de identificar interações intermoleculares corretamente para os compostos da equipe.



Adicionalmente, os resultados do acoplamento sugerem que as porções 3-bromopiridina dos compostos 1 e 2, e 3-clorotiofeno dos compostos 3 e 4 realizam interações hidrofóbicas com a fenilalanina 174, interação não explorada pelo grupo 3-cloropiridina presente no inibidor co-cristalizado ao alvo farmacológico, o que pode representar uma eventual vantagem desses compostos para interação com o alvo.

Figura 4. Interações intermoleculares apontadas para os derivados 1 a 4, bem como para o inibidor co-cristalizado à estrutura do Fator XA, apontadas pelo servidor PoseView. Linhas tracejadas em verde e preto entre os compostos e os resíduos de aminoácidos apontam interações hidrofóbicas e polares, respectivamente.



Vale ressaltar que, apesar dos compostos desenvolvidos pela equipe apresentarem scores próximos ao do fármaco, isso não significa que tais protótipos apresentariam bom desempenho *in vivo*, podendo ser necessário mais modificações a nível molecular, tais como adição ou exclusão de grupos funcionais. Nessa perspectiva, a avaliação de descritores físico-químicos que se relacionam a biodisponibilidade oral para os compostos propostos, por exemplo, poderia auxiliar na escolha de quais seriam os mais promissores para testes, considerando aqueles com menores chances de apresentar problemas farmacocinéticos.

Os resultados obtidos no servidor SwissADME dos 2 protótipos em potencial desenvolvidos pela equipe ficaram dentro dos principais parâmetros farmacocinéticos, conhecidos como regras de Lipinski. Em 1997, Christopher A. Lipinski e colaboradores, trabalhando para a Indústria Farmacêutica Pfizer, realizaram um estudo com mais de 2000 fármacos, no qual observaram que algumas propriedades físico-químicas eram necessárias para que as drogas apresentassem boa solubilidade em água e permeabilidade intestinal, características essenciais para a disponibilidade oral (SANTOS; GONSALVES; ARAUJO, 2018). Os parâmetros que estabelecem que o protótipo é candidato a um bom fármaco são: log P maior ou igual a 5, massa molecular menor ou igual a 500 g/mol, aceptores de ligação de hidrogênio menor ou igual a 10, doadores de ligação de hidrogênio menor ou igual a 5 e número de ligações rotacionáveis menor ou igual a 10. O



resultados do protótipo mol 3 $\log P = 3,82$; massa molecular = 456,94 g/mol; aceptores de ligação de H = 5; doadores de ligação de H = 1; número de ligações rotacionáveis = 7. No protótipo mol4, $\log P = 3,92$; massa molecular = 485,00 g/mol; aceptores de ligação de H = 5; doadores de ligação de H = 1; número de ligações rotacionáveis = 8.

3. Conclusão

Conclui-se que a metodologia didática proposta foi útil para ilustrar a aplicação de ferramentas *in silico* no ensino de competências no que se refere a Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos no curso de graduação em Farmácia. Os discentes em questão consideraram a experiência exitosa devido a consolidação e aplicação dos conhecimentos teóricos vistos em literatura, assim como a descoberta e experimentação de softwares utilizados nos cálculos de modelagem molecular, alcançando o objetivo pedagógico do componente curricular.

O planejamento de fármacos com auxílio do computador (do inglês, *Computer-Aided Drug Design* - CADD) assume diversas abordagens. A SBDD, abordada no presente trabalho, é a estratégia de CADD mais amplamente utilizada, principalmente para a realização de triagens virtuais de bancos de compostos químicos para a identificação de potenciais compostos ativos. Embora apresente vantagens relacionadas à redução de custos quando essa estratégia precede testes em bancada, métodos *in silico* SBDD aplicados à triagem virtual de bancos maiores, da ordem de milhões de compostos, podem apresentar custos consideráveis de poder computacional para viabilizar a pesquisa em tempo hábil. Além disso, como explorado ao longo da metodologia proposta, sua aplicação requer a cuidadosa validação prévia.

Diante da proposta didática do presente trabalho, se ressaltam os ganhos frente o estímulo ao pensamento crítico na área de pesquisa e contribuição para a formação de um perfil do profissional da área de farmácia mais engajado e capacitado, bem como para compreensão da imensa relevância dessas ferramentas para que o profissional farmacêutico atenda as exigências do mercado de trabalho.

Por fim, diante dos bons resultados obtidos na aplicação do DockThor para identificação de potenciais compostos bioativos frente ao FatorXA, pretende-se aplicar a referida metodologia para triagem de bancos de dados maiores, visando identificar potenciais compostos ativos frente o referido alvo. Tais compostos serão encaminhados para testes laboratoriais *in vitro*, mediante parcerias com instituições que investiguem fármacos voltados a distúrbios de coagulação.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer aos professores da disciplina que possibilitou este trabalho, Lourenço Botelho e André Lacerda, especialmente, ao professor André, pela paciência e ternura diante da ideia proposta. Os sinceros agradecimentos aos membros que compuseram a equipe no semestre 2022.1.

Referências

ALMEIDA, J. M. et al. Diretrizes de conceito, diagnóstico e tratamento da trombose venosa superficial. **J Vasc Bras.** 2019, v. 18, e20180105. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1677-5449.180105>. Acesso em: 7 out. 2022.



STAES 22'

Seminário de Tecnologias Aplicadas em Educação e Saúde

BARREIRO, E. J; FRAGA, C.A.M. Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos [recurso eletrônico] 3. ed. – Porto Alegre: Artmed, 2015.

BARREIRO, E. J. et al. Modelagem Molecular: Uma Ferramenta para o Planejamento Racional de Fármacos em Química Medicinal. **Química Nova** [online]. 1997, v. 20, n. 3, p. 300-310. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40421997000300011>. Acesso em: 23 out. 2022.

Brasil. Ministério da Educação. Conselho Nacional de Educação (CONAMA). **Resolução nº6, de 19/10/2017**. Institui as Diretrizes Curriculares Nacionais do Curso de Graduação em Farmácia e dá outras providências.

CARVALHO, Ivone et al. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. **Química Nova** [online]. 2003, v. 26, n. 3, p. 428-438. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000300023>. Acesso em: 6 out. 2022.

CHEUNG, S. et al. Discovery of a benzenesulfonamide-based dual inhibitor of microsomal prostaglandin E2 synthase-1 and 5-lipoxygenase that favorably modulates lipid mediator biosynthesis in inflammation. **Eur J Med Chem**. v. 156, p. 815-830. 2018. Acesso em: 23 out. 2022.

CLARK, M. A. et al. Farmacologia ilustrada. 5. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2013. 611 p.

CONSTANTINESCU, S. N. A new era for small molecule screening: from new targets, such as JAK2 V617F, to complex cellular screens. **J Cell Mol Med**, v.13, n.2, p. 212-214. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19183237/> Acesso em: 23 out. 2022.

CORTE, J. R. et al. Structure–activity relationships of anthranilamide-based factor Xa inhibitors containing piperidinone and pyridinone P4 moieties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 2008, v.18(9), p.2845–2849. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.03.092>. Acesso em 12 out. 2022.

DAINA, A.; MICHELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Sci Rep** 7, 42717 (2017). Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep42717>. Acesso em 16 out. 2022.

FERREIRA, C. N. et al. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. **Rev Bras Hematol. Hemoter.** [online]. 2010, v. 32, n. 5 , p. 416-421. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-84842010000500016>. Acesso em: 05 out. 2022.

FLATO, U. A.P et al. Novos anticoagulantes em cuidados intensivos. **Rev Bras Ter Intensiva** [online]. 2011, v. 23, n. 1, p. 68-77. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-507X2011000100012>. Acesso em: 8 out. 2022.

FRANCO R.F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. **Medicina**, Ribeirão Preto, v.34, nº 3/4, p. 229-237, jul./dez. 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v34i3/4p229-237>. Acesso em: 8 out. 2022

GUEDES, I.A. et al. Drug design and repurposing with DockThor-VS web server focusing on SARS-CoV-2 therapeutic targets and their non-synonym variants. **Sci Rep**. v. 11. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84700-0>. Acesso em: 23 out. 2022.



STAES 22'

Seminário de Tecnologias Aplicadas em Educação e Saúde

Johns Hopkins University. Thrombosis. Disponível em: <https://www.hopkinsmedicine.org/health/conditions-and-diseases/thrombosis> Acesso em 6 out. 2022.

JUN LEE, C. et al. Recent Estimates of the Structure of the Factor VIIa (FVIIa)/Tissue Factor (TF) and Factor Xa (FXa) Ternary Complex. **THROMBOSIS RESEARCH**, v. 125, SUPPLEMENT 1, S7-S10. 2010. Disponível em: [https://www.thrombosisresearch.com/article/S0049-3848\(10\)00075-7/fulltext](https://www.thrombosisresearch.com/article/S0049-3848(10)00075-7/fulltext). Acesso em 12 out. 2022.

JURRUS, E. et al. Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. **Protein Sci.** 2018 Jan, v.27, n.1, p.112-128. Disponível em: 10.1002/pro.3280. Acesso em: 16 out. 2022.

KNEGTEL, R. M.; KUNTZ, I. D.; & OSHIRO, C. M. Molecular docking to ensembles of protein structures. **J Mol Biol**, San Francisco, v.266, n.2, p.424-440, feb. 1997. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9047373/>. Acesso: 23 out. 2022.

LÄTTI, S.; NIINIVEHMAS, S; PENTIKÄINEN, O.T. Rocker: Open source, easy-to-use tool for AUC and enrichment calculations and ROC visualization. **J Cheminform.** v.8(1). 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27606011/>. Acesso em: 23 out. 2022.

LIU, S et al. Practical model selection for prospective virtual screening. **J Chem Inf Mod**, 2018, v. 59, n.1, p. 282-293. Acesso em: 23 out. 2022.

MAI, A et al. Structure-based design, synthesis, and biological evaluation of conformationally restricted novel 2-alkylthio-6-[1-(2,6-difluorophenyl)alkyl]-3,4-dihydro-5-alkylpyrimidin-4(3H)-ones as non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. **J Med Chem**, v.44, p. 2544-2554. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11472208/>. Acesso em: 23 out. 2022.

MASCARENHAS, A.M.S et al. A. Pharmacophore-based virtual screening and molecular docking to identify promising dual inhibitors of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. **J Biomolecular Structure and Dynamics.** v. 39, n. 16, p. 6021-6030, 2020. Disponível em: DOI:10.1080/07391102.2020.1796791 .Acesso em: 23 out. 2022.

Ministério da Saúde. **Biblioteca Virtual em Saúde.** Trombose. 2019. Disponível em: <https://bvsm.saude.gov.br/trombose/>. Acesso em: 6 out. 2022.

MYSINGER, M.M. et al. DUDE-E. **J. Med. Chem.**, 2012, Jul 5. Disponível em: doi 10.1021/jm300687e. Acesso em 16 out 2022.

PEREIRA, L. R. L.; FREITAS, O. Evolução da Atenção Farmacêutica e a perspectiva para o Brasil. **Rev. Bras. de Cienc Farm**, São Paulo, v. 44, n. 4, p. 601-612, 2008.

PETTERSEN, E.F et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. **J Comput Chem.** V.25(13), p.1605-1612. 2004.

RODRIGUES, R.P. et al. Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos **Rev. Virtual Quim.**, 2012, v.4 n.6, p. 739-776. Disponível em: <http://static.sites.sbq.org.br/rvq.sbq.org.br/pdf/v4n6a10.pdf>. Acesso em 7 out. 2022.

RUDDEN, L.S.P; DEGIACOMI, M.T. Protein Docking Using a Single Representation for Protein Surface, Electrostatics, and Local Dynamics. **J. Chem. Theory Comput.** 2019. v.15, n.9, p. 5135-5143. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.9b00474>. Acesso em 23 out. 2022.



STAES 22'

Seminário de Tecnologias Aplicadas em Educação e Saúde

SABE, V.T et al. Current trends in computer aided drug design and a highlight of drugs discovered via computational techniques: A review. **Eur J Med Chem.** 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113705>. Acesso em: 20 out. 2022.

SANTOS, V.L.A; GONSALVES, A.A; ARAUJO, C.R.M. Abordagem didática para o desenvolvimento de moléculas bioativas: Regra dos Cinco de Lipinski e preparação de heterociclo 1,3,4-oxadiazol em forno de micro-ondas doméstico. **Quim. Nova**, v. 41, n. 1, p.110-115, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170135>. Acesso em 20 out. 2022.

SERAFIN, C. JUNIOR, D.C; VARGAS, M. Perfil do farmacêutico no Brasil: relatório. Brasília: Conselho Federal de Farmácia, 2015.

SILVA, P.M.J. Velhos e novos anticoagulantes orais. Perspetiva farmacológica. **Rev Port Cardiol.** 2012; v.31, supplement I, p. 6-16. Disponível em: <https://www.revportcardiol.org/pt-velhos-e-novos-anticoagulantes-orais-perspetiva-farmacologica-articulo-S0870255112700343>. Acesso em: 7 out. 2022.

TEMML, V.; KUTIL, Z. Structure-based molecular modeling in SAR analysis and lead optimization. **Computational and Structural Biotechnology Journal.** v. 19, p. 1431–1444, 2021.

TROTT, O.; OLSON, A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **J Comput Chem.** v.31, n. 2, p. 455-461. 2010. Disponível em: [doi:10.1002/jcc.21334](https://doi.org/10.1002/jcc.21334). Acesso em: 23 out. 2022.

WANG, Z. et al. Comprehensive evaluation of ten docking programs on a diverse set of protein–ligand complexes: the prediction accuracy of sampling power and scoring power. **Phys Chem Chem Phys.** v.18, n.18, p. 12964–12975. 2016.