UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Alexandra Menezes dos Anjos Dória Silva

Estudo *in silico* de novos compostos contra inosina monofosfato desidrogenase de *Cryptosporidium parvum*

Juiz de Fora
2025

Alexandra Menezes dos Anjos Dória Silva

Estudo *in silico* de novos compostos contra inosina monofosfato desidrogenase de *Cryptosporidium parvum*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Ativos.

Orientadora: Profª. Drª. Lauren Hubert Jaeger

Coorientadora: Profª. Drª. Priscila Vanessa Zabala Capriles Goliatt

Juiz de Fora

2025

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração
automática da Biblioteca Universitária da UFJF,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Silva, Alexandra Menezes dos Anjos Dória.
Estudo in silico de novos compostos contra inosina monofosfato desidrogenase de Cryptosporidium parvum / Alexandra Menezes dos Anjos Dória Silva. -- 2025.
105 f.

Orientador: Lauren Hubert Jaeger
Coorientador: Priscila Vanessa Zabala Capriles Goliatt
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2025.

1. Criptosporidiose. 2. Inosina monofosfato desidrogenase. 3. In silico. I. Jaeger, Lauren Hubert , orient. II. Goliatt , Priscila Vanessa Zabala Capriles , coorient. III. Título.

Alexandra Menezes dos Anjos Dória Silva

Estudo *in silico* de novos compostos contra inosina monofosfato desidrogenase de *Cryptosporidium parvum*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Ativos.

Aprovada em 09 de janeiro de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Lauren Hubert Jaeger - Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Priscila Vanessa Zabala Capriles Goliatt - Coorientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Job Domingos Inácio Filho

Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)

Dr. Vinícius Carius de Souza

Instituto Butatan

Dra. Kerla Joeline Lima Monteiro

Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)

Juiz de Fora, 22/11/2024.

Documento assinado eletronicamente por **Lauren Hubert Jaeger**, **Professor(a)**, em 10/01/2025, às 08:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Job Domingos Inácio Filho**, **Usuário Externo**, em 10/01/2025, às 10:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **VINICIUS CARIUS DE SOUZA**, **Usuário Externo**, em 12/01/2025, às 17:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Priscila Vanessa Zabala Capriles Goliatt**, **Professor(a)**, em 12/01/2025, às 17:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Kerla Joeline Lima Monteiro**, **Usuário Externo**, em 28/01/2025, às 16:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Uŋƒ (www2.uŋƒ.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **2116959** e o código CRC **BDB06759**.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta dissertação.

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por me permitir percorrer toda essa jornada, mesmo nos momentos mais desafiadores.

A minha orientadora, Profª. Drª Lauren Hubert Jaeger, pelo apoio constante, orientação precisa e paciência ao longo de todo o processo de pesquisa. Sua dedicação e competência foram essenciais para a concretização deste trabalho. Sempre me incentivou a ir além, com muito carinho e comprometimento. Uma pesquisadora admirável, que com certeza será um modelo a ser seguido em minha trajetória acadêmica.

À minha coorientadora, Profª. Drª. Priscila Vanessa Zabala Capriles Goliatt, pela sua vasta expertise e generosidade, sempre disposta a me auxiliar, até mesmo em momentos de descanso.

Sou imensamente grato aos meus familiares, especialmente aos meus pais, José Vieira e Francilurde, à minha tia Luciene, ao meu marido, Giulliano, e, principalmente, ao meu filho, Miguel, por todo o amor, paciência e apoio incondicional ao longo dessa jornada. Sem o suporte emocional e a confiança de vocês, não teria sido possível chegar até aqui.

Aos meus amigos, em especial ao Otávio, da equipe de modelagem, e ao Victor, Karolayne e Laura, do Laboratório de Células-tronco e Parasitologia que estiveram sempre ao meu lado nos momentos de dificuldade, oferecendo seus conhecimentos e palavras de incentivo, expresso meu sincero agradecimento. A amizade de todos foi essencial para manter minha motivação diante dos desafios dessa trajetória.

À chefia e aos meus colegas de trabalho, agradeço pela compreensão e pelo apoio durante minha ausência, permitindo que eu me dedicasse aos estudos. A colaboração de vocês foi fundamental para que eu pudesse conciliar todas as responsabilidades com foco e dedicação.

Por fim, agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFJF, por abrir suas portas e proporcionar a oportunidade de fazer ciência, promovendo o crescimento da pesquisa e contribuindo para a geração de novos conhecimentos.

RESUMO

A criptosporidiose é uma zoonose causada por protozoários do gênero C*ryptosporidium*, no qual a espécie *C. parvum* tem interesse na saúde pública e animal. É uma doença diarreica que acomete diferentes hospedeiros, incluindo humanos (crianças e indivíduos imunocomprometidos) e animais de produção. O fármaco comercialmente disponível para tratamento da criptosporidiose é o fármaco nitazoxanida (NTZ), o qual apresenta eficácia moderada em indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV). Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a potencial atividade inibitória de compostos provenientes de uma biblioteca pública brasileira contra a biomacromolécula alvo inosina monofosfato desidrogenase (IMPDH) de *C. parvum,* com o intuito de descobrir candidatos a novos fármacos, eficazes e seguros, para o tratamento da criptosporidiose. A abordagem metodológica usada foi a triagem virtual de 1.176 compostos frente a enzima IMPDH do parasito. A modelagem comparativa foi realizada entre uma sequência de aminoácidos da IMPDH de *C. parvum* e sequências ortólogas para a construção de um modelo tridimensional completo. O atracamento molecular foi realizado para avaliar as interações entre os compostos e dois sítios distintos da enzima (sítio do ligante inosina monofosfato [IMP] e o do cofator nicotinamida adenina dinucleotídeo [NAD+]) utilizando dois *softwares* AutoDock Vina e DockThor. Três parâmetros foram avaliados: (i) afinidade de ligação (Kcal/mol); (ii) constante de inibição teórica (cKi) e (iii) Z-score. Foram também avaliados *in silico* os parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos, a atividade biológica antiparasitária e/ou antiprotozoária e a seletividade frente a enzimas de mamíferos. Com base nos resultados de atracamento molecular e interações entre os ligantes e a proteína, três compostos foram selecionados para o sítio catalítico da IMP (BR010017, BR020113 e BR020128) e dois (BR010304 e BR010518) para o sítio do cofator NAD+. Quanto às propriedades físico-químicas, todos os compostos atenderam à regra dos cinco de Lipinski. Os compostos promissores para o sítio catalítico do NAD+ mostraram atividade biológica antiprotozoária. Quanto ao perfil de toxicidade, apenas o composto BR010518 apresentou-se seguro. Em relação aos parâmetros farmacocinéticos, o composto BR020128 foi o único a apresentar *Clearance* de valor negativo. Apesar dessas violações *in silico*, é fundamental validar esses resultados por meio de testes *in vitro* e *in vivo* para confirmar a eficácia e segurança dos compostos promissores.

Palavras-chave: *Cryptosporidium parvum;* inosina monofosfato desidrogenase; modelagem comparativa; atracamento molecular; parâmetros farmacocinéticos, parâmetros físico-químicos.

ABSTRACT

Cryptosporidiosis is a zoonotic disease caused by protozoa of the genus *Cryptosporidium*, with *C. parvum* being of particular interest for public and animal health. It is a diarrheal disease affecting various hosts, including humans (especially children and immunocompromised individuals) and livestock. The commercially available drug for the treatment of cryptosporidiosis is nitazoxanide (NTZ), which has moderate efficacy in individuals infected with the human immunodeficiency virus (HIV). In this context, the aim of the present study was to assess the potential inhibitory activity of compounds from a Brazilian public library (BraCoLi) against the target biomacromolecule inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) of *C. parvum*, in an effort to discover new, effective, and safe drug candidates for the treatment of cryptosporidiosis. The methodological approach used was virtual screening of 1,176 compounds against the parasite's IMPDH enzyme. Comparative modeling was performed between an amino acid sequence of *C. parvum* IMPDH and orthologous sequences to construct a complete three-dimensional model. Molecular docking was carried out to assess the interactions between the compounds and two distinct enzyme sites (the inosine monophosphate [IMP] ligand site and the nicotinamide adenine dinucleotide [NAD+] cofactor site), using AutoDock Vina and DockThor software. Three parameters were evaluated: (i) binding affinity (Kcal/mol); (ii) theoretical inhibition constant (cKi); and (iii) Z-score. In silico analysis were performed on the physicochemical and pharmacokinetic parameters, antiparasitic and/or antiprotozoal biological activity, and selectivity against mammalian enzymes. Based on the molecular docking results and interactions between the ligands and the protein, three compounds were selected for the IMP catalytic site (BR010017, BR020113, and BR020128), and two (BR010304 and BR010518) for the NAD+ cofactor site. Regarding physicochemical properties, all compounds met Lipinski's "Rule of Five." The promising compounds for the NAD+ catalytic site exhibited antiprotozoal biological activity. In the toxicity profile, only the compound BR010518 was found to be safe. Regarding pharmacokinetic parameters, BR020128 was the only compound to exhibit a negative Clearance value. Despite these in silico violations, it is crucial to validate these results through in vitro and in vivo tests to confirm the efficacy and safety of the promising compounds.

Keywords: *Cryptosporidium parvum;* inosine phosphate dehydrogenase; comparative modeling; molecular docking; pharmacokinetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - *Cryptosporidium*: fontes de infecção, modos de transmissão e ciclo biológico 20

Figura 2 - Via da biossíntese de purina de *Cryptosporidium* spp. 28

Figura 3 - A natureza do cofator NAD+ com seus subsítios 30

Figura 4 - Ciclo catalítico da inosina monofosfato desidrogenase 31

Figura 5 - Representação do mecanismo de ação inibitório na IMPDH do ligante ácido micofenólico 32

Figura 6 - Estrutura 2D dos fármacos ribavirina (A), mizoribina (B), tiazofurina (C) e ácido micofenólico (D) 39

Figura 7 - Sequência de aminoácidos da enzima inosina monofosfato desidrogenase de C. parvum 43

Figura 8 - Estrutura tridimensional do modelo alvo.B99990052 45

Figura 9 - Gráfico de Ramachandran do modelo alvo.B99990052 da inosina monofosfato desidrogenase 46

Figura 10 - Representação da estrutura modelada da alça da enzima IMPDH no modelo alvo.B99990052. 47

Figura 11: Perfil eletroestático do modelo alvo B9999052 da IMPDH de *C. parvum* (A), isoenzima 1(7RER) de IMPDH de *Homo sapeins* (B) e isoenzima 2 (6I0O) de IMPDH de *Homo sapeins* (C). 48

Figura 12 - Modelo alvo.B99990052 interagindo com a quinta pose do ligante BR020046 53

Figura 13 - Modelo alvo.B99990052 interagindo com os ligantes que apresentaram os menores valores de afinidade em relação aos controles. 55

Figura 14 - Modelo alvo.B99990052 interagindo com os ligantes que apresentaram as melhores interações (melhores poses). 56

Figura 15 - Modelo alvo.B99990052 interagindo com o ligante BR010518. 58

Figura 16 - Composto BR010304 interagindo com o resíduo R1515 da alça aberta (laranja) do modelo alvo.B99990052. 59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Resíduos de aminoácidos do modelo gerado que corresponde aos resíduos que fazem ligação com o cofator e o substrato natural da IMPDH 29

Quadro 2 - Valores de referência usados na Plataforma pkCSM Pharmacokinetics.40

Quadro 3 - Parâmetros da Regra dos cinco de Lipinski 42

Quadro 4 - Moldes selecionados para a realização do alinhamento global múltiplo. 44

Quadro 5 - Resultado de atracamento molecular dos compostos promissores no sítio do substrato IMP da enzima IMPDH de C. parvum 50

Quadro 6 - Resultado do atracamento molecular dos compostos promissores no sítio do cofator NAD+ da enzima IMPDH de C. parvum. 51

Quadro 7- Resultados das interações entre os compostos promissores e os resíduos de aminoácidos no sítio do substrato IMP da enzima IMPDH de C. parvum. 57

Quadro 8- Resultados das interações entre os compostos promissores e os resíduos importantes para o sítio do cofator NAD+ da enzima IMPDH de C. parvum. 60

Quadro 9 - Propriedades farmacocinéticas dos compostos mais promissores no sítio do substrato IMP da enzima IMPDH de C. parvum. 63

Quadro 10- Propriedades farmacocinéticas dos compostos mais promissores no sítio do cofator NAD+ da enzima IMPDH de C. *parvum*. 66

Quadro 11 - Propriedades físicoquímicas dos compostos promissores no sítio do substrato IMP da enzima IMPDH de C. *parvum* 68

Quadro 12 - Propriedades físicoquímicas dos compostos promissores do sítio do cofator NAD+ da enzima IMPDH de C. *parvum*. 70

Quadro 13 - Perfil de toxicidade dos compostos promissores do sítio do substrato IMP da enzima IMPDH de C. parvum 71

Quadro 14 - Perfil de toxicidade dos compostos promissores do sítio do cofator NAD+ da enzima IMPDH de *C. parvum* 73

Quadro 15 - Potencial atividade biológica dos compostos promissores no sítio do substrato IMP da enzima IMPDH de *C. parvum*. 74

Quadro 16 - Potencial atividade biológica dos compostos promissores no sítio do NADH da enzima IMPDH de *C. parvum*. 75

Quadro 17 - Resultados da seletividade dos compostos promissores no sítio do ligante IMP frente à enzimas ortólogas de mamíferos 76

Quadro 18 - Resultados da seletividade dos compostos promissores no sítio do cofator NAD+ frente às enzimas ortólogas de mamíferos 78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADMET	Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (do inglês *Acquired Immunodeficiency Syndrome*)
AMP	Adenosina 5'-monofosfato
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BraCoLi	*The Brazilian Compound Library*
BLAST	*Basic Local Alignment Search Tool*
CADD	Planejamento de fármacos auxiliado por computador (do inglês *Computer-Assisted Drug Design)*
C. parvum	*Cryptosporidium parvum*
CYP 3A4	Citocromo 3A4
CYP450	Citocromo P 450
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês *dexodeoxyribonucleic acid*)
DOPE	Discrete Optimized Protein Energy
FDA	*Food and Drug Administration*
GMP	Guanosina 5'-monofosfato
GMPS	Guanosina 5'-monofosfato sintetase
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês *Human Immunodeficiency Virus*)
H. sapiens	*Homo sapiens*
IMP	Inosina monofosfato
IMPDH	Inosina 5′-monofosfato desidrogenase
MPA	Ácido micofenólico (do inglês *mycophenolic acid*)
MZR	Mizoribina
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo hidrogenase
NTZ	Nitazoxanida
OMS	Organização Mundial da Saúde
One Health	Uma só saúde
Pa	Probabilidade de "ser ativo"
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase chain reaction*)
PDB	Banco de dados de proteína (do inglês Protein Data Bank)

Pi	Probabilidade de “ser inativo”
RMSD	Raiz do Desvio quadrático médio (do inglês *Root Mean Square Deviation)*
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês *ribonucleic acid*)
TPSA	Área de superfície polar topológica (do inglês *topological polar surface area*)
VDss	Volume de distribuição no estado estacionário (do inglês *volumes of distribution steady-state)*
XMP	Xantosina-5′-monofosfato

LISTA DE SÍMBOLOS

Å	Angström
A	Alanina
C	Cisteína
Da	Daltons
D	Ácido aspártico / aspartato
E	Ácido glutâmico / glutamato
G	Glicina
g/mol	Gramas por mol
H	Histidina
K	Lisina
Kcal/mol	Quilocaloria por mol
L/Kg	Litro por quilograma
Log P	Coeficiente de partição
M	Metionina
mL/min/kg	Mililitro por minuto por quilograma
µM	Micromolar
N	Asparagina
R	Arginina
S	Serina
T	Treonina
V	Valina
Y	Tirosina
%	Porcentagem
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17

2 DESENVOLVIMENTO 18

2.1 REFERENCIAL TEÓRICO 18

2.1.1 **Protozoários do gênero *Cryptosporidium*: histórico, taxonomia e biologia** 18

2.1.2 **A doença criptosporidiose e sua epidemiologia** 21

2.1.3 **Diagnóstico laboratorial da criptosporidiose** 22

2.1.4 **Tratamento farmacológico** 24

2.1.5 **Planejamento *in silico* de fármacos** 26

2.1.6 **Enzima Inosina monofosfato desidrogenase de *Cryptosporidium parvum*** 27

3 OBJETIVOS 33

3.1 OBJETIVO GERAL 33

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 33

4 MATERIAL E MÉTODOS 34

4.1 COMPOSTOS DA BIBLIOTECA PÚBLICA BraCoLi 34

4.2 REALIZAÇÃO DA MODELAGEM COMPARATIVA DA BIOMACROMOLÉCULA ALVO INOSINA MONOFOSFATO DESIDROGENASE DE *Cryptosporidium parvum* 34

4.3 AVALIAÇÃO DA AFINIDADE DE LIGAÇÃO E DAS INTERAÇÕES DOS COMPOSTOS FRENTE A BIOMACROMOLÉCULA ALVO 36

4.4 DETERMINAÇÃO DO PERFIL FARMACOCINÉTICO *IN SILICO* E A POTENCIAL ATIVIDADE BIOLÓGICO DOS COMPOSTOS PROMISSORES 39

4.5 VERIFICAR A SELETIVIDADE *IN SILICO* DOS COMPOSTOS PROMISSORES FRENTE A ENZIMAS DE DIFERENTES HOSPEDEIROS MAMÍFEROS 42

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 43

5.1 REALIZAÇÃO DA MODELAGEM COMPARATIVA DA BIOMACROMOLÉCULA ALVO INOSINA MONOFOSFATO DESIDROGENASE DE *Cryptosporidium parvum* 43

5.2 AVALIAÇÃO DA AFINIDADE DE LIGAÇÃO E DAS INTERAÇÕES DOS COMPOSTOS FRENTE A BIOMACROMOLÉCULA ALVO 49

5.3 DETERMINAÇÃO DO PERFIL FARMACOCINÉTICO *IN SILICO* E A POTENCIAL ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS COMPOSTOS PROMISSORES 61

5.4 VERIFICAR A SELETIVIDADE *IN SILICO* DOS COMPOSTOS PROMISSORES FRENTE A ENZIMAS DE DIFERENTES HOSPEDEIROS MAMÍFEROS 75

6 CONCLUSÃO 81

7 PERSPECTIVAS 83

REFERÊNCIAS 84

APÊNDICE A - *TEMPLATES* COM SIMILARIDADE ACIMA DE 40% COM A SEQUÊNCIA DE IMPDH DE *Cryptosporidium parvum* 96

1 INTRODUÇÃO

Os protozoários do gênero *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) são um dos principais grupos de patógenos de veiculação hídrica e um dos responsáveis por surtos de diarreia no mundo (Gerace; Presti; Biondo, 2019). Mais de 40 espécies desse gênero já foram descritas (Ryan. E. *et al*, 2021), sendo as espécies *C. parvum* e *C. hominis* as que mais comumente acometem o hospedeiro humano. Em animais de produção, a criptosporidiose provoca consideráveis prejuízos econômicos, como mortalidade em animais recém-nascidos, atraso no desenvolvimento, maior demanda de mão de obra e elevados gastos com medicamentos (Santin, 2020). Apesar de serem conhecidos há décadas, esses parasitos têm ganhado a atenção da comunidade científica nos últimos anos devido ao aumento do número de casos (Gerace; Presti; Biondo, 2019).

Algumas características fazem desse parasito de interesse para a saúde pública e animal: i) a doença que causam é uma zoonose (abordagem *One Health*), ii) a sua comprovada resistência ao tratamento da água com soluções à base de cloro e iii) a existência de apenas uma opção terapêutica para o tratamento da doença (Adeyemo *et al*., 2019; Dumaine; Tandel; Striepen, 2020; Sparks *et al*., 2015). Esta última pode ser considerada um sério problema, uma vez que a resistência aos antiparasitários tem emergido nos últimos dez anos em diversas espécies de protozoários (Koning, 2017). Atualmente, o tratamento da criptosporidiose é limitado a apenas um fármaco, a nitazoxanida (NTZ), e sua eficácia é variável, demonstrando resolução dos sintomas diarreicos e cura parasitológica entre 50% e 90% dos casos tratados (Miyamoto; Ecmann, 2015).

Considerando isso, o presente projeto se propõe a avaliar a potencial atividade inibitória *in silico* de compostos de uma biblioteca pública de Minas Gerais no Brasil (BraCoLi), contra a biomacromolécula alvo inosina monofosfato desidrogenase de *C. parvum* na tentativa de descobrir novos candidatos a fármacos para tratamento da criptosporidiose.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1.1 **Protozoários do gênero *Cryptosporidium*: histórico, taxonomia e biologia**

O primeiro membro do gênero *Cryptosporidium* foi descrito em 1907 por Ernest Edward Tyzzer, no epitélio intestinal de camundongos. O parasito pertence ao filo Apicomplexa no qual possui mais de 300 gêneros, dentre eles o gênero *Cryptosporidium,* e mais de 6.000 espécies (Rueckert; Betts;Tsaousis, 2019).

Inicialmente, os parasitos desse gênero foram classificados como pertencentes à ordem Eucoccidiidae, devido às suas semelhanças durante o ciclo de vida com outros parasitos coccídeos entéricos (Levine, 1980). Entretanto, esses parasitos foram reclassificados para a ordem Gregarina, com base em estudos que observaram paridades entre eles, nas fases evolutivas a partir do processo de excisão e da análise do sequenciamento do gene ribossomal 18S (Carreno; Martin; Barta; 1999). Assim, baseado em análises genômicas, um estudo revisitou a taxonomia do gênero e sugeriu a transferência de *Cryptosporidium* para o grupo dos gregarinos e, dessa forma, criou-se uma nova subclasse, Cryptogregaria, dentro da classe Gregarinomorphea (Cavalier-Smith, 2014).

Além das características citadas acima, outras características foram avaliadas e úteis na reclassificação: a presença de uma organela “alimentadora” em estágios de desenvolvimento, ausência de esporocistos e localização epicelular em células hospedeiras (Aldeyarbi; Karanis, 2016). Adicionalmente, tais parasitos deixaram de possuir a estrutura celular conhecida como apicoplasto, bem como os conjuntos genéticos dos plastídeos e das mitocôndrias (Ryan; Hijjawi, 2015). Porém, eles ainda possuem os genes associados às complexas organelas apicais (um conjunto de organelas encontradas na extremidade apical do microrganismo) (Sanderson *et al*., 2008).

Em 2019, uma nova alteração para a subclasse Cryptogregarinorida, dentro de Gregarinasina, foi sugerida (Adl *et al*., 2019). Outros estudos já mostraram uma divergência na taxonomia de parasitos *Cryptosporidium* quando comparado à outros membros Apicomplexa após análises transcriptômicas, sugerindo que *Cryptosporidium* representa uma linhagem distinta dos gregarinos (Janouškovec *et al*., 2019; Mathur *et al*., 2019; Salomaki *et al*., 2021). Dessa forma, uma nova classificação taxonômica foi sugerida: Domínio Eukarya*,* filo Apicomplexa*,* classe

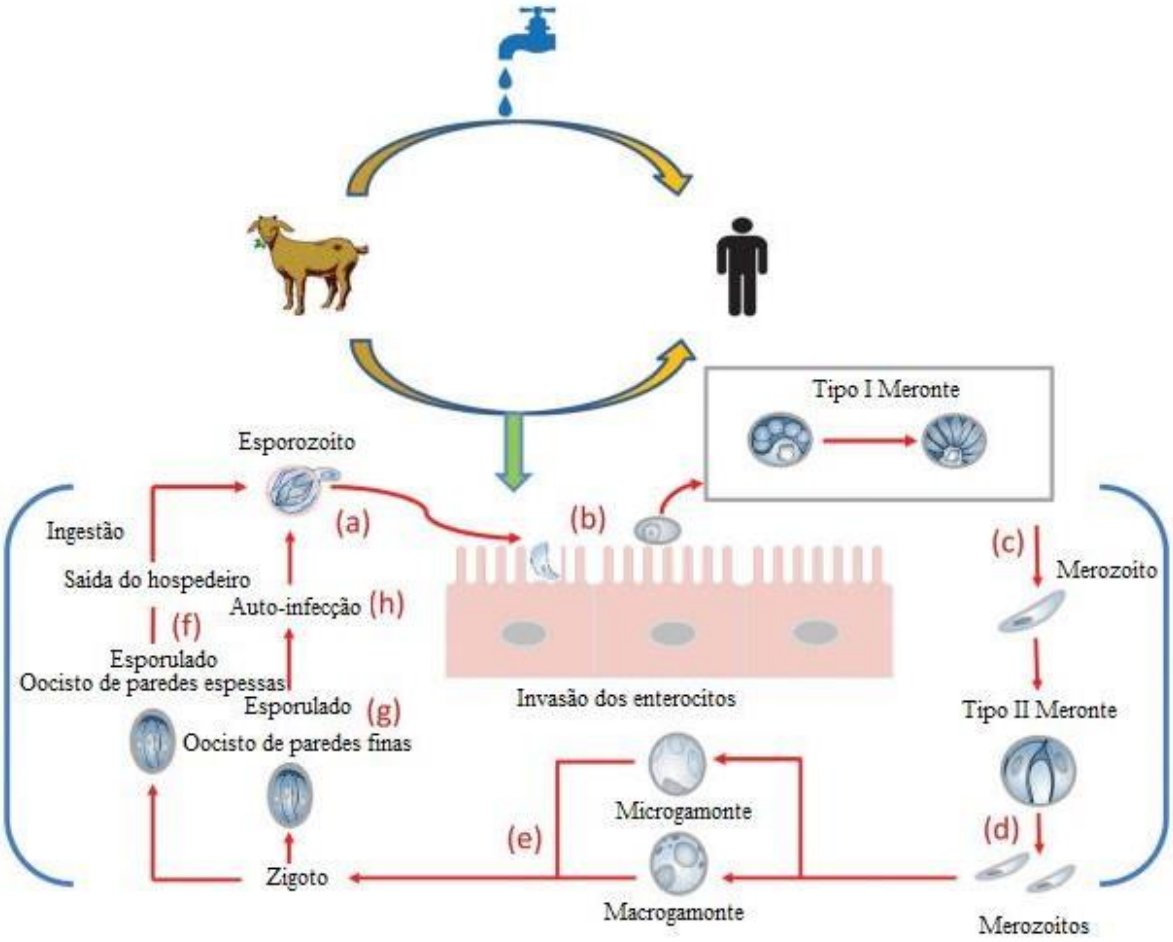
Sporozoasida (Gregarinomorphea*),* ordem Eucoccidiorida (Cryptogregarida), família Cryptosporidiidae*,* gênero *Cryptosporidium,* espécie *C. parvum* (Chalmers; Davies; Tyler, 2019).

Até o presente momento, aproximadamente cerca de 44 espécies dentro do gênero *Cryptosporidium* já foram descritas e mais de 120 diferentes genótipos são conhecidos por causar infecções em mamíferos, aves, répteis e peixes (Ryan. U. M. *et al*, 2021). Interessantemente, a espécie *C. hominis* é disseminado entre hospedeiros humanos, ao passo que *C. parvum* mantém um ciclo de transmissão zoonótico, ocorrendo a transferência entre animais (principalmente domésticos) e seres humanos (Khan; Shaik; Grigg, 2018).

As espécies do gênero *Cryptosporidium* são protozoários parasitas intracelulares e extracitoplasmáticos localizados em um vacúolo parasitóforo, possuindo um ciclo de vida monoxênico, no qual necessita de apenas um hospedeiro para se completar (Ghazy; Abdel-Shafy; Shaapan, 2015). Diversas características únicas diferenciam os parasitos desse gênero de outros protozoários, tais como: i) uma localização incomum dentro da célula hospedeira, situando-se entre o citoplasma celular e a membrana celular, ii) a capacidade de realizar autoinfecção, e iii) uma resistência natural aos desinfetantes comercialmente disponíveis, incluindo o cloro (Ghazy; Abdel-Shafy; Shaapan, 2015).

O ciclo de vida inclui as fases assexuada e sexuada, que ocorrem sequencialmente no mesmo hospedeiro, terminando com a liberação de oocistos infectantes nas fezes. Cada oocisto tem tamanho de quatro a seis micrômetros de diâmetro, contendo quatro esporozoítos formados em seu interior e sua transmissão é através da ingestão desses oocistos maduros (transmissão fecal-oral) (Figura 1) (Chalmers; Davies; Tyler, 2019).

Figura 1 - *Cryptosporidium*: fontes de infecção, modos de transmissão e ciclo biológico



A infecção se inicia quando um indivíduo ingere oocistos maduros (a) que liberam os esporozoítos que invadem a mucosa intestinal. Ali, há o estabelecimento de um ciclo repetido de reinfecção endógena (autoinfecção endógena). Os trofozoítos permanecem na porção apical da célula (b) e sofrem divisão assexuada (merogonia) para formar merozoítos (c). Os merozoítos liberados dos merontes do tipo I entram em células hospedeiras para formar merontes do tipo II. Os merontes do tipo II não se reciclam, mas entram nas células hospedeiras para formar os estágios sexuais (d). Os merontes tipo II formam merozoítos que se diferenciam em microgamontes (masculino) e macrogamontes (feminino) (e). Após a fecundação, o zigoto se desenvolve em oocistos resistentes de paredes espessas (f) que são excretados do hospedeiro na matéria fecal. No entanto, alguns oocistos têm paredes finas (g) e excistam dentro do mesmo hospedeiro em processo de autoinfecção (h).

Fonte: Adaptado de Gerace, Presti e Biondo (2019).

2.1.2 **A doença criptosporidiose e sua epidemiologia**

A criptosporidiose é uma doença com distribuição cosmopolita que se apresenta como uma gastroenterite aguda com dor abdominal e diarreia (Dillingham; Lima; Guerrant, 2002). Os primeiros casos de criptosporidiose em seres humanos foram descritos em 1976, e desde então o protozoário foi identificado como um parasito patogênico associado à ocorrência de diarreia, principalmente em indivíduos com o sistema imunológico comprometido (Meisel *et al*., 1976; Nime *et al*., 1976).

O parasito ganhou destaque durante a epidemia da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) durante a década de 1980. Esses pacientes eram mais suscetíveis à infecção do que as pessoas com o sistema imunológico não comprometido. A febre e a má absorção são comuns nesses indivíduos, podendo evoluir para doença inflamatória e obstrução do trato biliar, colangite esclerosante, estenose papilar e pancreatite (Wang, R. J. *et al*., 2018). Além disso, nesses indivíduos o parasito geralmente causa uma forma crônica e prolongada da doença, que é difícil de ser tratada e que pode evoluir ao óbito (Wang, Z. D. *et al*., 2018). Outro grupo considerado mais suscetível a essa infecção é o de crianças em idade escolar (de zero a 5 anos de idade), cuja prevalência é aproximadamente 10% maior do que em indivíduos maiores de 18 anos (Dong *et al.*, 2020). É conhecido que em países em desenvolvimento, a infecção por *Cryptosporidium* spp. em crianças está associada à desnutrição, crescimento atrofiado e comprometimento cognitivo (Guerrant, 1997). Além disso, o protozoário é considerado como a principal causa de diarreia grave em crianças, também podendo levar à morte (Khalil *et al*., 2018).

Mundialmente, acredita-se que o número de casos de infecção por *Cryptosporidium* spp. seja de 7,6% na população geral, com uma prevalência média de 4,3% em países desenvolvidos e 10,4% nos países em desenvolvimento. O registro dessa parasitose já abrange cerca de 69 países (Dong *et al.,* 2020). Recentemente, devido ao aumento do número de casos da infecção pelo mundo, a Organização Mundial da Saúde (OMS) incluiu a criptosporidiose na “Iniciativa para Doenças Negligenciadas” (Savioli; Smith; Thompson, 2006).

Em países de alta renda, o parasito pode causar surtos de diarreia devido a fontes de água ou alimentos contaminados com oocistos infecciosos (Putignani; Manichella, 2010). No entanto, o contato com animais, a ocorrência de diarreia na família e a prática da defecação ao ar livre em regiões sem saneamento básico, são

fatores de risco que estão associados à infecção em países em desenvolvimento (Bouzid; Kintz; Hunter, 2018).

Estudos de infecciosidade humana e modelagem dose-resposta confirmaram que um pequeno número de oocistos na água para beber pode causar infecção em humanos, sendo a probabilidade de infecção quando apenas um oocisto é ingerido em torno de 72% (Messner; Berger, 2016). Os oocistos têm a capacidade de permanecer viáveis no ambiente por vários meses e demonstram resistência às concentrações habituais de cloro empregadas no tratamento da água (Peeters *et al*., 1989; Chauret *et al*., 2001).

Em animais de produção (animais domésticos), a criptosporidiose foi relatada em todo o mundo, independentemente do sistema de criação (Santin; Trout; Fayer 2008). A infecção por *Cryptosporidium* spp. representa uma ameaça significativa para a indústria pecuária, afetando frequentemente uma variedade de espécies de animais, incluindo camelos, coelhos, gado, cabras, ovelhas, búfalos, aves, suínos, mamíferos selvagens, burros, cavalos, peixes e cervos (Alarcón-Zapata *et al*., 2023; Wells *et al.,* 2015). A prevalência da infecção varia entre as espécies, sendo estimada em 18% em bezerros, 28,52% em bovinos, de 27,8% a 60,4% em suínos, 29,4% em gatos e 52,7% em cães (Dărăbuș *et al*., 2023; Chen *et al*., 2022).

As infecções por *Cryptosporidium* representam uma preocupação relevante para a saúde animal, especialmente em rebanhos neonatais, pois provocam sintomas semelhantes aos observados em humanos, resultando em perdas econômicas devido à redução da taxa de crescimento e aumento da mortalidade nos animais afetados. Além disso, a criptosporidiose eleva os custos relacionados aos cuidados veterinários e aos serviços de saúde animal (Santin, 2020). O esterco de animais, especialmente o de bovinos, serve como um importante reservatório de oocistos, podendo afetar tanto hospedeiros animais quanto seres humanos (Vermeulen *et al*., 2017). As espécies zoonóticas de *Cryptosporidium* em ruminantes incluem *C. parvum* e *C. ubiquitum*, sendo o *C. parvum* a segunda espécie mais frequentemente responsável por infecções em humanos (Xiao, 2010).

2.1.3 **Diagnóstico laboratorial da criptosporidiose**

O diagnóstico laboratorial da criptosporidiose é feito normalmente pela identificação microscópica de oocistos nas fezes de animais infectados (Khurana; Chaudhary, 2018). O método de coloração de Ziehl-Neelsen modificado é o mais

utilizado para a identificação dos oocistos (Kar *et al.*, 2011). Técnicas de concentração parasitária podem ser utilizadas antes da coloração na tentativa de aumentar a sensibilidade da técnica. As mais comumente usadas são a flutuação em solução saturada de sacarose e a centrífugo-sedimentação utilizando éter-formalina ou acetato-formalina (Khurana; Chaudhary, 2018). A eliminação intermitente de oocistos nas fezes (O'Leary; Sleator; Lucey, 2021) e a necessidade de ser realizada por profissionais bem treinados para a correta identificação do parasito, são algumas limitações da técnica parasitológica convencional (Elsafi *et al*., 2013).

Outras metodologias também podem ser utilizadas, como testes imunológicos envolvendo pesquisa de antígenos do parasito nas fezes, ou ainda, a detecção do DNA do parasito em amostras biológicas (técnicas de biologia molecular) (Khurana; Chaudhary, 2018). Os testes imunológicos para detecção de antígenos são simples, rápidos e específicos. Apesar de terem um custo elevado comparados às técnicas convencionais, os testes imunológicos requerem o uso de anticorpos monoclonais desenhados para alvos específicos para diferenciação do parasito e apresentam excelente sensibilidade. O teste da imunofluorescência direta, pode ser utilizado também na identificação de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água (Neto *et al.*, 2010). Nesse caso, é necessário o uso de grandes volumes de água para análise, através de filtração seguida de concentração (Navarro-I-Martinez; Del Águila; Bornay-Llinares, 2011; Galván *et al.*, 2014).

As ferramentas moleculares atualmente utilizadas na detecção do DNA do parasito baseiam-se na reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variações (Xiao, 2010). Essas técnicas geralmente estão associadas com sequenciamento nucleotídico de fragmentos específicos para confirmação dos resultados e análise da diversidade genética entre espécies e genotipagem (Xiao, 2010; Khurana; Chaudhary, 2018).

O exame histopatológico, é outra técnica em que pode ser utilizada para identificar formas evolutivas do parasito em materiais de tecido, comumente usado nos casos de autópsia e biópsia (Chalmers; Giles, 2010). A coloração mais utilizada é hematoxilina-eosina em que as formas evolutivas são visualizadas como corpos esféricos de coloração basofílica, medindo de 2,0 a 7,5 micrômetros de diâmetro, localizados na superfície de células epiteliais intestinais.

2.1.4 **Tratamento farmacológico**

O fármaco nitazoxanida (NTZ) foi aprovado pela agência norte-americana *Food and Drug Administration* (FDA) para uso nos Estados Unidos em 2003, enquanto no Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) concedeu o registro em 2015. No entanto, este fármaco apresenta eficácia moderada no tratamento em grupos imunocomprometidos, como pacientes com HIV/AIDS (Amadi *et al*., 2002). O benefício da NTZ pode ser limitado apenas a indivíduos imunocompetentes, ainda sim, chegando apenas a 56% de cura nos indivíduos testados. Estudos demonstraram uma menor duração da diarreia e maior eliminação do parasito em indivíduos saudáveis em comparação com o grupo imunocomprometido (Atia *et al*., 2016; Amadi *et al*., 2002).

A paromomicina, em crianças imunocompetentes, também não apresentou efeito melhor que o fármaco NTZ (69% - 87%) em estudo (Hussien *et al*., 2013), e ainda apresentou efeitos colaterais, como distúrbios gastrointestinais e o aumento da enzima fosfatase alcalina (Hewitt *et al*., 2000). Em relação aos macrolídeos houve uma redução de oocistos eliminados nas fezes com a utilização de azitromicina, eritromicina e roxitromicina (Diptyanusa; Sari, 2021). Por outro lado, o uso de espiramicina acetilada em indivíduos assintomáticos mostrou uma taxa ainda maior na redução de oocistos eliminados (Huang *et al*., 2015).

Cryptosporidium apresenta alguns desafios únicos para o desenvolvimento de fármacos eficazes. As espécies do gênero são membros do filo Apicomplexa, porém diferem dos demais parasitos do mesmo filo por ter perdido ao longo de sua evolução importantes organelas (apicoplasto e mitocondria) que normalmente são utilizadas como alvo farmacológicos (Wang*;* Castellanos-Gonzalez; White, 2020; Checkley *et al*., 2015; Abrahamsen *et al*., 2004*).* Outra questão, é o fato desses parasitos serem intracelulares obrigatórios, mas se localizar fora do citoplasma dos enterócitos do hospedeiro. Essas localizações criam desafios para a farmacocinética dos fármacos*.* Evidências recentes sugerem que as bombas de efluxo expulsam alguns compostos que poderiam ser fármacos eficazes (Bonafonte *et al*., 2004). A dificuldade no cultivo *in vitro*, cria barreiras para novos estudos e novas intervenções terapêuticas (Griffiths *et al*., 1998; Bhalchandra*;* Cardenas; Ward*,* 2018*;* Arnold *et al*., 2019).

Estudos realizados com os análogos da somatostatina para o tratamento da criptosporidiose intestinal não forneceu resultados satisfatórios na eliminação do

parasito (Diptyanusa; Sari, 2021). Outras opções terapêuticas testadas como letrazuril, benzeno acetonitrila, usado como medicamento quimioprofilático para infecções coccídicas também não responderam de maneira satisfatória gerando muitos efeitos colaterais (Diptyanusa; Sari, 2021). Inhibidores de benzoxaborol foram identificados contra patógenos protozoários, inibindo o desenvolvimento de *C. parvum* intracelular. A pirazolopiridina foi testada em bezerros neonatos e em camundongos, reduzindo a diarreia e a eliminação de oocistos dentro de três dias de tratamento (Rahman *et al.,* 2022).

O reposicionamento dos fármacos miltefosina e a clofazimina foi realizado entretanto não apresentaram desempenho satisfatório na melhora clínica, e nenhum dos pacientes nos ensaios apresentaram depuração de *Cryptosporidium* (Sinkala *et al*., 2011). Por fim, altas doses de albendazol foram testadas, na qual apresentou excelentes resultados na erradicação do parasito em indivíduos portadores do HIV (Zulu *et al*., 2002). No entanto, o tratamento com albendazol produziu efeitos colaterais gastrointestinais moderados.

Em relação aos animais de produção, também não se dispõe de um medicamento totalmente eficaz para o tratamento da criptosporidiose. Sendo que os fármacos já mencionados para uso humano igualmente não demonstraram eficácia nesses hospedeiros (Ali *et al*., 2024). Estudos *in vivo* têm sido realizados na busca por opções terapêuticas no tratamento da infecção em animais.

A substância lactato de halofuginona foi avaliada em bezerros neonatos após exposição natural ao *C. parvum*. Entretanto, a substância mostrou-se pouco eficaz, não promovendo recuperação completa dos animais nem a eliminação de sinais clínicos (Vélez *et al*., 2019). Já outra substância, a tilosina, foi testada em bezerros neonatos e resultou em recuperação clínica total, embora tenha proporcionado apenas uma cura parasitológica parcial (Duru *et al*., 2013). A lasalocida, testada como terapia profilática em 12 bezerros neonatos, não garantiu proteção total contra *C. parvum* (Murakoshi *et al*., 2014). A triazolopiradizina MMV665917 demonstrou resultados parciais em leitões gnotobióticos (Lee *et al*., 2019), enquanto a quitosana obteve efeitos semelhantes em cordeiros neonatos (Aydogdu *et al*., 2019).

Não existem vacinas disponíveis para prevenção ou controle da infecção por *Cryptosporidium* em humanos ou em animais (Innes *et al*., 2020). A vacina é uma alternativa terapêutica e tem sido estudada. Alguns antígenos de *Cryptosporidium* spp. como *gp*15, *cp*15 e *cp*23 estão sendo considerados como candidatos para a

imunoterapia (Helmy; Hafez, 2022). Mas ainda se faz necessário compreender melhor a resposta imune do hospedeiro frente à infecção (Rahman *et al*., 2022; Ryan; Zahedi; Paparini, 2016).

2.1.5 **Planejamento *in silico* de fármacos**

Estudos clássicos de avaliação da atividade antiparasitária e citotoxicidade *in vitro* de compostos sintéticos têm sido realizados (Li *et al*., 2020; Murakoshi *et al*., 2020). Entretanto, essa abordagem exige a síntese de numerosos análogos e sucessivos testes de atividade biológica. Somado a isso, as técnicas de cultivo de células e de parasitos são dispendiosas e requerem extenso período de investigação, eventualmente bem-sucedido (Carvalho *et al*., 2003).

Esforços no planejamento *in silico* de fármacos para o tratamento da criptosporidiose têm sido feitos. O planejamento de fármacos auxiliado por computador (do inglês *Computer-Assisted Drug Design,* CADD) pode permitir o entendimento das interações entre pequenas moléculas (chamadas ligantes) e um receptor (sítio ativo de uma proteína) e explorar os fatores estruturais relacionados ao possível efeito biológico com custos muito baixos. Utilizando a estratégia do atracamento molecular (*molecular docking*) é possível predizer a posição, orientação e a energia de ligação entre um ligante e um receptor (Torres *et al*., 2019). Além disso, as ferramentas computacionais permitem uma análise rápida da atividade biológica *versus* propriedades físicoquímicas de uma série de moléculas de interesse (Carvalho *et al*., 2003). Após as análises computacionais, os compostos promissores são selecionados e, então, submetidos aos ensaios *in vitro* tradicionais, reduzindo os custos (tempo e financeiro) do projeto.

Dessa forma, estudos computacionais têm mostrado o potencial de algumas proteínas como biomoléculas alvo para o desenvolvimento de novos fármacos contra *Cryptosporidium* spp. Dentre as proteínas mais promissoras para o tratamento da criptosporidiose estão a lisil-tRNA sintetase, a fenilalanina-tRNA sintetase, a proteína quinase dependente de cálcio e a inosina monofosfato desidrogenase (Baragaña *et al*., 2019; Vinayak *et al*., 2020; Castellanos-Gonzalez *et al*., 2013; Gorla *et al*., 2014).

A proteína inosina monofosfato desidrogenase (IMPDH, do inglês 5′-*mono-phosphate dehydrogenase*) apresenta um diferencial devido ao fato de estar envolvida na síntese dos nucleotídeos purinas do parasito (Kirubakaran *et al*., 2012). Além disso,

esta proteína é altamente divergente do seu ortólogo humano – uma vez que *Cryptosporidium* adquiriu esse gene de proteobactérias por transferência lateral de genes (Striepen *et al*., 2004).

2.1.6 **Enzima Inosina monofosfato desidrogenase de *Cryptosporidium parvum***

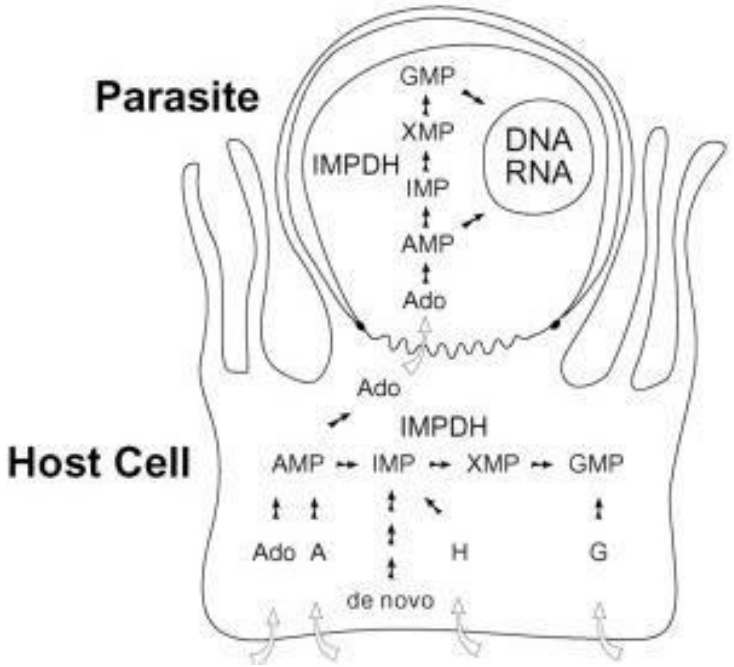
A enzima inosina monofosfato desidrogenase (IMPDH) desempenha um papel crucial na síntese de nucleotídeos de guanina (Wang; Hedstrom, 1997). Este produto possui diversas funções celulares, incluindo sinalização intracelular e transmembranar (Parandoosh *et al*., 1990; Manzoli *et al*., 1995), replicação e síntese de DNA/RNA (Bremer *et al*., 2009). A inibição da IMPDH leva à redução do reservatório de nucleotídeos de guanina e, consequentemente, resulta na morte celular (Olah *et al*., 1990). Por esse motivo, tem sido alvo de investigação como uma potencial estratégia terapêutica para tratar diversas condições, incluindo câncer (Chen *et al*., 2007), infecções virais (Shah *et al*., 2015; Nair *et al*., 2007), e até mesmo doenças autoimunes (Ratcliffe *et al*., 2006). A via da IMPDH está presente em praticamente todos os parasitos protozoários (Hedstrom, 2009; Koning*;* Bridges; Burchmore, 2005) com exceção de *Giardia lamblia* (Morrison *et al*, 2007; Hedstrom, 2009) e de *Trichomonas vaginalis* (Hedstrom, 2009; Carlton *et al*., 2007).

Apesar de ser um eucarioto, o *Cryptosporidium* possui uma IMPDH de origem procariótica, o que foi viabilizado por meio de uma transferência horizontal de genes de bactéria (Umejiego *et al*., 2004; Striepen *et al*., 2004). As IMPDHs procarióticas e eucarióticas apresentam notáveis divergências em suas propriedades estruturais e cinéticas, desempenhando um papel importante na seletividade de agentes anti-*Cryptosporidium* (Zhang *et al*., 1999). A indicação de que a IMPDH de *C. parvum* tem origem procariótica levou à sugestão de que esses inibidores possam ter eficácia contra IMPDHs presentes em bactérias patogênicas (Gollapalli *et a*l., 2010). Esses inibidores, em geral, apresentam maior hidrofobicidade e uma área de superfície menos polar em comparação com os antibióticos (O'Shea; Moser, 2008). Esse perfil sugere que esses inibidores não conseguem penetrar de forma eficaz em bactérias (Kim *et al*., 2015).

A análise genômica revelou que as espécies de *Cryptosporidium* são incapazes de sintetizar nucleotídeos de purina (Striepen *et al*., 2004; Abrahamsen *et al*., 2004). Portanto, dependem exclusivamente da adenosina obtida do hospedeiro para a produção de nucleotídeos de guanina (Fotie *et al*., 2018).

A adenosina quinase de *C. parvum* converte a adenosina em adenosina monofosfato (AMP) (Figura 2). O AMP entra no pool de nucleotídeos de adenina ou é convertido em guanosina monofosfato (GMP) pela ação sequencial das enzimas AMP desaminase, IMPDH e GMP sintase (Umejiego *et al*., 2004).

Figura 2 - Via da biossíntese de purina de *Cryptosporidium* spp.



Fonte: Umejiego *et al*., 2004.

A IMPDH é formada por homotetrâmeros com simetria quadrada (Kim *et al*., 2015). Ela contém um sítio de ligação com a inosina monofosfato (IMP, substrato natural), um sítio de ligação com o cofator nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD+) e uma alça flexível (Makowska-Grzyska *et al*., 2015). Os quatro sítios de ligação do substrato IMP e do cofator NAD+ encontram-se nas proximidades das interfaces da subunidade. Os resíduos que compõem o sítio de ligação do IMP são altamente conservados entre os organismos. Em contrapartida, a sequência do sítio de ligação do NAD+ pode ser variável (Hedstrom, 2009).

O Quadro 1 apresenta os resíduos de aminoácidos do modelo desenvolvido, os quais correspondem aos descritos na literatura pelos autores Umejiego *et al.* (2004), Li *et al*. (2015) e Hedstrom (2009), sendo os que compõem os sítios de ligação e interagem com seus respectivos ligantes.

Quadro 1 - Resíduos de aminoácidos do modelo gerado que corresponde aos resíduos que fazem ligação com o cofator e o substrato natural da IMPDH

Sítio	**Resíduo de aminoácido (Símbolo)**	**Posição na proteína**
NAD+	Prolina (P)	26A
	Alanina (A)	1365D
	Asparagina (N)	1371D
	Metionina (M)	1502D
	Metionina (M)	1508D
	Metionina (M)	1526D
	Valina (V)	1527D
	Ácido Glutâmico (E)	1529D
	Tirosina (Y)	358A
IMP	Serina (S)	1248D
	Serina (S)	1417D
	Cisteína (C)	1419D
	Ácido Aspártico (D)	1452D
	Glicina (G)	1454D
	Glicina (G)	1475D
	Serina (S)	1476D
	Metionina (M)	1502D
	Glicina (G)	1503D
	Ácido glutâmico (E)	1529D

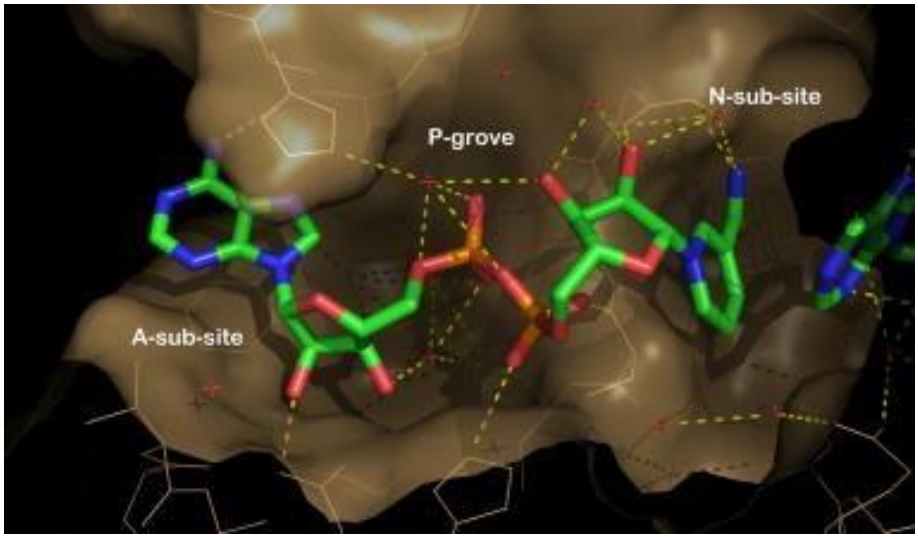
Fonte: Adaptado de Umejiego *et al*., 2004; Li *et al*., 2015; Hedstrom, 2009.

O sítio de ligação ao NAD+ tem sido constantemente usado como alvo para o desenvolvimento de inibidores para a IMPDH (Chen *et al*.,2010; Felczak *et al*., 2011). Este sítio é composto por três subsítios: (i) o sítio de ligação à nicotinamida ribosídeo (subsítio N), (ii) o sítio de ligação do pirofosfato (subsítio P) e (iii) o sítio de ligação à

adenosina (subsítio A) (Felczak *et al*., 2011) (Figura 3). Este último é o que apresenta alta divergência de resíduos entre diferentes organismos (Kim *et al*., 2015).

Nos organismos eucarióticos, este subsítio está localizado no mesmo monômero que o IMP (Colby *et al*.,1999), enquanto em procariotos, ele interage com uma bolsa no monômero adjacente (Kim *et al*., 2015).

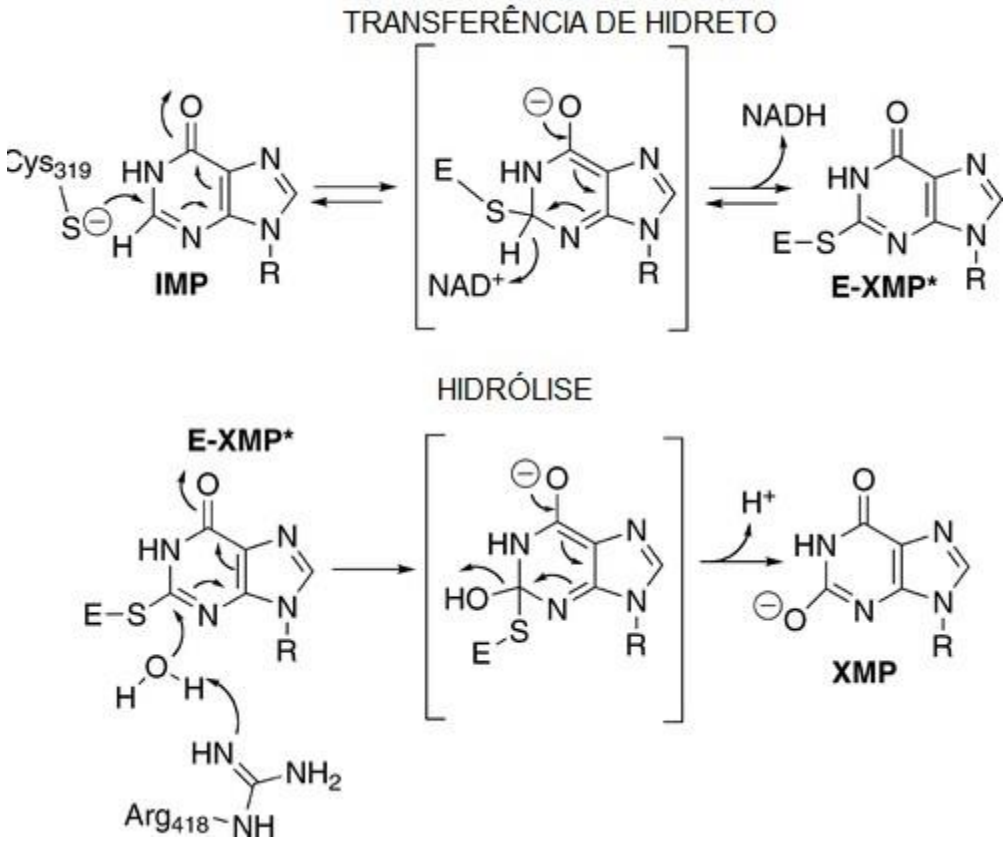
Figura 3 - A natureza do cofator NAD+ com seus subsítios



Fonte: Retirado de Felczak et al., 2011

A alça flexível da IMPDH modifica sua conformação durante seu ciclo catalítico. O resíduo de cisteína no sítio ativo ataca o carbono dois do IMP, transferindo o hidreto para o NAD+. Isso resulta na formação de um intermediário covalente E-XMP e um NADH reduzido que abandonará o sítio ativo. Após a saída do NADH, a alça flexível ocupa o local vago do dinucleotídeo, posicionando adequadamente os resíduos de arginina (R) e tirosina (Y). Essa díade ativa uma molécula de água por meio da retirada de prótons, levando à hidrólise do intermediário E-XMP e liberando o XMP da enzima (Hedstrom, 2009) (Figura 4).

Figura 4 - Ciclo catalítico da inosina monofosfato desidrogenase

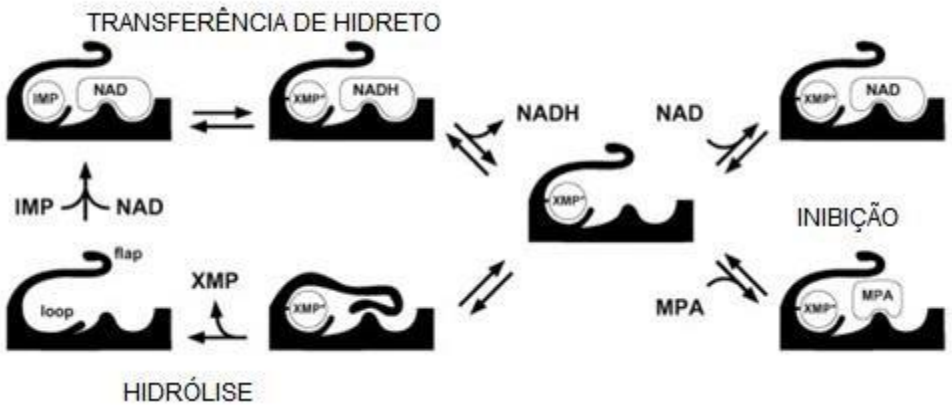


Fonte: Hedstrom, 2009.

Diversos inibidores disputam com a alça pelo espaço vago do NAD+, dificultando, assim, a hidrólise do E-XMP. A escolha entre esses inibidores é influenciada tanto pela estrutura do local de ligação do NAD+ quanto pelas propriedades dinâmicas da alça da IMPDH (Umejiego *et al*., 2004).

O ácido micofenólico (MPA) atua como um potente inibidor das IMPDHs de mamíferos (Hedstrom, 2009) retendo o intermediário E-XMP* ao se ligar na porção nicotinamida do sítio vago do NAD+ (Figura 5). Isso ocorre devido à sua maior afinidade pelos resíduos arginina (R)322 e glutamina (Q)441, que diferem dos resíduos lisina (K) e glutamato (E) encontrados em enzimas microbianas (Umejiego *et al*., 2004). O uso da forma éster do ácido micofenólico (MMF) contra a IMPDH em humanos tem sido estudada como um profármaco para evitar a rejeição de órgãos transplantados em algumas doenças autoimunes (Mucenic, 2024).

Figura 5 - Representação do mecanismo de ação inibitório na IMPDH do ligante ácido micofenólico



Fonte: Umejiego *et al*., 2004.

Uma distinção estrutural adicional entre a IMPDH de células eucarióticas e procarióticas é a preferência pela conformação aberta em enzimas de mamíferos, ao passo que a conformação fechada da alça é mais prevalente em enzimas microbianas (Digits; Hedstrom,1999; Gan; Petsko; Hedstrom, 2002). Portanto, o MPA destaca-se como um inibidor potente de IMPDHs em mamíferos, enquanto exibe uma eficácia relativamente reduzida em enzimas microbianas. Por outro lado, a mezoribina (MZP) é um inibidor da IMPDH que é ativada para o 5′-monofosfato pela adenosina quinase fixando-se no sítio da IMP e induz a conformação fechada (Gan; Petsko; Hedstrom, 2002).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a afinidade de ligação de compostos da biblioteca pública (BraCoLi) contra a biomacromolécula alvo inosina monofosfato desidrogenase de *Cryptosporidium parvum*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar modelagem comparativa da biomacromolécula alvo inosina monofosfato desidrogenase de *Cryptosporidium parvum;*
- Avaliar a afinidade de ligação e as interações de compostos de uma biblioteca pública frente a biomacromolécula alvo inosina monofosfato desidrogenase de *Cryptosporidium parvum;*
- Determinar o perfil farmacocinético *in silico* e a potencial atividade biológica dos compostos promissores;
- Verificar a seletividade *in silico* dos compostos promissores frente a enzimas de diferentes hospedeiros mamíferos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COMPOSTOS DA BIBLIOTECA PÚBLICA BraCoLi

Os compostos provenientes da biblioteca pública *The Brazilian Compound Library* (BraCoLi, https://www.farmacia.ufmg.br/qf/downloads/) foram selecionados para análise (Veríssimo *et al*., 2022). A biblioteca é composta por 1.176 compostos inéditos, de diferentes grupos químicos, desenhados e sintetizados por pesquisadores de Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), liderados pelo Prof. Ricardo Alves e pela Profa. Renata Oliveira.

Os 1.176 compostos foram obtidos no formato .mol2 na plataforma *online* da Faculdade de Farmácia da UFMG (https://www.farmacia.ufmg.br/qf/downloads/). Adicionou-se carga de Gasteiger aos compostos utilizando o Autodock Tools v. 1.5.6 (Morris; Huey; Olson, 2008; https://autodocksuite.scripps.edu/adt/) e os arquivos foram salvos na extensão .pdbqt.

4.2 REALIZAÇÃO DA MODELAGEM COMPARATIVA DA BIOMACROMOLÉCULA ALVO INOSINA MONOFOSFATO DESIDROGENASE DE *Cryptosporidium parvum*

Foi realizada uma busca por sequências de aminoácidos da enzima inosina monofosfato desidrogenase de *Cryptosporidium parvum* no banco de dados biológico de proteínas UniProt (The UniProt Consortium, 2023; https://www.uniprot.org/). Os critérios de seleção da sequência de aminoácidos foram: i) entrada revisada no banco de dados; ii) maior escore de validação de anotação e iii) menor número de mutações. A sequência no formato Fasta foi obtida no mesmo banco de dados.

Uma busca por sequências similares a sequência alvo foi realizada utilizando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) na plataforma *Protein Data Bank* (PDB), (https://www.rcsb.org/) obedecendo aos seguintes parâmetros: i) retornar entidades poliméricas e ii) valor e-*value cutoff* de 0.0001 (Berman *et al*., 2002). As sequências resultantes foram ranqueadas pelo valor de identidade com a sequência de *C. parvum* e aquelas apresentando valores acima de 40% foram analisadas.

A partir das referências ranqueadas, foram selecionados moldes que tivessem: i) os seus sítios catalíticos vazios, ou seja, sem os ligantes críticos IMP e sem o NAD+, ii) possuíssem a maior identidade com a sequência alvo, iii) tivessem a estrutura secundária da alça do sítio determinada experimentalmente e iv) pelo menos um molde fosse uma estrutura experimentalmente resolvida de *C. parvum.* Todos foram

analisados no formato .pdb através do software PyMOL v.2.3.2 (https://pymol.org/2/). Os arquivos foram convertidos para o formato .readseq no editor de texto Kate (https://kate-editor.org/pt-br/), para a realização do alinhamento global.

No servidor *online* Clustal Omega (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) (Sievers *et al*., 2011) foi usada a sequência de *C. parvum* (Uniprot ID Q8T6T2) juntamente com mais três moldes (3FFS, 7OJ2 e 3TSB) , previamente selecionado conforme os critérios citados acima para o alinhamento global, porém os dois últimos tiveram suas cadeias A replicadas para que fosse possível formar o homotetrâmero.

Com a intensão de identificar informações relevantes para o processo de modelagem, a estrutura secundário da proteína alvo foi analisada utilizando preditores de estrutura secundária e disordem, como: NetSurfP (https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetSurfP-1.1/) (Petersen *et a*l., 2009), Frag1D (https://frag1d.bioshu.se/pred/) (Zhou *et al*., 2010), PSIPRED (http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/) (Jone, 1999), Scratch (http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/) (Pollastri, *et al*., 2002), Gor4 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html) (Garnier; Gibrat; Robson, 1996), PredictProtein (https://predictprotein.org/) (Bernhofer *et al*., 2021), Jpred4 (https://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred/) (Drozdetskiy *et al*., 2015), Proteus2 (http://www.proteus2.ca/proteus2/) (Montgomerie *et al*,. 2008), Yaspin (https://www.ibi.vu.nl/programs/yaspinwww/) (Lin *et al*., 2005) e Quick2D (https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tools/quick2d) (Gabler *et al*., 2020), este último também informa as regiões de desordem que são caracterizadas por sua flexibilidade estrutural e falta de conformação 3D estável.

Também foram utilizados os programas HMMTOP (Tusnády; Simon, 2001) (http://www.enzim.hu/hmmtop/html/document.html) e o DeepTMHMM (Hallgren *et al.,* 2022) (https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM/) que realizam a predição da topologia de proteínas transmembrana alfa-helicoidal e beta-barril.

Adicionalmente, também foi utilizado o servidor SignalP-6.0 (https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/) (Nielsen *et al*., 2024) para verificar a presença de peptídeo sinalozadores e regiões de clivagem, e os *softwares* ResPRE, (Li, *et al*. 2019) (https://seq2fun.dcmb.med.umich.edu/ResPRE/) e RFcon (Luttrell *et al*., 2019) (http://dna.cs.miami.edu/RFcon/) para predição de mapa de contato onde calcula a distância entre todos os possíveis pares de resíduos de aminoácidos na estrutura proteica.

A partir do alinhamento global, e do consenso das predições realizadas em diversos *softwares* citados acima foi possível fazer as restrições de estrutura secundária no *script* do servidor Modeller 10.4 (Sali; Blundell, 1993), programa utilizado na construção dos modelos 3D. Para selecionar o melhor modelo gerado, foi avaliada a qualidade da energia das estruturas obtidas baseado no molpdf, DOPE (Discrete Optimized Protein Energy) e DOPE normalizado. Também foi avaliada a qualidade estereoquímica e a validação da geometria através dos gráficos de Ramachandran (Williams *et al*., 2018) gerado pelo Molprobity (http://molprobity.biochem.duke.edu/) que fornece informações importantes sobre possíveis *outliers* e percentual de resíduos que estão em regiões favoráveis e desfavoráveis. Dessa forma, um modelo foi selecionado para as análises de atracamento molecular.

Também foi realizado um estudo *in silico* do perfil eletrostático no modelo, utilizando a ferramenta APBS Electrostatics do software PyMOL v.2.3.2 (https://pymol.org/2/). Esse estudo foi comparado ao perfil eletrostático das estruturas do PDB ID 7RER e 6I0O, que correspondem, respectivamente, às isoenzimas 1 e 2 da IMPDH de *H. sapiens.* A finalidade da análise é identificar diferenças na distribuição de cargas elétricas, o que ajudou na seletividade dos compostos frente ao parasito *C. parvum*.

4.3 AVALIAÇÃO DA AFINIDADE DE LIGAÇÃO E DAS INTERAÇÕES DOS COMPOSTOS FRENTE A BIOMACROMOLÉCULA ALVO

O atracamento molecular é uma ferramenta que nos permite fazer uma triagem virtual de muitos compostos simultaneamente, onde avalia a complementaridade estrutural e química entre um composto e seu receptor alvo, além de prever a posição mais eficaz de ligantes no sítio alvo (Vázquez *et al*., 2020).

As avaliações de afinidade de ligação e as interações proteína-ligante foram realizadas em dois softwares, da onde foi realizado um consenso entre: AutoDock Vina (Eberhardt *et al*., 2016) e Dockthor v2.0 (Almeida, 2011), e os parâmetros analisados em ambos foram: i) A afinidade global média que significa quanto menor for a energia em quilocalorias por mol (Kcal/mol) do ligante em relação ao sítio ativo da molécula alvo, maior será a força da ligação entre eles (Suwitono; Lizki *et al*., 2016); ii) o Z-score médio que serve para avaliar a qualidade e confiabilidade das previsões,

sendo que os valores mais baixos de Z-score indicam que a afinidade de ligação de uma dado ligante é significativamente superior à média de todos os ligantes da base testada. (Kim et al., 2019), iii) as interações entre proteína-ligante, esses últimos foram visualizados no software PyMOL v.2.3.2 (https://pymol.org/2/). e a iv) a constante média de inibição teórica (cKi) que se baseia na energia de ligação para calcular a inibição da proteína pelo ligante em micromolar (μM), e valores mais próximos de zero significa que menores concentrações do ligante são suficientes para inibir a atividade do receptor (Cer *et al*., 2009). A constante pode ser calculada de acordo com a fórmula a seguir (Nelson; Cox, 2002).

$$cKi = e^{\left(\frac{\Delta G}{RT}\right)}$$

onde, cKi é a constante teórica de inibição, ΔG é a afinidade obtida nos estudos de atracamento, R é a constante dos gases e T é a temperatura definida em 298,15 K.

Primeiramente, antes realizar a atracamento molecular, foi necessário a criação de duas caixas no software AutoDockTools v.1.5.6 (MGLTools, https://ccsb.scripps.edu/mgltools/): uma para o sítio catalítico do IMP e outra para o sítio do cofator NAD+, para delimitar as regiões importantes que comportam os resíduos críticos pertencentes a cada sítio.

Para o sítio do IMP, foi utilizado como centro da caixa o átomo de enxofre presente no resíduo de cisteína na posição (C1419) da cadeia D que faz ligação nucleofílica com o carbono dois do anel de purina do IMP (Umejiego *et al*., 2004), onde X= -48.063, Y= -52.697 e Z= 80.159. O tamanho da caixa (X = 26, Y = 38 e Z = 26) foi estabelecido pelo comprimento do maior composto da biblioteca BraCoLi, medido no software PyMOL v.2.3.2 (https://pymol.org/2/). Os demais resíduos participantes da caixa foram: ácido aspártico (D 1452), ácido glutâmico (E 1529), glicina (G 1454), glicina (G 1475), glicina (G 1503), metionina (M 1502), serina (S 1248), serina (S 1417) e serina (S 1476), todos da cadeia D.

Para o sítio do NAD+, as coordenadas X = -49.920, Y = -49.257 e Z = 83.687 foram identificadas a partir do átomo de oxigênio (OE1) do resíduo ácido glutâmico (E 1529) da cadeia D que faz ligação de hidrogênio com inibidor do NAD+ e o tamanho da caixa foi X= 28, Y=24 e Z=38 respeitando também o maior ligante da BraColi. Os resíduos críticos que formaram a caixa do NAD+ foram: alanina (A 1365), asparagina

(N 1371), metionina (M 1502), metionina (M 1508), metionina (M 1526), valina (V 1527) todos da cadeia D. E a tirosina (Y 358) e prolina (P 26) da cadeia A.

Em relação ao preparo do modelo, foi adicionado hidrogênio no programa Molprobity (http://molprobity.biochem.duke.edu/) e protonado no programa https://server.poissonboltzmann.org/pdb2pqr (Jurrus *et al*,. 2018) e salvo em formato .pqr. Em seguida foi convertido em .pdb, depois adicionado cargas de Gasteigers e salvos no formato .pdbqt pelo programa AutoDockTools v.1.5.6 (MGLTools, https://ccsb.scripps.edu/mgltools/). Essas cargas desempenham um papel crucial na simulação das interações eletrostáticas entre os ligantes e os alvos protéicos durante o procedimento de atracamento molecular (Torres *et al*., 2019).

Para a execução do DockThor, a biblioteca de compostos já se encontrava no formato .mol2 e o modelo no formato .pdb já possuía hidrogênios adicionados com o programa Molprobity. Não foram utilizados cofatores e nenhum resíduo da proteína precisou ter sua protonação alterada. As coordenadas cartesianas X, Y e Z e as dimensões foram as mesmas utilizadas nos testes com o AutoDock Vina.

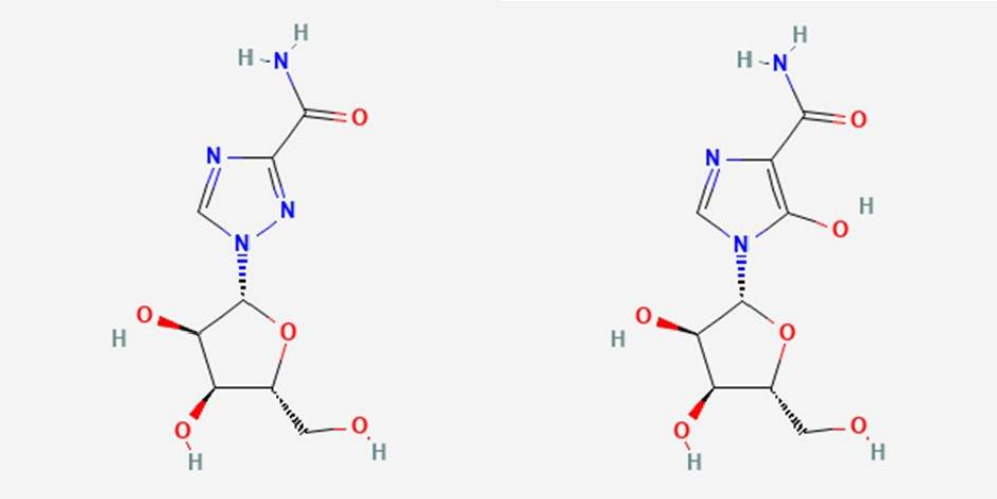
Os fármacos ribavirina e mizoribina foram utilizados como controle positivo no atracamento molecular por serem análogos de nucleosídeos que podem ser fosforilados intracelularmente em 5'-monofosfatos (IMP) e agem de maneira inibitória no sítio catalítico da enzima inosina monofosfato desidrogenase (Sintchak; Nimmesgern, 2000). O fármaco ácido micofenólico atua como um inibidor não competitivo com alta afinidade pelo intermediário E-XMP, disputando com a alça pelo sítio dinucleotídeo vazio de NAD+, impedindo assim a hidrólise de E-XMP. (Hedstrom, 2009) e a tiazofurina que é convertido em dinucleotídeos de adenina, por tanto um análogo do NAD+, que se liga como inibidor não competitivo da porção de nicotinamida do sítio NAD+. (Hedstrom, 2009; Umejiego *et al*., 2004). A finalidade dos controles é validar os resultados obtidos com os compostos da biblioteca BraCoLi, isto é, as substâncias testadas somente são válidas caso apresentem resultados similares ou melhores se comparadas aos controles.

As estruturas químicas dos controles, além dos ligantes naturais (NAD+ e IMP) foram obtidas no PubChem (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/docs/about*)* (Figura 6). e realizada a otimização da geometria (estrutura 3D) e a adição de hidrogênios na plataforma Avogadro (*https://avogadro.cc/*), utilizando os seguintes parâmetros: i) campo de força = MMFF94S, ii) etapas por atualização = 4, iii) algoritmo = descida mais íngreme e iv) marcação dos átomos fixos móveis. As moléculas foram salvas no

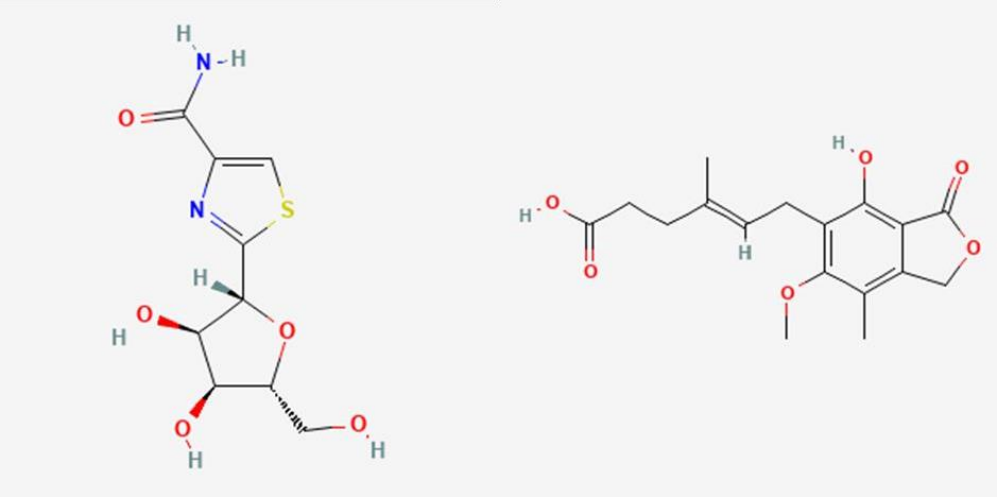
formato .mol2. Depois seguiu os mesmos passos dos compostos da biblioteca BraCoLi.

Figura 6 - Estrutura 2D dos fármacos ribavirina (A), mizoribina (B), tiazofurina (C) e ácido micofenólico (D)

A B



C D



Fonte: Pubchem (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)

4.4 DETERMINAÇÃO DO PERFIL FARMACOCINÉTICO *IN SILICO* E A POTENCIAL ATIVIDADE BIOLÓGICO DOS COMPOSTOS PROMISSORES

O perfil farmacocinético foi avaliado na plataforma *pkCSM Pharmacokinetics* (*https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsm/prediction*) no qual são considerados aspectos

como absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) além da toxicidade (T). Essa plataforma foi utilizada para calcular e predizer as propriedades farmacocinéticas e de toxicidade, por meio de preditores que foram divididos nas cinco classes ADME/T baseando-se em gráficos (Pires *et al*., 2015). No Quadro 2, são listados os parâmetros verificados, valor de referência e interpretação dos resultados.

Quadro 2 - Valores de referência usados na Plataforma pkCSM Pharmacokinetics.

Parâmetro	**Valor de Referência**	**Interpretação**
Absorção Intestinal (%)	> 30%	Valores < 30% indicam que o composto será pouco absorvido
Permeabilidade Caco-2	Papp > 8 x 10 -6 cm/s Modelo preditivo pkCSM, alta permeabilidade Caco-2 > 0,90	Prevê a absorção de medicamentos administrados oralmente
Volume de distribuição no estado estacionário (VDss) (log L/Kg)	Baixo se estiver abaixo de 0,71L/kg (log VDss < - 0,15) e alto se estiver acima de 2,81L/kg (log VDss > 0,45)	Quanto maior o volume de distribuição (VD) indica que o fármaco está mais concentrado nos tecidos do que no plasma.
Fração livre no plasma (Fu)	Para um determinado composto, a fração prevista que não estaria ligada no plasma será calculada	Quanto mais ligado o fármaco estiver das proteínas no sangue, menor será sua eficiência em atravessar as membranas celulares.
Inibidores CYP 3A4/P2D6	O preditor avaliará se uma determinada molécula tem probabilidade de ser metabolizada por P450	Inibidores do citocromo P450 podem causar alterações significativas na farmacocinética desses medicamentos.
Clearance total log (ml/min/kg)	O logaritmo de depuração previsto de um determinado composto é dado em log (ml/min/kg)	Esta relacionada com a biodisponibilidade e desempenha um papel crucial na definição das taxas de dosagem necessárias para alcançar concentrações de estado estacionário no organismo.

Parâmetro	Valor de Referência	Interpretação
Toxicidade de Ames	Não	Resultados positivos no teste de AMES indicam que o composto possui potencial mutagênico
Toxicidade Rat LD50	Informa a dose letal (LD50%)	A LD50 é a quantidade de um composto administrado de uma só vez que causa a morte de 50% de um grupo de animais
Hepatotoxicidade	Não	Valores positivos sugerem que o composto pode interferir na função hepática.
Permeabilidade na barreira hematoencefálica (BHE) (log BB)	> 0,3	Valores de Log BB > 0,3 atravessam facilmente a barreira hematoencefálica, enquanto valores de log BB < -1 são mal distribuídos no cérebro
Inibidires de hERG I e II	O preditor determinará se o composto provavelmente é um inibidor de hERG I / II	Inibição dos canais de potássio são as principais causas para o desenvolvimento da síndrome de QT longo adquirido levando a arritmias ventricular fatal

Fonte: Adaptado de Pires *et al.*, 2015.

O SwissADME é uma ferramenta online gratuita projetada para avaliar as propriedades farmacocinéticas, a semelhança com medicamentos e a compatibilidade química medicinal de pequenas moléculas. (Daina; Michielin; Zoete, 2017) As propriedades físico-químicas dos compostos promissores foram obtidos nos servidores *Swiss ADME* (http://www.swissadme.ch/) e *pkCSM Pharmacokinetics* (*https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsm/prediction*) através dos parâmetros citados no Quadro 3. Moléculas que violam mais do que dois critérios da regra dos cinco de Lipinski podem ter problemas de biodisponibilidade oral (Lipinski *et al*., 2001).

Quadro 3 - Parâmetros da Regra dos cinco de Lipinski

Parâmetro	**Valor de Referência**
Massa molar (Da)	≤ 500
lipofilicidade (log P)	≤ 5
Doadores de hidrogênio	≤ 5
aceptores de hidrogênio	≤ 10
área de superfície polar topológica (TPSA) é fornecida em Å	≤ 140

Fonte: Adaptado de Santos, Gonsalves; Araújo, 2018.

A previsão do potencial de atividade antiparasitária e/ou antiprotozoária foi realizada por meio da plataforma Way2Drug (http://www.way2drug.com/), utilizando a ferramenta PASS Online. O PASS (*Prediction of Activity Spectra for Substances*) é um algoritmo que prevê a atividade biológica de substâncias com base em suas estruturas químicas. O parâmetro de referência adotado foi uma relação onde a probabilidade de ser ativo (PA) supera a probabilidade de ser inativo (PI) em mais de 30% (Filimonov *et al*., 2014).

4.5 VERIFICAR A SELETIVIDADE *IN SILICO* DOS COMPOSTOS PROMISSORES FRENTE A ENZIMAS DE DIFERENTES HOSPEDEIROS MAMÍFEROS

Desde 2014, o SwissTargetPrediction é um serviço online que prevê os alvos de pequenas moléculas bioativas em humanos e outros vertebrados. Ele ajuda a compreender os mecanismos moleculares de um fenótipo ou bioatividade, identificar possíveis efeitos colaterais e prever alvos indesejados de moléculas, além de possibilitar o reaproveitamento de medicamentos (Daina; Michielin; Zoete, 2019). Quando o resultado mais se aproxima de 01 (um), indica uma alta similaridade entre a molécula testada e os ligantes conhecidos na base de dados, e a probabilidade de interação é considerada absoluta (Daina; Michielin; Zoete, 2019).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 REALIZAÇÃO DA MODELAGEM COMPARATIVA DA BIOMACROMOLÉCULA ALVO INOSINA MONOFOSFATO DESIDROGENASE DE *Cryptosporidium parvum*

A sequência de aminoácidos que codifica a enzima IMPDH de *C. parvum* foi acessada através de uma busca no banco de dados biológico UniProt, cujo número de entrada é Q8T6T2. Essa sequência contém 400 resíduos de aminoácidos, com acesso de entrada revisado e com maior escore de anotação (5/5), além de não apresentar mutações. A Figura 7 mostra a sequência de aminoácidos da enzima no formato Fasta.

Figura 7 - Sequência de aminoácidos da enzima inosina monofosfato desidrogenase de *C. parvum*

```
>sp|Q8T6T2|IMDH_CRYPV Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase
OS= Cryptosporidium parvum OX=5807 GN=56k.02 PE=1 SV=1
MGTKNIGKGLTFEDILLVPNYSEVLPREVSLETKLTKNVSLKIPLISSAMDTVTEHLMAVG
MARLGGIGIIHKNMDMESQVNEVLKVKNWISNLEKNESTPDQNLDKESTDGKDTKSNNNID
AYSNENLDNKGRLRVGAAIGVNEIERAKLLVEAGVDVIVLDSAHGHSLNIIRTLKEIKSKM
NIDVIVGNVVTEEATKELIENGADGIKVGIGPGSICTTRIVAGVGVPQITAIEKCSSVASK
FGIPIIADGGIRYSGDIGKALAVGASSVMIGSILAGTEESPGEKELIGDTVYKYYRGMGSV
GAMKSGSGDRYFQEKRPENKMVPEGIEGRVKYKGEMEGVVYQLVGGLRSCMGYLGSASIEE
LWKKSSYVEITTSGLRESHVHDVEIVKEVMNYSK
```

Fonte: Autoria própria (2025).

Devido a ausência da estrutura 3D da alça da região catalítica (308 até 330) e outras pequenas regiões nos moldes de *C. parvum*, a modelagem comparativa foi realizada com o objetivo de se obter esta região. O resultado do BLAST mostrou que 201 estruturas tinham alguma similaridade com a sequência do IMPDH de *C. parvum*. Noventa e sete moldes foram selecionados para análise, baseados na similaridade acima de 40% com a sequência de *C. parvum* (APÊNDICE A).

O alinhamento múltiplo foi realizado com três moldes (Quadro 4) resultando em alta taxa de cobertura da IMPDH, com exceção da região que compreende os resíduos 115 a 123, não havendo alinhamento correspondente. Para regiões sem cobertura, através do consenso dos programas de predição de estrutura secundária, foi possível

inserir as restrições de estrutura secundária e de contato para formação de uma alfa hélice nessa região em todas as quatro cadeias.

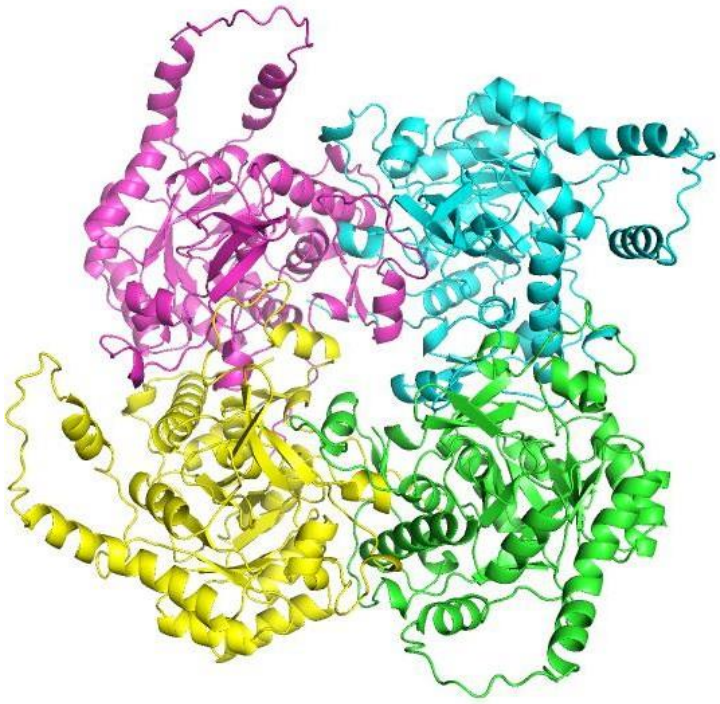
Quadro 4 - Moldes selecionados para a realização do alinhamento global múltiplo.

Variável	**Número de entrada no *Protein Data Bank***		
	3FFS	**7OJ2**	**3TSB**
Organismo	*C. parvum*	*Bacillus subtilis*	*Bacillus anthracis*
Ligante	SEM LIGANTES	PO_4, GOL	PO_4
Identidade (%)	100	56	46
e-value	6,389e-254	8,87e-121	1,289e-110
Cadeia	A,B,C,D	A	A,B
Resolução (Å**)**	3,19	1,76	2,595

PO_4: íon fosfato. GOL: glicerol. Fonte: Autoria própria (2025).

Foram gerados 60 modelos, sendo o modelo alvo.B99990052 selecionado devido ao menor escore (-18836.904688) e melhor qualidade estereoquímica para a realização do atracamento molecular. A estrutura 3D do modelo selecionado está mostrada na Figura 8.

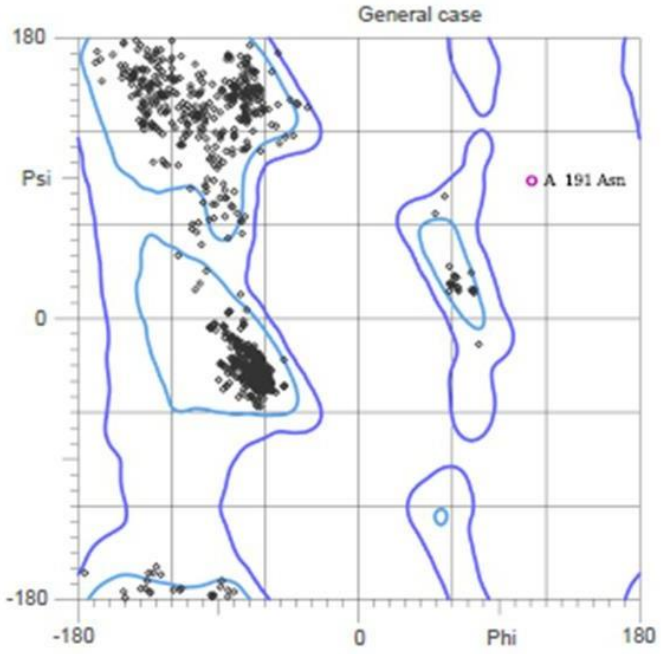
Figura 8 - Estrutura tridimensional do modelo alvo.B99990052



Proteína representada em cartoon com a cadeia A em rosa, cadeia B em amarelo, cadeia C em verde e cadeia D em azul.
Fonte: Autoria própria (2025).

A qualidade estereoquímica do modelo gerado foi observada através da construção do gráfico de Ramachandran (Figura 9). A estrutura alvo.B99990052 se destacou pela menor quantidade de *outliers* presentes, sendo apenas dois resíduos: ácido aspártico (N191) e glicina (G590) que não fazem parte dos sítios do substrato IMP e do cofator NAD+. O resultado apresentou 97,0% de todos os resíduos de aminoácidos em regiões favoráveis, 99,7% de todos os resíduos em regiões aceitáveis e 0,3% em regiões inadequadas.

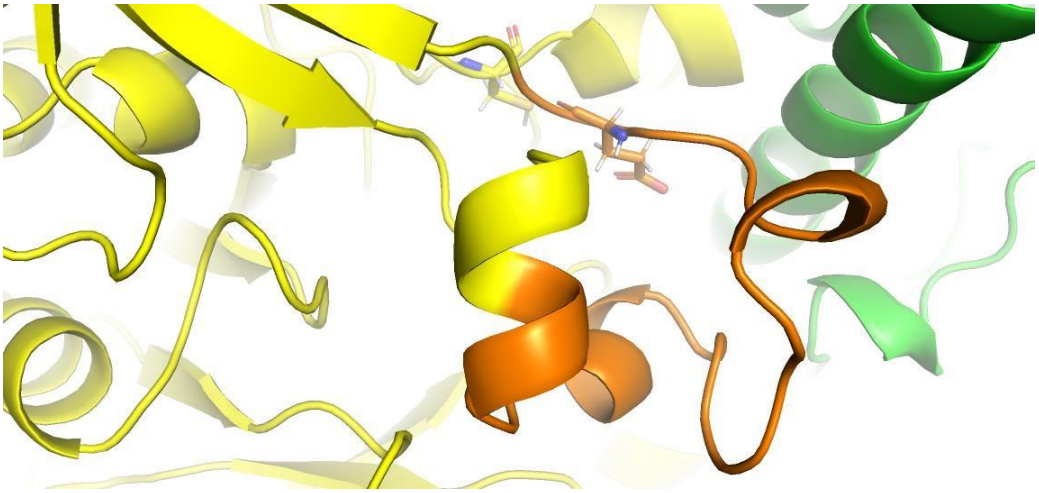
Figura 9 - Gráfico de Ramachandran do modelo alvo.B99990052 da inosina monofosfato desidrogenase



Fonte: Autoria própria (2025).

Através da modelagem comparativa, além da estrutura quaternária da proteína alvo, foi possível obter a estrutura 3D da alça da região catalítica (descrita anteriormente). A Figura 10 mostra a estrutura da alça aberta modelada (cor laranja), área que compreende os resíduos 308 até 330 do modelo. A modelagem da região da alça é importante para que o mecanismo catalítico da IMPDH ocorra, pois tem a função de fechar o sítio do cofator NAD+ durante a fase de hidrólise. Essa região do sítio do cofator representa um dos alvos farmacológicos onde foi realizado o atracamento molecular no presente estudo.

Figura 10 - Representação da estrutura modelada da alça da enzima IMPDH no modelo alvo.B99990052.



Representação em cartoon da região de interseção entre as cadeias B (amarelo) e C (verde) com a alça aberta em laranja. Fonte: Autoria própria (2025).

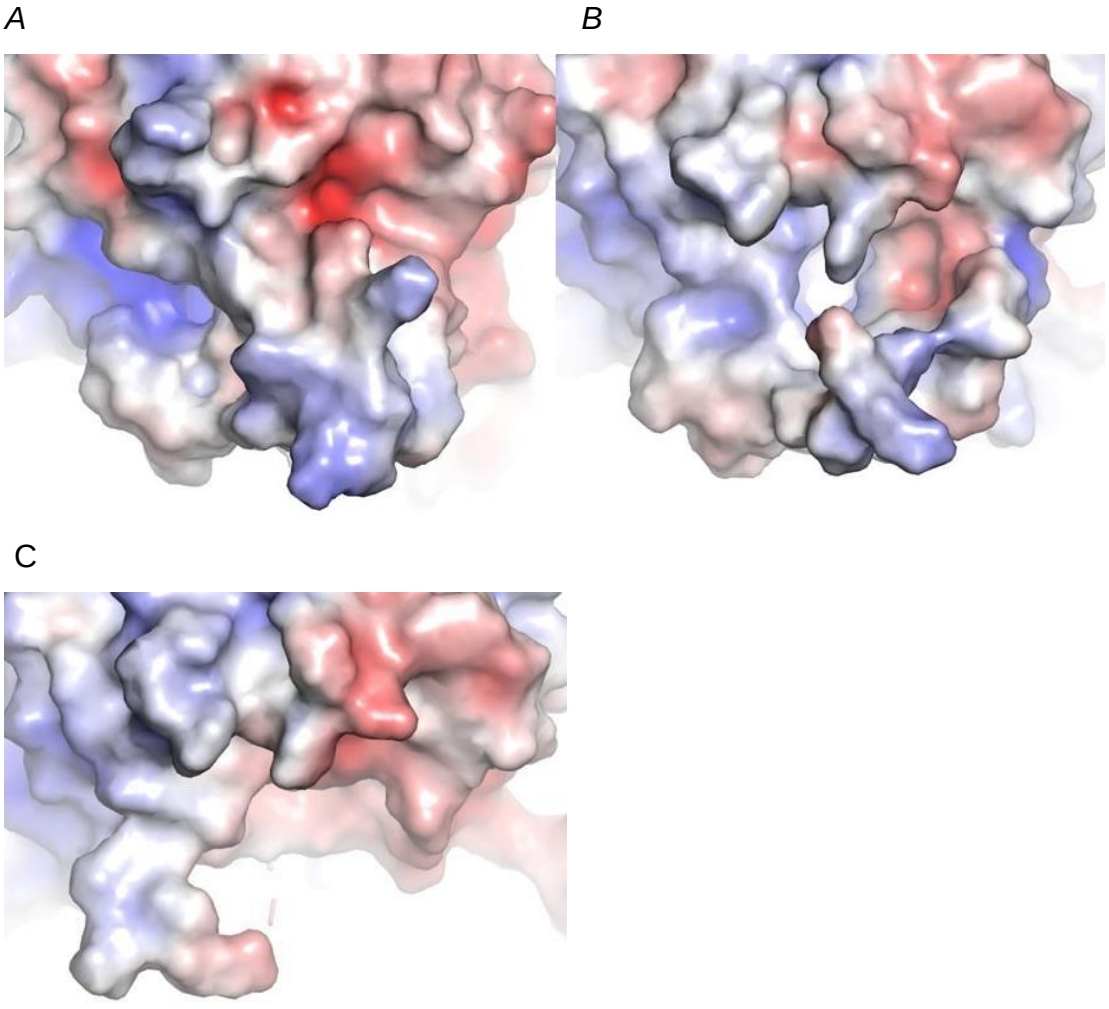
Na Figura 11, foi apresentado o perfil eletrostático, permitindo observar diferenças na distribuição de cargas entre o modelo alvo B9999052 e as isoenzimas 1 (PDB ID 7RER) e 2 (PDB ID 6I0O) de IMPDH de *H. sapiens*. Três pontos principais foram identificados: i) sítio catalítico, ii) alça e iii) cavidade. O modelo alvo B9999052 da IMPDH de *C. parvum* mostrou uma região do sítio catalítico com carga mais negativa e uma alça mais eletropositiva em comparação com as isoenzimas, além de uma cavidade que pode variar de volume conforme a movimentação da alça, sendo menor do que nas outras estruturas, embora todas apresentem um potencial mais positivo.

A isoenzima 1 possui apenas uma parte da estrutura secundária da alça predita, que é menos eletropositiva, e seu sítio catalítico é também menos negativo, com uma cavidade mais neutra e uma abertura bastante distinta de *C. parvum*. Por outro lado, a isoenzima 2 apresenta um sítio catalítico com carga negativa; a visualização da cavidade é dificultada pela movimentação da região, mas é possível notar que se trata de uma área mais neutra em relação às outras estruturas. Além disso, a isoenzima 2 não possui a alça em sua estrutura 3D, o que altera sua conformação e dificulta a análise comparativa com as demais estruturas.

Apesar da alça incompleta das isoenzimas 1 e 2 da IMPDH de *H. sapiens* que pode levar essa diferença de potencial eletrostático com o *C. parvum*, ainda assim

existem algumas diferenças nos resíduos na região catalítica. Em *C. parvum* existem os resíduos N171, R353, L25, K210 e E329, enquanto a isoenzima 2 de *H. sapiens* apresenta os resíduos F282, Q469, T45, R322 e Q441. No entanto, a isoenzima 1 de *H. sapiens* possui a mesma sequência da isoenzima 2, diferindo apenas pelos resíduos Y (tirosina) na posição 282 e I (isoleucina) na posição 45.

Figura 11: Perfil eletrostático do modelo alvo B9999052 da IMPDH de *C. parvum* (A), isoenzima 1(PDB ID 7RER) de IMPDH de *Homo sapiens* (B) e isoenzima 2 (PDB ID 6I0O) de IMPDH de *Homo sapiens* (C).



Fonte: Autoria própria (2025).

5.2 AVALIAÇÃO DA AFINIDADE DE LIGAÇÃO E DAS INTERAÇÕES DOS COMPOSTOS FRENTE A BIOMACROMOLÉCULA ALVO

O atracamento molecular foi realizado com 1.176 compostos da biblioteca pública BraCoLi. Dez compostos promissores, com os melhores resultados de Z-score global, estão apresentados nos Quadros 5 e 6. O Quadro 5 exibe os resultados do atracamento no sítio do substrato IMP e o Quadro 6 mostra os resultados no sítio do cofator NAD+.

No sítio do substrato natural IMP, foram calculadas a afinidade média global e o desvio padrão global dos compostos, cujos valores foram, respectivamente, -6,674 kcal/mol e 1,875 kcal/mol. Esses resultados permitiram avaliar a energia de ligação média de cada composto. Como observado no Quadro 5, após a análise consenso, o composto BR020385 se destacou em relação ao substrato e aos controles, apresentando um Z-score médio global de -1,384 e cKi médio global de 0,227μM.

Nos resultados de atracamento consenso referente ao sítio do cofator NAD+ (Quadro 6), obteve-se uma afinidade média global de -6,651 kcal/mol e um desvio padrão global de 1,583 kcal/mol. O composto BR020385 novamente se destacou no sítio de NAD+, apresentando o menor valor de Z-score médio global de -1,372 e um cKi médio global de 0,348 μM, superando também o cofator e os controles.

Além do composto BR020385, os compostos BR020371 e BR020373 também foram selecionados como promissores para ambos os sítios do estudo, devido aos baxos valores de Z-Score médio global obtidos no consenso entre os programas

Quadro 5 - Resultado de atracamento molecular dos compostos promissores no sítio do substrato IMP da enzima IMPDH de *C. parvum*

Nome do composto	**RESULTADO DO ATRACAMENTO MOLECULAR NO SÍTIO DO IMP**							
	AutoDock Vina			DockThor			Resultado consenso	
	Afinidade média (kcal/mol)	cKi médio (µM)	Z-score médio	Afinidade média (kcal/mol)	cKi médio (µM)	Z-score médio	cKi (µM) médio global	Z-score médio global
BR010017	-9,100	0,213	-1,293	-7,109	6,145	-0,232	3,179	-0,762
BR010035	-7,355	4,057	-0,363	-9,550	0,099	-1,535	2,078	-0,949
BR010036	-7,700	2,268	-0,546	-9,341	0,142	-1,421	1,205	-0,984
BR020046	-7,588	2,736	-0,487	-8,404	0,691	-0,922	1,714	-0,704
BR020054	-7,300	4,456	-0,333	-8,720	0,405	-1,090	2,431	-0,712
BR020113	-7,944	1,501	-0,677	-8,314	0,804	-0,874	1,152	-0,775
BR020128	-8,233	0,922	-0,831	-8,995	0,254	-1,237	0,588	-1,034
BR020371	-7,944	1,501	-0,677	-7,951	1,483	-0,681	1,492	-0,679
BR020373	-8,144	1,071	-0,783	-7,812	1,878	-0,606	1,474	-0,695

BR020385	-8,771	0,371	-1,118	-9,656	0,083	-1,590	0,227	-1,354
IMP	-8,811	0,347	-1,139	-6,600	14,509	0,039	7,428	-0,549
Mizoribina	-7,411	3,694	-0,392	-6,756	11,156	-0,043	7,425	-0,218
Ribavirina	-7,788	1,952	-0,594	-6,844	9,611	-0,090	5,782	-0,342

Fonte: Autoria própria (2025).

Quadro 6 - Resultado do atracamento molecular dos compostos promissores no sítio do cofator NAD+ da enzima IMPDH de C. *parvum.*

Nome do composto	**RESULTADO DO ATRACAMENTO MOLECULAR NO SÍTIO DO NAD+**							
	AutoDock Vina			DockThor			Resultado consenso	
	Afinidade média (kcal/mol)	cKi médio (µM)	Z-score médio	Afinidade média (kcal/mol)	cKi médio (µM)	Z-score médio	cKi (µM) médio global	Z-score médio global
BR010187	-7,222	5,082	-0,360	-8,268	0,868	-1,021	2,975	-0,691
BR010198	-7,733	2,144	-0,683	-7,927	1,546	-0,805	1,845	-0,744
BR010212	-7,366	3,982	-0,451	-8,346	0,762	-1,070	2,372	-0,761

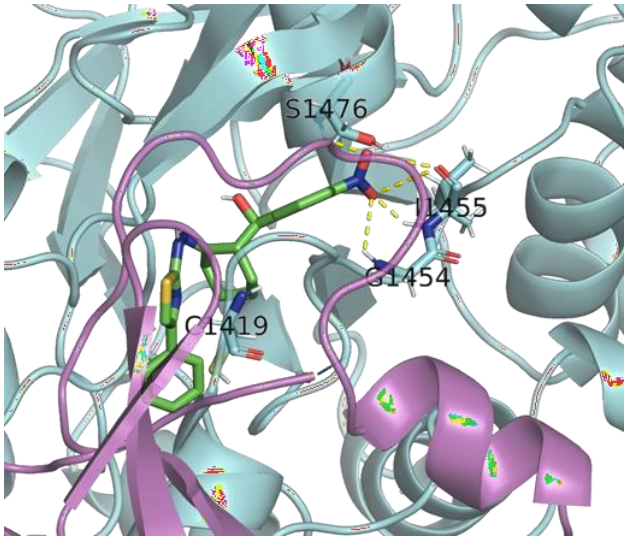
BR010215	-7,333	4,212	-0,430	-8,228	0,930	-0,995	2,571	-0,713
BR010216	-7,111	6,130	-0,290	-8,414	0,679	-1,113	3,404	-0,701
BR010304	-7,733	2,144	-0,683	-8,098	1,157	-0,914	1,651	-0,798
BR010518	-8,500	0,588	-1,167	-7,506	3,144	-0,540	1,866	-0,853
BR020371	-8,333	0,779	-1,062	-8,237	0,916	-1,001	0,847	-1,031
BR020373	-7,655	2,445	-0,634	-8,328	0,786	-1,058	1,615	-0,846
BR020385	-8,688	0,427	-1,286	-8,960	0,270	-1,458	0,348	-1,372
NAD+	-7,488	3,240	-0,529	-7,429	3,584	-0,491	3,412	-0,510
Tiazofurina	-7,044	6,860	-0,248	-6,629	13,831	0,013	10,346	-0,117
Ácido micofenólico	-5,933	44,751	0,453	-7,232	4,998	-0,366	24,875	0,043

Fonte: Autoria própria (2025).

Os resultados das interações entre os compostos promissores e os resíduos de aminoácidos dos diferentes sítios – IMP e NAD+ – estão apresentados nos Quadros 7 e 8, respectivamente.

Observou-se que no sítio do IMP todos os compostos testados apresentaram afinidade mais negativa em relação aos controles positivos, mizoribina (-8,2 kcal/mol) e ribavirina (-8,2 kcal/mol), com exceção do composto BR020046, que, em sua quinta pose, apresentou energia de -7,6 kcal/mol. No entanto, esse composto conseguiu se inserir no sítio catalítico e interagir por meio de ligações de hidrogênio com dois resíduos importantes do sítio catalítico, S1476 e G1454 da cadeia D. Dessa forma, BR020046 foi considerado um composto promissor (Figura 12).

Figura 12 - Modelo alvo.B99990052 interagindo com a quinta pose do ligante BR020046



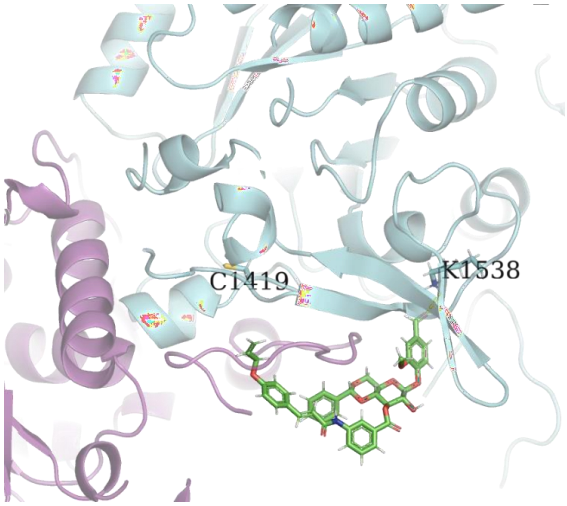
Proteína representada em cartoon, cadeia A em magenta e cadeia D em azul, e resíduos relevantes apresentados em *sticks*. Fonte: Autoria própria (2025).

O substrato natural IMP foi utilizado como referência de acoplamento por ser o substrato natural do sítio catalítico da IMPDH. Na Figura 13 observou-se que apenas os compostos (A) BR010035, (B) BR010036 e (C) BR0200385, com afinidades de -10,0, -10,2 e -10,2 kcal/mol, respectivamente, apresentaram energias inferiores ao IMP.

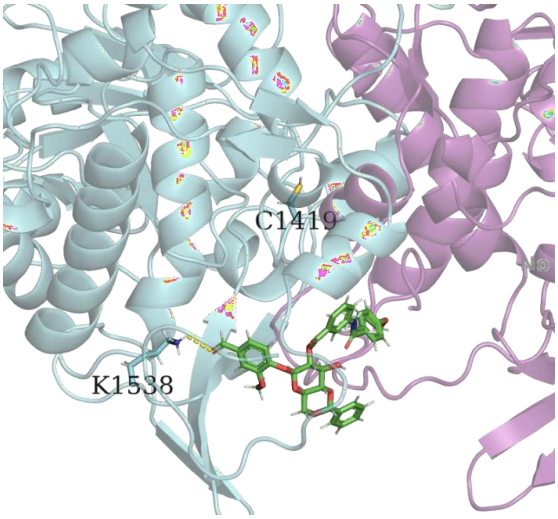
Durante a visualização das interações desses ligantes com o modelo alvo.B99990052 no programa Pymol, foi possível perceber que esses compostos ocluem a entrada no sítio catalítico do IMP devido ao seu grande tamanho, o que impede a formação de ligações com os resíduos específicos do sítio catalítico do IMP. Eles apenas interagem com os resíduos mais afastados do sítio que estão no interior da caixa. Embora esses compostos não atuem diretamente nos resíduos catalíticos, podem exercer um papel inibitório significativo, ao bloquear a entrada do IMP no seu sítio catalítico e, assim, impedir a catálise da reação enzimática.

Figura 13 - Modelo alvo.B99990052 interagindo com os ligantes que apresentaram os menores valores de afinidade em relação aos controles.

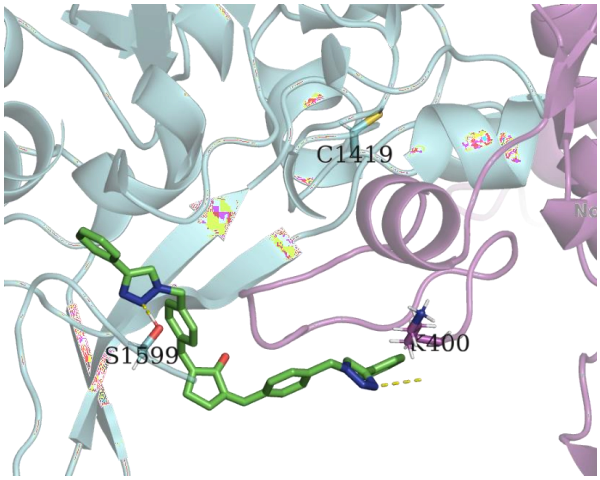
A



B



C



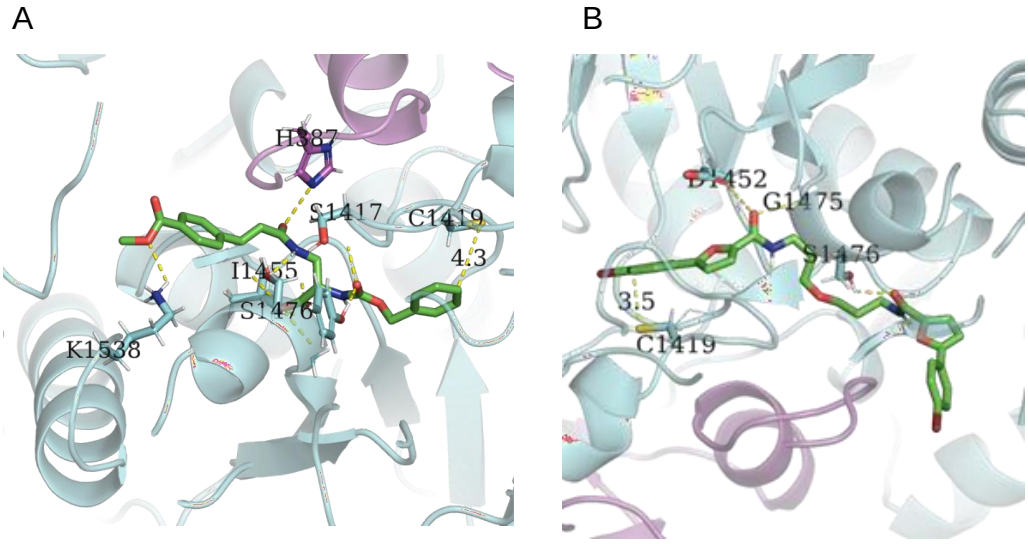
Proteína representada em cartoon, cadeia A em magenta e cadeia D em azul, e resíduos relevantes apresentados em *sticks*. Fonte: Autoria própria (2025).

Na Figura 14, os compostos (A) BR010017 e (B) BR010128 conseguiram acessar o sítio catalítico do substrato do IMP demonstrando os maiores números de interações do tipo ligação de hidrogênio com os resíduos de interesse, mantendo-se à distâncias de 4,3 e 3,5 Å, respectivamente, do resíduo C1419, aminoácido de referência para a ligação do substrato.

Os resíduos críticos que interagiram com o composto BR010017 foram S1417, G1475 e S1476 da cadeia D com uma afinidade de -9,2 kcal/mol. Para o composto

BR010128, os resíduos foram D1452, G1475 e S1476 da cadeia D, com uma afinidade de -9,0 kcal/mol.

Figura 14 - Modelo alvo.B99990052 interagindo com os ligantes que apresentaram as melhores interações (melhores poses).



Proteína representada em cartoon, cadeia A em magenta e cadeia D em azul, e resíduos relevantes apresentados em *sticks*. Fonte: Autoria própria (2025).

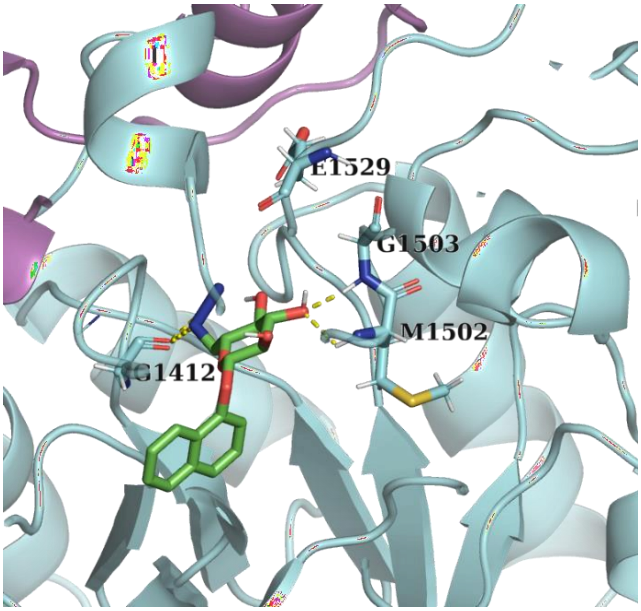
Quadro 7 - Resultados das interações entre os compostos promissores e os resíduos de aminoácidos no sítio do substrato IMP da enzima IMPDH de C. *parvum*.

Nome do composto	Afinidade (kcal/mol)	Interação			
		Pose	Resíduo	Tipo de ligação	*Software*
BR010017	-9,2	1	H387, K1538, I1455, Y1499, S1476 S1417, G1475	Ligação de hidrogênio	AutockVina
BR010035	-10,0	1	K1538	Ligação de hidrogênio	DockThor
BR010036	-10,2	1	K1538	Ligação de hidrogênio	DockThor
BR020046	-7,6	5	S1476, I1455 e G1454	Ligação de hidrogênio	AutockVina
BR020054	-8,8	1	K400	Ligação de hidrogênio	DockThor
BR020113	-8,6	1	H387, S1476, I1455, P1415, G1454	Ligação de hidrogênio	AutockVina
BR020128	-9,0	2	D1452, G1475 e S1476	Ligação de hidrogênio	AutockVina
BR020371	-9,2	1	K1536	Ligação de hidrogênio	AutockVina
BR020373	-8,9	1	R1456, K1536	Ligação de hidrogênio	AutockVina
BR020385	-10,2	1	K400, S1599	Ligação de hidrogênio	AutockVina
IMP	-9,7	1	N1391, G1412, G1414 G1416, S1417, D1452, Y1499 e R1515	Ligação de hidrogênio	AutockVina
Mizoribina	-8,2	1	N1391, S1417, D1452, G1475, S1476, Y1499, R1515, I1474, M1502	Ligação de hidrogênio	AutockVina
Ribavirina	-8,2	1	N1391, S1417, D1452, G1475, S1476, Y1499, R1515	Ligação de hidrogênio	AutockVina

D: aspartato, E: glutamato, H: histidina, K: lisina, N:asparagina, R: arginina, S: serina, I: isoleucina, Y: tirosina, G:glicina. Fonte: Autoria própria (2025).

No Quadro 8 referente ao sítio do cofator NAD+, observou-se que todos os compostos apresentaram uma afinidade inferior à dos controles, ácido micofenólico (-5,6 kcal/mol) e tiazofurina (-6,6 kcal/mol), e do controle que exerce função comparativa, o cofator NAD+ (-7,7 kcal/mol). A pose 02 do composto BR010518 foi o que demonstrou a maior afinidade, com valor de -9,0 kcal/mol, e ainda formou uma ligação de hidrogênio com o resíduo M1502, aminoácido importante por pertencer ao sítio catalítico do cofator NAD+ (Figura 15).

Figura 15 - Modelo alvo.B99990052 interagindo com o ligante BR010518.

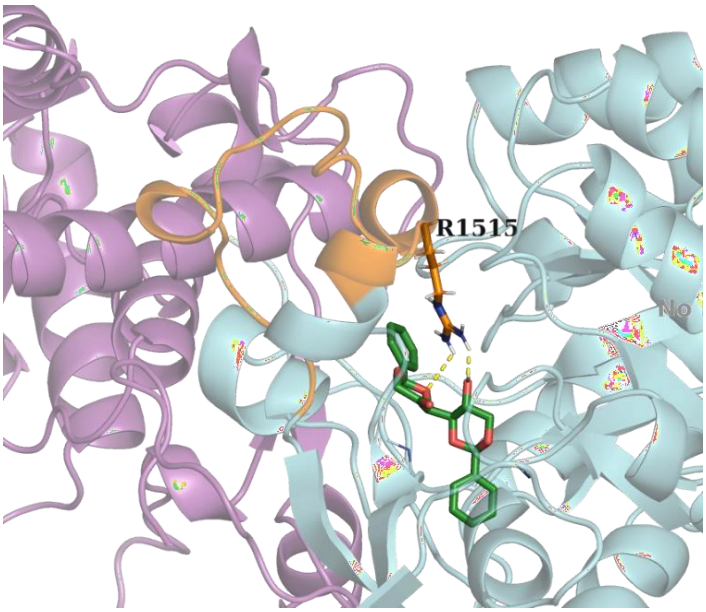


Proteína representada em cartoon e resíduos relevantes apresentados em *sticks*. Fonte: Autoria própria (2025).

O composto BR010304 formou uma interação do tipo ligação de hidrogênio com o resíduo (R1515), localizado na alça do modelo, conforme ilustrado na Figura 16. A alça possui uma função importantíssima na catálise da reação enzimática da IMPDH por se dobrar no sítio NAD+ e sua díade formada pelos resíduos arginina (R1515) e tirosina (Y1516), sendo a arginina desempenhando um papel mais significativo que a tirosina na ativação da molécula de água para que converta a

enzima de uma desidrogenase para uma hidrolase, ocorrendo a liberação do XMP. (Guillén Schlippe *et a*l., 2004).

Figura 16 - Composto BR010304 interagindo com o resíduo R1515 da alça aberta (laranja) do modelo alvo.B99990052.



Proteína representada em cartoon e resíduos relevantes apresentados em *sticks*. Fonte: Autoria própria (2025).

Quadro 8 - Resultados das interações entre os compostos promissores e os resíduos importantes para o sítio do cofator NAD+ da enzima IMPDH de C. *parvum*.

Nome do composto	Afinidade (kcal/mol)	Interação			*Software*
		Pose	Resíduo	Tipo de ligação	
BR010187	-8,2	3	G1511	Ligação de hidrogênio	DockThor
BR010198	-8,2	1	S1248, G1412, G1414, S1417 D1452, G1453, I1455, G1475, Y1499	Ligação de hidrogênio	Autodock Vina
BR010212	-8,5	1	V1343, N1344 e D1514	Ligação de hidrogênio	DockThor
BR010215	-8,3	1	E1345, D1514 e R1521	Ligação de hidrogênio	DockThor
BR010216	-8,4	1	N1344, E1519 e E1523	Ligação de hidrogênio	DockThor
BR010304	-8,0	4	R1515	Ligação de hidrogênio	Autodock Vina
BR010518	-9,0	2	M1502 e G1503	Ligação de hidrogênio	Autodock Vina
BR020371	-8,9	2	G1511, D1514	Ligação de hidrogênio	Autodock Vina
BR020373	-8,4	1	G1511, D1514, G1513	Ligação de hidrogênio	Autodock Vina
BR020385	-9,0	1	R1521	Ligação de hidrogênio	Autodock Vina
NADH	-7,7	2	M1508, S1510, K1520 e R1348	Ligação de hidrogênio	Autodock Vina
Tiazofurina	-6,6	7	Y358, G1414, D1452, E1529	Ligação de hidrogênio	Autodock Vina
Ácido micofenólico	-5,6	8	A1365, S1417, I1418, C1419, G1475, R1515	Ligação de hidrogênio	Autodock Vina

D:aspartato, E:glutamato, H:histidina, K:lisina, N:asparagina, R:arginina, S:serina, G:glicina, Y:tirosina, I:isoleucina. M:metionina. Fonte: Autoria própria (2025).

A pesquisa de Katiyar; Srivastava e Nath (2021) realizou um estudo utilizando várias abordagens *in silico* em busca de compostos anti-criptosporídeos. Seus resultados apresentaram afinidades de ligação de −11,2, −10,4 e −10,2 kcal/mol para os compostos ZINC16511373, ZINC39780256 e ZINC09672610, respectivamente, utilizando o software AutoDock Vina. Esses compostos demonstraram interação com pelo menos um resíduo específico do sítio catalítico NAD+, a metionina (M302).

Entretanto, é importante ressaltar que os autores não modelaram a alça da região catalítica para os estudos de atracamento, e a grid usada foi de 50x50x50 em torno do ligante que já estava no 4IXH, ao invés de usar o resíduo catalítico. Tais fatores podem ter contribuído para diferentes formas de encaixe de resíduos volumosos no sítio e para valores de energia mais baixos.

No presente estudo, empregando também o programa AutoDock Vina, foram obtidos bons resultados de afinidade de ligação, com valores de −8,0 e −9,0 kcal/mol para os compostos BR010304 e BR010518, respectivamente. Destaca-se que o composto BR010518 interagiu com a metionina (M1502) do modelo alvo B99990052, equivalente à metionina (M302) do trabalho de Katiyar; Srivastava e Nath em 2021.

Katiyar; Srivastava e Nath (2021) complementaram sua pesquisa com estudos de dinâmica molecular para avaliar a estabilidade de interação do complexo proteína-ligante, que ocorreu após 34ns de simulação. Como perspectiva para etapas futuras do nosso trabalho é também realizar análises de estabilidade do composto mais promissor no sítio do substrato IMP.

5.3 DETERMINAÇÃO DO PERFIL FARMACOCINÉTICO *IN SILICO* E A POTENCIAL ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS COMPOSTOS PROMISSORES

Considerando a necessidade que compostos desenvolvidos para parasitos intracelulares, mais especificamente os parasitos situados em parasitóforos, tem de atravessar três membranas (membrana celular do hospedeiro, membrana do parasito e membrana do parasitóforo), a avaliação dos parâmetros farmacocinéticos se torna essencial (Basore *et al*., 2015).

Os parâmetros farmacocinéticos dos compostos promissores do sítio do substrato IMP são apresentados no Quadro 9. Todos os compostos apresentaram valores de absorção intestinal superiores a 50%, indicando sua capacidade de atravessar a parede intestinal e alcançar a corrente sanguínea. No entanto, apenas os compostos BR020113, BR010371, BR020373 e BR020385 exibiram resultados

superiores a 0,90 log Papp em 10^{-6} cm/s no teste de permeabilidade em células Caco-2, que também avalia a absorção intestinal. Esse parâmetro é realizado baseado na predição de experimentos com células que mimetizam a mucosa intestinal humana, caracterizada por sua permeabilidade Caco-2.

O composto BR010017 demonstrou maior volume de distribuição no plasma por apresentar o menor valor de VDss de -2,036 log L/kg. O composto BR020385 (fração livre no plasma = 0,387) mostrou estar na sua forma livre ou não conjugada às proteínas plasmáticas, o que permite atravessar membranas celulares com maior eficiência.

O parâmetro de permeabilidade BBB do composto BR020373 apresentou o maior valor de 0,321log BB, indicando que o composto tem condições de atravessar a barreira hematoencefálica diferentemente dos controles, o que implica em possíveis efeitos colaterais.

O *Clearance* do composto BR020385 foi de 0,749log mL/min/kg, o mais elevado, parâmetro importante para determinar a dose necessária para atingir a concentração do estado estacionário.

Quadro 9 - Propriedades farmacocinéticas dos compostos mais promissores no sítio do substrato IMP da enzima IMPDH de C. *parvum*.

Composto	**Absorção intestinal humana (%)**	**Permeabilidade Caco2 (log Papp em 10^{-6} cm/s)**	**VDss (log L/kg)**	**Fração livre no plasma**	**Permeabilidade BBB (log BBB)**	**Inibidor CYP 3A4/P2D6**	***Clearence* total (log mL/min/kg)**
BR010017	54	0,162	-2,036	Zero	-0,724	Não/Não	0,450
BR010035	88	0,651	-1,048	0,170	-0,702	Não/Não	0,050
BR010036	87	0,601	-0,960	0,138	-0,694	Sim/Não	0,060
BR020046	100	0,349	0,240	Zero	-0,589	Sim/Não	0,243
BR020054	100	0,262	0,284	Zero	-0,761	Sim/Não	0,112
BR020113	92	1,120	0,334	0,161	-0,645	Sim/Não	0,130
BR020128	99	0,566	0,748	0,107	-0,861	Sim/Não	-0,197
BR020371	95	1,070	0,234	0,144	0,297	Sim/Não	0,254
BR020373	98	1,096	0,662	0,071	0,321	Sim/Não	0,390

BR020385	97	1,255	-0,628	0,387	-1,003	Sim/Não	0,749
Mizoribina	45	0,020	-0,199	0,961	-1,111	Não/Não	0,649
Ribavirina	55	0,421	-0,015	0,789	-0,921	Não/Não	0,623

VDss: Volume de distribuição no estado estacionário; CYP 3A4/P2D6: Citocromo 3A4/P2D6. Fonte: Autoria própria (2025).

Os parâmetros farmacocinéticos dos compostos promissores do sítio do cofator NAD+ são apresentados no Quadro 10. O composto BR010304 se mostrou com alta taxa de absorção intestinal e permeabilidade Caco-2 com valores de 94% e 1,539 log Papp em 10-6 cm/s, respectivamente, sendo maiores que os controles. Processo que vai determinar a eficácia terapêutica, uma vez que o medicamento seja administrado por via oral.

O menor volume de distribuição dentre os selecionados foi o composto BR010198 com o valor de -1,421 log L/kg, menor que o controle ácido micofenólico, que foi de -1,025 log L/kg, o que indica que o composto é mais hidrossolúvel se concentrando no plasma sanguíneo. Este parâmetro ajuda a prever sua concentração no corpo ao longo do tempo, a quantidade que chega aos tecidos alvo e a dose necessária para alcançar os efeitos terapêuticos desejados

O composto BR020371 interage com a enzima 3A4 do citocromo P450 que é um conjunto de enzimas fundamental para o metabolismo de uma ampla variedade de substâncias, incluindo fármacos. Essas enzimas podem acelerar ou retardar a metabolização dos medicamentos, impactando sua eficácia e toxicidade.

O *clearance* é fundamental para a otimização de regimes terapêuticos porque está diretamente ligada à eliminação de fármacos. O composto BR010187 demonstrou um valor de 1,092 log mL/min/kg o que representa ser um composto que não se acumula no organismo.

Quadro 10- Propriedades farmacocinéticas dos compostos mais promissores no sítio do cofator NAD+ da enzima IMPDH de C. *parvum*.

Composto BraCoLi	**Absorção intestinal humana (%)**	**Permeabilidade Caco2 (log Papp em 10^{-6} cm/s)**	**VDss (log L/kg)**	**Fração livre no plasma**	**Permeabilidade BBB (log BBB)**	**Inibidor CYP 3A4/P2D6**	***Clearence* total (log mL/min/kg)**
BR010187	58	0,578	-0,333	0,159	-1,357	Não/Não	1,092
BR010198	60	0,426	-1,421	0,212	-1,608	Não/Não	0,212
BR010212	46	-0,312	-0,229	0,344	-1,703	Não/Não	0,403
BR020215	71	0,536	-0,166	0,266	-1398	Não/Não	0,268
BR020216	71	0,536	-0,166	0,266	-1,398	Não/Não	0,268
BR010304	94	1,539	-0,885	Zero	-0,571	Não/Não	0,179
BR010518	58	-0,262	0,112	0,246	-1,045	Não/Não	0,090
BR020371	95	1,070	0,234	0,144	0,297	Sim/Não	0,254
BR020373	99	1,096	0,662	0,071	0,321	Sim/Não	0,390
BR020385	98	1,255	-0,628	0,387	-1,003	Sim/Não	0,749
Tiazofurina	58	-0,178	-0,089	0,80	-0,932	Não/Não	0,331
Ácido micofenólico	54	0,895	-1,025	0,163	-0,414	Não/Não	0,685

Fonte: Autoria própria (2025).

As propriedades físico-químicas dos compostos promissores para os sítios catalíticos IMP e do NAD+ são apresentadas nos Quadros 11 e 12, respectivamente. No Quadro 11, observou-se que quatro compostos não atenderam uma ou mais regra dos cinco de Lipinski, conforme analisados nas plataformas Swiss ADME e pkCSM Pharmacokinetics.

Os compostos BR010035 e BR010036 infligiram três parâmetros da regra dos cinco de Lipinski, são elas: o peso molecular de 707,73 g/mol, as 11 ligações de aceitadores de hidrogênio e um TPSA superior a 140 Å, parâmetros semelhantes em ambos compostos. Esses compostos foram considerados inadequados para administração oral porque o elevado peso molecular dificulta a travessia das membranas celulares e a chegada do composto às áreas-alvo do organismo. A presença de mais de 10 aceitadores de hidrogênio indica que o composto será altamente polar, o que reduz sua lipofilicidade e, consequentemente, sua capacidade de atravessar as barreiras lipídicas das células intestinais, prejudicando sua absorção oral e o TPSA, que quantifica a área superficial polar de um composto, revela que quanto maior o TPSA, maior a polaridade da molécula, o que está geralmente associado a uma menor permeabilidade através das membranas celulares.

O terceiro composto, BR010128, apresentou peso molecular de 630,32 e um log P superior a 5. Por fim, o quarto composto, BR020385, teve peso molecular de 574,67 e log P também superior a 5. Ambos desobedeceram dois parâmetros da regra dos cinco de Lipinski não comprometendo a probabilidade de serem eficazes quando administrados por via oral.

Os demais critérios como o coeficiente de partição log P mede a lipofilicidade dos compostos. Enquanto os grupos doadores de hidrogênio, tendem a ser mais facilmente absorvidos e mais lipofílicos (solúveis em lipídios) quando possuem menos de cinco ligações de hidrogênio, o que facilita a penetração celular.

Compostos que violam mais de dois critérios da regra dos cinco de Lipinski podem apresentar dificuldades em penetrar as células, ter baixa biodisponibilidade ou interagir de forma ineficaz com seus alvos terapêuticos

Quadro 11 - Propriedades físicoquímicas dos compostos promissores no sítio do substrato IMP da enzima IMPDH de C. *parvum*

Composto	**Peso molecular (g/mol)**	**Log P**		**Número de doadores de hidrogênio**		**Número de aceptores de hidrogênio**		**TPSA**		**Violações de Lipinski**	**Promissor a administração por via oral baseado na regra dos cinco de Lipinski**
		SA	**PP**	**SA**	**PP**	**SA**	**PP**	**SA**	**PP**		
BR010017	425,410	1,840	0,650	2	2	7	7	133,860	178,210	0	Sim
BR010035	707,730	4,430	5,530	2	2	11	11	148,080	299,674	3	Não
BR010036	707,720	4,400	5,530	2	2	11	11	148,080	299,674	3	Não
BR020046	422,510	3,830	5,410	2	2	5	7	131,570	177,817	0	Sim
BR020054	456,950	4,590	6,060	2	2	5	7	131,570	188,120	0	Sim
BR020113	451,324	4,090	4,787	1	1	4	5	72,950	176,231	0	Sim
BR020128	630,320	5,530	6,688	2	2	5	5	93,710	231,382	2	Sim
BR020371	376,450	5,000	6,003	0	0	3	3	42,850	168,987	0	Sim
BR020373	376,459	4,820	6,003	0	0	3	3	42,850	168,987	0	Sim
BR020385	574,670	5,990	7,130	0	0	5	7	78,490	255,369	2	Sim
Mizoribina_	259,220	-2,230	-2,701	5	5	7	8	151,060	101,046	0	Sim
Ribavirina	244,200	-2,140	-3,011	4	4	7	8	143,720	95,440	0	Sim

SA: Swiss ADME. PP: pkCSM Pharmacokinetics (PP). Log P: coefeciente de partição; TPSA: Área de superfiície polar topológica. Fonte: Autoria própria (2025)

No Quadro 12, o composto BR010212 violou três parâmetros da regra dos cinco de Lipinski, apresentando peso molecular de 617,73 g/mol, 11 aceitadores de hidrogênio e um TPSA superior a 140 Å. Por essas razões, a infração acima de dois critérios de Lipinski é suficiente para colocar em alerta a administração oral de um composto, colocando o ligante BR010212 em observação para futuras análises e melhoramento.

Os compostos BR010215 e BR010216 possuem características físico-químicas semelhantes e infringiram duas regras dos cinco de Lipinski, o peso molecular de 601,74 g/mol e TPSA superior a 140 Å e por último, o composto BR020385 apresentou peso molecular de 574,67 g/mol e log P superior a 5. O composto BR010304 não violou nenhuma regra dos cinco de Lipinski nem apresentou qualquer parâmetro farmacocinético desfavorável, o que o torna um promissor candidato a fármaco.

Quadro 12 - Propriedades físico-químicas dos compostos promissores do sítio do cofator NAD+ da enzima IMPDH de C. *parvum*.

Composto	**Peso molecular (g/mol)**	**Log P**		**Número de doadores de hidrogênio**		**Número de aceptores de hidrogênio**		**TPSA**		**Violações da regra dos cinco de Lipinski**	**Promissor a administração por via oral**
		SA	**PP**	**SA**	**PP**	**SA**	**PP**	**SA**	**PP**		
BR010187	469,494	1,270	1,484	3	3	9	10	144,000	195,665	1	Sim
BR010198	417,370	-0,870	-1,269	4	4	10	11	164,230	169,324	1	Sim
BR010212	617,730	1,280	1,392	5	5	11	12	176,620	256,924	3	Não
BR010215	601,730	1,980	2,420	4	4	10	11	156,390	252,130	2	Sim
BR010216	601,740	1,970	2,420	4	4	10	11	156,390	252,130	2	Sim
BR010304	356,374	1,860	2,144	1	1	6	6	74,220	150,806	0	Sim
BR010518	331,328	0,850	1,336	3	3	8	6	128,900	137,040	0	Sim
BR020371	376,450	5,000	6,003	0	0	3	3	42,850	168,987	0	Sim
BR020373	376,459	4,820	6,003	0	0	3	3	42,850	168,987	0	Sim
BR020385	574,670	5,990	7,130	0	0	5	7	78,490	255,369	2	Sim
Tiazofurina	260,271	-1,090	-1,604	4	4	6	7	154,140	100,473	0	Sim
Ácido micofenólico	320,341	2,720	2,733	2	2	6	5	93,060	133,889	0	Sim

SA: Swiss ADME. PP: pkCSM Pharmacokinetics (PP). Fonte: Autoria própria (2025).

No Quadro 13 encontra-se o resumo dos resultados de toxicidade dos compostos promissores do sítio do substrato IMP da enzima IMPDH de *C. parvum.*

A maioria dos compostos selecionados no atracamento molecular são hepatotóxicos, com exceção dos compostos BR010035 e BR010036. Enquanto, os compostos BR020113 e BR020373 além de hepatotóxicos também exibiram potencial mutagênico.

A Toxicidade Aguda Oral em ratos (DL50) é um parâmetro utilizado para avaliar o potencial tóxico de uma substância quando administrada por via oral. No quadro abaixo, observa-se que todos os compostos promissores apresentam uma DL50 superior a 2,00 mol/kg, indicando menor toxicidade em relação aos controles, a mizoribina com valor de DL50 de 1,864 mol/kg, enquanto a ribavirina possui uma DL50 de 1,988 mol/kg.

Somente o composto BR010017, além dos controles, não interage com os canais de potássio hERG I e II, enquanto os demais compostos apresentam um alto risco de causar alterações cardíacas ao interagir com esses canais, potencialmente levando ao desenvolvimento de arritmias.

Quadro 13 - Perfil de toxicidade dos compostos promissores do sítio do substrato IMP da enzima IMPDH de C. parvum

Composto	**Hepatotoxicidade**	**Toxicidade AMES**	**Toxicidade aguda oral em ratos (DL50) (mol/kg)**	**Inibidores de HERG I e II**
BR010017	Sim	Não	2,072	Não/Não
BR010035	Não	Não	2,939	Não/Sim
BR010036	Não	Não	2,855	Não/Sim
BR010046	Sim	Não	3,246	Não/Sim
BR010054	Sim	Não	3,315	Não/Sim
BR020113	Sim	Sim	2,386	Não/Sim
BR020128	Sim	Não	2,719	Não/Sim
BR020371	Sim	Não	2,549	Não/Sim

BR020373	Sim	Sim	2,482	Não/Sim
BR020385	Sim	Não	2,344	Não/Sim
Mizoribina	Não	Não	1,864	Não/Não
Ribavirina	Não	Não	1,988	Não/Não

Fonte: Autoria própria (2025).

No Quadro 14, é apresentada a análise da toxicidade dos compostos promissores para o sítio do cofator NAD+. O composto BR020373 foi o único a demonstrar hepatotoxicidade e resultado positivo no teste de Ames, enquanto o composto BR010058 foi o único a não apresentar essas características tóxicas.

A dose letal que causa a morte de 50% dos ratos para a maioria dos compostos está próxima aos valores observados nos controles. Apenas os compostos BR010212, BR010215 e BR010216 apresentaram doses ligeiramente superiores às dos controles, com valores de 3,870 mol/kg, 3,702 mol/kg e 3,702 mol/kg, respectivamente. A tiazofurina e o ácido micofenólico foram os controles utilizados no estudo de toxicidade, e não foi registrada nenhuma interação com os canais de potássio hERG II, assim como para os compostos BR010187, BR010198, BR010304 e BR010518, alteração que poderia resultar no desenvolvimento da síndrome do QT longo adquirido, com risco de arritmia ventricular fatal.

Diversas estratégias podem ser adotadas para melhorar a toxicidade apresentada por alguns compostos: alterações na estrutura química por meio de novas sínteses ou engenharia molecular, ajustes na lipofilicidade, otimização de dosagens e o uso de sistemas de liberação controlada são abordagens-chave para aprimorar o perfil de segurança dos fármacos. Além disso, a aplicação de modelagem computacional e ensaios in vitro é fundamental para assegurar que as modificações tragam os resultados esperados, sem comprometer a eficácia terapêutica.

Quadro 14 - Perfil de toxicidade dos compostos promissores do sítio do cofator NAD+ da enzima IMPDH de *C. parvum*

Composto	**Hepatotoxicidade**	**Toxicidade AMES**	**Toxicidade aguda oral em ratos (DL50) (mol/kg)**	**Inibidores de HERG I e II**
BR010187	Sim	Não	2,863	Não/Não
BR010198	Sim	Não	2,557	Não/Não
BR010212	Sim	Não	3,.870	Não/Sim
BR010215	Sim	Não	3,702	Não/Sim
BR010216	Sim	Não	3,702	Não/Sim
BR010304	Não	Sim	2,425	Não/Não
BR010518	Não	Não	2,313	Não/Não
BR020371	Sim	Não	2,549	Não/Sim
BR020373	Sim	Sim	2,482	Não/Sim
BR020385	Sim	Não	2,344	Não/Sim
Tiazofurina	Não	Não	2,108	Não/Não
Ácido micofenólico	Não	Não	2,443	Não/Não

Fonte: Autoria própria (2025).

Os compostos selecionados no quadro 15 foram analisados no servidor Way2Drug para avaliação da atividade biológica *in silico*. Apenas os compostos BR020046 e BR020054 apresentaram valores superiores a 30% de atividade biológica antiparasitária. O controle ribavirina demonstrou ação antiprotozoária de 0,471, valor proporcionalmente semelhante ao observado nos compostos mencionados. O composto BR010017 não obteve resultados da plataforma.

Quadro 15 - Potencial atividade biológica dos compostos promissores no sítio do substrato IMP da enzima IMPDH de *C. parvum*.

Composto BraCoLi	Atividade biológica			
	Antiparasitária		Antiprotozoário	
	Pa*	Pi*	Pa*	Pi*
BR010017	SR	SR	SR	SR
BR010035	-	-	-	-
BR010036	-	-	-	-
BR020046	0,445	0,022	-	-
BR020054	0,490	0,017	-	-
BR020113	-	-	-	-
BR020128	-	-	-	-
BR020371	-	-	-	-
BR020373	-	-	-	-
BR020385	-	-	-	-
Mizoribina	-	-	-	-
Ribavirina	-	-	0,471	0,012

Pa: probabilidade de “ser ativo”. Pi: probabilidade de “ser inativo”. SR: sem resultado. Fonte: Autoria própria (2025).

Foi realizada uma consulta no servidor Way2Drug para avaliar a atividade biológica *in silico* dos compostos promissores no sítio do NAD+. Apenas o composto BR010304 apresentou atividade biológica antiprotozoária superior a 50%. O composto BR010518, por sua vez, mostrou uma atividade biológica antiprotozoária próxima ao ponto de corte de 30%. Em comparação, o controle positivo ácido micofenólico apresentou atividade antiparasitária superior a 60%. Todos os compostos retornaram resultados da plataforma.

Quadro 16 - Potencial atividade biológica dos compostos promissores no sítio do NADH da enzima IMPDH de *C. parvum*.

Composto BraCoLi	Atividade biológica			
	Antiparasitária		Antiprotozoário	
	Pa*	Pi*	Pa*	Pi*
BR010187	-	-	-	-
BR010198	-	-	-	-
BR010212	-	-	-	-
BR010215	-	-	-	-
BR010216	-	-	-	-
BR010304	-	-	0,539	0,008
BR010518	-	-	0,311	0,042
BR020371	-	-	-	-
BR020373	-	-	-	-
BR020385	-	-	-	-
Tiazofurina	-	-	-	-
Ácido micofenólico	0,622	0,008	-	-

Pa: probabilidade de “ser ativo”. Pi: probabilidade de “ser inativo”.
SR: sem resultado. Fonte: Autoria própria (2025).

5.4 VERIFICAR A SELETIVIDADE *IN SILICO* DOS COMPOSTOS PROMISSORES FRENTE A ENZIMAS DE DIFERENTES HOSPEDEIROS MAMÍFEROS

Através da plataforma SwissTargetPrediction, foi possível avaliar a seletividade dos compostos promissores para a IMPDH de vertebrados. O composto BR020054 apresentou uma probabilidade de 12% de interagir com as isoenzimas IMPDH 1 e 2 de *H. sapiens*, o que pode indicar um risco de efeitos colaterais quando administrado

em humanos. Além disso, também possui 12% de probabilidade de interagir com a IMPDH 2 de *Mus musculus*. O composto BR020046 apresentou uma probabilidade de 11% de interagir exclusivamente com a IMPDH 2 de *M. musculus*, o que levanta preocupação quanto a uma possível reação cruzada se administrado em humanos para o tratamento de alguma doença.

Para os compostos com probabilidade de inibição igual a zero, isso indica que não há interação com a IMPDH. Já para os compostos que não retornaram resultados, significa que a enzima não foi identificada na base de dados do programa com similaridade suficiente a outros compostos estudados.

Quadro 17 - Resultados da seletividade dos compostos promissores no sítio do ligante IMP frente à enzimas ortólogas de mamíferos

Composto BraCoLi	**Hospedeiro**	**Enzima**	**Percentual de probabilidade inibição (%)**
BR010017	*Homo sapiens*	IMPDH1 e 2	SR
	Mus musculus	IMPDH2	0
	Rattus novergicus	IMPDH1	SR
BR010035	*Homo sapiens*	IMPDH1 e 2	0
	Mus musculus	IMPDH2	0
	Rattus novergicus	IMPDH1	SR
BR010036	*Homo sapiens*	IMPDH1 e 2	SR
	Mus musculus	IMPDH2	0
	Rattus novergicus	IMPDH1	SR
BR020046	*Homo sapiens*	IMPDH1 e 2	SR
	Mus musculus	IMPDH2	11%
	Rattus novergicus	IMPDH1	SR

Composto BraCoLi	**Hospedeiro**	**Enzima**	**Percentual de probabilidade inibição (%)**
BR020054	*Homo sapiens*	IMPDH1 e 2	12%
	Mus musculus	IMPDH2	12%
	Rattus novergicus	IMPDH1	SR
BR020113	*Homo sapiens*	IMPDH1 e 2	0
	Mus musculus	IMPDH2	0
	Rattus novergicus	IMPDH1	SR
BR020128	*Homo sapiens*	IMPDH1 e 2	0
	Mus musculus	IMPDH2	0
	Rattus novergicus	IMPDH1	SR
BR020371	*Homo sapiens*	IMPDH1 e 2	SR
	Mus musculus	IMPDH2	SR
	Rattus novergicus	IMPDH1	SR
BR020373	*Homo sapiens*	IMPDH1 e 2	SR
	Mus musculus	IMPDH2	SR
	Rattus novergicus	IMPDH1	SR
BR020385	*Homo sapiens*	IMPDH1 e 2	SR
	Mus musculus	IMPDH2	SR
	Rattus novergicus	IMPDH1	SR
Mizoribina	*Homo sapiens*	IMPDH1 e 2	0
	Mus musculus	IMPDH2	SR

Composto BraCoLi	Hospedeiro	Enzima	Percentual de probabilidade inibição (%)
	Rattus novergicus	IMPDH1	SR
Ribavirina	*Homo sapiens*	IMPDH1 e 2	SR
	Mus musculus	IMPDH2	SR
	Rattus novergicus	IMPDH1	SR

SR: sem resultado. Fonte: Autoria própria (2025).

No quadro 18, apenas o composto BR010216 apresentou interação com as isoenzimas IMPDH 1 e 2 de *H. sapiens*, com uma probabilidade de 6%. A interação com a IMPDH 2 de *M. musculus* também foi de 6%. Em comparação, o controle ácido micofenólico apresentou uma probabilidade de interação significativamente maior, de 96%, tanto com as isoenzimas humanas quanto com a IMPDH de *M. musculus*.

Este resultado reforça o mecanismo de ação do ácido micofenólico (MPA), que atua especificamente nas enzimas IMPDH 1 e 2 humanas, uma vez que o fármaco se liga a resíduos não conservados presentes apenas nessas isoenzimas. Dessa forma, o MPA é um potente inibidor das IMPDHs de mamíferos, mas apresenta uma eficácia reduzida ao inibir as enzimas microbianas (Umejiego *et al*., 2004).

Quadro 18 - Resultados da seletividade dos compostos promissores no sítio do cofator NAD+ frente às enzimas ortólogas de mamíferos

Composto BraCoLi	Hospedeiro	Enzima	Percentual de probabilidade inibição (%)
BR010187	*Homo sapiens*	IMPDH1 e 2	SR
	Mus musculus	IMPDH2	SR
	Rattus novergicus	IMPDH1	SR

Composto BraCoLi	**Hospedeiro**	**Enzima**	**Percentual de probabilidade inibição (%)**
BR010198	*Homo sapiens*	IMPDH1 e 2	SR
	Mus musculus	IMPDH2	0
	Rattus novergicus	IMPDH1	SR
BR010212	*Homo sapiens*	IMPDH1 e 2	SR
	Mus musculus	IMPDH2	0
	Rattus novergicus	IMPDH1	SR
BR010215	*Homo sapiens*	IMPDH1 e 2	SR
	Mus musculus	IMPDH2	SR
	Rattus novergicus	IMPDH1	SR
BR010216	*Homo sapiens*	IMPDH1 e 2	6%
	Mus musculus	IMPDH2	6%
	Rattus novergicus	IMPDH1	SR
BR010304	*Homo sapiens*	IMPDH1 e 2	SR
	Mus musculus	IMPDH2	SR
	Rattus novergicus	IMPDH1	SR
BR010518	*Homo sapiens*	IMPDH1 e 2	SR
	Mus musculus	IMPDH2	SR
	Rattus novergicus	IMPDH1	SR
BR020371	*Homo sapiens*	IMPDH1 e 2	SR
	Mus musculus	IMPDH2	SR

Composto BraCoLi	**Hospedeiro**	**Enzima**	**Percentual de probabilidade inibição (%)**
	Rattus novergicus	IMPDH1	SR
BR020373	*Homo sapiens*	IMPDH1 e 2	SR
	Mus musculus	IMPDH2	SR
	Rattus novergicus	IMPDH1	SR
BR020385	*Homo sapiens*	IMPDH1 e 2	SR
	Mus musculus	IMPDH2	SR
	Rattus novergicus	IMPDH1	SR
Tiazofurina	*Homo sapiens*	IMPDH1 e 2	SR
	Mus musculus	IMPDH2	0
	Rattus novergicus	IMPDH1	SR
Ácido micofenólico	*Homo sapiens*	IMPDH1 e 2	96%
	Mus musculus	IMPDH2	96%
	Rattus novergicus	IMPDH1	SR

SR: sem resultado. Fonte: Autoria própria (2025).

6 CONCLUSÃO

Através da modelagem comparativa, foi possível construir um modelo 3D completo da enzima IMPDH de *C. parvum*, o que permitiu a realização de estudos de atracamento molecular com uma biblioteca brasileira pública, contendo 1.176 compostos únicos e inéditos. Os compostos que apresentaram os melhores resultados de ancoragem molecular e de interações foram com o sítio catalítico do substrato natural IMP: BR010017, BR010035, BR010036, BR020128, BR020371, BR020373 e BR020385. Embora os três últimos não apresentem interações específicas com resíduos do sítio catalítico, vale ressaltar que eles bloqueiam a entrada do ligante natural, justificando a continuidade dos estudos.

Em relação ao sítio do cofator NAD+, os mesmos compostos mencionados anteriormente foram selecionados, além dos compostos BR010304 e BR010518, que interagiram com pelo menos um resíduo essencial para a atividade catalítica e apresentaram valores de energia inferiores aos dos controles positivos.

Entre os dez ligantes analisados no sítio catalítico do substrato natural IMP, o composto BR020285 se destacou com o melhor desempenho, pois não apresentou reprovação em nenhum parâmetro farmacocinético, exceto pela inibição do CYP3A4. Dependendo do objetivo, essa característica pode ser vantajosa, pois pode reduzir o metabolismo do fármaco e aumentar sua concentração plasmática.

O composto BR020128 apresentou baixa permeabilidade nas células Caco-2, baixo volume de distribuição e *Clearance* total de -0,197 mL/min/kg, indicando ser um ligante com baixa excreção. Já o composto BR010017 mostrou apenas uma permeabilidade reduzida nas células Caco-2.

Quanto ao perfil farmacocinético do sítio do cofator NAD+, o composto BR010518 apresentou baixa permeabilidade nas células Caco-2 (-0,262 log Papp em 10^-6 cm/s) e baixo volume de distribuição. O composto BR010304, por sua vez, mostrou fração livre no plasma igual a zero, o que pode comprometer o transporte celular.

Todos os compostos dos sítios catalíticos da IMP e NAD+ apresentaram alguma toxicidade, com exceção do composto BR010518. Os compostos BR020046 e BR020054, do sítio catalítico da IMP, demonstraram atividade antiparasitária, mas com seletividade de aproximadamente 12% para IMPDH de *M. musculus* e *H. sapiens*, o que pode limitar a continuidade dos estudos deste composto devido à baixa

seletividade para *C. parvum*.

No sítio do cofator NAD+, os compostos BR010304 e BR010518 apresentaram atividade antiprotozoária, enquanto o BR010216, com seletividade de 6% para IMPDH de *M. musculus* e *H. sapiens*, o que pode comprometer a sua continuidade nos testes *in vitro* e *in vivo* devido à sua baixa seletividade para *C. parvum*.

Portanto, os resultados mais promissores obtidos neste estudo foram para o sítio catalítico do IMP, com destaque para os compostos BR010017, BR020113 e BR020128, e para o sítio do cofator NAD+ os compostos BR010304 e BR010518.

7 PERSPECTIVAS

As perspectivas para estudos futuros são:

- Testar o atracamento nas outras cadeias do tetrâmero modelado para avaliar possíveis diferenças entre elas, uma vez que não foi realizado atracamento com cadeias laterais flexíveis;
- O trabalho se concentrou apenas na etapa inicial do mecanismo catalítico, as demais etapas podem ter a alça do sítio modelada em suas outras conformações e testadas via atracamento molecular;
- Realizar testes de dinâmica molecular das moléculas promissoras para avaliar a estabilidade da interação com os sítios estudados.
- Realizar os testes in vitro das moléculas promissoras deste trabalho a fim de avaliar a capacidade inibitória dos ligantes bem como possíveis toxicidades em modelos celulares.
- Realizar avaliação de farmacofóros nos diferentes estágios do mecanismo catalítico, em ambos os sítios estudados, para melhoramento de compostos promissores.

REFERÊNCIAS

ABRAHAMSEN, M. S. *et al*. Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. **Science**, v. 304, n. 5669, p. 441-445, 2004.

ADEYEMO, F. E. *et al*. Efficiency of chlorine and UV in the inactivation of *Cryptosporidium* and *Giardia* in wastewater. **PLoS One**, v. 14, n. 5, p. e0216040, 2019.

ADL, S. M. *et al*. Revisions to the classification, nomenclature, and diversity of eukaryotes. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 4-119, 2019.

ALARCÓN-ZAPATA, M. A. *et al*. Frequency of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in Domestic and Captive Wild Animals in the North of Veracruz, Mexico. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 43, n. 4, p. 814-818, 2023.

ALDEYARBI, H. M.; KARANIS, P. The Ultra-Structural Similarities between *Cryptosporidium parvum* and the Gregarines. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 79-85, 2016.

ALI, M. *et al*. Emerging therapeutic avenues against Cryptosporidium: A comprehensive review. **Veterinary Parasitology**, v. 331, p. 110279, 2024.

ALMEIDA, Diogo Marinho. **Dockthor: Implementao, aprimoramento e validao de um programa de docking receptor-ligante**. 2011. Tese de Doutorado - Laboratório Nacional de Computação Científica-LNCC, Petrópolis, Rio de Janeiro, 2011

AMADI, B. *et al*. Effect of nitazoxanide on morbidity and mortality in Zambian children with cryptosporidiosis: a randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 360, n. 9343, p. 1375-1380, 2002.

ARNOLD, S. L. *et al*. P-Glycoprotein–Mediated Efflux Reduces the In Vivo Efficacy of a Therapeutic Targeting the Gastrointestinal Parasite *Cryptosporidium*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 220, n. 7, p. 1188-1198, 2019.

ATIA, M. M. *et al.* Assessing the efficacy of nitazoxanide in treatment of cryptosporidiosis using PCR examination. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 46, n. 3, p. 683-692, 2016.

AYDOGDU, U. *et al*. The determination of treatment effect of chitosan oligosaccharide in lambs with experimentally cryptosporidiosis. **Small Ruminant Research**, v. 180, p. 27-34, 2019.

BARAGAÑA, B. *et al*. Lysyl-tRNA synthetase as a drug target in malaria and cryptosporidiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 14, p. 7015-7020, 2019.

BASORE, K. *et al*. How do antimalarial drugs reach their intracellular targets?. **Frontiers in pharmacology**, v. 6, p. 91, 2015.

BERNHOFER, Michael et al. PredictProtein-predicting protein structure and function for 29 years. **Nucleic acids research**, v. 49, n. W1, p. W535-W540, 2021.

BERMAN, H. M. *et al*. The protein data bank. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 58, n. 6, p. 899-907, 2002

BONAFONTE, M. *et al*. *Cryptosporidium parvum*: effect of multi-drug reversing agents on the expression and function of ATP-binding cassette transporters. **Experimental parasitology**, v. 106, n. 3-4, p. 126-134, 2004.

BHALCHANDRA, S.; CARDENAS, D.; WARD, H. D. Recent breakthroughs and ongoing limitations in *Cryptosporidium* research. **F1000Research**, v. 7, 2018.

BOUZID, M.; KINTZ, E.; HUNTER, P. R. Risk factors for *Cryptosporidium* infection in low and middle income countries: A systematic review and meta-analysis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 6, p. e0006553, 2018.

BREMER, S. *et al*. Expression of IMPDH1 is regulated in response to mycophenolate concentration. **International immunopharmacology**, v. 9, n. 2, p. 173-180, 2009.

CARLTON, J. M. *et al*. Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. **Science**, v. 315, n. 5809, p. 207-212, 2007.

CARRENO, R. A.; MATRIN, D. S.; BARTA, J. R. *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. **Parasitology Research**, v. 85, n. 11, p. 899-904, 1999.

CASTELLANOS-GONZALEZ, A. *et al*. A novel calcium-dependent protein kinase inhibitor as a lead compound for treating cryptosporidiosis. **The Journal of infectious diseases**, v. 208, n. 8, p. 1342-1348, 2013.

CAVALIER-SMITH, T. Gregarine site-heterogeneous 18S rDNA trees, revision of gregarine higher classification, and the evolutionary diversification of Sporozoa. **European journal of protistology**, v. 50, n. 5, p. 472-495, 2014.

CER, R. Z. *et al*. IC 50-to-K i: a web-based tool for converting IC 50 to K i values for inhibitors of enzyme activity and ligand binding. **Nucleic acids research**, v. 37, n. suppl_2, p. W441-W445, 2009.

CHALMERS, R. M.; GILES, M. Zoonotic cryptosporidiosis in the UK: challenges for control. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 5, p. 1487-97, 2010.

CHALMERS, R. M.; DAVIES, A. P.; TYLER, K. *Cryptosporidium*. **Microbiology (Reading)**, v. 165, n. 5, p. 500-502, 2019.

CHAURET, C. P. *et al.* Chlorine dioxide inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts and bacterial spore indicators. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 7, p. 2993-3001, 2001.

CHECKLEY, W. *et al*. A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *Cryptosporidium*. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p.85-94, 2015.

CHEN, L.; PANKIEWICZ, K. W. Recent development of IMP dehydrogenase inhibitors for the treatment of cancer. **Current opinion in drug discovery & development**, v. 10, n. 4, p. 403-412, 2007.

CHEN, L. *et al.* Triazole-linked inhibitors of inosine monophosphate dehydrogenase from human and *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of medicinal chemistry**, v. 53, n. 12, p. 4768-4778, 2010.

CHEN, X. *et al*. Molecular Epidemiological Investigation of *Cryptosporidium* sp., *Giardia duodenalis*, Enterocytozoon bieneusi and Blastocystis sp. Infection in Free-ranged Yaks and Tibetan Pigs on the Plateau. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 42, n. 4, p. 533-539, 2022.

COLBY, T. D. *et al.* Crystal structure of human type II inosine monophosphate dehydrogenase: implications for ligand binding and drug design**. Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 7, p. 3531-3536, 1999.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. **Nucleic acids research**, v. 47, n. W1, p. W357-W364, 2019.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 42717, 2017.

DĂRĂBUȘ, G. et al. Epidemiology of *Cryptosporidium* infection in Romania: a review. **Microorganisms**, v. 11, n. 7, p. 1793, 2023.

DIGITS, J. A.; HEDSTROM, L. Species-Specific Inhibition of Inosine 5 '-Monophosphate Dehydrogenase by Mycophenolic Acid. **Biochemistry**, v. 38, n. 46, p. 15388-15397, 1999.

DILLINGHAM, R. A.; LIMA, A. A.; GUERRANT, R. L. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. **Microbes and infection**, v. 4, n. 10, p. 1059-1066, 2002.

DIPTYANUSA, A.; SARI, I. P. Treatment of human intestinal cryptosporidiosis: A review of published clinical trials. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 17, p. 128-138, 2021.

DONG, S. *et al*. Prevalence of *Cryptosporidium* infection in the global population: a systematic review and meta-analysis. **Acta Parasitologica**, v. 65, p. 882-889, 2020.

DROZDETSKIY, A. *et al*. JPred4: a protein secondary structure prediction server. **Nucleic acids research**, v. 43, n. W1, p. W389-W394, 2015.

DUMAINE, J. E.; TANDEL, J.; STRIEPEN, B. *Cryptosporidium parvum*. **Trends in Parasitology**, v. 36, n. 5, p. 485-486, 2020.

DURU, S. Y. *et al*. The therapeutic efficacy of tylosin in calf cryptosporidiosis. **Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, v. 19, p. A175-A180, 2013.

EBERHARDT, J. *et al*. AutoDock Vina 1.2. 0: New docking methods, expanded force field, and python bindings. **Journal of chemical information and modeling**, v. 61, n. 8, p. 3891-3898, 2021. doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00203

ELSAFI, S. H. *et al*. Comparison of microscopy, rapid immunoassay, and molecular techniques for the detection of Giardia lamblia and Cryptosporidium parvum. **Parasitology research**, v. 112, n. 4, p. 1641-1646, 2013.

FELCZAK, K. *et al*. Cofactor-type inhibitors of inosine monophosphate dehydrogenase via modular approach: targeting the pyrophosphate binding sub-domain. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 19, n. 5, p. 1594-1605, 2011.

FILIMONOV, D. A. *et al*. Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the PASS online web resource. **Chemistry of Heterocyclic Compounds**, v. 50, p. 444-457, 2014.

FOTIE, J. Inosine 5'-Monophosphate Dehydrogenase (IMPDH) as a potential target for the development of a new generation of antiprotozoan agents. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 8, p. 656-671, 2018.

GABLER, F. *et al*. Protein sequence analysis using the MPI bioinformatics toolkit. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 72, n. 1, p. e108, 2020.

GALVÁN, A. L. *et al*. A year-long study of *Cryptosporidium* species and subtypes in recreational, drinking and wastewater from the central area of Spain. **Science of the Total Environment,** v. 468-469, p. 368-375, 2014.

GAN, L.; PETSKO, G. A.; HEDSTROM, L. Crystal structure of A ternary complex of tritrichomonas foetus inosine 5 ‘-Monophosphate dehydrogenase: Nad+ orients the active site loop for catalysis. **Biochemistry**, v. 41, n. 44, p. 13309-13317, 2002.

GARNIER, J.; GIBRAT, J. F.; ROBSON, B. [32] GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. **Methods in enzymology**, v. 266, p. 540-553, 1996.

GERACE, E.; PRESTI, V. D. M. L.; BIONDO, C. *Cryptosporidium* infection: epidemiology, pathogenesis, and differential diagnosis. **European Journal of Microbiology and Immunology**, v.9, n.4, p.119-123, 2019.

GHAZY, A. A.; ABDEL-SHAFY, S.; SHAAPAN, R. M. Cryptosporidiosis in animals and man: 1. Taxonomic classification, life cycle, epidemiology and zoonotic importance. **Asian Journal of Epidemiology**, v.8, n.3, p. 48-63, 2015.

GOLLAPALLI, Deviprasad R. et al. Structural determinants of inhibitor selectivity in prokaryotic IMP dehydrogenases. **Chemistry & biology**, v. 17, n. 10, p. 1084-1091, 2010.

GORLA, S. K. *et al*. Validation of IMP dehydrogenase inhibitors in a mouse model of cryptosporidiosis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 3, p. 1603-1614, 2014.

GRIFFITHS, J. K. *et al*. Paromomycin and geneticin inhibit intracellular *Cryptosporidium parvum* without trafficking through the host cell cytoplasm: implications for drug delivery. **Infection and immunity**, v.66, n.8, p. 3874-3883, 1998.

GUERRANT, R. L. Cryptosporidiosis: an emerging, highly infectious threat. **Emerging infectious diseases**, v. 3, n. 1, p. 51-57, 1997.

GUILLÉN SCHLIPPE, Y. V. *et al*. Substitution of the conserved Arg-Tyr dyad selectively disrupts the hydrolysis phase of the IMP dehydrogenase reaction. **Biochemistry**, v. 43, n. 15, p. 4511-4521, 2004.

HALLGREN, J*. et al*. DeepTMHMM predicts alpha and beta transmembrane proteins using deep neural networks. **BioRxiv**, p. 2022.04. 08.487609, 2022.

HEDSTROM, L. IMP dehydrogenase: structure, mechanism, and inhibition. **Chemical reviews**, v. 109, n. 7, p. 2903-2928, 2009.

HELMY, Y. A.; HAFEZ, H. M. Cryptosporidiosis: From prevention to treatment, a narrative review. **Microorganisms**, v. 10, n. 12, p. 2456, 2022.

HEWITT, R. G. *et al*. Paromomycin: no more effective than placebo for treatment of cryptosporidiosis in patients with advanced human immunodeficiency virus infection. **Clinical infectious diseases**, v. 31, n. 4, p. 1084-1092, 2000.

HUANG, M. Z. et al. Therapeutic effects of acetylspiramycin and garlicin on cryptosporidiosis among drug users. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 5, n. 3, p. 185-190, 2015.

INNES, E. A. *et al*. A one health approach to tackle cryptosporidiosis. **Trends in parasitology**, v.36, n.3, p. 290-303, 2020.

HUSSIEN, S. M. M. *et al*. Comparative study between the effect of nitazoxanide and paromomycine in treatment of cryptosporidiosis in hospitalized children. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 43, n. 2, p. 463-470, 2013.

JANOUŠKOVEC, J. *et al*. Apicomplexan-like parasites are polyphyletic and widely but selectively dependent on cryptic plastid organelles. **Elife**, v. 8, p. e49662, 2019.

JONES, D. T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. **Journal of molecular biology**, v. 292, n. 2, p. 195-202, 1999.

JURRUS, E. *et al*. Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. **Protein Science**, v. 27, n. 1, p. 112-128, 2018.

KATIYAR, K.; SRIVASTAVA, R. K.; NATH, R. Identification of novel anti-cryptosporidial inhibitors through a combined approach of pharmacophore modeling, virtual screening, and molecular docking. **Informatics in Medicine Unlocked**, v. 24, p. 100583, 2021.

KAR, S. *et al*. Quantitative comparison of different purification and detection methods for *Cryptosporidium* parvum oocysts. **Veterinary parasitology**, v. 177, n. 3-4, p. 366-370, 2011.

KHALIL, I. A. *et al*. Morbidity, mortality, and long-term consequences associated with diarrhoea from *Cryptosporidium* infection in children younger than 5 years: a meta-analyses study. **The Lancet Global Health**, v. 6, n. 7, p. e758-e768, 2018.

KHAN, A.; SHAIK, J. S.; GRIGG, M. E. Genomics and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* species. **Acta Tropica**, v. 184, p. 1-14, 2018.

KHURANA, S.; CHAUDHARY, P. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. **Tropical parasitology**, v. 8, n. 1, p. 2-7, 2018.

KIM, Y. *et al*. Structure of *Cryptosporidium* IMP dehydrogenase bound to an inhibitor with in vivo antiparasitic activity. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications**, v. 71, n. 5, p. 531-538, 2015.

KIM, S. S.; APRAHAMIAN, M. L.; LINDERT, Steffen. Improving inverse docking target identification with Z-score selection. **Chemical biology & drug design**, v. 93, n. 6, p. 1105-1116, 2019.

KIRUBAKARAN, S. *et al*. Structure–activity relationship study of selective benzimidazole-based inhibitors of Cryptosporidium parvum IMPDH. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 22, n. 5, p. 1985-1988, 2012.

KONING, H. P.; BRIDGES, D. J.; BURCHMORE, R. J. S. Purine and pyrimidine transport in pathogenic protozoa: from biology to therapy. **FEMS microbiology reviews**, v. 29, n. 5, p. 987-1020, 2005.

KONING, H. P. Drug resistance in protozoan parasites. **Emerging Topics in Life Sciences**, v. 1, n. 6, p. 627-632, 2017.

LEE, S. *et al*. Piperazine-derivative MMV665917: an effective drug in the diarrheic piglet model of Cryptosporidium hominis. **The Journal of infectious diseases**, v. 220, n. 2, p. 285-293, 2019

LEVINE, N. D. Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. **The Journal of parasitology**, v. 66, n. 5, p. 830-834, 1980.

LI, R. J. *et al*. Binding mode of inhibitors and Cryptosporidium parvum IMP dehydrogenase: A combined ligand-and receptor-based study. **SAR and QSAR in Environmental Research**, v. 26, n. 5, p. 421-438, 2015.

LI, J. *et al*. Detection of human intestinal protozoan parasites in vegetables and fruits: a review. **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 380, p. 1-19, 2020.

LI, Y. *et al*. ResPRE: high-accuracy protein contact prediction by coupling precision matrix with deep residual neural networks. **Bioinformatics**, v. 35, n. 22, p. 4647-4655, 2019.

LIN, K. *et al*. A simple and fast secondary structure prediction method using hidden neural networks. **Bioinformatics**, v. 21, n. 2, p. 152-159, 2005.

LIPINSKI, C. A. *et al*. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, **Advanced Drug Delivery Review,** v. 46, n. 1-3, p.3-26, 2001.

LUTTRELL, J. *et al*. Predicting protein residue-residue contacts using random forests and deep networks. **BMC bioinformatics**, v. 20, p. 115-127, 2019.

MAKOWSKA-GRZYSKA, M. *et al*. A novel cofactor-binding mode in bacterial IMP dehydrogenases explains inhibitor selectivity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 9, p. 5893-5911, 2015.

MANZOLI, L. *et al*. Phosphoinositide signaling in nuclei of Friend Cells: tiazofurin down-regulates phospholipase C β1. **Cancer research**, v. 55, n. 14, p. 2978-2980, 1995.

MATHUR, V. *et al*. Multiple independent origins of apicomplexan-like parasites. **Current Biology**, v. 29, n. 17, p. 2936-2941. e5, 2019.

MEISEL, J. L. *et al*. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. **Gastroenterology**, v. 70, n. 6, p. 1156-1160, 1976.

MESSNER, M. J.; BERGER, P. *Cryptosporidium* infection risk: results of new dose-response modeling. **Risk Analysis**, v. 36, n. 10, p. 1969-1982, 2016.

MIYAMOTO, Y.; ECKMANN, L. Drug development against the major diarrhea-causing parasites of the small intestine, *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1208, 2015.

MONTGOMERIE, S. *et al.* PROTEUS2: a web server for comprehensive protein structure prediction and structure-based annotation. **Nucleic acids research**, v. 36, n. suppl_2, p. W202-W209, 2008.

MORRIS, G. M.; HUEY, R.; OLSON, A. J. Using autodock for ligand-receptor docking. **Current protocols in bioinformatics**, v. 24, n. 1, p. 8.14. 1-8.14. 40, 2008.

MORRISON, H. G. *et al.* Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite Giardia lamblia. **Science**, v. 317, n. 5846, p. 1921-1926, 2007.

MUCENIC, M. Advancements in autoimmune hepatitis management: Perspectives for future guidelines. **World Journal of Hepatology**, v. 16, n. 2, p. 135, 2024.

MURAKOSHI, F. *et al*. Administration of lasalocid-NA is preventive against cryptosporidiosis of newborn calves. **The Veterinary Record**, v. 175, n. 14, p. 353, 2014.

MURAKOSHI, F. *et al*. Nullscript inhibits Cryptosporidium and Toxoplasma growth. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 14, p. 159-166, 2020.

NAIR, V. et al. IMPDH as a biological probe for RNA antiviral drug discovery: synthesis, enzymology, molecular docking, and antiviral activity of new ribonucleosides with surrogate bases. **Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids**, v. 26, n. 6-7, p. 651-654, 2007.

NAVARRO-I-MARTINEZ, L.; DEL ÁGUILA, C.; BORNAY-LLINARES, F. J. *Cryptosporidium*: un género en revisión. Situación en España. **Enfermedades infecciosas y Microbiología clínica**, v. 29, n. 2, p. 135-143, 2011.

NETO, R. C. *et al*. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in surface water supply of Campinas, southeast Brazil. **Water Science and Technology**, v. 62, n. 1, p. 217-222, 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Leninger princípios de bioquímica. In: **Leninger princípios de bioquímica**. 2002. p. 975.

NIELSEN, H. *et al*. SignalP: the evolution of a web server. In: **Protein Bioinformatics**. New York, NY: Springer US, 2024. p. 331-367.

NIME, F. A. *et al*. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. **Gastroenterology**, v. 70, n. 4, p. 592-598, 1976.

O'LEARY, J. K; SLEATOR, R. D; LUCEY, B. *Cryptosporidium* spp. diagnosis and research in the 21st century. **Food and Waterborne Parasitology**, v. 24, n. e00131, p. 1-15, 2021.

O'SHEA, R.; MOSER, H. E. Physicochemical properties of antibacterial compounds: implications for drug discovery. **Journal of medicinal chemistry**, v. 51, n. 10, p. 2871-2878, 2008.

OLAH, E. *et al*. Down-regulation of c-myc and c-Ha-ras gene expression by tiazofurin in rat hepatoma cells. **Cancer biochemistry biophysics**, v. 11, n. 2, p. 107-117, 1990.

PARANDOOSH, Z. *et al*. Changes in diacylglycerol and cyclic GMP during the differentiation of human myeloid leukemia K562 cells. **Life sciences**, v. 46, n. 4, p. 315-320, 1990.

PEETERS, J. E. *et al*. Effect of disinfection of drinking water with ozone or chlorine dioxide on survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Applied and environmental microbiology**, v. 55, n. 6, p. 1519-1522, 1989.

PETERSEN, Bent et al. A generic method for assignment of reliability scores applied to solvent accessibility predictions. **BMC structural biology**, v. 9, p. 1-10, 2009.

PIRES, D. E. V; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B. pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. **Journal of medicinal chemistry**, v. 58, n. 9, p. 4066-4072, 2015.

POLLASTRI, G. *et al*. Improving the prediction of protein secondary structure in three and eight classes using recurrent neural networks and profiles. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 47, n. 2, p. 228-235, 2002.

PUTIGNANI, L.; MENICHELLA, D. Global Distribution, Public Health and Clinical Impact of the Protozoan Pathogen *Cryptosporidium*. Interdisciplinary**. Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2010, p. 1-39, 2010.

RAHMAN, S. U. *et al*. Advances in therapeutic and vaccine targets for Cryptosporidium: Challenges and possible mitigation strategies. **Acta Tropica**, v. 226, p. 106273, 2022.

RATCLIFFE, A. J. Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase inhibitors for the treatment of autoimmune diseases. **Current opinion in drug discovery & development**, v. 9, n. 5, p. 595-605, 2006.

RYAN, U.; HIJJAWI, N. New developments in *Cryptosporidium* research. **International journal for parasitolog**y, v. 45, n. 6, p. 367-373, 2015.

RYAN, U.; ZAHEDI, A.; PAPARINI, A. *Cryptosporidium* in humans and animals—a one health approach to prophylaxis. **Parasite immunology**, v. 38, n. 9, p. 535-547, 2016.

RYAN, E. *et al*. An Update on Zoonotic *Cryptosporidium* Species and Genotypes in Humans**. Animals,** v.11, n. 3307, p.1-22, 2021.

RYAN, U. M. *et al*. Taxonomy and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* and Giardia–a 50 year perspective (1971–2021). **International Journal for Parasitology**, v. 51, n. 13-14, p. 1099-1119, 2021.

RUECKERT, S.; BETTS, E. L.; TSAOUSIS, A. D. The symbiotic spectrum: where do the gregarines fit?. **Trends in Parasitology**, v. 35, n. 9, p. 687-694, 2019.

SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **Journal of molecular biology**, v. 234, n. 3, p. 779-815, 1993.

SALOMAKI, E. D. *et al*. Gregarine single-cell transcriptomics reveals differential mitochondrial remodeling and adaptation in apicomplexans. **BMC biology**, v. 19, p. 1-19, 2021.

SANDERSON, S. J. *et al*. Determining the protein repertoire of *Cryptosporidium parvum* sporozoites. **Proteomics**, v. 8, n. 7, p. 1398-1414, 2008.

SANTOS, V. L. dos A.; GONSALVES, A. de A.; ARAÚJO, 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. **Química Nova**, v. 41, n. 1, p. 110-115, 2018.

SANTÍN, M.; TROUT, J. M.; FAYER, R. A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. **Veterinary parasitology**, v. 155, n. 1-2, p. 15-23, 2008.

SANTIN, M. *Cryptosporidium* and *Giardia* in Ruminants. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 36, n. 1, p. 223-238, 2020.

SHAH, C. P.; KHARKAR, P. S. Inosine 5′-monophosphate dehydrogenase inhibitors as antimicrobial agents: recent progress and future perspectives. **Future Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 11, p. 1415-1429, 2015.

SAVIOLI, L.; SMITH, H.; THOMPSON, A. Giardia and *Cryptosporidium* join the 'neglected diseases initiative'. **Trends in parasitology**, v. 22, n. 5, p. 203-208, 2006.

SIEVERS, F. *et al*. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular systems biology**, v. 7, n. 1, p. 539, 2011.

SINKALA, E. *et al*. In a trial of the use of miltefosine to treat HIV-related cryptosporidiosis in Zambian adults, extreme metabolic disturbances contribute to high mortality. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 105, n. 2, p. 129-134, 2011.

SINTCHAK, M. D.; NIMMESGERN, E. The structure of inosine 5′-monophosphate dehydrogenase and the design of novel inhibitors. **Immunopharmacology**, v. 47, n. 2-3, p. 163-184, 2000.

SUWITONO, M. R.; LIZKI, A. C. Docking study of Cyclomulberrin, Cyclomorusin and Engeletin into p50 NF-kÎ² Transcription Factor with AutoDock Vina. **Journal of International Scholars Conference-SCIENCE & ENGINEERING**, v. 1, n. 4, 2016.

SPARKS, H. et al. Treatment of *Cryptosporidium*: what we know, gaps, and the way forward. **Current tropical medicine reports**, v. 2, n. 3, p. 181-187, 2015.

STRIEPEN, B. *et al*. Gene transfer in the evolution of parasite nucleotide biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 9, p. 3154-3159, 2004.

TORRES, P. H. M. *et al*. Key topics in molecular docking for drug design. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 18, p. 4574, 2019.

TUSNADY, G. E.; SIMON, I. The HMMTOP transmembrane topology prediction server. **Bioinformatics**, v. 17, n. 9, p. 849-850, 2001.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010.

UniProt: the universal protein knowledgebase in 2023. **Nucleic acids research**, v. 51, n. D1, p. D523-D531, 2023.

UMEJIEGO, N. N. *et al*. *Cryptosporidium parvum* IMP dehydrogenase: identification of functional, structural, and dynamic properties that can be exploited for drug design. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 39, p. 40320-40327, 2004.

VÁZQUEZ, J. *et al*. Merging ligand-based and structure-based methods in drug discovery: An overview of combined virtual screening approaches. **Molecules**, v. 25, n. 20, p. 4723, 2020.

VÉLEZ, J. *et al*. Long-term use of yeast fermentation products in comparison to halofuginone for the control of cryptosporidiosis in neonatal calves. **Veterinary Parasitology**, v. 269, p. 57-64, 2019.

VERÍSSIMO, G. C. *et al*. The Brazilian compound library (BraCoLi) database: a repository of chemical and biological information for drug design. **Molecular Diversity**, v.26, n. 6, p. 3387-3397, 2022.

VERMEULEN, L. C. *et al*. Global *Cryptosporidium* loads from livestock manure. **Environmental science & technology**, v. 51, n. 15, p. 8663-8671, 2017.

VINAYAK, S. *et al*. Bicyclic azetidines kill the diarrheal pathogen Cryptosporidium in mice by inhibiting parasite phenylalanyl-tRNA synthetase. **Science Translational Medicine**, v. 12, n. 563, p. eaba8412, 2020.

XIAO, L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. **Experimental parasitology**, v. 124, n. 1, p. 80-89, 2010.

ZHANG, R. *et al*. Characteristics and crystal structure of bacterial inosine-5‘-monophosphate dehydrogenase. **Biochemistry**, v. 38, n. 15, p. 4691-4700, 1999.

WANG, W.; HEDSTROM, L. Kinetic mechanism of human inosine 5 ‘-monophosphate dehydrogenase type ii: random addition of substrates and ordered release of products. **Biochemistry**, v. 36, n. 28, p. 8479-8483, 1997.

WANG, R. J. *et al.* Widespread occurrence of *Cryptosporidium* infections in patients with HIV/AIDS: Epidemiology, clinical feature, diagnosis, and therapy. **Acta Tropica**, v. 187, p. 257-263, 2018.

WANG, Z. D. *et al*. Prevalence of *Cryptosporidium*, microsporidia and *Isospora* infection in HIV-infected people: a global systematic review and meta-analysis. **Parasites & Vectors**, v.11, n.28, p. 1- 19, 2018.

WANG, B.; CASTELLANOS-GONZALEZ, A.; WHITE J. A. C. Novel drug targets for treatment of cryptosporidiosis. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 24, n. 9, p. 915-922, 2020.

WELLS, B. *et al*. Prevalence, species identification and genotyping *Cryptosporidium* from livestock and deer in a catchment in the Cairngorms with a history of a contaminated public water supply. **Parasites & vectors**, v. 8, n. 66, p. 1-13, 2015.

WILLIAMS, C. J. *et al*. MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. **Protein Science**, v. 27, n. 1, p. 293-315, 2018.

ZHOU, T.; SHU, N.; HOVMÖLLER, S. A novel method for accurate one-dimensional protein structure prediction based on fragment matching. **Bioinformatics**, v. 26, n. 4, p. 470-477, 2010.

ZULU, I. *et al*. Albendazole chemotherapy for AIDS-related diarrhoea in Zambia—clinical, parasitological and mucosal responses. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 16, n. 3, p. 595-601, 2002.

APÊNDICE A - *TEMPLATES* COM SIMILARIDADE ACIMA DE 40% COM A SEQUÊNCIA DE IMPDH DE *Cryptosporidium parvum*

Código PDB	ORGANISMO	LIGANTES	IDENTIDADE	E-VALUE	CADEIAS	RESOLUÇÃO (Å)
3FFS	*Cryptosporidium parvum*	SEM LIGANTES	100%	6,389e-254	A, B, C, D,	3,19
7OJ2	*Bacillus subtilis*	PO_4, GOL	56%	7,844e-121	A	1,76
3TSB	*Bacillus anthracis*	PO_4	46%	1,289e-110	A, B	2,595
3KHJ	*Cryptosporidium parvum*	IMP, C64, ACT	89%	1,558e-217	A, B, C, D, E	2,8
4IXH	*Cryptosporidium parvum*	IMP, Q21, EDO	89%	1,558e-217	A, B, C, D	2,105
4QJ1	*Cryptosporidium parvum*	IMP, N09, EDO, ACY, FMT	89%	1,558e-217	A, B, C, D	2,415
4MZ1	*Campylobacter jejuni*	IMP, 2F1, SO_4, PO_4, ACY, K	61%	1,8e-143	A, B, C	2,3991
4MZ8	*Campylobacter jejuni*	IMP, C91, 2F2, SO_4, GOL, EDO, ACY, FMT, Cl	61%	1,8e-143	A, B, C	2,3991
5UQF	*Campylobacter jejuni*	IMP, 8KY, SO_4, GOL, EDO, Cl, K	61%	1,8e-143	A, B, C	2,73

Código PDB	ORGANISMO	LIGANTES	IDENTIDADE	E-VALUE	CADEIAS	RESOLUÇÃO (Å)
5UQG	*Campylobacter jejuni*	IMP, 8l4, EDO, K	61%	1,8e-143	A, B, C, D, E	2,03
5UQH	*Campylobacter jejuni*	IMP, 8L1, EDO, IPA, K	61%	1,8e-143	A, B, C, D, E	2,201
5URQ	*Campylobacter jejuni*	IMP, 8L7, K	61%	1,8e-143	A, B, C, D,	2,7
6MGR	*Campylobacter jejuni*	MPD, JQS, SO_4, K, Cl	61%	1,8e-143	A, B	1,97
4R7J	*Campylobacter jejuni*	IMP, MPD, SO_4, GOL, K, Cl	61%	1,8e-143	A	2,1172
4RV8	*Cryptosporidium parvum*	IMP, I13, PEG, GOL	89%	1,558e-217	A, B, C, D	2,053
4MJM	*Bacillus subtilis*	EDO	54%	1,469e-120	A, B, C, D	2,2544
1EEP	*Borreliella burgdorferi*	SO_4	53%	1,169e-112	A, B	2,4
5AHL	*Pseudomonas aeruginosa*	Na	53%	6,341e-119	A	1,951
4FEZ	*Vibrio cholerae*	PEG, EDO, FMT	53%	3,402e-122	A	2,16

Código PDB	ORGANISMO	LIGANTES	IDENTIDADE	E-VALUE	CADEIAS	RESOLUÇÃO (Å)
4Q32	*Clostridium perfringens*	IMP, C91	53%	5,123e-117	A, B, C, D	2,788
5AHM	*Pseudomonas aeruginosa*	IMP, PO_4	53%	6,341e-119	A, B	1,74
4Q33	*Clostridium perfringens*	IMP, 2YA, SO_4, GOL, ACY, FMT	53%	5,123e-117	A, B, C, D, E	2,885
5UWX	*Clostridium perfringens*	IMP, 8L7, MRD, MPD, ACY	53%	5,123e-117	A, B, C, D	1,85
5UXE	*Clostridium perfringens*	IMP, 8LA, MPD, SO_4, FMT, K	53%	5,123e-117	A, B, C, D	2,1
5UZC	*Clostridium perfringens*	IMP, 8N1, MRD, MPD, ACY, FMT	53%	5,123e-117	A, B, C, D	1,85
5UZE	*Clostridium perfringens*	IMP, 8L1, GOL, K	53%	5,123e-117	A, B, C, D	2,27
5UZS	*Clostridium perfringens*	IMP, 8L4, PG4, PGE, PEG, EDO, K, Mg	53%	5,123e-117	A, B, C, D	2,367
5VSV	*Clostridium perfringens*	IMP, 8KY	53%	5,123e-117	A, B, C, D	2,205
6MGU	*Bacillus anthracis*	JQS, PGE, PEG, EDO, K	52%	1,18e-115	A, B	1,54

Código PDB	ORGANISMO	LIGANTES	IDENTIDADE	E-VALUE	CADEIAS	RESOLUÇÃO (Å)
7MTU	*Bacillus anthracis*	IMP, ZO7, GOL, EDO, K	52%	1,18e-115	A, B, C, D, E	2,34
7MTX	*Bacillus anthracis*	IMP, ZO4, K	52%	1,18e-115	A, B, C, D, E	2,44
4FO4	*Vibrio cholerae*	IMP, MOA, K	52%	3,044e-118	A, B	2,03
4IX2	*Vibrio cholerae*	IMP, K	52%	3,044e-118	A, B, C, D	2,146
4QNE	*Vibrio cholerae*	IMP, NAJ, K,	52%	3,044e-118	A, B	2,32
4MY1	*Bacillus anthracis*	IMP, P68,	52%	1,18e-115	A, B, C, D, E	2,5997
4MY8	*Bacillus anthracis*	IMP, Q21, EDO, ACY, FMT	52%	1,18e-115	A, B, C, D	2,2924
4MY9	*Bacillus anthracis*	IMP, C91, MLI	52%	1,18e-115	A, B, C, D, E	2,5893
4MYA	*Bacillus anthracis*	IMP, 2EY, GOL	52%	1,18e-115	A, B	1,8997
4MYX	*Bacillus anthracis*	IMP, 2F0, MLI, SO_4, GOL, EDO FMT,	52%	1,18e-115	A, B, C, D, E	2,701

Código PDB	ORGANISMO	LIGANTES	IDENTIDADE	E-VALUE	CADEIAS	RESOLUÇÃO (Å)
4QM1	*Bacillus anthracis*	IMP, 39H	52%	1,18e-115	A, B, C, D	2,7964
5URS	*Bacillus anthracis*	IMP, 8LA, PGE, PO_4, GOL, EDO, K	52%	1,18e-115	A, B, C, D, E	2,388
5UUV	*Bacillus anthracis*	IMP, 8L1, GOL, K	52%	1,18e-115	A, B, C, D	2,75
5UUZ	*Bacillus anthracis*	IMP, 8L4, K	52%	1,18e-115	A, B, C, D, E	2,496
4QQ3	*Vibrio cholerae*	XMP, Cl	52%	3,044e-118	A	1,72
4X3Z	*Vibrio cholerae*	XMP, NAD, PO_4, GOL, K	52%	3,044e-118	A, B	1,62
5UPX	*Listeria monocytogenes*	XMP, GOL	50%	1,614e-115	A	1,855
7XLO	*Metanocaldococcus jannaschii*	SEM LIGANTES	49%	8,453e-110	A, B	1,65
1VRD	*Thermotoga marítima*	SEM LIGANTES	48%	1,999e-117	A, B	2,18
5UPY	*Listeria monocytogenes*	IMP, Q21, EDO, GOL, Cl	48%	6,885e-111	A	2,35

Código PDB	ORGANISMO	LIGANTES	IDENTIDADE	E-VALUE	CADEIAS	RESOLUÇÃO (Å)
5J5R	*Mycolicibacterium termoresistibile*	IMP, 6G1	48%	1,561e-106	A	1,6
5K4X	*Mycolicibacterium termoresistibile*	IMP, 6T9	48%	1,561e-106	A	1,37
5K4Z	*Mycolicibacterium termoresistibile*	IMP, 6T8	48%	1,561e-106	A	1,64
5OU1	*Mycolicibacterium termoresistibile*	IMP, AUQ	48%	1,561e-106	A	1,78
5OU2	*Mycolicibacterium termoresistibile*	IMP, 36Y	48%	1,561e-106	A	1,45
5OU3	*Mycolicibacterium termoresistibile*	IMP, AUN	48%	1,561e-106	A	1,6
6D4Q	*Mycolicibacterium termoresistibile*	IMP, FWG	48%	1,561e-106	A	1,71
6D4R	*Mycolicibacterium termoresistibile*	IMP, FWY	48%	1,561e-106	A	1,34
6D4S	*Mycolicibacterium termoresistibile*	IMP, FWV	48%	1,561e-106	A	1,63
6D4T	*Mycolicibacterium termoresistibile*	IMP, FWS	48%	1,561e-106	A	1,54

Código PDB	ORGANISMO	LIGANTES	IDENTIDADE	E-VALUE	CADEIAS	RESOLUÇÃO (Å)
6D4U	*Mycolicibacterium termoresistibile*	IMP, FWP	48%	1,561e-106	A	1,7
6D4V	*Mycolicibacterium termoresistibile*	IMP, FWM	48%	1,561e-106	A	2,02
6D4W	*Mycolicibacterium termoresistibile*	IMP, FWJ	48%	1,561e-106	A	1,8
6MJY	*Mycolicibacterium termoresistibile*	RCP	48%	1,561e-106	A	1,56
6KCF	*Candidatus Liberibacter*	SEM LIGANTES	46%	1,914e-105	A, B, C, D	2,55
3ZFH	*Pseudomonas aeruginosa*	Cl	46%	8,453e-110	A	2,25
4AVF	*Pseudomonas aeruginosa*	SEM LIGANTES	46%	8,453e-110	A, B, C, D	2,23
6GJV	*Pseudomonas aeruginosa*	SEM LIGANTES	46%	8,453e-110	A, B, C, D, E	2,11
6GK9	*Pseudomonas aeruginosa*	F2K, SO_4	46%	8,453e-110	A, B, C, D, E	2,54
3TSD	*Bacillus anthracis*	XMP, TAR, SO_4,	46%	1,289e-110	A, B	2,653

Código PDB	ORGANISMO	LIGANTES	IDENTIDADE	E-VALUE	CADEIAS	RESOLUÇÃO (Å)
3USB	*Bacillus anthracis*	IMP, SO_4, GOL, Cl	46%	1,289e-110	A, B	2,38
4ZQM	*Mycobacterium tuberculose*	XMP, NAD	46%	3,522e-102	A	1,602
4ZQN	*Mycobacterium tuberculose*	IMP, 4QO	46%	3,522e-102	A	2,0
4ZQO	*Mycobacterium tuberculose*	IMP, Q67, GOL, PGO, K	46%	3,522e-102	A	1,76
4ZQP	*Mycobacterium tuberculose*	IMP, KP3, PO4, GOL, PGO, K	46%	3,522e-102	A	1,9
4ZQR	*Mycobacterium tuberculose*	PO4, GOL, PGO, K	46%	3,522e-102	A, B, C, D	1,692
5UPU	*Mycobacterium tuberculose*	IMP, 6T9	46%	3,522e-102	A	2,905
5UPV	*Mycobacterium tuberculose*	IMP, 8KV, EDO, FMT,	46%	3,522e-102	A	1,63
7PJI	*Pseudomonas aeruginosa*	IMP, PIB, ATP, ACT, K, Mg	46%	8,453e-110	A, B	2,6
4DQW	*Pseudomonas aeruginosa*	ATP, PO4, GOL, Mn	46%	8,453e-110	A, B	2,51

Código PDB	ORGANISMO	LIGANTES	IDENTIDADE	E-VALUE	CADEIAS	RESOLUÇÃO (Å)
5AHN	*Pseudomonas aeruginosa*	IMP, Mg	46%	8,453e-110	A	1,652
7QBJ	*Pseudomonas aeruginosa*	SEM LIGANTES	45%	3,259e-107	A, B, C, D	2,27
7QEM	*Pseudomonas aeruginosa*	IMP	45%	3,259e-107	A, B, C, D	3,09
4FXS	*Vibrio cholerae*	IMP, MOA, K,	45%	1,302e-113	A	2,24
7QDX	*Pseudomonas aeruginosa*	ATP, Mg	45%	3,259e-107	A, B	2,9
2CU0	*Pyrococcus horikoshii*	XMP	44%	7,358e-103	A, B	2,1
7PMZ	*Streptomyces coelicolor*	G4P, ATP, Mg	43%	1,037e-108	A, B, C, D, E	2,03
1ZFJ	*Streptococcus pyogenes*	IMP	43%	5,468e-106	A	1,9
7OJ1	*Bacillus subtilis*	B4P, Mg	41%	1,148e-76	A	2,44
1YPF	*Bacillus anthracis*	SEM LIGANTES	40%	4,546e-33	A, B	1,8

Código PDB	ORGANISMO	LIGANTES	IDENTIDADE	E-VALUE	CADEIAS	RESOLUÇÃO (Å)
7OJ1	*Bacillus subtilis*	B4P, Mg	40%	1,77e-77	B	2,44
7OY9	*Mycolicibacterium smegmatis*	SEM LIGANTES	40%	6,031e-47	A, B, C, D, E	2,8
2A1Y	*Bacillus anthracis*	5GP	40%	4,546e-33	A	2,27
7R50	*Mycolicibacterium smegmatis*	5GP	40%	6,031e-47	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K. L, M, N, O, P	2,5
4XTD	*Eremothecium gossypii*	IMP	40%	1,005e-65	A, B	2,05
4XTI	*Eremothecium gossypii*	IMP, K	40%	1,005e-65	A, B	1,5
4Z0G	*Eremothecium gossypii*	5GP, GOL, K	40%	1,005E-65	A, B	1,25
4XWU	*Eremothecium gossypii*	SEM LIGANTES	40%	1,005E-65	A	1,75

Fonte: Autoria própria (2025).