UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento de uma plataforma modelo para a busca de ligantes com potencial leishmanicida baseado na inibição seletiva da enzima diidroorotato desidrogenase

Eder Lorenzato Junior

Ribeirão Preto
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento de uma plataforma modelo para a busca de ligantes com potencial leishmanicida baseado na inibição seletiva da enzima diidroorotato desidrogenase

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Química e Física Biológica,

Orientado(a): Eder Lorenzato Junior

Orientador(a): Prof. Dra. Maria Cristina Nonato Costa

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 08/04/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2016

RESUMO

Lorenzato, E. **Desenvolvimento de uma plataforma modelo para a busca de ligantes com potencial leishmanicida baseado na inibição seletiva da enzima diidroorotato desidrogenase**. 2016. 153f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) causam um imenso sofrimento para a pessoa acometida e em muitos casos podem levar o indivíduo a morte. Elas representam um obstáculo devastador para a saúde e continuam a ser um sério impedimento para a redução da pobreza e desenvolvimento socioeconômico. Das 17 doenças desse grupo, a leishmaniose, incluindo a leishmaniose cutânea, tem grande destaque devido sua alta incidência, os gastos para o tratamento e as complicações geradas em processos de coinfecção. Ainda mais agravante, os investimentos direcionados ao controle, combate e principalmente a inovação em novos produtos é ainda muito limitado. Atualmente, a academia tem um importante papel na luta contra essas doenças através da busca de novos alvos terapêuticos e também de novas moléculas com potencial terapêutico. É nesse contexto que esse projeto teve como meta a implantação de uma plataforma para a identificação de moléculas com atividade leishmanicida. Como alvo terapêutico, optamos pela utilização da enzima diidroorotato desidrogenase de *Leishmania Viannia braziliensis* (LbDHODH), enzima de extrema importância na síntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidina, cuja principal função é converter o diidroorotato em orotato. Esta enzima foi clonada, expressa e purificada com sucesso em nosso laboratório. Os estudos permitiram que a enzima fosse caracterizada cineticamente e estruturalmente via cristalografia de raios-X. Os primeiros ensaios inibitórios foram realizados com o orotato, produto da catálise e inibidor natural da enzima. O potencial inibitório do orotato foi mensurado através da estimativa do IC_{50} e a interação proteína-ligante foi caracterizada através de estudos cristalográficos. Estratégias *in silico* e *in vitro* foram utilizadas na busca de ligantes, através das quais foram identificados inibidores para a enzima LbDHODH. Ensaios de validação cruzada, utilizando a enzima homóloga humana, permitiram identificar os ligantes com maior índice de seletividade que tiveram seu potencial leishmanicida avaliado *in vitro* contra as formas promastigota e amastigota de *Leishmania braziliensis*. A realização do presente projeto permitiu a identificação de uma classe de ligantes que apresentam atividade seletiva contra LbDHODH e que será utilizada no planejamento de futuras gerações de moléculas com atividade terapêutica para o tratamento da leishmaniose. Além disso, a plataforma de ensaios otimizada permitirá a avaliação de novos grupos de moléculas como uma importante estratégia na busca por novos tratamentos contra a leishmaniose.

Palavras-chave: Diidroorotato Desidrogenase; Leishmania; Leishmaniose cutânea; Busca de ligantes.

ABSTRACT

Lorenzato, E. **Development of a model plataform for the search of leishmanicidal compounds based on the selective inhibition of dihydroorotate dehydrogenase**. 2016. 153f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Neglected tropical diseases (NTDs) pose a devastating obstacle to health and remain a serious impediment to poverty reduction and socioeconomic development. Of 17 diseases listed among NTDs, the leishmaniasis, including cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis, are characterized by high number of cases and high costs for the treatment, usually of low efficacy and highly toxic. Even more problematic, the investment devoted to combat to control and to develop new therapies remains limited. Nowadays, the Academy has had an important role in the fight against NTDs, contributing in the search of new therapeutic targets and in the development of lead compounds. Within this context, the present project aimed the development of a pipeline for identification of leishmanicidal compounds based on the selective inhibition of the enzyme dihydroorotate dehydrogenase from *Leishmania Viannia braziliensis* (LbDHODH). LbDHODH acts in the *de novo* biosynthetic pathway of pyrimidine nucleotides, by catalysing the conversion of dihydroorotate to orotate and has been considered an important macromolecular target against proliferative and parasitic diseases. LbDHODH was successfully cloned, expressed and purified. The target enzyme was characterized by kinetic studies and its structure was solved by X-ray crystallography techniques. Inhibition assays were performed in presence of orotate, product of catalysis and natural inhibitor of DHODH. Its inhibitory potential was evaluated by the estimative of IC_{50} and the protein-ligand interaction was characterized by crystallographic studies. I*n silico* and *in vitro* strategies were used in the search for LbDHODH inhibitors. Cross-validation studies were performed against the human homologue enzyme. Inhibitors displaying higher selectivity index were evaluated against both promastigote and amastigote forms of *Leishmania braziliensis*. Our work allowed the identification of a new class of compounds that display selective inhibition of LbDHODH and show leishmanicidal activity. They will be used as prototypes for the development of new generations of LbDHODH inhibitors. Moreover, our pipeline can be used to screen large number of chemical libraries as tool for the identification of different chemical entities that can contribute to the development of new therapeutic strategies for the treatment of leishmaniasis.

Keywords: Dihydroorotate Dehydrogenase; Leishmania; Cutaneous leishmaniasis, Search inhibitors.

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 *CONSIDERAÇÕES INICIAIS*

Ao longo de vários anos nosso laboratório tem trabalhado na caracterização de e avaliação de proteínas alvo para o desenvolvimento de moléculas candidatas a fármacos, focando principalmente compostos direcionados ao tratamento das enfermidades conhecidas como Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs). Esse grupo de doenças causam um imenso impacto no aspecto socioeconômico, leva sofrimento para as pessoas acometidas, independente da DNTs, as quais em alguns casos pode levar o individuo a morte. Como exemplo de DNTs podemos citar os diferentes tipos de leishmaniose, a doença de chagas e a esquistossomose.

O presente projeto tem como foco o desenvolvimento de uma plataforma de busca de moléculas bioativas contra *Leishmania braziliensis*, espécie responsável pela Leishmaniose muco-cutânea. As leishmanioses correspondem a um grupo de enfermidades espalhadas de maneira endêmica em 88 países, pertencentes a quatro continentes (África, Ásia, Europa, América do Sul e América do Norte), e em quase sua totalidade são países subdesenvolvidos. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que aproximadamente 14 milhões de pessoas estão contaminadas com as diferentes formas da doença e cerca de 350 milhões de pessoas correm o risco de contraírem a mesma.

Existem basicamente dois tipos de leishmaniose, a leishmaniose visceral e a cutânea. A leishmaniose visceral (**LV**), conhecida como calazar, e que causa hipertrofia do baço e fígado, febre, anemia e perda de peso é sem dúvidas a forma mais grave da doença sendo fatal em alguns casos (Aguir *et al.*, 2013). A leishmaniose cutânea (**LC**) é forma mais comum da doença provocando ulcerações e cicatrizes na pele (Daftarian *et al.*, 2013). A leishmaniose muco-cutânea ou mucosa (**LMC**), é normalmente uma evolução do quadro clinico da leishmaniose cutânea quando não tratada adequadamente e tem como característica a presença de úlceras que levam a destruição das mucosas, principalmente do nariz, boca e garganta (De Paulo *et al.*, 2013). Espécies diferentes de *Leishmania* são responsáveis pelas diferentes formas clínicas da doença. Infecções por *L. major* ou *L. tropica* causam **LC**, as espécies da América do Sul, como *L. (V) braziliensis* causa

além da **LC** a **LMC** e espécies como a *L. donovani* ou *L. infantum* causam **LV** (Pace, 2014).

De todas as formas de manifestação da leishmaniose, a cutânea é a forma mais comum, a qual é considerada endêmica em 84 países e mais de 90% dos casos concentra-se em somente 7 países, incluindo o Brasil. Além disso, a leishmaniose cutânea é considerada uma das seis mais importantes doenças infecciosas devido a sua alta incidência em diversos países (Nascimento *et al.*, 2013). A manifestação muco-cutânea é dependente da espécie que parasita o hospedeiro e é mais prevalente na América do Sul (De Paulo *et al.*, 2013). Os medicamentos para ambas manifestações são praticamente os mesmos e a falta de investimento na busca de novas terapias é uma das principais causas da persistência da leishmaniose mucosa ao redor do mundo (Mansueto *et al.*, 2014)

O limitado investimento dos governos e das indústrias farmacêuticas no controle e desenvolvimento de novas formas de tratamento para a leishmaniose contribui para o surgimento de novos casos e o agravamento dos já existentes. Em contrapartida, as pesquisas realizadas em nível acadêmico tem fornecido um grande arsenal de pequenas moléculas exploradas para o tratamento da leishmaniose, além de diversos alvos que podem auxiliar na busca de um tratamento eficaz contra a mesma. Neste sentido, nosso grupo, a fim de identificar possíveis moléculas candidatas a fármacos contra a leishmaniose, tem utilizado de sua expertise em biologia estrutural, somada à grande experiência de nossos colaboradores na área de síntese orgânica, tecnologia farmacêutica e parasitologia, para desenvolver plataformas de ensaios de identificação de ligantes que apresentem atividade leishmanicida baseado em alvo proteíco.

Nesse estudo em particular, nosso alvo é a enzima diidroorotato desidrogenase de *Leishmania Viannia braziliensis* (LbDHODH). O fluxograma da **Figura** 1 esquematiza os passos utilizados na construção e avaliação da nossa plataforma de ensaios. Inicialmente, como um protótipo para validação de nossa plataforma utilizamos o orotato inibidor natural da enzima. A plataforma de ensaios foi então utilizada para avaliar diferentes bibliotecas de compostos e fragmentos de origem sintética e natural, e posteriormente quantificar e caracterizar cinética e estruturalmente o mecanismo de inibição de compostos identificados. Os compostos

selecionados e identificados como seletivos através da realização de estudos de validação cruzada, utilizando a enzima homóloga humana HsDHODH, foram avaliados em ensaios celulares contra as formas promastigota e amastigota de *Leishmania braziliensis*. Foram também realizados ensaios *in vitro* da citotoxicidade sobre fibroblastos L969. Os compostos identificados como ativos serão utilizados para o planejamento de novas gerações de inibidores que serão avaliados em nossa plataforma.

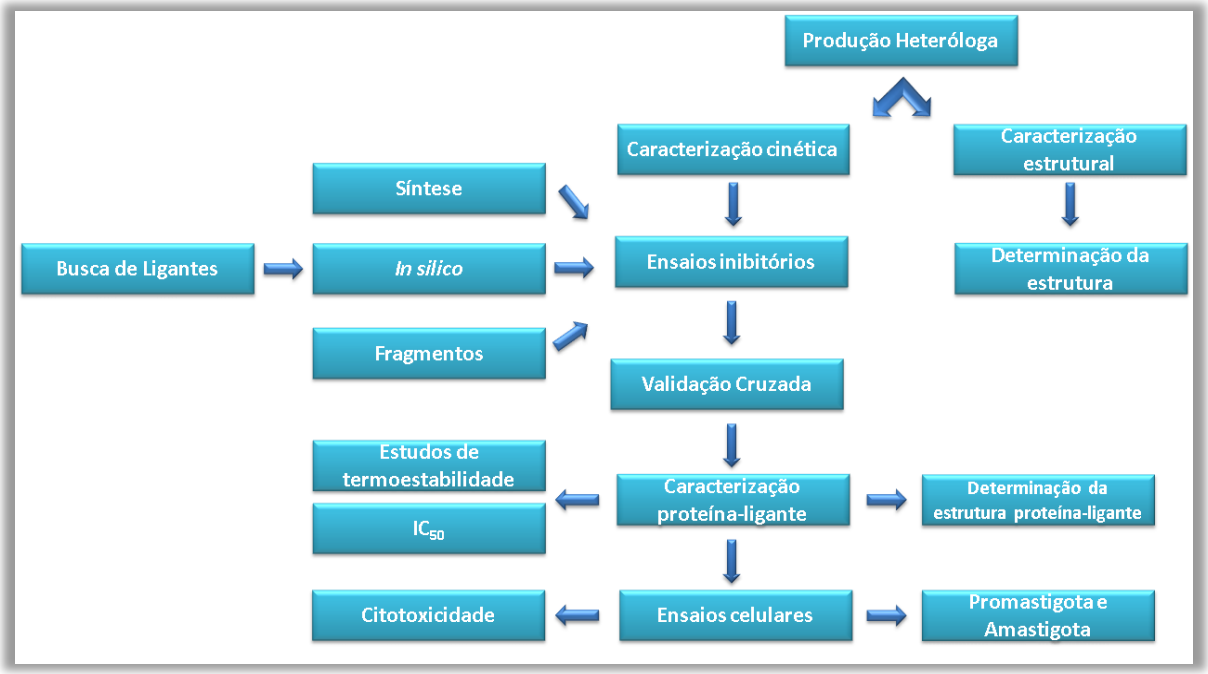


Figura 1. **Plataforma de ensaios na busca de ligantes baseado na inibição seletiva da enzima diidroorotato desidrogenase.** A construção da plataforma de identificação de ligantes iniciou-se com a produção heteróloga da enzima alvo. Como primeira etapa foi realizada a completa caracterização cinética, a qual permitiu otimizar os ensaios de avaliação do potencial inibitório utilizando o orotato como modelo. A cristalização da LbDHODH foi utilizada não somente a caracterização da estrutura livre de ligantes, mas também a caracterização dos complexos proteína-ligante. Utilizamos três estratégias para enriquecer nossa biblioteca de ligantes: a síntese de moléculas comercias que apresentaram atividade leishmanicida, busca de ligantes *in silico* e por fragmentos baseados no núcleo 2-amino benzotiazol. Além disso, ensaios de validação cruzada frente à enzima diidroorotato desidrogenase humana (HsDHODH) foram realizados a fim de selecionar os compostos seletivos para a enzima do parasita. Em complemento aos ensaios enzimáticos, os testes celulares serão realizados afim de verificar a eficácias dos compostos em nível celular. Desenvolvida nossa plataforma, procedimentos de formulação poderão ser iniciados para que os testes pré-clínicos sejam realizados.

Vale a pena ressaltar, que devido à alta similaridade sequencial compartilhada entre as DHODHs de tripanossomatídeos, os resultados obtidos

através do uso da plataforma poderão ser também explorados para o combate de outras formas clínicas de leishmaniose causada por outras espécies de Leishmania, assim como a doença de Chagas e a doença do sono, causada pelo *Trypanossoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*, respectivamente.

1.2 *DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS*

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) as doenças tropicais negligenciadas (DTN) pertencem a um grupo de doenças de características bastante distintas que atinge principalmente as populações mais pobres. As DTNs são endêmicas em 149 países e atingem mais de 1,4 bilhões de pessoas ao redor do mundo, custando bilhões de dólares para os governos. Atualmente 17 doenças são consideradas DTN pela OMS, dentre elas destaca-se a Tripanossomíase Africana, Leishmaniose, Doença de Chagas, Cisticercose, Esquistossomose e a Dengue. As doenças tropicais negligenciadas são causadas por agentes infecciosos e parasitários como os vírus, bactéria, protozoários e helmintos.

Os fármacos disponíveis no mercado para os tratamentos de algumas DNTs como a leishmaniose são escassos, apresentam baixa eficiência e sérios problemas colaterais, além da alta toxicidade e em muitos casos, há relatos do surgimento de resistência a essas drogas (Maltezou, 2010). Apesar do grande número de pessoas que são acometidas por essas doenças, os investimentos direcionados ao combate e a pesquisa por novos compostos bioativos e alvos terapêuticos são mínimos.

Em 30 de janeiro de 2012 a Organização Mundial da Saúde aprovou a Declaração de Londres que tem como objetivo erradicar, eliminar e intensificar o controle das principais DNTs até o final desta década. Para que esse objetivo seja alcançado a OMS contará com apoio dos governos dos Estados Unidos, Reino Unido e Emirados Árabes, de várias companhias farmacêuticas, da Fundação Bill & Melinda Gates e do Banco Mundial. As principais medidas para a execução do tratado incluem o aumento de doação de medicamentos pelas gigantes farmacêuticas, o fornecimento de 800 milhões de dólares para apoiar programas de eliminações de doenças, a expansão de programas de distribuição de medicamentos e por último o incentivo na busca por novos medicamentos (Dias *et al.*, 2013).

As medidas propostas pela declaração de Londres de 2012 já começam a surtir efeitos com o aumento do acesso aos medicamentos pelas populações mais pobres, além da intensificação dos programas de eliminação e prevenção dessas doenças (Molyneux, 2014). Porém os investimentos em P&D para a busca não só de novos compostos bioativos, mas de novos alvos terapêuticos ainda é muito escasso. Apesar da Declaração de Londres ser uma excelente proposta no combate das DTNs, ela peca pelo não investimento em inovação, seja na validação de um novo alvo terapêutico ou na descoberta de novos princípios ativos.

1.3 *LEISHMANIOSE CUTÂNEA*

1.3.1 Histórico e ciclo de vida

O militar William Boog Leishman identificou em 1903 o protozoário causador do calazar ou febre dum-dum e em sua homenagem foi dado o nome do gênero deste protozoário de *Leishmania* (Stockdale e Newton, 2013). Com o avanço da microscopia, biologia molecular, bioquímica e imunologia foi possível identificar as diversas espécies causadoras das leishmanioses e correlacionar com suas correspondentes manifestações clínicas.

Em se tratando de leishmaniose cutânea e muco-cutânea no Brasil, o manuscrito de Eduardo Rabelo de título "Contribuições ao estudo da leishmaniose tegumentar no Brasil" descreve que a existência da leishmaniose do Brasil já era observada no século XIX, podendo ser dividida em três períodos históricos. No primeiro, de origem incerta que vai até 1895, começou-se a observar feridas causadas pelo protozoário as quais foram denominadas de botão da Bahia. O segundo período que vai até 1909, quando foi identificado o agente etiológico da ulcera de Bauru. O último período inicia-se em 1910 até o ano de publicação do manuscrito, onde foram observadas as lesões mucosas, as quais foram associadas ao agente etiológico da leishmaniose (Vale e Furtado, 2005).

Tripanossomatideos são protozoários caracterizados por possuir um único flagelo. Todos os membros desse grupo são exclusivamente parasitas e primariamente encontrados em insetos. Alguns genêros do grupo também utilizam-se de um segundo hospedeiro, como o homem, e são responsáveis por uma diversidade de doenças. Três doenças humanas importantes são causadas por tripanossomatídeos como a Doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, a

doença do sono causada pelo *Trypanosoma cruzi*, e as Leishmanioses, um grupo de doenças causada por diferentes espécies do parasita *Leishmania* (Wheeler, Gluenz e Gull, 2013).

Atualmente vinte e uma espécies do gênero *Leishmania* são descritas, as quais são responsáveis pelas diversas formas de leishmaniose. No Brasil, a L. *chagasis* é a cepa responsável pela manifestação visceral. Por outro lado, as cepas L. *braziliensis*, *amazonensis* e *guayanensis* são responsáveis pela manifestação cutânea. Enquanto as cepas *amazonensis* e *guayanensis* estão restritas a região amazônica, a cepa L. *braziliensis*, também responsável pela manifestação muco-cutânea, está distribuída por todo território brasileiro e em alguns países da América do Sul, (Pace, 2014).Independentemente da manifestação clínica da doença o ciclo de vida da *Leishmania* é conservado (**Figura** 2).

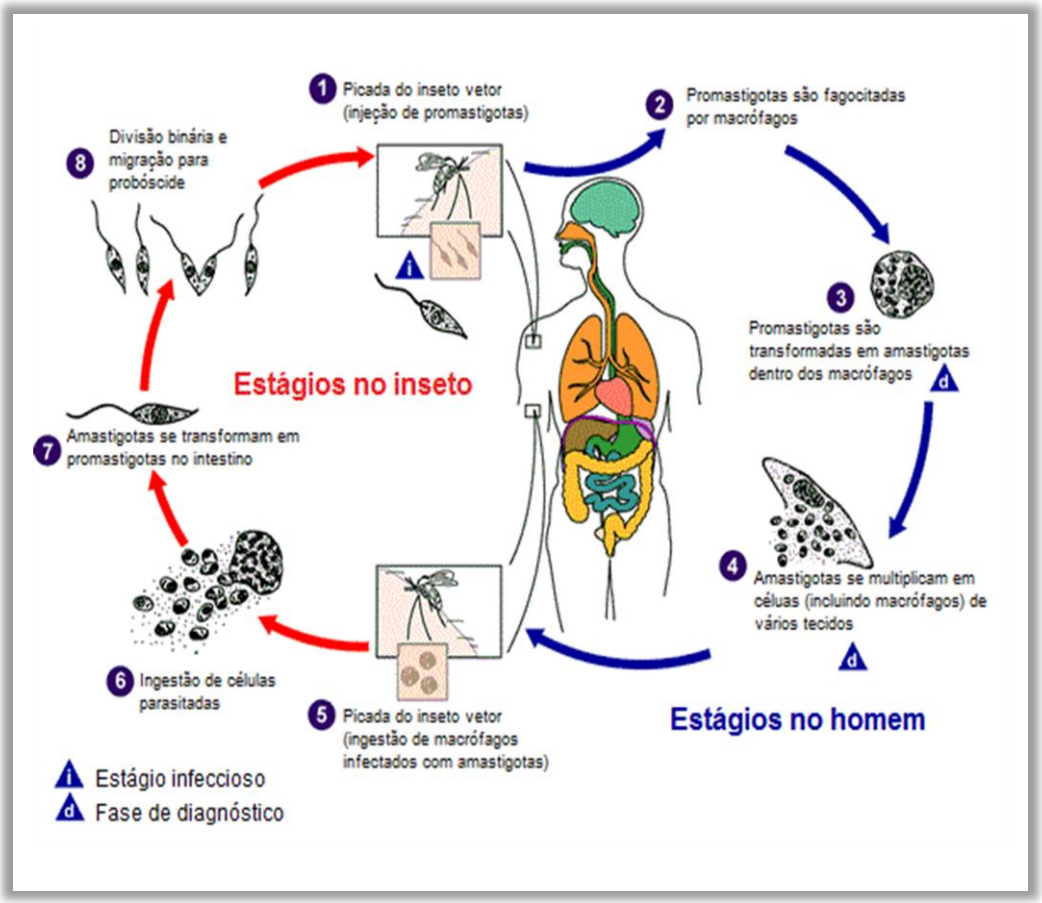


Figura 2. **Ciclo de vida do parasito causador da leishmaniose.** Agente causador do gênero *Leishmania ssp* dos diferentes tipos de Leishmaniose. Imagem retirada e adaptada do CDC (http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/).

Durante o ciclo de vida a Leishmania possui dois hospedeiros, o hospedeiro intermediário, que pode ser o homem, cachorro e roedores, e um hospedeiro definitivo, insetos flebotomíneos fêmeas do gênero *Lutzomyia*. A infecção de um hospedeiro vertebrado ocorre quando a fêmea do inseto flebotomíneo, conhecido popularmente como mosquito-palha, pica o mamífero para se alimentar. Nessa etapa, a forma promastigota metacíclica penetra na pele do hospedeiro e invade diferentes células, principalmente os macrófagos. Os macrófagos fagocitam as promastigotas, que em seu interior, transformam-se em amastigotas e assim multiplicam-se por divisão binarias sucessivas. Posteriormente as amastigotas rompem a membrana do macrófago, caem na circulação sanguínea onde podem ser novamente fagocitadas pelos macrófagos difundindo-se na corrente sanguínea. O inseto fêmea do gênero *Lutzomyia* ao picar o hospedeiro intermediário suga os macrófagos contendo as amastigotas. Após a ingestão as amastigotas são liberadas dos macrófagos e no trato gastrointestinal diferenciam-se em formas promastigotas procíclicos, as quais se multiplicam por divisão binária. Após esses eventos, as promastigotas procíclicos migram para a válvula estomodeal do mosquito, na qual se diferencia em promastigotas metacíclicos, as quais são extremamente moveis. Por fim as promastigostas metacíclicos rompem a válvula estomodeal e migram para o probóscide, na qual transmite as promastigotas metacíclicos ao hospedeiro intermediario, através da picada do mosquito fêmea (Leifso *et al.*, 2007).

1.3.2 Incidência

A principal e mais importante espécie de *leishmania* causadora da manifestação cutânea nas Américas é a *Leishmania Viannia brasilienses* (Mansueto et al., 2014). Enquanto a espécie *Leishmania V. braziliensis* tem sua maior incidência principalmente na América do Sul, espécies como a *L. major* tem sua maior incidência em países do velho mundo (Pace, 2014). Na **Figura** 3 é possível observar a distribuição dos casos de leishmaniose cutânea ao redor do mundo, no período de 2005 a 2009. Dentre os territórios, podemos descatar os que compõe a

América do Sul e a Ásia, mais especificamente o sudoeste asiático e a Ásia ocidental.

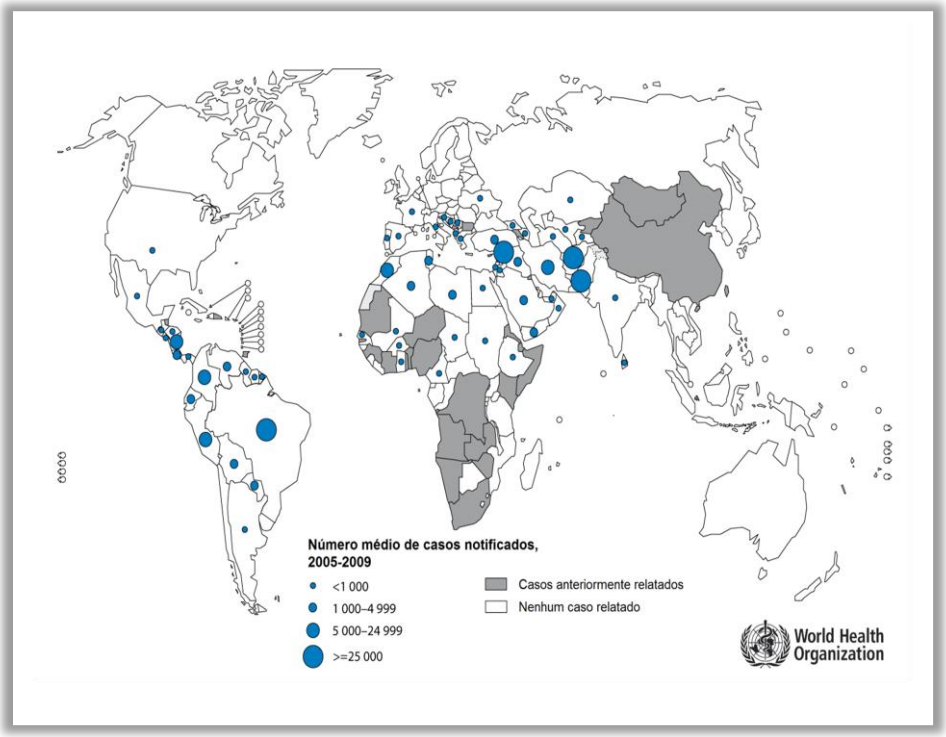


Figura 3: **Incidência de Leishmaniose cutânea no mundo**. Número e distribuição de casos de **LC** no mundo entre 2005-2009. Imagem adaptada da OMS.

Na **Figura** 4 é possível notar áreas de maior incidência da leishmaniose cutânea no Novo Mundo. Em destaque, a América do Sul é a que apresenta maior número de casos de leishmaniose cutânea, incluindo o Brasil onde a doença está espalhada por quase todo território. Também é possível observar na **Figura** 4 previsão do surgimento de novos casos, com destaque paras as regiões litorâneas e norte do Brasil, onde a probabilidade para o aparecimento de novos casos é alta.

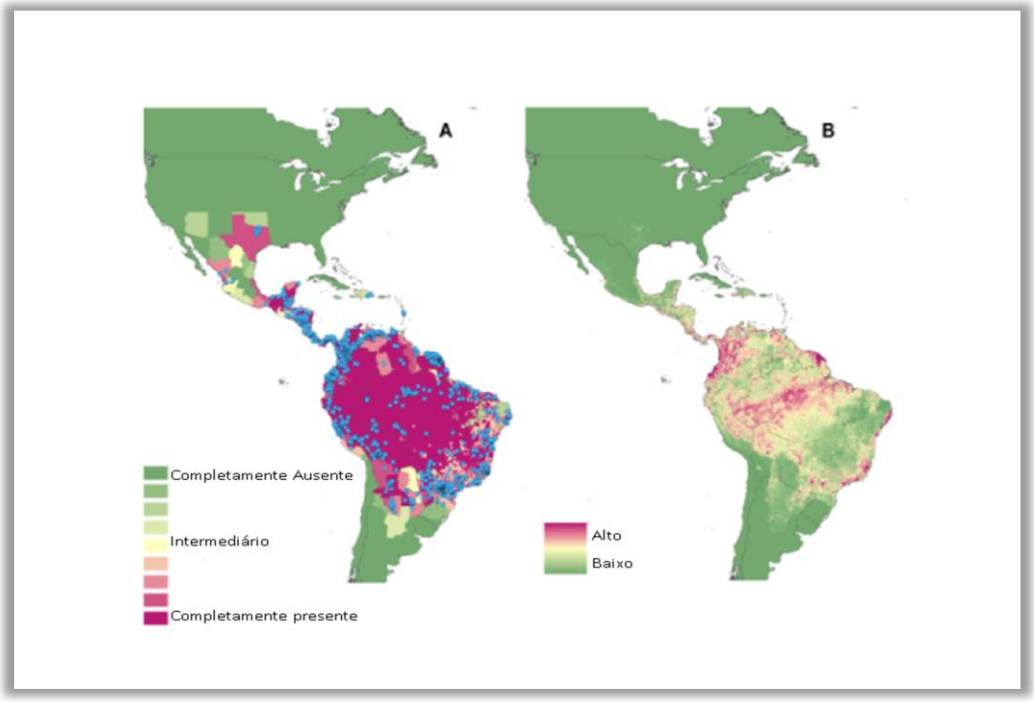


Figura 4. **Casos reportados de Leishmaniose Cutânea no Novo Mundo**. (**A**) Distribuição da doença na América, onde as áreas verdes são consideradas livres da doença e as áreas mais roxas são consideras endêmicas, os pontos em azul são considerados centros de ocorrência. (**B**) Risco previsto para novos casos, em verde baixa probabilidade e em roxo alta probabilidade de ocorrência. Imagem retirada e adaptada de Pigott *et al.*, 2014.

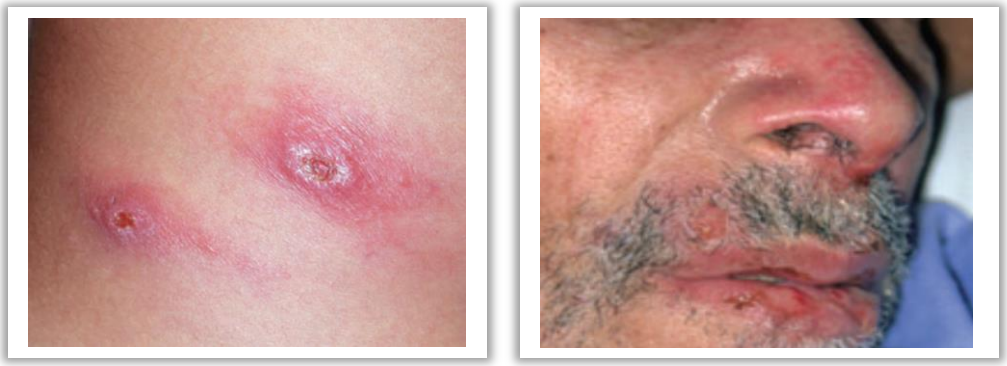
De acordo com a OMS, a média de casos reportados de leishmaniose cutânea no Brasil entre os anos 2005 e 2013 são de 22 mil casos por ano, sendo o Brasil o país de maior índice de leishmaniose cutânea no mundo. Embora a taxa de incidência da leishmaniose cutânea no Brasil tem diminuído graças à implementação de melhorias nas áreas de risco e controle de pequenos surtos, o Brasil ainda é um pais de alta prevalência de leishmaniose cutânea, a qual é responsável por diversos fatores negativos na economia e na sociedade brasileira (De Oliveira Guerra *et al.*, 2015).

1.3.3 Diagnóstico e Manifestação Clínica

Segundo o Ministério da Saúde o diagnóstico da leishmaniose cutânea se dá pela caracterização da lesão observando aspectos como forma bem definida da lesão e consistência. Já a manifestação muco-cutânea é caracterizada pela presença de ulceras sem forma definida presentes nas mucosas do indivíduo, principalmente na boca e nariz, as quais são tão graves que acabam por desfigurar o local da manifestação. O exame laboratorial envolve técnicas como escarificação, biópsia com impressão por aposição e punção aspirativa, histopatologia além de técnicas mais sofisticadas como a reação em cadeia de polimerase (PCR) (Gontijo e Carvalho, 2003).

A leishmaniose cutânea geralmente ocorre em áreas expostas como o rosto, pescoço e membros nos quais aparecem ulcerações indicando a fase crônica da doença. Os tipos de lesões, a magnitude e o tempo de recuperação do paciente dependerá da espécie de *Leishmania* que infectará o indivíduo (David e Craft, 2009). No entanto, elas compartilham de algumas características em comum, como o surgimento de úlceras, a deformação do local atingido, o tempo elevado para a cura, além de afetar o paciente psicologicamente tornando-o desmotivado, resistente ao tratamento e com dificuldades de sociabilização (Pace, 2014). Vale lembrar que a manifestação muco-cutânea, por ser uma evolução da cutânea, intensifica drasticamente os sintomas e feridas, bem como afeta o tempo de cura e

recuperação do paciente. Na **Figura** 5 está representada as manifestações da leishmaniose mucosa.



(A) **(B)**

Figura 5. **Manifestações leishmaniose leishmaniose cutânea e mucosa**. As feridas em **A** representa a forma mais comum da leishmaniose a qual é a manifestação cutânea. Em **B** este representado a forma muco-cutânea da leismaniose, a qual é uma evolução da manifestação cutânea, sendo considerada mais grave. Imagens adaptadas de David e Craft, 2009.

Enquanto a manifestação cutânea da doença não leva a morte, na ausência de complicações, o progresso da lesão pode evoluir para a manifestação muco-cutânea, o que gera complicações no tratamento (Lewnard *et al.*, 2014). Outro problema ligado à leishmaniose cutânea está relacionado à coinfecção com outras doenças infecciosas, como a tuberculose e a AIDS (Navarrete-Dechent *et al.*, 2015). Nesses casos, a presença da leishmaniose cutânea em pacientes já debilitados dificulta o tratamento, fazendo com que as chances de cura diminuam, podendo levar o paciente a óbito. A associação das formas cutâneas e muco-cutâneas fortemente caracterizados por problemas fisiológicos e psicológicos, além do agravamento de doenças como AIDS e tuberculose em processos de coinfecção são fatores suficientes para que as autoridades juntamente com o setor público e privado busquem alternativas tanto para o tratamento quanto para a prevenção.

1.3.4 Prevenção e tratamento

A prevenção da leishmaniose corresponde a métodos educativos, eliminação do mosquito transmissor, além do sacrifício de animais como cachorro e gatos que servem de reservatórios para a propagação da doença. Embora sejam métodos simples e eficazes, na prática, esses métodos são muito pouco utilizados o que

aumenta os casos incidência de leishmaniose em geral (Kappagoda e Ioannidis, 2014).

Para o tratamento da leishmaniose cutânea e muco-cutânea são utilizados diversos medicamentos, como os derivados de antimônios pentavalentes, o estibogluconato de sódio e o antimoniato de N-metilglucamina, além da anfotericina B e a pentamidina. Esses medicamentos de escolha são considerados tóxicos, de baixa eficácia e de longa duração para o tratamento. Alguns outros medicamentos como a paramomicina e azitromicina, utilizados como antibacterianos, estão em estudo quanto a sua eficácia leishmanicida (Sundar e Chakravarty, 2013). No Brasil os medicamentos utilizados e que são distribuídos gratuitamente são o antimoniato de N-metilglucamina, à anfotericina B e a pentamidina (**Figura** 6).

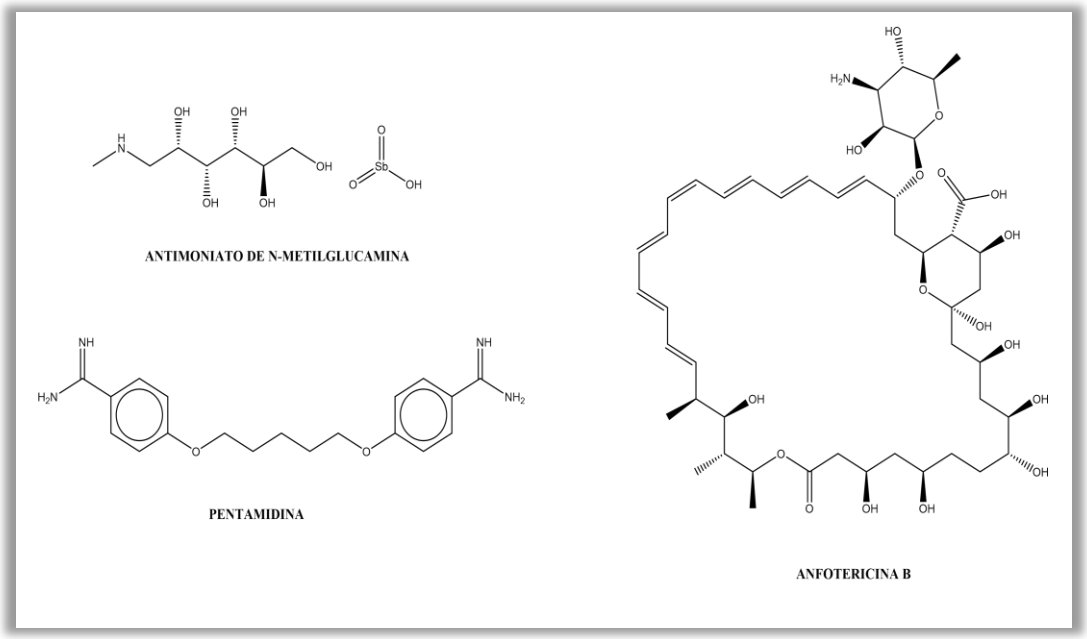


Figura 6. **Estrutura dos princípios ativos dos medicamentos utilizados para o tratamento da leishmaniose cutânea e muco-cutânea.** No Brasil esses medicamentos são disponibilizados gratuitamente pelo governo.

O mecanismo de ação dos antimônios pentavalentes permanece incerto, ao que indica os estudos, eles induzem danos ao DNA. A necessidade da administração parenteral, associado à alta toxicidade, principalmente para idosos, cardiopatas e neufropatas são os pontos negativos de sua administração (Lima *et al.*, 2010). A pentamidina possui como mecanismo a interferência na biossíntese de DNA e consequentemente a inibição da divisão das células do parasita, este composto é somente utilizando quando a indícios de resistência de cepas de

leishmanioses aos derivados de antimônio pentavalentes, pois a sua baixa biodisponibilidade associada a sua alta toxicidade limitam a administração desse medicamento (Nguewa *et al.*, 2005).

Por outro lado a anfotericina B é o medicamento mais eficaz para o tratamento da leishmaniose interagindo tanto com a forma amastigota como promastigota. Neste caso seu mecanismo de ação está relacionado à interação com o ergosterol, um tipo de esterol presente na membrana do parasita (Paila, Saha e Chattopadhyay, 2010). A sua alta toxicidade é o ponto negativo para sua administração, no entanto a utilização do deoxicolato anfotericina B, indicado para o tratamento de leishmaniose cutânea em pacientes HIV positivo, diminui o efeito tóxico, porém encarece o valor do medicamento (Moreno-Rodriguez *et al.*, 2015).

Embora os medicamentos citados, em muitos casos, são eficazes contra a leishmaniose cutânea e mucosa, existem vários problemas relacionados à sua administração como toxicidade, biodisponibilidade e em casos de cepas resistentes são ineficazes (Croft, Sundar e Fairlamb, 2006). A falta de pesquisa e desenvolvimento de medicamentos acaba por negligenciar ainda a leishmaniose, doença tão devastadora e que acomete milhões de pessoas pelo mundo. É nesse contexto que nós da academia podemos contribuir, na busca por novos alvos e compostos eficientes contra os diversos tipos de leishmaniose.

1.3.5 Impacto socioeconômico

A situação atual da leishmaniose e de outras doenças tropicais negligenciadas tem tido um grande impacto na saúde pública, na questão social e no âmbito financeiro. Apesar disso, os investimentos e parcerias entre setor público e privado ainda são insuficientes para o combate dessas parasitoses.

O impacto financeiro gerado com o tratamento da leishmaniose mucosa é enorme, o que causa rombo de milhões de dólares aos cofres públicos. Em particular, no Brasil os gastos somente com os medicamentos derivados de antimônios pentavalentes chegam à ordem de R$ 5.500.000 ao ano, ou seja, são gasto milhões de reais com uma única droga para o tratamento, sem considerar os gastos hospitalares e pós-hospitalares (Neves *et al.*, 2011)

Outro fator que preocupa está relacionado ao impacto social da leishmaniose cutânea. A dor do paciente acometido por esse tipo de infecção não fica restrita somente as disfunções fisiológicas causadas pelo parasita, ela vai muito além, causando sérios problemas relacionados à que questões de sociabilização e depressão. Estudos sobre o impacto psicológico da leishmaniose cutânea mostraram que há uma alta prevalência de pacientes com sintomas de depressão e ansiedade, em alguns casos há relatos de insatisfação corporal, baixa autoestima e em casos mais graves há indícios de suicídio (Yanik *et al.*, 2004).

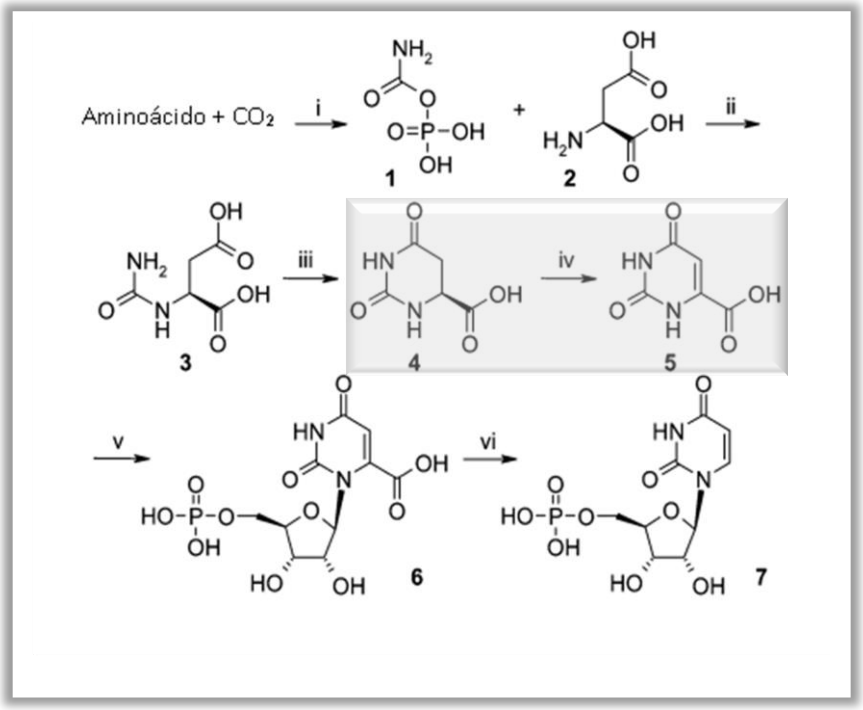
A leishmaniose cutânea e a mucosa não são letais, porém os impactos sociais e econômicos fazem como que diminua qualidade de vida dos pacientes. Deste modo, a busca por novas terapias para o tratamento da leishmaniose mucosa tem o objetivo não só de eliminar o parasita causador da doença, mas sim de oferecer uma qualidade de vida melhor ao paciente.

1.4 *DIIDROOROTATO DESIDROGENASE*

1.4.1 Função

Os nucleotídeos são componentes de extrema importância metabólica, apresentando diversas funções vitais ao organismo. São ativadores e inibidores de várias vias do metabolismo intermediário da célula; atuam como transportadores de energia; são os elos químicos essenciais na resposta celular na presença de hormônios e a outros estímulos extracelulares; atuam como componentes de coenzimas, além de formar as unidades fundamentais que constituem os ácidos desoxirribonucléicos (DNA) e ribonucléicos (RNA) (Nelson, Lehninger e Cox, 2008).

Muitos organismos conseguem obter nucleotídeos de pirimidina através da via de salvação, onde é possível reciclar os nucleosídeos e as bases nitrogenadas geradas pelo metabolismo celular e assim reutilizá-los para a formação de novos derivados de pirimidina. Porém, em condições especiais como a proliferação celular ou em organismos onde a via de salvação não é presente, há a necessidade de a própria célula sintetizar os nucleotídeos de pirimidina através da *via de novo* (Wilson *et al.*, 2012). A via *de novo* de biossíntese de nucleotídeos de pirimidina, representada no **Esquema** 1, é composta por seis enzimas, as quais são responsáveis pela formação dos nucleotídeos de pirimidina citosina, uracila e timina.



Esquema 1. **Etapas da biossíntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidina em procariotos**. (i) carbomil fosfatase sintetase; (ii) aspartato transcarba-milase; (iii) diidroorotase; (iv) diidroorotato desidrogenase; (v) orotato fosforibosil transferase; (vi) orodilato descarboxilase. Esquema adaptado de Munier-Lehmann *et al.*, 2013.

Em particular, no quarto passo da *via de novo* atua a enzima diidroorotato desidrogenase (DHODH), destacado no **Esquema** 1, a qual é o alvo de estudo deste projeto. Essa enzima tem a capacidade de converter o L-diidroorotato (DHO) em orotato.

A interrupção da síntese de nucleotídeos de pirimidina pode levar a diminuição da taxa de replicação do organismo, visto que os nucleotídeos de pirimidina obtidos pela via de salvação são insuficientes para a formação do DNA (Garavito, Narvaez-Ortiz e Zimmermann, 2015). Assim a HsDHODH pode ser explorada para doenças como o câncer, por exemplo, diminuindo a replicação das células cancerígenas (Batt, 1999). Além disso, diversos trabalhos mostram moléculas capazes de inibir uma diversidade de enzimas DHODH de diversos organismos como a DHODH de bactérias (Marcinkeviciene *et al.*, 2000), de fungos (Gustafson *et al.*, 1996), de vírus (Wang *et al.*, 2011), de tripanossomatideos (Pinheiro, Emery e Nonato, 2013), dentre muitos outros organismo onde a enzima diidroorotato desidrogenase pode ser explorada como um alvo terapêutico. Provavelmente a inibição da diidroorotato desidrogenase dos parasitas implica na diminuição da replicação do DNA e consequentemente, na diminuição da

reprodução do parasita. Deste modo, compostos que agem inibindo a DHODH possuem um efeito farmacológico estático, ou seja, um efeito que atenua a replicação celular, facilitando a ação de outros medicamentos ou do próprio sistema imunológico. Isso torna a enzima DHODH um importante alvo a ser explorado para diversas doenças ocasionadas por diferentes organismos.

1.4.2 Classificação das DHODHs

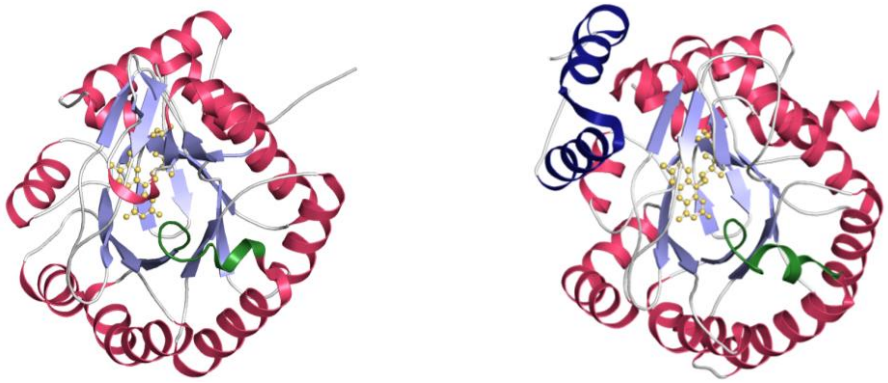
A DHODH é dividida em classe 1 e classe 2, de acordo com suas características estruturais, localização intracelular, tipo de segundo substrato e origem biológica (Norager *et al.*, 2002). A classe 1 ainda é subdividida em 1A e 1B, as quais são encontradas no citosol das células, estão presentes em bactérias Gram-positivas, fungos aeróbicos e eucariotos inferiores como os tripanossomatídeos. Enzimas pertencentes à classe 1A utilizam o fumarato como agente oxidante enquanto que as de classe 1B utilizam NAD^+.

As enzimas de classe 2 são encontradas associadas a membranas, seja ela citosólica ou mitocondrial e por isso apresenta um domínio de interação com a membrana em sua estrutura N-terminal (Liu *et al.*, 2000). As DHODHs de classe 2 podem ser encontradas em eucariotos, como os humanos e em algumas bactérias Gram-negativas e utilizam como agente oxidante a ubiquinona (Rowland *et al.*, 2000).

Outra diferença importante em relação às estruturas das classes de DHODHs está relacionada à sua estrutura quaternária. Enzimas de classe 1A são homodímeros, enquanto que as classe 1B são heterodimeros e as de classe 2 comportam-se como um monômero. Tanto a classe 1 A e a 2 compartilham de um mononucleotideo de flavina (FMN) como cofator e a classe 1B, além do FMN, apresenta uma flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e um cluster [2Fe-2S] (Nielsen, Andersen e Jensen, 1996).

Embora as diferenças de estruturas quaternárias, segundo substrato, localização celular entre outras, as DHODHs de classe 1 A e 2 apresentam o sítio catalítico extremamente conservado. Esse sítio é composto de um barril α/β folha, onde oito folhas β são rodeadas de oito α-helices e é nessa região que encontramos o cofator FMN. A **Figura** 7 mostras duas enzimas DHODHs, em **A** temos uma enzima de classe 1 A, a de *trypanossoma cruzi* (TcDHODH) e em **B** a enzima

humana (HsDHODH), enzima de classe 2. A diferença mais notável nestas estruturas é a dupla hélice presente na estrutura da enzima humana (azul escuro), a qual é responsável pelo ancoramento na membrana.



(A) (B)

Figura 7. **Representação estrutural das enzimas TcDHODH (PDB 3C3N) em A e HsDHODH (PDB 1D3G) em B**. Apesar de ambas enovelarem em um motivo de barril α/β folha formando um sítio catalítico altamente conservado, elas apresentam diferenças estruturais como o resíduo catalítico e em especial na HsDHODH um domínio de membrana formado por duas α hélices. Imagem retirada de Pinheiro, 2012.

A diferença mais notável em relação ao sitio catalítico está relacionado ao resíduo catalítico, enquanto na classe 1 A o resíduo é de uma cisteína na de classe 2 observamos uma serina (Mcdonald e Palfey, 2011). Baseado nas diferenças estruturais, na sua localização celular e na característica do segundo substrato é possível planejar de maneira racional candidatos a fármacos que possam ser inibidores seletivos para as DHODHs de parasitas. É através dessas características particulares de cada enzima que trabalhamos no planejamento de compostos que sejam seletivos para as enzimas de classe 1 A, especialmente as DHODHs de Leishmania *v. brasiliensis,* principal causadora da leishmaniose cutânea.

1.4.3 Mecanismo catalítico da DHODH de classe 1A

A LbDHODH é uma enzima pertencente à classe 1 A, de acordo com a divisão atual das enzimas DHODHs. O mecanismo catalítico das DHODHs 1 A esta apresentado na **Figura** 8, onde é possível dividir o mecanismo em duas etapas, sendo a primeira uma etapa oxidativa e a segunda a etapa redutiva. Segundo (Inaoka *et al.*, 2008), na primeira etapa o enxofre da cisteína catalítica atua como um

nucleófilo e abstrai um próton da molécula de diidroorotato (H5a). Em seguida o hidrogênio H_6 é transferido para o FMN, reduzindo-o e oxidando a molécula de diidroorotato a orotato. Com o FMN reduzido inicia-se a segunda etapa, onde o fumarato atua como substrato. Mais uma vez ocorre um mecanismo baseado na transferência de hidreto, onde o hidrogênio ligado ao nitrogênio 5 do anel do FMN é transferido para a dupla ligação do fumarato, a qual é paz de abstrair um próton da cisteína catalítica. Deste modo o fumarato é reduzido e o FMN oxidado, fazendo com que a enzima esteja apta novamente a mais um ciclo catalítico.

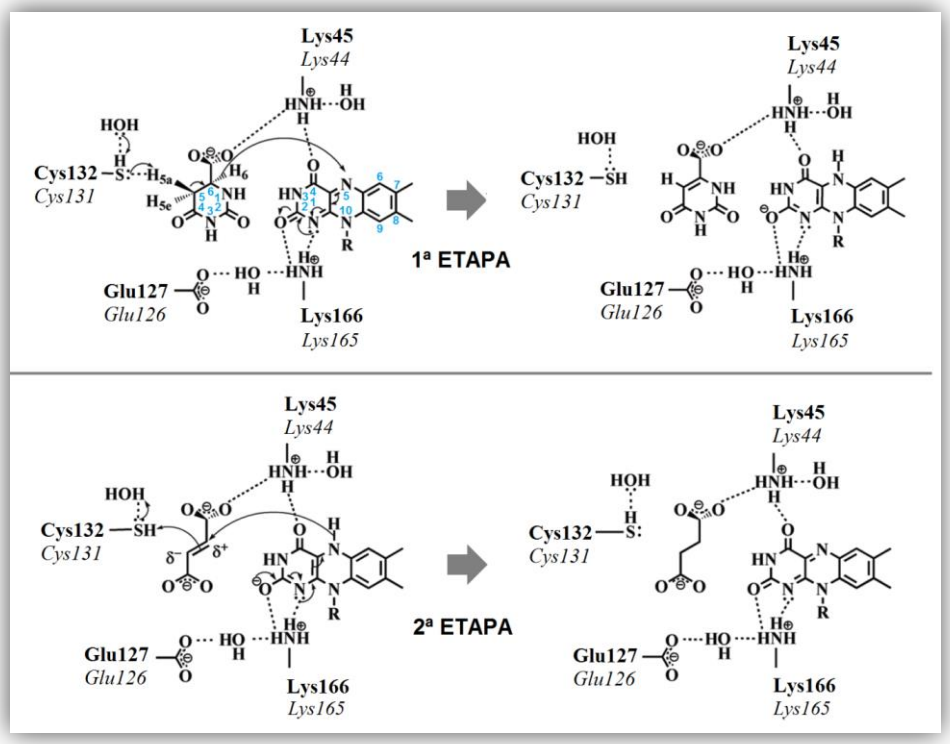


Figura 8. **Mecanismo proposto para a catalise das enzimas DHODH de classe 1 A**. O mecanismo catalítico consiste em converter L-diidroorotato em orortato, na primeira etapa e posteriormente converter fumarato em malato na segunda etapa. Imagem retirada de Inaoka *et al.*, 2008.

1.4.4 Diidroorotato desidrogenase como alvo terapêutico

Alvos terapêuticos são regiões dentro de um organismo para o qual é dirigido um ligante, seja ele um composto endógeno ou um fármaco. Medicamentos podem ter ação sobre diversos alvos, como o DNA, membrana celular, como é comum alguns antibacterianos e antifúngicos, receptores, canais, enzimas, entre outros. Dentre os alvos, as enzimas destacam-se, sendo essas componentes essenciais para a sobrevivência de qualquer ser vivo por estarem envolvidas na maioria dos

eventos celulares. Alvos enzimáticos para o planejamento de fármacos já são hoje uma realidade (Robertson, 2005). Modular e/ou interromper vias metabólicas importantes por estarem diretamente relacionadas com a sobrevivência ou proliferação celular é atualmente uma estratégia racional no combate de doenças proliferativas, autoimune e principalmente àquelas relacionados à presença de patógenos: bactérias, fungos e parasitas.

No caso particular da enzima DHODH, as enzimas de classe 2 como a DHODH humana e a DHODH de *Plasmodium falciparum* são alvos validados. O pró-fármaco leflunomida, utilizada para o tratamento da artrite reumatoide, após ser metabolizado dá origem ao composto teriflunomide (A77 1256) o qual inibe a HsDHODH, sendo a leflunomida o primeiro fármaco utilizado para inibir a enzima DHODH humana (Greene *et al.*, 1995). Além disso, diversos outros compostos foram identificados como inibidores, como é o caso do Brequinar, que apesar de ser um excelente composto, nos ensaios clínicos de fase II demonstrou modestos efeitos anticâncer. No entanto diversos trabalhos mostram análogos do brequinar, como possíveis antitumorais (Hurt, Sutton e Clardy, 2006). Com relação à DHODH de *Plasmodium falciparum*, a atovacona é o principio ativo do medicamento MEPRON® e atua na inibição da enzima DHODH do parasita, sendo uma alternativa ao uso de medicamentos derivados da cloroquina, os quais são ineficazes a cepas resistentes do parasita (Munier-Lehmann *et al.*, 2013).

A relevância da via *de novo* de nucleotídeos de pirimidina tem sido avaliada para outros organismos. Por exemplo, estudos mostraram que a via metabólica de síntese de nucleotídeos de pirimidinas é essencial para a sobrevivência da forma tripomastigota do parasita *T. cruzi*, como validado através de experimentos de "*Knock out*" do gene que codifica a enzima TcDHODH (Annoura *et al.*, 2005). Além disso, experimentos em *T. brucei* realizado por (Arakaki *et al.*, 2008) demonstraram que em condições onde a expressão da DHODH é minimizada e o meio é pobre em nucleotídeos de pirimidina, o crescimento do parasita é profundamente reduzido, dificultando a sobrevivência do mesmo. Esses resultados demonstram a relevância da rota de biossíntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidina, em particular da enzima DHODH para o metabolismo em tripanossomatídeos e sugerem que a enzima DHODH deve ser explorada como um alvo terapêutico como uma alternativa

para a busca de compostos candidatos a fármacos para o tratamento das enfermidades relacionados a esses parasitas.

Nesse sentido nosso laboratório tem trabalhado na busca de inibidores seletivos para as enzimas DHODH da classe 1A. Em um de nossos trabalhos mais recentes foram identificados dois compostos de origem comercial promissores com atividade leishmanicida, eles foram denominados de LCPSP 3027 e LCPVL 898. Estas duas moléculas foram capazes de inibir seletivamente a enzima de *Leishmania* major, apresentaram IC_{50} 1,66µM e 2,82 µM, respectivamente, demonstraram atividade leishmanicida em culturas *in vitro* de *Leishmania V. braziliensis* na forma promastigota (DL_{50} de 2.1 µM para LCPSP3027 e DL_{50} de 2.8 µM para LCPVL898), se mostraram não citotóxicas para macrófagos e os estudos da forma amastigota mostraram uma redução significativa nos índices de infectividade (Pinheiro, 2012).

A identificação desses compostos com potencial atividade leishmanicida nos motivou a buscar a validação da DHODH como alvo terapêutico assim como a identificação de inibidores seletivos para a DHODH de *Leishmania braziliensis*. Dentro desse contexto, esse projeto teve como meta a estruturação de uma plataforma de ensaios para a identificação compostos com atividade leishmanicida *in vitro* através da inibição seletiva da enzima DHODH de *Leishmania braziliensis*. Através da combinação de ferramentas bioquímicas, biofísicas e computacionais foi possível desenvolver uma plataforma de ensaios que permitirá a identificação de inibidores seletivos à enzima DHODH de *L. braziliensis* e que apresente atividade leishmanicida *in vitro*. Nossos estudos foram capazes de identificar novas classes de ligantes que serão utilizados para o desenvolvimento de novas gerações de ligantes com potencial leishmanicida.

5. CONCLUSÃO

A enzima diidroorotato desidrogenase (DHODH) está presente em diversos organismos como bactérias, protozoários e em humanos e tem papel fundamental na *via de novo* de síntese de nucleotídeos de pirimidina. A DHODH atua no quarto passo dessa via e que tem a função catalisar a conversão do diidroorotato em orotato. A literatura mostra que a inibição específica dessa enzima, é capaz de inibir toda a rota *de novo* de biossíntese de nucleotídeos de pirimidina (**Esquema** 1). Além disso, organismos/células que dependam exclusivamente da via *de novo* ou aquelas em que a via de salvação não é suficiente para suprir a necessidade de produção de pirimidinas, se mostram susceptíveis a inibição específica da enzima DHODH. Dada a relevância dessa via metabólica, a DHODH tem sido explorada como alvo para fármacos para o tratamento de diferentes doenças. Inibidores da DHODH humana já são corriqueiramente utilizados para o tratamento de artrite reumatoide (Prakash e Jarvis, 1999). Além disso, novos inibidores da DHODH humana já encontram-se em fase 3 de testes clínicos para o tratamento do câncer. A enzima DHODH de *Plasmodium falcipurum* foi validada como alvo para o tratamento da malária (Ittarat *et al.*, 1995) e vários compostos que apresentam inibição seletiva estão em fase final de desenvolvimento (Booker *et al.*, 2009).

Dado o grande potencial terapêutico da DHODH em diferentes organismos, nosso laboratório tem devotado grandes esforços na avaliação dessa enzima como alvo para o tratamento de doenças tropicais negligenciadas.

Dentre essas doenças encontram-se as leishmanioses do tipo cutânea e muco-cutânea, um grave problema de saúde pública no Brasil, cujas formas de terapias ainda são limitadas, de baixa eficácia, altamente tóxicas e de baixa adesão por parte dos pacientes. Existe uma grande necessidade em se buscar novas formas de tratamento para a leishmaniose, de forma a combater de forma eficaz os grandes prejuízos pessoais e sociais que a doença provoca.

Neste sentido, esse trabalho teve como proposta a construção de uma plataforma para identificação de ligantes seletivos para a enzima DHODH de *Leishmania (Vianina) braziliensis,* espécie de *Leishmania* causadora da leishmaniose cutânea e muco-cutânea. O trabalho se iniciou com a produção da enzima na forma heteróloga e o desenvolvimento do protocolo de purificação. A proteína LbDHODH é expressa em *Escherichia coli* em fusão com uma cauda de 6

histidinas na região N-terminal, que foi utilizada para desenvolvermos com sucesso o protocolo de purificação através do uso de coluna de afinidade por Ni^{2+}.

Previamente aos estudos inibitórios, a enzima LbDHODH foi caracterizada através de estudos de cinética enzimática e de termoestabilidade. Posteriormente, conseguimos caracterizar a enzima do ponto de vista cinético, crucial para a identificação de identificação de ligantes. Em nossos estudos, os dados cinéticos obtidos foram ajustados em um modelo de cinética enzimática do tipo ping-pong, onde a primeira etapa da reação, etapa redutiva de conversão de diidroorotato em orotato, obedece o modelo cooperativo de catálise. O coeficiente de Hill varia de acordo com a concentração do segundo substrato, fumarato, e atinge o valor de 2 em concentrações saturantes. Esses resultados, somados aos nossos estudos prévios realizados com a enzima LmDHODH (REIS, R.A.G, *et al* 2015) e estudos realizados com a proteína homóloga de *Lactococcus lactis*, sugerem um papel importante na forma dimérica, e na "conversa" entre os monômeros. Estudos mais detalhados acerca do mecanismo das DHODHs de class 1A já se encontram em andamento no laboratório.

Realizamos também a caracterização quanto à estabilidade térmica da proteína utilizando a técnica de termofluor. As diferenças quanto á temperatura de desenovelamento da proteína na forma livre e na presença de ligantes estimadas por diferentes fluoróforos, sypro *Orange* (Cummings, Farnum e Nelen, 2006) e o próprio FMN (Padua *et al.*, 2014), sugere que o mecanismo de exposição do FMN e do sypro são distintos e podem também ser utilizados para avaliar o mecanismo inibitório de ligantes da proteína.

Paralelo à caracterização cinética, procedemos aos ensaios de caracterização estrutural, no qual fomos capazes de elucidar a estrutura da LbDHODH por difração de raios- X a uma resolução de 2.12 Å. Os ensaios de cristalização são reprodutíveis, e a determinação da estrutura cristalográfica da LbDHODH em complexo com orotato a 1.76 Å através do uso de técnicas de co-cristalização nos permite considerar que a determinação da estrutura cristalográfica com diferentes ligantes pode ser também uma estratégia a ser utilizada para a caracterização do mecanismo de inibição dos diferentes ligantes e/ou inibidores identificados.

Os estudos de caracterização cinética e de termoestabilidade nos permitiram propor experimentos para a identificação de ligantes da LbDHODH. A molécula de orotato, inibidor natural da enzima, foi então avaliado frente aos dois ensaios. Através dos ensaios de inibição enzimática na presença dos dois substratos em concentrações saturantes foi possível determinar a potência de inibição através do calculo de IC_{50}. Os ensaios utilizando a técnica de TermoFMN também se mostrou sensível à presença do ligante, permitindo a obtenção de uma curva dose-reposta.

Considerando que a metodologia de identificação de ligantes havia sido desenvolvida com sucesso, passamos para a segunda etapa do projeto que consistia na identificação de inibidores para LbDHODH combinando tanto conhecimentos prévios obtidos no laboratório com relação à inibição da DHODH de tripanossomatídeos, assim como testando novas bibliotecas de compostos cedidas pelos nossos colaboradores.

Nessa busca por ligantes destaca-se o uso de estratégias *in silico* e *in vitro*. Destaca-se também a colaboração do Prof. Flávio Emery que participou do projeto, tanto na orientação do projeto no aspecto que envolveu a síntese de compostos, como também fornecendo sua biblioteca de compostos 2-amino benzotiazol para avaliação. Além disso, vários colaboradores do nosso laboratório tiveram seus compostos avaliados em nossa plataforma.

Para a busca de ligantes iniciamos pela estratégia de utilizar os conhecimentos prévios acerca dos compostos LCPSP 3027 e LCPVL 898, obtidos comercialmente e identificados como potentes inibidores da proteína homóloga LmDHODH e que já haviam demonstrado atividade leishmanicida *in vitro* contra cultura das formas promastigota e amastigota. Em nossos ensaios, ambos os compostos se mostraram potentes inibidores da enzima LbDHODH, com IC_{50} estimados em baixos valores na ordem de µM.

Esses resultados nos estimularam a seguir duas distintas estratégias. Primeiro, a de utilizarmos métodos *in silico*, através do uso de técnicas de docagem contra o modelo cristalográfico previamente obtido para LbDHODH, na busca de moléculas análogas aos compostos LCPSP 3027 e LCPVL 898. Segundo, a de buscarmos uma rota sintética rápida e barata, de forma a possibilitar a realização de estudos de formulação e ensaios em modelo animal.

Na busca *in silico*, análogos à molécula LCPVL 898 foram ensaiados virtualmente, e as 8 moléculas, priorizadas com base no modo de interação com a proteína-alvo, foram adquiridas comercialmente e avaliadas *in vitro*. Nessa busca, foi possível identificar o composto LCPVL 697, que apresentou taxas de inibição semelhante aos compostos aos compostos LCPSP 3027 e LCPVL 898. Ensaios de inibição cruzada contra a enzima humana mostrou que o LCPVL 697 é um inibidor seletivo contra a enzima LbDHODH.

Embora tenhamos dedicado grandes esforços na tentativa da síntese do LCPSP 3027 e LCPVL 898, não conseguimos obtê-los. No entanto, os compostos intermediários das rotas de síntese foram também avaliados, e permitiram a identificação do composto **13**, obtido na rota de síntese do LCPVL 898. Apesar de ser uma pequena molécula mostrou taxas de inibição na ordem de 50% na concentração de100 µM sugerindo que a cadeia alifática da molécula LCPVL 898 é de extrema importância para a inibição da enzima.

Em paralelo foram também testados diferentes bancos de dados de moléculas, oriundos de diferentes laboratórios e varrendo um amplo espectro de diversidade química e estrutural. Nesses ensaios destacou-se a capacidade inibitória de fragmentos baseado no núcleo 2-amino benzotiazol, isto é, moléculas de tamanho da ordem de 200 Da, e que apresentaram atividade inibitória na faixa de baixo µM. No total foram identificados 13 fragmentos com capacidade inibitória e seletiva para a enzima LbDHODH.

Os 9 compostos identificados em nossa plataforma tiveram seu potencial leishmanicida e citotóxico avaliado. Nenhum dos compostos se mostrou citotóxico para os ensaios realizados com cultura de fibroblastos. Com relação a atividade leishmanicida, os compostos **Tia 26**, **Tia 29** e **Tia 36** apresentaram atividade inibitória da faixa de 10 a 80 µM contra cultura de *Leishmania (Vianna) braziliensis* na forma promastigota e os compostos **Tia 26**, **Tia 29**, **Tia 36,Tia 16** e LCPVL 697 apresentaram atividade inibitória na faixa de 50 a 130 µM contra cultura de fibroblastos infectados com a forma amastigota.

Embora ainda sejam resultados preliminares e não temos ainda nenhum resultado que correlacione diretamente a inibição seletiva desses compostos contra a enzima LbDHODH com às atividades leishmanicida identificadas, não podemos

desconsiderar a hipótese de que as diferenças encontradas quanto ao potencial inibitório contra as formas promastigota e amastigota sejam consequência não somente das características estruturais da membrana das diferentes formas de *Leishmania* e do mecanismo de internalização dessas moléculas, como também nas diferenças em níveis de expressão e dependência da rota de biossíntese de pirimidinas para as diferentes formas do parasita.

Os resultados obtidos até o presente momento são extremamente promissores, principalmente por se tratar de fragmentos moleculares que serão utilizados como núcleos para a síntese de diferentes análogos. Estudos de caracterização estrutural se encontram em andamento para a caracterização do mecanismo inibitório desse grupo de inibidores e para fornecer as bases estruturais que permitirão o planejamento racional de ligantes baseado na estrutura da LbDHODH.

Dada à alta identidade sequencial entre as enzimas DHODH do gênero *Leishmania*, os resultados obtidos através dos nossos estudos poderão também ser exploradas no planejamento de compostos com atividade leishmanicida contra outras espécies de *Leishmania.* Além disso, outras enzimas DHODH de classe 1 A como a de *Trypanossoma cruzi* também pode ser explorada para os compostos identificados.

A plataforma de ensaios para busca de moléculas com atividade leishmanicida baseado na inibição seletiva da enzima diidroorotato desidrogenase de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, implementada durante o desenvolvimento do projeto, se encontra disponível para testar os diferentes bancos de compostos que sejam de interesse da comunidade científica.

7. REFERÊNCIAS

AGUIR, N. E. et al. Visceral leishmaniasis in immunocompetent adults. About six cases. **Pathologie Biologie,** v. 61, n. 2, p. 54-58, Apr 2013.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **Plos One,** v. 7, n. 5, May 31 2012.

ANNOURA, T. et al. The origin of dihydroorotate dehydrogenase genes of kinetoplastids, with special reference to their biological significance and adaptation to anaerobic, parasitic conditions. **Journal of Molecular Evolution,** v. 60, n. 1, p. 113-127, Jan 2005.

ARAKAKI, T. L. et al. Characterization of Trypanosoma brucei dihydroorotate dehydrogenase as a possible drug target; structural, kinetic and RNAi studies. **Molecular Microbiology,** v. 68, n. 1, p. 37-50, Apr 2008.

ASHWORTH, I. W. et al. A new route for manufacture of 3-cyano-1-naphthalenecarboxylic acid. **Organic Process Research & Development,** v. 7, n. 1, p. 74-81, Jan-Feb 2003.

BATT, D. G. Inhibitors of dihydroorotate dehydrogenase. **Expert Opinion on Therapeutic Patents,** v. 9, n. 1, p. 41-54, Jan 1999.

BAUMGARTNER, R. et al. Dual binding mode of a novel series of DHODH inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry,** v. 49, n. 4, p. 1239-1247, Feb 2006.

BEKHIT, A. A.; FAHMY, H. T. Y. Design and synthesis of some substituted 1H-pyrazolyl-oxazolidines or 1H-pyrazolyl-thiazolidines as anti-inflammatory-antimicrobial agents. **Archiv Der Pharmazie,** v. 336, n. 2, p. 111-118, Apr 2003.

CORDEIRO, A. T. et al. Crystal structure of dihydroorotate dehydrogenase from Leishmania major. **Biochimie,** v. 94, n. 8, p. 1739-1748, Aug 2012.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clin Microbiol Rev,** v. 19, n. 1, p. 111-26, Jan 2006.

CUMMINGS, M.; FARNUM, M.; NELEN, M. Universal screening methods and applications of ThermoFluor (R). **Journal of Biomolecular Screening,** v. 11, n. 7, p. 854-863, OCT 2006 .

DAFTARIAN, P. M. et al. A Targeted and Adjuvanted Nanocarrier Lowers the Effective Dose of Liposomal Amphotericin B and Enhances Adaptive Immunity in Murine Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases,** v. 208, n. 11, p. 1914-1922, Dec 2013.

DARU, J.; STIRLING, A. Mechanism of the Pechmann Reaction: A Theoretical Study. **Journal of Organic Chemistry,** v. 76, n. 21, p. 8749-8755, Nov 2011.

DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatologic Therapy,** v. 22, n. 6, p. 491-502, Nov-Dec 2009.

DE OLIVEIRA GUERRA, J. A. et al. Tegumentary leishmaniasis in the State of Amazonas: what have we learned and what do we need? **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical,** v. 48, p. 12-19, Jun 2015.

DE PAULO, L. F. B. et al. Mucocutaneous leishmaniasis: mucosal manifestations in an endemic country. **International Journal of Infectious Diseases,** v. 17, n. 11, p. E1088-E1089, Nov 2013.

DEVINE, S. M. et al. Promiscuous 2-Aminothiazoles (PrATs): A Frequent Hitting Scaffold. **Journal of Medicinal Chemistry,** v. 58, n. 3, p. 1205-1214, Feb 2015. ISSN 0022-2623.

EL-AZAB, A. S.; ABDEL-AZIZ, A. A. M. AN EFFICIENT SYNTHESIS OF THIOESTERS VIA TFA-CATALYZED REACTION OF CARBOXYLIC ACID AND THIOLS: REMARKABLY FACILE C-S BOND FORMATION. **Phosphorus Sulfur and Silicon and the Related Elements,** v. 187, n. 9, p. 1046-1055, 2012.

ERLANSON, D. A. Introduction to Fragment-Based Drug Discovery. In: DAVIES, T. G. e HYVONEN, M. (Ed.). **Fragment-Based Drug Discovery and X-Ray Crystallography**. Berlin: Springer-Verlag Berlin, v.317, 2012. p.1-32. (Topics in Current Chemistry).

FELICIANO, P. R. et al. Cloning, expression, purification, and characterization of Leishmania major dihydroorotate dehydrogenase. **Protein Expression and Purification,** v. 48, n. 1, p. 98-103, Jul 2006.

GARAVITO, M. F.; NARVAEZ-ORTIZ, H. Y.; ZIMMERMANN, B. H. Pyrimidine Metabolism: Dynamic and Versatile Pathways in Pathogens and Cellular Development. **Journal of Genetics and Genomics,** v. 42, n. 5, p. 195-205, May 2015.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. D. L. R. D. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** v. 36, n. 1, p. 71-80, 01 2003.

GREENE, S. et al. INHIBITION OF DIHYDROOROTATE DEHYDROGENASE BY THE IMMUNOSUPPRESSIVE AGENT LEFLUNOMIDE. **Biochemical Pharmacology,** v. 50, n. 6, p. 861-867, Sep 1995.

GUSTAFSON, G. et al. Identification of a new antifungal target site through a dual biochemical and molecular-genetics approach. **Current Genetics,** v. 30, n. 2, p. 159-165, Jul 1996.

HURT, D. E.; SUTTON, A. E.; CLARDY, J. Brequinar derivatives and species-specific drug design for dihydroorotate dehydrogenase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters,** v. 16, n. 6, p. 1610-1615, Mar 2006.

INAOKA, D. K. et al. Structures of Trypanosoma cruzi dihydroorotate dehydrogenase complexed with substrates and products: atomic resolution insights into mechanisms of dihydroorotate oxidation and fumarate reduction. **Biochemistry,** v. 47, n. 41, p. 10881-91, Oct 2008.

IRANPOOR, N. et al. Easily prepared azopyridines as potent and recyclable reagents for facile esterification reactions. An efficient modified mitsunobu reaction. **Journal of Organic Chemistry,** v. 73, n. 13, p. 4882-4887, Jul 2008.

KAMINSKI, T.; KIRSCH, G. Claisen condensation of N-methylpyrrolidinone and alpha-chloronicotinic esters. **Journal of Heterocyclic Chemistry,** v. 45, n. 1, p. 229-234, Jan-Feb 2008.

KAPPAGODA, S.; IOANNIDIS, J. P. A. Prevention and control of neglected tropical diseases; overview of randomized trials, systematic reviews and meta-analyses. **Bulletin of the World Health Organization,** v. 92, n. 5, p. 356-366, May 2014.

LEIFSO, K. et al. Genomic and proteomic expression analysis of Leishmania promastigote and amastigote life stages: the Leishmania genome is constitutively expressed. **Mol Biochem Parasitol,** v. 152, n. 1, p. 35-46, Mar 2007.

LEWNARD, J. A. et al. Forecasting Temporal Dynamics of Cutaneous Leishmaniasis in Northeast Brazil. **Plos Neglected Tropical Diseases,** v. 8, n. 10, p. 11, Oct 2014.

LIMA, M. I. S. et al. Genotoxic effects of the antileishmanial drug glucantime(A (R)). **Archives of Toxicology,** v. 84, n. 3, p. 227-232, Mar 2010.

LIU, S. P. et al. Structures of human dihydroorotate dehydrogenase in complex with antiproliferative agents. **Structure with Folding & Design,** v. 8, n. 1, p. 25-33, Jan 2000.

LIU, Y. et al. Structure of the putative dihydroorotate dehydrogenase from Streptococcus mutans. **Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications,** v. 67, p. 182-187, Feb 2011.

LO, M. et al. Evaluation of fluorescence-based thermal shift assays for hit identification in drug discovery. **Analytical Biochemistry,** v. 332, n. 1, p. 153-159, SEP 1 2004 2004.

MAES, J.; RAUWS, T. R. M.; MAES, B. U. W. Synthesis of C8N9 Annulated Purines by Iron-Catalyzed CH Amination. **Chemistry-a European Journal,** v. 19, n. 28, p. 9137-9141, Jul 2013.

MALTEZOU, H. C. Drug resistance in visceral leishmaniasis. **J Biomed Biotechnol,** v. 2010, p. 617521, 2010.

MANSUETO, P. et al. Leishmaniasis in travelers: A literature review. **Travel Medicine and Infectious Disease,** v. 12, n. 6, p. 563-581, Nov-Dec 2014.

MARCINKEVICIENE, J. et al. Selective inhibition of bacterial dihydroorotate dehydrogenases by thiadiazolidinediones. **Biochemical Pharmacology,** v. 60, n. 3, p. 339-342, Aug 2000.

MCDONALD, C. A.; PALFEY, B. A. Substrate binding and reactivity are not linked: grafting a proton-transfer network into a Class 1A dihydroorotate dehydrogenase. **Biochemistry,** v. 50, n. 14, p. 2714-6, Apr 2011.

MOLYNEUX, D. H. Neglected tropical diseases: now more than just 'other diseases' - the post-2015 agenda. **International Health,** v. 6, n. 3, p. 172-180, Sep 2014.

MORENO-RODRIGUEZ, A. C. et al. Efficacy and toxicity evaluation of new amphotericin B micelle systems for brain fungal infections. **International Journal of Pharmaceutics,** v. 494, n. 1, p. 17-22, Oct 2015.

MORISAWA, Y.; KATAOKA, M.; KITANO, N. STUDIES ON ANTICOCCIDIAL AGENTS .2. SYNTHESIS AND ANTICOCCIDIAL ACTIVITY OF NITROPYRIDINECARBOXAMIDES AND DERIVATIVES. **Journal of Medicinal Chemistry,** v. 20, n. 4, p. 483-487, 1977.

MUNIER-LEHMANN, H. et al. On Dihydroorotate Dehydrogenases and Their Inhibitors and Uses. **Journal of Medicinal Chemistry,** v. 56, n. 8, p. 3148-3167, Apr 2013.

NASCIMENTO, B. W. L. et al. Study of sand flies (Diptera: Psychodidade) in visceral and cutaneous leishmaniasis areas in central western of Minas Gerais state - Brazil. **Acta Tropica,** v. 125, n. 3, p. 262-268, Mar 2013.

NAUJORKS, A. A. D. et al. Novel naphthoquinone derivatives and evaluation of their trypanocidal and leishmanicidal activities. **Organic & Biomolecular Chemistry,** v. 13, n. 2, p. 428-437, 2015.

NAVARRETE-DECHENT, C. et al. Dermatologic manifestations associated with HIV/AIDS. **Revista Chilena De Infectologia,** v. 32, p. S57-S71, Feb 2015.

NELSON, D. L.; LEHNINGER, A. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. New York: W.H. Freeman, 2008.

NEVES, L. O. et al. A randomized clinical trial comparing meglumine antimoniate, pentamidine and amphotericin B for the treatment of cutaneous leishmaniasis by Leishmania guyanensis. **Anais Brasileiros De Dermatologia,** v. 86, n. 6, p. 1092-1101, Nov-Dec 2011.

NGUEWA, P. A. et al. Pentamidine is an antiparasitic and apoptotic drug that selectively modifies ubiquitin. **Chemistry & Biodiversity,** v. 2, n. 10, p. 1387-1400, 2005.

NIELSEN, F. S.; ANDERSEN, P. S.; JENSEN, K. F. The B form of dihydroorotate dehydrogenase from Lactococcus lactis consists of two different subunits, encoded by the pyrDb and pyrK genes, and contains FMN, FAD, and [FeS] redox centers. **Journal of Biological Chemistry,** v. 271, n. 46, p. 29359-29365, Nov 1996.

NORAGER, S. et al. E-coli dihydroorotate dehydrogenase reveals structural and functional distinctions between different classes of dihydroorotate dehydrogenases. **Structure,** v. 10, n. 9, p. 1211-1223, Sep 2002.

PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of Infection,** v. 69, p. S10-S18, Nov 2014.

PADUA, R. A. P. et al. ThermoFMN - A Thermofluor Assay Developed for Ligand-Screening as an Alternative Strategy for Drug Discovery. **Journal of the Brazilian Chemical Society,** v. 25, n. 10, p. 1864-+, Oct 2014.

PAILA, Y. D.; SAHA, B.; CHATTOPADHYAY, A. Amphotericin B inhibits entry of Leishmania donovani into primary macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v. 399, n. 3, p. 429-433, Aug 2010.

PANTOLIANO, M. et al. High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery. **Journal of Biomolecular Screening,** v. 6, n. 6, p. 429-440, DEC 2001 .

PEIXOTO, J. A. et al. Antileishmanial Activity of the Hydroalcoholic Extract of Miconia langsdorffii, Isolated Compounds, and Semi-Synthetic Derivatives. **Molecules,** v. 16, n. 2, p. 1825-1833, Feb 2011.

PIGOTT, D. M. et al. Global Distribution Maps of the Leishmaniases. **Elife,** v. 3, p. 33, Jun 2014.

PINHEIRO, M. P. **Planejamento de inibidores das enzimas diidroorotato desidrogenase de *Trypanossoma cruzi* e *Leishmania major***. 2012. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-SP, Universidade de São Paulo

PINHEIRO, M. P.; EMERY, F. D.; NONATO, M. C. Target Sites for the Design of Anti-trypanosomatid Drugs Based on the Structure of Dihydroorotate Dehydrogenase. **Current Pharmaceutical Design,** v. 19, n. 14, p. 2615-2627, Apr 2013.

PINHEIRO, M. P.; IULEK, J.; NONATO, M. C. Crystal structure of Trypanosoma cruzi dihydroorotate dehydrogenase from Y strain. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v. 369, n. 3, p. 812-817, May 2008.

ROWLAND, P. et al. Structure of dihydroorotate dehydrogenase B: Electron transfer between two flavin groups bridged by an iron-sulphur cluster. **Structure,** v. 8, n. 12, p. 1227-1238, Dec 2000.

ROYER, A. M. et al. Iron Acyl Thiolato Carbonyls: Structural Models for the Active Site of the Fe - Hydrogenase (Hmd). **Journal of the American Chemical Society,** v. 132, n. 47, p. 16997-17003, Dec 2010.

SCOTT, D. E. et al. Fragment-Based Approaches in Drug Discovery and Chemical Biology. **Biochemistry,** v. 51, n. 25, p. 4990-5003, Jun 2012.

STOCKDALE, L.; NEWTON, R. A Review of Preventative Methods against Human Leishmaniasis Infection. **Plos Neglected Tropical Diseases,** v. 7, n. 6, Jun 2013.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. **Expert Opinion on Pharmacotherapy,** v. 14, n. 1, p. 53-63, Jan 2013.

TIPPARAJU, S. K. et al. Design and synthesis of 2-pyridones as novel inhibitors of the Bacillus anthracis enoyl-ACP reductase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters,** v. 18, n. 12, p. 3565-3569, Jun 2008.

TROTT, O.; OLSON, A. J. Software News and Update 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, Jan 2010.

VALE, E. C. S. D.; FURTADO, T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia,** v. 80, n. 4, p. 421-428, 2005-08 2005.

WANG, Q. Y. et al. Inhibition of Dengue Virus through Suppression of Host Pyrimidine Biosynthesis. **Journal of Virology,** v. 85, n. 13, p. 6548-6556, Jul 2011.

WHEELER, R. J.; GLUENZ, E.; GULL, K. The Limits on Trypanosomatid Morphological Diversity. **Plos One,** v. 8, n. 11, p. 18, Nov 2013.

WILSON, Z. N. et al. Genetic Dissection of Pyrimidine Biosynthesis and Salvage in Leishmania donovani. **Journal of Biological Chemistry,** v. 287, n. 16, p. 12759-12770, Apr 2012.

WYSS, D. F. et al. Combining NMR and X-ray Crystallography in Fragment-Based Drug Discovery: Discovery of Highly Potent and Selective BACE-1 Inhibitors. In: DAVIES, T. G. e HYVONEN, M. (Ed.). **Fragment-Based Drug Discovery and X-Ray Crystallography**. Berlin: Springer-Verlag Berlin, v.317, 2012. p.83-114. (Topics in Current Chemistry).

YANIK, M. et al. The psychological impact of cutaneous leishmaniasis. **Clinical and Experimental Dermatology,** v. 29, n. 5, p. 464-467, Sep 2004.