

JULIANA CHELESKI

**Planejamento de Inibidores da Enzima Diidroorotato Desidrogenase de *Trypanosoma cruzi*
por biocalorimetria**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de doutor em Ciências.

Área de concentração: Físico-Química

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari

São Carlos

2011

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Josmar e Jussara Cheleski, ao meu irmão Jefferson, por existirem.
Ao conhecimento que nos impulsiona a luz.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pelas pessoas que encontrei, pelos livros que li.

Aos meus pais, Josmar e Jussara, pelo exemplo de união e amor pela vida. Ao meu irmão Jefferson Cheleski, pela amizade e pelas palavras de carinho.

Ao meu amado Helton Wiggers.

Ao Prof. Dr. Carlos Montanari pela orientação e pelo voto de confiança por ter me aceitado no seu laboratório.

A Malu Montanari por ser nossa *mãe* em todos os momentos desta caminhada.

Aos amigos que compartilharam comigo inúmeros momentos de alegria, tristeza, pescarias, congressos, artigos, roda de violão: Geraldo, Renato e Mábia Freitas, Josmar e Adriane, Rafael, Peter Kenny, Vinicius, Bauab, Fabio e Patrícia, Guiga e Roberto, Andrei e Patrícia, Igor e Aline (e a todos os meninos da república do Igor).

Ao Grupo NEQUIMED-PN: Emanuella Fonseca (e sua mãe), Fabyana e Ricardo, Jean, Juliane, Aderson, pelas jornadas de trabalho. A Fabiana Rossini, pela disposição de nos ajudar e ser nossa 'chefa'.

Um agradecimento especial para a Prof.^a Dra. Cristina Nonato (Faculdade de Farmácia de Ribeirão Preto/USP), Dr. Josmar R. Rocha e Matheus Pinheiro pela colaboração científica.

Ao grupo de Biologia Molecular e Bioquímica (IQSC) pela amizade. A mãe Sabrina, pelas horas de alegria e por me dar à honra de cuidar por um momento da Beatriz. A Natalia, pela companhia e os momentos de espera, para a Beatriz vir ao mundo.

Ao grupo de Biofísica Molecular 'Sérgio Mascarenhas': Andressa, Bel (que me chama de Karina), Joci, Ana Paula Citadini, Jaba pela colaboração e dedicação para me ensinar.

A todos meus conterrâneos do Paraná/Guarapuava e da Unicentro.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e a Fundação de Amparo a pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Processo 2007/05424-2) pelo suporte financeiro.

"Há duas formas de conhecimento: o legítimo e o ilegítimo. Ao ilegítimo pertencem todos estes: a visão, a audição, o olfato, o paladar e o tato. O legítimo, porém, está separado daquele".

Demócrito

RESUMO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, é uma doença tropical que enseja morte/morbidade de milhões de pessoas na América Latina. Por processos migratórios, vem-se estendendo ao sul dos Estados Unidos, Canadá, Europa, Austrália e Japão. Essa doença tem sido considerada *super-negligenciada* pela indústria farmacêutica, já que os dois fármacos disponíveis para o seu tratamento foram introduzidos há mais de quarenta anos e apresentam baixa eficácia com vários efeitos colaterais severos. Mais recentemente, a Organização Mundial da Saúde considerou a doença de Chagas, dentre outras, como a *doença da pobreza*! Com esse cenário completamente desfavorável aos portadores da doença, é necessária a descoberta, desenvolvimento e introdução de novos fármacos para o tratamento eficiente e seguro da doença de Chagas.

Dentro desse contexto, este trabalho representa uma importante contribuição para o entendimento das razões moleculares da ação farmacológica de substâncias químicas bioativas de interesse à farmacoterapia da doença de Chagas. Ao nível molecular, a enzima pertencente à via de síntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidinas, diidroorotato desidrogenase do *Trypanosoma cruzi* (TcDHODH), é um alvo promissor para a descoberta e desenvolvimento de candidatos a fármacos de interesse para o tratamento da doença de Chagas.

Os conceitos e ferramentas da química medicinal computacional, tais como os ensaios virtuais *in silico*, foram usados para a identificação de inibidores da TcDHODH. Vinte e seis substâncias inéditas como inibidores da TcDHODH foram adquiridos comercialmente e avaliados experimentalmente através da Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC) para a determinação do mecanismo de inibição e da constante cinética de afinidade (K_i^{app}).

Na etapa de docagem molecular, o objetivo era identificar moléculas que apresentassem uma boa afinidade pelo sítio ativo da enzima TcDHODH. A primeira série de ligantes selecionados dos métodos *in silico*, apresentou inibição enzimática na concentração de micromolar com eficiência média de ligante de $0,50 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ átomo}^{-1}$. Devido à baixa massa molecular (aproximadamente 200 kDa) e a alta eficiência de ligante, essa série foi considerada como constituída de excelentes substâncias com elevado poder de reconhecimento biomolecular. Por isso, foram caracterizadas como substâncias passíveis de otimização no processo *do-ligante-para-substância matriz*.

As enzimas TcDHODH e DHODH de *Leishmania major* (LmDHODH) têm sítios ativos com elevado grau de similaridade. Portanto, usando a enzima LmDHODH como padrão de substituição da TcDHODH é possível fazer a descrição do modo de interação do co-complexo TcDHODH-inibidor. O modo de ação descrito através da resolução da estrutura cristalográfica de raios-X, além de validar ortogonalmente os resultados cinéticos obtidos por ITC – que identificou as substâncias como inibidores competitivos (por interação direta no sítio ativo da enzima TcDHODH), geraram hipóteses farmacofóricas para a busca de novas moléculas (chamadas de segunda geração), agora com padrão superior de reconhecimento molecular do sítio da TcDHODH. Para validar complementarmente a hipótese, foi demonstrado que os inibidores da TcDHODH inibem, similarmente, a LmDHODH.

Uma análise cuidadosa da estrutura tridimensional da enzima TcDHODH, demonstrou a possibilidade de ocupação do sítio S2 que se estende além da região do sítio catalítico S1, permitindo assim o aumento da afinidade biomolecular com os inibidores. Além disso, o sítio S2 não é encontrado na estrutura da proteína de humanos (HsDHODH), podendo ser uma região passível de seletividade frente à enzima TcDHODH.

O emprego adequado dessa hipótese resultou na otimização dos ligantes identificados previamente para substâncias mais potentes que inibiram a enzima de forma competitiva em relação ao substrato diidroorotato (DHO) em valores K_i^{app} de 121 ± 14 nM e 190 ± 10 nM.

A técnica de ITC foi fundamental no processo de descoberta de inibidores enzimáticos, pois se mostrou extremamente susceptível à determinação da interação intermolecular enzima-inibidor, permitindo acompanhar a cinética da reação e obter os valores da constante de afinidade de maneira precisa e acurada. Com isso, a taxa de acerto obtida nesta tese foi de 46%, considerando-se apenas as substâncias com valores de $K_i^{app} < 100$ μ M. Esse é um número favoravelmente apreciável, já que na literatura ele gira em torno de 1-10% quando o planejamento *in silico* é realizado, quando comparado às taxas de acerto dos métodos de ensaio em larga escala (HTS), entre 0-2 %, os resultados alcançados neste trabalho são ainda mais significativos.

Além disso, as substâncias químicas selecionadas através da integração de métodos *in silico* e biocalorimétricos apresentam elevado grau de complexidade no processo biomolecular de interação enzima-ligante, que permite classificá-las para as fases seguintes da gênese planejada de fármacos.

ABSTRACT

American trypanosomiasis or Chagas disease, caused by the haemoflagellate *Trypanosoma cruzi*, is a tropical disease that affects millions of people in Latin America. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries is attained by immigration as the disease also affects people in the United States, Canada, Europe, Australia and Japan. However, the United States are not to be written off as an area of nonendemicity for Chagas disease like Europe or Asia because the southern states have enzootic *T. cruzi* transmission that involves triatomine species and hosts such as raccoons, opossums, and domestic dogs. Even though, this disease has been considered as a *super-neglected* from the big Pharma Industry viewpoint since the only available drugs for its treatment were introduced in the market more than forty years ago and worsen is that they have low efficacy and cause various severe side effects.

Although the current clinical scenario is of course discouraging and is far from being even a soothing treatment for those who suffer from the disease, it prompts one to set efforts towards the need of discovering and developing new efficacious and safe drugs to treat Chagas disease.

Our research group covers the concept of enzymes acting as targets for the action of drugs. Once *T. cruzi* has many druggable targets, the dihydroorotate dehydrogenase enzyme (TcDHODH) that belongs to the *de novo* pyrimidine nucleotide synthetic pathway has been chosen for the search of new inhibitors that may be of use in the treatment of Chagas disease. To accomplish with this and considering that inhibitors are molecules that decrease enzyme activity leading to parasite death, we used the concepts and tools of modern computational medicinal chemistry such as *in silico* screening of small molecules that bind to the active site of the TcDHODH.

After a thoroughly program of virtually screening thousands of compounds, 26 were purchased from commercially available sources and experimentally assayed against the TcDHODH using Isothermal Titration Calorimetry (ITC) in order to determine the mechanism of inhibition and the kinetic affinity constant (K_i^{app}).

The first series of inhibitors selected from our *in silico* strategy were evaluated by ITC to yield compounds that inhibited the TcDHODH in the micromolar concentration range with an average of 0.50 kcal mol⁻¹ atom⁻¹ ligand efficiency (LE). Because the assayed compounds have low molecular weight (ca. 200 kDa) and high LE, which bring them to the specific bimolecular pattern recognition all of them were

considered good inhibitors capable of being selected to enter the hit-to-lead optimization process.

The detailed description of the ligand-enzyme mode of binding (MOB) is thoroughly accomplished by solving the X ray crystal structure of the surrogate *Leishmania major* DHODH enzyme (LmDHODH), which has a high degree of similarity with the enzyme TcDHODH. The MOB credited to be in the active site of the TcDHODH orthogonally validated the ITC kinetic experimental data obtained for all ligands as competitive inhibitors that interact at the active site of the TcDHODH and helped to generate pharmacophoric hypotheses for the search of new second generation molecules acting against the enzyme TcDHODH. Analyzing the 3D structure of the TcDHODH along with its surrogate LmDHODH, we envisaged the possibility of compounds to extend their side chain beyond the region of the catalytic site (called S1), and interacting in a region called S2, so to increase binding affinity. Moreover, the TcDHODH S2 site that is not found in the 3D protein structure of humans (HsDHODH) is likely to offer new insights for the search of inhibitors whose binding to this S2 site can pave the roads towards the needed structural basis for selective inhibition of TcDHODH.

The most potent compounds inhibited the enzyme competitively with respect to the substrate dihydroorotate (DHO) at K_i^{app} values of 121 ± 14 nM and 190 ± 10 nM, which constitutes high affinity TcDHODH inhibitors. The ITC technique was pivotal to this process of enzyme inhibitors discovery, because it proved to be extremely sensitive thus allowing to monitor the kinetics of the reaction and to obtain precise and accurate values of affinity constants.

The hit rate obtained in this work, considering only those compounds with $K_i^{app} < 100$ μ M, was 46%. This is a really high number, since literature values range from 1 to 10% when the planning new inhibitors via *in silico* methods when compared to the success rates obtained by the methods of testing on large scales (HTS), 0-2 %, the results achieved in this work are even more significant. Moreover, the compounds selected through the integration of *in silico* and calorimetric methods showed a high degree of complexity in the process of bimolecular enzyme-ligand recognition, which allows to pass them to the next phase of the drug design process.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Átomo
Å	Angstroms
ADME	Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção
Asn	Resíduo de aminoácido asparagina
Asp	Resíduo de aminoácido aspartato
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina trifosfato
BamHI	Enzima de restrição derivada de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Cys	Resíduo de aminoácido cisteína
DCIP	Dicloroindofenol
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DHO	Diidroorotato
DHODHs	Diidroorotato desidrogenases
DMSO	Dimetilsulfóxido
D.O _{600nm}	Densidade óptica medida em 600nm
DG	Variação da energia livre de Gibbs
DS	Variação de entropia
DQ	Variação da quantidade de calor
DH _{app}	Variação da entalpia aparente de interação
DH ¹	Variação de entalpia de ativação, no estado de transição
DS ¹	Variação da entropia de ativação, no estado de transição

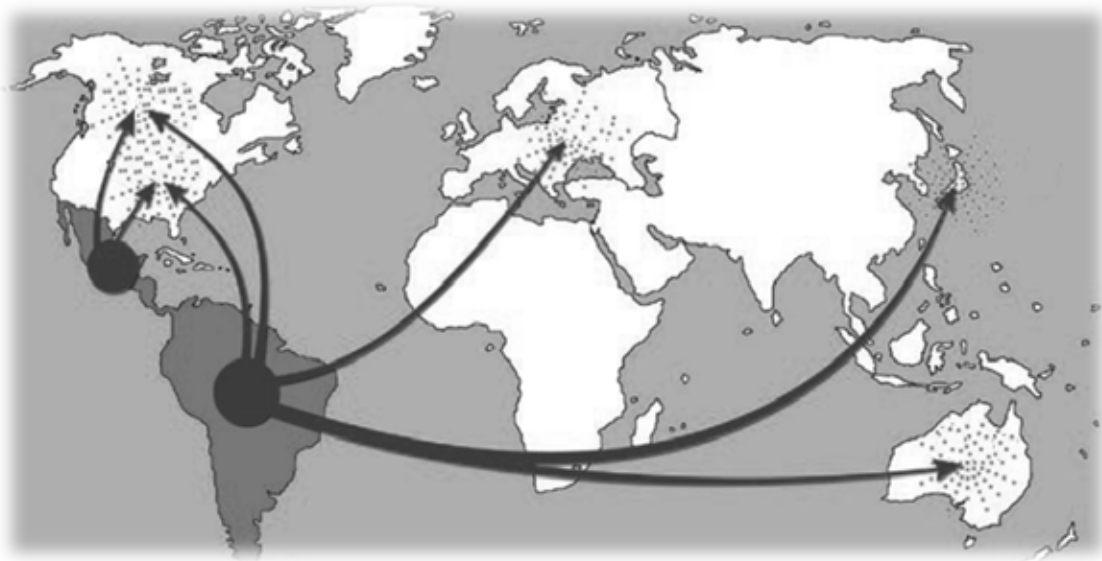
DG ¹	Variação da energia livre de ativação, no estado de transição
[DL]	Variação na concentração do ligante
E	Enzima
E _a	Energia de ativação
[E _o]	Concentração total de enzima
E.C.	Classificação numérica de enzimas do <i>Enzyme Commission</i>
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetraacético
EI	Enzima-inibidor
EIS	Enzima-inibidor-substrato
ES	Enzima-substrato
FDA	Administração Federal de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (<i>Food and Drug Administration</i>)
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FMN	Flavina mononucleotídeo
FUM	Substrato fumarato
G3P	Gliceraldeído-3-fosfato
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
Gln	Resíduo de aminoácido glutamina
Glu	Resíduo de aminoácido glutamato
Gly	Resíduo de aminoácido glicina
His	Resíduo de aminoácido histidina
His ₆ -TcGAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase com cauda de histidina

HTS	Ensaio Automatizado em Larga Escala
HsDHODH	Enzima diidroorotato desidrogenase humana
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
ITC	Calorimetria de Titulação Isotérmica
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
kDa	1000 Daltons
K_i^{app}	Constante de inibição aparente
K_M	Constante de Michaelis Menten
k_{cat}	Constante catalítica
LBDD	<i>Ligand Based Drug Design</i> (Planejamento baseado na estrutura do ligante)
LB Broth	Luria Broth
Lys	Resíduo de aminoácido lisina
MW	Massa molecular
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida
NCE	Nova Entidade Química
PDB	Banco de Dados de Proteínas
QSAR	Relação quantitativa estrutura atividade
SAR	Relação estrutura atividade
Ser	Resíduo de aminoácido serina
SBDD	<i>Structure Based Drug Design</i> (Planejamento Baseado na Estrutura do Alvo)
SDS-Page	Gel de eletroforese de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio

<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TcDHODH	Diidroorotato desidrogenase de <i>Trypanosoma cruzi</i>
TEA	Trietanolamina
LmDHODH	Diidroorotato desidrogenase de <i>Leishmania major</i>
Ni-NTA	Resina de Níquel iônico imobilizado covalentemente com ácido nitriloacético sobre resina de agarose
ON	<i>Over Night</i> . Período de 12 horas
Triz	Trizma Base
Thr	Resíduo de aminoácido treonina
UMP	Uridina monofosfato
USP	Universidade de São Paulo
V_{\max}	Velocidade máxima
v/v	Proporção volume/volume da mistura de dois componentes da solução
OMS	Organização Mundial da Saúde

Capítulo 1

Introdução



O cenário mundial de pessoas infectadas com doença de Chagas, infelizmente, continua crescendo. Neste capítulo são abordados aspectos históricos da doença de Chagas, modo de transmissão, infecção e perspectivas de tratamento, assim como o papel das enzimas da via de síntese de nucleotídeos de pirimidina e da via glicolítica na busca por novos fármacos para o tratamento desta doença.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Chagas

1.1.1. História da doença e distribuição geográfica

Os protozoários, causadores de inúmeras doenças humanas, existiam primariamente no ciclo silvestre, zoótica (sem a participação do homem no ciclo de vida) de ambientes florestais, desde milhões de anos atrás.

Entre as doenças causadas por protozoário, estão a amebíase ou disenteria amebiana, a úlcera de Bauru, toxoplasmose, doença do sono, giardíase, malária, leishmaniose e doença de Chagas. Não se sabe bem ao certo em que período da história o ciclo silvestre de transmissão destes protozoários passou a ser um ‘problema’ no meio humano. Há, por exemplo, relatos de múmias encontradas no Chile e Peru, com sinais de infecção da doença de Chagas, que datam em 7000 AC a 1500 DC (Figura 1.1).

A tripanossomíase americana, mais conhecida como doença de Chagas, foi descrita pela primeira vez pelo médico sanitário Carlos Chagas em 1909.^[1,2] A doença de Chagas é causada pela infecção do protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* que pertence à ordem Kinetoplastida. Esta ordem inclui o gênero *Leishmania* (causador da Leishmaniose)^[3] e *Trypanosoma*, que também engloba o agente etiológico da doença do sono, o *Trypanosoma brucei*.^[4,5] Na África, o *T. brucei* é o^[6] causador de altas taxas de morbidez e mortalidade. A organização mundial de saúde (OMS) estima que existam 300.000 pessoas infectadas e que 60 milhões estejam vivendo em áreas de risco^[7].

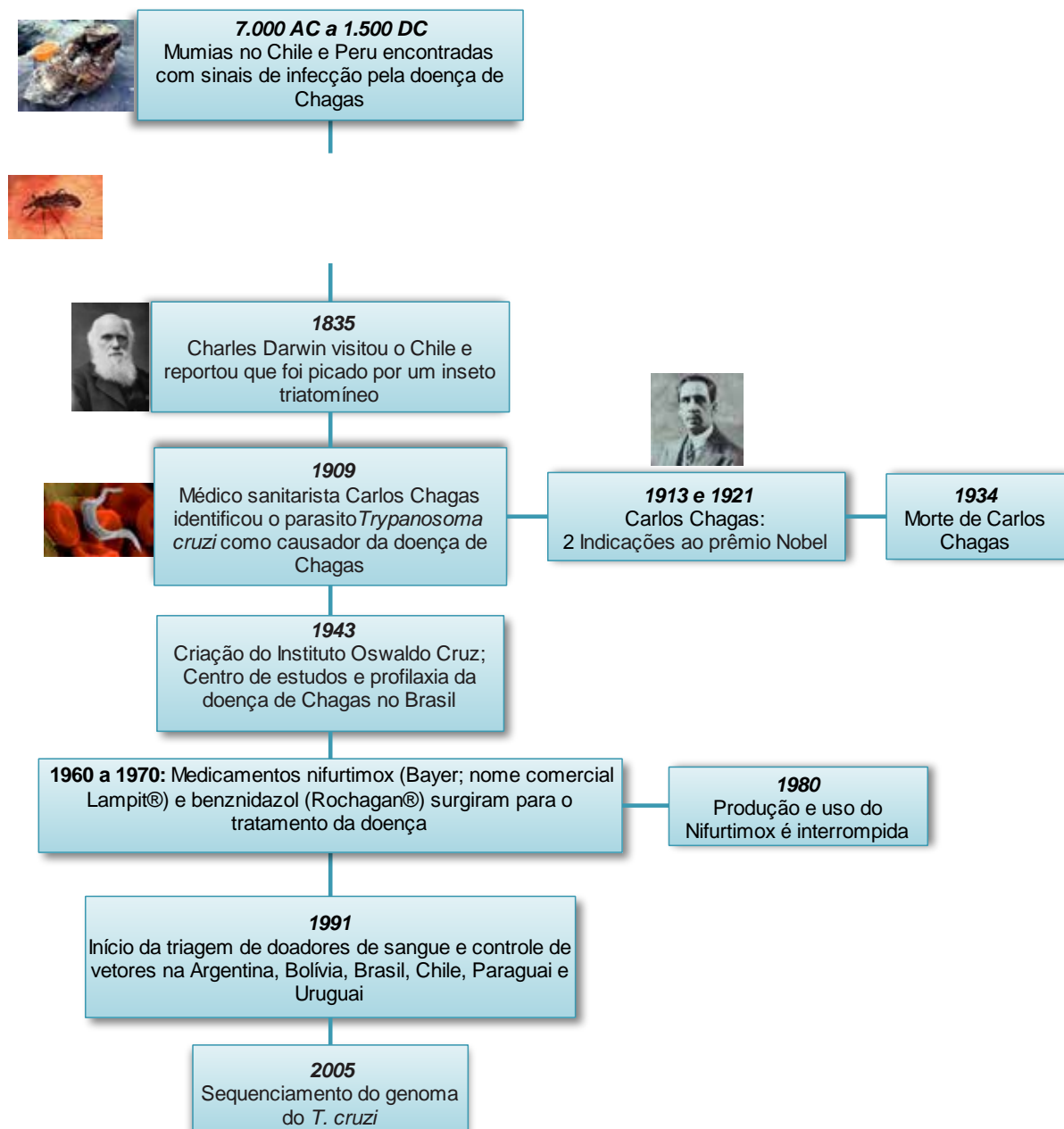


Figura 1.1. Aspectos gerais da história da doença de Chagas. Figura adaptada.^[8]

No Brasil existem atualmente seis espécies de *Leishmania* responsáveis pela doença humana. A leishmaniose visceral (também conhecida como febre negra ou kala-azar na Índia) ^[9,10] é a mais severa, sua transmissão ocorre através do chamado “mosquito da areia”, afetando mais de 12 milhões de pessoas com cerca de 350 milhões em áreas de risco. ^[10] Esta doença acomete principalmente pessoas que vivem em países pobres, se estendendo no continente Americano, Africano e Asiático. Infelizmente,

ainda não existe um tratamento efetivo para o tratamento da leishmaniose e a sua quimioterapia é ineficiente.

Entretanto, desses males, a Doença de Chagas é endêmica em países latino-americanos. ^[11] Porém, devido à crescente emigração de pessoas infectadas para áreas não endêmicas, já são encontrados casos em países como os Estados Unidos (mais de 300.000 pessoas infectadas), Canadá (mais de 5.500 pessoas infectadas) e Austrália (mais de 1.500 pessoas infectadas), Japão (mais de 3.000 pessoas infectadas) e no continente Europeu (mais de 80.000 pessoas infectadas). ^[12]



Figura 1.2. Distribuição geográfica da doença de Chagas. Figura adaptada. ^[12]

1.1.2. Manifestações clínicas

A doença de Chagas apresenta duas fases distintas: a fase aguda e a crônica. A primeira leva a sintomas de febre, anorexia, dilatação do fígado e do baço, inflamações do miocárdio e em casos raros pode levar ao desenvolvimento da meningoencefalite, que é fatal. Esta fase ocorre logo após a infecção pelo parasito. A fase crônica permanece assintomática no período de dez a vinte anos. No entanto, nesta etapa, o parasito se reproduz continuamente no organismo, causando danos irreversíveis em

órgãos como o cérebro e o coração. Após uma ou duas décadas de progressão da doença, há o aparecimento gradual de demência (3% dos casos iniciais), insuficiência cardíaca (em 30% dos casos), dilatação do trato digestivo (megaesôfago ou megacólon, em 6% dos casos) devido à destruição da enervação e das células musculares destes órgãos, as quais são responsáveis pelo tônus muscular. Neste estágio a doença é geralmente fatal. ^[13]

1.1.1. Contaminação e ciclo de vida

A contaminação do homem por meio do inseto vetor ocorre quando o inseto, ao picar a vítima para sugar o sangue, defeca sobre a pele, que então coça o local e assim transfere o parasito para a corrente sanguínea. Outras formas de contaminação são por transfusão sanguínea, via congênita, acidentes de laboratórios, transplante de órgãos e ingestão oral do parasito por alimentos contaminados. ^[1-8] Uma vez dentro da célula do hospedeiro, as formas *tripomastigotas* transformam-se na forma replicativa em humanos, a *amastigota*, que se reproduzem várias vezes antes de voltar à forma *tripomastigota* e serem liberada para as correntes sanguínea e linfática após o rompimento da membrana celular. Uma vez que isto ocorre, o parasito se espalha pelo organismo invadindo novas células e repetindo o processo de replicação (Figura 1.3). ^[14] Enquanto se espalha pelo corpo, carregado pelo sangue, o parasito também fica disponível para transferência ao inseto vetor através da picada e assim seguir novamente seu ciclo no triatomíneo. ^[15]

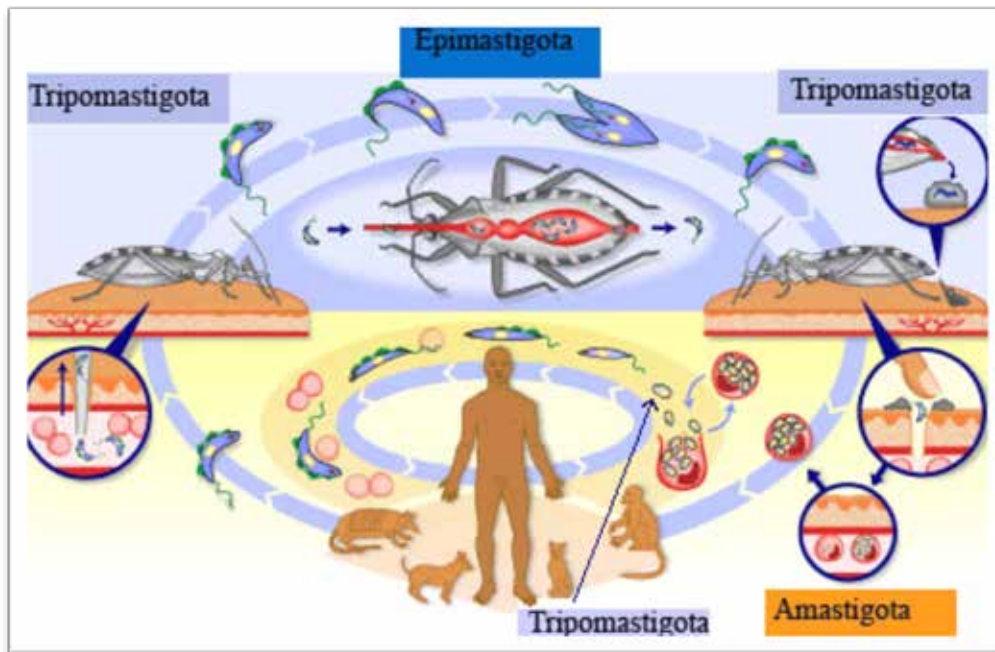


Figura 1.3. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.^[14]

1.1.3. Tratamento

Doenças como a malária, leishmaniose, doença do sono e a doença de Chagas são denominadas como *doenças tropicais negligenciadas*. Apesar de resultarem em elevadas taxas de mortalidade e consequências sociais e econômicas devastadoras, são largamente negligenciadas pela indústria farmacêutica porque afetam principalmente pessoas pobres nos países tropicais. Desse modo, elas são vistas como um mercado pouco atraente para impulsionar investimentos no desenvolvimento de novos fármacos^[16]. Esse termo é apropriado já que dos mais de 1300 fármacos introduzidos para várias indicações terapêuticas entre os anos de 1975 e 1999, somente 13 tinham como alvo as doenças tropicais. Em 2000, somente 0,1% do investimento global em pesquisas na área de saúde foi destinado para a busca de fármacos contra a malária, leishmaniose, tripanosomíases e tuberculose^[17].

Infelizmente, o descaso com a doença de Chagas é ainda mais grave, ao ponto de alguns autores a descreverem como uma doença tropical *super-negligenciada*^[16-18]. Os

únicos fármacos utilizados tratamento da doença (Figura 1.4) foram introduzidos há mais de 40 anos: nifurtimox (Lampit®) e benzonidazol (Rochagan®). Estes dois fármacos são ativos apenas na fase aguda da doença e, além disso, ambos causam sérios efeitos colaterais tais como anorexia, perda de peso, vômito, náusea, diarreia. O nifurtimox, atualmente, não é mais comercializado no Brasil, Argentina, Chile e Uruguai. ^[19]

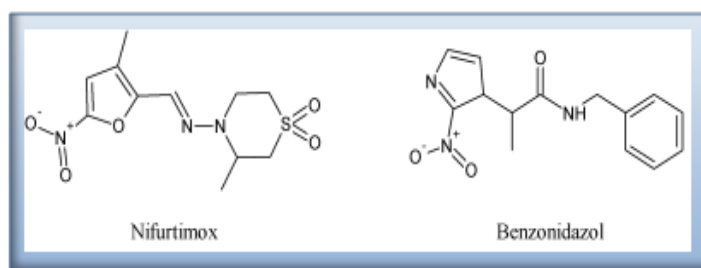


Figura 1.4. Representação das estruturas químicas dos fármacos usados no tratamento da doença de Chagas.

O mecanismo de ação proposto para o nifurtimox e o benzonidazol é através da formação de radicais livres e/ou metabólitos eletrofílicos ^[20,21]. O grupo nitro de ambos os fármacos é reduzido a um grupo amino pela ação de nitroredutases, com a formação de vários radicais livres intermediários e metabólitos eletrofílicos.

Estes fármacos não respeitam os critérios estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde, que descreve que um “bom” fármaco tenha (i) cura parasitológica nas fases aguda e crônica de infecção; (ii) seja efetivo em dose única ou em poucas doses; (iii) seja facilmente acessível ao paciente contaminado; (iv) sem efeitos colaterais ou teratogênicos; (v) sem a necessidade de hospitalização para o tratamento e (v) não induza resistência no agente etiológico. ^[22,23]

O *T. cruzi* forma um grupo geneticamente diverso com cepas que variam quanto a taxa de multiplicação e morfologia. As formas tripomastigotas podem invadir uma variedade de células de mamíferos *in vivo* e *in vitro* incluindo fibroblastos, células

epiteliais, células endoteliais e neurônios, mostrando preferência por células do sistema retículo-endotelial e células musculares.

O genoma do *T. cruzi*, sequenciado em 2005, está sendo estudado amplamente e tem sido demonstrada a presença de centenas de genes que codificam proteínas, muitas com atividade enzimática, que participam dos processos metabólicos essenciais para a sobrevivência do parasito. Estas proteínas podem ser utilizadas para o controle quimioterapêutico das infecções parasitárias.

Nas últimas duas décadas, os novos conhecimentos adquiridos a partir do estudo das vias bioquímicas do *T. cruzi* têm permitido a identificação de uma série de alvos para serem usados no tratamento da doença de Chagas. As enzimas glutationil espermidina sintetase^[24], tripanotona sintetase, farnesilpirofosfato sintase, tripanotona redutase^[25], preniltransferases,^[26] hipoxantina-guanina fosforibosil transferase,^[27] cruzaina, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e diidroorotato desidrogenase (DHODH) têm sido identificadas como potenciais alvos quimioterapêuticos.^[10-26]

As enzimas cruzaina, GAPDH e DHODH estão entre os alvos biomacromoleculares estudados no Grupo de Estudos em Química Medicinal de Produtos Naturais (NEQUIMED-PN). Neste trabalho, dois destes alvos foram estudados e serão descritos nos capítulos seguintes: a enzima TcDHODH e GAPDH.

1.2. Via Glicolítica

A via glicolítica é considerada uma rota promissora para o desenvolvimento de fármacos contra os tripanossomatídeos porque exerce um papel essencial no fornecimento de energia para o parasito, na forma de ATP (Adenosina tri-fosfato) e ocorre em uma organela especializada chamada de glicossomo.^[35] No glicossomo estão presentes sete das dez enzimas que participam da conversão da glicose em piruvato: hexocinase (HK), glicose 6-fosfato-isomerase; 6-fosfofrutocinase (PYK), 1,6-difosfato aldolase (ALD), triosefosfato isomerase (TIM), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e a fosfoglicerato cinase (PGK).

Os alvos mais promissores para o desenvolvimento de fármacos tripanossomicidas foram identificados por Bakker *et al.*, usando modelos matemáticos para calcular quais as etapas da glicólise precisam ser menos inibidas para induzir a inibição de certa quantidade do fluxo glicolítico^[36]. A Tabela 1.1 reporta a porcentagem em que cada enzima da glicólise precisa ser inibida para que o fluxo glicolítico diminua em 50%. A enzima GAPDH exerce papel significativo no controle do fluxo glicolítico. A inibição dessa enzima em 84% provoca a redução do fluxo glicolítico em 50%.

Tabela 1.1. Enzimas envolvidas no controle da glicólise. Inibição leva a uma redução de 50% do fluxo glicolítico.

Enzimas*	Inibição necessária (%)
Transporte de glicose	51
ALD	76
GDH	83
GAPDH	84
PGK	85
HK	93
PFK	93
PYK	97

*ALD, frutose-1,6-difosfato aldolase; GDH, glicerol-3-fosfato desidrogenase; GAPDH, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; PGK, 3-fosfoglicerato cinase; HK, hexocinase; PFK, 6-fosfofruto-cinase; PYK, piruvato cinase

Engel *et al.* mostraram que uma cultura da forma amastigota do *T. cruzi* possui um metabolismo essencialmente glicolítico, e que ela adquire a habilidade de oxidar substratos, tais como aminoácidos, somente após a diferenciação para a forma epimastigota.^[37] A forte dependência dos tripanossomatídeos pela via glicolítica para a obtenção de energia explica o motivo pelo qual as enzimas desta via se tornaram alvos promissores na busca por novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas.^[35-41]

1.3. Via de síntese *de novo* de pirimidinas

Diversos microrganismos que afetam a saúde humana como, por exemplo, a bactéria *Helicobacter pylori* (responsável por úlceras estomacais), o parasito *Plasmodium falciparum* (causador da malária) e também tripanossomatídeos como o *Trypanosoma cruzi* só conseguem obter nucleotídeos de pirimidinas através da via de biossíntese *de novo*.^[38] Assim, as enzimas que participam desta via metabólica são consideradas potenciais alvos para o planejamento de fármacos.^[39]

A síntese de nucleotídeos é essencial para o desenvolvimento de todos e quaisquer organismos. Além de participarem como unidades fundamentais dos ácidos nucléicos, DNA e RNA, os nucleotídeos atuam também como ativadores e inibidores de várias vias do metabolismo intermediário das células.

A enzima diidroorotato desidrogenase (DHODH), que está na quarta etapa da síntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidina, tem sido estudada como um alvo promissor para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos contra parasitoses causadas por tripanossomatídeos.^[40,41] Experimentos de nocaute genético (do termo “*knock out*”, que consiste em bloquear a expressão de um gene específico num organismo) visando a validação da DHODH do *T. cruzi* (TcDHODH) sugerem o papel essencial desta enzima para a sobrevivência do parasito.^[38]

Apesar do potencial da enzima DHODH como alvo terapêutico, apenas a enzima de *Plasmodium falciparum* (PfDHODH) têm sido objeto de vários estudos para o planejamento de inibidores capazes de intervir na via metabólica de síntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidinas e atuarem como agentes quimioterápicos contra a Malária.^[42,43] Alguns desses são baseados em fármacos já disponíveis para o tratamento de artrite reumatóide ou imunossupressivos, os quais têm como alvo a enzima DHODH de humanos (HsDHODH).^[44]

1.4. Referências

- [1] CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Mem. Inst. Osw. Cruz**, v. 1, p. 159-218, 1909.
- [2] BARRET, M. P.; BURCHMORE, R. J. S.; STICH, A.; LAZZARI, J. O.; FRASH, A. C.; CAZZULO, J. J.; KRISHNA, S. The trypanosomiasis. **The Lancet**, v. 362, n. 9394, p. 1469-1480, 2003.
- [3] HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 354, n. 9185, p. 1191-1199, 1999.
- [4] MASLOV, D.; PODLIPAEV, S. A.; LUKES, J. Phylogeny of the kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 3, p. 397-402, 2001.
- [5] BALAKRISHNAN, I.; ZUMLA, A. African trypanosomiasis. In: GILLESPIE, S. H.; PEARSON, R. D. (Eds.). **Principles and practice of clinical parasitology**. Chichester: John Wiley, 2001. p. 315-334.
- [6] MASLOV, D.; PODLIPAEV, S. A.; LUKES, J. Phylogeny of the kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 3, p. 397-402, 2001.
- [7] CAVALLI, A.; BOLOGNESI, M. L. Neglected Tropical Diseases: Multi-Target-Directed Ligands in the Search for Novel Lead Candidates against *Trypanosoma* and *Leishmania*. **J. Med. Chem.**, v. 52, n. 23, p. 7339-7359, 2009.
- [8] CLAYTON, J. Chagas disease 101. **Nat.**, v. 465, n. n7301_supp, p. S4-S5, 2010.
- [9] MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAVIA, N. G. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005.
- [10] HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 354, n. 9185, p. 1191-1199, 1999.
- [11] CAVALLI, A.; BOLOGNESI, M. L. Neglected tropical diseases: multi-target-directed ligands in the search for novel lead candidates against *Trypanosoma* and *Leishmania*. **J. Med. Chem.**, v. 52, n. 23, p. 7339-7359, 2009.
- [12] COURA, J. R.; VINAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 465, n. n7301_supp, p. S6-S7, 2010.
- [13] LINÁRES, G. E.; RAVASCHINO, E. L.; RODRIGUEZ, J. B. Progresses in the field of drug design to combat tropical protozoan parasitic diseases. **Cur. Med. Chem.**, v. 13, n. 3, p. 335-360, 2006.

- [14] Life-cycle of *Trypanosoma cruzi*. Disponível em: <[http:// apps.who.int/tdr/svc/diseases/chagas](http://apps.who.int/tdr/svc/diseases/chagas) >. Acesso em: 27 jan. 2011.
- [15] COURA, J. R.; VINAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*, v. 465, n. n7301_supp, p. S6-S7, 2010.
- [16] MORAN, M.; GUZMAN, J.; ROPARS A. L.; MCDONALD, A.; JAMESON, N.; OMUNE, B.; RYAN, S.; WU, L. Neglected disease research and development: how much are we really spending? **PLoS Med.**, v. 6, n. 2, p. 137-146, 2009.
- [17] PINK, R.; HUDSON, A.; MOURIÈS, M. A.; BENDIG, M. Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 4, n. 9, p. 727-740, 2005.
- [18] MOREL, C. M.; CARVALHEIRO, J. R.; ROMERO, C. N. P.; COSTA, E. A.; BUSS, P. M. The road to recovery. **Nature Biotech.**, v. 449, n. 7159, p. 180-182, 2007.
- [19] PAULINO, M.; IRIBARNE F.; DUBIN, M.; MORALES, S. A.; TAPIA, O.; STOPPANI, A. O. M. The chemotherapy of chagas' disease: an overview. **Mini-rev. Med. Chem.**, v. 5, n. 5, p. 499-519, 2005.
- [20] MORENO, S. N. J.; DOCAMPO, R.; MASON, R. P.; LEÓN, W.; STOPPANI, A. O. Different behaviors of benznidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 218, n. 2, p. 585-591, 1982.
- [21] DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. J. Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Infect. Dis.**, v. 6, n. 2, p. 223-238, 1984.
- [22] COURA, J. R. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy - A proposal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 4, p. 549-554, 2009.
- [23] SOEIRO, M. N. C.; DE CASTRO, S. L. *Trypanosoma cruzi* targets for new chemotherapeutic approaches. **Exp. Opin. Therap. Targ.** v. 13, n. 1, p. 105-121, 2009.
- [24] VERBRUGGEN, C.; DE CRAECKER, S.; RAJAN, P.; JIAO, X. Y.; BORLOO, M.; SMITH, K.; FAIRLAMB, A. H.; HAEMERS, A. Phosphonic acid and phosphinic acid tripeptides as inhibitors of Glutathionylspermidine synthetase. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 6, n. 3, p. 253-258, 1996.
- [25] CUNNINGHAM, M. L.; ZVELEBIL, M. J.; FAIRLAMB, A. H. Mechanism of inhibition of trypanothione reductase and glutathione reductase by trivalent organic arsenicals. **Eur. J. Biochem.**, v. 221, n. 1, p. 285-295, 1994.
- [26] URBINA, J. A.; MORENO, B.; VIERKOTTER, S.; OLDFIELD, E.; PAYARES, G.; SANOJA, C.; BAILEY, B. N.; YAN, W.; SCOTT, D. A.; MORENO, S. N. J.; DOCAMPO, R. *Trypanosoma cruzi* contains major pyrophosphate stores, and its growth in vitro and in vivo is blocked by pyrophosphate analogs. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 47, p. 33609-33615, 1999.
- [27] NAKAJIMA-SHIMADA, J.; HIROTA, Y.; AOKI, T. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth in mammalian cells by purine and pyrimidine analogs. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 40, n. 11, p. 2455-2458, 1996.
- [28] WILLSON, M., SANEJOUAND, Y. H., PERIE, J., HANNAERT, V., OPPERDOES, F. R. Sequencing, modeling, and selective inhibition of *Trypanosoma brucei* hexokinase. **Chem. Biol.**, v. 9, n. 7, p. 839-847, 2002.
- [29] CORDEIRO, A. T.; HARDRÉ, R.; MICHELS, P. A. M.; SALMON, L.; DELBONI, L. F.; THIEMANN, O. H. *Leishmania mexicana* glucose-6-phosphate isomerase: crystallization, molecular-replacement solution and inhibition. **Acta Cryst. B.**, v. D60, n. 5, p. 915-919, 2004.

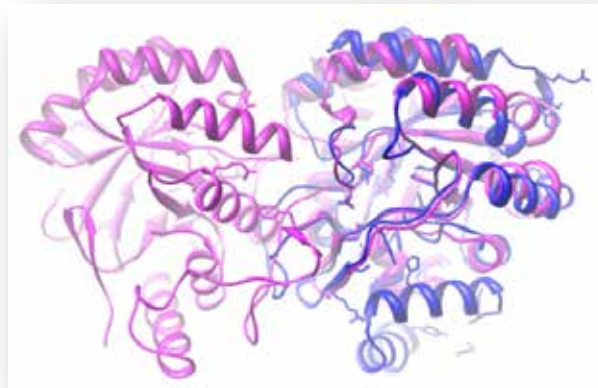
- [30] NYASSE, B.; NONO, J.; SONKE, B.; DENIER, C.; FONTAINE, C. Trypanocidal activity of bergerin, the major constituent of *Flueggea virosa*, on *Trypanosoma brucei*. **Pharmazie**, v. 59, n. 6, p. 492-494, 2004.
- [31] CLAUSTRE, S.; DENNIER, C.; GHAZAL, F. L.; LOUGARE, A.; LOPEZ, C.; CHEVALIER, N.; MICHELS, P. A. M.; PERRIE, J.; WILSON, M. Exploring the active site of *Trypanosoma brucei* phosphofructokinase by inhibition studies: specific irreversible inhibition. **Biochem.**, v. 41, n. 32, p. 10183-10193, 2002.
- [32] DAX, C.; DUFFIEUX, F.; CHABOT, N.; COINCON, M.; SYGUSCH, J.; MICHELS, P. A. M.; BLONSKI, C. Selective irreversible inhibition of fructose 1,6-bisphosphate aldolase from *Trypanosoma brucei*. **J. Med. Chem.**, v. 49, n. 5, p. 1499-14502, 2006.
- [33] ILLANA, V. O.; MONTFORT, R. P.; CALAHORRA, F. L.; COSTAS, M.; ROMERO, A. R.; PUYOU, M. T. G.; PUYOU, A. G. Structural differences in triosephosphate isomerase from different species and discovery of a multitypanosomatid inhibitor. **Biochem.**, v. 45, n. 8, p. 2556-2560, 2006.
- [34] BRESSI, J. C.; CHOE, J.; HOUGH, M. T.; BUCKNER, F. S.; VOORHIS, W. C. V.; VERLINDE, C. L. M. J.; HOL, W. G. J.; GELB, M. H., Adenosine analogues as inhibitors of *Trypanosoma brucei* phosphoglycerate kinase: elucidation of a novel binding mode for a 2-amino-N(6)-substituted adenosine. **J. Med. Chem.**, v. 43, n. 22, p. 4135-4150, 2000.
- [35] VERLINDE, C. L. M. J.; HANNAERT, V.; BLONSKI, C.; WILLSON, M.; PÉRIÉ, J. J.; FOTHERGILL-GILMORE, L. A.; OPPERDOES, F. R.; GELB, M. H.; HOL, W. G. J.; MICHELS, P. A. M. Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs. **Drug Resist. Updates**, v. 4, n. 1, p. 50-65, 2001.
- [36] BAKKER, B. M.; MICHELS, P. A. M.; OPPERDOES, F. R.; WESTERHOLFF, H. V. What controls glycolysis in bloodstream form *Trypanosoma brucei*? **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 21, p. 14551-14559, 1999.
- [37] ENGEL, J. C.; CAZZULO, B. M. F.; STOPPANI, A. O. M.; CANNATA, J. J. B.; CAZZULO, J. J. Aerobic glucose fermentation by *Trypanosoma cruzi* axenic culture amastigote-like forms during growth and differentiation to epimastigotes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 26, n. 1, p. 1-10, 1987.
- [38] ANNOURA, T.; NARA, T.; MAKIUCHI, T.; HASHIMOTO, T.; AOKI, T. The Origin of Dihydroorotate Dehydrogenase Genes of Kinetoplastids, with Special Reference to Their Biological Significance and Adaptation to Anaerobic, Parasitic Conditions. **J. Mol. Evolution**, v. 60, n. 1, p. 113-127, 2005.
- [39] CHRISTOPHERSON, R. I.; LYONS, S. D.; WILSON, P. K. Inhibitors of de novo nucleotide biosynthesis as drugs. **Acc. Chem. Res.**, v. 35, n. 11, p. 961-971, 2002.
- [40] CORDEIRO, A. T.; FELICIANO, P. R.; NONATO, M. C. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of *Leishmania major* dihydroorotate dehydrogenase. **Acta Crystal. Section F**, v. 62, n. 10, p. 1049-1051, 2006.
- [41] ARAKAKI, T. L.; BUCKNER, F. S.; GILLESPIE, J. R.; MALMQUIST, N. A.; PHILLIPS, M. A.; KALYUZHNIY, O.; LUFT, J. R.; DETITTA, G. T.; VERLINDE, C. L. M. J.; VOORHIS, W. C. V.; HOL, W. G. J.; MERRITT, E. A. Characterization of *Trypanosoma brucei* dihydroorotate dehydrogenase as a possible drug target; structural, kinetic and RNAi studies. **Mol. Microbiol.**, v. 68, n. 1, p. 37-50, 2008.
- [42] HEIKKILA, T.; RAMSEY, C.; DAVIES, M.; GALTIER, C.; STEAD, A. M. W.; JOHNSON, A. P.; FISHWICK, C. W. G.; BOA, A. N.; MCCONKEY, G. A. Design and synthesis of potent Inhibitors of the malaria parasite dihydroorotate dehydrogenase. **J. Med. Chem.**, v. 50, n. 2, p. 186-191, 2006.

[43] HURT, D. E.; WIDOM, J.; CLARDY, J. Structure of Plasmodium falciparum dihydroorotate dehydrogenase with a bound inhibitor. **Acta Crystal. Section D**, v. 62, n. 3, p. 312-323, 2006.

[44] LIU, S.; NEIDHARDT, E. A.; GROSSMAN, T. H.; OCAIN, T.; CLARDY, J. Structures of human dihydroorotate dehydrogenase in complex with antiproliferative agents. **Struct. Fold. Design**, v. 8, p. 25-33, 2000.

Capítulo 2

Alvos enzimáticos



A enzima diidroorotato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi* (TcDHODH) e de *Leishmania major* (LmDHODH) são os alvos biomacromoleculares amplamente estudados neste trabalho. Já a contribuição deste trabalho com relação à enzima gliceraldeído-3-fostato desidrogenase (GAPDH) envolve os aspectos da elaboração e padronização de um novo protocolo de expressão genética, para obtenção da proteína para a realização de ensaios bioquímicos. Nesse contexto, serão apresentadas informações a respeito da via metabólica, reação e o mecanismo destas duas enzimas, assim como da sua estrutura cristalográfica.

2. ALVOS ENZIMÁTICOS

2.1. Enzima Diidroorotato desidrogenase

2.1.1. Localização e estrutura

De acordo com a estrutura primária e localização celular, as enzimas diidroorotato desidrogenases (DHODHs E.C. 1.3.3.1) de diferentes organismos podem ser divididas em duas Classes, 1 e 2. ^[1] As enzimas da Classe 1 podem ser subdivididas nas sub Classes 1A, 1B, conforme Figura 2.1.

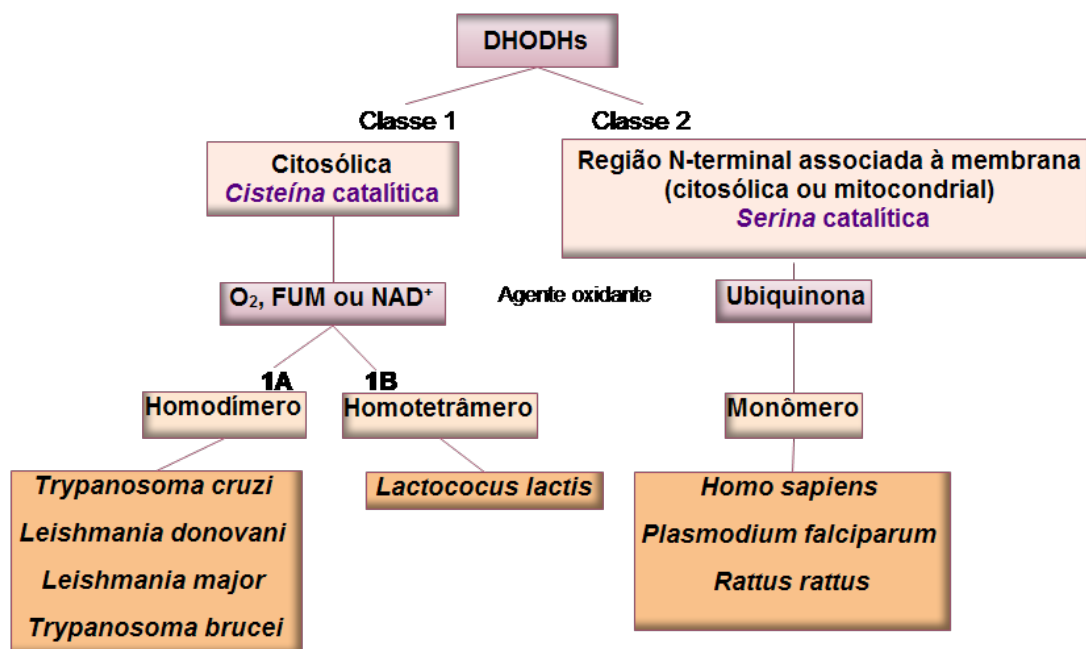


Figura 2.1. Classificação das DHODHs conforme sua estrutura, localização celular, substrato e estado de oligomerização.

Enquanto as proteínas membros das Classes 1 são citosólicas, com massa molecular de aproximadamente 34 kDa, as DHODHs da Classe 2 apresentam uma extensão na região N-terminal que permite a associação dessas enzimas com membranas. ^[2] No alinhamento da cadeia de aminoácidos a identidade sequencial entre as enzimas da Classe 1 e 2 é menor que 20%.

Outra diferença entre as duas famílias de enzimas diz respeito ao aceitador natural de elétrons utilizado na reoxidação do cofator flavina mononucleotídeo (FMN). As enzimas da Classe 1 utilizam como receptores de elétrons o oxigênio, fumarato (FUM) ou a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺). Já as enzimas da Classe 2 utilizam moléculas com características mais hidrofóbicas, como a ubiquinona.^[2,3] Nas DHODHs da Classe 1, como resíduo catalítico a cisteína, enquanto que na Classe 2 este resíduo é substituído por uma Serina.^[8]

Uma característica importante das DHODHs da Subclasse 1A é o fato de o sítio catalítico estar enterrado dentro de cada unidade monomérica e encoberto por uma alça bastante flexível composta pelos resíduos 128-135, chamada de *alça ativa* ou *loop β 4- α 4*, que abre e fecha para permitir a entrada dos substratos e saída dos produtos do sítio. Preso nesta cavidade (por interações de ligação de hidrogênio), próximo ao sítio catalítico, encontra-se o grupo prostético flavina mononucleotídeo (FMN), o qual possui graus de liberdade conformacionais bastante restrito devido a interações bastante específicas com o sítio.^[3-5]

A forma planar do anel de oxazolidina do cofator FMN permite o posicionamento paralelo com o anel pirimidínico do substrato diidroorotato (DHO) e do produto de reação, orotato (ORO), sem alterar significativamente a conformação da cadeia polipeptídica que circunda a região do sítio. Na Figura 2.2 é mostrada uma representação desse emparelhamento das moléculas dentro do sítio onde é possível observar que a cisteína catalítica (Cys130) se posiciona paralelamente ao substrato, a qual favorece a retirada dos hidrogênios dos carbonos C₅ e C₆ do substrato DHO e transferência aos carbonos C₂ e C₃ do substrato FUM durante a catálise.^[1-4]

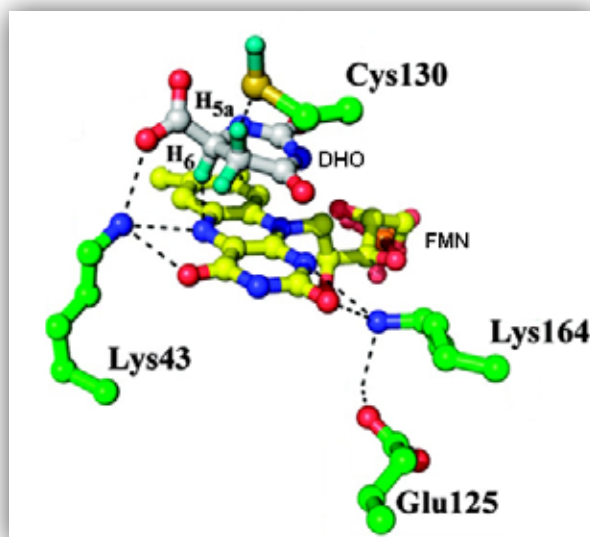


Figura 2.2. Posicionamento do substrato DHO (em cinza) e do FMN (em amarelo) dentro do sítio ativo da TcDHODH.

Várias estruturas cristalográficas de DHODHs pertencentes a diferentes organismos têm sido determinadas através de cristalografia de raios X, como por exemplo (código do Banco de dados de Proteínas, PDB): 2E6F (*Trypanosoma cruzi*), 3C61 (*Leishmania donovani*), 1JUE (*Lactococcus lactis*), 2B4G (*Trypanosoma brucei*), 1EP3 (*Lactococcus lactis*), 2FPV (*Homo sapiens*), 3FJ6 (*Plasmodium falciparum*) e 1UUM (*Rattus rattus*).^[4-8]

Em geral, as enzimas de ambas as classes apresentam uma estrutura terciária similar, enovelando-se em um motivo barril α/β que consiste de uma região central formada por 8 fitas beta paralelas rodeadas por 8 α -hélices (Figura 2.3).

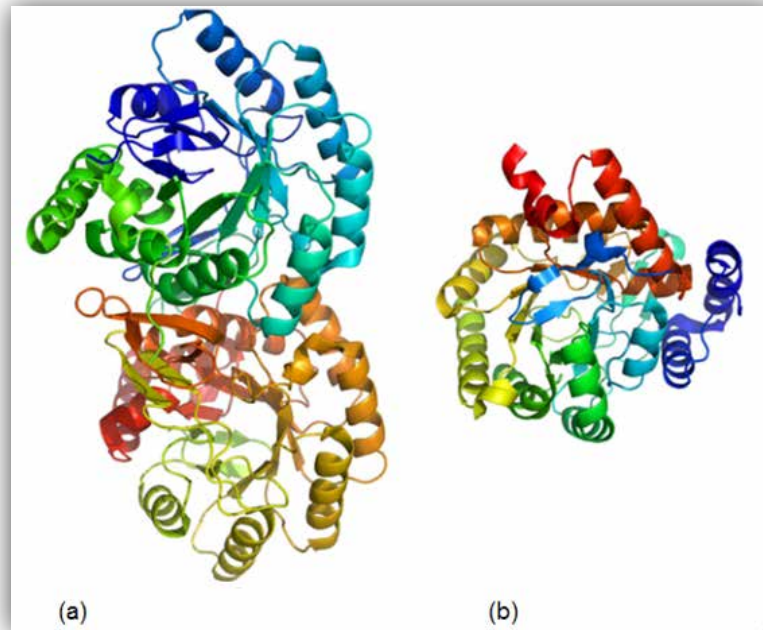


Figura 2.3. Estruturas tridimensionais de DHODHs pertencentes às classes 1 e 2. (a) LmDHODH e (b) HsDHODH. Ambas as proteínas enovelam-se um motivo do tipo barril α/β . A TcDHODH é dimérica enquanto HsDHODH é monomérica.

No topo do barril, três fitas β antiparalelas formam uma espécie de “tampa” que recobre o sítio catalítico. O fundo do barril é formado um par de fitas β antiparalelas. As enzimas pertencentes à Classe 2 contêm na região N-terminal um motivo adicional composto de três hélices, responsável pela interação desta com a membrana, e que se encontra ausente na estrutura de DHODHs da Classe 1. Além disso, DHODHs da Classe 2 apresentam um longa alça que conecta uma das α -hélices do N-terminal ao fundo do barril.

2.1.2. Reação e mecanismo

A biossíntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidina é composta de seis enzimas: carbamil fosfato sintetase, aspartato transcarbamilase, diidroorotase, diidroorotato desidrogenase, orotato fosforibosil transferase e orotodilato descarboxilase. O produto resultante de cada reação enzimática é utilizado como substrato pela enzima subsequente da via. ^[10-14]

Durante a catálise, a DHODH utiliza cofator FMN na primeira semi-reação para promover a oxidação do substrato diidroorotato (DHO) enquanto FMN é reduzido. No caso da enzima DHODH de tripanosomatídeos como *Trypanosoma cruzi* (TcDHODH) e *Leishmania major* (LmDHODH), o fumarato (FUM) é o agente oxidante, Fig. 2.4.^[9] Na segunda semi-reação, FMN é reoxidado através do auxílio do FUM, segundo um mecanismo enzimático do tipo *ping-pong*. Essa é à única etapa de oxido-redução da via.

[10,11]

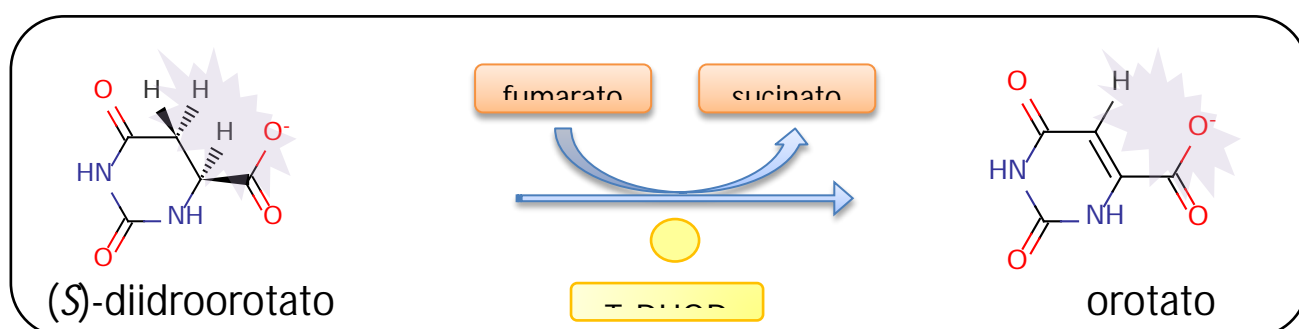


Figura 2.4. Reação de óxido-redução catalisada pela enzima TcDHODH.

Nos últimos anos o mecanismo da reação catalisada pela DHODH tem sido bastante estudado, tanto com base em análises cinéticas quanto estruturais. Sendo que o mecanismo detalhado de toda a reação da TcDHODH foi proposto recente.^[12-22]

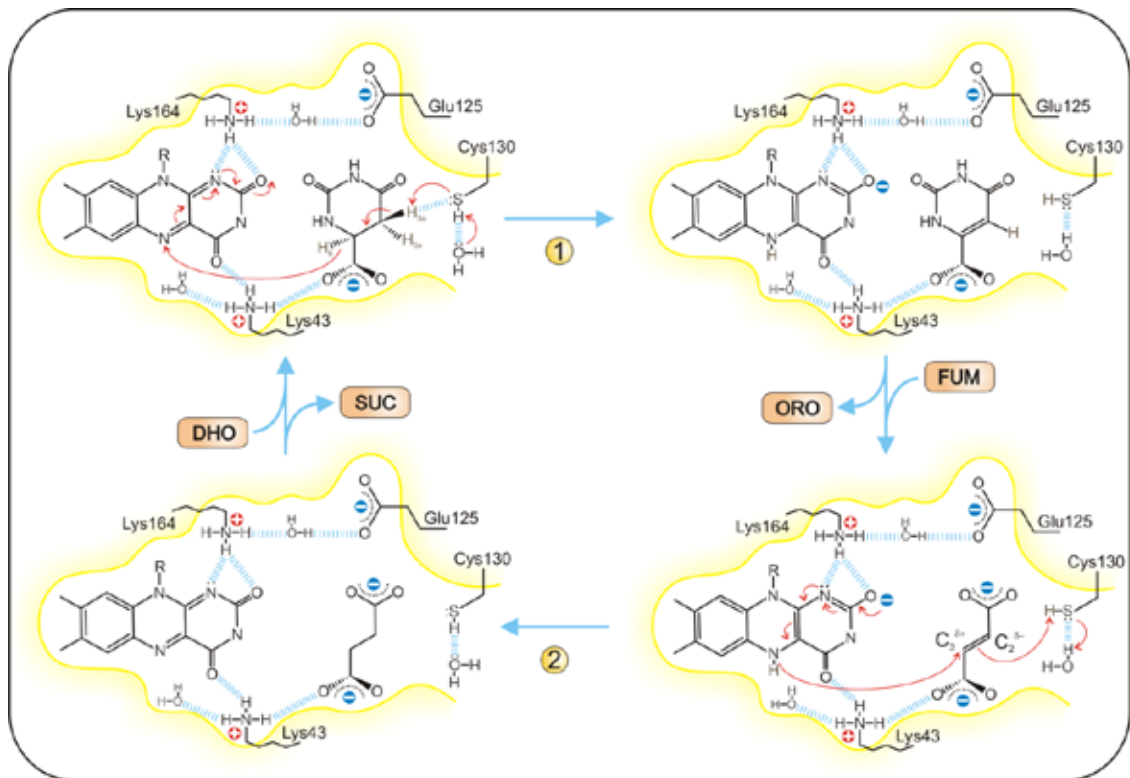


Figura 2.5. Mecanismo da reação catalisada pela enzima TcDHODH. (1) Primeira semi-reação: DHO é convertido a ORO através da abstração do próton (H_{5a}) pela Cys130 e a transferência do hidreto (H₆) ao nitrogênio N₅ do FMN. (2) Segunda semi-reação: a transferência de um hidreto (H⁻) pelo FMN aniônico e de um próton pela Cys130 ao agente oxidante (FUM).

A cisteína catalítica (Cys130) abstrai um próton do carbono-5 (C₅) do substrato DHO. Juntamente com a abstração deste próton, o DHO transfere um hidrogênio (H₆) na forma de hidreto, ao nitrogênio N₅ do cofator FMN. Este processo de redução ocorre enquanto a carga negativa do FMN aniônico reduzido (FMNH⁻) é estabilizada pelos resíduos de aminoácidos Lys43 e Lys164. Em seguida o produto da primeira semi-reação orotato (ORO) deixa o sítio ativo para a entrada do agente oxidante fumarato (FUM), Figura 2.5. Na segunda semi-reação, a redução do substrato FUM a SUC, há a transferência de um hidreto ao carbono C₃^{δ+} do FUM pelo nitrogênio N₅ do FMNH⁻ e de um próton da Cys130 ao carbono C₂^{δ-}. Ao final desta etapa o sítio fica novamente disponível para a entrada de outra molécula de substrato e um novo ciclo da catálise.

2.1.3. Inibidores

Vários inibidores focando o sítio de interação da ubiquinona (substrato das DHODH da Classe 2) têm sido planejados principalmente para a enzima DHODH de humanos. Por exemplo, o pró-fármaco *leflunomida* (com o nome comercial de ARAVA® da Sanofi-Aventis) (a) está disponível para uso clínico para o tratamento de artrite reumatóide, Fig. 2.6. ^[2]

As substâncias 3,4- e 3,5-hidroxibenzoato são conhecidas como inibidores da Classe 1 das DHODHs (Figura 2.6 (b)), identificados por Palfey *et al.* e recentemente estudados como inibidores da DHODH de *Lactococcus lactis* através de métodos calorimétricos e espectroscópicos para avaliar o efeito do pH nas suas afinidades pelo alvo.^[23,24] Outro inibidor descrito na literatura é o próprio produto de reação, orotato (ORO) e uma molécula muito semelhante, o oxonato (OXO).^[12,25] Porém, não há relatos na literatura sobre planejamento ou teste de inibidores da TcDHODH com o objetivo de desenvolvimento de candidatos a fármacos para o tratamento da Doença de Chagas.

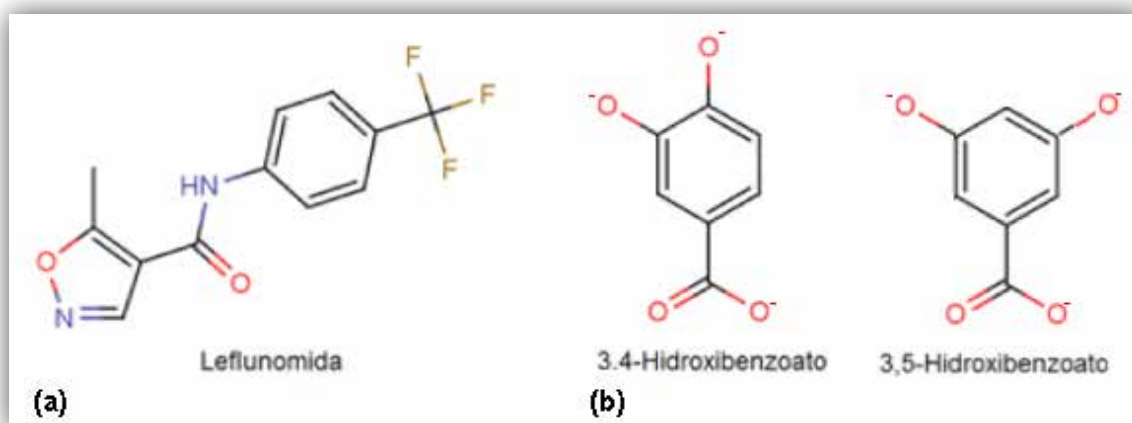


Figura 2.6. Estrutura dos inibidores das DHODHs. (a) Fármaco *leflunomida*, que tem como alvo a enzima de humanos, utilizado no tratamento de artrite reumatóide; (b) Substâncias 3,4- e 3,5-hidroxibenzoato são inibidores da Classe 1.

2.2. Enzima Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

Esta enzima está na sexta reação da glicólise: a fosforilação oxidativa do D-gliceraldeído-3-fosfato (G3P) para 1,3-bisfosfoglicerato (1,3-BPG) (Figura 2.7).^[26] As formas infectantes de *T. cruzi* (tripomastigotas) são altamente dependentes da via glicolítica para produção de ATP. Estas informações levam a considerar a enzima GAPDH como um alvo atraente para a descoberta e desenvolvimento de novos inibidores enzimáticos como candidatos potenciais a fármacos antichagásicos.

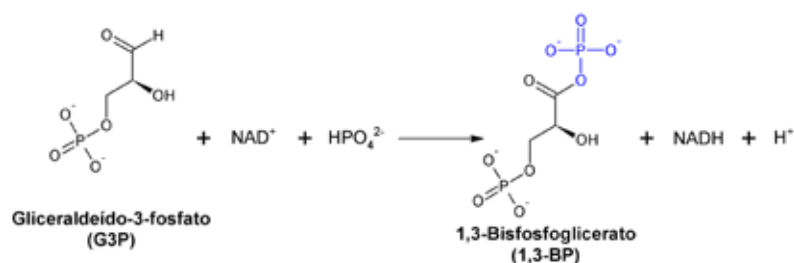


Figura 2.7. Reação da enzima GAPDH: fosforilação oxidativa do D-gliceraldeído-3-fosfato (G3P) para 1,3-bisfosfoglicetato (1,3-BPG).

A enzima GAPDH consiste de um homotetrâmero com massa molecular de aproximadamente 156 kDa onde cada subunidade do tetrâmero é composta por dois domínios: o domínio de ligação do NAD^+ , na extremidade N-terminal, e o domínio catalítico.^[27]

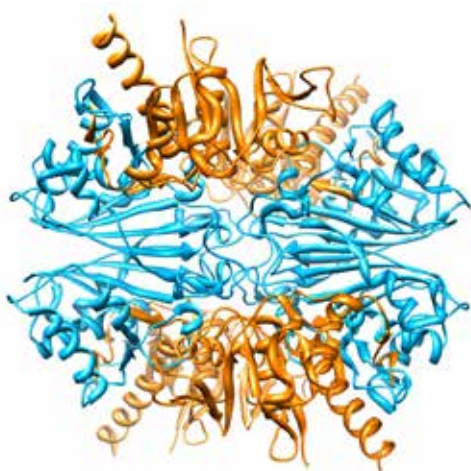


Figura 2.8. Estrutura da enzima GAPDH. Domínio do cofator NAD^+ (laranja) e catalítico (azul). Figura gerada com o programa Chimera.^[28]

Várias classes de moléculas foram testadas contra essa enzima, mas nenhuma ainda se mostrou muito promissora. Dentre essas classes podem-se citar as cumarinas, flavonóides, análogos de nucleosídeos e análogos do 1,3-BPG.^[29-33]

2.3. Referências

- [1] BJORNBERG, O.; ROWLAND, P.; LARSEN, S.; JENSEN, K. F. Active site of dihydroorotate dehydrogenase A from *Lactococcus lactis* Investigated by chemical modification and mutagenesis. **Biochem.**, v. 36, n. 51, p. 16197-16205, 1997.
- [2] LIU, S.; NEIDHARDT, E. A.; GROSSMAN, T. H.; OCAIN, T.; CLARDY, J. Structures of human dihydroorotate dehydrogenase in complex with antiploriferative agents. **Struct. Fold. & Des.**, v. 8, p. 25-33, 2000.
- [3] BJORNBERG, O.; GRUNER, A.-C.; ROEPSTORFF, P.; JENSEN, K. F. The Activity of *Escherichia coli* dihydroorotate dehydrogenase is dependent on a conserved loop identified by sequence homology, mutagenesis, and limited proteolysis. **Biochem.**, v. 38, n. 10, p. 2899-2908, 1999.
- [4] ROWLAND, P.; NORAGER, S.; JENSEN, K. F.; LARSEN, S. Crystallization and preliminary X-ray studies of membrane-associated *Escherichia coli* dihydroorotate dehydrogenase. **Acta Crystal. Section D**, v. 56, n. 5, p. 659-661, 2000.
- [5] ROWLAND, P.; BJORNBERG, O.; NIELSEN, F. S.; JENSEN, K. F.; LARSEN, S. The crystal structure of *Lactococcus lactis* dihydroorotate dehydrogenase A complexed with the enzyme reaction product throws light on its enzymatic function. **Prot. Sci.**, v. 7, n. 6, p. 1269-1279, 1998.
- [6] ARAKAKI, T. L.; BUCKNER, F. S.; GILLESPIE, J. R.; MALMQUIST, N. A.; PHILLIPS, M. A.; KALYUZHNIY, O.; LUFT, J. R.; DETITTA, G. T.; VERLINDE, C. L. M. J.; VOORHIS, W. C. V.; HOL, W. G. J.; MERRITT, E. A. Characterization of *Trypanosoma brucei* dihydroorotate dehydrogenase as a possible drug target; structural, kinetic and RNAi studies. **Mol. Microb.**, v. 68, n. 1, p. 37-50, p. 37-50, 2008.
- [7] HANSEN, M.; NOURS, J. L.; JOHANSSON, E.; ANTAL, T.; ULLRICH, A.; LÖFFLER, M.; LARSEN, S. Inhibitor binding in a class 2 dihydroorotate dehydrogenase causes variations in the membrane-associated N-terminal domain. **Prot. Sci.**, v. 13, n. 4, p. 1031-1042, 2004.
- [8] DAVIES, M.; HEIKKILA, T.; MCCONKEY, G. A.; FISHWICK, C. W. G.; PARSONS, M. R.; JOHNSON, A. P. Structure-based design, synthesis, and characterization of inhibitors of human and *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenases. **J. Med. Chem.**, v. 52, n. 9, p. 2683-2693, 2009.
- [9] TAKASHIMA, E.; INAOKA, D. K.; OSANAI, A.; NARA, T.; ODAKA, M.; AOKI, T.; INAKA, K.; HARADA, S.; KITA, K. Characterization of the dihydroorotate dehydrogenase as a soluble fumarate reductase in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasit.**, v. 122, n. 2, p. 189-200, 2002.
- [10] LEHNINGER, A.L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Biosynthesis of amino acids, nucleotides, and related molecules. In: NELSON, D. L.; COX, M. M. (Ed.). **Lehninger – Principles of Biochemistry**. 4. ed. New York: W. H. Freeman, 2004. 862-880.
- [11] FELICIANO, P. R.; CORDEIRO, A. T.; COSTA-FILHO, A. J.; NONATO, M. C. Cloning, expression, purification, and characterization of *Leishmania major* dihydroorotate dehydrogenase. **Prot. Express. Purif.**, v. 48, n. 1, p. 98-103, 2006.

- [12] CHELESKI, J.; WIGGERS, H. J.; CITADINI, A. P.; DA COSTA FILHO, A. J.; NONATO, M. C.; MONTANARI, C. A. Kinetic mechanism and catalysis of *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase enzyme evaluated by isothermal titration calorimetry. **Anal. Biochem.**, v. 399, p. 13-22, 2010.
- [13] BJÖRNBERG, O.; JORDAN, D. B.; PALFEY, B. A.; JENSEN, K. F. Dihydrooxonate Is a Substrate of Dihydroorotate Dehydrogenase (DHOD) Providing evidence for involvement of cysteine and serine residues in base catalysis. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 391, n. 2, p. 286-294, 2001.
- [14] FAGAN, R. L.; JENSEN, K. F.; BJÖRNBERG, O.; PALFEY, B. A. Mechanism of flavin reduction in the class 1A dihydroorotate dehydrogenase from *Lactococcus lactis*. **Biochem.**, v. 46, n. 13, p. 4028-4036, 2007.
- [15] FAGAN, R. L.; NELSON, M. N.; PAGANO, P. M.; PALFEY, B. A. Mechanism of Flavin Reduction in Class 2 Dihydroorotate Dehydrogenases. **Biochem.**, v. 45, n. 50, p. 14926-14932, 2006.
- [16] JORDAN, D. B.; BISAHA, J. J.; PICOLLELLI, M. A. Catalytic Properties of Dihydroorotate Dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*: Studies on pH, Alternate Substrates, and Inhibitors. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 378, n. 1, p. 84-92, 2000.
- [17] MARCINKEVICIENE, J.; JIANG, W.; LOCKE, G.; KOPCHO, L. M.; ROGERS, M. J.; COPELAND, R. A. A second dihydroorotate dehydrogenase (Type A) of the human pathogen enterococcus faecalis: expression, purification, and steady-state kinetic mechanism. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 377, n. 1, p. 178-186, 2000.
- [18] ROWLAND, P.; NIELSEN, F. S.; JENSEN, K. F.; LARSEN, S. The crystal structure of the flavin containing enzyme dihydroorotate dehydrogenase A from *Lactococcus lactis*. **Structure.**, v. 5, n. 2, p. 239-252, 1997.
- [19] ROWLAND, P.; NØRAGER, S.; JENSEN, K. F.; LARSEN, S. 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, 2000.
- [20] NØRAGER, S.; ARENT, S.; BJÖRNBERG, O.; OTTOSEN, M.; LEGGIO, L. L.; JENSEN, K. F.; LARSEN, S. *Lactococcus lactis* dihydroorotate dehydrogenase A mutants reveal important facets of the enzymatic function. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 31, p. 28812-28822, 2003.
- [21] ROWLAND, P.; LARSEN, S.; BJÖRNBERG, O.; NIELSEN, F. S.; JENSEN, K. F. The crystal structure of *Lactococcus lactis* dihydroorotate dehydrogenase A complexed with the enzyme reaction product throws light on its enzymatic function. **Prot. Sci.**, v. 7, n. 6, p. 1269-1279, 1998.
- [22] INAOKA, D. K.; SAKAMOTO, K.; SHIMIZU, H.; SHIBA, T.; KURISU, G.; NARA, T.; AOKI, T.; KITA, K.; HARADA, S. Structures of *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase complexed with substrates and products: atomic resolution insights into mechanisms of dihydroorotate oxidation and fumarate reduction. **Biochem.**, v. 47, n. 41, p. 10881-10891, 2008.
- [23] PALFEY, B. A.; BJORNBERG, O.; JENSEN, K. F. Specific inhibition of a family 1A dihydroorotate dehydrogenase by benzoate pyrimidine analogues. **J. Med. Chem.**, v. 44, n. 18, p. 2861-2864, 2001.
- [24] WOLFE, A. E.; THYMARK, M.; GATTIS, S. G.; FAGAN, R. L.; HU, Y.-C.; JOHANSSON, E.; ARENT, S.; LARSEN, S.; PALFEY, B. A. Interaction of benzoate pyrimidine analogues with class 1A dihydroorotate dehydrogenase from *Lactococcus lactis*. **Biochem.**, v. 46, n. 19, p. 5741-5753, 2007.
- [25] BJÖRNBERG, O.; JORDAN, D. B.; PALFEY, B. A.; JENSEN, K. F. Dihydrooxonate Is a substrate of dihydroorotate dehydrogenase (DHOD) providing evidence for involvement of cysteine and serine residues in base catalysis. **Archiv. Biochem. Biophys.**, v. 391, n. 2, p. 286-294, 2001.

- [26] GARRET, R. H.; GRISHAM, C. M. Glycolysis. In: **BIOCHEMISTRY**, London: Hardcover, 1999. p. 609-638.
- [27] SOUZA, D. H. F.; GARRATT, R. C.; ARAÚJO, A. P. U.; GUIMARÃES, B. G.; JESUS, W. D. P.; MICHELS, P. A. M.; HANNAERT, V.; OLIVA, G. Trypanosoma cruzi glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: structure, catalytic mechanism and targeted inhibitor design. **FEBS Lett.**, v. 424, n. 3, p. 131-135, 1998.
- [28] PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S.; GREENBLATT, D. M.; MENG, E. C.; FERRIN, T. E. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. **J. Comp. Chem.**, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.
- [29] MORAES, V. R. S. *et al.* Enzymatic inhibition studies of selected flavonoids and chemosystematic significance of olmethoxylated flavonoids and quinoline alkaloids in neoraputia (Rutaceae). **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 14, n. 3, p. 380-387, 2003.
- [30] JANUARIO, A. H., LOURENCO, M. V., DOMEZIO, L. A., PIETRO, R. C. L. R., CASTILHO, M. S., TOMAZELA, D. M., FERNANDES DA SILVA, M. F. D. G., VIEIRA, P. C., FERNANDES, J. B., FRANCA, S. D. C., Isolation and structure determination of bioactive isoflavones from callus culture of *Dipteryx odorata*. **Chem. Pharm. Bull**, v. 53, n. 7, p. 740-742, 2005.
- [31] TOMAZELA, D. M.; PUPO, M. T.; PASSADOR, E. A. P.; DA SILVA, M. F. D. G. F.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; RODRIGUES FO, E.; OLIVA, G.; PIRANI, J. R. Pyrano chalcones and a flavone from *Neoraputia magnífica* and their *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-inhibitory activities. **Phytochem.**, v. 55, n. 6, p. 643-651, 2000.
- [32] FREITAS, R. F.; PROKOPCZYK, I. C.; ZOTTIS, A.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D.; TREVISAN, M. T. S.; VILEGAS, W.; SILVA, M. G. V.; MONTANARI, C. A. Discovery of novel *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibitors. **Bio. Med. Chem.**, v. 17, n. 6, p. 2476-2482, 2009.
- [33] VIEIRA, P. C.; MAFEZOLI, J.; PUPO, M. T.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; ALBUQUERQUE, S.; OLIVA, G.; PAVÃO, F. Strategies for the isolation and identification of trypanocidal compounds from the Rutales. **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 3, p. 617-622, 2001.

Capítulo 3

Planejamento de fármacos



Neste capítulo são abordados os aspectos fundamentais da química medicinal no planejamento de fármacos, com o uso de métodos em quiminformática: ferramenta capaz de “navegar” pelo espaço químico para que seja possível a identificação de substâncias bioativas.

3. QUÍMICA MEDICINAL

3.1. Descoberta de fármacos

O objetivo da química medicinal é a identificação de novas estruturas químicas com potencial uso terapêutico, tanto para alvos macromoleculares já conhecidos e validados, quanto para novos alvos biológicos. Pelo lado retrospectivo, a química medicinal também inclui o estudo dos fármacos existentes, suas propriedades farmacológicas e suas relações estrutura-atividade biológica. ^[1] Segundo a definição oficial dada pela IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada): “*a química medicinal é uma disciplina baseada na química, também envolvendo aspectos das ciências biológicas, médica e farmacêutica. Seu interesse está na invenção, descoberta, desenvolvimento, identificação e preparação de compostos biologicamente ativos, o estudo de seu metabolismo, a interpretação de seu modo de ação ao nível molecular e a construção de relações estrutura-atividade*” ^[2].

O processo de descoberta e desenvolvimento de um fármaco é dividido em duas grandes fases: (i) fase pré-clínica (descoberta e otimização) e (ii) fase clínica (desenvolvimento), ^[1] Figura 3.1.

Nas primeiras etapas da fase pré-clínica, há a identificação da necessidade de uma nova terapia, ou adequação dos tratamentos existentes, juntamente com a avaliação do conhecimento sobre a doença alvo. Juntamente há a identificação e validação do alvo terapêutico (receptor, enzima, canal iônico, proteínas de membrana, DNA/RNA ou modelo celular). A correta identificação e seleção do alvo é a primeira etapa importante para o sucesso de um projeto em química medicinal. ^[3] Em seguida vem à identificação (ou descoberta) de substâncias ativas que interajam com o alvo selecionado. Os passos subsequentes incluem a identificação de substâncias químicas que apresentem atividade

biológica *in vitro* relevante, denominadas ligantes (do inglês, *hits*), e o teste de moléculas análogas em modelos biológicos apropriados.

A identificação de substâncias químicas bioativas pode-se iniciar com um banco de dados com uma grande quantidade de moléculas (da ordem de milhões), o qual será reduzido, por meio de triagem computacional (estudos *in silico*), a um banco com alguns milhares de moléculas. A identificação de esqueletos químicos, contidos nas moléculas de interesse, poderá resultar na seleção de estruturas moleculares que serão modificadas a partir de estudos de relação estrutura-atividade qualitativa (SAR) ou quantitativa (QSAR) envolvendo diversos estudos pré-clínicos *in vitro* e *in vivo*.

Na fase clínica, a proposta é o aperfeiçoamento das propriedades farmacocinéticas e o ajuste fino das propriedades farmacêuticas (formulação química) das substâncias selecionadas para que estas se tornem aptas ao uso clínico. Para que isto seja possível são feitas avaliações da tolerância em voluntários humanos saudáveis (Fase I), da eficácia e segurança em pacientes (centenas de pacientes, Fase II) seguidas de uma avaliação acerca da eficácia e de propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME, Fase III) que envolve milhares de pacientes em múltiplos centros clínicos, geralmente em diversos países. [4]

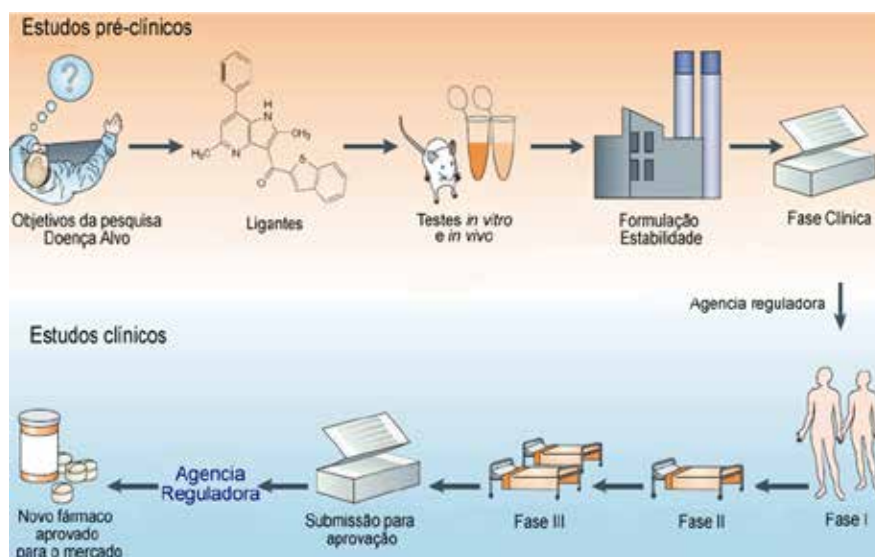


Figura 3.1. Etapas do processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. [4]

Somente após a realização de todos os estudos clínicos (fases I, II e III) e demonstração adequada de dosagem e segurança a molécula em estudo, já estabelecida sob uma forma farmacêutica com eficácia terapêutica, será aprovada pelo órgão regulador (FDA nos Estados Unidos e ANVISA no Brasil) que estabelece as condições para a comercialização. Após a comercialização, continuam sendo realizados os monitoramentos dos novos fármacos, na fase IV.

3.2. As três principais fases da ação de um fármaco

A chegada de um fármaco em seu local de ação, em concentração adequada para produzir o efeito biológico desejado, necessita da ocorrência de uma série de fenômenos complexos, os quais podem ser agrupados em três fases: farmacêutica, farmacocinética e farmacodinâmica. ^[1]

A *fase farmacêutica* está relacionada com a escolha da forma de administração e com a formulação do medicamento. Na formulação é decidido se o composto irá ser administrado na forma de comprimidos, cápsulas, líquido, etc.

Para produzirem seus efeitos locais ou sistêmicos, os fármacos são manipulados ou formulados em diversas formas farmacêuticas e administrados por diferentes vias. Ambas influenciam diretamente a biodisponibilidade, parâmetro que indica a quantidade com que um fármaco alcança o local de ação.

As vias de administração são classificadas em parenteral e enteral. A via de administração parenteral é aquela em que o fármaco não passa pelo trato gastrointestinal (intramuscular, intravenosa, subcutânea, entre outras) enquanto a via de administração enteral é aquela em que o fármaco é absorvido pelo trato gastrointestinal (oral, sublingual, retal). Em ambas as vias, como esperado, a estabilidade dos fármacos no organismo durante os processos de absorção e distribuição deve ser rigorosamente

investigada durante o programa de pesquisa e desenvolvimento de um novo medicamento.

A *fase farmacocinética* controla os diferentes parâmetros que governam o caminho percorrido pelo fármaco desde a sua administração até o seu encontro com o alvo. ^[1] A interação do fármaco com o alvo resulta em uma modificação de processos fisiológicos, cuja intensidade depende, na maioria dos casos, da concentração e do tempo de permanência no sangue e tecidos. A atividade farmacológica é atribuída a um fármaco depois de definida a forma farmacêutica, a via de administração e a dose administrada, os graus de Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção, e inclusive, Toxicologia (ADME/Tox), além de outros fatores como idade, sexo e estado fisiológico do paciente ou do animal em experimentação.

Durante a absorção, o fármaco ou o candidato, atravessa as membranas biológicas e organelas, processo que é fortemente dependente das características físico-químicas da substância (ionizado, não ionizado, tamanho, coeficiente de partição, etc.), até alcançar a corrente sanguínea. Essa é responsável pela sua distribuição pelo organismo, levando-o até o alvo. Uma vez que ele exerce seu efeito ele deve ser eliminado do organismo, senão a sua acumulação irá provocar efeitos colaterais. O metabolismo usualmente transforma o fármaco num composto mais solúvel em água para facilitar a sua eliminação pelas rotas de eliminação, sendo que as mais comuns são a renal (urina) e retal (fezes), mas ocasionalmente também pode ocorrer por outras vias (e.g. pulmonar, salivar, cutânea).

A *fase farmacodinâmica* está relacionada à interação do fármaco com o alvo biológico, ou seja, a complementaridade estereoelétrica (e não apenas geométrica) de sua estrutura molecular com o sítio de ligação do alvo biomacromolecular. ^[1-4] 1

O químico medicinal tem o desafio de maximizar a potência e a seletividade, e assim, minimizar os efeitos secundários indesejados produzidos pelos fármacos, considerando que as características estruturais podem conferir significativa rigidez e/ou flexibilidade às moléculas, ocasionando, inclusive, na existência de estereoisômeros, os quais podem exibir propriedades biológicas diferentes, como potência, tipos de atividade e efeitos colaterais indesejáveis. Por exemplo, a *R*-talidomida é sedativa enquanto seu estereoisômero *S*-talidomida apresenta a teratogenicidade como efeito colateral. A exploração das características estruturais no processo de otimização da atividade farmacológica, via modificação estrutural, depende, por outro lado, do entendimento da estrutura molecular tridimensional do alvo biológico.

3.3. A quiminformática na identificação de fármacos

Muitos trabalhos de pesquisa são conduzidos com o intuito de identificar moléculas protótipos, também chamados de compostos líderes. Um protótipo exibe uma atividade farmacológica considerável, porém é portador de efeitos secundários indesejáveis que não podem ser negligenciados. Este composto representa um promissor ponto de partida, no qual incidirá futuros estudos computacionais e experimentais para o refinamento da resposta biológica, até se tornar um fármaco eficaz, com ação terapêutica desejada. Vários são os caminhos para se chegar a um protótipo, como por exemplo, os ensaios aleatórios, modificação molecular de fármacos conhecidos (referidos na literatura como “*me-too compounds*”) e o uso de ferramentas em quiminformática na química medicinal.

No ensaio aleatório, ou *screening randômico*, todas as substâncias disponíveis, independentemente da natureza química, são submetidas arbitrariamente a testes biológicos contra um ou mais alvos na expectativa de se encontrar uma substância

promissora. Atualmente utiliza-se o *screening* em massa HTS (*High-Throughput Screening*) tanto em compostos sintéticos como de origem natural.

A *modificação molecular de fármacos conhecidos* baseia-se na alteração da estrutura química de fármacos existentes para produzir compostos similares, com propriedades terapêuticas ou toxicológicas superiores ao fármaco de origem. Por razões econômicas, é uma estratégia bastante aplicada atualmente pela indústria farmacêutica, com objetivo de melhorar as propriedades terapêuticas, aumentar a potência, melhorar a atividade farmacológica, minimizar a toxidez e obter formulações que sejam facilmente manipuláveis e administradas aos pacientes.

O desenvolvimento de estratégias e a aplicação de métodos computacionais para a seleção e otimização de candidatos a fármacos fazem parte da *Quiminformática*. A exploração do *espaço químico* e o delineamento das regiões estabelecidas pelo *espaço químico-biológico* só são possíveis através da criação de bancos de dados *in silico* para o armazenamento adequado das informações sobre as pequenas moléculas e os alvos macromoleculares. Como consequência disso, os métodos e ferramentas computacionais vêm se tornando parte integral das etapas de identificação e otimização de ligantes para o armazenamento, gerenciamento, análise de dados e modelagem molecular de compostos, tanto dentro das indústrias farmacêuticas quanto na academia.

O termo “*quiminformática*” foi definido pela primeira vez por Brown (1998) ^[6] como “*uma combinação de recursos para transformar dados em informação e informação em conhecimento, com o propósito de se tomar melhores decisões mais rapidamente dentro do processo de planejamento de fármacos*”. Uma definição mais ampla foi dada por Gasteiger: “*A Quiminformática consiste do uso dos métodos de informática para resolver problemas químicos*”. ^[7]

3.3.1. O espaço químico-biológico

O planejamento e desenvolvimento de um novo fármaco é um processo longo, complexo, caro e altamente arriscado ^[8]. Em uma análise de 68 fármacos aprovados, estimou-se que foram necessários em média 15 anos para que uma nova entidade química (NCE) chegasse ao mercado ao custo de 800 milhões de dólares ^[9], podendo chegar a US\$1,4 bilhão. Na fase de pesquisa, somente uma pequena fração dos compostos é selecionada para um grupo de candidatos a fármacos, para posterior desenvolvimento.

Mesmo com os altos investimentos e a introdução de novas tecnologias (química combinatória, ensaios automatizados em larga escala – HTS) pela indústria farmacêutica, a taxa de sucesso é de apenas 10% ^[10]. Cerca de 30% dos compostos que chegam aos estágios finais do desenvolvimento clínico são abandonados em decorrência da ausência de eficácia, e baixa segurança clínica e toxicológica ^[11].

Uma das dificuldades encontradas no planejamento e desenvolvimento de um composto até este se tornar um fármaco é o tamanho do *espaço químico* no qual a busca é realizada. Estima-se que o número de substâncias teoricamente sintetizáveis utilizando apenas a combinação de átomos de C, O, H, N, P, S, F, Cl, Br, I e com uma massa molecular (MM) menor que 500 Da gira entre 10^{40} a 10^{120} moléculas. Assim, dada a vastidão do espaço químico, o desafio na descoberta de fármacos é localizar aquelas regiões nas quais são mais prováveis de se encontrar substâncias biologicamente ativas.

A química medicinal navega pelo imenso espaço químico-biológico usando os métodos em *quiminformática*. ^[12] Fazem parte das atividades da Quiminformática no contexto da descoberta de fármacos: descrição, manipulação e análise de bancos de dados de estruturas químicas (virtuais ou reais); relação estrutura atividade (SAR); pós-processamento de dados obtidos em ensaios (reais ou virtuais) contra os alvos;

planejamento *de novo* para geração e otimização de compostos-líderes; ensaios *in silico* para a predição de propriedades ADME, do metabolismo e da toxicologia; mineração e visualização de dados; *ensaios virtuais*.^[13]

Os métodos utilizados para a identificação, seleção e otimização de ligantes neste trabalho são os *ensaios virtuais*, focando no alvo enzimático presente no parasito *Trypanosoma cruzi*, a enzima DHODH.

3.3.2. *Ensaio virtual*

A quiminformática possibilitou também a introdução de tecnologias avançadas na busca de fármacos. Dentre essas técnicas destacam-se o *ensaio virtual* (do inglês, *virtual screening*).^[14] Os ensaios virtuais consistem da aplicação de modelos computacionais para selecionar e/ou priorizar substâncias para os ensaios experimentais. Através de ensaios virtuais é possível pontuar, classificar e filtrar moléculas contidas em grandes bancos de dados de acordo com as suas probabilidades de possuir alguma afinidade por um determinado alvo.^[15,16]

Diante do vasto espaço químico da coleção virtual de moléculas, disponíveis no banco de dados, pode-se aplicar “filtros moleculares”, para eliminar substâncias inapropriadas ou indesejáveis. Esta “filtragem” pode ser realizada delimitando-se as propriedades físicas, conteúdo atômico, grupos funcionais e/ou propriedades topológicas, gerando uma sub-coleção, para aplicação de métodos baseados na estrutura do ligante ou receptor, Figura 3.2.

Historicamente, existem duas formas de planejamento utilizadas no ensaio virtual: o *planejamento baseado na estrutura do ligante* (LBDD) e o *planejamento baseado na estrutura do receptor* (SBDD). O planejamento baseado na estrutura do ligante é usado para identificar moléculas com características (pontos farmacofóricos, descritores estruturais) similares à dos ligantes conhecidos.^[17] O ensaio virtual baseado

na estrutura do alvo requer o uso da estrutura tridimensional do alvo, a qual pode ser obtida experimentalmente (Raios-X, RMN, microscopia eletrônica) ou computacionalmente (modelagem por homologia, *Threading*). O *planejamento integrado* pode ser realizado quando se conhecem tanto a estrutura do alvo quanto a dos ligantes. Somente as substâncias que são previstas como tendo certa afinidade pelo alvo serão selecionadas e avaliadas experimentalmente.

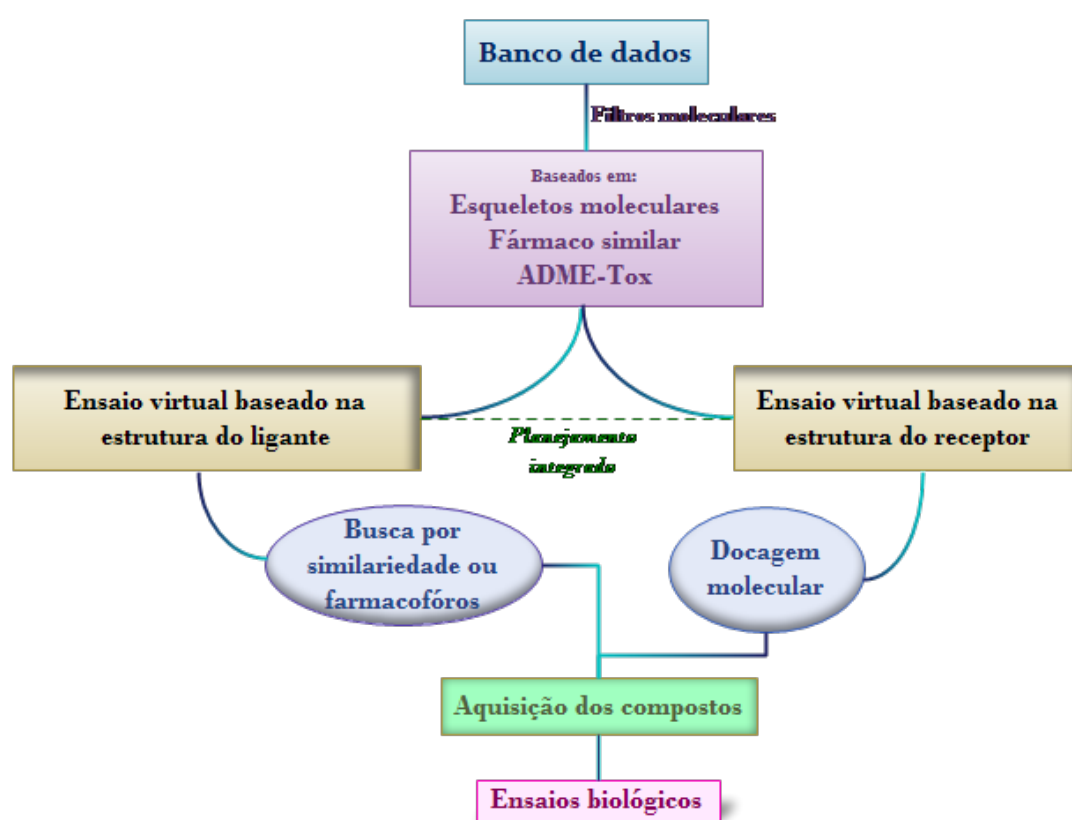


Figura 3.2. Estratégia de ensaio virtual para seleção de substâncias bioativas.

O ensaio virtual tem sido usado como uma abordagem alternativa à técnica de HTS, realizando-se o ensaio *in silico* de grandes coleções de moléculas (reais ou virtuais), buscando aqueles que apresentam uma complementaridade significativa com o sítio ativo do alvo. ^[17]

3.4. Referências

- [1] WERMUTH, C. G. Medicinal chemistry: definition and objectives, the three main phases of drug activity, drug and disease classifications. In: *The PRACTICE OF MEDICINAL CHEMISTRY*. Amsterdam: Academic Press, 2003. p. 29-31.
- [2] WERMUTH, C. G.; GANELLIN, C. R.; LINDBERB, P.; MITSCHER, L. A. Glossary of terms used in medicinal chemistry. **Pure Appl. Chem.**, v. 70, n. 1, p. 1129-1143, 1998.
- [3] OPREA, T. I.; TROPSHA, A. Target, chemical and bioactivity databases – integration is key. **Drug Discov. Today**, v. 3, n. 4, p. 357-365, 2006.
- [4] LOMBARDINO, J. G.; LOWE, J. A. The role of the medicinal chemist in drug discovery then and now. **Nat Rev Drug Discov**, v. 3, n. 10, p. 853-862, 2004.
- [5] KEARNS, G. L.; ABDEL-RAHMAN, S. M.; ALANDER, S. W.; BLOWEY, D. L.; LEEDER, J. S.; KAUFFMAN, R. E. Developmental pharmacology - Drug disposition, action, and therapy in infants and children. **New Engl. J. Med.**, v. 349, n. 12, p. 1157-1167, 2003.
- [6] BROWN, F.K. Chemoinformatics: What is it and How does it Impact Drug Discovery. In: BRISTOL, J. A. (Ed.). **An. Reports Med. Chem.**. Ann Arbor: Academic Press, 1998. v. 33, p. 375-384.
- [7] GASTEIGER, J. The central role of chemoinformatics. **Chemom. Int. Lab. Syst.**, v. 82, n. 1-2, p. 200-209, 2006.
- [8] LOMBARDINO, J. G.; LOWE, J. A. III. The role of the medicinal chemist in drug discovery - then and now. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 3, n. 10, p. 853-862, 2004.
- [9] CHONG, R. C.; SULLIVAN, D. J. New uses for old drugs. **Nature.**, v. 448, n. 7154, p. 645-646, 2007.
- [10] ZHAO, H.; GUO, Z. Medicinal chemistry strategies in follow-on drug discovery. **Drug Discov. Today**, v. 14, n. 9, p. 516-522, 2009.
- [11] HOPKINS, A. L., Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery. **Nature Chem. Biol.**, v. 4, n. 11, 682-690, 2008.
- [12] GHOSE, A. K.; HERBERTZ, T.; SALVINO, J. M.; MALLAMO, J. P. Knowledge-based chemoinformatic approaches to drug discovery. **Drug Discov. Today**, v. 11, n. 23, p. 1107-1114, 2006.
- [13] OPREA, T. I. Chemoinformatics and the quest for leads in drug discovery. In: GASTEIGER, J.(Ed.). **Handbook of chemoinformatics**. Weinheim: Wiley-VCH, 2003. p. 1509-1531.
- [14] BLEICHER, K. H.; BOHM, H. J.; MULLER, K.; ALANINE, A. I. Hit and lead generation: beyond high-throughput screening. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 2, n. 5, p. 369-378, 2003.
- [15] OPREA, T. I; MATTER, H. Integrating virtual screening in lead discovery. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 8, n. 4, p. 349-358, 2004.
- [16] LEACH, A. R.; GILLET, V. J. Virtual screening. In: LEACH, A. R.; GILLET, V. (Ed.). **An Introduction to Chemoinformatics**. Dordrecht: Springer, 2007. p. 159-182.
- [17] GHOSH, S.; NIE, A.; AN, J.; HUANG, Z. Structure-based virtual screening for drug discovery. **Curr. Op. Chem. Biol.**, v. 10, n. 3, p. 194-202, 2006.

Capítulo 4

Objetivos



Os objetivos fundamentais desta tese de doutorado são apresentados neste capítulo.

4. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho são:

Ü A utilização e aplicação dos métodos de Quiminformática, ensaios virtuais baseados nas estruturas dos ligantes (LBVS) e do receptor (SBVS), para a seleção de moléculas capazes de inibir a enzima diidroorotato desidrogenase do parasito *Trypanosoma cruzi* (TcDHODH), com a colaboração do Dr. Josmar R. Rocha;

Ü Estabelecimento de estratégias para a seleção de moléculas com perfis estruturais e propriedades físico-químicas passíveis de otimização molecular dentro do contexto da química medicinal;

Ü Estruturação de uma coleção de moléculas com base no banco de dados comercial *Zinc*, seguida da aquisição destas substâncias para serem avaliadas nos ensaios enzimáticos;

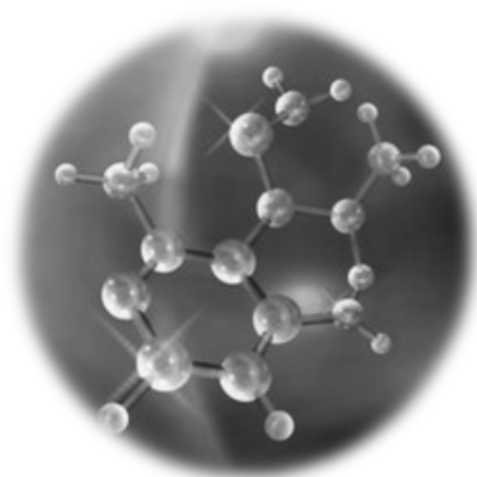
Ü Desenvolvimento de um novo protocolo para expressão e purificação da enzima TcGAPDH com a inserção de um his-tag (denominada His₆-GAPDH), para que seja possível a produção da proteína com alto rendimento para sua utilização pelos membros do grupo *Nequimed-PN*;

Ü Determinação a entalpia aparente de reação da enzima TcDHODH e padronizar os ensaios cinéticos utilizando o método de Titulação Calorimétrica Isotérmica, estabelecendo um protocolo geral de ensaio de inibição enzimática;

Ü A validação dos métodos e das estratégias adotados para seleção das moléculas através da determinação do mecanismo de inibição e da constante de inibição (K_i^{app}) das substâncias selecionadas pelos ensaios virtuais;

Capítulo 5

Planejamento de inibidores da enzima TcDHODH



Neste capítulo será feita uma breve introdução sobre os métodos em quiminformática utilizados, assim como a estratégia e os critérios utilizados para a seleção dos compostos.

5.2 Referências

- [1] BROOIJMANS, N.; KUNTZ, I. D. Molecular recognition and docking algorithms. **Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.**, v. 32, p. 335-373, 2003.
- [2] LEACH, A. R.; SHOICHET, B. K.; PEISHOFF, C. E. Prediction of protein-ligand interactions. Docking and scoring: successes and gaps. **J. Med. Chem.**, v. 49, n. 20, p. 5851-5855, 2006
- [3] SHOICHET, B. K. Virtual screening of chemical libraries. **Nature**, v. 432, n. 7019, p. 862-865, 2004.
- [4] KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Rev. Drug Discov.**, v. 3, n. 11, p. 935-949, 2004.
- [5] ROCHA, J. R. Planejamento de inibidores das enzimas gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e diidroorotato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi*. Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos. **Tese de Doutorado**, 2010.
- [6] PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S.; GREENBLATT, D. M.; MENG, E. C.; FERRIN, T. E. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. **J. Comp. Chem**, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.
- [7] DAVIS, J. P.; CAIN, G. A.; PITTS, W. J.; MAGOLDA, R. L.; COPELAND, R. A. The Immunosuppressive Metabolite of Leflunomide Is a Potent Inhibitor of Human Dihydroorotate Dehydrogenase. **Biochemistry**, v. 35, n. 4, p. 1270-1273, 1996.
- [8] Tripos Bookshelf 8.0, Tripos International, 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA.
- [9] FAGAN, R. L.; JENSEN, K. F.; BJÖRNBERG, O.; PALFEY, B. A. Mechanism of Flavin Reduction in the Class 1A Dihydroorotate Dehydrogenase from *Lactococcus lactis*. **Biochemistry**, v. 46, n. 13, p. 4028-4036, 2007.
- [10] ROWLAND, P.; BJORNBERG, O.; NIELSEN, F. S.; JENSEN, K. F.; LARSEN, S. The crystal structure of *Lactococcus lactis* dihydroorotate dehydrogenase A complexed with the enzyme reaction product throws light on its enzymatic function. **Prot. Science**, v. 7, n. 6, p. 1269-1279, 1998.
- [11] IRWIN, J. J.; SHOICHET, B. K. ZINC – a free database of commercially available compounds for virtual screening. **J. Chem. Inf. Model.**, v. 45, n. 1, p. 177-182, 2005.
- [12] RIDLEY, D. D. Introduction to structure searching with SciFinder scholar. **J. Chem. Edu.**, v. 78, n. 4, p. 559-560, 2001.
- [13] EMOLECULES – Chemical structure drawing search. Disponível em: <<http://www.emolecules.com>>. Acesso em 20 jan. 2011.
- [14] USING AUTODOCK 4 FOR VIRTUAL SCREENING. Disponível em: <<http://autodock.scripps.edu/faqs-help/tutorial/using-autodock4-for-virtual-screening>>. Acesso em: 22 jan. 2011.
- [15] SHERMAN, W.; DAY, T.; JACOBSON, M. P.; FRIESNER, R. A.; FARID, R. Novel procedure for modeling ligand/receptor induced fit effects. **J. Med. Chem.**, v. 49, n. 2, p. 534-553, 2005.

Capítulo 6

Biologia Molecular: ferramenta para obtenção do alvo biológico



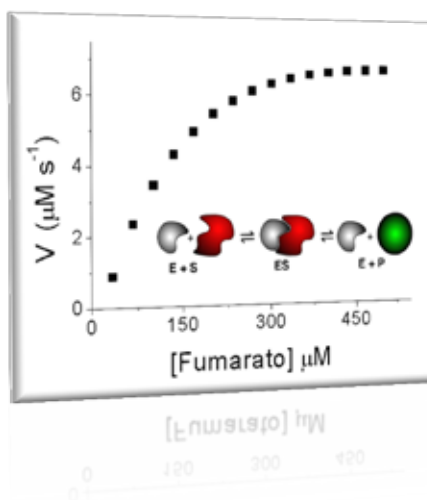
Neste capítulo são abordados os aspectos fundamentais do uso da biologia molecular para obtenção do alvo biomacromolecular, necessário para os estudos calorimétricos e cristalográficos

6.1. Referências

- [1] NELSON, D. L.; COX, M. M., Biosynthesis of amino acids, nucleotides, and related molecules. In: NELSON, D. L.; COX, M. M. (Eds.). **Lehninger – principles of biochemistry**. 4. ed. New York: W. H. Freeman, 2004. p. 862-880.
- [2] ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream. **Science**, v. 303, n. 5665, p. 1818-1822, 2004.
- [3] ERLICH, H. A.; GELFAND, D.; SNINSKY, J. J. Recent advances in the polymerase chain reaction. **Science**, v. 252, n. 5013, p. 1643-1651, 1991.
- [4] CHELESKI, J.; WIGGERS, H. J.; CITADINI, A. P.; DA COSTA FILHO, A. J.; NONATO, M. C.; MONTANARI, C. A. Kinetic mechanism and catalysis of Trypanosoma cruzi dihydroorotate dehydrogenase enzyme evaluated by isothermal titration calorimetry. **Anal. Biochem.**, v. 399, n. 1, p. 13-22, 2010.
- [5] HANNAERT, V., OPPERDOES, F.R., MICHELS, P.A. Glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of Trypanosoma brucei and Trypanosoma cruzi: Expression in Escherichia coli, purification, and characterization of the enzymes. **Prot. Express. Purif.**, v.6, n. 3, p. 244-250, 1995.
- [6] BANEYX, F., Recombinant protein expression in Escherichia coli. **Cur. Opin. Biotech.**, v.10, n. 5, p. 411-421, 1999.
- [7] BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

Capítulo 7

TcDHODH: Ensaio cinético e mecanismo de reação



Neste capítulo é feita uma breve introdução sobre a cinética enzimática e a técnica de Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC). Em seguida, os resultados dos parâmetros cinéticos para os substratos DHO e FUM, assim como dos parâmetros de ativação da reação catalisada pela enzima TcDHODH.

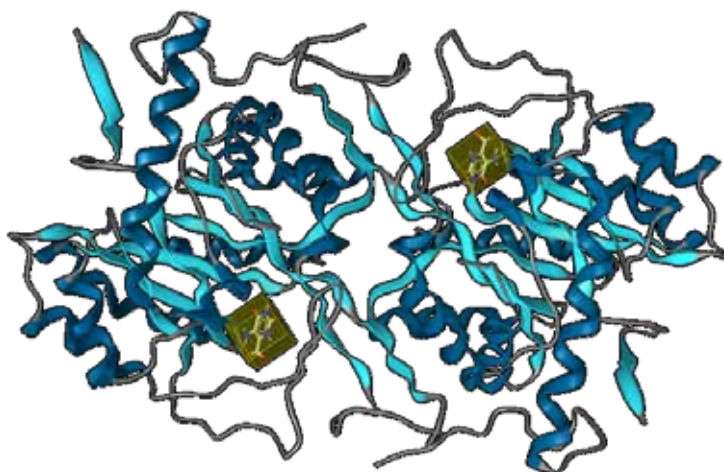
7.1.Referências

- [1] COPELAND, R. A., Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis, New York: Wiley-VCH, 2000. 397 p.
- [2] VERLI, H.; BARREIRO, E. J. Um paradigma da química medicinal: a flexibilidade dos ligantes e receptores. **Quím. Nova**, v. 28, n. 1, p. 95-102, 2005.
- [3] KOSHLAND, D. Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. **Proc. Nat. Acad. Scient.** U. S. A., v. 44, p. 98-104, 1958.
- [4] GARRET, R. H.; GRISHAM, C. M. Enzyme kinetics. In: **BIOCHEMISTRY**, London: Hardcover, 1999. p. 426-459.
- [5] ABABOU, A.; LADBURY, J. E. Survey of the year 2004: literature on applications of isothermal titration calorimetry. **J. Mol. Recog.**, v. 19, n. 1, p. 79-89, 2006.
- [6] TODD, M. J.; GOMEZ, J. Enzyme kinetics determined using calorimetry: A general assay for enzyme activity? **Anal. Biochem.**, v. 296, n. 2, p. 179-187, 2001.
- [7] LADBURY, J. E.; CHOWDHRY, B. Z. Sensing the heat: the application of isothermal titration calorimetry to thermodynamic studies of biomolecular interactions. **Chem. & Biol.**, v. 3, n. 10, p. 791-801, 1996.
- [8] CHELESKI, J.; WIGGERS, H. J.; CITADINI, A. P.; DA COSTA FILHO, A. J.; NONATO, M. C.; MONTANARI, C. A. Kinetic mechanism and catalysis of Trypanosoma cruzi dihydroorotate dehydrogenase enzyme evaluated by isothermal titration calorimetry. **Anal. Biochem.**, v. 399, n. 1, p. 13-22, 2010.
- [9] OLSEN, S. N. Applications of isothermal titration calorimetry to measure enzyme kinetics and activity in complex solutions. **Therm. Acta**, v. 448, n. 1, p. 12-18, 2006.
- [10] EDWARDS, P. M. Origin 7.0: Scientific Graphing and Data Analysis Software. **J. Chem. Inf. Comput. Sci.**, v. 42, p. 1270-1271, 2002.
- [11] SYSTAT SOFTWARE. Sigmaplot 10. [Programa de Computador]. Richmond: [s.n], 2006, 1 CD-ROM.
- [12] FUKADA, H.; TAKAHASHI, K. Enthalpy and heat capacity changes for the proton dissociation of various buffer components in 0.1 M potassium chloride. **Prot. Struct. Funct., Bioinfo.** v. 33, n. 2, p. 159-166, 1998.
- [13] FELICIANO, P. R.; CORDEIRO, A. T.; COSTA-FILHO, A. J.; NONATO, M. C. Cloning, expression, purification, and characterization of Leishmania major dihydroorotate dehydrogenase. **Prot. Expres. Purif.**, v. 48, n. 1, p. 98-103, 2006.
- [14] ARAKAKI, T. L. et al. Characterization of Trypanosoma brucei dihydroorotate dehydrogenase as a possible drug target; structural, kinetic and RNAi studies. **Mol. Microbiol.**, v. 68, n. 1, p. 37-50, 2008.
- [15] NIELSEN, F. S.; JENSEN, K. F.; ROWLAND, P.; LARSEN, S. Purification and characterization of dihydroorotate dehydrogenase a from lactococcus lactis, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the enzyme. **Prot. Scien.**, v. 5, n. 5, p. 852-856, 1996.
- [16] ZAMEITAT, E.; PIERIK, A. J.; ZOCHER, K.; LÖFFLER, M. Dihydroorotate dehydrogenase from Saccharomyces cerevisiae: spectroscopic investigations with the recombinant enzyme throw light on catalytic properties and metabolism of fumarate analogues. **FEMS Yeast Res.**, v. 7, n. 6, p. 897-904, 2007.

- [17] LIPINSKI, C. Solubility in the design of combinatorial libraries. In: YAN, B. (Ed.). *Chemical analysis: analysis and purification methods in combinatorial chemistry*. New York: Wiley Interscience, 2004. v. 163, p. 407-434.
- [18] LENEVICH, S.; XU, J.; HOSOKAWA, A.; CRAMER, C. J.; DISTEFANO, M. D. Transition State Analysis of Model and Enzymatic Prenylation Reactions. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 129, n. 18, p. 5796-5797, 2007.
- [19] ANDÚJAR-SÁNCHEZ, M.; LAS HERAS-VÁZQUEZ, F. J.; CLEMENTE-JIMÉNEZ, J. M.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, S.; CAMARA-ARTIGAS, A.; RODRÍGUEZ-VICO, F.; JARA-PÉREZ, V. Enzymatic activity assay of d-hydantoinase by isothermal titration calorimetry. Determination of the thermodynamic activation parameters for the hydrolysis of several substrates. **J. Biochem. Biophys. Methods**, v. 67, n. 1, p. 57-66, 2006.
- [20] SCHRAMM, V. L. Enzymatic transition states and transition state analogues. *Cur. Opin. Struct. Biol.*, v. 15, n. 6, p. 604-613, 2005.
- [21] EFTINK M. R.; BILTONEN, R. L.; Energetics of ribonuclease A catalysis, 3, Temperature dependence of the hydrolysis of cytidine cyclic 2',3'-phosphate, *Biochem.*, v. 22, 5140-5150, 1983.
- [22] MA, B.; KUMAR, S.; TSAI, C.-J.; HU, Z.; NUSSINOV, R. Transition-state Ensemble in Enzyme Catalysis: Possibility, Reality, or Necessity? *J. Theor. Biol.*, v. 203, n. 4, p. 383-397, 2000.
- [23] HANNAERT, V.; OPPERDOES, F.R.; MICHELS, P.A.; Glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*: Expression in *Escherichia coli*, purification, and characterization of the enzymes. *Prot. Expr. Purif.*, v. 6, n. 3, p. 244-250, .
- [24] CHELESKI, J.; FREITAS, R. F.; WIGGERS, H. J.; ROCHA, J. R.; DE ARAÚJO, A. P. U.; MONTANARI, C. A. Expression, purification and kinetic characterization of His-tagged glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. *Prot. Expr. Purif.*, v. 76, n. 2, p. 190-196, 2011.
- [25] COPELAND, L.; ZAMMIT, A. Kinetic properties of NAD-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the host fraction of soybean root nodules. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 312, p. 107-113, 1994.
- [26] CARDOSO, C. L.; MORAES, M. C.; GUIDO, R.V.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D.; WAINER, I. W.; CASS, Q. B.; The development of an immobilized enzyme reactor containing glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: The effect of species' specific differences on the immobilization. *Anal.*, v. 133, p. 93-99, 2008.

Capítulo 8

Inibidores das DHODHs: Cinética e Estrutura Cristalográfica



Neste capítulo, será feita uma breve descrição sobre os inibidores enzimáticos reversíveis. Em seguida, serão apresentados os resultados de inibição enzimática das substâncias selecionadas pelos métodos de *virtual screening*, assim como a estrutura cristalográfica dos co-complexos.

8.1. Referências

- [1] COPELAND, R. A. **Enzymes**: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis. New York: Wiley-VCH, 2000. 397 p.
- [2] COPELAND, R. A. **Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery**. New Jersey: Wiley-VCH, 2005. 296 p.
- [3] SYSTAT SOFTWARE. **Signaplot 10**. [Programa de Computador]. Richmond: [s.n], 2006. 1 CD-ROM.
- [4] American Chemical Society, **SciFinder Scholar**. [Programa de Computador]. Columbus: [s.n], 2007 1 CD-ROM.
- [5] CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering, **Nucl. Acids Res.**, v. 16, n. 22, p. 10881-10890, 1988.
- [6] PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S.; GREENBLATT, D. M.; MENG, E. C.; FERRIN, T. E. UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. **J. Comput. Chem.**, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.
- [7] CHELESKI, J.; ROCHA, J. R.; PINHEIRO, M. P.; WIGGERS, H. J.; DA SILVA, A. B. F.; NONATO, M. C.; MONTANARI, C. A. Novel insights for dihydroorotate dehydrogenase class 1A inhibitors discovery. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 45, n. 12, p. 5899-5909, 2010.
- [8] HOPKINS, A. L.; GROOM, C. R.; ALEX, A. Ligand efficiency: a useful metric for lead selection. **Drug Discov. Today**, v. 9, n. 10, p. 430-431, 2004.
- [9] SIEGAL, G.; AB, E. Integration of fragment screening and library design. **Drug Discov. Today**, v. 12, n. 23, p. 1032-1039, 2007.
- [10] CARR, R. A. E.; CONGREVE, M.; MURRAY, C. W.; REES, D. C. Fragment-based lead discovery: leads by design. **Drug Discov. Today**, v. 10, n. 14, p. 987-992, 2005.
- [11] LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv. Drug Del. Rev.**, v. 23, n. 1, p. 3-25, 1997.
- [12] LEACH, A. R.; HANN, M. M.; BURROWS, J. N.; GRIFFEN, E. J. Fragment screening: an introduction. **Mol. Biosyst.**, v. 2, n. 9, p. 429-426, 2006.
- [13] REES, D. C.; CONGREVE, M.; MURRAY, C. W.; CARR, R. Fragment-based lead discovery. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 3, n. 8, p. 660-672, 2004.
- [14] HADJUK, P.; GREER, J. A decade of fragment-based drug design: strategic advances and lessons learned. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 6, n. 3, p. 211-219, 2007.
- [15] Segel, I. H. **Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems**. New York: Wiley, 2006. 957p.
- [16] HOPKINS, A. L.; GROOM, C. R.; ALEX, A. Ligand efficiency: a useful metric for lead selection. **Drug Disc. Today**, v. 9, n. 10, p. 430-431, 2004.
- [17] SHOICHET, B. K. Virtual screening of chemical libraries. **Nature**, v. 432, n. 7019, p. 862-865, 2004.
- [18] SHOICHET, B.; K.; MCGOVERN, S.; L.; WEI, B.; IRWIN, J. Lead discovery using molecular docking. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 6, n. 4, p. 439-446, 2002.

Capítulo 9

Conclusões e Perspectivas



Este capítulo apresenta as conclusões desta tese de doutorado que envolveu o uso de métodos em quiminformática e experimentais na identificação de novos inibidores da enzima TcDHODH. Além disso, são apresentadas as perspectivas para a continuação deste trabalho.

9. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

9.1. Conclusões

A doença de Chagas é uma das doenças tropicais mais negligenciadas no mundo. Apesar dos impactos socioeconômicos negativos, da diminuição da qualidade de vida e dos efeitos severos ao organismo causados pela doença de Chagas, esta completou 100 anos em 2009, de sua descoberta, sendo que não há um tratamento eficaz e seguro. Os únicos fármacos disponíveis para o tratamento dessa doença foram introduzidos há mais de quarenta anos e apresentam uma série de efeitos colaterais, além de serem eficazes apenas na fase aguda da doença. Nesse contexto, a busca por novas moléculas mais eficazes e menos tóxicas é essencial para aliviar o sofrimento de milhões de pessoas que estão infectadas por essa doença.

A identificação de novas substâncias capazes de modular a atividade da enzima TcDHODH, alvo que desempenha função metabólica importante para a sobrevivência do parasito *T. cruzi*, foi realizada com sucesso neste trabalho através a utilização dos métodos em quiminformática aliados aos métodos experimentais. A quiminformática, com o desafio de encontrar substâncias biologicamente ativas através da descrição e delimitação do espaço químico-biológico, permitiu a seleção de substâncias ativas dentro de grandes coleções de moléculas.

O método escolhido para a determinação do mecanismo de inibição e constante de inibição (K_i^{app}) das moléculas foi a Titulação Calorimétrica Isotérmica ultra-sensível (ITC), que forneceu dados cinéticos precisos. Além disso, técnica de ITC mostrou ser extremamente sensível, permitindo-se acompanhar a cinética da reação e obter os valores de K_i^{app} de maneira acurada, na qual foi possível determinar a diferença dos valores de afinidade dos inibidores na ordem de nanomolar. Também, diferente do método espectrofotométrico, a técnica de ITC pode ser usada em soluções opacas e não

necessita que o substrato contenha grupos cromóforos, fluoróforos ou necessitem de reações acopladas.

Em paralelo a este trabalho, também se desenvolveu um novo protocolo de expressão para outra importante enzima do *T. cruzi*, a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, de uma maneira rápida, de fácil purificação, alto rendimento e com significativa estabilidade, que possibilitará aos membros do Grupo Nequimed a realização dos ensaios bioquímicos de novos inibidores de maneira reprodutiva e eficaz.

O protocolo de ensaio bioquímico desenvolvido utilizando ITC, para a determinação dos parâmetros cinéticos de reação obtidos para as enzimas DHODHs de *T. cruzi* e *L. major* em relação aos dois substratos (DHO e FUM), nos ajudou a elucidar o comportamento cinético destas enzimas e a elucidar a afinidade dos substratos. Para a enzima TcDHODH foi feito um estudo adicional, frente a diferentes tampões, temperaturas e na presença do cossolvente DMSO e do surfactante Triton X-100, e assim, foi estabelecido um protocolo de ensaio cinético para que possa ser incluído moléculas com baixa solubilidade em água ou que venham a agregar.

Das vinte e seis substâncias testadas durante o projeto, dezenove inibiram a TcDHODH competitivamente. Destas, duas substâncias tiveram suas estruturas cristalográficas resolvidas (códigos PDB: 3MJY e 3MHU), e desta maneira, os modos de interação elucidados.

Estes resultados nos indicaram a possibilidade de buscar por novas moléculas, em regiões que se estenderam além do sítio ativo (S1), na nova região, que chamamos de S2. Esta região, nunca antes explorada para as enzimas DHODHs, não está presente na enzima DHODH de humanos. Assim, moléculas capazes de interagir em S1 e S2 poderão ser seletivas para as enzimas da Classe 1A. Seguindo esta hipótese, a segunda

geração de moléculas, gerou substâncias com afinidade nanomolar, nunca antes descrito na literatura para as enzimas DHODHs.

Com isso, a taxa de acerto obtida nesta tese, considerando as substâncias com $K_i^{app} < 100 \mu\text{M}$, foi de 46%, um número significativo considerando-se apenas as substâncias ensaiadas, já que na literatura ele gira em torno de 1-10% quando o planejamento *in silico* é realizado e se comparado às taxas de acerto obtidas através dos métodos de ensaio em larga escala (HTS), de 0-2 %, os resultados alcançados neste trabalho são ainda mais expressivos. Atribuímos o desta seleção a integração de diferentes tecnologias: uso dos métodos em quiminformática para seleção das moléculas, da biologia molecular para a obtenção do alvo biomacromolecular, dos ensaios bioquímicos utilizando a ITC e a determinação da estrutura do complexo enzima/inibidor utilizando cristalografia de raios X.

Além da alta afinidade das substâncias, se observamos a eficiência do ligante, podemos dizer que estas moléculas se caracterizam como ótimas candidatas para seguirem na próxima etapa da gênese planejada de fármacos. Com este trabalho, esperamos dar uma importante contribuição para o futuro da quimioterapia da doença de Chagas, encontrando-se novos inibidores potentes pela enzima DHODH de *T. cruzi*.

9.2. Perspectivas

A etapa posterior da gênese planejada de fármacos é a otimização dos ligantes descritos neste trabalho em substâncias-matrizes. Para isso, novas estruturas químicas com base nas moléculas mais potentes foram selecionadas e estão sendo sintetizadas. Em paralelo, será utilizada a técnica de cristalografia de raios X para a determinação estrutural do complexo enzima/inibidor, fornecendo informações sobre o modo de interação (MOB). As substâncias estão sendo testadas contra as formas infectivas do *T. cruzi*, na Escola de Medicina de Ribeirão Preto - USP, sob a coordenação do Prof. Dr. João Santana. As substâncias que forem ativas no parasito *T. cruzi* com melhor resposta do que o fármaco Benzonidazol serão avaliadas nos testes de toxidez. Primeiramente, os testes de toxidez serão realizadas em células de mamíferos para avaliar os índices de segurança. Uma vez validada a classe química, os seguintes testes de toxidez seguem para o modelo animal, que devem ser realizados em pelo menos dois mamíferos.

Os estudos não clínicos de segurança no Brasil são propostos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e são descritos no: “*Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos, Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia -GESEF- ANVISA 2010*” e incluem os estudos de toxicidade de dose única (aguda), toxicidade de doses repetidas, toxicidade reprodutiva, genotoxicidade, tolerância local e carcinogenicidade além de estudos para a avaliação da segurança farmacológica e toxicocinética (Administração, Distribuição, Metabolismo e Excreção – ADME).

Uma vez comprovada a segurança dessas substâncias, os dados poderão ser apresentados e avaliados pela ANVISA, fornecendo subsídios para dar início as Pesquisas Clínicas.

Apêndices



ANEXO 1

Numeração utilizada na tese	Numeração do Banco de dados do grupo <i>Nequimed</i>
1	Nequimed 63
2	Nequimed 62
3	Nequimed 61
4	Nequimed 59
5	Nequimed 66
6	Nequimed 73
7	Nequimed 56
8	Nequimed 75
9	Nequimed 143
10	Nequimed 144
11	Nequimed 58
12	Nequimed 133
13	Nequimed 134
14	Nequimed 60
15	Nequimed 65
16	Nequimed 68
17	Nequimed 145
18	Nequimed 72
19	Nequimed 70
20	Nequimed 71
21	Nequimed 74
22	Nequimed 67
23	Nequimed 130
24	Nequimed 131
25	Nequimed 132
26	Nequimed 146



Contents lists available at ScienceDirect

Analytical Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yabio

Kinetic mechanism and catalysis of *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase enzyme evaluated by isothermal titration calorimetry

Juliana Cheleski^a, Helton José Wiggers^b, Ana Paula Citadini^c, Antônio José da Costa Filho^c, Maria Cristina Nonato^d, Carlos Alberto Montanari^{a,b,*}

^a Grupo de Química Medicinal de Produtos Naturais, NEQUIMED-PN, Departamento de Química e Física Molecular, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 13560-970 São Carlos, SP, Brazil

^b Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, 13565-905 São Carlos, SP, Brazil

^c Grupo de Biofísica Molecular Sérgio Mascarenhas, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 13560-970 São Carlos, SP, Brazil

^d Laboratório de Cristalografia de Proteínas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14040-903 Ribeirão Preto, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 August 2009

Received in revised form 14 November 2009

Accepted 15 November 2009

Available online 20 November 2009

Keywords:

Chagas disease

Trypanosoma cruzi

Dihydroorotate dehydrogenase

Enzyme kinetics

Activation thermodynamic parameters

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi dihydroorotate dehydrogenase (TcDHODH) catalyzes the oxidation of L-dihydroorotate to orotate with concomitant reduction of fumarate to succinate in the *de novo* pyrimidine biosynthetic pathway. Based on the important need to characterize catalytic mechanism of TcDHODH, we have tailored a protocol to measure TcDHODH kinetic parameters based on isothermal titration calorimetry. Enzymatic assays lead to Michaelis–Menten curves that enable the Michaelis constant (K_M) and maximum velocity (V_{max}) for both of the TcDHODH substrates: dihydroorotate ($K_M = 8.6 \pm 2.6 \mu\text{M}$ and $V_{max} = 4.1 \pm 0.7 \mu\text{M s}^{-1}$) and fumarate ($K_M = 120 \pm 9 \mu\text{M}$ and $V_{max} = 6.71 \pm 0.15 \mu\text{M s}^{-1}$). TcDHODH activity was investigated using dimethyl sulfoxide (10%, v/v) and Triton X-100 (0.5%, v/v), which seem to facilitate the substrate binding process with a small decrease in K_M . Arrhenius plot analysis allowed the determination of thermodynamic parameters of activation for substrates and gave some insights into the enzyme mechanism. Activation entropy was the main contributor to the Gibbs free energy in the formation of the transition state. A factor that might contribute to the unfavorable entropy is the hindered access of substrates to the TcDHODH active site where a loop at its entrance regulates the open–close channel for substrate access.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Chagas disease or American trypanosomiasis, caused by the flagellate protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, has been considered one of the most neglected diseases in the world. The available control strategy has not fully helped to reduce disease burden. Despite Brazil's efforts to control this disease, a large segment of the population still suffers from its effects [1]. The most recent estimate data from the Disease Control Priorities Project of the National Institutes of Health and World Bank indicate an overall number of 9.8 million people infected with *T. cruzi* [2].

The progression of this disease can lead to symptoms such as inflammatory cardiomyopathy, neural disorders, and digestive injuries. A large percentage of Chagas patients receive no specific antiparasitic therapy because of the ineffectiveness and toxicity of the pharmacological agents in use (nifurtimox and benznidazole). Hence, better therapeutic agents and novel drug targets need to be developed, but when focusing on the challenges facing drug

target selection and characterization, care must be taken before the search for active compounds can begin. This means that we must, for instance, describe the biochemical mechanism of targets to achieve active site complementarity (steric, electrostatic, and hydrophobic).

Trypanosoma cruzi dihydroorotate dehydrogenase (TcDHODH,¹ EC 1.3.99.11) catalyzes a coupled redox reaction in which dihydroorotate (DHO) is oxidized to orotate and fumarate is reduced to succinate. This is the fourth enzymatic step in the pyrimidine *de novo* biosynthetic pathway [3]. Although the enzymatic function of dihydroorotate dehydrogenases (DHODs) is conserved in all organisms, the enzymes in prokaryotic and eukaryotic organisms are quite different [4].

Based on amino acid sequence identity, DHODs have been classified into two families referred to as family 1 and family 2. Family

* Corresponding author. Address: Grupo de Química Medicinal de Produtos Naturais, NEQUIMED-PN, Departamento de Química e Física Molecular, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 13560-970 São Carlos, SP, Brazil. Fax: +55 16 3373 9985.

E-mail address: montana@iqsc.usp.br (C.A. Montanari).

¹ Abbreviations used: TcDHODH, *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase; DHO, dihydroorotate; DHOD, dihydroorotate dehydrogenase; NAD⁺, nicotinamide adenine dinucleotide; ITC, isothermal titration calorimetry; DMSO, dimethyl sulfoxide; IPTG, isopropyl β -D-thiogalactoside; Ni-NTA, nickel-nitrilotriacetic acid; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis; UV, ultraviolet; HTS, high-throughput screening; FMN, flavin mononucleotide.



Effects of organic solvents on the enzyme activity of *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in calorimetric assays

H.J. Wiggers^a, J. Cheleski^a, A. Zottis^b, G. Oliva^b, A.D. Andricopulo^b, C.A. Montanari^{a,*}

^a Departamento de Química e Física Molecular, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 13560-970 São Carlos, SP, Brazil

^b Laboratório de Química Medicinal e Computacional, Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 13560-970 São Carlos, SP, Brazil

Received 7 May 2007

Available online 6 July 2007

Abstract

In drug discovery programs, dimethyl sulfoxide (DMSO) is a standard solvent widely used in biochemical assays. Despite the extensive use and study of enzymes in the presence of organic solvents, for some enzymes the effect of organic solvent is unknown. Macromolecular targets may be affected by the presence of different solvents in such a way that conformational changes perturb their active site structure accompanied by dramatic variations in activity when performing biochemical screenings. To address this issue, in this work we studied the effects of two organic solvents, DMSO and methanol (MeOH), in the isothermal titration calorimetry (ITC) kinetic assays for the catalyzed reaction of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) from *Trypanosoma cruzi*. The solvent effects on *T. cruzi* GAPDH had not yet been studied. This enzyme was shown here to be affected by the organic solvents content up to 5.0% for MeOH and up to 7.5% for DMSO. The results show that when GAPDH is assayed in the presence of DMSO (5%, v/v) using the ITC experiment, the enzyme exhibits approximately twofold higher activity than that of GAPDH with no cosolvent added. When MeOH (5%, v/v) is the cosolvent, the GAPDH activity is sixfold higher. The favorable effects of the organic solvents on the Michaelis–Menten enzyme–substrate complex formation ensure the consistency of the biological assays, structural integrity of the protein, and reproducibility over the measurement time. The reaction was also kinetically monitored by standard spectrophotometric assays to establish a behavioral performance of *T. cruzi* GAPDH when used for screening of potential inhibitors.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Chagas disease; Isothermal titration calorimetry; Enzyme kinetics; Organic solvents

Traditional and high-throughput screening techniques are widely employed for the identification of hits and leads for a large number of relevant drug targets. Compatible and integrated systems for measurements of biological activity are a vital component in all stages of the drug discovery and development process. The use of calorimetry to directly measure the heat change associated with thermodynamics for biomolecular processes in buffered solutions is of utmost importance [1]. Because the process needs to be rationalized and automated for the potential low solubility of some chemical hits (not all chemical hits are poorly

soluble), dimethyl sulfoxide (DMSO)¹ is the standard solvent used for preparing stock solutions of compounds for biological screens and assays. This is due mostly to the favorable DMSO solubility of chemically diverse organic compounds, low sensitivity and reactivity in screening assays, and low vapor pressure [2].

One of the challenges in the process of taking a hit to a lead in drug discovery involves the optimization of target binding affinity and selectivity, which usually are directly

¹ Abbreviations used: DMSO, dimethyl sulfoxide; ITC, isothermal titration calorimetry; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; G3P, D,L-glyceraldehyde-3-phosphate; 1,3-DPG, 1,3-diphosphoglycerate; MeOH, methanol; TEA, triethanolamine; SIM, single injection method; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid.

* Corresponding author. Fax: +55 16 3373 9985.

E-mail address: montana@iqsc.usp.br (C.A. Montanari).



Contents lists available at ScienceDirect

Protein Expression and Purification

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yprep

Expression, purification and kinetic characterization of His-tagged glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*

Juliana Cheleski^a, Renato F. Freitas^a, Helton José Wiggers^{a,b}, Josmar R. Rocha^a, Ana Paula Ulian de Araújo^c, Carlos A. Montanari^{a,b,*}

^a Grupo de Estudos em Química Medicinal de Produtos Naturais – NEQUIMED-PN, Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador Sancarlenense, 400, 13560-970 São Carlos, SP, Brazil

^b Departamento de Química – Universidade Federal de São Carlos – São Carlos – SP, Brazil

^c Laboratório de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas”, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos – SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 July 2010

and in revised form 22 November 2010

Available online 4 December 2010

Keywords:

Trypanosoma cruzi Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Escherichia coli expression
Kinetic parameters
Experimental design
Isothermal titration calorimetry
Chagas' disease

ABSTRACT

Trypanosomes are flagellated protozoa responsible for serious parasitic diseases that have been classified by the World Health Organization as tropical sicknesses of major importance. One important drug target receiving considerable attention is the enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease (*T. cruzi* Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (TcGAPDH); EC 1.2.1.12). TcGAPDH is a key enzyme in the glycolytic pathway of *T. cruzi* and catalyzes the oxidative phosphorylation of D-glyceraldehyde-3-phosphate (G3P) to 1,3-bisphosphoglycerate (1,3-BPG) coupled to the reduction of oxidized nicotinamide adenine dinucleotide, (NAD⁺) to NADH, the reduced form. Herein, we describe the cloning of the *T. cruzi* gene for TcGAPDH into the pET-28a(+) vector, its expression as a tagged protein in *Escherichia coli*, purification and kinetic characterization. The His₆-tagged TcGAPDH was purified by affinity chromatography. Enzyme activity assays for the recombinant His₆-TcGAPDH were carried out spectrophotometrically to determine the kinetic parameters. The apparent Michaelis–Menten constant (K_m^{app}) determined for D-glyceraldehyde-3-phosphate and NAD⁺ were 352 ± 21 and 272 ± 25 μ M, respectively, which were consistent with the values for the untagged enzyme reported in the literature. We have demonstrated by the use of Isothermal Titration Calorimetry (ITC) that this vector modification resulted in activity preserved for a higher period. We also report here the use of response surface methodology (RSM) to determine the region of optimal conditions for enzyme activity. A quadratic model was developed by RSM to describe the enzyme activity in terms of pH and temperature as independent variables. According to the RMS contour plots and variance analysis, the maximum enzyme activity was at 29.1 °C and pH 8.6. Above 37 °C, the enzyme activity starts to fall, which may be related to previous reports that the quaternary structure begins a process of disassembly.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Chagas' disease (American trypanosomiasis) affects around 9.8 million in the tropical region from South America to the southern United States, as recently estimated by the Disease Control Priorities Project of the National Institute of Health and World Bank [1–3]. The disease is caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. There is an urgent need for new, effective and affordable drugs against this disease because the existing drug treatment for Chagas' disease based on nifurtimox (LampitTM,

Bayer) and benznidazole (RochaganTM, RadanilTM, Roche), has very poor efficacy, high toxicity and serious side effects [4].

The great dependence of trypanosomatids on glycolysis to obtain energy makes glycolytic enzymes attractive targets for drug design against Chagas' disease [5,6]. *T. cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (TcGAPDH,¹ EC 1.2.1.12) which catalyzes the oxidative phosphorylation of D-glyceraldehyde-3-phosphate (G3P) to 1,3-bisphosphoglycerate (1,3-BPG) coupled to reduction of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) to NADH, is a key enzyme in the glycolytic pathway [7].

* Corresponding author at: Grupo de Estudos em Química Medicinal de Produtos Naturais – NEQUIMED-PN, Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador Sancarlenense, 400, 13560-970 São Carlos, SP, Brazil. Fax: +55 16 3373 9985.

E-mail address: montana@iqsc.usp.br (C.A. Montanari).

¹ Abbreviations used: TcGAPDH, *Trypanosoma cruzi* Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; NAD⁺, nicotinamide adenine dinucleotide; G3P, D-glyceraldehyde-3-phosphate; 1,3-BPG, 1,3-diphosphoglycerate; DMSO, dimethyl sulfoxide; ITC, isothermal titration calorimetry; TEA, triethanolamine; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; Ni-NTA, nickel-nitrilotriacetic acid; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; UV, ultraviolet; IPTG, isopropyl- β -D-thiogalactoside; RSM, response surface methodology.



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>

Original article

Novel insights for dihydroorotate dehydrogenase class 1A inhibitors discovery

Juliana Cheleski^a, Josmar R. Rocha^a, Matheus P. Pinheiro^b, Helton José Wiggers^a, Albérico B.F. da Silva^a, Maria C. Nonato^{b,*}, Carlos A. Montanari^{a,*}^a Grupo de Estudos em Química Medicinal de Produtos Naturais, NEQUIMED-PN, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador Sarcartense 400, 13560-970, São Carlos–SP, Brazil^b Laboratório de Cristalografia de Proteínas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14040-903 Ribeirão Preto, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 July 2010

Received in revised form

21 September 2010

Accepted 23 September 2010

Available online 7 October 2010

Keywords:

Isothermal titration calorimetry

Virtual screening

Chagas' disease

Dihydroorotate dehydrogenase (DHODH)

*Trypanosoma cruzi**Leishmania major*

ABSTRACT

The enzyme dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) has been suggested as a promising target for the design of trypanocidal agents. We report here the discovery of novel inhibitors of *Trypanosoma cruzi* DHODH identified by a combination of virtual screening and ITC methods. Monitoring of the enzymatic reaction in the presence of selected ligands together with structural information obtained from X-ray crystallography analysis have allowed the identification and validation of a novel site of interaction (S2 site). This has provided important structural insights for the rational design of *T. cruzi* and *Leishmania major* DHODH inhibitors. The most potent compound (1) in the investigated series inhibits TcDHODH enzyme with K_i^{app} value of 19.28 μ M and possesses a ligand efficiency of 0.54 kcal mol⁻¹ per non-H atom. The compounds described in this work are promising hits for further development.

© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Parasitic protozoa infect millions of people every year and are some of the most important causes of human sickness, death, mutilation and debilitation. The protozoan order kinetoplastida contains species of the genus *Leishmania* that cause Leishmaniasis and also includes the genus *Trypanosoma*, species that cause Chagas' disease [1,2].

Leishmaniasis (a set of trypanosomal diseases caused by various species of *Leishmania*) has a worldwide distribution most spread in Central and South America, southern Europe, North and East Africa, the Middle East, and the Indian subcontinent. Transmission of Leishmaniasis mostly occurs via the bite of an infected phlebotomine sandfly and can also be transmitted through blood transfusions [3,4]. The pharmacotherapies remain limited, in terms of toxicity, efficacy and by their relative high cost in developing countries [5].

Chagas' disease, caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, is one of the major health problems in several countries of Latin America, extending to southern United States [6]. Despite

Brazil's efforts to control this disease, a large segment of the population still suffers from its effects [7–10].

The most recent estimated data from the Disease Control Priorities Project of the National Institutes of Health and World Bank indicate an overall number of 9.8 million people infected with *T. cruzi* [11]. The only two available drugs (nifurtimox and benznidazole) have several drawbacks such as poor efficacy and multiple side effects. Hence, more effective and safer drugs for human use must be developed.

Knowledge of the biochemistry of *T. cruzi* has revealed new potential targets for chemotherapy intervention. One such important drug target receiving considerable attention is the *T. cruzi* flavoenzyme dihydroorotate dehydrogenase (TcDHODH; EC 1.3.99.11), which catalyzes a coupled redox reaction in which dihydroorotate is oxidized to orotate and fumarate is reduced to succinate [12,13]. In DHODH knockout studies, *T. cruzi* did not express the enzyme protein and could not survive even in the presence of pyrimidine nucleosides, confirming its dependence on *de novo* biosynthesis [14].

In this article, we report the discovery of novel TcDHODH inhibitors by combined use of Isothermal Titration Calorimetry (ITC), virtual screening and X-ray crystallography techniques. Heat changes are a fundamental part of binding events and biochemical reactions. ITC has been extensively used to study thermodynamic

* Corresponding authors. Tel.: +55 16 3373 9986; fax: +55 16 3373 9985.
E-mail address: montana@iqsc.usp.br (Carlos A. Montanari).