JEAN FRANCISCO ROSA RIBEIRO

Estudo *in vitro* do Metabolismo Microssomal Hepático de Agentes Tripanossomicidas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari

São Carlos

2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e pelas excelentes pessoas que colocou no meu caminho.

À minha família, em especial aos meus pais Ângelo Rosa Ribeiro e Oneida Ferreira Ribeiro pelo apoio e por me ensinarem a lutar pelos meus objetivos.

Aos meus irmãos Nilo, Daiane e Judson, pela amizade e pelos bons conselhos.

Aos meus amigos Ricardo, Igor, Gerlado, Leandro, Josmar e Daniella, verdadeiros irmãos que compartilharam comigo bons e maus momentos, sempre dispostos a ajudar e ter uma palavra amiga.

A todos os colegas (membros e ex-membros) do NEQUIMED, Dr. Helton Wiggers, Dr[a]. Juliana Cheleski, M.Sc Fabiana Rosini, M.Sc. Fabyana Soares, M.Sc. Emanuella Fonseca, M.Sc. William Fernandes, Cristian Reyes, M.Sc Cesar Kurohane, Prof. Dr. Andrei Leitão, Prof. Dr. Rosivaldo Borges, Cristian Camilo, Daine Tesuka e Irwin Linares, pela ambiência científica, pelas calorosas discussões que certamente contribuíram para minha formação profissional além dos inúmeros momentos de alegria e de descontração.

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Montanari por me ajudar a superar esse desafio com paciência e confiança. À Dra. Maria Luiza Montanari (Malu) pelas conversas e bons conselhos.

Ao Instituto de Química de São Carlos (IQSC) e a seus funcionários pelo apoio, competência e pela atenção prestada.

Ao Grupo de Síntese Orgânica e CLAE da Universidade Federal de São Carlos UFScar, em especial à professora Dr[a].Regina Vincenzi Oliveira e a pesquisadora Dr[a]. Neila Maria Cassiano pelo precioso auxilio no desenvolvimento desse trabalho.

Ao Grupo de Cromatografia do Instituto de Química de São Carlos (CROMA) em especial ao Professor Dr. Fernando Mauro Lanças e ao Dr. Guilherme Miola Titato por possibilitarem a realização dos estudos de espectrometria de massas.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo financiamento e a bolsa de estudos concedida.

EPÍGRAFE

*"***A medicina consiste da ingestão de substâncias desconhecidas em um organismo que se conhece menos ainda***".*

Voltaire

RESUMO

Em face das recentes exigências das agências regulatórias quanto à aprovação de novos fármacos, os estudos de biotransformação têm-se tornado uma etapa indispensável para a identificação e otimização de compostos bioativos. O objetivo desses estudos é identificar, já nas fases iniciais da descoberta de fármacos, candidatos que apresentam propriedades indesejáveis como a (i) presença de metabólitos ativos ou tóxicos; (ii) inibição de enzimas metabolizadoras; (iii) depuração metabólica inadequada, entre outras. Neste estudo, foi realizada a caracterização metabólica e a identificação de possíveis inibidores das enzimas do citocromo P450 de oito promissores candidatos a fármacos, identificados através de ensaios virtuais como inibidores da *Tc*GAPDH, Cruzaina e *Tc*DHODH, todas do *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas. Esses compostos foram testados contra as três principais isoformas do citrocromo P450: CYP 3A4, CYP 2D6 e CYP2C9. Os valores de IC_{50} de 1,4 µM e 1,3 µM contra a CYP2C9 foram encontrados para os compostos Nequimed53 e Nequimed125, enquanto o Nequimed42 inibiu a CYP 3A4 com um valor de IC_{50} de 7,12 µM. Posteriormente foi conduzida a caracterização metabólica dos compostos Nequimed53 e 125 com foco na identificação dos principais metabólitos, sítios de metabolismo e vias de biotransformação através da técnica de *LC-ESI-QqTOF-MS*. Para ambos os compostos, a biotransformação por microssomas extraídos de fígado de ratos deu-se preferencialmente por uma única via dependente de NADPH. No caso do Nequimed54, o metabólito formado apresentou uma variação da razão *m/z* de +16, indicando a ocorrência da hidroxilação do composto parental, enquanto que para o composto Nequimed125, o metabólito formado apresentou uma variação da razão *m/z* de -28, condizente com a perda de um fragmento etila do composto parental.

Palavras-chave: Citocromo P450, HPLC, Espectrometria de massas, fluorimetria, Metabolismo de fármaco.

ABSTRACT

In the light of recent demands from regulatory agencies for the acceptance of new drugs, the biotransformation studies have become an essential step for the identification and optimization of bioactive compounds. The objective of these studies is to identify compounds that have undesirable properties such as (i) the presence of toxic or active metabolites, (ii) inhibition of metabolizing enzymes, (iii) excessive metabolic clearance, *inter alia*. In this study we characterized the metabolism and cytochrome P450 inhibition of eight compounds identified by virtual screening as inhibitors of *Tc*GAPDH, Cruzain and *Tc*DHODH which are of interest as targets for intervention in treatment of Chagas Disease. These compounds were tested against cytochrome P450 isoforms 3A4, 2D6 and 2C9. IC_{50} values of 1.4 µM and 1.3 µM against CYP 2C9 were observed for Nequimed53 and Nequimed125.while Nequimed42 inhibited CYP 3A4 with an IC_{50} of 7.1 µM. Subsequently, we characterized the *in vitro* metabolism of Nequimed53 and 125 with a focus on metabolite identification and biotransformation pathways using the LC-ESI-MS-QqTOF technique. For each, the biotransformation by rat liver microsomes occurred by a single NADPH-dependent pathway. For Nequimed54, the observed metabolite $[M+16]^+$ indicated hydroxylation of parent compound. The metabolite $[M-28]^+$ observed for Nequimed125 indicated desethylation of the parent compound.

Key-words: Cytochrome P450, HPLC, Mass Spectrometry, Fluorimeter, Drug Metabolism

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1 - Etapas do desenvolvimento de um novo fármaco. Esses estudos estão divididos em duas fases: a fase de estudos pré-clínicos e a fase de estudos clínicos. O químico medicinal atua de forma mais significativa na fase pré-clínica do desenvolvimento.....19

Figura 1.2 - Influencia dos movimentos migratórios na alteração da distribuição geográfica dos casos da doença de Chagas fora da América Latina.....22

Figura 1.3 - Esquema da reação catalisada pela gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Fosforilação oxidativa do gliceraldeído-3-fosfato a 1,3-bifosfoglicerato com concomitante redução do NAD^+ a NADH.....25

Figura 1.4 - Principais inibidores enzimáticos da *Tc*GAPDH desenvolvidos pelo grupo NEQUIMED e os valores de suas constantes de inibição (*Ki*).....26

Figura 1.5 - Esquema de reação de clivagem da ligação peptídica por proteases.....27

Figura 1.6 - Inibidor enzimático da cruzaina desenvolvidos pelo grupo NEQUIMED e o valor de sua constante de inibição (Ki) frente essa enzima.....28

Figura 1.7 - Reação de óxido-redução catalisada pela enzima *Tc*DHODH. 28

Figura 1.8 - Inibidores enzimáticos da *Tc*DHODH desenvolvidos pelo grupo NEQUIMED. 29

Figura 2.1 – Rotas de eliminação dos 200 fármacos mais prescritos em 2002 42

Figura 2.2 - Mecanismo detalhado da reação do citocromo P450. (a) o fármaco forma um complexo com o citocromo P450 oxidado; (b) o NADPH doa um elétron à flavoproteína que reduz o complexo P450-fármaco; (c) o oxigênio une-se ao complexo, (e) e o NADPH ou o NADH doa o segundo elétron, formando o complexo ativado-P450-substrato; (f) o ferro é oxidado com a perda de água; e (g) ocorre à formação do produto oxidado do fármaco. (d) Para a reação de monooxigenação ocorrer, o segundo elétron deve ser entregue rapidamente, caso contrário o complexo se dissocia com a liberação de superóxidos. [18].....43

Figura 4.1 - Substratos fluorogênicos cumarínicos possuem dois potenciais sítios de metabolismo e a oxidação de qualquer um deles libera um metabólito altamente fluorescente em solução aquosa. 51

Figura 4.2 - Variando a razão entre [S]/K_M é possível determinar o modo de inibição de inibidores enzimáticos através da mudança dos valores de IC_{50}. 52

Figura 4.3 – IC_{50} do composto cetoconazol utilizado como controle de inibição positivo para a isoforma CYP 3A4. 53

Figura 4.4 – Estrutura química dos principais grupos toxicofóricos envolvidos na formação de intermediários reativos. 56

Figura 4.5 – Possíveis mecanismos de inibição para as enzimas do citocromo P450. (a) inibição reversível. (b) inibição irreversível, o inibidor é bioativado pela enzima a um intermediário reativo que se liga covalentemente a enzima. (c) inibição irreversível, o inibidor é bioativado pela enzima a um intermediário reativo que se liga covalentemente a apoproteina.(d) Quase-irreversível inibição, o inibidor é bioativado pela enzima a um intermediário destrói o grupo prostético. 56

Figura 4.6 - Mecanismo genérico de inibição irreversível. 57

Figura 4.7 – Determinação experimental dos parâmetros de inativação para inibição da CYP 3A4 pela eritromicina. 58

Figura 4.8 - Procedimento experimental para os ensaios fluorimétricos. 59

Figura 4.9 - Configuração da placa utilizada no ensaio fluorimétrico. 60

Figura 4.10 - perfil da curva de dose-resposta dos compostos Nequimed53 e Nequimed125 frente à isoforma CYP 2C9. 64

Figura 4.11 - IC_{50} do composto Nequimed 42 frente a enzima CYP3A4. 65

Figura 5.1 - Gráfico da polaridade *versus* massa do analito, destacando as regiões onde cada método de ionização é aplicável. 71

Figura 5.2 - Modelo da carga residual (CRM). A evaporação do solvente a partir da gota inicialmente formada conduz a um aumento na densidade de carga na superfície do líquido. Quando a repulsão entre as cargas supera a tensão superficial, ocorre a explosão coulombica e a gota se fragmenta. Esse processo se repete até a liberação dos íons em fase gasosa. 72

Figura 5.3 - Modelo de evaporação iônica (IEM). A evaporação do solvente e a "explosão coulômbica" reduz o tamanho das gotas carregadas até um determinado raio crítico, onde então a emissão de íons na fase gasosa começa ocorrer. 73

Figura 5.4 - Visão funcional do ESI-QqTOF 76

Figura 5.5 – Representação de um correlograma com as distâncias entre o centro reativo do citocromo (Ferro-oxeno, na porção heme) e as diferentes regiões químicas no interior do sítio ativo da enzima. 82

Figura 5.6 – Impressão digital ("Fingerprint") de cada categoria de átomos do substrato. As distâncias entre as diferentes posições atômicas classificadas são medidas e, então, transformadas em códigos binários. Assim, os valores de 1 e 0 são atribuídos a cada "bin", indicando respectivamente a presença ou ausência daquela distância. 83

Figura 5.7 - Cálculo de similaridade entre os correlogramas da CYP e do ligante utilizando o índice de similaridade de Carbó. 84

Figura 5.8 – Cromatogramas do íon extraído de *m/z* 280 no modo de operação MS dos controles e da incubação microssomal referentes ao estudo de biotransformação do composto Nequimed54. 87

Figura 5.9 – Identificação do metabólito *m/z* 296, $[M+16]^+$. A presença do pico cromatográfico apenas na incubação microssomal 54D afasta a possibilidade do mesmo ser um possível interferente da matriz ou um produto de biotransformação não dependente de NADPH. 88

Figura 5.10 – Espectro de fragmentação do íon extraído de *m/z* 280 referente ao composto Nequimed54. 89

Figura 5.11 – Proposta de mecanismo de fragmentação do composto Nequimed54. 90

Figura 5.12 – Colisão de espécies radicalares. Proposta de racionalização dos sinais de *m/z* 144,0820 e 142,0820 presentes no espectro de fragmentação do composto Nequimed54. 90

Figura 5.13 – Proposta global de racionalização do espectro de fragmentação do composto Nequimed54. 91

Figura 5.14 - LC-MS/MS da incubação do composto teste com a suspensão microssomal e NADPH por um período de 6 horas. 92

Figura 5.15 - Espectro de fragmentação do íon de *m/z* 296 e a estrutura referente ao metabólito,destacando-se a região da molécula onde ocorrer a hidroxilação do composto Nequimed54. 93

Figura 5.16 – Posições atômicas consideradas pelo software MetaSite nos estudos de predição de sítio de metabolismo para o composto Nequimed54. 94

Figura 5.17 - vias preferências de biotransformação do composto Nequimed54 preditas pelo MetaSite. 96

Figura 5.18 - Possíveis vias de metabolização da quinolina em humanos. 97

Figura 5.19 - Possíveis vias de metabolização da quinolina em microssomas de fígado de rato. 98

Figura 5.20 - Cromatogramas do íon extraído de *m/z* 375 no modo de operação MS dos controles e da incubação microssomal referentes ao estudo de biotransformação do composto Nequimed125. 100

Figura 5.21 - Identificação do metabólito *m/z* 347, $[M-28]^+$. A presença do pico cromatográfico apenas na incubação microssomal 125D afasta a possibilidade do mesmo ser um possível interferente da matriz ou um produto de biotransformação não dependente de NADPH. 101

Figura 5.22 - Espectro de fragmentação do íon extraído de *m/z* 375 referente ao composto Nequimed125, $[M+H]^+$.....102

Figura 5.23 - Posições atômicas consideradas pelo software MetaSite nos estudos de predição de sítio de metabolismo para o composto Nequimed125. 103

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Valores de IC_{50} determinados experimentalmente para os compostos cetoconazol, quinidina e sulfafenazol utilizados como controles de inibição para as isoformas CYP3A4, CYP2D6 e CYP2C9. 61

Tabela 4.2 -. Estruturas e valores de IC_{50}, das substâncias testadas frente às enzimas CYP3A4, CYP2D6 e CYP2C9. 62

Tabela 5.1 - Reações de biotransformação mais comuns e as respectivas alterações de massas produzidas.....77

Tabela 5.2 - Mais comuns metabólitos de fase II e as correspondentes mudanças de massa. 78

INDÍCE DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

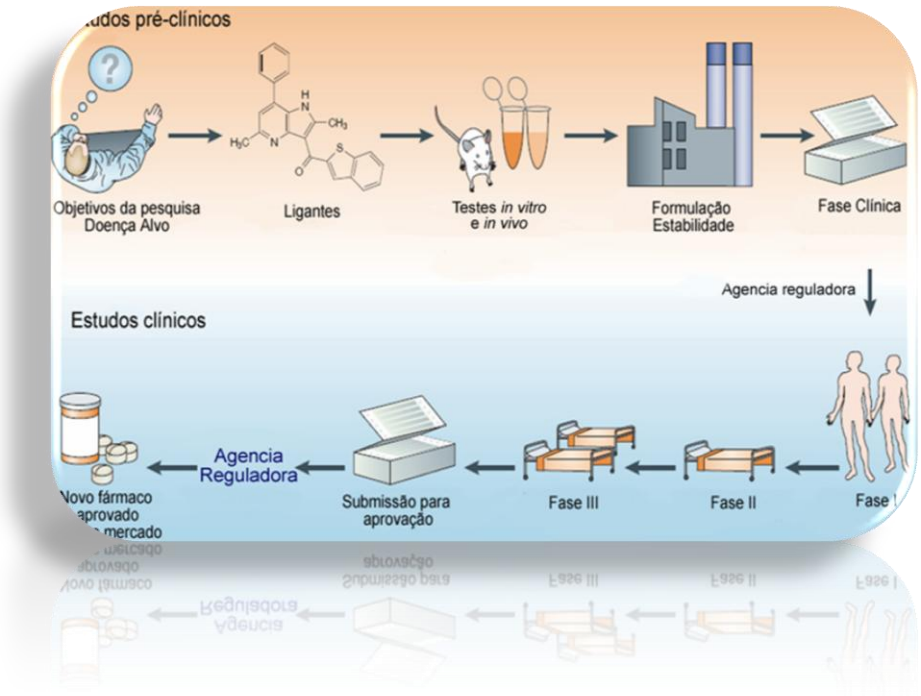
NCE	do inglês, *new chemical entity*
IUPAC	do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*
IND	do inglês, *Investigational New Drug*
FDA	do inglês, *Food and Drug Administration*
ROS	Espécies reativas de oxigênio
*Tc*GAPDH	do inglês, *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase of T.cruzi*
*Tc*DHOHH	do inglês, *Dihydroorotate dehydrogenase of T. cruzi*
G3P	Gliceraldeído 3-fosfato
1,3-BPG	1,3-bisfosfoglicerato
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
K*i*	Constante de inibição
UMP	Uridina monofosfato
DHO	di-hidro orotato
ORO	Orotato
FUM	Fumarato
SUC	Succinato
NADPH	Nicotinamida adenine dinucleotídeo fosfato reduzida
IC_{50}	Concentração inibitória necessária para reduzir em 50% a atividade enzimática
K_M	Constante de Michaellis-Menten
TDI	do inglês, *time-dependent inhibition*
API	do inglês, *Atmospheric Pressure Ionization*
ESI	do inglês, *Electrospray ionization*
APCI	do inglês, *Atmospheric-pressure chemical ionization*
CRM	do inglês, *Charge Residue Model*
IEM	do inglês, *Ion Evaporation Model*
TOF-MS	do inglês, *Time-of-flight mass spectrometry*
MIFs	do inglês, *Molecular Iinteractions Fields*

SUMÁRIO

Capítulo 1 16
Introdução 16
1. INTRODUÇÃO 17
1.1. A Química Medicinal e o planejamento de fármacos 17
1.2. As fases da descoberta e desenvolvimento de fármacos 18
1.3. As três fases da ação de um fármaco 20
1.4. A doença de Chagas 22
1.5. Alvos para o planejamento de novos fármacos voltados para o tratamento da doença de Chagas. 24
1.5.1. Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi* (*TcGAPDH*) 24
1.5.2. A enzima Cruzaina 26
1.5.3. A enzima Diidroorotato desidrogenase 28
1.6. O papel do metabolismo no processo de desenvolvimento de fármacos 29
Capítulo 2 38
2. O METABOLISMO DE FÁRMACOS 39
2.1. Reações de biotransformação e suas enzimas 39
2.2. Reações de fase I ou funcionalização 39
2.3. Reações de fase II ou conjugação 40
2.4. AS ENZIMAS DO CITOCROMO P450 40
Capítulo 3 46
Objetivos 46
3. OBJETIVOS 47
3.1. Objetivos específicos 47
Capítulo 4 48
4. INTERAÇÕES DO TIPO FÁRMACO-FÁRMACO 49
4.1. Estudos de inibição reversível das enzimas do citocromo P450 usando fluorimetria 50
4.2. Estudos de inibição tempo-dependente (TDI) 53
4.3. Materiais e métodos 58

4.3.1. Estudos de inibição reversível 58
4.3.2. Estudos de inibição tempo-dependente 60
4.4. Resultados e discussão 61
Capítulo 5 68
5. ESTUDOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO 69
5.1. Caracterização dos metabólitos e identificação dos sítios de metabolismo 69
5.1.1. Cromatografia líquida de alta eficiência 69
5.1.2. Métodos de ionização a pressão atmosférica 70
5.1.3. Ionização por "electrospray" (ESI) 71
5.1.4. Instrumento híbrido do tipo Qq-TOF 73
5.1.5. Identificação dos metabólitos 76
5.1.6. Métodos *in sílico* aplicados ao estudo de biotransformação de fármacos 78
5.2. Materiais e métodos experimentais 79
5.2.1. Extração e preparação das frações microssomais 79
5.2.2. Procedimentos de incubação "*in vitro*" 80
5.2.3. Predição de sítios de metabolismo utilizando o software MetaSite. 81
5.3. Resultados e discussão 86
5.3.1. Identificação dos metabólitos principais do composto Nequimed54 86
5.3.2. Identificação dos sítios de metabolismo do composto Nequimed54 89
5.3.3. Identificação dos metabólitos principais do composto Nequimed125 99
5.3.4. Identificação dos sítios de metabolismo do composto Nequimed125 101
Capítulo 6 107
6. Conclusões e perspectivas 108
6.1. Conclusões 108
6.2. Perspectivas 109
ANEXO 1 110
ANEXO 2 116

Capítulo 1



Introdução

Neste capítulo é apresentada uma breve introdução sobre o papel da Química Medicinal na descoberta de fármacos, a doença de Chagas, ressaltando a necessidade da descoberta de novos fármacos para seu tratamento e os alvos que estão sob estudo no grupo NEQUIMED, incluindo a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, cruzaina e diidroorotato desidrogenase, todas de *Trypanosoma cruzi*.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Química Medicinal e o planejamento de fármacos

O mercado global de produtos farmacêuticos experimentou um crescimento na venda de medicamentos de US$ 840 bilhões em 2007 para US$ 1 Trilhão em 2012.[1] Além disso, não são poucos os casos de um fármaco que gere bilhões de dólares anuais de receita. Como exemplos de *blockbusters* (termo em inglês para designar os fármacos com vendas anuais acima de US$ 1 bilhão), temos a atorvastatina (Liptor, Pfizer) e o Clopidogrel (Plavix, Sanofi Aventis Farmacêutica) com vendas estimadas em 2007 de 12 e 5,9 bilhões de dólares, respectivamente. [2]

O custo do desenvolvimento de novos fármacos também continua aumentando. O número de fármacos aprovados por bilhão de dólares investidos em pesquisa e desenvolvimento apresentou uma taxa de redução de 50% a cada nove anos, desde 1950. Uma análise de 68 fármacos aprovados estimou-se que sejam necessários em média 15 anos para que uma nova entidade química (NCE) chegue ao mercado a um custo de 800 milhões a 1,4 bilhão de dólares.[2]

Mesmo após o aumento dos investimentos e a introdução de novas tecnologias pela indústria farmacêutica, a taxa de sucesso – partindo-se da escolha do alvo até a obtenção do registro junto às agências regulatórias – é de apenas 10% e o número de novos fármacos aprovados anualmente permanece constante entre 20 a 30 compostos.[3] Atualmente, 30% dos compostos que chegam aos estágios finais do desenvolvimento clínico são abandonados em decorrência, muitas vezes, de problemas farmacocinéticos, como baixa biodisponibilidade, duração de ação inadequada (muito curta ou muito longa), ou a presença de metabólitos ativos, além de problemas de eficácia e segurança clínica.[4] Além disso, a existência de efeitos adversos raros difíceis de serem detectados durante o curso de desenvolvimento do fármaco pode levar à a sua retirada do mercado , gerando enormes prejuízos para a indústria farmacêutica.[5]

Apesar dos inúmeros desafios, antecipar o perfil de candidatos a fármacos com maiores chances de avançar pelos vários estágios do desenvolvimento significa minimizar as potenciais perdas com a falha de um candidato nas fases tardias, e mais caras, do desenvolvimento clínico.[6]

1.2. As fases da descoberta e desenvolvimento de fármacos

A União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, do inglês International Union of Pure and Applied Chemistry) define a Química Medicinal como:

> "*uma área do conhecimento baseada na química, também envolvendo aspectos das ciências biológicas, médicas e farmacêuticas. Está interessada na descoberta, planejamento, identificação e preparação de compostos biologicamente ativos, no estudo do metabolismo, na interpretação de seus modos de ação a nível molecular e na construção de uma relação entre estrutura e atividade*".[7]

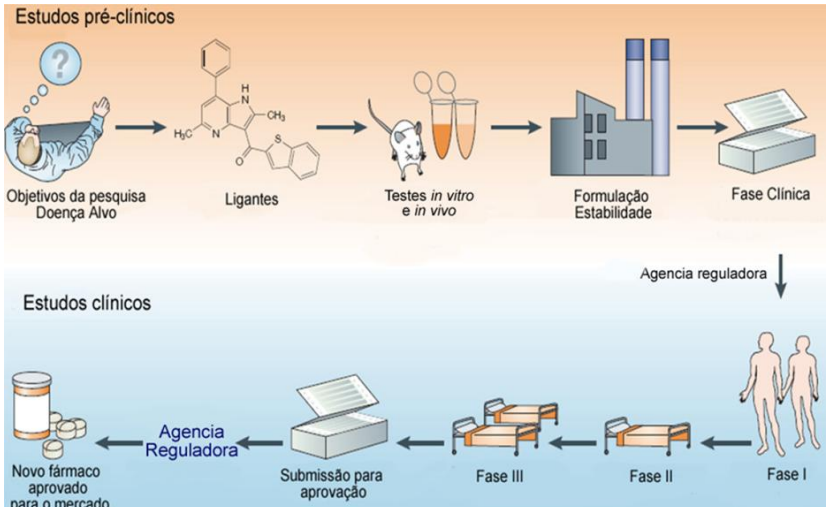
A Química Medicinal envolve uma ampla área de atuação, sendo assim, considerada como multidisciplinar. Essa área do conhecimento se preocupa em preparar ou selecionar compostos apropriados para testes biológicos. Caso um ou uma série de compostos apresentem atividade contra determinado alvo, o químico medicinal procura conhecer o mecanismo de ação desses compostos bem como entender como ocorre o processo de interação molecular a nível topográfico, estrutural e, se possível, energético. Também é importante o conhecimento a respeito da forma com que esses compostos são inativados pelo metabolismo *in vivo* e os parâmetros físico-químicos que regulam a biodisponibilidade dos compostos quando administrados por via oral. Além de tudo isso, ainda é preciso estabelecer uma relação entre a estrutura química e a atividade de uma série de compostos visando eficácia em modelos *in vitro* e segurança em modelos *in vivo*.[8]

O processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos (Figura 1.1) é dividido em duas grandes fases: a fase pré-clínica (descoberta e otimização) e a fase clínica (desenvolvimento).[9]

A fase pré-clínica inicia-se com a identificação da necessidade de uma nova terapia ou a adequação de uma terapia já existente, considerando aspectos de segurança, eficácia e mecanismos de ação. Segue-se a identificação e validação do alvo terapêutico (receptor, enzima,

grupo transportador, DNA, célula, entre outros) e a triagem de substâncias ativas que são capazes de modular a atividade do alvo selecionado, porém com baixa afinidade com o mesmo. Esses compostos são conhecidos como *ligantes* (do inglês *hits*) e podem ser oriundos de produtos naturais, síntese química ou processos biotecnológicos. A próxima etapa é a síntese de estruturas análogas para a maximização da atividade biológica e finalmente a seleção de um ou mais *compostos-matriz* (do inglês, *lead compound*) como candidatos para o desenvolvimento do fármaco. Esses compostos passam por avaliações toxicológicas em animais e caso sejam aprovados em todos os testes, os dados acumulados da pesquisa são reunidos na forma de um comunicado especial (*CE*) à ANVISA, ou como uma solicitação de registro para investigação de um novo fármaco (*IND*, do inglês, *Investigational New Drug*) ao FDA. Uma vez que a autorização para as pesquisas é concedida, há a necessidade da síntese em larga escala dos candidatos a fármacos para possibilitar os estudos de formulação, avaliações sobre o uso em longo prazo em animais e os estudos das fases clínicas.[9]

Figura 1.1 - Etapas do desenvolvimento de um novo fármaco. Esses estudos estão divididos em duas fases: a fase de estudos pré-clínicos e a fase de estudos clínicos. O químico medicinal atua de forma mais significativa na fase pré-clínica do desenvolvimento



Fonte: 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.

Na fase clínica o principal objetivo é o aperfeiçoamento das propriedades farmacocinéticas e farmacêuticas (formulação química) das substâncias selecionadas para que estas se tornem aptas ao uso clínico. Os testes de fase I geralmente são conduzidos em pequenos

grupos de voluntários sadios. Esses voluntários submetem-se a exames médicos exaustivos e são rigorosamente monitorados com a finalidade de avaliar a eficácia e segurança, bem como o comportamento do novo fármaco no corpo humano, gerando assim informações sobre formulação, absorção, distribuição, biodisponibilidade, eliminação e efeitos colaterais. Os testes de fase II são conduzidos em pequenos grupos de pacientes que têm a condição para a qual o fármaco foi desenvolvido como opção de tratamento. Estes testes avaliam a eficácia e também ajudam a estabelecer o nível das doses e a posologia. O sucesso dessa fase conduz aos testes de fase III, nos quais o novo produto é testado num grande número de pacientes, fornecendo dados sobre a segurança e a eficácia, a fim de satisfazer as agências regulatórias. Para os poucos candidatos que sobrevivem a esta série de testes, todos os dados acumulados durante a pesquisa são submetidos à ANVISA na forma de um pedido de registro do novo fármaco, ou como a *Aplicação de Novo Fármaco* (*NDA*, do inglês, *New Drug Aplication*), no caso do FDA. Todos os dados são revisados por especialistas das próprias agências e somente após a aprovação, o fármaco pode ser prescrito pelos médicos aos pacientes para tratar a doença para a qual foi designado. Na fase clínica IV são realizados os monitoramentos pós-comercialização dos novos fármacos. [10]

1.3. As três fases da ação de um fármaco

Para produzir seus efeitos característicos, um fármaco deve estar presente em concentrações apropriadas em seus locais de ação. Embora sejam evidentemente proporcionais à quantidade de substância administrada, as concentrações de fármaco ativo (não ligado) obtidas dependem da extensão e da taxa de sua absorção, sua distribuição (que reflete principalmente a ligação relativa às proteínas plasmáticas e teciduais), seu metabolismo (biotransformação) e sua excreção. Essas características são influenciadas por propriedades físico-químicas do fármaco como tamanho, forma molecular, grau de ionização, lipossolubilidade relativa, entre outras.[9] A ação de um fármaco quando administrado a humanos ou animais, pode ser dividida em três fases: a fase farmacêutica, farmacocinética e farmacodinâmica.

A fase farmacêutica (algumas vezes chamada de biofarmacêuticas) envolve a escolha da via de administração apropriada, bem como a formulação adequada para otimizar a absorção e distribuição do fármaco. Algumas das possíveis rotas de administração são oral, intravenosa, nasal, transdermal, retal, entre outras. Já a fase farmacodinâmica trata diretamente da natureza e qualidade das interações entre o fármaco e seu alvo biomacromolecular. O desafio nessa etapa é maximizar a potência e minimizar os efeitos adversos.[9]

Por fim, a fase farmacocinética abrange os processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção. A absorção é definida como a taxa de saída do fármaco do seu local de administração para a corrente sanguínea. A taxa de absorção de uma substância química depende de sua capacidade de cruzar as membranas biológicas, que funcionam como uma barreira física à entrada de substâncias estranhas no organismo e podem variar quanto a sua composição e o grau de seletividade. A quantidade de fármaco que alcança a circulação sistêmica é definida como a fração biodisponível e, uma vez que a maioria dos fármacos alcança seus locais de ação diretamente a partir da circulação sistêmica, esse é um parâmetro importante durante os processos de otimização das propriedades farmacocinéticas. A distribuição do fármaco no organismo ocorre através do sistema circulatório e em menor escala através da circulação linfática, podendo a partir daí alcançar qualquer tecido, exceto aqueles protegidos por membranas de permeabilidade seletiva, como cérebro e testículos. De forma geral, os órgãos e tecidos apresentam grandes diferenças em suas capacidades de captar fármacos, devido a diferenças na concentração plasmática do fármaco, controladas principalmente pelo pH dos vários compartimentos do corpo, fluxo sanguíneo variável nos diferentes tecidos e órgãos e a capacidade do fármaco de se ligar a proteínas plasmáticas.[9]

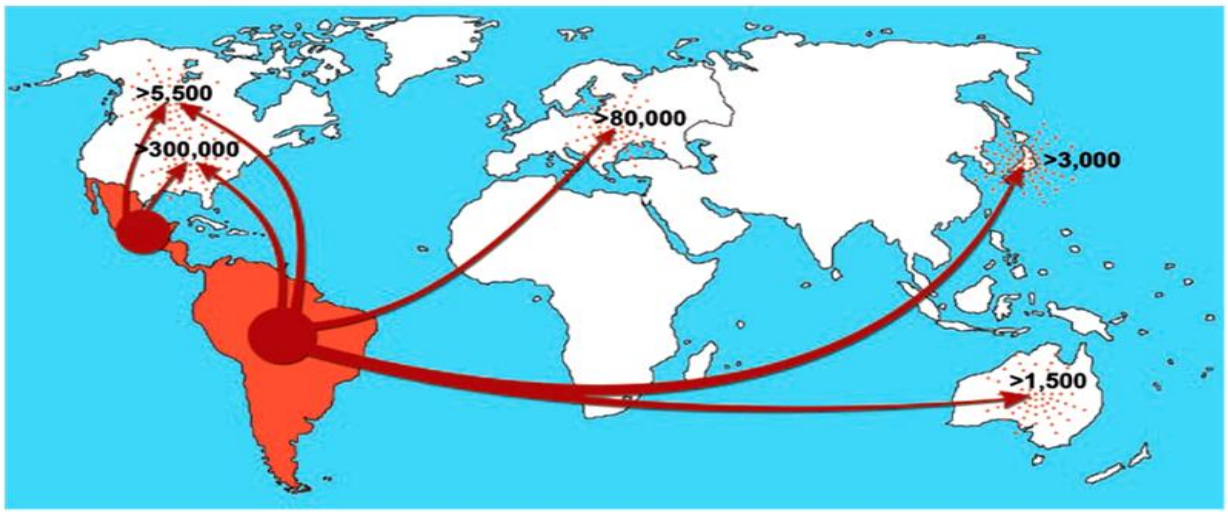
O metabolismo tem a função de transformar quimicamente os fármacos ou qualquer outra substância estranha ao organismo (xenobiótico) em compostos mais solúveis em água para facilitar sua excreção através da urina e outros sítios de excreção. Geralmente tais reações levam à produção de metabólitos sem qualquer atividade farmacológica. No entanto, metabólitos ativos, tóxicos e até mesmo com atividade distinta do fármaco original podem ser formados.[11]

Depois que o efeito farmacológico foi exercido, o fármaco e seus metabólitos devem ser excretados do organismo com uma cinética apropriada. Um processo de eliminação muito rápido leva a necessidade de administração de várias doses e uma aceitação menor do paciente.[9] As principais rotas de excreção do fármaco do organismo são a renal (urina) e retal (fezes), mas ocasionalmente também podem ocorrer outras vias (e.g. pulmonar, salivar, cutânea).[9]

1.4. A doença de Chagas

O *Trypanosoma cruzi* é o protozoário agente causador da doença de Chagas (tripanossomíase americana ou esquizotripanose).[12] Essa doença é uma antroponose frequente nas Américas, principalmente na América Latina. No entanto, sua distribuição epidemiológica tem sofrido grandes modificações, uma vez que a doença tem se espalhado para regiões antes consideradas incomuns. Essas mudanças têm ocorrido devido a fenômenos migratórios de regiões endêmicas (América Latina) para regiões não endêmicas (América do Norte, Europa, Austrália e Japão) como podemos observar na Figura 1.2. [13,14]

Figura 1.2 - Influencia dos movimentos migratórios na alteração da distribuição geográfica dos casos da doença de Chagas fora da América Latina.



Fonte: COURA, J. R. V., P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. Nature, v. 465, n. 7301, p. S7, 2010.

A transmissão dessa doença ocorre através do inseto vetor, o barbeiro (80 a 90%), transfusão sanguínea (5 a 20%) e por via congênita (0.5 a 8%). Além disso, tem sido relatada a transmissão através de alimentos contaminados [13,14,15]. Sua etiologia foi descrita em 1909 pelo médico sanitarista Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas, quando encontrou no sangue de uma criança febril o mesmo protozoário encontrado nos barbeiros e nas diversas espécies de animais examinadas na região de Lassance, Minas Gerais. Carlos Chagas conseguiu naquela época descobrir o agente etiológico, *T. cruzi*, sua biologia no hospedeiro vertebrado e invertebrado, seus reservatórios e diversos aspectos da patogenia e sintomatologia pertinentes à fase aguda da doença. Infelizmente a doença de Chagas, ainda hoje é um problema médico-social grave. Na América Latina, essa doença afeta cerca de 10 milhões de indivíduos, sendo que mais de 25 milhões estão sob risco de infecção. Mesmo depois de 104 anos de sua descoberta, a fármaco-terapia da doença de Chagas ainda continua ineficaz na fase crônica da doença. [12]

A doença de Chagas apresenta uma fase aguda e outra crônica. A primeira geralmente é assintomática, embora raramente possa levar ao desenvolvimento da meningoencefalite, que é fatal. Outros sintomas possíveis são: febre, anorexia, dilatação do fígado e do baço, e inflamações do miocárdio. O caso crônico permanece assintomático entre dez e vinte anos. No entanto, neste período de bem-estar geral, o parasito continua se reproduzindo continuamente em baixos números, causando danos irreversíveis em órgãos como o cérebro e o coração. O resultado é apenas aparente após uma ou duas décadas de progressão, com 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. No cérebro há frequentemente a formação de granulomas. Neste estágio a doença é geralmente fatal mesmo com tratamento. [12]

Atualmente, a doença de Chagas é tratada por dois fármacos, o benzonidazol e o nifurtimox. Esses fármacos apresentam eficácia limitada, sérios efeitos adversos, genotoxicidade, requerem administração por longo período de tempo e, ainda, já são conhecidas cepas resistentes aos mesmos. O mecanismo de ação do nifurtimox baseia-se na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) como o ânion superóxido e peróxido de hidrogênio e a ação do benzonidazol é

resultado da modificação covalente de macromoléculas por derivados reduzidos. Não existem tratamentos para a forma indeterminada e crônica.[16] Existem, no entanto, tentativas de se empregar outras substâncias, sendo que poucas apresentaram resultados promissores até o momento. O posaconazol levou à cura parasitológica em modelos murinos com doença de Chagas nas fases aguda e crônica e está atualmente na fase de estudos clínicos.[16]

1.5. Alvos para o planejamento de novos fármacos voltados para o tratamento da doença de Chagas.

Muitos alvos macromoleculares de várias vias metabólicas do parasito vêm sendo investigados para o tratamento da doença de Chagas, como por exemplo, enzimas envolvidas na via de síntese de esteróis, enzimas da classe das cisteíno proteases, no metabolismo do pirofosfato, na síntese da tripanotiona, da via da salvação das purinas e pirimidinas, da via glicolítica e outras.[16,17]

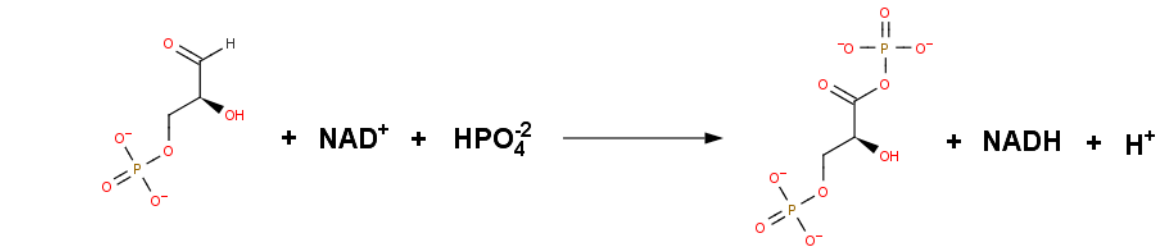
O Grupo de Estudos em Química Medicinal (NEQUIMED) tem despendido um grande esforço para o desenvolvimento de novas substâncias com potencial atividade tripanossomicida. O grupo se dedica ao estudo de três alvos enzimáticos do *T. cruzi:* as enzimas Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase (*Tc*GAPDH), Cruzaina e a Di-hidro orotato Desidrogenase (*Tc*DHODH). Ao longo de seis anos, vários inibidores enzimáticos foram propostos com base em um criterioso planejamento computacional e muitos deles apresentaram atividade *in vitro* não apenas contra os referidos alvos enzimáticos, mas também contra cepas resistentes do parasito. Segue uma breve descrição destes alvos, bem como alguns dos inibidores enzimáticos propostos pelo grupo, os quais foram estudados nesse trabalho.

1.5.1. Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi* (*TcGAPDH*)

A via glicolítica tem se tornado uma das rotas metabólicas mais promissoras para o desenvolvimento de novos compostos anti-chagásicos. O *T. cruzi* depende exclusivamente da glicólise para a obtenção de energia, já que não apresenta um ciclo de Krebs funcional. [18] Esta grande dependência da glicólise como fonte de energia é que faz das enzimas da via glicolítica alvos importantes para o planejamento de substância tripanossomicidas. Engel *et al*. mostrou 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 tripomastigotas.[19]

Ocupando a sexta posição da via glicolítica, a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) promove a fosforilação oxidativa do substrato gliceraldeído 3-fosfato (G3P) para 1,3-bisfosfoglicerato (1,3-BPG), reação essa dependente do co-fator NAD^+, como exemplificado na Figura 1.3.[20]

Figura 1.3 - Esquema da reação catalisada pela gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Fosforilação oxidativa do gliceraldeído-3-fosfato a 1,3-bifosfoglicerato com concomitante redução do NAD^+ a NADH.



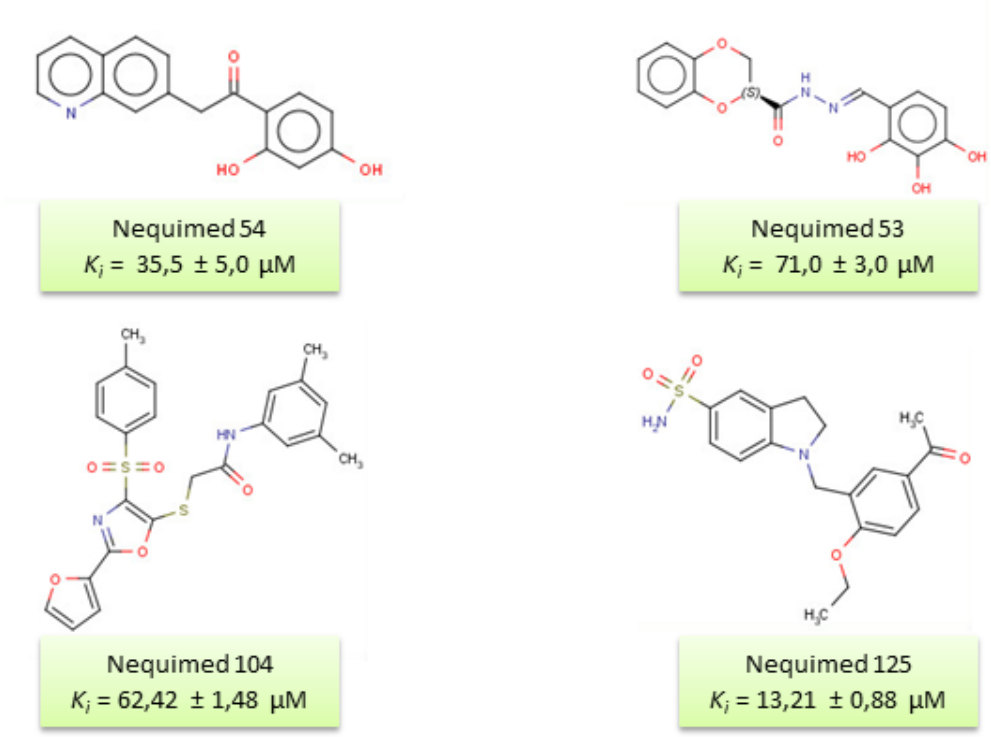
Gliceraldeído-3-fosfato (G3P)

1,3- Bisfosfoglicerato (1,3-BPG)

Em estudos realizados por Bakker *et al.*, identificou-se os alvos mais promissores para o desenvolvimento de fármacos tripanossomicidas utilizando modelos matemáticos para calcular quais as etapas da glicólise precisam ser menos inibidas para induzir uma redução significativa do fluxo glicolítico. Segundo esse estudo, uma inibição de 84% dessa enzima conduz uma redução de 50% no fluxo glicolítico. [21] Esse conjunto de características explica o motivo pelo qual essa enzima se tornou um alvo promissor na busca por novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas.[22]

Em estudos realizados em nosso grupo de pesquisa, novas classes químicas foram identificadas como inibidores da *Tc*GAPDH e algumas delas foram ativas contra o parasito. Segue na Figura 1.4 as estruturas dos principais inibidores enzimáticos da *Tc*GAPDH desenvolvidos pelo grupo, bem como os valores de suas constantes de inibição (K_i) frente essa importante enzima da via glicolítica. [23-24]

Figura 1.4 - Principais inibidores enzimáticos da *Tc*GAPDH desenvolvidos pelo grupo NEQUIMED e os valores de suas constantes de inibição (*Ki*).



1.5.2. A enzima Cruzaina

A cruzaina, uma cisteíno endoprotease que catalisa reações de hidrólise de ligações peptídicas (Figura 1.5), é uma enzima chave na patogenicidade da doença de Chagas, uma vez que está envolvida em vários processos celulares como invasão da célula do hospedeiro e nutrição do parasito.

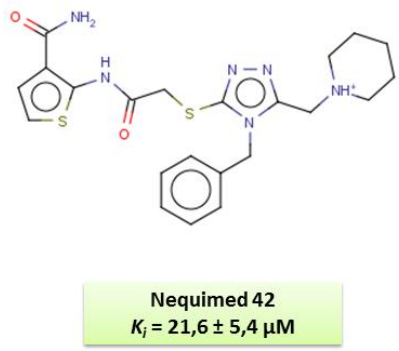
Figura 1.5 - Esquema de reação de clivagem da ligação peptídica por proteases.

Essa enzima é também reconhecida como um antígeno imunodominante durante a infecção em humanos com uma possível participação da defesa do parasito frente às reações do organismo humano. Foi sugerida a participação direta dessa protease no dano do tecido hospedeiro causado pela secreção dessa enzima, conduzindo a ruptura das células infectadas. Além disso, acredita-se que a morte do parasito também pode promover a liberação dessa protease, conduzindo a dano tecidual e estímulo do sistema imunológico do hospedeiro. [2529] A inibição desta enzima bloqueia a proliferação das formas extracelular epimastigotas e intracelular amastigotas, indicando um papel fundamental na sobrevivência, diferenciação e crescimento do parasito.[30]

A enzima cruzaina é um alvo validado e por esse motivo uma intensa busca por inibidores foi realizada por vários grupos de pesquisa em todo mundo nos últimos vinte anos. A descoberta de novos compostos, provenientes de classes químicas distintas, mais seguros e eficazes representa uma importante contribuição para o desenvolvimento da quimioterapia da doença de Chagas.

Com esse propósito, o grupo NEQUIMED contribuiu com a descoberta de novas classes químicas identificadas como inibidores da cruzaina. Tais substâncias promoveram a inibição em concentração micromolar frente à enzima e apresentam atividades confirmadas frente ao *T. cruzi*. Tais características oferece uma oportunidade de otimização da estrutura molecular dessas substâncias utilizando tanto critérios farmacodinâmicos quanto farmacocinéticos. Dentre essas substancias, o composto Nequimed42 foi considerado o mais promissor por apresentar os melhores valores de inibição frente a enzima e o parasito. A Figura 1.6 traz a estrutura química desse inibidor, bem como sua constante de inibição contra a cruzaina.[31]

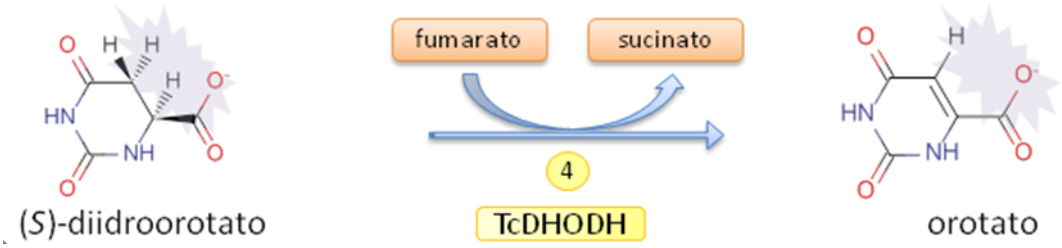
Figura 1.6 - Inibidor enzimático da cruzaina desenvolvidos pelo grupo NEQUIMED e o valor de sua constante de inibição (Ki) frente essa enzima.



1.5.3. A enzima Di-hidro orotato desidrogenase

Esta enzima ocupa a quarta posição na via de biossíntese de novo de UMP, o precursor de todos os nucleotídeos de pirimidina, e catalisa a oxidação do (S) di-hidro orotato (DHO) a orotato (ORO) com concomitante redução do fumarato (FUM) a succinato (SUC), segundo um mecanismo enzimático do tipo ping-pong, mostrado resumidamente na Figura 1.7. [23-32]

Figura 1.7 - Reação de óxido-redução catalisada pela enzima *Tc*DHODH.



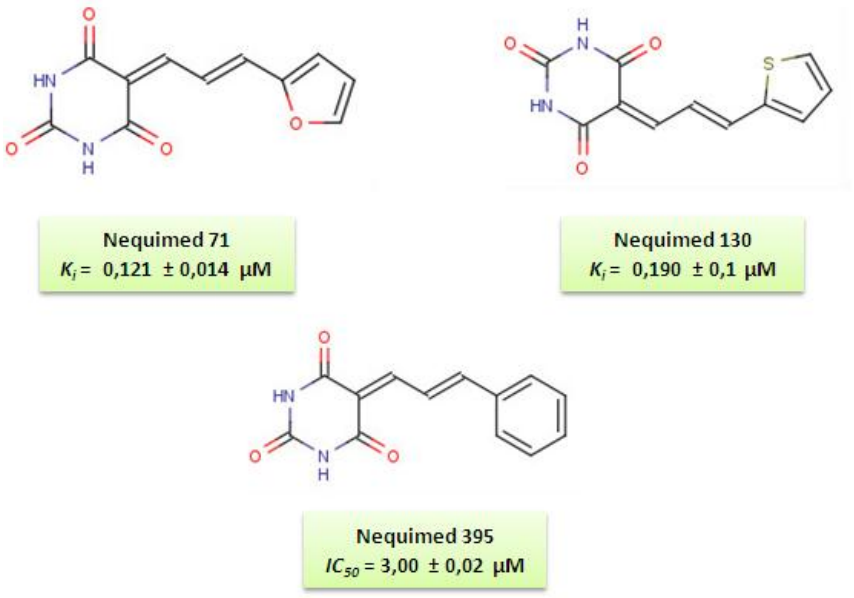
Fonte: ROCHA, J. R. *Planejamento de Inibidores das Enzimas Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase e Diidroorotato Desidrogenase de Trypanosoma cruzi*. 201 f. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências - área de concentração: Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

Essa reação corresponde à única etapa de oxido-redução na síntese de novo de nucleotídeos de pirimidina. Durante a catálise, a DHODH utiliza a flavina mononucleotídeo (FMN) como coenzima na primeira parte da reação para promover a oxidação do substrato DHO enquanto FMN é reduzido. Na segunda parte da reação, FMN é reoxidado através do auxílio de

um segundo substrato, o agente oxidante, cuja natureza varia entre as enzimas codificadas por genes diferentes da mesma família. No caso da enzima DHODH de tripanosomatídeos como *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania major*, o fumarato é o agente oxidante. Estudos utilizando experimentos de "knock out" do gene que codifica a enzima Diidroorotato desidrogenase de TcDHODH sugerem o papel essencial desta enzima para a sobrevivência do parasito. [23-32]

O grupo Nequimed foi pioneiro no desenvolvimento de novas classes de substancias inibidoras dessa enzima por meio de um criterioso programa de planejamento molecular racionamente dirigido. A Figura 1.8 mostra a estrutura química e os valores de inibição de alguns dessas substancias estudadas nesse trabalho.[23-32]

Figura 1.8 - Inibidores enzimáticos da *Tc*DHODH desenvolvidos pelo grupo NEQUIMED.



1.6. O papel do metabolismo no processo de desenvolvimento de fármacos

Mesmo apresentando excelentes valores de inibição, muitas destas moléculas podem ser reprovadas nas fases tardias do desenvolvimento em decorrência de problemas de absorção, distribuição, metabolização e excreção inadequada. Contudo, a maioria desses problemas podem

ser identificados e contornados ainda nas fases iniciais do processo de desenvolvimento, evitando-se perdas significativas de tempo e dinheiro. Propriedades metabólicas inadequadas têm sido a principal causa de falha de ínúmeros candidatos durante as fases de desenvolvimento clínico. Muitas dessas substâncias apresentam taxas de metabolização inadequadas, problemas de toxicidez por gerarem metabólitos reativos ou ainda promovem a inibição de importantes enzimas metabolizadoras, como por exemplo, as enzimas do citocromo P450. Todas esssas características têm forçado uma mudança de paradígma dentro da indústria farmacêutica que agora tem passado a preconisar a realização dos estudos farmacocinético já nas fases de identificação dos ligantes. Assim, essas propriedades são avaliadas e otimizadas juntamente com as propriedades farmacodinâmicas.

Um importante conceito na química medicinal é o planejamento de fármacos "moles" ou "duros" como estratégia para otimizar parâmetros farmacocinéticos. Fármacos moles (do inglês, **soft drugs**), são compostos planejados para produzirem metabólitos conhecidamente não tóxicos, depois de terem alcançado sua função terapêutica. Enquanto que fármacos duros (do inglês, **hard drugs**), são aqueles planejados para conter características estruturais necessárias para a atividade farmacológica sem serem susceptíveis à transformação metabólica ou química. O planejamento de fármacos duros não apenas soluciona o problema de toxidez devido a intermediários reativos ou metabólitos ativos como também proporcionam uma farmacocinética mais simples e previsível de forma que o fármaco possa ser excretado primariamente pela bile ou pelos rins.[33]

O químico medicinal pode bloquear ou, até mesmo, promover o metabolismo, a partir de modificações estruturais dos compostos no sentido de obter fármacos com perfis farmacológicos mais favoráveis.[33] De modo geral, a taxa de metabolismo pode ser reduzida através da incorporação de grupos funcionais estáveis (grupos bloqueadores) em sítios metabolicamente vulneráveis, desde que estas mudanças não sejam prejudiciais à atividade farmacológica. Exemplos clássicos incluem: bloqueio da oxidação de posições específicas em anéis aromáticos através da introdução de grupos fortemente retiradores de elétrons ($-CF_3$, $-SO_2NH_2$, $-SO_3^-$); introdução de um grupo N-t-butil para prevenir a N-desalquilação; troca de uma ligação éster

lábil por um grupo amida; a restrição conformacional da molécula em uma posição desfavorável para a via metabólica e o bloqueio de um grupo lábil por impedimento estérico.[33]

Essas modificações são orientadas pelos estudos de caracterização metabólica que identificam quais são as regiões metabolicamente vulneráveis na estrutura química de um composto, bem como quais os processos de biotransformação dirigem sua eliminação do organismo. Isso é frequentemente realizado através de estudos de metabolismo *in vitro* utilizando-se frações subcelulares (tais como microssomal, citosólica e S9), fragmentos de fígado, hepatócitos e enzimas expressas em sistemas heterólogos. Se um determinado composto apresenta um curto tempo de meia-vida com a produção de um simples metabólito majoritário, a identificação do sítio de metabolismo se torna uma etapa essencial para que o químico medicinal possa propor modificações estruturais apropriadas para produzir análogos mais estáveis. Estes estudos ganham uma relevância ainda maior quando os metabólitos gerados apresentam algum tipo de atividade farmacológica ou estão envolvidos em algum evento de toxidez. Nesses casos uma completa caracterização do metabólito é requerida.

Outro problema muito comum dentro do contexto de metabolismo de fármacos está relacionado com as interações do tipo fármaco-fármaco. No decorrer dos últimos 20 anos, um grande número de novas classes de agentes terapêuticos foi introduzido na prática clínica. Entre essas classes incluem os inibidores seletivos da recaptação da serotonina (SSRI), antidepressivos de mecanismo misto, novos agentes antifúngicos da classe dos azóis, agentes antimicrobianos da classe dos macrolídeos e os novos agentes antirretrovirais usados na terapia contra a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Muitos desses composotos possuem como propriedades farmacológicas secundárias a inibição ou a indução das enzimas do citocromo P450 (CYPs), responsáveis pelo metabolismo oxidativo da maioria dos fármacos usados na prática clínica. [3439] A inibição de algumas dessas enzimas pode promover o acúmulo tóxicos de outros fármacos coadministrados ou ainda alterar o metabolismo de substâncias endógenas. Assim, torna-se vital a avaliação dessa propriedade o quanto antes, evitando que compostos que possuam essa característica indesejável avance para os estágios mais tardios do desenvolvimento clínico, onde invariavelmente serão reprovados, causando grandes prejuízos.

Nesse trabalho será conduzida uma avaliação *in vitro* do potencial inibitório de oito promissores candidatos a fármacos desenvolvidos no grupo Nequimed, frente às isoformas CYP 3A4, CYP 2D6 e CYP 2C9, buscando identificar precocemente o envolvimento dessas substâncias em interações do tipo fármaco-fármaco. Além disso, será conduzida a caracterização metabólica de dois promissores inibidores enzimáticos desenvolvidos no grupo (Nequimed54 e Nequimed125) com foco na identificação dos principais metabólitos, sítios de metabolismo e vias de biotransformação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SMITH, G. *Global Pharmaceuticals & Medicine Manufacturing: Market Research Report.* 2013

2. CHONG, C. R.; SULLIVAN, D. J. New uses for old drugs. **Nature**, v. 448, n. 7154, p. 645-646, 2007.

3. ZHAO, H.; GUO, Z. Medicinal chemistry strategies in follow-on drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 14, n. 9-10, p. 516-522, 2009.

4. HOPKINS, A. L. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery. **Nat Chem Biol**, v. 4, n. 11, p. 682-690, 2008.

5. WADMAN, M. Journal grows suspicious of Vioxx data. **Nature**, v. 438, n. 7070, p. 899-899, 2005.

6. KOLA, I.; LANDIS, J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? **Nat Rev Drug Discov**, v. 3, n. 8, p. 711-716, 2004.

7. WERMUTH, C. G.; GANELLIN, C. R.; LINDBERG, P.; MITSCHER, L. A. Glossary of terms used in medicinal chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 70, n. 5, p. 1129-1143, 1998.

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

9. PETER, I. Medicinal Chemistry: Definitions and Objectives, Drug Activity Phases, Drug Classification Systems. In: CAMILLE GEORGES, W. (Ed.). **The Practice of Medicinal Chemistry (Third Edition)**. New York: Academic Press, 2008. p. 63-72.

10. 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.

11. CAMILLE G, W. Designing Prodrugs and Bioprecursors. In: CAMILLE GEORGES, W. (Ed.). **The Practice of Medicinal Chemistry (Third Edition)**. New York: Academic Press, 2008. p. 721-746.

12. CHERNUSHEVICH, I. V.; LOBODA, A. V.; THOMSON, B. A. An introduction to quadrupole–time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 36, n. 8, p. 849-865, 2001.

13. COURA, J. R.; VINAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 465, n. 7301, p. S6-S7, 2010.

14. A pesquisa de novas drogas para o tratamento da doença de Chagas: Disponível em: < http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=124>. Acesso em: 27 jan., 2011

15. COURA, J. R.; CASTRO, S. L. D. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 3-24, 2002.

16. URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 55-68, 2010.

17. 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 Resistance Updates**, v. 4, n. 1, p. 50-65, 2001.

18. ENGEL, J. C.; FRANKE DE CAZZULO, B. M.; 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. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 26, n. 1-2, p. 1-10, 1987.

19. 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. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 26, n. 1, p. 1-10, 1987.

20. 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 Letters**, v. 424, n. 3, p. 131-135, 1998.

21. OPPERDOES, F. R. Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. **Annual Review of Microbiology**, v. 41, p. 127-151, 1987.

22. BAKKER, B. M.; MICHELS, P. A. M.; OPPERDOES, F. R.; WESTERHOFF, H. V. What Controls Glycolysis in Bloodstream Form *Trypanosoma brucei*? **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 21, p. 14551-14559, 1999.

23. ROCHA, J. R. *Planejamento de Inibidores das Enzimas Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase e Diidroorotato Desidrogenase de Trypanosoma cruzi*. 201 f. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências - área de concentração: Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

24. PROKOPCZYK, I. M. *Planejamento de Inibidores da Enzima Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase de Trypanosoma cruzi e Avaliação Bioquímica por Calorimetria de Titulação Isotérmica*. 95 f. Tese de Mestrado (Mestre em Ciências - área de concentração: físico-química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

25. SCHARFSTEIN, J.; SCHECHTER, M.; SENNA, M.; PERALTA, J. M.; MENDONCAPREVIATO, L.; MILES, M. A. *Trypanosoma cruzi* characterization and isolation of a 57/51,000 MW surface glycoprotein (GP57/51) expressed by epimastigotes and blood stream trypomastigotes. **Journal of Immunology**, v. 137, n. 4, p. 1336-1341, 1986.

26. ENGEL, J. C.; DOYLE, P. S.; HSIEH, I.; MCKERROW, J. H. Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 188, n. 4, p. 725-734, 1998.

27. CAFFREY, C. R.; SCORY, S.; STEVERDING, D. Cysteine Proteinases of Trypanosome Parasites: Novel Targets for Chemotherapy. **Current Drug Targets**, v. 1, n. 2, p. 155-162, 2000.

28. KLEMBA, M.; GOLDBERG, D. E. Biological roles of proteases in parasitic protozoa. **Annual Review of Biochemistry**, v. 71, p. 275-305, 2002.

29. VERMELHO, A. B.; DE SIMONE, S. G.; D'AVILA-LEVY, C. M.; DO SANTOS, A. L. S.; DE MELO, A. C. N.; SILVA JR, F. P.; DA SILVA BON, E. P.; BRANQUINHA, M. H.

Trypanosomatidae peptidases: A target for drugs development. **Current Enzyme Inhibition**, v. 3, n. 1, p. 19-48, 2007.

30. ENGEL, J. C.; DOYLE, P. S.; PALMER, J.; HSLEH, I.; BAINTON, D. F.; MCKERROW, J. H. Cysteine protease inhibitors alter Golgi complex ultrastructure and function in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Cell Science**, v. 111, n. 5, p. 597-606, 1998.

31. WIGGERS, H. J. *Planejamento de Inibidores da Enzima Cruzaína de Trypanosoma cruzi: dos Ligantes aos Compostos Matrizes*. 173 f. Doutorado (Doutor em Ciências) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

32. CHELESKI, J. *Planejamento de Inibidores da Enzima Diidroorotato Desidrogenase de Trypanosoma cruzi por biocalorimetria*. 159 f. Doutorado (Doutor em Ciências) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

33. NASSAR, A.-E. F.; KAMEL, A. M.; CLARIMONT, C. Improving the decision-making process in the structural modification of drug candidates: enhancing metabolic stability. **Drug Discovery Today**, v. 9, n. 23, p. 1020-1028, 2004.

34. GREENBLATT, D. J.; VON MOLTKE, L. L.; HARMATZ, J. S.; SHADER, R. I. Human Cytochromes and Some Newer Antidepressants: Kinetics, Metabolism, and Drug Interactions. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 19, n. 5, p. 23S-35S, 1999.

35. VENKATAKRISHNAN, K.; VON MOLTKE, L. L.; GREENBLATT, D. J. Effects of the Antifungal Agents on Oxidative Drug Metabolism: Clinical Relevance. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 38, n. 2, p. 111-180, 2000.

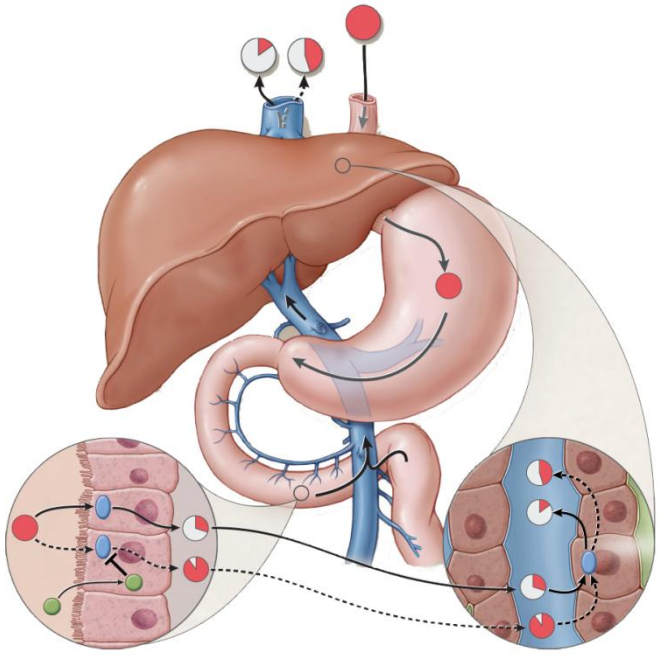
36. PISCITELLI, S. C.; GALLICANO, K. D. Interactions among Drugs for HIV and Opportunistic Infections. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 13, p. 984-996, 2001.

37. DE MAAT, M. M. R.; EKHART, G. C.; HUITEMA, A. D. R.; KOKS, C. H. W.; MULDER, J. W.; BEIJNEN, J. H. Drug Interactions Between Antiretroviral Drugs and Comedicated Agents. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 42, n. 3, p. 223-282, 2003.

38. NIEMI, M.; BACKMAN, J. T.; FROMM, M. F.; NEUVONEN, P. J.; KIVISTÖ, K. T. Pharmacokinetic Interactions with Rifampicin: Clinical Relevance. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 42, n. 9, p. 819-850, 2003.

39. ANTONIOU, T.; TSENG, A. L. Interactions Between Antiretrovirals and Antineoplastic Drug Therapy. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 44, n. 2, p. 111-145, 2005.

Capítulo 2



Reações de biotransformação e suas enzimas

Nesse capítulo serão apresentadas as principais vias de biotransformação de fármacos, suas enzimas e reações catalisadas.

2. O METABOLISMO DE FÁRMACOS

2.1. Reações de biotransformação e suas enzimas

A maioria dos tecidos e órgãos do organismo humano apresenta alguma atividade metabólica, assim os rins, o trato gastrointestinal, os pulmões, a pele e outros órgãos contribuem para o metabolismo sistêmico dos fármacos. No entanto, o fígado é o órgão que apresenta maior quantidade de enzimas metabólicas, sendo bem aceito que esse órgão desempenha o papel mais importante na biotransformação de fármacos e xenobióticos.[1]

O metabolismo de fármacos pode ser dividido em duas categorias *(i)* reações de fase I e *(ii)* reações de fase II. Enquanto que essa classificação em muitos aspectos é relevante e útil, a terminologia é enganosa, principalmente quando determina uma ordem cronológica para os dois eventos, uma vez que as "reações de fase II" podem ocorrer sem, ou antes, das "reações de fase I". Dessa forma é geralmente aceito denominar as "reações de fase I" como "reações de funcionalização" e as "reações de fase II" como "reações de conjugação". [1]

2.2. Reações de fase I ou funcionalização

Essas reações envolvem principalmente enzimas das classes das hidrolases e oxido-redutases. As enzimas do citocromo P450 são as principais enzimas metabolizadoras de fármacos, sendo expressas no retículo endoplasmático (RE) dos hepatócitos e das células de outros tecidos em menor grau.

Outras vias também podem oxidar moléculas lipofílicas. Um exemplo de uma via oxidativa não-P450 é a via da enzima álcool desidrogenase, que oxida os álcoois a seus derivados aldeídos como parte do processo global de excreção.[2] Outras enzimas não-P450 importantes são: *(i)* a monoamina oxidase (MAO) que é responsável pela oxidação de compostos endógenos que contêm amina, como as catecolaminas e a tiramina e *(ii)* as flavinas

monooxigenases (FMOs) que catalisam a oxidação da cimetidina, clindamicina, fembendazol entre outros fármacos.[3-4]

As hidrolases constituem um conjunto complexo de enzimas, muitas das quais também estão relacionadas com o metabolismo de xenobióticos. Entre as principais serino-hidrolases incluem as carboxiesterases, arilesterases, colinesterases e várias serino-endopeptidases.[5]

2.3. Reações de fase II ou conjugação

As reações de conjugação são um segundo conjunto de mecanismos destinados a modificar os compostos para sua excreção. Os substratos dessas reações incluem tanto metabólitos de reações de oxidação (por exemplo, epóxidos) quanto compostos que já contêm grupos químicos apropriados para conjugação, como hidroxila (-OH), amina ($-NH_2$), ou carboxila (-COOH). Esses substratos são acoplados a compostos endógenos (por exemplo, acido glicurônico e seus derivados, ácido sulfúrico, ácido acético, aminoácidos e o tripeptídio glutationa) por enzimas de transferência, que se localizam tanto no citosol quanto no retículo endoplasmático dos hepatócitos (e de outros tecidos).

Na maioria dos casos os processos de conjugação tornam os xenobióticos mais solúveis em água e esse aumento na hidrofilia conduz a uma eficiente eliminação do organismo. Praticamente todos os produtos conjugados são farmacologicamente inativos, com algumas exceções importantes (por exemplo, glicuronídio de morfina). Exemplos de enzimas de conjugação são: *(i)* a UDP-glicuronil transferase (UDPGT), *(ii)* sulfotransferase (ST), *(iii)* glutationa-S-transferase (GST) e *(iv)*. Metiltransferases.[6-14]

2.4. AS ENZIMAS DO CITOCROMO P450

A superfamília do citocromo P-450 é composta por enzimas do tipo heme-tiolato que quando reduzidas e complexadas com monóxido de carbono apresentam um pico de absorbância em 450 nm, também denominada pico de Soret. As evidências de sua existência em microssomas de ratos foram relatadas por Klingenberg em 1958 e sua função caracterizada por Estabrook, Cooper e Rosenthal em 1963, a partir dos estudos de hidroxilação do carbono 21 da 17-hidroxi-progesterona, catalisada por microssomas obtidos do córtex da adrenal. Essas enzimas estão amplamente distribuídas por todos os reinos de seres vivos, sendo encontradas em todos os organismos eucariotos e em alguns organismos procariotos. Nos organismos eucariotos, essas enzimas são essenciais, já que estão envolvidas na biossíntese de esteróis, que por sua vez, são indispensáveis constituintes da membrana plasmática das células. Por outro lado, essas enzimas não possuem a mesma relevância para organismos procariotos, sendo, inclusive, ausentes em algumas bactérias como a *Escherichia coli*.[15]

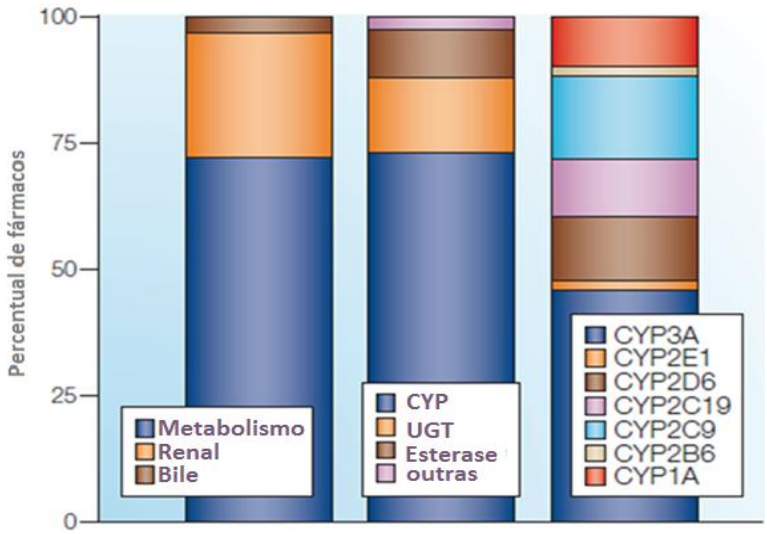
Em humanos as CYPs são expressas em altos níveis no fígado, sendo encontradas também na parede do intestino delgado, pulmões, cérebro e pele. Ao nível celular, essas enzimas são encontradas, principalmente, aderidas às membranas do retículo endoplasmático e das mitocôndrias.[16]

O sequenciamento do genoma humano revelou a existência de 57 genes funcionais e 58 pseudogenes da CYP. Esses genes são agrupados dentro de uma superfamília, que por sua vez é composta de famílias e subfamílias, considerando o grau de similaridade da estrutura primária da enzima. A nomenclatura das enzimas do citocromo P450 é dada pelo radical CYP seguida por um número que designa sua família, uma letra que denota a subfamília e outro número que designa o gene.[17]

Essa superfamília de enzimas está envolvida no metabolismo de uma ampla variedade de xenobióticos e compostos endógenos. Estima-se que 75% dos fármacos comercialmente disponíveis sejam metabolizados por alguma de suas isoformas. Tendo em vista essa importante função, destacam-se dez isoformas do citocromo P450, a saber, CYP 1A2, CYP 2A6, CYP 2B6, CYP 2C8, CYP 2C9, CYP 2C19, CYP 2D6, CYP 2E1, CYP 3A4 e CYP 3A5, sendo a CYP3A4

a mais importante delas, estando envolvida no metabolismo de 50% dos fármacos clinicamente disponíveis (Figura 2.1).[18]

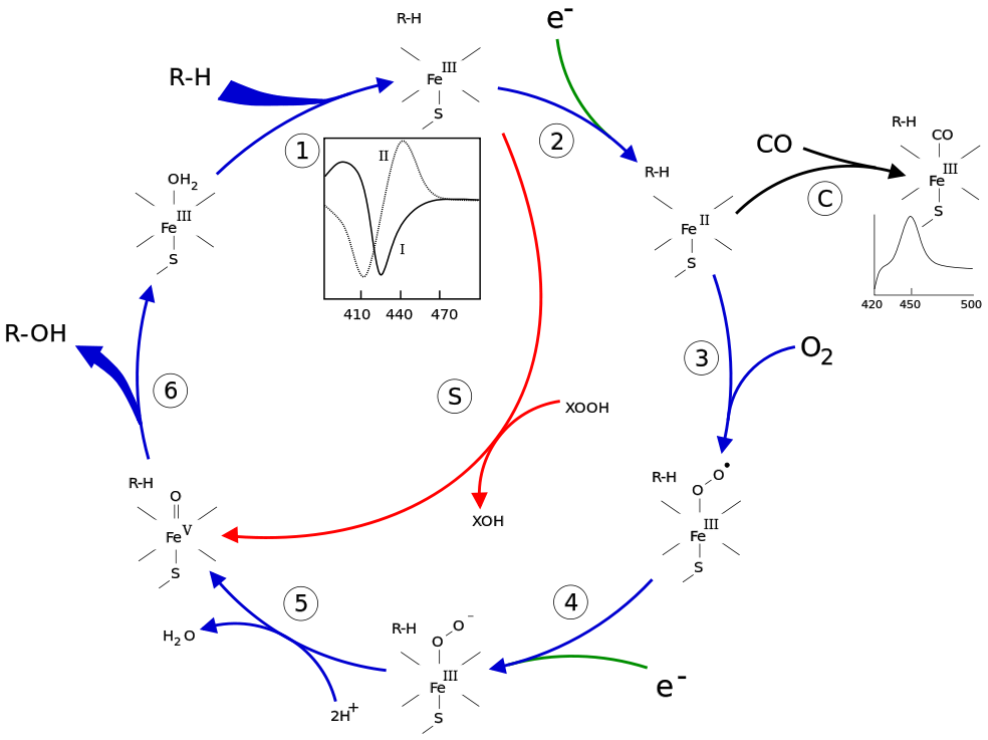
Figura 2.1 – Rotas de eliminação dos 200 fármacos mais prescritos em 2002



Fonte: Adaptado de WIENKERS, L. C.; HEATH, T. G. Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data. **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, n. 10, p. 825-833, 2005.

O seu ciclo catalítico (Figura 2.2) se inicia com a ligação do substrato ao citocromo P450 oxidado (Fe^{3+}), formando um complexo que, a seguir, é reduzido através de duas etapas de oxidação/redução sequenciais. O fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) é o doador dos elétrons em ambas as etapas, através de uma flavoproteína redutase (NADPH-citocromo P450 redutase). Na primeira etapa o elétron doado reduz o oxigênio molecular, formando um complexo de oxigênio ativado P450-substrato. Por fim, à medida que o complexo torna-se mais ativo através de rearranjos, o átomo de oxigênio reativo é transferido para o substrato, resultando na formação do produto oxidado, com a recuperação do citocromo P450 no processo.[19]

Figura 2.2 - Mecanismo detalhado da reação do citocromo P450. (1) o fármaco forma um complexo com o citocromo P450 oxidado; (2) o NADPH doa um elétron à flavoproteína que reduz o complexo P450-fármaco; (3) o oxigênio une-se ao complexo, (4) e o NADPH ou o NADH doa o segundo elétron, formando o complexo ativado-P450-substrato; (5) o ferro é oxidado com a perda de água; e (6) ocorre à formação do produto oxidado do fármaco. (c) se o monóxido de carbono se ligar a P450 reduzida o ciclo é interrompido. Essa reação produz um pico de absorção em 450 nm. [16]



Fonte: adaptado de GUENGERICH, F. P. Cytochrome P450 and Chemical Toxicology. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 70-83, 2007.

A versatilidade metabólica das CYPs é vista não somente em sua ampla variedade de substratos, mas também na grande diversidade de reações que elas catalisam, como reações de monooxigenação, oxidação (envolvendo liberação de radicais superóxidos), hidroperoxidações e reações de redução. Muitas dessas reações apresentam grande importância toxicológica como é o caso das reações que envolvem liberação de radicais superóxidos, relacionados com a peroxidação de lipídeos de membrana e aquelas reações que levam a produção de metabólitos reativos envolvidos em processos de hepatotoxicidade, carcinogênese e idiossincrasias. [19]

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. TESTA, B.; KRÄMER, S. D. The Biochemistry of Drug Metabolism – An Introduction. **Chemistry & Biodiversity**, v. 3, n. 10, p. 1053-1101, 2006.

2. CRABB, D. W.; MATSUMOTO, M.; CHANG, D.; YOU, M. Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcohol-related pathology. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 63, n. 01, p. 49-63, 2004.

3. ZIEGLER, D. M. Recent Studies on the Structure and Function of Multisubstrate Flavin-Containing Monooxygenases. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 33, n. 1, p. 179-199, 1993.

4. SHIH, J. C.; CHEN, K.; RIDD, M. J. MONOAMINE OXIDASE: From Genes to Behavior. **Annual Review of Neuroscience**, v. 22, n. 1, p. 197-217, 1999.

5. TESTA, B.; KRÄMER, S. D. The Biochemistry of Drug Metabolism – An Introduction. **Chemistry & Biodiversity**, v. 4, n. 9, p. 2031-2122, 2007.

6. LANGGUTH, H. S.; BENET, L. Z. Acyl Glucuronides Revisited: Is the Glucuronidation Proces a Toxification as Well as a Detoxification Mechanism? **Drug Metabolism Reviews**, v. 24, n. 1, p. 5-47, 1992.

7. WEINSHILBOUM, R. M.; OTTERNESS, D. M.; SZUMLANSKI, C. L. METHYLATION PHARMACOGENETICS: Catechol O-Methyltransferase, Thiopurine Methyltransferase, and Histamine N-Methyltransferase. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 39, n. 1, p. 19-52, 1999.

8. BANOGLU, E. Current status of the cytosolic sulfotransferases in the metabolic activation of promutagens and procarcinogens. **Curr Drug Metab**, v. 1, n. 1, p. 1-30, 2000.

9. NAGATA, K.; YAMAZOE, Y. Pharmacogenetics of Sulfotransferase. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 40, n. 1, p. 159-176, 2000.

10. TUKEY, R. H.; STRASSBURG, C. P. Human UDP-Glucuronosyltransferases: Metabolism, Expression, and Disease. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 40, n. 1, p. 581-616, 2000.

11. FISHER, M. B.; PAINE, M. F.; STRELEVITZ, T. J.; WRIGHTON, S. A. The role of hepatic and extrahepatic UDP-glucuronosyltransferases in human drug metabolism*1†2. **Drug Metabolism Reviews**, v. 33, n. 3-4, p. 273-297, 2001.

12. DICKINSON, D. A.; FORMAN, H. J. Cellular glutathione and thiols metabolism. **Biochemical Pharmacology**, v. 64, n. 5–6, p. 1019-1026, 2002.

13. BOCK, K. W. Vertebrate UDP-glucuronosyltransferases: functional and evolutionary aspects. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, n. 5, p. 691-696, 2003.

14. POMPELLA, A.; VISVIKIS, A.; PAOLICCHI, A.; TATA, V. D.; CASINI, A. F. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, n. 8, p. 1499-1503, 2003.

15. TSUNEO, O. Forty Years of Cytochrome P450. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 266, n. 3, p. 690-698, 1999.

16. TESTA, B.; KRÄMER, S. D. The Biochemistry of Drug Metabolism – An Introduction. **Chemistry & Biodiversity**, v. 4, n. 3, p. 257-405, 2007.

17. NELSON, D. R.; ZELDIN, D. C.; HOFFMAN, S. M.; MALTAIS, L. J.; WAIN, H. M.; NEBERT, D. W. Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. **Pharmacogenetics**, v. 14, n. 1, p. 1-18, 2004.

18. WIENKERS, L. C.; HEATH, T. G. Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data. **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, n. 10, p. 825-833, 2005.

19. GUENGERICH, F. P. Cytochrome P450 and Chemical Toxicology. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 70-83, 2007.

Capítulo 3

Objetivos

Este capítulo apresenta os objetivos desta dissertação de mestrado.

3. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo geral a caracterização do perfil metabólico *in vitro* e a avaliação de potenciais interações do tipo fármaco-fármaco de uma série de inibidores enzimáticos desenvolvidos a partir de um programa de planejamento de novos agentes tripanossomicidas no Grupo de Química Medicinal do IQSC/USP (NEQUIMED).

3.1. Objetivos específicos

- ✓ Avaliação *in vitro* do potencial inibitório de oito promissores candidatos a fármacos frente às isoformas CYP 3A4, CYP 2D6 e CYP 2C9;

- ✓ Identificação das principais vias de metabolização dos compostos Nequimed54 e Nequimed125 em microssomas de fígado extraídos de ratos;

- ✓ Identificação dos metabólitos e sítios de metabolismo dos compostos Nequimed54 e Nequimed125 em microssomas de fígado extraídos de ratos.

.

Capítulo 4

Identificação de potenciais inibidores das enzimas do citocromo P450

Nesse capítulo é apresentada uma introdução a respeito das interações do tipo fármaco-fármaco, as técnicas utilizadas para sua identificação, bem como os resultados obtidos da avaliação de oito promissores inibidores enzimáticos desenvolvidos no grupo NEQUIMED.

4. INTERAÇÕES DO TIPO FÁRMACO-FÁRMACO

Esquemas terapêuticos que envolvem a coadministração de múltiplos fármacos, principalmente em pacientes com doenças crônicas tais como insuficiência cardíaca congestiva, hipertensão, doenças reumáticas, câncer e AIDS, podem resultar em reações adversas, perda de eficácia terapêutica e toxidez aguda, causado por modificações na velocidade do metabolismo *in vivo* devido a indução ou inibição das enzimas metabolizadoras de fármacos, o que podem levar a alterações na concentração do fármaco na corrente sanguínea em níveis abaixo ou acima da janela terapêutica.[1]

Mesmo sendo um problema muito comum na prática clínica, o mecanismo específico envolvido só foi definido graças à identificação de enzimas críticas para o processo de depuração de fármacos do organismo, das quais se destacam as enzimas da família do citocromo P450. Portanto, a avaliação de candidatos a fármacos para potencial inibição das enzimas do citocromo P450 é, nos dias atuais, conduzida já no início do processo de desenvolvimento de fármacos, uma vez que muitos compostos sintetizados nas fases de descoberta são rejeitados por interferirem no metabolismo de outros fármacos amplamente utilizados na terapêutica. Nesse sentido, um número grande de candidatos precisa ser avaliado, conduzindo a utilização de ensaios rápidos, mas com alta capacidade de predição.[2]

Por essa razão a principal abordagem que tem sido utilizada são os ensaios de inibição competitiva em que a inibição do ciclo catalítico da enzima pelo composto teste é usado para identificar potenciais substratos e inibidores. Os ligantes obtidos a partir desses ensaios devem ser posteriormente avaliados para uma correta caracterização quanto a sua natureza de inibidores ou substratos de uma determinada isoenzima. Além disso, muitos compostos podem ser bioativados a intermediários reativos que podem se ligar covalentemente a macromoléculas biológicas. [1-3]

Com esse propósito um grande número de abordagens experimentais tem sido utilizado. Podem-se citar os métodos de rápida separação para isolar metabólitos radiomarcados, métodos de separação cromatográficos, tais como HPLC e as abordagens que fazem uso da técnica de

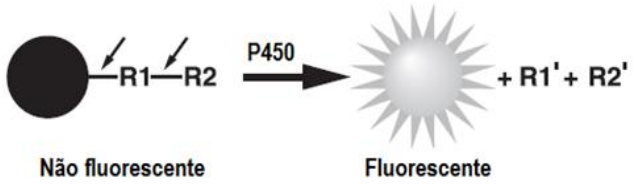
LC/MS para análise de metabólitos. No entanto, esses ensaios incluem trabalhosas etapas de separação pós-reação que são muitas vezes demoradas e inadequadas para ensaios em larga escala. Por esse motivo, a abordagem que tem se mostrado mais promissora para ensaios em larga escala de inibidores são os ensaios fluorimétricos, já que esses não requerem etapas de separação pós-reação.[2]

O fenômeno de fluorescência é definido pela capacidade de uma molécula emitir radiação eletromagnética na região do ultravioleta próximo ao visível, quando excitado por uma fonte de luz. Os estados eletrônicos da maior parte das moléculas orgânicas podem agrupar-se em dois tipos principais: singleto e tripleto. No estado singleto, todos os elétrons da molécula têm os spins emparelhados, enquanto, no estado tripleto, há um conjunto de spins eletrônicos não emparelhados.[4] O mecanismo fundamental de fluorescência é a emissão de fótons quando a molécula é excitada no estado singleto, onde o spin do elétron no orbital excitado mantém sua orientação original. O processo de emissão e excitação no fenômeno de fluorescência é muito rápido, com tempo de meia vida na ordem de nano segundo. Desta forma, é possível observar facilmente a fluorescência à temperatura ambiente e diretamente em solução, o que torna o procedimento experimental fluorimétrico bastante simples e robusto. [4]

4.1. Estudos de inibição reversível das enzimas do citocromo P450 usando fluorimetria

Considerando a sua simplicidade e robustez, a fluorimetria tem se tornado a técnica padrão para determinação de IC_{50} para as enzimas do citocromo P450, fazendo uso da construção de curvas do tipo dose-resposta. Os substratos fluorogênicos utilizados para os ensaios são derivados cumarínicos e possuem dois potenciais sítios de metabolismo, sendo que a oxidação de qualquer um deles libera um metabólito altamente fluorescente em solução aquosa Figura 4.1. Os ensaios empregam baculossomos obtidos a partir de células de inseto que expressam uma específica isoforma e NADPH-P450 redutase, oferecendo uma distinta vantagem sobre microssomas de fígado humano, já que se trabalha com somente uma isoforma do citocromo P450. Os ensaios foram realizados em um fluorímetro no modo cinético, medindo-se, continuamente, o sinal de fluorescência. [5-2]

Figura 4.1 - Substratos fluorogênicos cumarínicos possuem dois potenciais sítios de metabolismo e a oxidação de qualquer um deles libera um metabólito altamente fluorescente em solução aquosa.



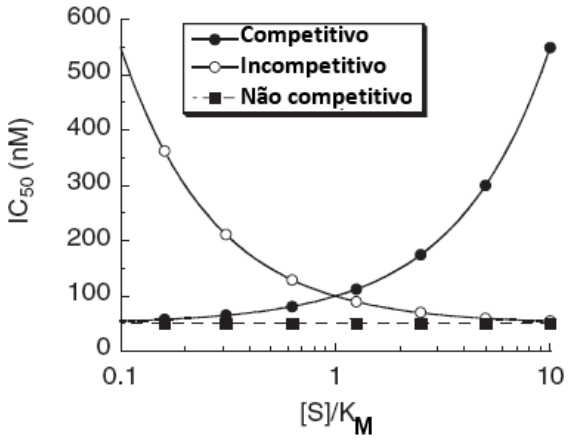
Para o propósito de identificar e comparar inibidores enzimáticos deve-se primeiro definir uma métrica que reflete a capacidade de uma concentração fixa de um composto em reduzir a atividade da enzima alvo. A métrica mais comumente usada com esse propósito é o percentual de inibição que pode ser definido como:

$$\%\ \boldsymbol{inibição} = \mathbf{100}\left(\mathbf{1} - \frac{v_i}{v_b}\right) \qquad \text{Equação (4.1)}$$

onde v_i é a velocidade na presença de inibidor e v_b a velocidade do experimento controle.

A determinação da inibição reversível das enzimas do citocromo P450 pelos compostos selecionados foi realizada por meio de curvas de percentual de inibição para medir a concentração do composto que inibe em 50 % a atividade enzimática, valor conhecido como IC_{50} e que é uma medida comparativa de potência de inibição entre os inibidores ensaiados na mesma condição experimental. Experimentos realizados em diferentes condições experimentais não possuem os valores de IC_{50} comparáveis, já que fatores como pH, força iônica e temperatura podem causar mudanças nesses valores. Alteração na concentração do substrato também leva a alterações no valor dessa medida de potência, porém isso pode ser utilizado para verificar o mecanismo de inibição da molécula frente um determinado alvo, como mostrado na Figura 4.2.[6]

Figura 4.2 - Variando a razão entre [S]/K_M é possível determinar o modo de inibição de inibidores enzimáticos através da mudança dos valores de IC_{50}.



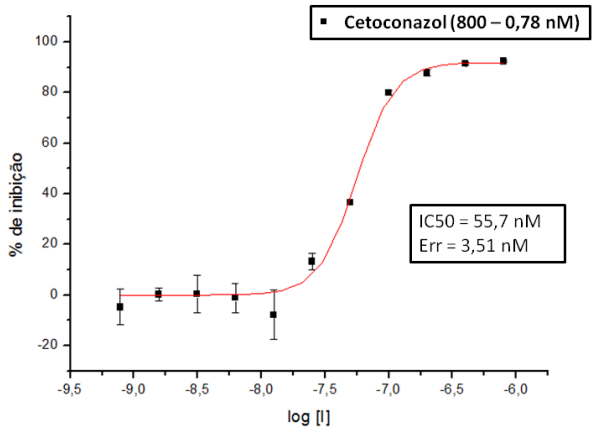
Fonte: Adaptado de Lead optimization and structure-activity relationships for reversible inhibitors. In: Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery: A guide for medicinal chemists and pharmacologists. New Jersey: John Wiley, 2005. v. 1, p. 116.

Nesse ensaio, caso a adição de substrato leve a um aumento do valor de IC_{50}, significa que o substrato e o inibidor competem pelo mesmo sítio da enzima, caracterizando assim, um inibidor competitivo. Se a concentração de substrato for diminuída e consequentemente houver aumento do valor de IC_{50} é indicativo de que o inibidor é incompetitivo, já que o mesmo interage apenas com o complexo enzima-substrato. Se não houver aumento do IC_{50} decorrente do incremento ou da diminuição da concentração de substrato, pode-se inferir que o inibidor é não competitivo. [7]

Uma forma de representar curvas de dose-resposta é através de um gráfico que relaciona o percentual de inibição com o logaritmo da concentração do inibidor. Geralmente, esse tipo de curva apresenta um padrão sigmoide, com o IC_{50} definido como o ponto médio da curva. Essa curva é caracterizada por apresentar dois platôs, um deles em baixas concentrações de inibidor e o outro em altas concentrações de inibidor (Figura 4.3).

Os valores do percentual de inibição das enzimas foram definidos como a variável dependente (eixo Y) enquanto os valores do logaritmo da concentração dos inibidores foram calculados e definidos como as variáveis independentes (eixo X).

Figura 4.3 – IC_{50} do composto cetoconazol utilizado como controle de inibição positivo para a isoforma CYP 3A4.



Os valores de IC_{50} foram calculados utilizando a equação 4.2, o método de ajuste foi não linear dos mínimos quadrados.

$$\%\boldsymbol{inibição} = \boldsymbol{A_0} + \frac{(\boldsymbol{A_1}-\boldsymbol{A_0})}{\boldsymbol{1+10^{(LogIC_{50})h}}} \qquad \text{Equação (4.2)}$$

Onde A_0 é o patamar inferior da curva, A_1 é o patamar superior, $LogIC_{50}$ é o logaritmo da concentração de IC_{50} e h o coeficiente de Hill. Os valores de A_1 e A_0 representam a resposta máxima e mínima da enzima nas concentrações mais baixas e altas do inibidor, respectivamente. O coeficiente de Hill está relacionado à estequiometria da interação, à cooperatividade entre monômeros de enzimas alostéricas (no caso de enzimas multiméricas) e também ao grau da relação dose-resposta: coeficiente igual a 1 indica interação completamente independente entre monômeros, maior que 1 cooperatividade positiva e menor que 1, negativa. Além do grau de cooperatividade, o coeficiente de Hill pode ser um diagnóstico de comportamento de inibição não ideal. Compostos que causem uma variação abrupta (h >> 1), usualmente refletem um mecanismo não específico de inibição, como agregação por exemplo.

4.2. Estudos de inibição tempo-dependente (TDI)

A inibição das enzimas do citocromo P450 pode ser classificada como reversível ou tempo-dependente (TDI). A inibição reversível envolve a rápida associação e dissociação do complexo enzima-inibidor podendo ter natureza competitiva, não-competitiva ou incompetitiva e já foi tratada na sessão anterior. Por outro lado, a inibição do tipo tempo-dependente resulta de uma interação covalente irreversível ou quase-irreversível (observado nos processos de interação de elevada afinidade) de um intermediário reativo à enzima que catalisa sua formação, resultando na perda da função enzimática. De forma geral, a TDI ocorre quando um composto apresenta um aumento da potência inibitória quando incubado com a enzima antes da adição do substrato. Essa forma de inibição também pode ser causada por compostos que apresentam elevada reatividade química, sem a necessidade de uma bioativação prévia. Para diferenciar esses dois tipos de inibição, a denominação de inibidor metabolismo-dependente é adotada para aqueles que precisam ser metabolicamente ativados antes de promoverem a ação inibitória. Interações do tipo fármaco-fármaco resultantes de TDI podem apresentar um início tardio devido o fato de a inibição depender do tempo de contato entre a enzima e o inibidor. Além disso, a ação inibitória geralmente se estende mesmo depois do inibidor ser eliminado, assim a atividade enzimática só pode ser restaurada mediante a biossíntese de uma nova enzima.[8]

É amplamente aceito que reações idiossincráticas são causadas por metabólitos mais reativos que os compostos parentais. Embora compostos de baixa massa molecular não sejam imunogênicos, uma forte resposta imune pode ser induzida quando esses compostos se ligam a proteínas ou outras macromoléculas. A maioria dos metabólitos reativos são eletrófilos, espécies deficientes em elétrons que comumente reagem com espécies nucleofílicas, compostos ricos em elétrons, que podem ser doados para formar uma nova ligação. Os eletrófilos podem ser classificados como “moles” ou “duros”, o que, simplificadamente, depende do nível de deslocalização da carga positiva. Espécies que apresentam a carga positiva deslocalizada são geralmente denominadas de eletrófilos “moles”, enquanto que aquelas que apresentam a carga positiva pouco deslocalizada são classificados como eletrófilos “duros”. Essa mesma nomenclatura se estende aos nucleófilos. De forma geral nucleófilos duros tendem a reagir com eletrófilos duros e nucleófilos moles com eletrófilos moles. A maioria dos metabólitos tóxicos são aqueles com reatividade intermediária. Se o metabólito reativo apresentar baixa reatividade

ele facilmente será excretado do organismo por sistemas como da glutationa/glutationa tranferase. Por outro lado, se o metabólito for extremamente reativo, ele provavelmente reagirá com moléculas de água ou outras substâncias presentes no meio reacional, o que diminui os riscos de reações idiossincráticas.[9]

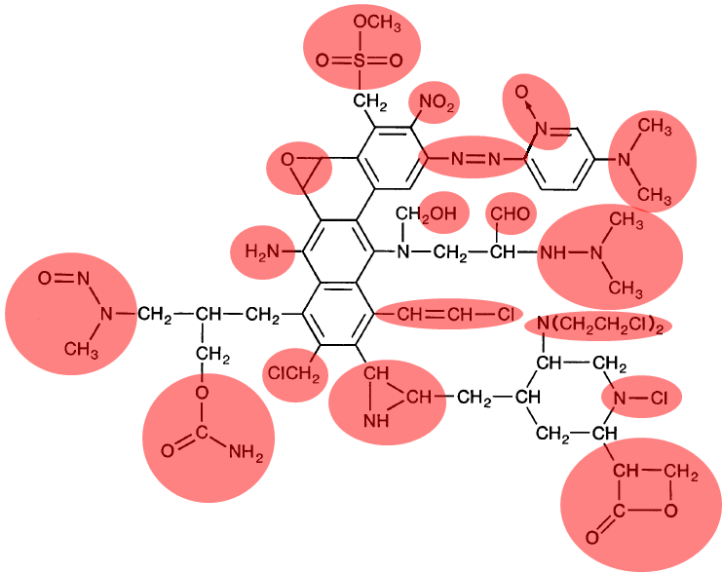
Quando uma reação entre um eletrófilo e um nucleófilo ocorre, uma nova ligação é formada. Isso significa que uma ligação deve ser rompida com a finalidade de manter o número apropriado de ligações no átamo atacado. Portanto, um fator que contribui para reatividade de um composto é a presença de um bom grupo de saída. Exemplos de bons grupos saída são os íon cloreto, brometo, acetato e sulfato. Outro tipo geral de metabólitos reativos são aqueles que apresentam uma dupla ligação polarizada que permite a formação de uma nova ligação sem a perda de um grupo de saída. Um exemplo clássico são os aceitadores de Michael são, por exemplo, compostos que apresentam um grupo carbonil conjugado com a dupla ligação carbono-carbono.[9]

Outro fator relevante para a reatividade de um composto é a tensão de anel. Compostos que possuem anéis de três e quatro membros apresentam uma elevada energia tensional e podem atuar com eletrófilos reativos. Isso ocorre especialmente quando átomos de oxigênio, enxofre ou nitrogênio estão presentes, como no caso dos epóxidos.[9]

Por fim, destaca-se o papel dos radicais livres como intermediários reativos. Os radicais livres são caracterizados por possuírem um elétron desemparelhado. A reação mais comum de radicais livres é a abstração de átomos de hidrogênio de outras moléculas, como por exemplo o oxigênio molecular, causando danos celulares por estresse oxidativo ou danos na membrana lipídica.[9]

A presença de alguns grupos funcionais está relacionada com a bioativação de determinados compostos e representa um alerta estrutural para possíveis idiossincrasias, interações do tipo fármaco-fármaco, genotoxicidez e carcinogenicidade. A Figura 4.4 mostra a estrutura química dos principais grupos toxicofóricos envolvidos na formação de intermediários reativos.[10-11]

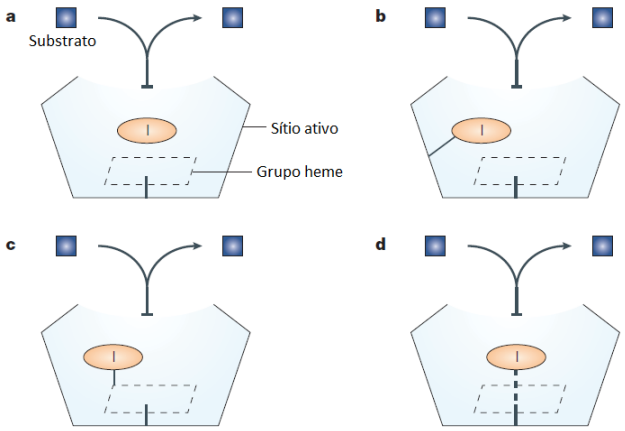
Figura 4.4 – Estrutura química dos principais grupos toxicofóricos envolvidos na formação de intermediários reativos.



Fonte: adaptado de TESTA, B.; KRÄMER, S. D. The Biochemistry of Drug Metabolism – An Introduction. **Chemistry & Biodiversity**, v. 6, n. 5, p. 591-684, 2009.

Vários passos do ciclo catalítico das enzimas do citocromo P450 são propensos à inibição covalente, incluindo as etapas de ligação do substrato, do oxigênio molecular ou, ainda, a transferência de elétrons realizada pela flavoproteina redutase, sua parceira redox. O mecanismo bioquímico pelo qual os compostos atuam como inibidores metabolismo-dependentes pode ser dividido em três categorias: a destruição do grupo heme, alquilação do grupo heme e a alquilação de resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da enzima. A Figura 4.5 ilustra as principais diferenças entre cada um desses mecanismos de inibição.[12]

Figura 4.5 – Possíveis mecanismos de inibição para as enzimas do citocromo P450. (a) inibição reversível. (b) inibição irreversível, o inibidor é bioativado pela enzima a um intermediário reativo que se liga covalentemente a enzima. (c) inibição irreversível, o inibidor é bioativado pela enzima a um intermediário reativo que se liga covalentemente a apoproteina.(d) Quase-irreversível inibição, o inibidor é bioativado pela enzima a um intermediário destrói o grupo prostético.



Fonte: Adaptado de WIENKERS, L. C.; HEATH, T. G. Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data. **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, n. 10, p. 825-833, 2005.

A ação de um inibidor covalente pode ser descrito pelo mecanismo genérico mostrado na Figura 4.6.[13]

Figura 4.6 - Mecanismo genérico de inibição irreversível.

$$E + I \underset{K_i}{\rightleftharpoons} E \bullet I \overset{k_2}{\underset{k_{-2}}{\rightleftharpoons}} E - I$$

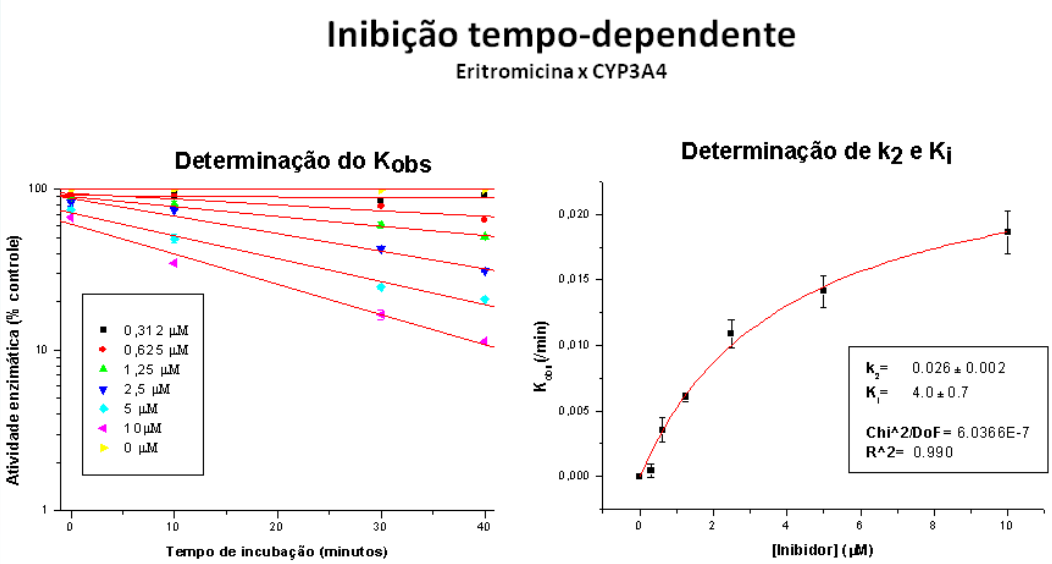
Complexo inicial não-covalente

Complexo covalente final

O processo de inibição ocorre em pelo menos dois passos. O composto deve primeiramente se ligar de forma não-covalente a proteína alvo (K_i), posicionando porções eletrofílicas de sua estrutura próximas de sítios nucleofílicos presentes na estrutura proteica. A ligação covalente é então estabelecida entre o inibidor e a enzima alvo. No caso em que a formação da ligação covalente é efetivamente irreversível, k_{-2} deverá ser igual a zero.[13]

Os ensaios de triagem são realizados monitorando-se a potencia inibitória do composto-teste em diferentes tempos de incubação com a enzima (Figura 4.7). Variando-se a concentração do composto teste é possível determinar a constante de inibição, K_{obs} , a partir da inclinação da reta gerada quando um gráfico do semilogarítimo da concentração do inibidor pelo tempo de incubação é desenhado. Os valores de K_{obs} são regraficados contra a concentração do inibidor e ajustados em uma equação hiperbólica, $K_{obs}=k_2.[I]/(K_i + [I])$, obtendo-se os valores de K_i e k_2.[13]

Figura 4.7 – Determinação experimental dos parâmetros de inativação para inibição da CYP 3A4 pela eritromicina.



4.3. Materiais e métodos

4.3.1. Estudos de inibição reversível

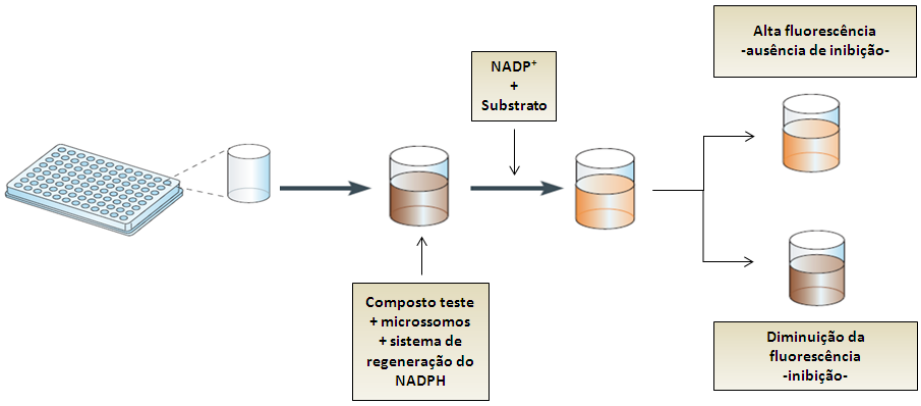
Os ensaios de IC_{50} foram realizadas em um fluorímetro da empresa BioTek (modelo Synergy HT). Esses ensaios foram conduzidos em placas de 96 poços, em triplicata e os valores de IC_{50} foram determinados utilizando o programa Origin 7.0. [14]

Os ensaios enzimáticos foram realizados em tampão fosfato de potássio 200 mM em pH 8,0, com a concentração de DMSO de 0,1% v/v. A concentração de enzima no ensaio foi de 10 nM para as isoformas CYP 2C9 e 2D6 e 5 nM para a CYP 3A4. As concentrações dos substratos no ensaio foram mantidas constantes em todos os poços e próximas dos valores de K_M de cada reação, sendo de 2 µM para o substrato BOMF (CYP 2C9), 10 µM para o substrato EOMCC (CYP 2D6) e 2 µM para o substrato DBOMF (CYP 3A4). A concentração de $NADP^+$ nos ensaios foi de 100 µM. Os compostos testes foram dispensados a partir de uma solução estoque de DMSO e suas concentrações nos ensaios variaram de 40 a 0,039 µM. Essas concentrações, partindo do mais concentrado para o menos concentrado, foram obtidas através de um esquema

de diluição serial de razão 1:2. Um sistema de regeneração de NADPH constituído de glicose-6-fosfato e glicose-6-fosfato desidrogenase foi utilizado em todos os ensaios.

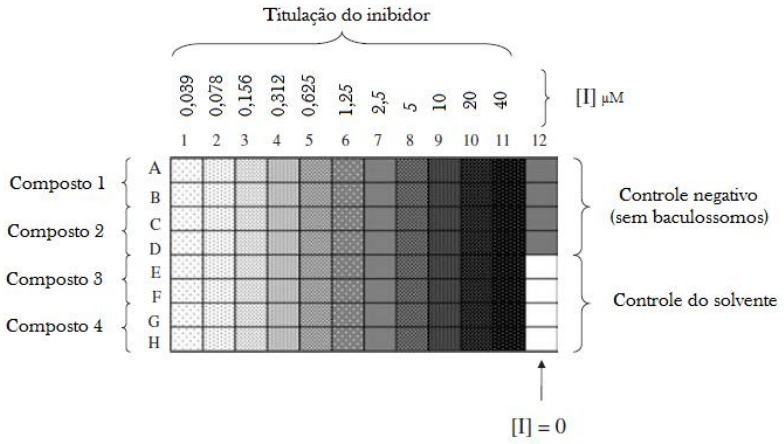
As figuras 4.8 e 4.9 ilustram de forma resumida o procedimento experimental e a configuração da placa utilizados nos ensaios fluorimétricos. O composto teste foi incubado com baculossomos constituídos de uma específica isoforma P450 e o sistema de regeneração do NADPH. O sistema de regeneração converte $NADP^+$ em NADPH que é requerido para iniciar a reação. Depois de uma breve incubação a fluorescência de fundo foi medida. A reação enzimática foi iniciada pela adição de uma mistura contendo $NADP^+$ e o substrato fluorogênico. A fluorescência foi, então, medida continuamente ao longo do tempo.

Figura 4.8 - Procedimento experimental para os ensaios fluorimétricos.



Inibidores padrões foram utilizados como controles de inibição positivos, sendo o cetoconazol para a CYP3A4, quinidina para a CYP2D6 e o sulfafenazol para a CYP2C9. Os inibidores padrões foram dispensados da mesma maneira que os compostos testes e os valores de IC_{50} foram determinados.

Figura 4.9 - Configuração da placa utilizada no ensaio fluorimétrico.



4.3.2. Estudos de inibição tempo-dependente

Todos os compostos que apresentaram atividade nos ensaios de inibição reversível foram avaliados quanto à possível inibição do tipo tempo-dependente.

Os ensaios enzimáticos foram realizados em tampão fosfato de potássio 200 mM em pH 8,0, com a concentração de DMSO de 0,1% v/v. A concentração de enzima no ensaio foi de 10 nM para a isoforma CYP 2C9 e 5 nM para a CYP 3A4. As concentrações dos substratos no ensaio foram mantidas constantes em todos os poços e próximas dos valores de K_M de cada reação, sendo de 2 µM para o substrato BOMF (CYP 2C9) e 2 µM para o substrato DBOMF (CYP 3A4). As concentrações avaliadas do composto teste foram de 0 µM, 10 µM, 5 µM, 2,5 µM, 1,25 µM, 0,625 µM e 0,312 µM nos tempos de 0, 10, 20, 30 e 40 minutos de incubação. Um sistema de regeneração de NADPH constituído de glicose-6-fosfato e glicose-6-fosfato desidrogenase foi utilizado em todos os ensaios.

O composto teste foi incubado com baculossomos constituídos de uma específica isoforma P450, o sistema de regeneração do NADPH e $NADP^+$. A reação enzimática foi iniciada nos respectivos tempos de incubação pela adição de uma solução contendo o substrato fluorogênico. A fluorescência foi, então, medida continuamente ao longo do tempo.

4.4. Resultados e discussão

As curvas do percentual de inibição em função da concentração dos inibidores foram determinadas para todos os compostos selecionados para os testes contra as principais isoformas das enzimas do citocromo P450.

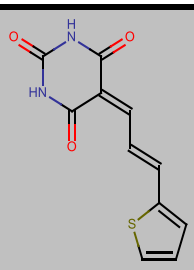
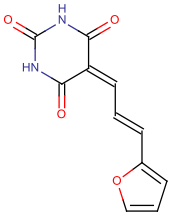
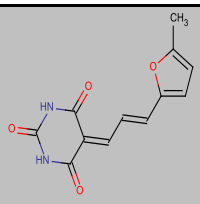
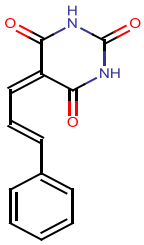
A Tabela 4.1 mostra os valores de IC_{50}, determinados experimentalmente para os compostos cetoconazol, quinidina e sulfafenazol utilizados como controles de inibição para as isoformas CYP3A4, CYP2D6 e CYP2C9, respectivamente.

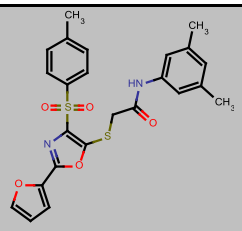
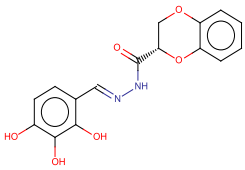
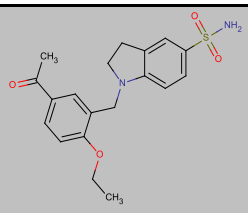
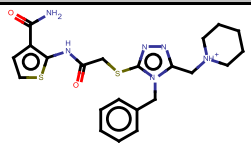
Tabela 4.1 - Valores de IC_{50} determinados experimentalmente para os compostos cetoconazol, quinidina e sulfafenazol utilizados como controles de inibição para as isoformas CYP3A4, CYP2D6 e CYP2C9.

Inibidor	**IC_{50}**	**Erro**	**Isoforma**
Cetoconazol	55,7 nM	3,51 nM	CYP 3A4
Sulfafenazol	5,95 µM	0,7 µM	CYP 2C9
Quinidina	78,5 nM	6,0 nM	CYP 2D6

Os resultados de inibição para os compostos testados estão na Tabela 4.2. Esses compostos são promissores inibidores enzimáticos, planejados no grupo NEQUIMED, de três dos principais alvos biológicos do *Trypanosoma cruzi*, entre eles podemos citar as enzimas cruzaina, *Tc*GAPDH e *Tc*DHODH.

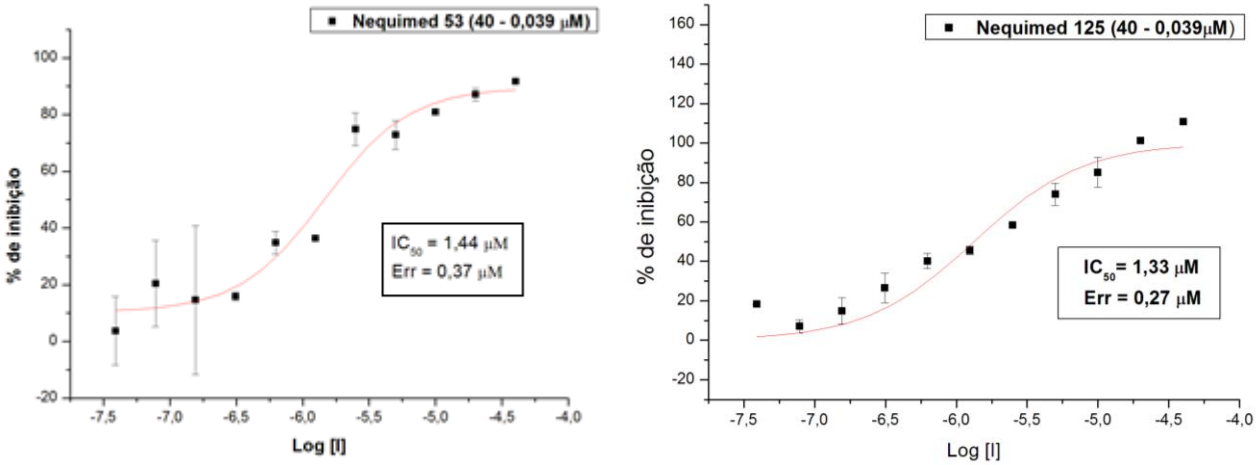
Tabela 4.2 -. Estruturas e valores de IC_{50}, das substâncias testadas frente às enzimas CYP3A4, CYP2D6 e CYP2C9.

Estrutura	Códigos Nequimed	IC_{50} (µM) CYP3A4	IC_{50} (µM) CYP2D6	IC_{50} (µM) CYP2C9	Inibição Tempo-dependente
	Nequimed 130	Inativa	Inativa	Inativa	-
	Nequimed 71	Inativa	Inativa	Inativa	-
	Nequimed 195	Inativa	Inativa	Inativa	-
	**Nequimed 01S**	Inativa	Inativa	Inativa	-

	Nequimed 104	Inativa	Inativa	Inativa	-
	Nequimed 53	Inativa	Inativa	1,44 ± 0,37	Inativa
	Nequimed125	Inativa	Inativa	1,33 ± 0,27	Inativa
	Nequimed 42	7,12 ± 0,65	Inativa	Inativa	Inativa

A Figura 4.10 mostra o perfil da curva de dose-resposta dos compostos Nequimed53 e Nequimed125 frente à isoforma CYP 2C9 com valor de IC_{50} = 1,44 ± 0,37 µM e 1,33 ± 0,27 µM, respectivamente.

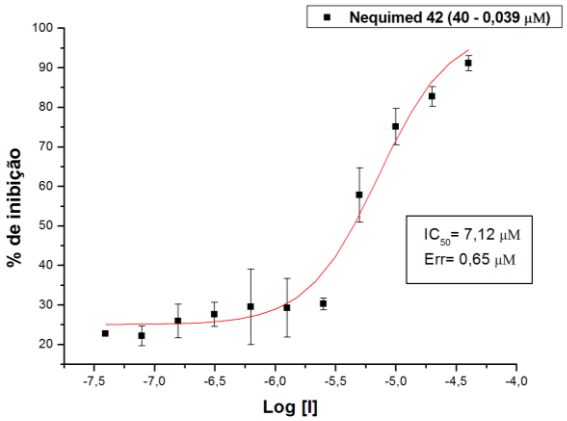
Figura 4.10 - perfil da curva de dose-resposta dos compostos Nequimed53 e Nequimed125 frente à isoforma CYP 2C9.



Para o Nequimed53, pode-se observar um comportamento fora do ideal da curva dose-resposta com o platô superior alcançando 89,6% de inibição. Isso sugere inibição parcial ou baixa solubilidade. Apesar do platô inferior se estabelecer próximo de 10% de inibição, podemos observar uma clara tendência de diminuição da inibição em concentrações inferiores daquelas usadas no ensaio. Para o composto Nequimed125, observamos um perfil de curva ideal com os dois platôs bem definidos. Esses valores de IC_{50} indicam um risco elevado para interações do tipo fármaco-fármaco, quando comparados com o padrão de inibição positivo (sulfafenazol, IC_{50} = 5.95 µM).

O perfil da curva de IC_{50} para o composto Nequimed42 segue abaixo na Figura 4.11. Esse composto apresentou um IC_{50} = 7,12 ± 0,65 µM. A curva obtida está fora do comportamento ideal com o platô inferior em 25,04% de inibição. Esse comportamento pode refletir a presença de um segundo sítio de interação de mais alta afinidade. Esse resultado requer experimentos adicionais para avaliação mais aprofundada do mecanismo de interação entre esse composto e a CYP 3A4.

Figura 4.11 - IC_{50} do composto Nequimed 42 frente a enzima CYP3A4.



Esse valor indica risco médio para interações do tipo fármaco-fármaco, quando comparado com o padrão de inibição positivo (cetoconazol, IC_{50} = 57,5 nM).

Vale ressaltar que estes ensaios não determinam a natureza da interação, sendo, portanto incapaz de diferenciar se a inibição da reação está ocorrendo devido à ação de um inibidor ou pela competição entre dois diferentes substratos pelo sítio ativo da enzima. Essas informações só poderão ser obtidas nos ensaios de fenotipagem metabólica que avaliarão a susceptibilidade desses compostos frente às principais enzimas metabolizadoras.

Por outro lado, nenhum dos compostos avaliados apresentou um perfil de inibição do tipo tempo-dependente. Esses resultados sugerem que esses compostos não são bioativados em espécies reativas pelas isoformas do citocromo P450 avaliadas. Este é um excelente resultado, haja vista que os processos de bioativação estão envolvidos em interações farmacológicas, toxidez, carcinogenicidade e graves idiossincrasias

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GUENGERICH, F. P. Role of Cytochrome P450 Enzymes in Drug-Drug Interactions. In: ALBERT, P. L. (Ed.). **Advances in Pharmacology**: Academic Press, 1997. p. 7-35.

2. TRUBETSKOY, O. V.; GIBSON, J. R.; MARKS, B. D. Highly Miniaturized Formats for In Vitro Drug Metabolism Assays Using Vivid® Fluorescent Substrates and Recombinant Human Cytochrome P450 Enzymes. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 10, n. 1, p. 56-66, 2005.

3. OBACH, R. S.; WALSKY, R. L.; VENKATAKRISHNAN, K.; HOUSTON, J. B.; TREMAINE, L. M. In vitro cytochrome P450 inhibition data and the prediction of drug-drug interactions: Qualitative relationships, quantitative predictions, and the rank-order approach. **Clin Pharmacol Ther**, v. 78, n. 6, p. 582-592, 2005.

4. SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. Porto Alegre: Bookman, 2002.

5. MARKS, B. D.; THOMPSON, D. V.; GOOSSENS, T. A.; TRUBETSKOY, O. V. High-Throughput Screening Assays for the Assessment of CYP2C9*1, CYP2C9*2, and CYP2C9*3 Metabolism Using Fluorogenic Vivid® Substrates. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 9, n. 5, p. 439-449, 2004.

6. COPELAND, R. A. Lead optimization and structure-activity relationships for reversible inhibitors. In: COPELAND, R. A. (Ed.). **Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery**. New Jersey: John Wiley, 2005. Cap.5. p. 111-140.

7. COPELAND, R. A. Reversible inhibitors. In: COPELAND, R. A. (Ed.). **Enzymes**. New York: John Wiley, 2002. p. 266-304.

8. OBACH, R. S.; WALSKY, R. L.; VENKATAKRISHNAN, K. Mechanism-Based Inactivation of Human Cytochrome P450 Enzymes and the Prediction of Drug-Drug Interactions. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 35, n. 2, p. 246-255, 2007.

9. LEE, J. S. O., R.S.; FISHER, M.B. Drug Metabolizing Enzymes: cytochrome P450 and Other Enzymes in Drug Discovery and Development, 2003. Cap.3. p. 608.

10. TESTA, B.; KRÄMER, S. D. The Biochemistry of Drug Metabolism – An Introduction. **Chemistry & Biodiversity**, v. 6, n. 5, p. 591-684, 2009.

11. WALSH, J. S.; MIWA, G. T. Bioactivation of Drugs: Risk and Drug Design. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 51, n. 1, p. 145-167, 2011.

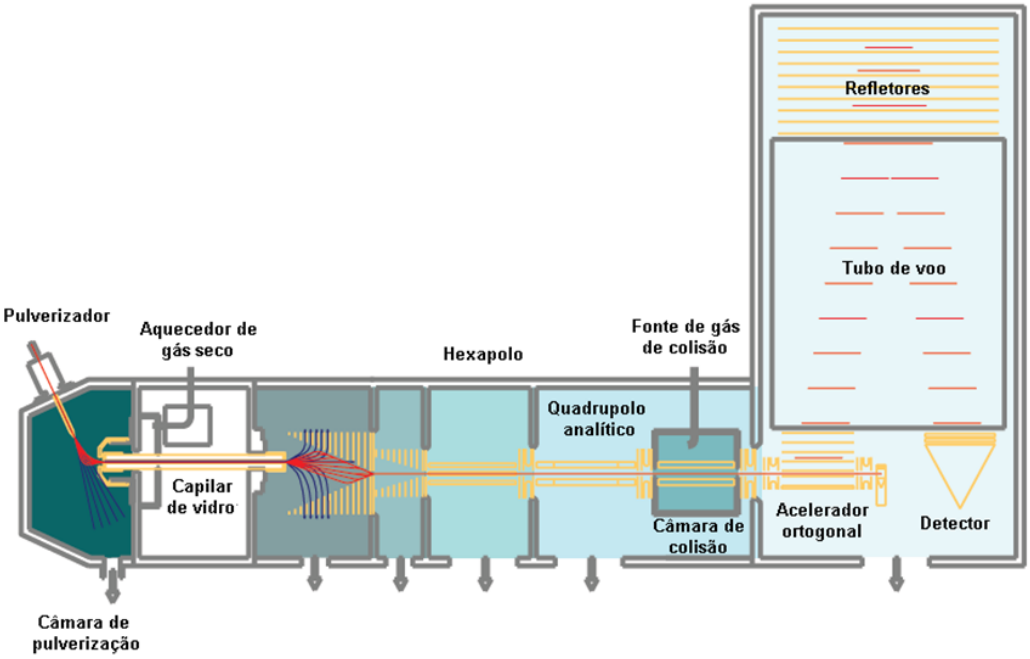
12. WIENKERS, L. C.; HEATH, T. G. Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data. **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, n. 10, p. 825-833, 2005.

13. SINGH, J.; PETTER, R. C.; BAILLIE, T. A.; WHITTY, A. The resurgence of covalent drugs. **Nat Rev Drug Discov**, v. 10, n. 4, p. 307-317, 2011.

14. EDWARDS, P. M. Origin 7.0: scientific graphing and data analysis software. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 42, n. 5, p. 1270-1271, 2002.

Capítulo 5

Estudos de identificação de metabólitos e sítios de metabolismo



Neste capítulo é apresentada uma discussão sobre a caracterização metabólica de substâncias de interesse em química medicinal, os métodos analíticos e computacionais comumente usados para sua avaliação, bem como os resultados obtidos a partir estudos de dois promissores inibidores enzimáticos desenvolvidos pelo grupo NEQUIMED.

5. ESTUDOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO

5.1. Caracterização dos metabólitos e identificação dos sítios de metabolismo

Os metabólitos são entidades químicas resultantes da biotransformação de substâncias endógenas e xenobióticos. Como já discutido, várias vias de biotransformação são possíveis e a avaliação do destino metabólico, o conhecimento das rotas e a extensão do metabolismo em animais e humanos, são objetivos centrais na química medicinal. Portanto, a caracterização estrutural dos metabólitos e a identificação de sítios metabolicamente vulneráveis na estrutura química dos candidatos a fármacos são informações fundamentais que guiam os químicos medicinais para o planejamento de novos compostos matrizes com propriedades farmacocinéticas aperfeiçoadas.

A caracterização metabólica é geralmente complicada e trabalhosa uma vez que as reações metabólicas produzem uma variedade enorme de compostos estruturalmente diversos e em concentrações relativamente baixas. Além disso, as matrizes biológicas estão repletas de proteínas, lipídeos e outros compostos endógenos que interferem na detecção dos metabólitos. A espectrometria de massas tem se tornado a ferramenta analítica de escolha para a detecção e identificação de metabólitos devido a sua capacidade de ser facilmente acoplada a sistemas de cromatografia líquida (LC) através de interfaces de ionização à pressão atmosférica (API). A alta sensibilidade e seletividade da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC/MS) e sua habilidade em separar, detectar e identificar muitos metabólitos na presença de materiais endógenos, a torna uma das técnicas mais versáteis e robustas para o estudo de metabolismo de fármacos. [1] Tendo isso em vista, uma discussão sobre a instrumentação dessa técnica será introduzida aqui.

5.1.1. Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é a ferramenta analítica padrão escolhida para separação de misturas complexas. A HPLC se baseia na migração diferencial dos

componentes de uma amostra devido a diferentes interações com duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. De forma geral, o grau de separação depende da extensão e da qualidade das interações existentes entre os vários componentes da amostra com as duas fases. Esse padrão de interação pode ser manipulado através de diversas combinações de solventes e colunas com o intuito otimizar as condições de separação. Deste modo, a escolha das condições cromatográficas para os estudos de identificação de metabólitos é uma etapa crucial no desenvolvimento do método de análise, uma vez que possibilita separar os metabólitos uns dos outros e também dos diversos componentes da matriz biológica, permitindo análises mais precisas e com menos interferentes. A grande possibilidade de combinações entre fases móveis e estacionárias torna-a uma técnica extremamente versátil e de grande aplicabilidade, capaz de realizar a separação de praticamente qualquer mistura.

Sendo assim, uma boa separação pode facilitar a ionização e a caracterização de um composto de interesse quando um espectrômetro de massas for utilizado como detector. Tradicionalmente, os estudos de metabolismo são conduzidos usando longas colunas de fase reversa para assegurar adequada separação do fármaco dos seus metabólitos e dos componentes da matriz biológica. [2-3]

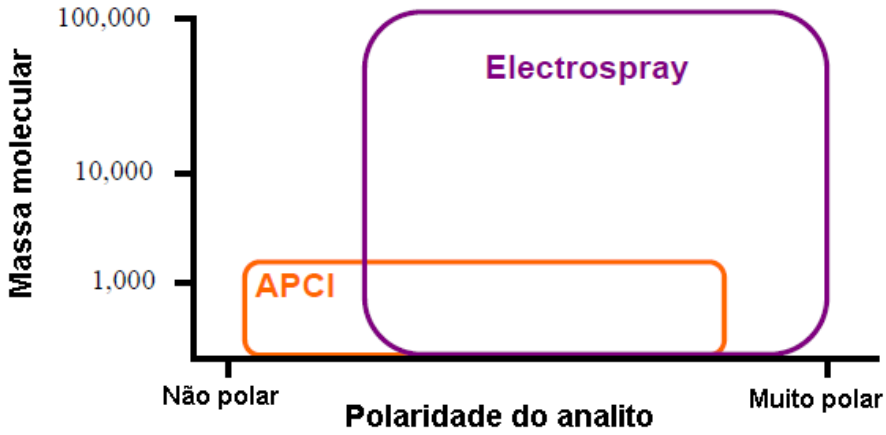
5.1.2. Métodos de ionização a pressão atmosférica

Um pré-requisito para a detecção, identificação e quantificação de qualquer espécie por um espectrômetro de massas é o fato de que todos os analitos devem ser convertidos em íons na fase gasosa antes de adentrarem no detector de massas. As técnicas de ionização a pressão atmosférica (API) são amplamente usadas para identificação de metabólitos, principalmente devido sua habilidade de ser acoplada a cromatografia líquida e gerar íons moleculares intactos em fase gasosa, sem a necessidade de vácuo. As fontes clássicas de ionização, ionização por electrospray (ESI) e a ionização química a pressão atmosférica (APCI), cobrem diferentes faixas de massas e de polaridade de analitos (Figura 5.1). Vários outros métodos de ionização tem

surgido com o intuito de ampliar ainda mais a aplicabilidade da espectrometria de massas, no entanto uma lista exaustiva foge do objetivo proposto aqui.[46-3]

Por ser uma técnica de ionização branda e permitir a análise de compostos de alta polaridade (considerando que as reações metabólicas produzem metabólitos, em geral, mais polares) e em matrizes complexas, a ionização por "electrospray" (ESI) foi o método de ionização de escolha para esse trabalho e será discutido em maiores detalhes nesse capítulo.

Figura 5.1 - Gráfico da polaridade *versus* massa do analito, destacando as regiões onde cada método de ionização é aplicável.



Fonte: adaptado de ROSENBERG, E. The potential of organic (electrospray- and atmospheric pressure chemical ionisation) mass spectrometric techniques coupled to liquid-phase separation for speciation analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1–2, p. 841-889, 2003.

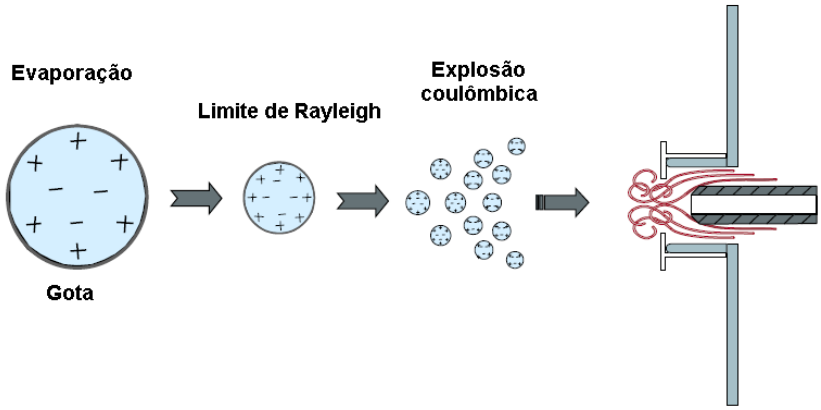
5.1.3. Ionização por "electrospray" (ESI)

O processo de ionização por "electrospray" é eletroforético por natureza.[7] De maneira geral, o campo elétrico aplicado na ponta do capilar conduz a separação de cargas positivas e negativas existentes na solução. Por exemplo, no modo positivo, a ponta do capilar tem, relativamente, um potencial positivo mais alto do que o orifício de vácuo ou "skimmer", dependendo do aparelho. Assim, as cargas positivas na superfície da gota repelem umas às outras e a superfície do líquido se expande para longe da ponta do capilar. Quando a força eletrostática e a tensão superficial são balanceadas, a superfície do líquido toma a forma de um cone, com um

semiângulo de 49,3º no seu vértice. Essa disposição geométrica da superfície do líquido ficou conhecida como "cone de Taylor" em homenagem aos trabalhos realizados por G. Taylor. À medida que essa pequena gotícula cresce, a repulsão causada pelo excesso de cargas positivas supera a tensão superficial e, então, a formação de gotículas menores ocorre a partir do vértice do cone.[8]

Dois mecanismos foram propostos para explicar a formação de íons em fase gasosa a partir de líquidos. O primeiro é conhecido como modelo da carga residual (CRM), Figura 5.2. Neste, a evaporação do solvente a partir da gota inicialmente formada, conduz a um aumento na densidade de carga na superfície do líquido. Quando, finalmente, a repulsão entre as cargas supera a tensão superficial, ponto conhecido como limite de Rayleigh, ocorre a "explosão coulômbica" e a gota se fragmenta. Esse processo continua com a evaporação de todo o solvente até, finalmente, os íons individuais ou "clusters" de íons serem formados em fase gasosa.[8-9]

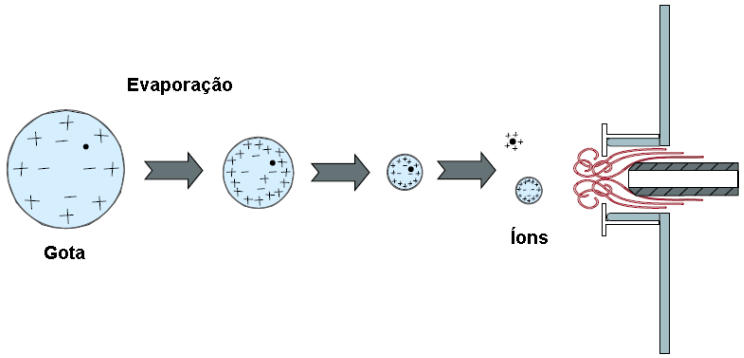
Figura 5.2 - Modelo da carga residual (CRM). A evaporação do solvente a partir da gota inicialmente formada conduz a um aumento na densidade de carga na superfície do líquido. Quando a repulsão entre as cargas supera a tensão superficial, ocorre a explosão coulombica e a gota se fragmenta. Esse processo se repete até a liberação dos íons em fase gasosa.



Por outro lado, no modelo de evaporação iônica (IEM), Figura 5.3, a evaporação do solvente e a "explosão coulômbica" reduz o tamanho das gotas carregadas até um determinado raio crítico (aproximadamente 10-20 nm), onde então a emissão de íons na fase gasosa começaria ocorrer. A evaporação iônica substitui a "explosão coulômbica" e continua até que os íons ou "clusters" de íons sejam formados em fase gasosa.[8] Acredita-se ainda que os dois

modelos possam ocorrer, sendo que íons menores são provavelmente formados por IEM, enquanto que íons maiores, como no caso das proteínas, tendem a ser formadas por CRM.

Figura 5.3 - Modelo de evaporação iônica (IEM). A evaporação do solvente e a "explosão coulômbica" reduz o tamanho das gotas carregadas até um determinado raio crítico, onde então a emissão de íons na fase gasosa começa ocorrer.



Durante a ionização por "electrospray" três processos essencialmente distintos podem ocorrer no interior do capilar: reações redox (oxidação/redução), que produzem íons moleculares ($M^{+\cdot}$) ou ($M^{-\cdot}$); reações ácido/base (protonação/desprotonação), que resultam na formação de moléculas protonadas $[M+H]^+$ ou desprotonadas $[M-H]^-$ e a coordenação com cátions (geralmente da família 1A) ou ânions (principalmente cloretos) que conduzem a formação de moléculas cationizadas $[M+Na]^+$e $[M+K]^+$ ou anionizadas $[M+Cl]^-$.[8-10]

5.1.4. Instrumento híbrido do tipo Qq-TOF

As vantagens de um analisador do tipo TOF têm sido exploradas desde a década de 1990 em instrumentos híbridos, onde é empregado como um segundo analisador de massas. O primeiro analisador é acoplado ao TOF de maneira que a aceleração dos íons tenha uma trajetória perpendicular entre os dois analisadores. A principal vantagem de ter um analisador do tipo TOF em último estágio do instrumento é o fato dele ser capaz de transmitir íons simultaneamente, conduzindo a uma melhora significativa na sensibilidade. De fato, essa capacidade de detectar ao mesmo tempo todos os íons com uma boa precisão, torna o analisador do tipo TOF ideal para ser acoplado com detectores exploratórios "do inglês, *scanning*

analysers" que podem detectar os íons de maneira sucessiva durante um período de tempo. Assim, essa combinação tem a vantagem de possibilitar análises extremamente rápidas e com excelente sensibilidade. Nos analisadores do tipo tempo-de-voo (TOF), os íons provenientes da fonte de ionização ou da célula de colisão quadrupolar são acelerados ortogonalmente por um pulso de energia (pulso de extração) antes de serem lançados no vácuo por uma distância definida. Assim íons com menor razão *m/z* possuem maior velocidade e chegam primeiro ao detector em relação aqueles com maior razão *m/z*. Dessa forma é possível obter a relação massa/carga, medindo-se o tempo de deslocamento dos íons até o detector. [11]

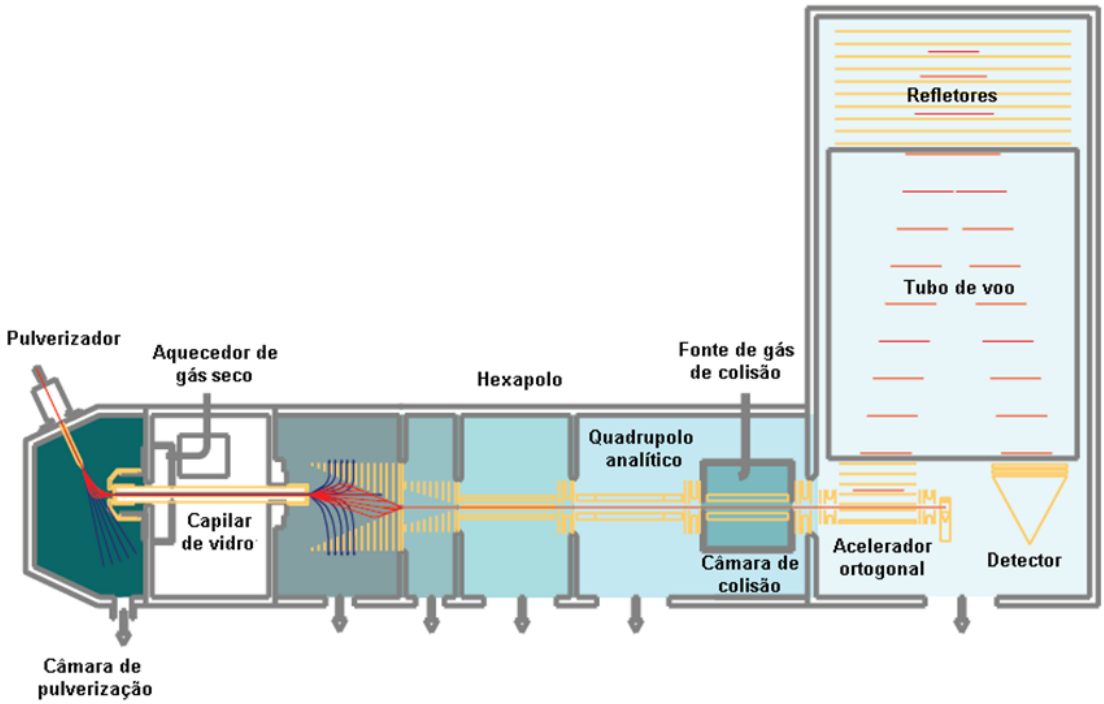
Nos instrumentos híbridos do tipo Qq-TOF, um analisador do tipo quadrupolo Q1 e uma célula de colisão quadrupolar (ou hexapolar, dependendo do aparelho) q2 são acoplados ao detector do tipo TOF, por esse motivo essa configuração é geralmente conhecida como Qq-TOF. Esse instrumento pode ser descrito como um triploquadrupolo em que o último quadrupolo é substituído por um analisador do tipo tempo-de-voo. Um analisador de massas do tipo quadrupolo consiste de quatro cilindros metálicos paralelos. Uma corrente elétrica do tipo DC e um potencial RF (rádio frequência) alternante é aplicado sobre eles de forma que os íons produzidos na fonte de ionização do instrumento sejam focalizados ao centro da região entre os cilindros, atravessando-os de forma axial. A trajetória dos íons é, portanto, dependente do campo elétrico produzido, de forma que apenas íons de uma particular razão *m/z* terão uma trajetória estável, alcançando o detector. A RF pode ser variada para que íons de diferentes razões *m/z* alcancem o detector, gerando assim o espectro de massas. A trajetória dos íons pode ser bastante complexa, podendo ser simplificadamente descrita como helicoidal.[11]

No modo (MS) do Qq-TOF com acelerador ortogonal, os quadrupolos Q1 e q2 operam apenas no modo radiofrequência (RF). Neste modo, a faixa de íons que passa pelos quadrupolos é expandida fazendo com que eles atuem somente como guias de íons mas mesmo assim agem limitando a faixa de massa que pode ser analisada pelo TOF. Dessa forma, o resultado é um bom desempenho com respeito à resolução e acurácia do analisador do tipo TOF, mas com a faixa de massa limitada pela transmissão dos quadrupolos.[11]

No modo de operação MS/MS, o quadrupolo Q1 é usado como filtro de íons para selecionar e transmitir somente íons precursores de interesse. Esses íons são acelerados por uma diferença de potencial entre 20 e 200 eV, antes de adentrarem na célula de colisão q2, onde sofrerão fragmentação pela colisão com moléculas de gás inerte (usualmente argônio ou nitrogênio), processo conhecido como CID (do inglês, *colision induced dissociation*). Por fim, os íons produzidos na célula de colisão adentram o analisador TOF onde serão separados pela relação massa/carga de acordo com seus tempos de voo.[11]

Atualmente os analisadores do tipo Qq-TOF apresentam alta resolução e precisão (até 5ppm). Os mecanismos que possibilitaram essa elevada resolução foram (i) a extração pulsada atrasada (do inglês, *delayed pulsed extraction*) e (ii) refletores (do inglês, reflectrons). No primeiro caso, uma demora entre o tempo de ionização e a extração (geralmente de nano segundos a microssegundo) é usada para reduzir a diferença na energia cinética inicial dos íons. Durante esse intervalo, a energia cinética resultante da ionização faz com que os íons se distribuam na área de extração de forma que as espécies de mesma razão m/z com energia cinética maior se aproximam mais do detector do que aqueles com energia cinética menor. O pulso extrator é, portanto, aplicado na forma de um gradiente de energia na região onde estão os íons. Os íons com menor energia cinética inicial recebem um pulso com mais energia e os íons com maior energia cinética inicial recebem um pulso com menos energia, igualando-se boa parte da energia cinética residual e a aceleração dos íons, melhorando a resolução do TOF. Já o segundo caso, envolve o uso de refletores eletrostáticos que aumentam o caminho ótico percorrido pelos íons. Isso aumenta o tempo de voo e, consequentemente, a resolução do equipamento. Estes refletores eletrostáticos são constituídos por uma série de grades que criam um campo elétrico responsável por retardar o voo dos íons e os reflete de volta no tubo de voo, obrigando-os a fazer uma curva no espaço. Durante essa curva, as diferenças na velocidade dos íons de mesma razão m/z são compensadas, o que faz com que os íons cheguem ao mesmo tempo ao detector.[11]

Figura 5.4 - Visão funcional do ESI-QqTOF



Fonte: MicrOTOFQ manual. Bruker Daltontics.2008.

5.1.5. Identificação dos metabólitos

Após a geração do espectro de massas, este deve ser inspecionado para se identificar a presença de metabólitos de fase I e II. A Tabela 5.1 apresenta uma lista das reações de biotransformação mais comuns e a mudança de massas correspondentes para metabólitos de fase I. O processo metabólico de fase I mais corriqueiro é a hidroxilação do composto parental que gera um metabólito M+16 Da, em geral produzido pela ação das enzimas do citocromo P450.

Tabela 5.1 - Reações de biotransformação mais comuns e as respectivas alterações de massas produzidas.

Mudança de Massa (Da)	**Tipo de biotransformação**
-28	Desetilação ($-C_2H_4$)
-14	Desmetilação ($-CH_2$)
-2	Oxidação por dois elétrons ($-H_2$)
+2	Redução por dois elétrons ($+H_2$)
+14	Adição de oxigênio e oxidação por dois elétrons ($+O-H_2$)
+16	Adição de oxigênio ($+O$)
+18	Hidratação ($+H_2O$)
+30	Adição de dois átomos de oxigênio e oxidação por dois elétrons ($+2O-H_2$)
+32	Adição de dois átomos de oxigênios ($+2O$)

A Tabela 5.2 apresenta uma lista dos mais comuns metabólitos de fase II e as correspondentes mudanças de massa. Metabólitos de fase II envolvem a conjugação de compostos endógenos com o objetivo de tornar o composto parental mais solúvel e são produzidos por uma série de enzimas já discutidas no capítulo 2 dessa dissertação.

Tabela 5.2 - Mais comuns metabólitos de fase II e as correspondentes mudanças de massa.

Mudança de massa (Da)	Conjugado
+42	Acetil
+80	Sulfato
+57	Glicina
+107	Taurina
+176	Glicuronídeo
+307 ou 305	Glutationa

Embora o espectro de massas simples (MS) é frequentemente suficiente para identificar o tipo de biotransformação que ocorreu, a fragmentação dos íons precursores (MS/MS) é necessário para identificar a região da molécula onde aconteceu a modificação estrutural. Essa é uma etapa basicamente investigativa e de fundamental importância para os químicos medicinais.

5.1.6. Métodos *in sílico* aplicados ao estudo de biotransformação de fármacos

Considerando a importância do conhecimento das propriedades farmacocinéticas e toxicológicas durante o estágio de desenvolvimento de um novo candidato a protótipo de fármaco, vários métodos *in sílico* têm sido desenvolvidos com o intuito de prever tais propriedades, auxiliando os estudos experimentais e permitindo que candidatos potencialmente tóxicos sejam eliminados antes dos estágios clínicos avançados. Estes estudos são capazes de prever o destino metabólico de determinadas substâncias, as regiões da molécula que são susceptíveis ao ataque das enzimas metabolizadoras, bem como os possíveis metabólitos formados. [12]

As ferramentas utilizadas na previsão de tais propriedades envolvem estudos de relação estrutura-atividade quantitativa (QSAR), modelagem molecular, estudos de similaridade química (2D e 3D) e programas que fazem uso de extensos bancos de dados contendo o destino metabólico de uma grande número de substâncias experimentalmente determinadas.[13] Outras excelentes combinações são de modelos 3D obtidos por modelagem molecular e sofisticadas abordagens de QSAR baseadas em análises de parâmetros multivariados obtidos a partir de campos moleculares de interação (MIFs), como encontrado no programa *MetaSite.* O *MetaSite* é um sistema restrito as principais enzimas do citocromo P450. No final do procedimento os átomos do substrato são classificados de acordo com suas acessibilidades e reatividades. Em outras palavras ele utiliza a estrutura 3D, tanto da enzima quanto do substrato fornecendo os principais sítios de metabolismo da molécula estudada.[12]

A identificação do sítio de metabolismo nas fases iniciais do processo de desenvolvimento de fármacos é comumente realizada por LC-MS/MS. No entanto, as informações obtidas com esses experimentos são frequentemente limitadas, uma vez que nos fornece apenas uma indicação genérica de qual a porção da molécula está sujeita a oxidação, redução ou hidrólise pelas enzimas do citocromo P450. Nesse contexto, o software MetaSite possibilita um refinamento dos resultados obtidos pelo experimento de LC-MS/MS ao prever as posições específicas de sítios de metabolismo na estrutura da molécula parental. Desse modo, combinando as informações experimentais com o poder preditivo desse método computacional é possível chegar a uma hipótese mais aproximada da posição do sítio de metabolismo, guiando assim as modificações estruturais necessárias para se modular as propriedades metabólicas de um candidato fármaco.

Nesta etapa do trabalho, foi realizada a caracterização metabólica dos compostos Nequimed54 e Nequimed125.

5.2. Materiais e métodos experimentais

5.2.1. Extração e preparação das frações microssomais

Ratos da raça Wistar de 6-8 semanas foram mantidos em sala apropriada a 20-23 °C com umidade relativa de aproximadamente 50%, ciclos de luz e escuridão de 12 h, livre de patógenos, em ar limpo e com constante suprimento de água. Estes animais foram mantidos no laboratório de Neuroendócrinologia, do Departamento de Ciências Fisiológicas, da Universidade Federal de São Carlos, laboratório no qual também foram realizadas as extrações dos fígados.

Os fígados de ratos foram degelados, pesados, picados e submetidos à extração das frações microssomais. Os pedaços de fígado picado foram homogeneizados em um ultra-som (Ultra-Turraz), em meio a solução de tampão PBS gelada. As frações foram obtidas através de uma sequência de centrifugações. Primeiro por 5 minutos a 600 x g, onde o sobrenadante foi recolhido e novamente centrifugado a 6.500 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente recolhido e submetido à outra centrifugação por 20 minutos, agora em uma rotação de 12.000 x g. Todas as centrifugações foram realizadas a uma temperatura de 4 ºC.

Finalmente, para a obtenção das frações microssomais, a amostra foi submetida a uma ultracentrifugação com uma rotação de 126.000 x g por 60 minutos a 4 ºC. O material depositado (pellets) foi removido do tubo de ultracentrifugação e transferido para um tubo de polipropileno com tampão PBS (pH = 7,4). A solução foi homogeneizada, utilizando um ultra-som. As amostras foram transferidas para tubos criogênicos e guardadas em freezer à -80ºC. Para cada extração microssomal, a determinação da concentração total de proteínas foi efetuada usando o método de BRADFORD. Essa etapa foi realizada no Grupo de Síntese Orgânica e HPLC da Universidade Federal de São Carlos sob a supervisão da professora Dr[a]. Regina V. Oliveira.

5.2.2. Procedimentos de incubação *in vitro*

Os ensaios *in vitro* foram realizados em tubos de ensaio e em duplicatas. Preparou-se inicialmente uma solução estoque a 10 mM do composto teste em DMSO. Os microssomas foram descongelados e sua concentração ajustada para 20mg/ml de proteína microssomal. Para um total de 190 µL, foram adicionados 181 µL de tampão fosfato de potássio (100 mM a pH

8,0), 2 µL de uma solução de NADPH a 20 mM (para uma concentração final de 1 mM) e 5 µL de microssomas (para uma concentração final de 0,5 mg/ml). Seguiu-se com a pré-incubação dos microssomas, tampão e composto teste (2 µL da solução estoque para uma concentração final de 100 µM) em banho-maria a 37 ºC por 5 minutos. O percentual de DMSO no ensaio foi de 0,01%. A reação foi iniciada com a adição de 10µL de NADPH a 20 mM, seguida pela incubação por 3 horas a 37 ºC em leve agitação. A reação foi finalizada pela adição de 200 µL de acetato de etila.

A mistura foi levada ao vortex e depois centrifugada a 9000 rpm por 5 minutos. A fração orgânica foi recolhida e secada em temperatura ambiente utilizando-se um SPEEDVAC. O material seco resultante foi redissolvido na fase móvel e congelado a -20 ºC até a análise por LC-MS. As análises foram realizadas em um equipamento de LC-ESI-QqOTOF-MS da Bruker Daltonics no laboratório de Cromatografia do Instituto de Química de São Carlos (CROMA) sob a supervisão do Professor Dr. Fernando Mauro Lanças.

Neste ensaio, os seguintes controles foram adicionados:

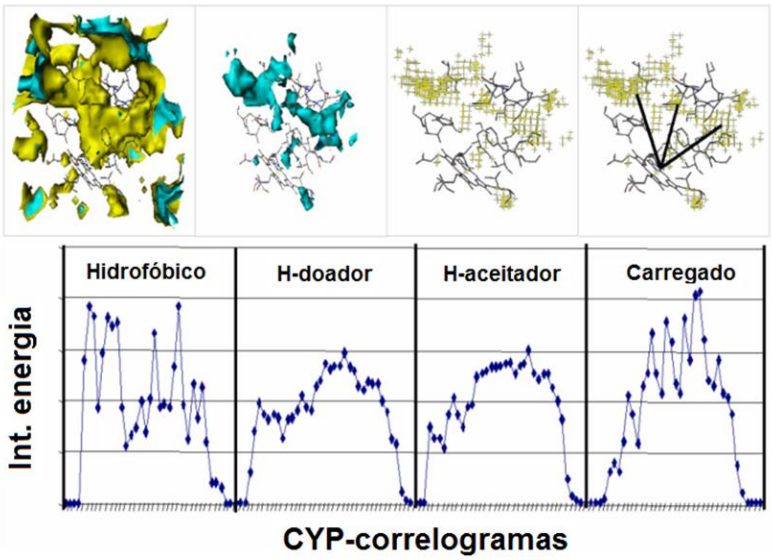
- Controle A: solução do Composto teste na concentração 100 µM, dissolvido em tampão fosfato de potássio (100 mM e pH 8,0) a 0,01% de DMSO.
- Controle B: solução do Composto teste na concentração 100 µM, dissolvido em tampão fosfato de potássio (100 mM e pH 8,0) a 0,01% de DMSO e NADPH na concentração de 1mM.
- Controle C: solução do Composto teste na concentração 100 µM, dissolvido em tampão fosfato de potássio (100 mM e pH 8,0) a 0,01% de DMSO e microssomas de fígado de rato na concentração de 0,05 mg/mL de proteína microssomal.

5.2.3. Predição de sítios de metabolismo utilizando o software MetaSite.

A metodologia aplicada no MetaSite envolve o cálculo de dois conjuntos de descritores, um para específica CYP envolvida e o outro para o potencial substrato, fornecendo uma "impressão digital" química (do inglês, *fingerprint*) de cada um deles. O conjunto de descritores usados para caracterizar a CYP envolvida é baseado em campos moleculares de interação

flexíveis (GRID-MIFs). Esses campos independem da posição inicial da cadeia lateral dos resíduos de aminoácidos e são mais adequados para simular a adaptação que a enzima sofre com a interação do substrato. Sondas físico-químicas são usadas para calcular o potencial de interação em cada ponto do sítio ativo com o objetivo de se obter informações quimicamente específicas sobre a maneira com que a macromolécula pode interagir com seus ligantes. Os pontos de interação 3D foram usados para calcular o "fingerprint" da enzima usando o programa GRIND. Para cada mapa de interação CYP-sonda, a informação é convertida em um histograma que captura as interações farmacofóricas da estrutura tridimensional da proteína. Tais histogramas são chamados de correlogramas que apresentam as distâncias entre o centro reativo do citocromo (Ferro-oxeno na porção heme) e as diferentes regiões químicas no interior do sítio ativo da enzima, veja a Figura 5.5.[14]

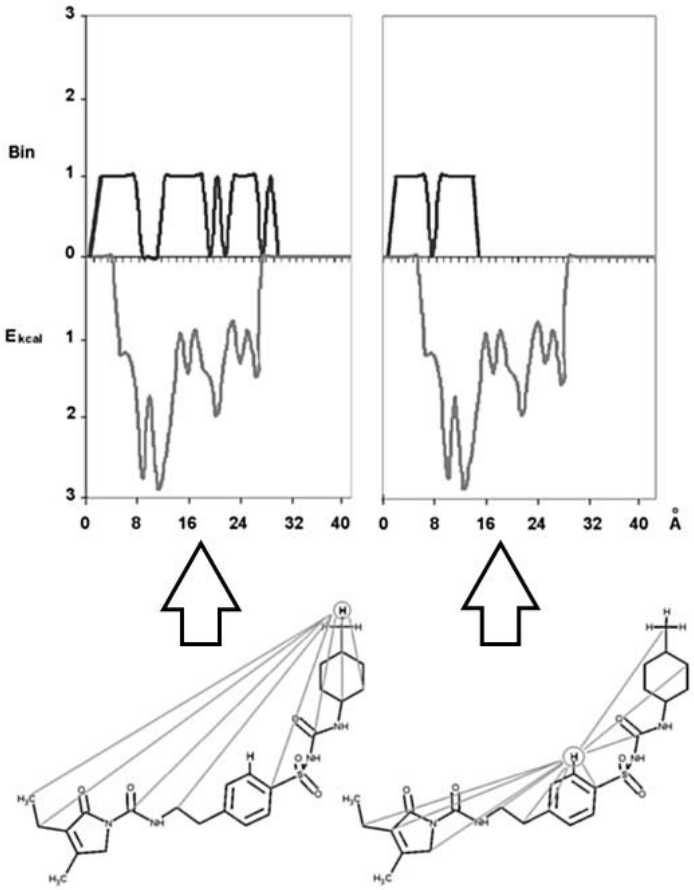
Figura 5.5 – Representação de um correlograma com as distâncias entre o centro reativo do citocromo (Ferro-oxeno, na porção heme) e as diferentes regiões químicas no interior do sítio ativo da enzima.



A estrutura tridimensional de cada substrato foi submetida a uma busca conformacional, onde os confômeros de baixa energia foram selecionados para realização dos cálculos de predição. Os descritores utilizados para caracterizar o substrato também foram obtidos a partir de sondas físico-químicas, sendo que todos os átomos do substrato foram categorizados como: hidrofóbicos, doadores de ligação de hidrogênio, aceitadores de ligação de hidrogênio ou eletricamente carregados. As distâncias entre as diferentes posições atômicas classificadas

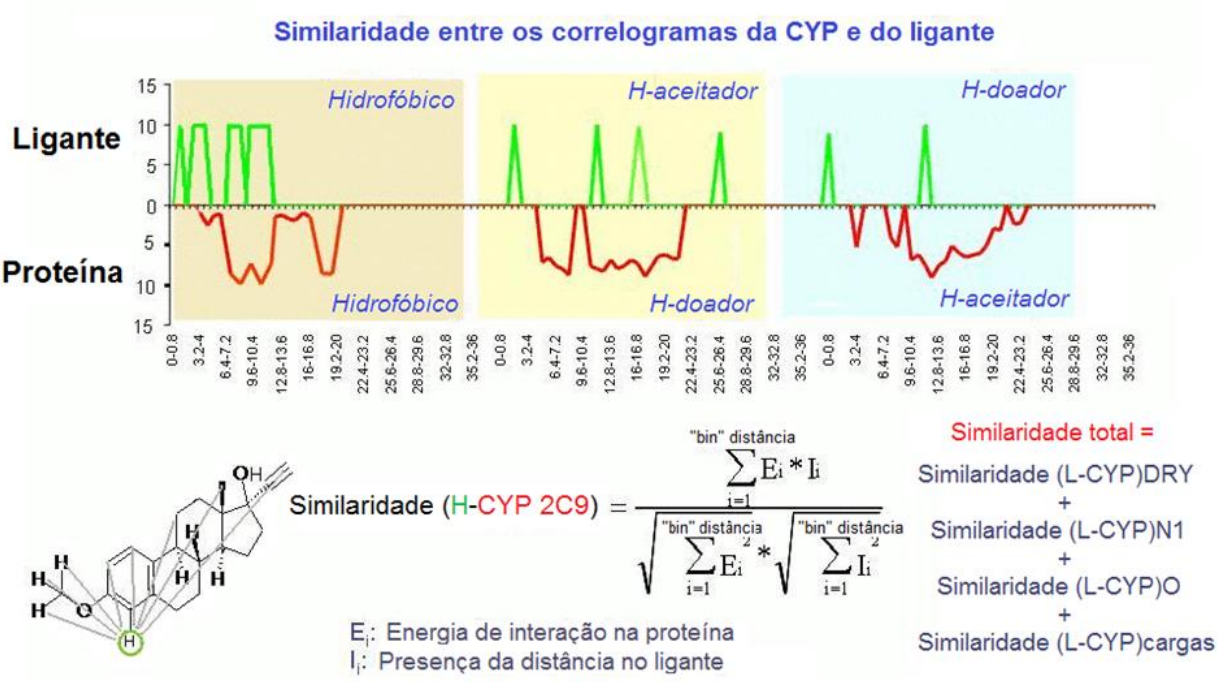
anteriormente foram medidas e, então, transformadas em códigos binários (Figura 5.6). Assim, os valores de 1 e 0 foram atribuídos a cada "bin", indicando respectivamente a presença ou ausência daquela distância entre os átomos avaliados, produzindo um "fingerprint" de cada categoria de átomos do substrato.[14]

Figura 5.6 – Impressão digital ("Fingerprint") de cada categoria de átomos do substrato. As distâncias entre as diferentes posições atômicas classificadas são medidas e, então, transformadas em códigos binários. Assim, os valores de 1 e 0 são atribuídos a cada "bin", indicando respectivamente a presença ou ausência daquela distância.



Uma vez obtidas as distâncias entre as diferentes regiões do sítio ativo da enzima e o centro reativo da CYP, uma comparação direta com as distâncias entre os diversos átomos do ligante é feita. A complementariedade das distâncias dos MIFs das regiões hidrofóbicas, carregadas, doadoras ou aceitadores de ligação de hidrogênio da enzima e do substrato é computada usando o índice de similaridade de Carbó, como demonstrado na Figura 5.7.[14]

Figura 5.7 - Cálculo de similaridade entre os correlogramas da CYP e do ligante utilizando o índice de similaridade de Carbó.



A predição do sítio de metabolismo é baseada na hipótese de que as distâncias do centro reativo na CYP (Ferro-oxeno na porção heme) com os pontos de interação na cavidade da proteína (GRID-MIFs) se correlacionam com as distâncias entre o centro reativo da molécula e as posições dos diferentes tipos de átomos passíveis de interação no substrato. Assim uma pontuação é atribuída a cada átomo do ligante, sendo essa proporcional à exposição dos mesmos ao grupo heme, representando o componente que avalia a acessibilidade do substrato em relação ao sítio reativo da enzima.[14]

Como apresentado, as enzimas do citocromo P450 catalisam tanto reações de oxidação quanto de redução. As reações oxidativas são mais comuns e incluem a hidroxilação de anéis aromáticos, *N*-, *O*- e *S*-desalquilação, *N*-oxidação, sulfoxidação, *N*-hidroxilação, desaminação, desalogenação e dessulfuração. Algumas CYPs apresentam forte preferência por certos mecanismos de reações. Essas preferência é considerada pelo MetaSite ao introduzir o componente M*i* (probabilidade de ocorrer um específico mecanismo de reação). Além disso, a maioria dessas reações requer a formação de espécies radicalares que usualmente representam a

etapa determinante da velocidade da reação. Por isso, um componente de reatividade R_i é calculado para cada átomo do substrato, levando em consideração a energia de ativação requerida para produzir os intermediários reativos para um específico mecanismo de reação. Isso é feito através de uma combinação de cálculos de orbitais moleculares e reconhecimento de fragmentos. O componente R_i independe da específica isoforma, estando relacionado basicamente com propriedades físico-químicas do substrato.[14]

Assim podemos observar que três componentes dirigem o controle do sítio de metabolismo na estrutura do substrato. O primeiro componente é a acessibilidade do átomo em relação ao centro catalítico da enzima (E_i), o segundo é a reatividade química do referido átomo (R_i) e por último a probabilidade de ocorrer o específico mecanismo de reação (M_i). Uma vez que os três componentes são calculados, o sítio de metabolismo pode ser descrito como uma função probabilidade P_{SOM}, mostrada na equação abaixo que está correlacionada com a energia livre global do processo.[14]

$$P_{SOM} = E_i.R_i.M_i$$

A função P_{SOM} assume valores distintos para os diferentes átomos do ligante de acordo com os valores dos componentes E_i, R_i.e M_i Quando o átomo do ligante está exposto ao centro catalítico da enzima (E_i possui uma pontuação elevada), mas sua reatividade é muito baixa (R_i possui uma pequena pontuação), a probabilidade de aquele átomo ser um sítio de metabolismo será próxima de zero. De maneira similar, quando um átomo é muito reativo (R_i tem um valor de pontuação alto), mas ele não está exposto ao centro catalítico da enzima (E_i tem uma pontuação muito baixa), a probabilidade de esse átomo ser um sítio de metabolismo também é próxima de zero. Portanto, para ser considerado um sítio de metabolismo, um átomo deve possuir valores significantes de reatividade e acessibilidade em relação ao grupo Heme. No entanto, se duas posições atômicas apresentarem valores de pontuação similares para os componentes E_i e R_i (ou valores similares do produto E_i x R_i), o sítio de metabolismo deverá ser aquele que apresenta maior probabilidade de ocorrer o específico mecanismo de reação, ou seja, aquele que apresentar maior valor de M_i.[14]

5.3. Resultados e discussão

5.3.1. Identificação dos metabólitos principais do composto Nequimed54

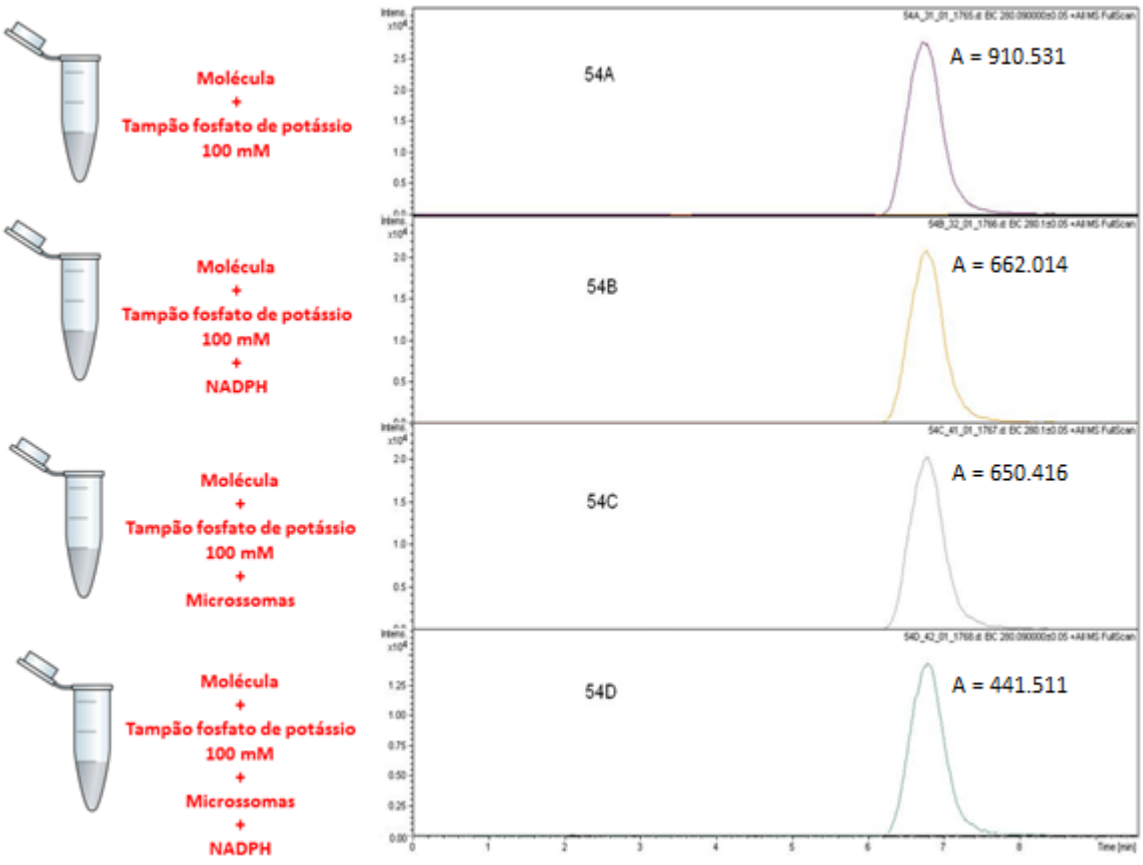
Os produtos de biotransformação foram identificados pela comparação entre os cromatogramas obtidos das incubações microssomais e aqueles obtidos dos controles usados nos ensaios. Essa análise comparativa permitiu identificar possíveis interferentes e diferenciá-los dos metabólitos produzidos. Além disso, tais controles fornecem informações importantes sobre a estabilidade química das moléculas estudadas frente a cada componente do meio reacional. Os controles foram submetidos aos mesmos procedimentos de preparação e extração que foram utilizados nas incubações microssomais.

Os três controles utilizados nesse ensaio foram genericamente nomeados de controle A, B e C. O controle A envolve a incubação do composto teste com o tampão da reação (tampão fosfato de potássio na concentração de 100 mM e pH 8,0) e fornece uma informação valiosa sobre a estabilidade química da molécula frente ao pH da reação. O controle B, envolve a incubação do composto testes com o tampão da reação e NADPH (1 mM). O NADPH é o agente redutor biológico requerido para iniciar a reação de biotransformação catalisada pelas enzimas metabolizadoras dependentes de NADPH (enzimas do citocromo P450 e flavina monooxigenases). Muitos compostos quimicamente instáveis podem reagir com o NADPH através de uma reação não enzimática. A avaliação dessa via de degradação é importante, pois os estudos de estabilidade metabólica envolvem, geralmente, um tempo prolongado de incubação da molécula com esse agente redutor. Por fim, o controle C envolve a incubação do composto teste com o tampão da reação e a suspensão microssomal. Tal controle pode nos dizer se existe alguma rota de biotransformação do composto que não seja dependente de NADPH. Além disso, o controle C nos fornece informações sobre possíveis interferentes presentes na fração microssomal.

As Figura 5.8 e Figura 5.9 referem-se aos cromatogramas obtidos da incubação microssomal e dos controles usados no estudo de biotransformação do composto Nequimed54

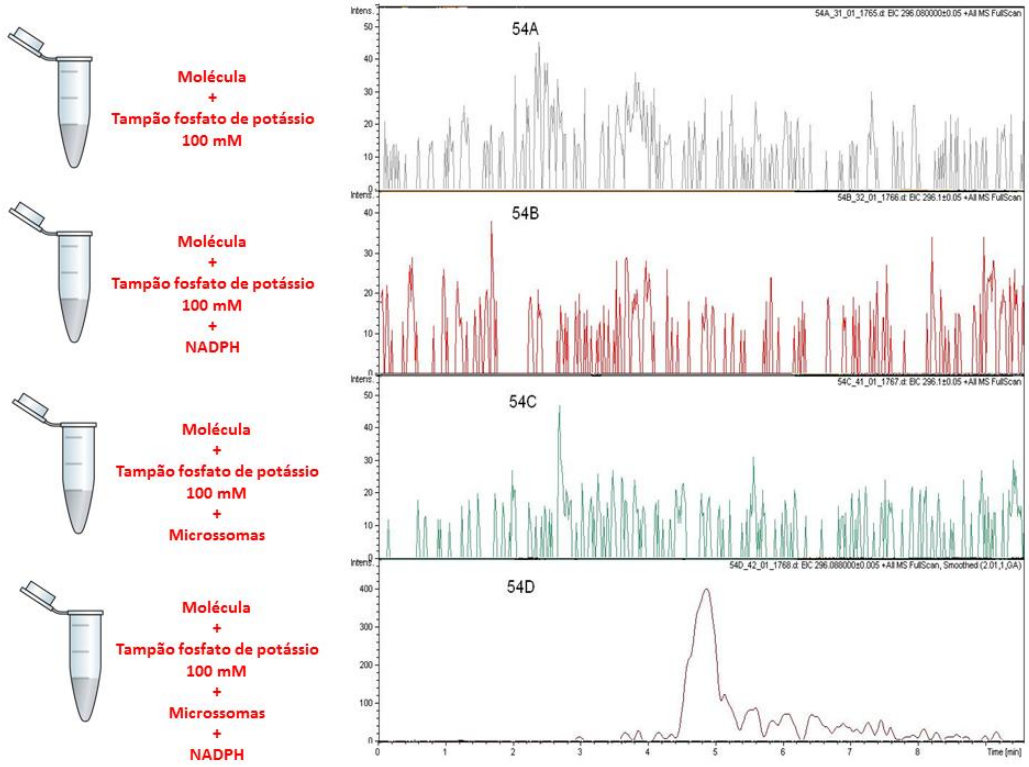
por LC-ESI-QqTOF-MS, utilizando-se o modo de ionização positivo. A fase móvel usada nessa análise foi composta de acetonitrila e tampão acetato de amônio (50:50 V/V) em pH 4,0. A ionização do composto Nequimed54 gerou um forte sinal do íon pseudomolecular $[M+H]^+$ de *m/z* 280. A Figura 5.8 mostra os cromatogramas do íon extraído no modo de operação MS. Pode-se observar pela análise dos cromatogramas 54B e 54C (controles) uma diminuição na área do pico cromatográfico de 28% e 28,6%, respectivamente, em relação ao controle 54A. Essa diminuição pode estar relacionada com alguma instabilidade da molécula frente o agente redutor (NADPH) presente no controle 54B e devido a ação de enzimas metabolizadoras não-dependentes de NADPH, no caso do controle 54C. O cromatograma 54D mostra uma diminuição da área do pico cromatográfico de 51,6%. Isso sugere uma depleção do substrato devido à ação de enzimas metabolizadoras dependentes de NADPH presentes na suspensão microssomal.

Figura 5.8 – Cromatogramas do íon extraído de *m/z* 280 no modo de operação MS dos controles e da incubação microssomal referentes ao estudo de biotransformação do composto Nequimed54.



Com base nesses resultados, uma busca sistemática por metabólitos foi realizada no íon cromatograma total, monitorando-se as variações de *m/z* típicas de processos de biotransformação de fase I. A Figura 5.9 mostra a identificação do único metabólito observado $[M+16]^+$. Pode-se notar que o íon extraído de *m/z* 296,00 está presente apenas na incubação microssomal 54D, com um tempo de retenção 4,8 min. A presença desse pico apenas nesse cromatograma afasta a possibilidade do mesmo ser um possível interferente da matriz ou produto de biotransformação não dependente de NADPH. Essa variação da *m/z* é condizente com uma hidroxilação, processo muito comum dentro do contexto das reações de biotransformação. Após a identificação do metabólito $[M+16]^+$, seguiu-se a caracterização estrutural no modo de operação MS/MS. O espectro de fragmentação do íon precursor $[M+16]^+$ nos fornece informações importantes para a identificação do sítio de metabolismo. Essa etapa será discutida na próxima seção desse capítulo.

Figura 5.9 – Identificação do metabólito *m/z* 296, $[M+16]^+$. A presença do pico cromatográfico apenas na incubação microssomal 54D afasta a possibilidade do mesmo ser um possível interferente da matriz ou um produto de biotransformação não dependente de NADPH.

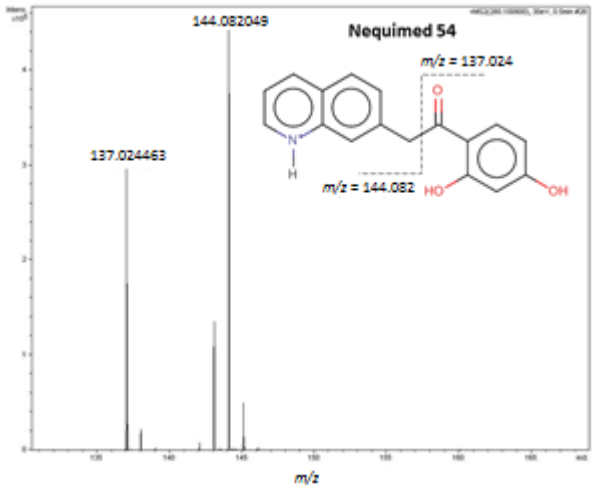


5.3.2. Identificação dos sítios de metabolismo do composto Nequimed54

Por apresentar semelhanças estruturais com a molécula parental, o metabólito tende a produzir, na maioria das vezes, um espectro de fragmentação semelhante ao do substrato. Essa característica pode ser utilizada para identificar qual o tipo de modificação química o substrato sofreu, bem como a região da estrutura da molécula em que ela ocorreu.

A Figura 5.10 mostra o espectro de fragmentação do íon extraído de *m/z* 280 referente ao composto Nequimed54, $[M+H]^+$. As análises foram realizadas no modo de ionização positivo, utilizando-se uma energia de colisão de 35eV com uma resolução de massas 6.000. Pode-se observar a presença do sinal de dois íons fragmentos mais estáveis no espectro, o primeiro de *m/z* 137,0232 e o segundo de *m/z* 144,0820. Outros íons observados no espectro são os de *m/z* 142,0820 e 143,0820.

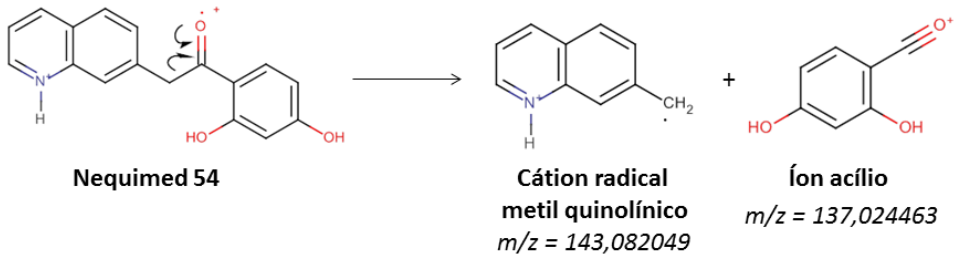
Figura 5.10 – Espectro de fragmentação do íon extraído de *m/z* 280 referente ao composto Nequimed54.



Todos os fragmentos relevantes deste espectro são produtos da clivagem alfa da cetona. O oxigênio carbonílico é o sítio preferencial de perda de elétrons durante o processo de excitação causado pelo choque do íon pseudomolecular com o gás N_2 contido na câmara de colisão. A perda de um elétron e a formação do íon pseudomolecular excitado resulta na clivagem homolítica da ligação C-C adjacente a carbonila, processo conhecido como clivagem alfa. Esse processo gera um fragmento radicalar neutro, geralmente não detectável pelo espectrômetro de

massas e um fragmento catiônico, conhecido como íon acílio. Considerando que as análises foram realizadas no modo de ionização positivo, podemos inferir que o processo ocorreu com retenção de carga no sítio radicalar, haja vista que a carga positiva permaneceu no íon acílio, sinal de *m/z* 137,0232. A carga positiva observada no cátion radical metil quinolínico deriva do processo de ionização por ESI e não do CID. A proposta do mecanismo de fragmentação segue na Figura 5.11.

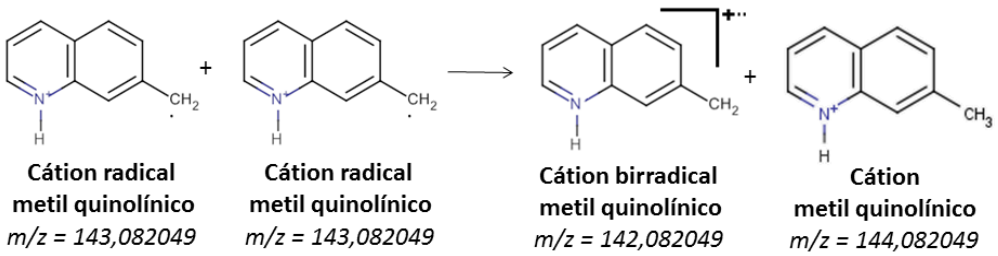
Figura 5.11 – Proposta de mecanismo de fragmentação do composto Nequimed54.



Aqui, a carga positiva do ìon acílio é fortemente estabilizada pelo efeito de ressonância com a porção diidróxifenílica. Da mesma forma, o cátion radical metil quinolínico é também estabilizado pelo efeito de ressonância com a porção quinolínica. Como podemos observar no espectro de fragmentação da Figura 5.12, o íon fragmento de maior intensidade do espectro possui uma *m/z* de 144,0820 e não de 143,0820.

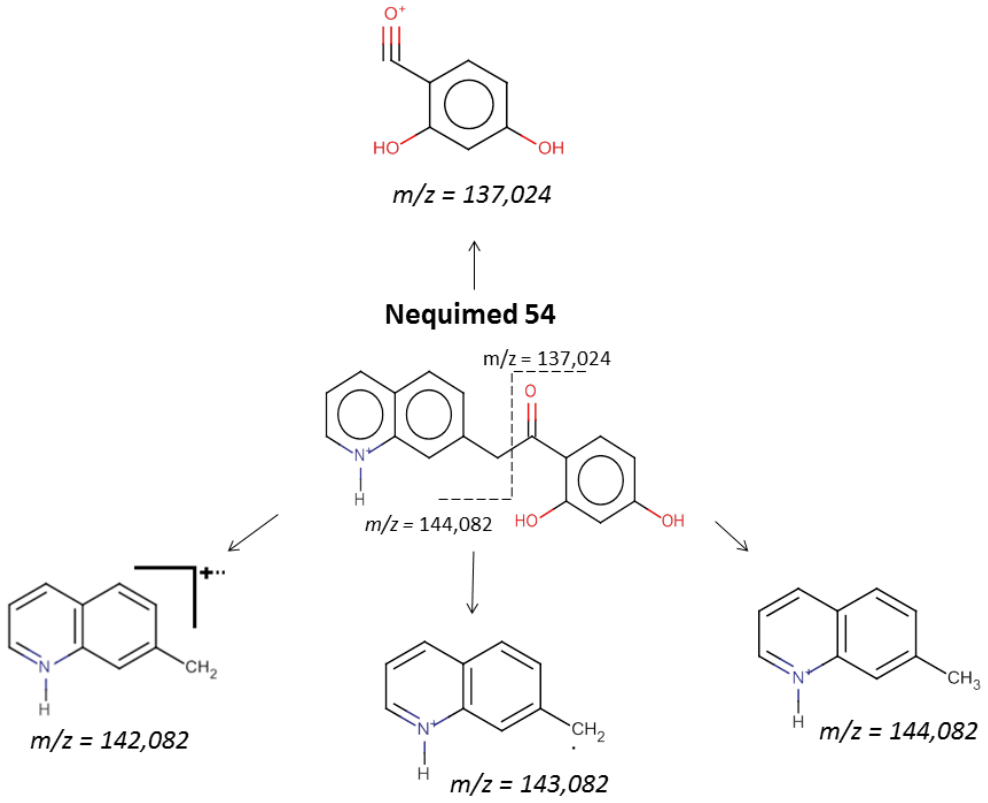
A presença desse sinal no espectro pode ser racionalizada em termos de reações radicalares que ocorrem no interior da câmara de colisão em decorrência do choque entre os fragmentos gerados.

Figura 5.12 – Colisão de espécies radicalares. Proposta de racionalização dos sinais de *m/z* 144,0820 e 142,0820 presentes no espectro de fragmentação do composto Nequimed54.



Esse mecanismo explica satisfatoriamente os sinais de *m/z* obtidos em 142,0820 e 144,0820, sendo esse último sinal o mais intenso e estável do espectro de fragmentação, haja vista que se trata de uma espécie catiônica e não radicalar. A Figura 5.13 mostra uma proposta global para explicar os sinais observados no espectro de fragmentação do composto Nequimed54.

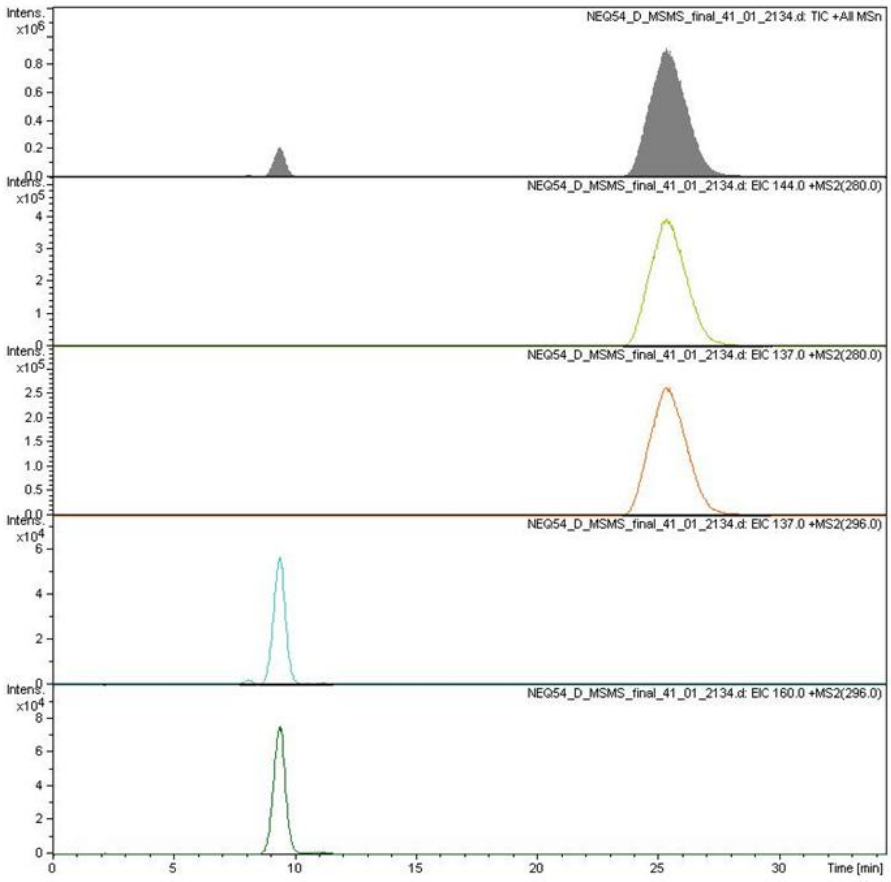
Figura 5.13 – Proposta global de racionalização do espectro de fragmentação do composto Nequimed54.



Após a análise do composto parental $[M+H]^+$ no modo de operação MS/MS, seguiu-se a fragmentação do íon $[M+16]^+$, referente ao metabólito hidroxilado identificado anteriormente. A Figura 5.14 mostra o cromatograma obtido a partir de um experimento de LC-MS/MS da incubação do composto teste com a suspensão microssomal e NADPH por um período de 6 horas. O primeiro cromatograma refere-se ao íon cromatograma total, onde podemos observar claramente a presença de dois picos cromatográficos referentes ao composto Nequimed54 (*m/z* 280) e seu metabólito formado (*m/z* 296). Os próximos quatro cromatogramas referem-se à

fragmentação de cada um dos íons precursores e o monitoramento dos íons fragmentos mais intensos e estáveis. Para o íon precursor referente ao composto teste *m/z* 280, dois íons fragmentos foram monitorados, o primeiro correspondente ao fragmento de *m/z* 144,00 (cátion metil quinolínico) e o segundo de *m/z* 137,00 (íon acílio), no tempo de retenção de Tr = 25,3 minutos. Já para o metabólito $[M+16]^+$, o íon precursor de *m/z* 296,00 produziu dois íons fragmentos, o primeiro de *m/z* 137,00 e o segundo de *m/z* 160,00, no tempo de retenção de Tr = 9,4 minutos.

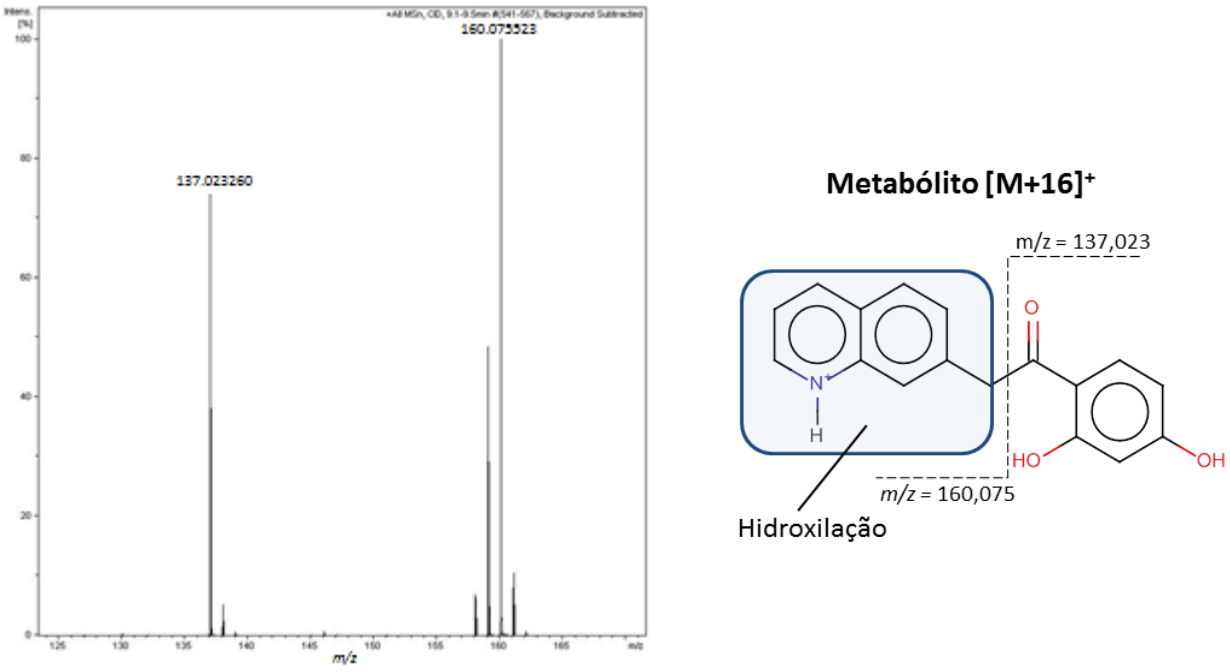
Figura 5.14 - LC-MS/MS da incubação do composto teste com a suspensão microssomal e NADPH por um período de 6 horas.



A análise comparativa desses resultados nos mostra claramente que a hidroxilação não ocorreu no fragmento de *m/z* 137,00 (íon acílio), mas sim no fragmento de *m/z* 144,00 correspondente ao cátion metil quinolínico, produzindo o fragmento de *m/z* 160, oriundo da

fragmentação do metabólito. Essa informação é valiosíssima, pois nos fornece qual a região da molécula sofreu o processo de biotransformação, restringindo as possibilidades de sítio de metabolismo apenas para a porção quinolínica da molécula, como podemos observar na Figura 5.15.

Figura 5.15 - Espectro de fragmentação do íon de *m/z* 296 e a estrutura referente ao metabólito,destacando-se a região da molécula onde ocorrer a hidroxilação do composto Nequimed54.



Pelo espectro de fragmentação (Figura 5.15) podemos sugerir que a formação dos íons filhos se deu via o mesmo mecanismo observado para o composto parental. Portanto, a formação dos fragmentos de *m/z* 158,075 e 160,075 derivam de reações radicalares que ocorrem no interior da célula de colisão em decorrência do choque entre as espécies produzidas pela fragmentação do íon pseudomolecular $[M+16]^+$, semelhantemente ao observado na fragmentação do composto parental. O fragmento de *m/z* 159,075 é um cátion monorradical produto da clivagem alfa da cetona, assim como o íon acílio de *m/z* 137,023, o processo ocorre com retenção de carga no sítio radical. A carga observada no fragmento *m/z* 160,075 deriva do processo de ionização e não da fragmentação do íon peseudomolecular $[M+16]^+$.

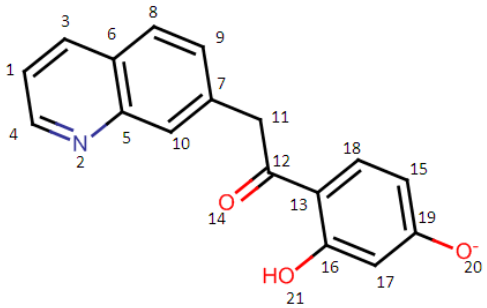
Com base, portanto, nas análises de LC-MS/MS podemos inferir que a hidroxilação do composto Nequimed54 ocorreu na porção quinolínica da molécula. No entanto, não podemos dizer a exata posição do sítio de biotransformação. Com intuito de obter informações mais detalhadas sobre a possível posição de hidroxilação, foi utilizado o software MetaSite.

5.3.2.1. Resultados de predição de sítios de metabolismo fornecidos pelo MetaSite para o composto Nequimed54.

O resultado fornecido pelo MetaSite não é otimizado para extrair todas as informações geradas pelo software, sendo necessários o uso dos resultados intermediários para criar as tabelas e os gráficos apresentados nesse trabalho. Um gráfico com os valores de E_i, R_i e P_{SOM} foi gerado para cada uma das moléculas analisadas frente as nove isoformas estudadas.

A numeração dos átomos da molécula foi feita de modo arbitrário pelo software, sem seguir nenhuma regra de numeração e é mostrada na Figura 5.16.

Figura 5.16 – Posições atômicas consideradas pelo software MetaSite nos estudos de predição de sítio de metabolismo para o composto Nequimed54.



Nequimed 54

Os resultados de predição para as nove isoformas estão ilustrados no ANEXO 1.

Podemos notar que os quatro átomos melhores pontuados em todas as isoforma avaliadas estão na porção quinolínica da molécula, sendo estes C11, N2, C1, C3 e C4, nesta ordem. Destes quatro átomos, apenas o C11 não é um carbono aromático e, sim, alifático. Vale ressaltar que uma hidroxilação nessa posição levaria a formação de um centro estereogênico. Observamos

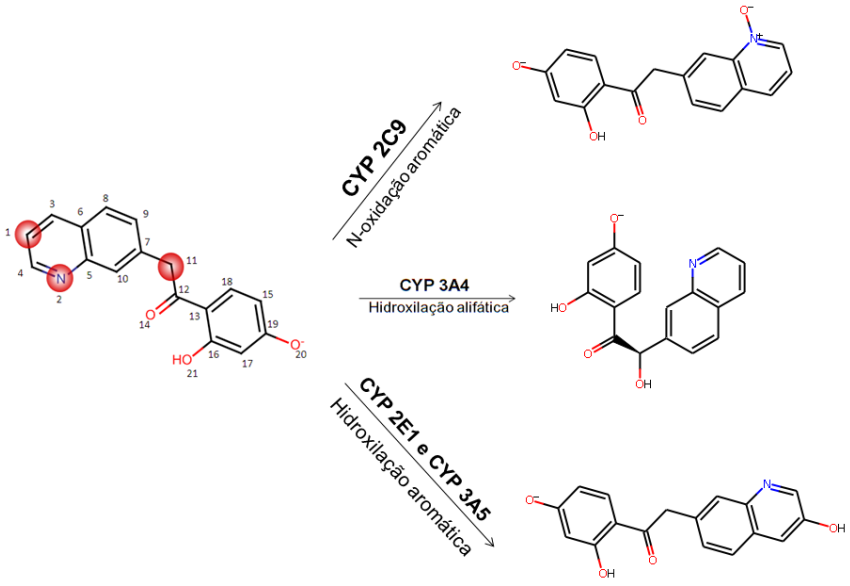
claramente que a porção diidroxifenílica não apresenta átomos bem classificados e provavelmente desempenha uma função importante no posicionamento da molécula no sítio ativo e o direcionamento do anel quinolínico para próximo do centro reativo da enzima.

Com base nesses resultados, pode-se notar que a posição atômica C1 é considerada o sítio preferencial de hidroxilação pelas isoformas CYP 1A1, CYP 2B6, CYP 2C19, CYP 2D6, CYP 2E1 e CYP 3A5. No entanto, essa posição atômica é muito mal pontuada nos casos das isoformas CYP 1A2, CYP 2C9 e CYP 3A4. Já as posições atômicas C3 e C4 não foram consideradas sítios de metabolismo preferenciais em nenhuma das predições. O átomo C3 obteve a segunda melhor pontuação para as isoformas CYP 1A1, CYP 1A2, CYP 2C19, CYP 2D6 e CYP 2E1 e o átomo C4 obteve a segunda melhor pontuação para as isoformas CYP 2B6 e CYP 3A5. O átomo N2 foi considerado o sítio preferencial de hidroxilação para isoforma CYP 2C9. Por fim, o átomo C11 foi o sítio de hidroxilação mais bem pontuado para a isoforma CYP 1A2 e CYP 3A4.

É importante ressaltar que esses resultados precisam ser analisados tendo sempre em vista a proporção relativa de cada isoforma P450 em humanos. Estima-se que cerca de 50% de todas as isoformas sejam compostas pela CYP 3A4, 20% pela CYP 2C9, 15% pela CYP 1A2, 10% pela CYP 2E1, 5% pela CYP 2C19, 5% pela CYP 2D6, 5% pela CYP 2A6 e 5% pela CYP2B6. Portanto é de se esperar que aquelas posições atômicas que sejam alvos das isoformas mais abundantes, tenham uma importância maior do que aquelas que são alvos das isoformas presente em menor quantidade em humanos. Isso é especialmente importante quando uma análise global de biotransformação hepática é necessária para se compreender quais as vias de biotransformação são as preferenciais. No entanto, sabe-se que mesmo sendo considerado um sistema enzimático de elevada “promiscuidade”, podendo, muitas vezes, um mesmo composto ser metabolizado por várias isoformas, sempre existe uma preferência maior para uma determinada P450 que domina a principal rota de biotransformação do substrato. As bases dessa seletividade se encontram no processo de reconhecimento molecular de cada isoforma. Esse processo é governado pela complementariedade estérica e eletrônica do sítio ativo de cada enzima com o substrato alvo.

Nas análises realizadas pelo MetaSite, o maior valor de pontuação foi dado para a isoforma CYP 3A4 (posição C11) com pontuação igual a 19. A segunda posição com maior pontuação predita foi para a isoforma CYP 2E1(posição C1) com valor de pontuação de 18.5. Para a terceira colocação, as isoformas CYP 3A5 e CYP 2C9 obtiveram a mesma pontuação para as posições C11 e N2, respectivamente, com valor igual a 17. A Figura 5.17 mostra as vias preferências de biotransformação do composto Nequimed54 preditas pelo MetaSite.

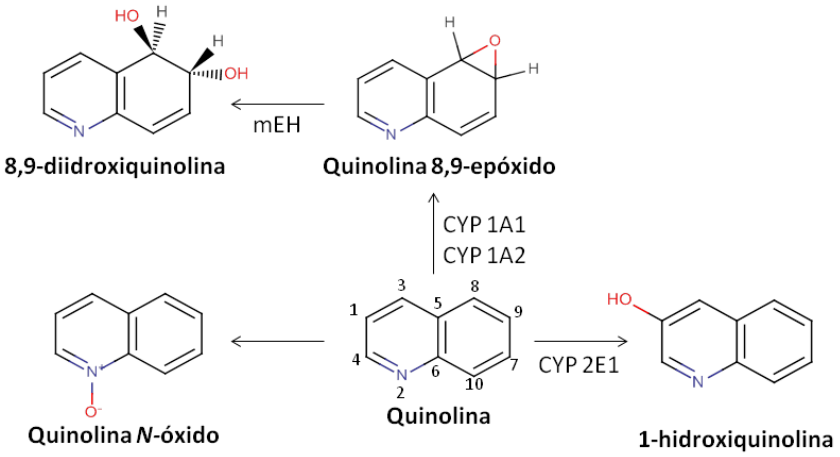
Figura 5.17 - vias preferências de biotransformação do composto Nequimed54 preditas pelo MetaSite.



O anel quinolínico é uma substrutura comum a muitos fármacos como a quinina, cloroquina, mefloquina, quinidina, rambamipide entre outros. Isso faz do anel quinolínico uma estrutura privilegiada com relevância particular para doenças causadas por protozoários como malária, doença de Chagas e leishmaniose. Em estudos recentes, essa substrutura tem mostrado leve mutagenicidade depois de sua oxidação por enzimas microssomais. O epóxido enamine, um dos metabólitos comuns, pode formar adutos com moléculas de DNA e induzir carcinogenicidade. As enzimas do citocromo P450 participam do metabolismo oxidativo dessa substrutura e suas rotas de biotransformação já são conhecidas tanto em microssomas de fígado humano quanto de ratos. Vários estudos com microssomas de fígado humano apontam que a isoforma CYP 2A6 é a principal P450 envolvida na formação da quinolina 8,9-epóxido e o

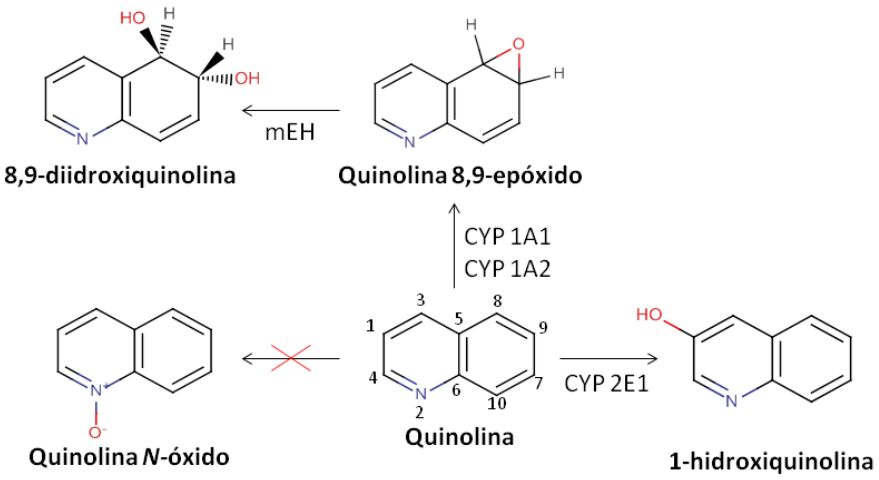
metabólito *N*-óxido. Embora o metabólito 8,9-diidroxiquinolina seja derivado direto do epóxido formado, a CYP 2A6 é incapaz de produzir esse produto. A CYP 2E1 é considerada a principal isoforma responsável pela 1-hidroxilação da quinolina e o produto hidroxilado tem sido apontado como genotóxico em estudos realizados tanto em *in vitro* quanto *in* vivo. A Figura 5.18 apresenta as possíveis vias de metabolização da quinolina em humanos, e a numeração atribuída para os átomos do anel quinolínico foi a mesma daquela atribuída pelo MetaSite para uma comparação direta e clara das informações.[15]

Figura 5.18 - Possíveis vias de metabolização da quinolina em humanos.



Por outro lado, estudos realizados com microssomas de fígado de rato têm demonstrado uma leve variação interespécies com um padrão de metabolização diferente e isoformas distintas daquelas obtidas por microssomas de fígado humano. Nesse caso, as CYPs 1A1 e 1A2 são as principais P450 envolvidas na formação da quinolina 8,9-epóxido, e a CYP2E1 a principal responsável pela hidroxilação na posição 1 do anel quinolínico. Já a formação do metabólito *N*-óxido é inexpressiva, haja vista que sua produção ocorre preferencialmente via isoforma CYP2A6 que está presente em níveis muito baixos ou até mesmo ausentes em microssomas de fígado de rato como podemos observar na Figura 5.19.[15]

Figura 5.19 - Possíveis vias de metabolização da quinolina em microssomas de fígado de rato.



Pode-se propor, com base nas informações acima e nos resultados obtidos tanto por espectrometria de massas quanto pelo MetaSite, possíveis hipóteses para as principais vias de metabolização do composto Nequimed54, levando em conta que a hidroxilação ocorra no anel quinolínico. Considerando que o modelo de estudos de biotransformação utilizado nesse trabalho foi microssomas de fígado extraídos de ratos, a *N*-hidroxilação via CYP2A6 pode ser desprezada, no entanto não podemos desconsiderar a hidroxilação dessa posição via outras isoformas, haja vista que a porção diidroxifenílica pode alterar o padrão de reconhecimento para outras CYPs. Vale lembrar que a *N*-hidroxilação aromática foi apontada pelo MetaSite como o principal mecanismo de biotransformação do composto Nequimed54 para a CYP2C9 e o segundo mais importante para CYP3A4, que são as isoformas mais abundantes tanto em humanos quanto em ratos.

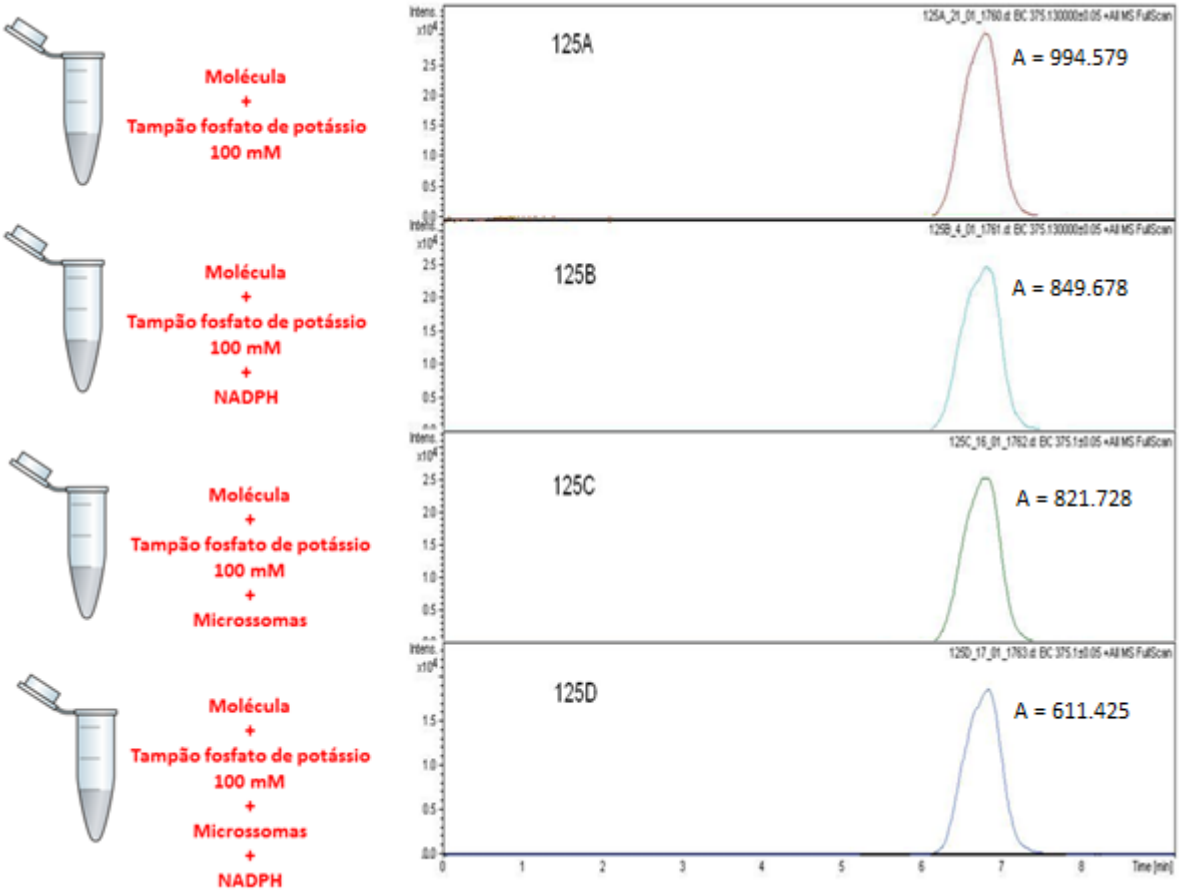
Podemos também observar que a via de epoxidação sempre conduz a formação de um produto diidroxilado (quinolina 8,9-epóxido), no entanto nenhum produto com essas características foi encontrado durante a inspeção do espectro de massas para metabólitos do composto Nequimed54, o que sugere que esse sítio de metabolismo não está adequadamente exposto ao centro reativo da enzima ou que o metabólito foi produzido em quantidades indetectáveis.

Por outro lado, a 1-hidroxilação do anel quinolínico é um mecanismo comum observado tanto em microssomas de fígado humano quanto para aqueles extraídos de ratos. O MetaSite pontua bem essa posição C1 quanto aos componentes de reatividade e acessibilidade. Além disso, essa posição é classificada como principal sítio de metabolismo predito para as isoformas CYP1A1, CYP2B6, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 e CYP3A5.

5.3.3. Identificação dos metabólitos principais do composto Nequimed125

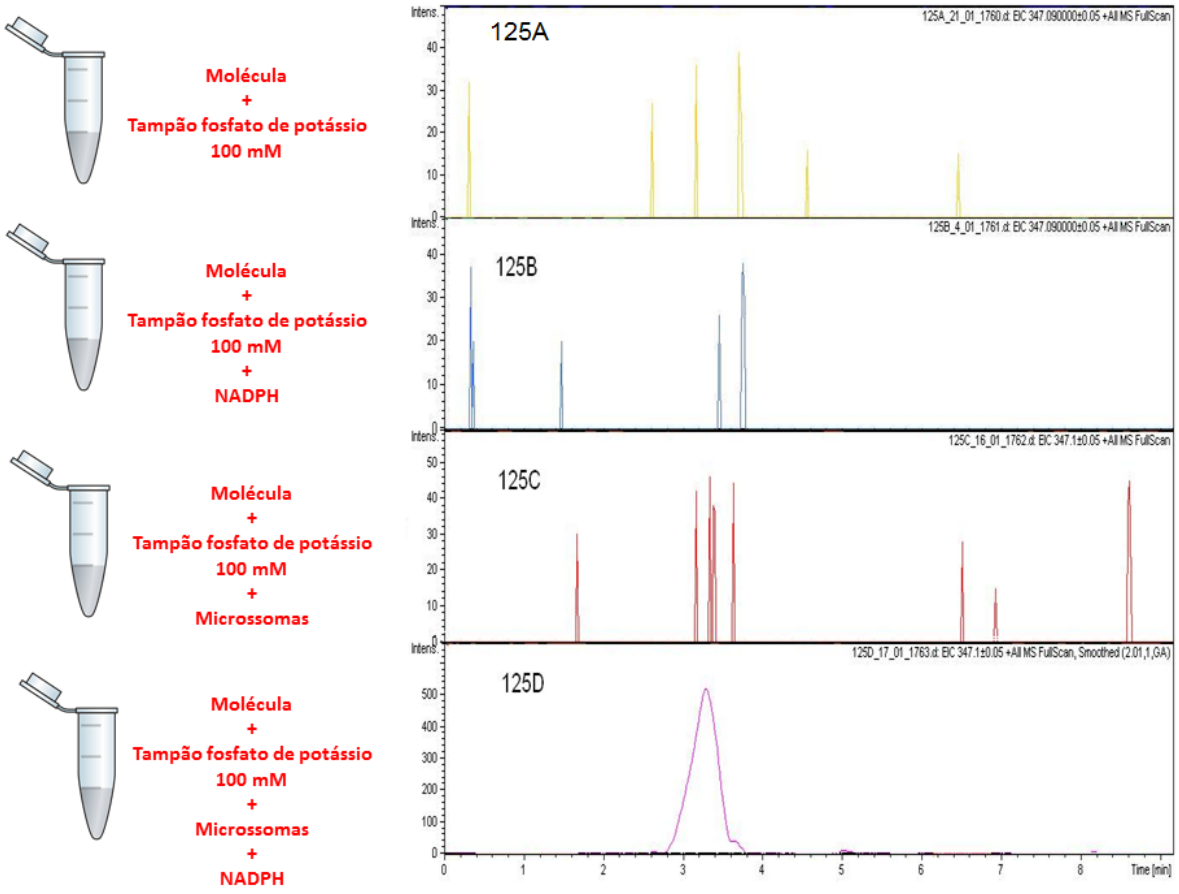
As Figura 5.20 e Figura 5.21 referem-se aos cromatogramas obtidos da incubação microssomal e dos controles usados no estudo de biotransformção do composto Nequimed125 por LC-ESI-QqTOF-MS, utilizando-se, também, o modo de ionização positivo. A Figura 5.20 mostra o cromatograma do íon extraído de *m/z* 375 no modo de operação MS, correspondente à massa do composto Nequimed125. Pode-se observar uma pequena diminuição na área do pico cromatográfico nos cromatogramas referentes aos controles 125B e 125C de 14,57% e 17,38%, respectivamente, com relação ao controle 125A. No controle 125B, tal diminuição pode estar relacionada com alguma instabilidade da molécula frente o agente redutor (NADPH). Já para o controle 125C, a diminuição do pico cromatográfico sugere a ação de enzimas metabolizadoras não-dependentes de NADPH, em uma pequena extensão. O cromatograma 125D mostra uma diminuição da área do pico cromatográfico de 38,6% em relação ao controle 125A o que sugere uma depleção do substrato devido a ação de enzimas metabolizadoras dependentes de NADPH.

Figura 5.20 - Cromatogramas do íon extraído de *m/z* 375 no modo de operação MS dos controles e da incubação microssomal referentes ao estudo de biotransformação do composto Nequimed125.



Assim, após uma inspeção do íon cromatograma total por razões *m/z* típicas de processos de biotransformação, foi possível identificar o íon do metabólito $[M-28]^+$ (Figura 5.21). Podemos notar que o íon extraído de razão *m/z* 347,10 está presente apenas na incubação microssomal 125D, com um Tr = 3,25 min. Por estar presente apenas no cromatograma 125D é afastada a possibilidade do mesmo ser um possível interferente da matriz ou produto de outras vias de biotransformação. Essa variação da razão *m/z* é condizente com uma desetilação. Após a identificação do íon do metabólito $[M-28]^+$, seguiu-se a caracterização estrutural no modo de operação MS/MS que será tratada a seguir.

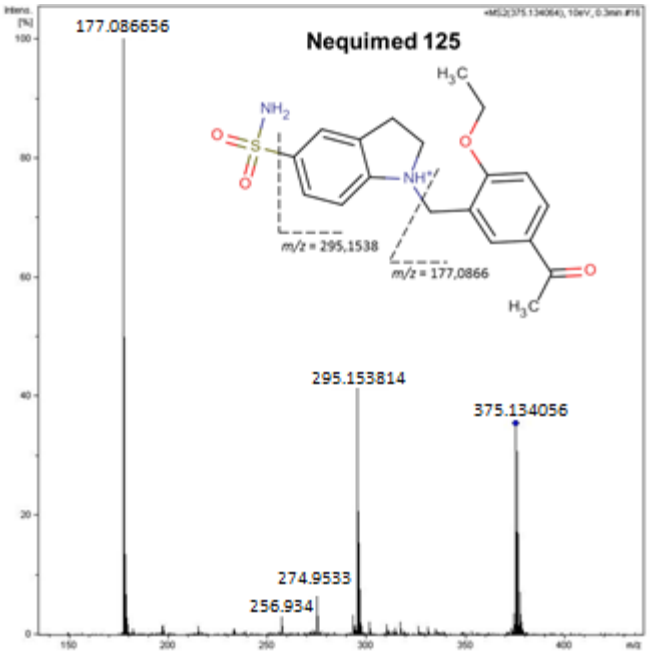
Figura 5.21 - Identificação do metabólito *m/z* 347, $[M-28]^+$. A presença do pico cromatográfico apenas na incubação microssomal 125D afasta a possibilidade do mesmo ser um possível interferente da matriz ou um produto de biotransformação não dependente de NADPH.



5.3.4. Identificação dos sítios de metabolismo do composto Nequimed125

A Figura 5.22 mostra o espectro de fragmentação do íon extraído de *m/z* 375 referente ao composto Nequimed125, $[M+H]^+$. As análises foram realizadas no modo de ionização positivo, utilizando-se uma energia de colisão de 5 eV com uma resolução de massas 6.000. Pode-se observar a presença do sinal de dois íons fragmentos mais estáveis no espectro, o primeiro de m/z 117,0866 e o segundo de m/z 295,1538.

Figura 5.22 - Espectro de fragmentação do íon extraído de *m/z* 375 referente ao composto Nequimed125, $[M+H]^+$.

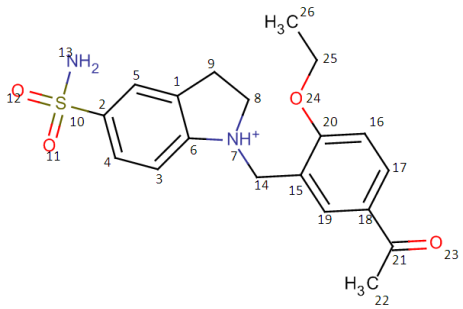


O fragmento de *m/z* 177,0866 ($C_{11}H_{13}O_2^{+\cdot}$) é formado através da perda da porção diidroindol sulfonamida. Da mesma forma, a perda da porção sulfonamida, leva a formação do fragmento de *m/z* 295,1538 ($C_{19}H_{21}NO_2^{+\cdot}$). Vários outros sinais de fragmentos também aparecem no espectro de massas, no entanto apresentam intensidades muito baixas. Para o metabólito, contudo, não foi possível identificar o mecanismo de sua fragmentação em decorrência da pequena intensidade do pico do íon pseudomolecular. Essa situação impediu uma comparação direta entre os mecanismos de fragmentação de ambas as moléculas, impossibilitando uma identificação precisa do sítio de metabolismo.

5.3.4.1. Resultados de predição de sítios de metabolismo fornecidos pelo MetaSite para o composto Nequimed125

As posições atômicas adotadas para o composto Nequimed125 bem como os resultados de predição realizados pelo programa MetaSite são mostrados no Anexo 2.

Figura 5.23 - Posições atômicas consideradas pelo software MetaSite nos estudos de predição de sítio de metabolismo para o composto Nequimed125.



Os resultados das predições de sítios de metabolismo estão no Anexo 2 dessa dissertação.

Pode-se observar no Anexo 2 que a posição atômica C25 foi considerada o principal sítio de metabolismo predito para as isoformas CYP 1A1, CYP 2B6, CYP 2C19, CYP 2E1 e CYP 3A5. Já a posição atômica C9 foi predita como o sitio de hidroxilação preferencial para a isoforma CYP 2C9 com pontuação de 29,5, porém a posição atômica C25 foi a segunda melhor pontuada, com pontuação de 28,5. A posição atômica N7 foi predita o principal sítio de metabolismo para as isoformas CYP 2D6 e CYP 1A2. Para a CYP 2D6 a posição N7 apresentou pontuação de 28,5, enquanto que a posição C25, segunda melhor colocada, apresentou pontuação de 28,25. Dessa forma, essas duas posições apresentam valores de P_{SOM} muito próximos o que impede discriminação entre qual das duas é o sítio preferencial de metabolismo.

Esses resultados corroboram aqueles obtidos por espectrometria de massas, o que nos permite inferir que a biotransformação do composto Nequimed125 se proceda via a oxidação da posição C25, adjacente ao átomo O24(fator de regeosseletividade). O metabólito encontrado apresenta uma variação da razão *m/z* de -28, condizente com a perda de um grupo etil. Isso implica na ocorrência de uma *O*-dealquilação.

A isoforma que apresentou maior pontuação para a posição atômica C25 foi a CYP 2B6, com pontuação de 33,08. A segunda melhor pontuada foi a CYP 3A5 com valor de pontuação de 28,78. A terceira e quarta melhor pontuação são das isoformas CYP 2C9 e CYP 2D6 com valores de pontuação de 28,5 e 28,25, respectivamente. Portanto, segundo os resultado obtidos

pelo MetaSite, a biotransformação do composto Nequimed125 deve ocorrer via a isoforma CYP 2B6.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SHUGUANG MA, S. K. C., KEVIN B. ALTON. Application of Mass Spectrometry for Metabolite Identification. **Current Drug Metabolism**, v. 7, n. 5, p. 503-523, 2006.

2. OLIVEIRA, E. J.; WATSON, D. G. Liquid chromatography–mass spectrometry in the study of the metabolism of drugs and other xenobiotics. **Biomedical Chromatography**, v. 14, n. 6, p. 351-372, 2000.

3. HOLČAPEK, M.; KOLÁŘOVÁ, L.; NOBILIS, M. High-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry in the identification and determination of phase I and phase II drug metabolites. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 1, p. 59-78, 2008.

4. IWABUCHI, H.; KITAZAWA, E.; KOBAYASHI, N.; WATANABE, H.; KANAI, M.; NAKAMURA, K.-I. Studies on drug metabolism using liquid chromatography/mass spectrometry: Comparison of three liquid chromatographic/mass spectrometric interfaces. **Biological Mass Spectrometry**, v. 23, n. 9, p. 540-546, 1994.

5. KOSTIAINEN, R.; KOTIAHO, T.; KUURANNE, T.; AURIOLA, S. Liquid chromatography/atmospheric pressure ionization–mass spectrometry in drug metabolism studies. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 38, n. 4, p. 357-372, 2003.

6. ROSENBERG, E. The potential of organic (electrospray- and atmospheric pressure chemical ionisation) mass spectrometric techniques coupled to liquid-phase separation for speciation analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1–2, p. 841-889, 2003.

7. VAN BERKEL, G. J.; ZHOU, F. Characterization of an Electrospray Ion Source as a Controlled-Current Electrolytic Cell. **Analytical Chemistry**, v. 67, n. 17, p. 2916-2923, 1995.

8. FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F.; WHITEHOUSE, C. M. Electrospray ionization–principles and practice. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 9, n. 1, p. 37-70, 1990.

9. FERNANDEZ DE LA MORA, J. Electrospray ionization of large multiply charged species proceeds via Dole's charged residue mechanism. **Analytica Chimica Acta**, v. 406, n. 1, p. 93-104, 2000.

10. CECH, N. B.; ENKE, C. G. Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 20, n. 6, p. 362-387, 2001.

11. CHERNUSHEVICH, I. V.; LOBODA, A. V.; THOMSON, B. A. An introduction to quadrupole–time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 36, n. 8, p. 849-865, 2001.

12. TESTA, B.; KRÄMER, S. D. The Biochemistry of Drug Metabolism – An Introduction. **Chemistry & Biodiversity**, v. 3, n. 10, p. 1053-1101, 2006.

13. FREITAS, R. F.; BAUAB, R. L.; MONTANARI, C. A. Novel Application of 2D and 3D-Similarity Searches To Identify Substrates among Cytochrome P450 2C9, 2D6, and 3A4. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 50, n. 1, p. 97-109, 2010.

14. CRUCIANI, G.; CAROSATI, E.; DE BOECK, B.; ETHIRAJULU, K.; MACKIE, C.; HOWE, T.; VIANELLO, R. MetaSite: Understanding Metabolism in Human Cytochromes from the Perspective of the Chemist. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 22, p. 6970-6979, 2005.

15. REIGN, G.; MCMAHON, H.; ISHIZAKI, M.; OHARA, T.; SHIMANE, K.; ESUMI, Y.; GREEN, C.; TYSON, C.; NINOMIYA, S.-I. Cytochrome P450 species involved in the metabolism of quinoline. **Carcinogenesis**, v. 17, n. 9, p. 1989-1996, 1996.

Capítulo 6

Conclusões e perspectivas

Este capítulo apresenta as conclusões dessa dissertação de mestrado e as perspectivas futuras para a continuação ou ampliação deste trabalho.

6. Conclusões e perspectivas

6.1. Conclusões

Neste trabalho, buscou-se a integração de tecnologias analíticas e computacionais para a avaliação de propriedades metabólicas relevantes de novos candidatos a fármacos de interesse para o tratamento da doença de Chagas.

Sabe-se que candidatos a fármacos devem apresentar propriedades apropriadas como estabilidade metabólica adequada, ausência de inibição de enzimas metabolizadoras (interações do tipo fármaco-fármaco) e formação de metabólitos ativos ou tóxicos para que os mesmo avancem no processo de desenvolvimento de um novo fármaco. Essa avaliação é comumente realizada por químicos medicinais através de uma caracterização metabólica criteriosa.

Nos estudos de interação do tipo fármaco-fármaco realizados neste trabalho, a fluorimetria mostrou-se uma técnica rápida e robusta na identificação de inibidores enzimáticos de três das principais isoformas do citocromo P450. O uso de baculossomos obtidos a partir de células de inseto contendo uma única isoforma expressada permitiu uma análise seletiva e sem a interferência de outros sistemas enzimáticos. Oito compostos foram avaliados frente às isoformas CYP 3A4, CYP 2D6 e CYP 2C9. Desse total, três inibidores enzimáticos foram identificados. O avanço desses três compostos para fases mais tardias e caras do desenvolvimento deve ser feito com cautela, buscando-se otimizar suas propriedades farmacocinéticas com vista a minimizar essa importante característica deletéria, uma vez que essas isoformas são responsáveis pelo metabolismo da maioria dos fármacos utilizados na terapêutica e a inibição de qualquer uma delas pode promover o acúmulo indesejado de outros fármacos coadministrados ou ainda alterar o metabolismo de substâncias endógenas.

A identificação do sítio de metabolismo fornece-nos uma informação valiosa para orientar futuras alterações estruturais, caso sejam necessárias modificações no perfil metabólico de uma substância química bioativa, tanto no sentido de aumentar ou diminuir sua estabilidade metabólica. De modo geral, a taxa de metabolismo pode ser reduzida através da incorporação de

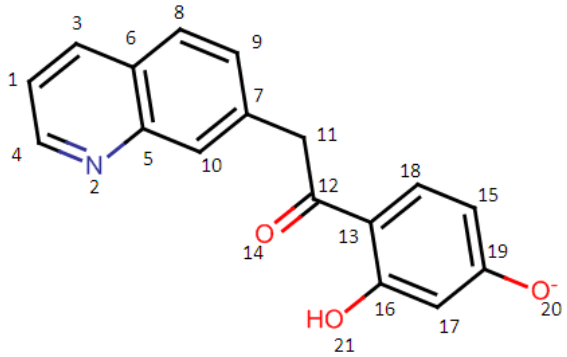
grupos funcionais estáveis (grupos bloqueadores) nos sítios metabolicamente vulneráveis, desde que estas mudanças não sejam prejudiciais à atividade farmacológica. A partir dos resultados dos estudos de caracterização metabólica, conclui-se que a biotransformação do composto Nequimed54 por microssomas de fígado extraídos de ratos, deu-se preferencialmente por uma única via dependente de NADPH o que sugere uma possível participação das enzimas do citocromo P450. O metabólito formado apresentou uma variação da razão *m/z* de +16, indicando a ocorrência da hidroxilação do composto parental. A posição atômica C1, presente no anel quinolínico, foi predita pelo programa MetaSite como o sítio de metabolismo mais provável para esse composto, resultado corroborado pelos estudos de espectrometria de massas. Já com relação ao Nequimed 125, conclui-se que sua biotransformação deu-se preferencialmente por uma única via dependente de NADPH, assim como observado para o Nequimed54. O metabólito formado apresentou uma variação da razão *m/z* de -28, condizente com a perda de um fragmento etila do composto parental. Os resultados fornecidos pelo programa MetaSite indicam a posição atômica C25 como o provável sítio de biotransformação, apresentando os maiores valores de reatividade e acessibilidade para a maioria das isoformas avaliadas.

6.2. Perspectivas

A próxima etapa desse trabalho foca a realização de ensaios de estabilidade e fenotipagem metabólica para identificar a taxa de metabolização, bem como quais os sistemas enzimáticos e as principais isoformas estão envolvidas na biotransformação desses compostos. Além disso, estudos estruturais utilizando técnicas complementares como ressonância magnética nuclear (RMN) ou cristalografia de Raios-X devem ser empregados para confirmar a estrutura e orientar a síntese dos metabólitos identificados. A obtenção em larga escala dos metabólitos permite a realização de estudos de atividade biológica e toxidez que são fundamentais para seleção de compostos com perfis farmacocinéticos mais adequados.

ANEXO 1

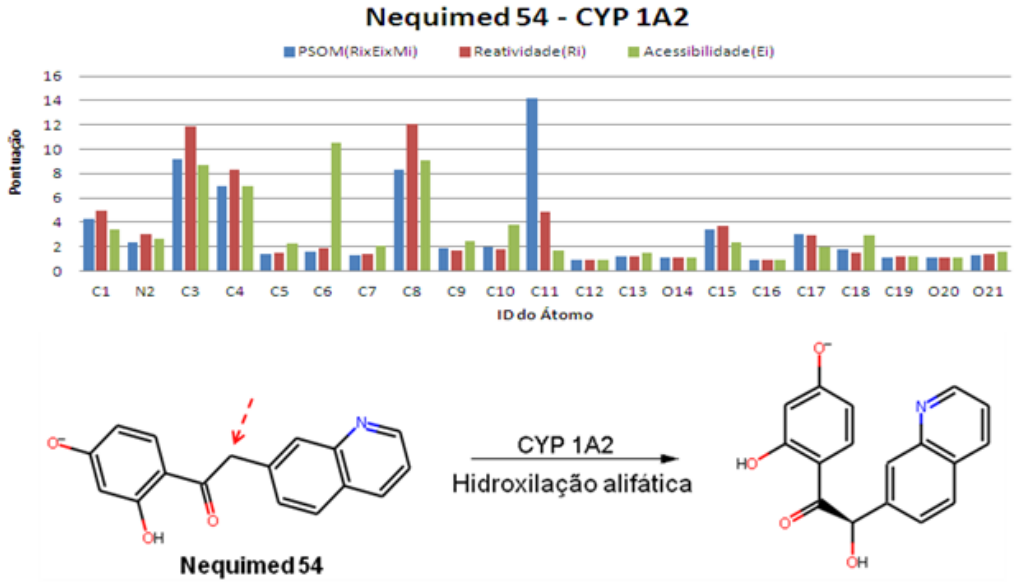
Numeração adotada pelo software MetaSite nos estudos de predição de metabolismo para o composto Nequimed125.



Nequimed 54

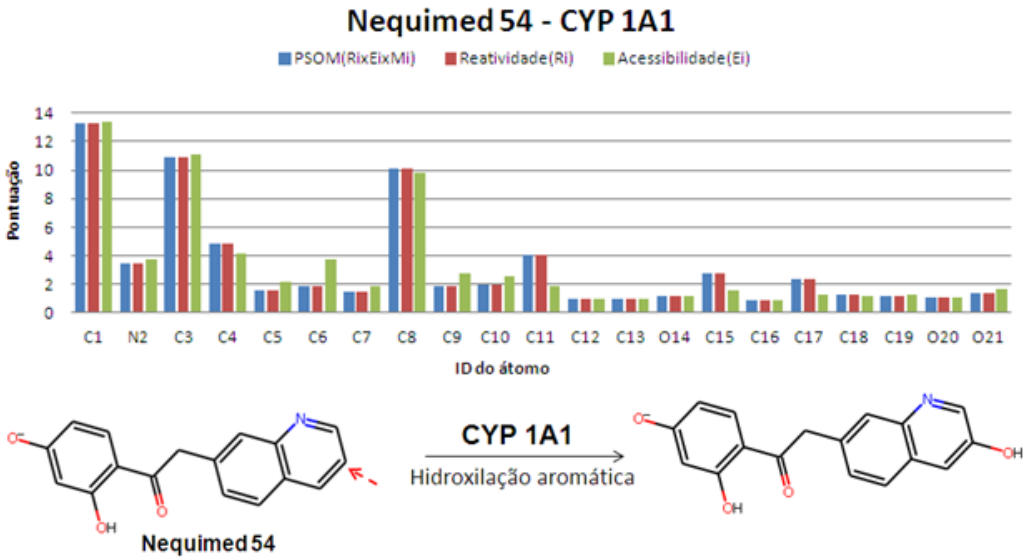
Os resultados de predição para **CYP 1A2** estão ilustrados na Figura A1. 1.

Figura A1. 1- Predição de sítio de metabolismo do composto Nequimed54 frente a isoforma CYP 1A2.



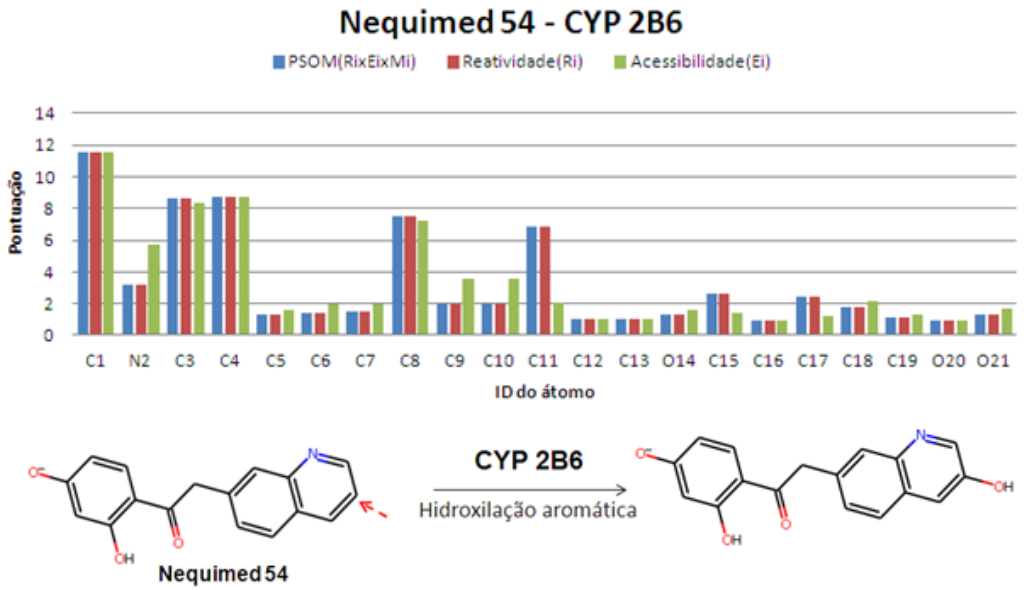
Os resultados de predição para **CYP 1A2** estão ilustrados na Figura A1. 2

Figura A1. 2 - Predição de sítio de metabolismo do composto Nequimed54 frente a isoforma CYP 1A1



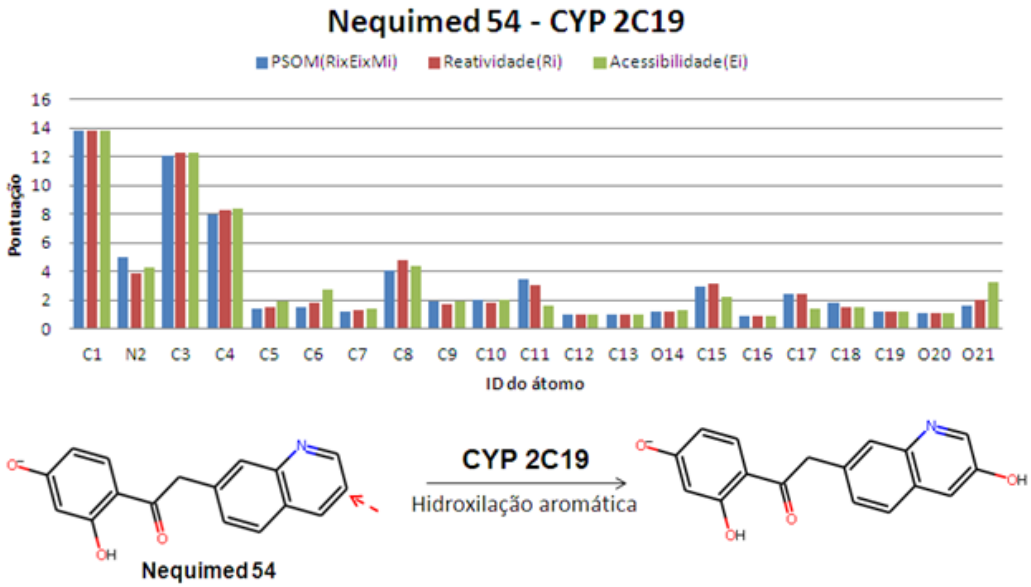
Os resultados de predição para **CYP 2B6** está ilustrado na Figura A1. 3.

Figura A1. 3- Predição de sítio de metabolismo do composto Nequimed54 frente a isoforma CYP 2B6.



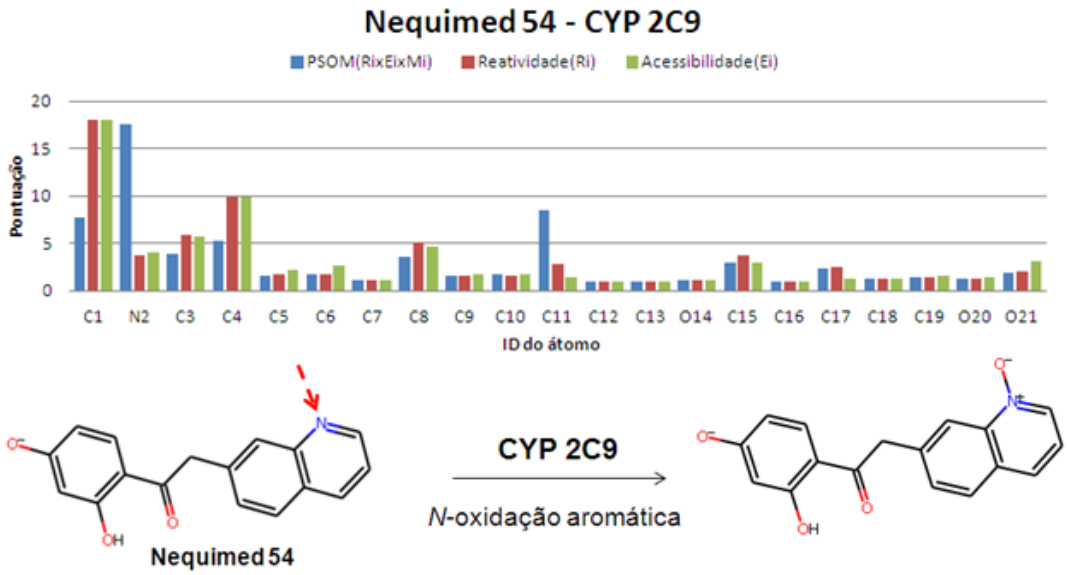
Os resultados de predição para **CYP 2C19** está ilustrado na Figura A1. 4

Figura A1. 4 - Predição de sítio de metabolismo do composto Nequimed54 frente a isoforma CYP 2C19.



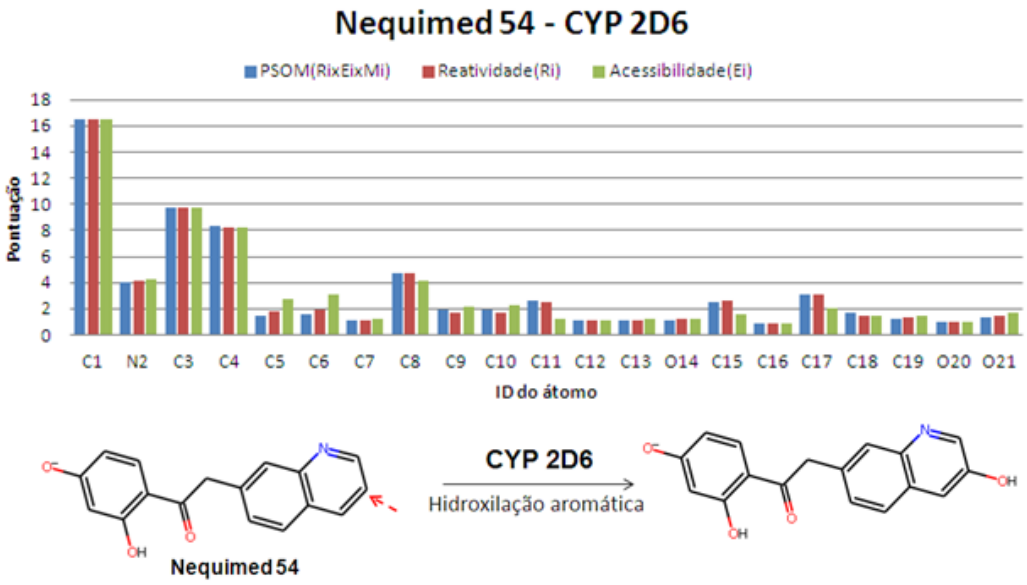
Os resultados de predição para **CYP 2C9** está ilustrado na Figura A1. 5.

Figura A1. 5 - Predição de sítio de metabolismo do composto Nequimed54 frente a isoforma CYP 2C9.



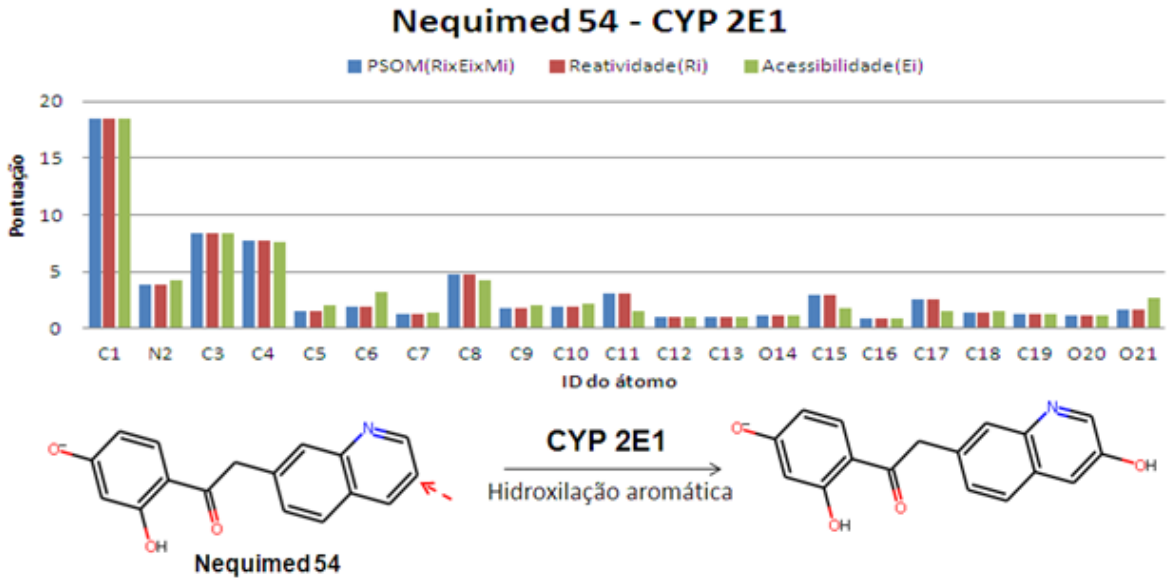
Os resultados de predição para **CYP 2D6** está ilustrado na Figura A1. 6.

Figura A1. 6 - Predição de sítio de metabolismo do composto Nequimed54 frente a isoforma CYP 2D6.



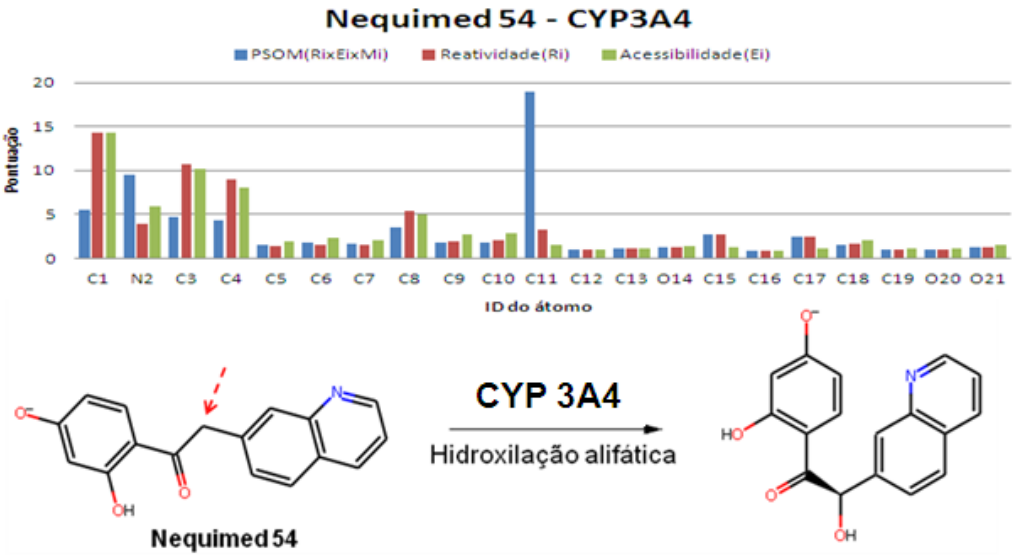
Os resultados de predição para **CYP 2E1** está ilustrado na Figura A1. 7.

Figura A1. 7 - Predição de sítio de metabolismo do composto Nequimed54 frente a isoforma CYP 2E1.



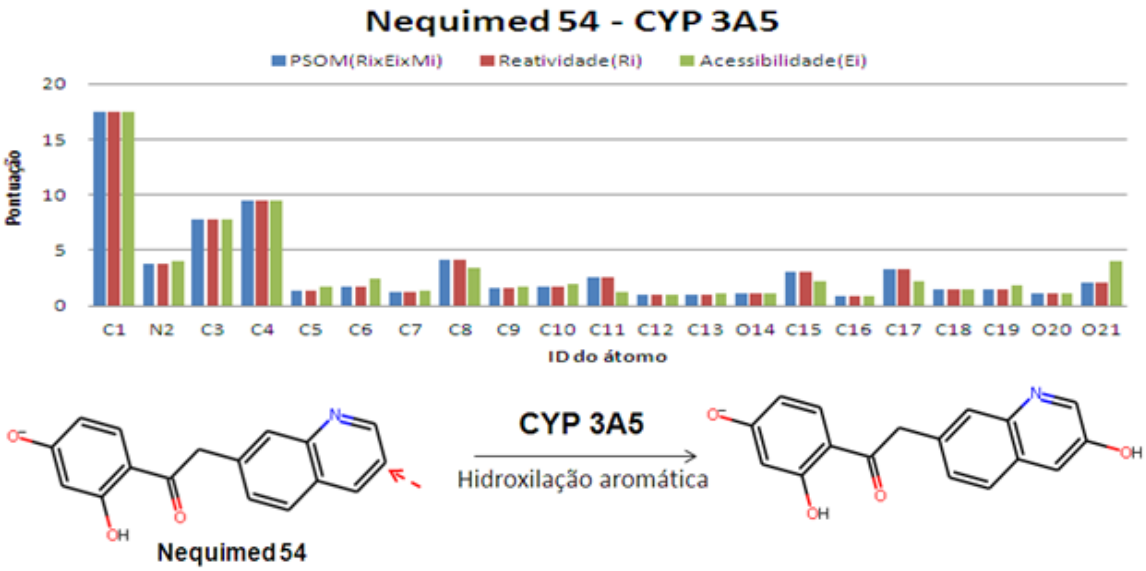
Os resultados de predição para **CYP 3A4** está ilustrado na Figura A1. 8

Figura A1. 8 - Predição de sítio de metabolismo do composto Nequimed54 frente a isoforma CYP 3A4.



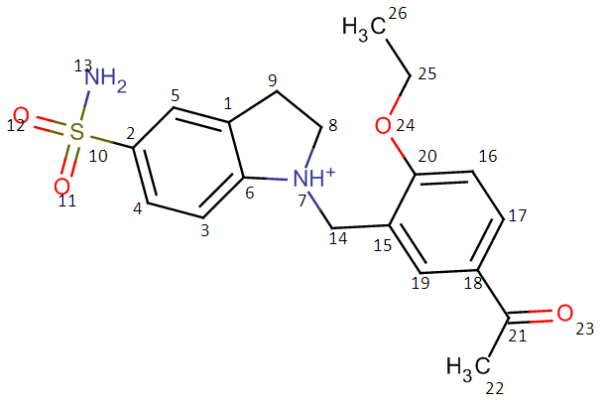
Os resultados de predição para **CYP 3A5** está ilustrado na Figura A1. 9

Figura A1. 9 - Predição de sítio de metabolismo do composto Nequimed54 frente a isoforma CYP 3A5.



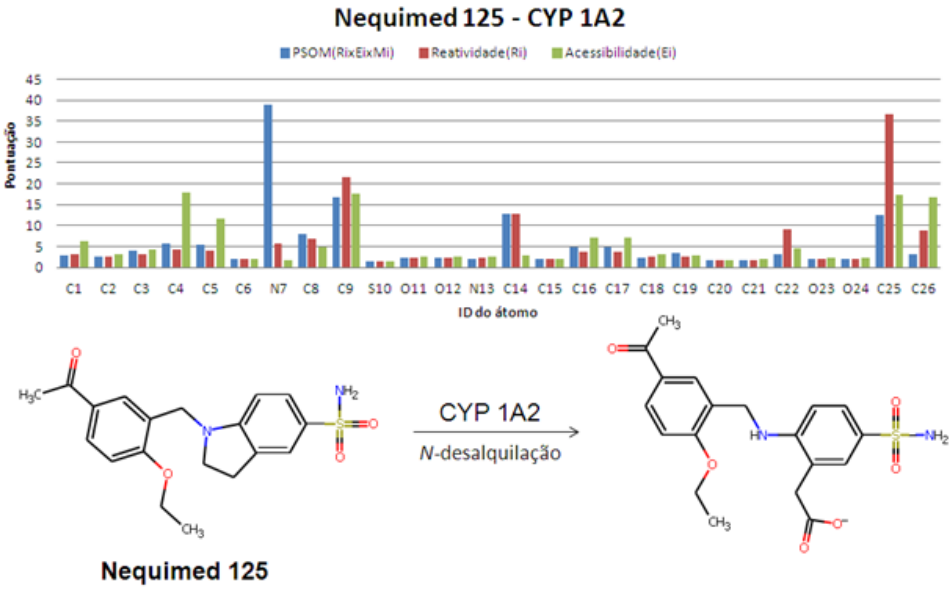
ANEXO 2

Numeração adotada pelo software MetaSite nos estudos de predição de metabolismo para o composto Nequimed125.



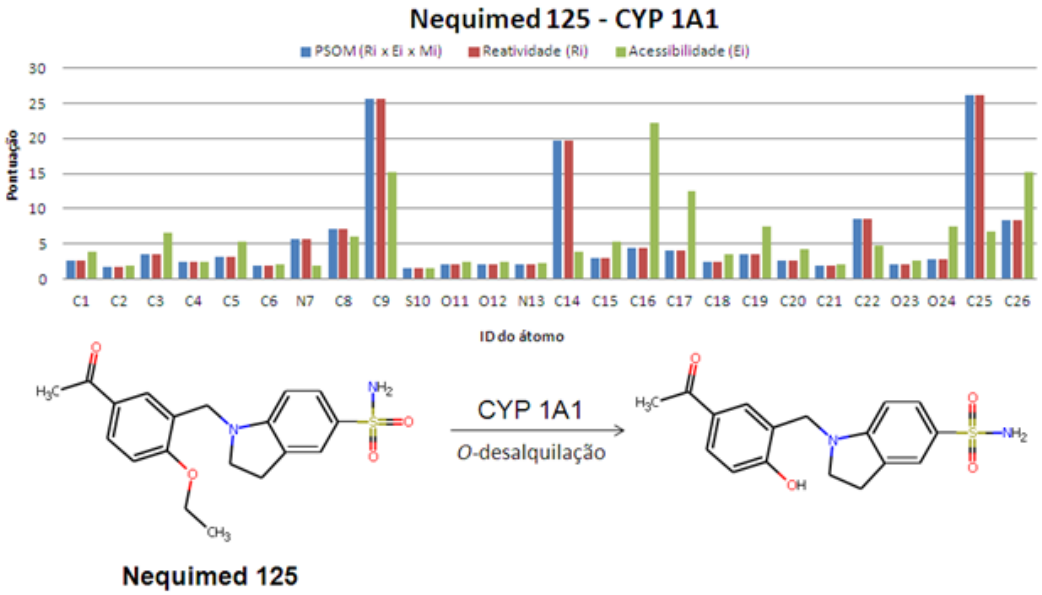
Os resultados de predição para **CYP 1A2** está ilustrado na Figura A2. 1.

Figura A2. 1- Predição de sítio de metabolismo do composto Nequimed125 frente a isoforma CYP 1A2.



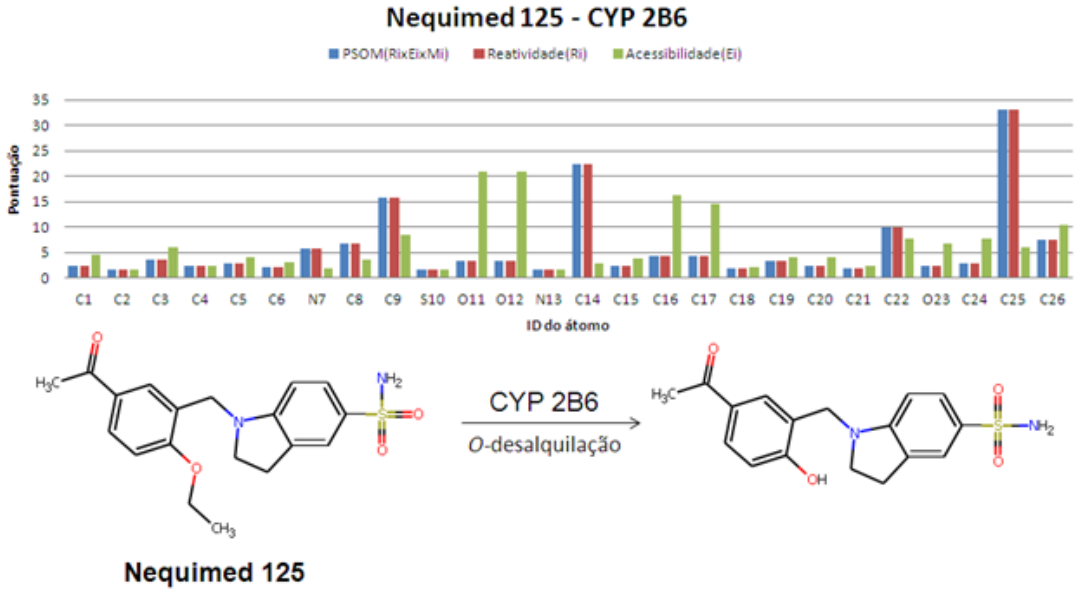
Os resultados de predição para **CYP 1A1** está ilustrado na Figura A2. 2.

Figura A2. 2 - Predição de sítio de metabolismo do composto Nequimed125 frente a isoforma CYP 1A1.



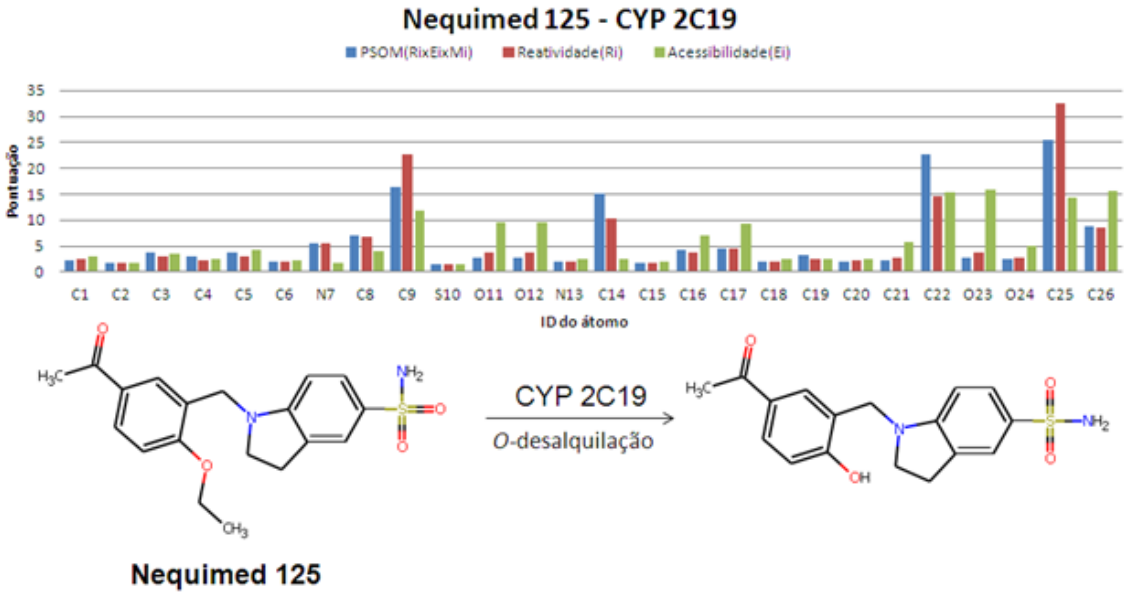
Os resultados de predição para **CYP 2B6** está ilustrado na Figura A2. 3.

Figura A2. 3 - Predição de sítio de metabolismo do composto Nequimed125 frente a isoforma CYP 2B6.



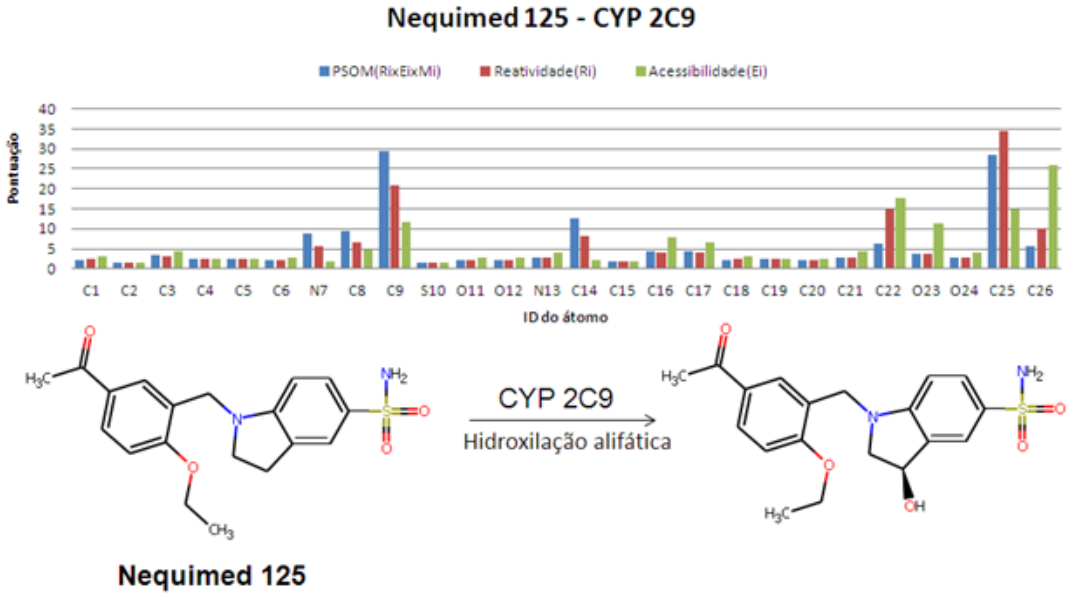
Os resultados de predição para **CYP 2C19** está ilustrado na Figura A2. 4

Figura A2. 4- Predição de sítio de metabolismo do composto Nequimed125 frente a isoforma CYP 2C19.



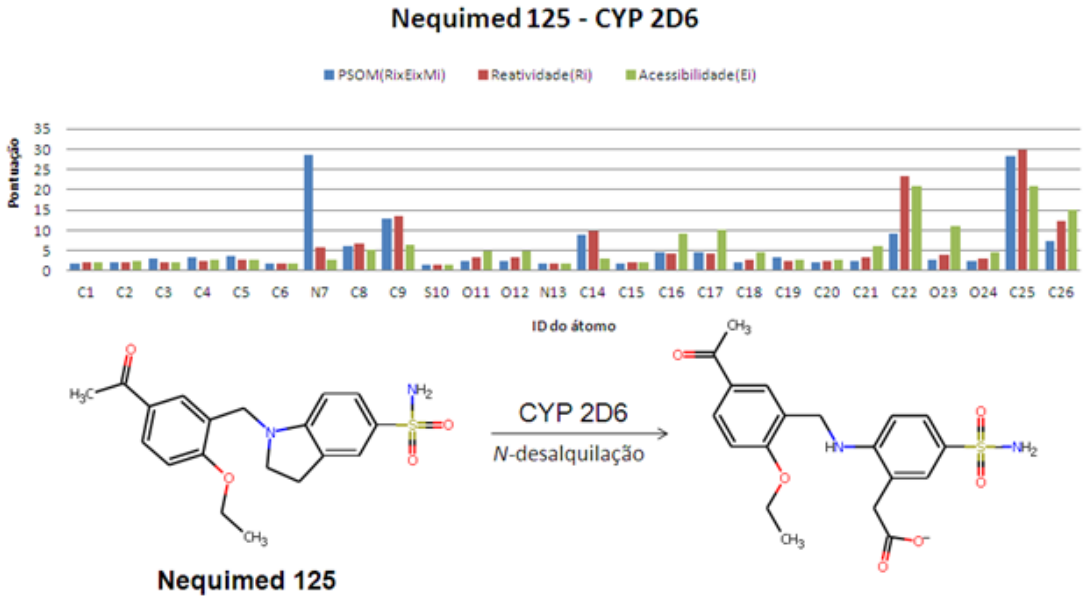
Os resultados de predição para **CYP 2C9** está ilustrado na Figura A2. 5

Figura A2. 5 - Predição de sítio de metabolismo do composto Nequimed125 frente a isoforma CYP 2C9.



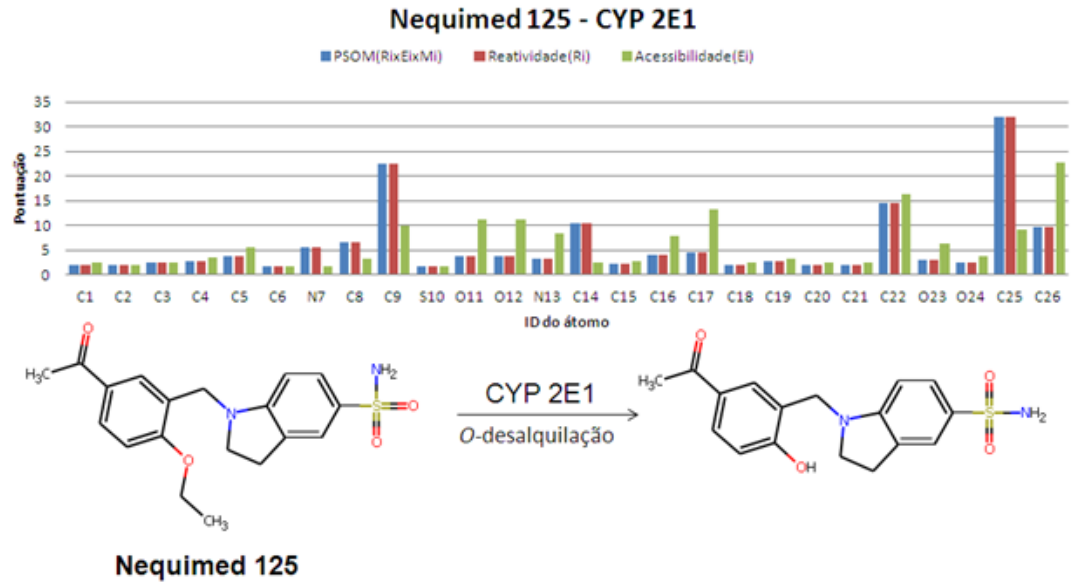
Os resultados de predição para **CYP 2D6** está ilustrado na Figura A2. 6.

Figura A2. 6 - Predição de sítio de metabolismo do composto Nequimed125 frente a isoforma CYP 2C9.



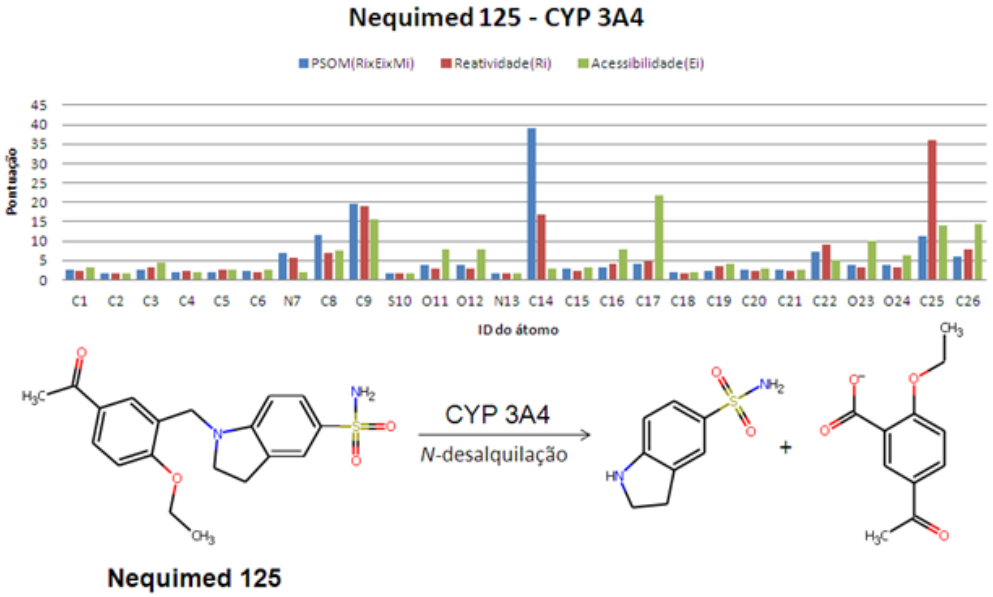
Os resultados de predição para **CYP 2E1** está ilustrado na Figura A2. 7

Figura A2. 7 - Predição de sítio de metabolismo do composto Nequimed125 frente a isoforma CYP 2E1.



Os resultados de predição para **CYP 3A4** está ilustrado na Figura A2. 8.

Figura A2. 8 - Predição de sítio de metabolismo do composto Nequimed125 frente a isoforma CYP 3A4



Os resultados de predição para **CYP 3A5** está ilustrado na Figura A2. 9.

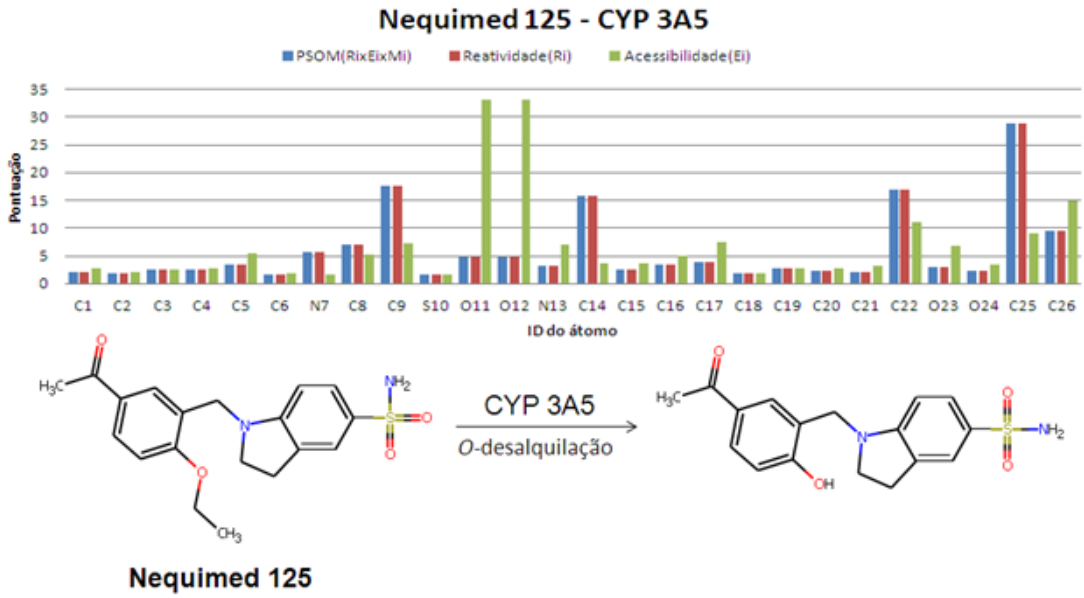



Figura A2. 9 - Predição de sítio de metabolismo do composto Nequimed125 frente a isoforma CYP 3A5.