IGOR MUCCILO PROKOPCZYK

**Determinação da Afinidade e Assinatura Termodinâmica de Inibidores da
Cruzaína por Calorimetria de Titulação Isotérmica**

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

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos, 2016

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.

Assinatura:

Data:

20 de Setembro de 2016

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Prokopczyk, Igor Muccilo

Determinação da afinidade e assinatura termodinâmica de inibidores da cruzaina por calorimetria de titulação isotérmica / Igor Muccilo Prokopczyk. — São Carlos, 2016.

105 f.

Tese (Doutorado em Química Orgânica e Biológica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2016.

Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari

1. Doença de Chagas. 2. Trypanosoma cruzi. 3. Cruzaina. 4. ITC. 5. Assinatura termodinâmica. I. Título.

*Referências Bibliográficas
conferidas pelo SBI/IQSC*

DEDICATÓRIA

a ti meu amado Otto

AGRADECIMENTOS

Ao ingressar no doutorado partimos de um projeto que deve ser transformado em uma tese. Para tal, é necessário trabalho duro e boas ideias. No campo das ideias, gostaria de agradecer ao Professor Dr. Carlos Alberto Montanari, meu orientador, e Dr. Josmar Rodrigues da Rocha, que me apoiaram quando o projeto inicial adotado em meu doutorado fora substituído. Muito obrigado! Agradeço também à CAPES/PROEX (#1101156) pela bolsa de estudos, bem como à FAPESP (#2013/18009-4) por todo suporte financeiro prestado ao projeto.

Claro que todo o esforço destinado à conclusão desta etapa não foi solitário! Gostaria de agradecer a você Aline Sousa da Silva, por me suportar em momentos críticos e por ser copartícipe de nossa obra-prima: Otto Prokopczyk, meu mais que amado filho! Agradeço também a meus familiares, Luiz (Pai), Vera (Mãe), Yuri (Irmão), João (Tio e padrinho) e Cida (Tia e madrinha).

Além dos familiares, gostaria de agradecer meus grandes amigos, feitos nessa incrível jornada de 11 anos em São Carlos: João e Amanda, Thiago e Mari, Eduardo e Scarlet, Leandro, Andressa, Lucas, Cesar e Otávio. Aos amigos que fiz ao longo dos 10 profícuos anos dedicados ao NEQUIMED/IQSC/USP: Geraldo, Peter, Jean, Josmar, Cristian, Erika, Daniel, Helton, Juliana, Renatinho, Nádia, Leandro, Vinicius, Fabiana, Ciça e William. Por fim, a aqueles que, mesmo que distantes, sempre me acompanharam: Galdino, Iuri, Vitor, Zé e Marcos.

Veni, vidi, vici

EPÍGRAFE

*“Freedom of thought is best promoted
by the gradual illumination of men's
minds, which follows from the advance
of science”*

Charles Robert Darwin

RESUMO

A enzima cruzaina é um alvo validado e promissor para a descoberta de agentes tripanossomicidas. A validação desta enzima estimulou o desenvolvimento de vários inibidores ao longo dos 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. Dentre essas classes, encontram-se as dipeptidil-nitrlas, que apresentam alta potência contra a cruzaina e são conhecidamente inibidores covalente-reversíveis. Estudos de afinidade através de Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC) são fundamentais na compreensão de sistemas bioquímicos e viabilizam a determinação dos parâmetros termodinâmicos. A ITC possibilita determinar com precisão e acurácia os valores de K_d ($1/K_d$), ΔH , ΔG , ΔS e ΔC_p e com esses parâmetros pode-se traçar facilmente o perfil termodinâmico dos ligantes. No presente trabalho, a enzima selvagem cruzaina e, pela primeira vez, foi realizado o estudo de afinidade através da ITC para 16 dipeptidil-nitrlas usadas como inibidores da cruzaina. O perfil termodinâmico (TP) foi obtido e observado como entálpico-dirigido com compensação entrópica desfavorável. A fatoração da energia livre (ΔG) de interação foi usada para avaliar os efeitos causados pelas substituições em P1, P2 e P3 na energética, sugerindo uma correlação direta entre a afinidade e a otimização entálpica/entrópica. As substituições avaliadas promoveram um aumento de 10 a 20 vezes na afinidade da cruzaina pelo inibidor. Estudos em diferentes tampões foram realizados para a determinação da influência do efeito de ionização na afinidade. O **Neq0569** foi testado contra a proteína mutante C25A, tendo sido observada inversão da assinatura que passou a ser entropicamente dirigida. Além disso, uma redução de 176 vezes na afinidade foi observada, demonstrando a importância da ligação covalente-reversível para o aumento da afinidade.

Palavras-chave: *Doença de Chagas; Trypanosoma cruzi, cruzaina; ITC; Assinatura Termodinâmica; Dipeptidil-nitrlas; Cisteíno Protease*

ABSTRACT

Cruzain is a validated and promising target for the discovery of trypanocidal agents. The validation of this enzyme has stimulated the development of several inhibitors over the past twenty years. The discovery of new compounds from different chemical classes, which are safer and more effective is an important contribution to the development of chemotherapy of Chagas disease. Among known classes are the dipeptidyl nitriles that exhibit high cruzain affinity and are known to be covalent-reversible inhibitors. Molecular optimization requires a rigorous assessment of physicochemical properties, including the thermodynamic characterization of molecular forces that govern cruzain-inhibitor interactions. Affinity studies by Isothermal Titration Calorimetry (ITC) are fundamental in understanding biochemical systems and enable the determination of thermodynamic parameters. The ITC data provides the determination of K_d values ($1/K_a$), ΔH , ΔG , ΔS and ΔC_p accurately and precisely. These parameters can easily be used to draw the thermodynamic profile of ligands. In this study, the wild type cruzain enzyme and, for the first time by the best of our knowledge, the study was conducted by ITC for 16 dipeptidyl nitriles used as inhibitors of cruzain enzyme, which is a hydrolase. The thermodynamic profile (TP) was obtained and observed to be enthalpy-driven with unfavorable entropic compensation. The free energy factorization (ΔG) interaction was used to evaluate the effects caused by substitutions in P1, P2 and P3 in energy, thereby suggesting a direct correlation between the affinity and the enthalpy/entropy optimization. Substitutions made possible to observe an increase of 10 to 20 times higher than the affinity for previous cruzain inhibitors. Studies on different buffers were performed to determine the influence of ionizing effect on affinity. **Neq0569** was tested against the mutant protein C25A, having been observed reversal of the signature which became entropy driven. Furthermore, a reduction of 176-fold in the affinity was observed, demonstrating the importance of covalent-reversible binding to increase affinity.

Keywords: *Chagas Disease; Trypanosoma cruzi; Cystein Protease, Cruzain; ITC; Thermodynamic Signature; Dipeptidyl nitriles*

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1. DISTRIBUIÇÃO DA DOENÇA DE CHAGAS PELO MUNDO ³	17
FIGURA 1.2. MEDICAMENTOS USADOS PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS	19
FIGURA 1.3. (A) ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DA CRUZAÍNA (PDB: 2AIM) COM A REPRESENTAÇÃO DOS DOMÍNIOS E ESQUEMA 2D DO COMPLEXO CRUZAÍNA-SUBSTRATO PARA EVIDENCIAR A NOMENCLATURA DOS SUB-SÍTIO E DO SUBSTRATO ²⁷	21
FIGURA 1.4 MECANISMOS CATALÍTICO DE UMA CISTEÍNO PROTEASE ²³	22
FIGURA 1.5. REPRESENTAÇÃO DO COMPLEXO CRUZAÍNA-K777 ONDE É POSSÍVEL OBSERVAR O MODO DE INTERAÇÃO (MOB, DO INGLÊS <i>MODE OF BINDING</i>) E ESTRUTURA 2D DO INIBIDOR DE CRUZAÍNA K777	24
FIGURA 1.6. FORMAÇÃO DO INTERMEDIÁRIO TIOIMIDATO ³⁵	24
FIGURA 1.7. ESTRUTURAS 2D DO ODANACATIB E DOS COMPOSTOS IDENTIFICADOS POR BEAULIEU E COLABORADORES E SUAS RESPECTIVAS ATIVIDADES ³⁹	25
FIGURA 1.8. CALORÍMETRO DESENVOLVIDO POR LAVOISIER.....	26
FIGURA 1.9. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ITC (A). EXPERIMENTO TÍPICO DE <i>AFINIDADE</i> OBTIDO ATRAVÉS DA ITC. A CURVA APRESENTADA NA PARTE DE CIMA É O DADO BRUTO E A DE BAIXO É A OBTIDA DEPOIS DA INTEGRAÇÃO DOS PONTOS ⁴⁰	27
FIGURA 1.10. GRÁFICO COM AS CURVAS DE AFINIDADE RESULTANTE DOS DIFERENTES VALORES DE K_D E C^{49}	29
FIGURA 1.11. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE TRÊS DIFERENTES PERFIS TERMODINÂMICOS DE DIFERENTES INIBIDORES ⁶¹	31
FIGURA 1.12. ASSINATURA TERMODINÂMICA DOS INIBIDORES DE HIV-1 PROTEASE DE PRIMEIRA E SEGUNDA GERAÇÃO ⁶²	32
FIGURA 1.13. COMPARAÇÃO DA A INTERAÇÃO DO FIDERESTAT COM A HALR1 W.T E COM A MUTANTE L300P ⁵²	33
FIGURA 3.1. ESTRUTURA DOS COMPOSTOS ESTUDADOS ATRAVÉS DA ITC.....	42

FIGURA 4.1. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MÉTODO DE AUTOINDUÇÃO MÍNIMA DENTRO DA CÉLULA BACTERIANA ⁷⁸	44
FIGURA 4.2. SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS QUE SERÃO CODIFICADOS PELO GENE PARA A PRODUÇÃO DA CRUZAÍNA. OS AMINOÁCIDOS SUBLINHADOS SÃO PERTENCENTES A CAUDA DE HISTIDINA NA REGIÃO N-TERMINAL, OS EM CINZA CLARO SÃO DO PRÓ-DOMÍNIO E OS EM PRETO SÃO PERTENCENTES A CRUZAÍNA MADURA	44
FIGURA 4.3. GEL PARA CONTROLE DA EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO EM COLUNA DE NI-NTA DA CRUZAÍNA W.T	45
FIGURA 4.4. GEL PARA ACOMPANHAMENTO DA ATIVAÇÃO DA CRUZAÍNA W.T	46
FIGURA 4.5. ILUSTRAÇÃO DA ETAPA DE ATIVAÇÃO DA CRUZAÍNA (1 A 6) ONDE É OBSERVADO O CLAREAMENTO DA SOLUÇÃO. FOTOS TIRADAS A (1) 0 MIN., (2) 10 MIN., (3) 30 MIN., (4) 60 MIN., (5) 90 MIN. E (6) 120 MIN.	46
FIGURA 4.6. GEL DE ATIVAÇÃO DA PROTEÍNA MUTANTE C25S	47
FIGURA 4.7. ESTRUTURA DA DIPEPTIDIL-NITRILA COM AS REGIÕES ONDE AS MODIFICAÇÕES SERÃO REALIZADAS (P1 A P3) E O <i>WARHEAD</i> (DESTACADO EM UMA CAIXA VERMELHA)	48
FIGURA 4.8. (A) ISOTERMA OBSERVADA PELO EXPERIMENTO USANDO ITC PARA O NEQ0409. (B) GRÁFICO OBTIDO A PARTIR A INTEGRAÇÃO DAS ÁREAS DOS PICOS EM A	49
FIGURA 4.9. GRÁFICO DA RELAÇÃO ENTRE A VARIAÇÃO DA ENTALPIA DE IONIZAÇÃO DO TAMPÃO E DA VARIAÇÃO DA ENTALPIA OBSERVADA POR	50
FIGURA 4.10. ASSINATURA TERMODINÂMICA DO NEQ0409 QUANDO ESTUDADO EM DIFERENTES TAMPÕES	51
FIGURA 4.11. CURVAS REPRESENTATIVAS DOS ESTUDOS DE AFINIDADE DA CRUZAÍNA PELO NEQ0409 NOS TAMPÕES (A) ACETATO DE SÓDIO, (B) CITRATO/ÁCIDO CÍTRICO, (C) BIS-TRIS E (D) MES	52
FIGURA 4.12. GRÁFICO DAS VARIAÇÕES DE ΔG , ΔH , ΔS E K_A EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA. AS LINHAS VERMELHAS REPRESENTAM O AJUSTE LINEAR.	53
FIGURA 4.13. GRÁFICO DA VARIAÇÃO DA ENTALPIA <i>VERSUS</i> TEMPERATURA. A PARTIR DO AJUSTE LINEAR (LINHA VERMELHA) PODE-SE OBTER O VALOR DE ΔC_p . EM VERDE ESTÁ REPRESENTADO O INTERVALO DE 95 % DE CONFIANÇA	55

FIGURA 4.14. PROJEÇÃO GRÁFICA DOS VALORES DE pK_I <i>VERSUS</i> pK_D DOS INIBIDORES DA CRUZAÍNA. A LINHA VERMELHA REPRESENTA O AJUSTE LINEAR E AS LINHAS VERDES REPRESENTAM O INTERVALO DE 95% DE CONFIANÇA.....	59
FIGURA 4.15. ASSINATURA TERMODINÂMICA DAS DIPEPTIDIL-NITRILAS ESTUDADAS POR ITC PRESENTES NESTE TRABALHO	61
FIGURA 4.16. GRÁFICO DE EEC ($\Delta H = -1,01 \pm 0,0515 - T\Delta S - 9,11 \pm 0,254$; $R^2 = 0,965$; $N = 16$) PARA AS DIPEPTIDIL-NITRILAS ESTUDADAS. A LINHA VERMELHA REPRESENTA O AJUSTE LINEAR E AS LINHAS VERDES REPRESENTAM O LIMITE DE CONFIANÇA DE 95%.....	62
FIGURA 4.17. PLANO ENTALPIA-ENERGIA LIVRE DE GIBBS PARA AS DIPEPTIDIL-NITRILAS.....	63
FIGURA 4.18. CORRELAÇÃO ENTRE A ENTALPIA DE INTERAÇÃO DAS DIPEPTIDIL-NITRILAS COM O NÚMERO DE ACEITADORES DE LIGAÇÃO DE HIDROGÊNIO, DOADORES DE LIGAÇÃO DE HIDROGÊNIO, LOGP E MASSA MOLECULAR. OS VALORES DOS PARÂMETROS FORAM CALCULADOS USANDO O PROGRAMA MARVIN SKETCH DA CHEMAXON	64
FIGURA 4.19. GRÁFICO DE TOP PARA AS DIPEPTIDIL-NITRILAS INIBIDORAS DA CRUZAÍNA	66
FIGURA 4.20. DIAGRAMA COM OS SUBSTITUINTES EM P1 (VERDE), P2 (AZUL) E P3 (ROXO).....	69
FIGURA 4.21. CICLO TERMODINÂMICO USADO PARA ILUSTRAR O EFEITO DAS SUBSTITUIÇÕES EM P1 E P2	73
FIGURA 4.22. CICLO TERMODINÂMICO DAS SUBSTITUIÇÕES EM P1, P2 E P3.....	74
FIGURA 4.23. GRÁFICOS DOS EXPERIMENTOS DE AFINIDADE DA C25A PELO NEQ0569.....	75
FIGURA 4.24. ASSINATURA TERMODINÂMICA DO COMPLEXO NEQ0569-W.T. E NEQ0569-C25A	76
FIGURA B.1. GRÁFICOS DOS EXPERIMENTOS EM DIFERENTES TAMPÕES ACETATO, CITRATO, BIS-TRIS E MES (RESPECTIVAMENTE).....	93
FIGURA B.2. GRÁFICOS DOS EXPERIMENTOS A 15 °C	94
FIGURA B.3 GRÁFICOS DOS EXPERIMENTOS A 20 °C	94
FIGURA B.4. GRÁFICOS DOS EXPERIMENTOS A 25 °C	95
FIGURA B.5 GRÁFICOS DOS EXPERIMENTOS A 30 °C	95
FIGURA B.6 GRÁFICOS DOS EXPERIMENTOS A 37 °C	96

FIGURA B.7. GRÁFICOS DOS EXPERIMENTOS DO NEQ0409	97
FIGURA B.8. GRÁFICOS DOS EXPERIMENTOS DO NEQ0413	97
FIGURA B.9. GRÁFICOS DOS EXPERIMENTOS DO NEQ0414	98
FIGURA B.10. GRÁFICOS DOS EXPERIMENTOS DO NEQ0415	98
FIGURA B.11. GRÁFICOS DOS EXPERIMENTOS DO NEQ0419	99
FIGURA B.12. GRÁFICOS DOS EXPERIMENTOS DO NEQ0533	99
FIGURA B.13. GRÁFICOS DOS EXPERIMENTOS DO NEQ0537	100
FIGURA B.14. GRÁFICOS DOS EXPERIMENTOS DO NEQ0544	100
FIGURA B.15. GRÁFICOS DOS EXPERIMENTOS DO NEQ0551	101
FIGURA B.16. GRÁFICOS DOS EXPERIMENTOS DO NEQ0552	101
FIGURA B.17. GRÁFICOS DOS EXPERIMENTOS DO NEQ0554	102
FIGURA B.18. GRÁFICOS DOS EXPERIMENTOS DO NEQ0568	102
FIGURA B.19. GRÁFICOS DOS EXPERIMENTOS DO NEQ0569	103
FIGURA B.20. GRÁFICOS DOS EXPERIMENTOS DO NEQ0570	103
FIGURA B.21. GRÁFICOS DOS EXPERIMENTOS DO NEQ0575	104
FIGURA B.22. GRÁFICOS DOS EXPERIMENTOS DO NEQ0577	104

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 3.1. COMPOSIÇÃO DO MEIO DE AUTO-INDUÇÃO	36
TABELA 3.2. COMPOSIÇÃO DO TAMPÃO DE LISE PARA 5 G DE PELLET	37
TABELA 3.3. COMPOSIÇÃO DE GEL DE RESOLUÇÃO 12%	39
TABELA 3.4. COMPOSIÇÃO DE GEL DE EMPILHAMENTO 6%	40
TABELA 3.5. PARÂMETROS USADOS PARA A CONFIGURAÇÃO DO EXPERIMENTO DE AFINIDADE NO ITC.....	41
TABELA 4.1. VALORES DA ENTALPIA DE IONIZAÇÃO PARA OS TAMPÕES USADOS NO ESTUDO DE DETERMINAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA PROTONAÇÃO/DESPROTONAÇÃO NA AFINIDADE DA CRUZAÍNA PELO NEQ0409	50
TABELA 4.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA DO AJUSTE LINEAR APLICADO NO GRÁFICO DA ΔH_{ION} VERSUS ΔH_{OBS}	51
TABELA 4.3. TABELA COM OS PARÂMETROS OBTIDOS NO ESTUDO DE INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA AFINIDADE	54
TABELA 4.4. PARÂMETROS ESTATÍSTICOS DO AJUSTE LINEAR APLICADO PARA A DETERMINAÇÃO DE ΔC_p	55
TABELA 4.5. PARÂMETROS TERMODINÂMICOS DAS DIPEPTIDIL-NITRILAS ESTUDADAS POR ITC	56
TABELA 4.6. VALORES DE pK_D E pK_I PARA AS DIPEPTIDIL-NITIRLAS	58
TABELA 4.7. PARÂMETROS ESTATÍSTICOS DO AJUSTE LINEAR DA RELAÇÃO pK_I VERSUS pK_D	59
TABELA 4.8. VALORES DA DIFERENÇA RELATIVA DOS PARÂMETROS TERMODINÂMICOS E RESPOSTAS BIOLÓGICAS EM RELAÇÃO AO NEQ0409	68
TABELA 4.9. VALORES DOS PARÂMETROS OBTIDOS PELA ITC PARA A INTERAÇÃO ENTRE A CRUZAÍNA C25A E O NEQ0569.....	76

ÍNDICE DE EQUAÇÕES

EQUAÇÃO 1.1.	$K_a = \frac{[ML]}{[M][L]}$	28
EQUAÇÃO 1.2.	$\Delta G = -RT \ln K_a$	28
EQUAÇÃO 1.3.	$\Delta G = \Delta H - T \Delta S$	28
EQUAÇÃO 1.4.	$\Delta C_p = \frac{\Delta H}{\Delta T}$	28
EQUAÇÃO 1.5.	$c = nM_t K_d$	28
EQUAÇÃO 1.6.	$\Delta H_{intrínseco} = \Delta H_{obs} - \Delta H_{inib} - \Delta H_{buffer}$	29
EQUAÇÃO 1.7.	$\Delta H_{obs} = \Delta H_{bind} + n_p \Delta H_{ion}$	29
EQUAÇÃO A.1.	$K = \frac{\theta}{(1-\theta)[X]}$	91
EQUAÇÃO A.2.	$X_t = [X] + n\theta M_t$	91
EQUAÇÃO A.3.	$\theta^2 - \theta \left[1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nKM_t} \right] + \frac{X_t}{nM_t} = 0$	91
EQUAÇÃO A.4.	$Q = n\theta \Delta H V_0$	92
EQUAÇÃO A.5.	$Q = \frac{nM_t \Delta H V_0}{2} \left[1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nKM_t} - \sqrt{\left(1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nKM_t} \right)^2 - \frac{4X_t}{nM_t}} \right]$	92
EQUAÇÃO A.6.	$\Delta Q_{(i)} = Q_{(i)} + \frac{dV_i}{V_0} \left[\frac{Q_{(i)} + Q_{(i-1)}}{2} \right] - Q_{(i-1)}$	92

ÍNDICE DE ABREVIACÕES E SIGLAS

$\Delta\Delta G$	Diferença Relativa da Energia Livre de Gibbs
$\Delta\Delta H$	Diferença Relativa da Entalpia
$\Delta\Delta S$	Diferença Relativa da Entropia
ΔG	Variação da Energia Livre de Gibbs
ΔH	Variação da Entalpia
ΔS	Variação da Entropia
A ou Ala	Alanina
C ou Cys	Cisteína
C25A	Cruzaína mutante onde o resíduo Cys25 é substituído pelo resíduo Ala25
C25S	Cruzaína mutante onde o resíduo Cys25 é substituído pelo resíduo Ser25
DNDi	Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas
DTT	Ditiotreitol
EEC	Compensação entálpica-entrópica
H ou His	Histina
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
ITC	Calorimetria de Titulação Isotérmica
K777	N-metil-piperazina-Phe-homoPhe-vinilsulfona-fenil
K_a	Constante de associação
K_d	Constante de dissociação
K_i	Constante de inibição
K_M	Constante de Michaelis-Menten
MOA	do inglês <i>Mode of Action</i>
MOB	do inglês <i>Mode of Binding</i>
NEQUIMED	Grupo de Química Medicinal
OD ₆₀₀	Densidade Óptica à 600 nm
ON	do inglês <i>Overnight</i>
PDB	do inglês <i>Protein DataBank</i>
PMSF	Fluoreto de fenil-metano-sulfonil

<i>R</i>	Constante universal dos gases ($8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ou $1,987 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)
S ou Ser	Serina
TCEP	Tris(2-carboxietil)fosfina
TOP	do inglês <i>Thermodynamic Optimization Plot</i>
TS	do inglês <i>Thermodynamic Signature</i>
W.T.	do inglês <i>Wild Type</i>
Z-FR-AMC	Z-Phe-Arg-7-amino-4-metilcoumarina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 A Doença de Chagas.....	17
1.2 O NEQUIMED/IQSC/USP	19
1.3 A cruzaina.....	20
1.3.1 Inibidores	23
1.3.1.1 Inibidores covalentes irreversíveis	23
1.3.1.2 Inibidores covalentes reversíveis (Dipeptidil-nitrilas)	24
1.4 Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)	25
1.4.1 Uso da ITC em Química Medicinal.....	30
2 OBJETIVOS	34
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Material.....	35
3.2 Métodos	35
3.2.1 Expressão e purificação da cruzaina W.T.	35
3.2.2 Expressão e purificação da cruzaina mutante C25S	39
3.2.3 Eletroforese em gel SDS-Page	39
3.2.4 Estudos de Afinidade através da ITC	40
3.2.5 Estudos de Afinidade da C25A pelo Neq0569.....	42
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 Expressão e purificação da cruzaina W.T	44
4.2 Expressão e purificação da cruzaina mutante C25S	47
4.3 Estudos de afinidade das dipeptidil-nitrilas sintetizadas pelo NEQUIMED/IQSC/USP ...	48
4.3.1 Influência do tampão na afinidade da cruzaina pelas dipeptidil-nitrilas	49

4.3.2 Influência da temperatura na afinidade da cruzaina pelas dipeptidil-nitrila e determinação ΔC_p	53
4.3.3 Parâmetros termodinâmicos das dipeptidil-nitrilas inibidoras da cruzaina.....	55
4.3.4 Avaliação das substituições em P1, P2 e P3 sob a óptica da termodinâmica.....	65
4.3.4.1 Diferença relativa da energia livre de Gibbs, entalpia e entropia ($\Delta\Delta G$, $\Delta\Delta H$ e $T\Delta\Delta S$) dos inibidores com relação ao Neq0409	68
4.3.4.1.1 Inibidores com substituição única	69
4.3.4.1.2 Inibidores com substituição dupla	71
4.3.4.1.3 Inibidores com substituição tripla	73
4.3.5 Estudo da afinidade da cruzaina mutante pelo Neq0569.....	75
5 PERSPECTIVAS.....	77
6 CONCLUSÕES.....	78
REFERÊNCIAS	80
APÊNDICE A – Modelo de ajuste usado pelo programa Origin 7.0 para a obtenção dos parâmetros termodinâmicos da interação entre macromolécula e ligante	91
APÊNDICE B – Gráficos dos experimentos realizados	93

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Doença de Chagas

A doença de Chagas, atualmente considerada uma doença super-negligenciada,¹ é causada pelo protozoário parasito *Trypanosoma cruzi* e foi descrita pelo médico sanitarista Carlos Chagas em 1909.² Ela é endêmica da América Latina, porém há a sua difusão para outros países devido a fenômenos migratórios, e por não ser uma doença comum em países da Europa, Ásia e América do Norte, não há um controle rigoroso, fazendo com que a contaminação por transplantes e transfusões seja recorrente.³

Figura 1.1. Distribuição da Doença de Chagas pelo mundo³

Fonte: Coura, J. R.; 2010, p. S6

As principais formas de contaminação são pela picada do inseto vetor, comumente chamado de “barbeiro” (*Triatoma infestans*), por rotas congênicas (transmissão vertical) que são aquelas transmitidas durante a gravidez da mãe, por transplantes de órgãos e transfusão sanguínea e por fim, o que vem ocorrendo, pela ingestão de alimentos contaminados como no

caso em 2007 onde foi ingerido açaí contaminado com o *T. cruzi*.⁴ A doença apresenta duas fases clínicas, a aguda e a crônica. A fase aguda dá-se entre 4 e 10 dias após a picada. Neste período o enfermo apresenta febre, mal-estares e cefaleia. Posteriormente, ocorre o aparecimento do “Sinal de Romaña” ou chagomas e invasão do sistema circulatório onde o parasito migra para, praticamente, todos os tecidos e órgãos.⁵

A fase crônica é caracterizada por um período longo de latência, em que os indivíduos não apresentam sintomas, podendo permanecer assim por toda a vida do chagásico.⁶ Quando tal fase se manifesta, seus principais sintomas, são: danos ao trato intestinal, causando as chamadas dilatações (megaesôfago e megacólon) e danos ao coração, ocasionando a megalocardia, insuficiência cardíaca, arritmias, lesão das fibrocélulas do miocárdio entre outros.⁷

Embora seja reconhecido, pela Organização Pan-Americana da Saúde, o avanço de países latino-americanos no controle da Doença de Chagas (sendo que em alguns deles a transmissão por vetores domésticos foi considerada erradicada),⁸ ainda inexiste um tratamento efetivo para pacientes chagásico.⁹

Atualmente o tratamento da doença de Chagas se dá através de dois medicamentos (Nifurtimox e Benzonidazol), ambos eficazes apenas na fase aguda da doença e com severos efeitos adversos. Por causa dos efeitos indesejados, o nifurtimox teve seu uso descontinuado no Brasil, Chile, Uruguai e EUA.¹⁰ Existem, no entanto, tentativas de se empregar outros compostos.¹¹ Estratégias como o reposicionamento de fármacos para doenças negligenciadas têm sido aplicada como forma de suprir a deficiência de medicamentos para seus tratamentos.¹⁰⁻¹³ Vale destacar, que até o momento, o Fexinidazol encontra-se em fase clínica II (Figura 1.2).¹⁴

Figura 1.2. Medicamentos usados para o tratamento da Doença de Chagas **Benzonidazol** **Nifurtimox** **Fexinidazol**

Fonte: Autoria própria

1.2 O NEQUIMED/IQSC/USP

O Grupo de Química Medicinal do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (NEQUIMED/IQSC/USP) tem dedicado seus esforços para a descoberta de pequenas substâncias químicas com atividade tripanossomicida¹⁵ e antitumoral. Inicialmente, o NEQUIMED/IQSC/USP trabalhava com produtos naturais (PN)¹⁶ com potencial atividade frente a uma importante enzima envolvida na via glicolítica do *Trypanosoma cruzi*, a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*TcGAPDH*).¹⁷⁻¹⁸ A determinação da propriedade bioativa iniciava-se com estudos computacionais, em sua maioria, orientados apenas pela estrutura do ligante (LBVS, do inglês *Ligand-Based Virtual Screening*). Os estudos de cinética enzimática e inibição eram realizados através de calorimetria de titulação isotérmica (ITC),¹⁹ por ser uma técnica independente de marcadores químicos e propriedades ópticas dos sistemas analisados, já que depende unicamente de uma propriedade intrínseca de reações químicas: o calor. Ao longo da trajetória do NEQUIMED/IQSC/USP, estratégias foram sendo implementadas, como o planejamento baseado na estrutura do alvo (TBVS, do inglês *Target-Based Virtual Screening*), e novos alvos, como a cruzaina²⁰ e a diidroorotato desidrogenase (*TcDHODH*)²¹ foram incorporados. Recentemente, o NEQUIMED/IQSC/USP obteve um

grande avanço na descoberta de inibidores de enzimas-alvo da doença de Chagas.¹⁵⁻²⁰⁻²¹ Em 2012, foi iniciada a síntese de compostos bioativos planejados pelos membros do grupo (anteriormente todos os compostos eram adquiridos junto a empresas especializadas). Os primeiros compostos sintetizados pelo NEQUIMED/IQSC/USP foram análogos de barbituratos usados como inibidores da *Tc*DHODH. Ainda em 2012, a classe de inibidores da cruzaina (dipeptidil-nitrilas) começou a ser sintetizada. Em 2013, o NEQUIMED/IQSC/USP conseguiu sua primeira estrutura cristalográfica de raio X para cruzaina (PDB: 4KLB) co-cristalizada com um inibidor não-peptídeo mimético e não-covalente.²²

1.3 A cruzaina

As proteases têm papel fundamental na sobrevivência e replicação de parasitos. Isso faz com que as enzimas desse grupo se tornem alvos atraentes do ponto de vista químico-medicinal.²³ De uma forma geral, as proteases atuam em ligações peptídicas catalisando a hidrólise dos mesmos e são divididas em classes que são definidas de acordo com sua tríade catalítica. Das classes de proteases, destaca-se a cisteína protease, cujo nome é definido por apresentar uma cisteína como aminoácido catalítico. Esta classe é subdividida em superfamílias sendo a com maior número de representantes aquelas similares à família das papaínas que contém diversas proteases oriundas de protozoários, plantas e as catepsinas lisossomais.²⁴

A cruzipaina é a principal cisteína protease do protozoário *T. cruzi* (agente etiológico da doença de Chagas), está presente em todas as suas formas parasitárias e mostra-se essencial para a manutenção da vida do parasito, desempenhando um papel direto na replicação, diferenciação celular e nutrição do *T. cruzi*.²³⁻²⁴ A cruzaina nada mais é do que a cruzipaina em sua forma madura expressada heterologicamente, já sem a sua porção C-terminal, cuja ausência não afeta a atividade enzimática da proteína.²⁵ Seu número de classificação segundo a comissão de nomenclatura de enzimas (*Enzyme Commission*) é EC 3.4.22.51. Os números correspondem a hidrolases (3), que atuam em ligações peptídicas (4), cisteína endopeptidase (22) e seu número específico (51).²³

A cruzaina apresenta uma sequência de 215 aminoácidos que se encontram enovelados em dois domínios, α -helicoidal (domínio L) e outro formado por folhas- β antiparalelas

(domínio R) (Figura 1.3). Na região entre os domínios existe uma fenda onde o sítio ativo, composto pela díade catalítica Cys25 e His159, está localizado.²⁶

Figura 1.3. (A) Estrutura cristalográfica da cruzaina (PDB: 2AIM) com a representação dos domínios e esquema 2D do complexo cruzaina-substrato para evidenciar a nomenclatura dos sub-sítio e do substrato²⁷

Fonte: Adaptado de AVELAR, L. A. A. 2014, p. 211

A nomenclatura do sítio ativo segue o mesmo padrão adotado para outras proteases, (Figura 1.3). O sub-sítio denominado S1 é a região onde se encontra a tríade catalítica, o sub-sítio S2 é uma região mais profunda com característica hidrofóbica, já o sub-sítio S3 é mais superficial e possui também característica hidrofóbica. A região de reconhecimento da ligação peptídica (compreendida entre os sub-sítios S1, S2 e S3) apresenta característica hidrofílica.²⁸

Figura 1.4 Mecanismos catalítico de uma cisteína protease²³

Fonte: Adaptado de CAZZULO, J. J., 2013, p. 1913

O mecanismo catalítico da cruzaina (Figura 1.4), e outras cisteína proteases, dá-se basicamente em quatro etapas: (i) Os resíduo cisteína (Cys25) e histidina (His159) encontram-se localizados no sítio ativo de forma a estabelecer o par iônico, onde o próton do grupo tiol (SH) da Cys é abstraído pelo N δ imidazólico da His formando o tiolato (S $^-$). (ii) Durante a

hidrólise da ligação peptídica do substrato, ocorre o ataque nucleofílico do tiolato ao carbono carbonílico da ligação peptídica formando um intermediário tetraédrico que é estabilizado pela cavidade do oxiânio (formada pela Gln19). (iii) Na etapa seguinte, a ligação amídica é clivada e a porção C-terminal do substrato é libertada formando uma acil-enzima. Subsequentemente, essa a acil-enzima é atacada pelo oxigénio de uma molécula água e um novo intermediário tetraédrico. (iv) Por fim, ocorre o restabelecimento do grupo tiolato liberando a porção N-terminal do substrato, e a enzima é regenerada dando então continuidade ao ciclo catalítico.

1.3.1 Inibidores

1.3.1.1 Inibidores covalentes irreversíveis

Os inibidores da cruzaina, assim como de outras proteases, podem ser divididos de uma maneira simplificada: quanto à sua estrutura, em peptídeo-miméticos e não peptídicos; quanto ao seu tipo de inibição, em reversível e irreversível. Independentemente de sua classificação, os inibidores seguem o mesmo padrão estrutural, uma sequência de reconhecimento (peptídica ou não peptídica) e um grupo de interação com o sítio ativo. Inibidores que se ligam covalentemente de maneira reversível ou irreversível com a cisteína catalítica apresentam um grupo eletrofílico, conhecido como *warhead*.²⁹

Atualmente, vários grupos de Química Medicinal têm seus esforços direcionados a identificação de inibidores da cruzaina.³⁰ No entanto, o composto mais avançado na gênese de fármacos foi K777 (Figura 1.5), identificado por Dieter Brommer *et al* como inibidor de cisteíno protease,³¹ e posteriormente estudado como um inibidor irreversível e peptídeo-mimético da cruzaina, pelo grupo do professor James Mckerrow da UCSF.³²

A estrutura do complexo cruzaina-K777 (PDB 2OZ2) possibilita a descrição do modo de interação (Figura 1.5). Observa-se na que o ligante ocupa os principais sub-sítios (S1, S2 e S3), além da região S1'. Também é observada a ligação covalente entre a cruzaina e o K777.

Figura 1.5. Representação do complexo cruzaína-K777 onde é possível observar o modo de interação (MOB, do inglês *Mode of Binding*) e estrutura 2D do inibidor de cruzaína K777

Fonte: Autoria própria

1.3.1.2 Inibidores covalentes reversíveis (Dipeptidil-nitrilas)

Os primeiros inibidores peptídeo-miméticos reversíveis da enzima cruzaína possuíam como *warhead* o grupo funcional cetona, o qual foi posteriormente modificado para diversos outros grupos, tais como alfa cetoamidas, cetoácidos, cetoésteres e aldeídos. Porém, apesar de apresentar inibição considerável contra a enzima, mostraram-se pouco efetivos quando testados diretamente contra o parasito.³³

Uma classe que vem sendo estudada como inibidor de cisteína protease são as dipeptidil-nitrilas,³⁴ que têm como grupo eletrofílico a nitrila, conhecida por realizar ligações covalentes reversíveis com o grupo tiol presente na Cys25 (Figura 1.6).³⁵

Figura 1.6. Formação do intermediário tioimidato³⁵

Fonte: Autoria própria

Inicialmente, foram estudadas peptidil-nitrilas como inibidores de papaína.³⁶ A partir de então, vários trabalhos foram publicados com a aplicação, agora das dipeptidil-nitrilas e derivados como inibidores de diversas catepsinas³⁷ com destaque para o Odanacatib® (inibidor de catepsina K), que vem sendo estudado como possível tratamento de osteoporose e metástase óssea (Figura 1.7).³⁸ Usando como base a estrutura do Odanacatib®, Beaulieu e colaboradores propuseram uma série de compostos que foram estudadas como inibidor de cruzaina, obtendo compostos promissores (Figura 1.7).³⁹

Figura 1.7. Estruturas 2D do Odanacatib e dos compostos identificados por Beaulieu e colaboradores e suas respectivas atividades³⁹

Fonte: Autoria própria

1.4 Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)

A calorimetria foi uma das técnicas científicas pioneiramente descritas na literatura.⁴⁰ Os estudos calorimétricos tiveram início com Black (na década 1760) quando o mesmo determinou a capacidade calorífica e o calor latente para a água. Pouco tempo depois, Lavoisier e Laplace apresentaram o primeiro calorímetro (Figura 1.8). O instrumento foi usado para a determinação do calor produzido pelo metabolismo de uma cobaia confinada em cela central (cela de amostra). O equipamento foi construído com uma camada externa de madeira e a mesma foi preenchida com gelo, sendo usada como uma jaqueta adiabática. Então outra camada foi usada, essa se apresentava diretamente em contato com a cela central onde a cobaia ficava confinada. A água obtida pelo derretimento do gelo era coletada e então o calor produzido pelo

metabolismo da cobaia pôde ser determinado. Essa primeira descrição da instrumentação do calorímetro foi também considerada o primeiro experimento calorimétrico para um sistema biológico.⁴⁰

Figura 1.8. Calorímetro desenvolvido por Lavoisier

Fonte: Adaptado de FREYER, M. W.; 2008, p. 79

Foto extraída do site <http://institutosanisidoro.com/fisica-quimica/calorimetro-de-lavoisier.html>, acessado em 05 fev. 2016

A calorimetria de titulação isotérmica tem sido aplicada para estudos de interações entre pequenas moléculas e alvos biomacromoleculares.⁴¹⁻⁴² Tal técnica mostra-se fundamental para o entendimento do comportamento de sistemas bioquímicos⁴³ e foi descrita em 1978, pela primeira vez para estudos de afinidade, por Beaudette e Langerman.⁴⁴ Os experimentos com ITC baseiam-se em um sistema de uma seringa e duas celas, a de amostra e a de referência. A seringa pode ser preenchida tanto com a macromolécula quanto com o ligante e é responsável pela titulação na cela de amostra, além da agitação do sistema. A célula de referência contém apenas água ou tampão, enquanto que a célula de amostra contém a macromolécula ou ligante (Figura 1.9).

Figura 1.9. Representação esquemática do ITC (A). Experimento típico de *Afinidade* obtido através da ITC. A curva apresentada na parte de cima é o dado bruto e a de baixo é a obtida depois da integração dos pontos⁴⁰

Fonte: Adaptado de FREYER, M. W., 2008, p. 79

O processo de injeção na célula de amostra proporciona a troca de calor (diluição e interação) que altera o equilíbrio entre ambas às celas, e um sistema de compensação (Potência Térmica em $\mu\text{cal s}^{-1}$) equaliza essa diferença gerando um sinal. Essa energia térmica aplicada em função do tempo é diretamente proporcional ao calor da reação. Cada injeção realizada promove a alteração no volume total. No entanto, esse volume excedente encontra-se fora da cela de amostra, e esse não é monitorado pelo calorímetro. O volume presente na cela de amostra é chamado de Volume ativo (V_0). Em um experimento comum, cada injeção provoca a diminuição de aproximadamente 1% da concentração da macromolécula (M_t) presente em V_0 .

A ITC determina, em um único experimento e sem a necessidade de sonda ou marcadores, a constante de associação (K_a) e os parâmetros termodinâmicos (ΔH , ΔG e ΔS) de um ligante frente ao alvo.⁴⁵ A sensibilidade do aparelho é extremamente alta e consegue detectar trocas de calores na ordem de 10^{-8} W o que proporciona medidas acuradas das constantes de associação (K_a) entre 10^2 - 10^9 M^{-1} .

A constante de afinidade (K_a) descreve a relação entre a concentração de um complexo macromolécula-ligante (ML) no estado de equilíbrio de uma reação reversível entre a macromolécula (M) e o ligante (L), ambos isolados.

Equação 1.1.
$$K_a = \frac{[ML]}{[M][L]}$$

Quando em condições de equilíbrio, K_a pode ser descrito em função da variação energia livre de Gibbs:⁴⁶

Equação 1.2.
$$\Delta G = -RT \ln K_a$$

Quando mais negativo o valor de ΔG , maior será o valor da afinidade entre do inibidor pela enzima. Como se sabe, o ΔG pode ser descrito em função da variação de entalpia menos o produto da temperatura pela variação da entropia:⁴⁶

Equação 1.3.
$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

A ITC pode prover com alguns experimentos extras outro parâmetro, o ΔC_p . Para isso é necessário que sejam realizados esses estudos em diferentes temperaturas. Essa determinação fornece a caracterização termodinâmica completa para o sistema em estudo. O ΔC_p é definido por:⁴⁷

Equação 1.4.
$$\Delta C_p = \frac{\Delta H}{\Delta T}$$

O parâmetro c (Equação 1.5) é usado como preditor do ajuste sigmoidal da curva do experimento de afinidade e o valor de c ajuda no planejamento do experimento através da simulação das curvas de interação. Onde n é a fração molar, M_t é a concentração total de macromolécula e $K_d = 1/K_a$.

Equação 1.5.
$$c = nM_t K_d$$

De acordo com o valor de c , pode-se classificar os processos de interação como afinidade forte (*tight binding*) ($c > 100$), afinidade moderada ($10 < c < 100$) e afinidade fraca ($c < 10$) (Figura 1.10). É importante observar o valor de c com cuidado, pois ele pode acarretar em complicações na obtenção dos resultados. Em casos onde $c > 100$ a curva de interação é muito inclinada o que provoca grande imprecisão na determinação de K_a . Em contrapartida, para casos onde $c < 10$, a curva tem pouca inclinação acarretando em problemas para a determinação de n , K_a e ΔH .⁴⁸

Figura 1.10. Gráfico com as curvas de afinidade resultante dos diferentes valores de K_d e c ⁴⁹

Fonte: Adaptado de MINETTI, C. A. S. A., 2013, p. 139

A aplicação da ITC na determinação da afinidade de uma enzima pelo ligante necessita de diversos cuidados,⁵⁰ pois como é uma técnica que não diferencia os tipos de calor trocado na cela de amostra, é imprescindível a realização de diversos tipos de experimentos a fim de obter a variação de entalpia correspondente exclusivamente a interação entre a enzima e o ligante. A determinação do $\Delta H_{intrínseco}$ (variação da entalpia intrínseca) para cada inibidor é obtida a partir de⁴⁰

Equação 1.6.
$$\Delta H_{intrínseco} = \Delta H_{obs} - \Delta H_{inib} - \Delta H_{buffer}$$

Onde ΔH_{obs} é o valor observado após a integração dos picos obtidos no experimento de afinidade, ΔH_{inib} é a simples titulação do inibidor sobre a solução que preenche a cela de amostra na ausência da enzima, e por fim o ΔH_{buffer} que é a titulação do tampão sobre ele mesmo.

Tratando-se de sistemas bioquímicos, devemos considerar outra influência além dos calores de diluições, o efeito de ionização do tampão por meio da transferência de próton do sistema para o tampão ou do tampão para o sistema. Essa influência é facilmente resolvida realizando estudos de afinidade em dois ou mais tampões. Com isso obtém-se a seguinte relação:

Equação 1.7.
$$\Delta H_{obs} = \Delta H_{bind} + n_p \Delta H_{ion}$$

Onde ΔH_{bind} é o referente à variação da entalpia de interação, n_p ao número de prótons trocados (cedidos ou aceitos) pelo sistema em estudo e ΔH_{ion} é o valor tabelado da variação da entalpia de ionização do tampão usado no estudo.

1.4.1 Uso da ITC em Química Medicinal

Nas últimas décadas, a aplicação da ITC na obtenção de propriedades termodinâmicas do processo de interação bimolecular tem ajudado a orientar químicos medicinais nas etapas de otimização⁵¹ proporcionando-lhes uma compreensão minuciosa das forças que guiam as interações.⁵² A decomposição da afinidade (ΔG) entre a macromolécula e o ligante em parâmetros entálpicos (ΔH) e entrópicos (ΔS) podem acelerar a descoberta de medicamentos.⁵³ Com base nessas informações, pode-se traçar a *Assinatura Termodinâmica* (TS) dos compostos em estudo.⁵⁴

A entalpia pode ser classificada como favorável (van der Waals, ligações de hidrogénio, etc.) ou desfavorável (dessolvatação de grupos polares).⁵⁵⁻⁵⁶ Uma entalpia favorável é observada quando ligante estabelece interações, com o alvo, fortes o suficiente para compensar a entalpia associada à dessolvatação.⁵⁷ Por outro lado, uma entalpia desfavorável geralmente indica que os grupos polares não apresentam interações suficientemente fortes com o alvo.⁵⁷⁻⁵⁸

Agora sob a perspectiva da entropia, destacam-se duas formas de quantificação deste termo: mudanças na entropia de solvatação e na conformacional. Após a interação, a água é deslocada do sítio de interação e um ganho de entropia do solvente é observado, que é particularmente importante para os grupos hidrofóbicos. Ao mesmo tempo, o ligante e certos grupos na proteína perdem liberdade conformacional (redução de graus de liberdade) resultando em uma mudança desfavorável na entropia.⁵⁹ Existem três situações distintas para os ligantes: os entálpicamente dirigidos, entropicamente dirigidos e os balanceados,⁶⁰ como mostrado na Figura 1.11.

Figura 1.11. Representação esquemática de três diferentes perfis termodinâmicos de diferentes inibidores⁶¹

Fonte: Adaptado de: O'BRIEN, R.; 2004, p. 3

Nesse exemplo pictórico, o composto definido como **A** apresenta uma grande contribuição entálpica em detrimento do termo entrópico. Já em **B** vemos exatamente o oposto de **A**. Agora em **C** vemos uma contribuição equilibrada dos termos.⁶¹ Com essas informações, os químicos medicinais têm a difícil tarefa de otimizar o composto-matriz, de forma a obter a máxima contribuição entálpica e entrópica.⁵³

Na etapa de otimização, deve-se levar em conta que os compostos respondam favoravelmente a diversas restrições como: biodisponibilidade oral, toxicidade, que os grupos polares incluídos realizem somente interações favoráveis, em outras palavras, todo ganho entálpico deve ser traduzido em melhora da afinidade além da redução de pênaltis entálpicos e entrópicos.⁵²⁻⁵³⁻⁵⁶ A modulação da contribuição entrópica é facilmente otimizada ao se inserir restrições conformacionais no ligante, forçando-o adotar uma conformação, quando livre, semelhante quando no complexo ML. No entanto, sabe-se que o processo de otimização entálpica é extremamente complexa que o torna um trabalho longo e árduo.⁵²⁻⁵³

Existe uma série de exemplos onde a ITC foi aplicada para a compreensão estrutural e otimização da afinidade e perfil termodinâmico. Entre eles, destaca-se o trabalho de Freire e colaboradores que estudaram a primeira e segunda geração de inibidores da HIV-1 proteases parar o tratamento da AIDS, os “navir” (Figura 1.12).⁶²

Figura 1.12. Assinatura termodinâmica dos inibidores de HIV-1 protease de primeira e segunda geração⁶²

Fonte: Adaptado de OHTAKA, H.; 2005, p. 193

Freire e colaboradores observaram uma mudança significativa na orientação da energia livre de Gibbs de interação, entropicamente dirigida na primeira, para entálpicamente dirigida na segunda geração.⁶³ Além dessa alteração na energética da afinidade, foi observado um aumento no ΔG sendo que o TMC-126 apresentou-se com a maior afinidade. Também pode-se destacar o papel da otimização entálpica, fazendo como que os ligantes apresentem interações mais específicas com o alvo, o que é traduzida em uma maior seletividade e adaptabilidade.⁶⁴⁻⁶⁵

No trabalho realizado por Petrova, T. *et al* para o Fidarestat, inibidor da Aldol Redutase humana tipo I (ALR1),⁶⁶ foi observado que ele, quando estudado contra a forma selvagem da ALR1, estabelece uma ligação de Hidrogênio entre o Oxigênio carbonílico e o NH da cadeia principal da Leu300 (Figura 1.13). Agora quando estudada a interação entre o Fidarestat e a ALR1 L300P mutante, a enzima perde o sítio de ligação de Hidrogênio, observando uma redução de 7,8 kJ mol⁻¹ no ΔG de interação. Isso é traduzido em uma perda de 1,37 unidade logarítmicas na afinidade da enzima pelo inibidor.⁶⁶

Figura 1.13. Comparação da interação do Fidarestat com a hALR1 W.T e com a mutante L300P⁵²

Fonte: Adaptado de KLEBE, G., 2015, p. 95

2 OBJETIVOS

O objetivo da presente tese é o estabelecimento do perfil termodinâmico (TS, do inglês *Thermodynamic Signature*) para uma série de inibidores da enzima cruzaína e estudar a influência da ligação covalente reversível entre a nitrila (*warhead* presente na série em questão) e a Cys25 através da mutação da cisteína catalítica para uma serina. Para alcançar o objetivo proposto faz-se necessário cumprir os seguintes objetivos específicos:

- ✓ Adequação do procedimento de purificação e expressão da enzima cruzaína em sua forma selvagem (WT, do inglês *Wild Type*), serina mutante (C25S);
- ✓ Aplicar o procedimento de estudo termodinâmico usando ITC para a série de dipeptidil-nitrilas identificadas como inibidoras da cruzaína e traçar seu perfil termodinâmico;
- ✓ Aplicar o procedimento de estudo termodinâmico usando ITC para a série de dipeptidil-nitrilas contra a cruzaína mutante C25S e C25A (alanina mutante), com a finalidade de identificar a contribuição da ligação covalente reversível no processo de interação do ligante-enzima/proteína.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Os reagentes utilizados foram adquiridos junto a Sigma-Aldrich e usados sem purificações adicionais. Já os compostos testados, são todos de propriedade intelectual do NEQUIMED/IQSC/USP e apresentam pureza superior a 95% e são enantiomericamente puros. Durante a execução do projeto foi utilizado um sistema calorimétrico de titulação isotérmica do tipo VP-ITC da MicroCal financiado pela FAPESP (Processo #2005/01282-3).

3.2 Métodos

3.2.1 Expressão e purificação da cruzaína W.T.

Inicialmente foi realizada a transformação da bactéria competente ArticExpress (DE3)RIL com o plasmídeo pET21a contendo o gene que codifica a enzima cruzaína fundida a uma cauda de histidina (His₆-tag) em -terminal. Para isso, foi seguido o seguinte procedimento: (i) Um microtubo com 50 µL de uma solução em suspensão da bactéria competente ArticExpress (DE3)RIL foi retirada do *freezer* a -80 °C e mantida em gelo por 15 min. (ii) Então, foi adicionado 5 µL do plasmídeo e o microtubo ficou em incubação no gelo por 30 min. (iii) Após o período de incubação, a solução foi levada a um banho termostático a 42 °C e mantida por 30 s e depois levada a banho de gelo por 2 min. (iv) Feito isso, 250 µL de meio SOC foi adicionado ao microtubo que foi então levado ao shaker a 37 °C sob agitação de 225 rpm durante 1 h. (v) Ao termino desse período duas placas de ágar+LB foram preparadas (uma com 20 µL e outra com 200 µL de bactéria) na presença dos antibióticos carbenicilina (100 µg mL⁻¹) e gentamicina (20 µg mL⁻¹). Todas as etapas descritas acima foram realizadas

em uma capela de fluxo laminar. As placas foram mantidas em uma estufa a 37 °C overnight (ON). No dia seguinte as placas foram lacradas e estocadas em geladeira.

A segunda parte foi o preparo do pré-inóculo. (i) foram dissolvidos 5 g do meio LB em 200 mL de água desionizada, e então a solução foi autoclavada. (ii) Após o arrefecimento da mistura, foram adicionados os dois antibióticos (carbenicilina e gentamicina) em quantidade suficiente para uma concentração final igual 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente. (iii) Então, uma colônia isolada na placa foi “pescada” com um palito de madeira e foi colocado em contato com o meio. (iv) O pré-inóculo foi deixado em um shaker a 37 ° e agitação (250 rpm) overnight. Assim como na etapa de transformação, o pré-inóculo foi preparado em ambiente estéril. Foram separados 10 mL do pré-inóculo, antes do contato com a colônia, para ser usado como branco para a medição da densidade óptica (OD_{600}).

Por fim, foi iniciada a etapa de autoindução para a expressão da cruzaína, seguindo o seguinte procedimento: (i) Preparou-se 1 L do meio de auto-indução com a composição descrita na Tabela 3.1.⁶⁷⁻⁶⁸ O meio foi autoclavado e, quando em temperatura ambiente, foi misturado 10 mL de uma solução de D-glicose 5%, 40 mL de α -lactose 5% e o volume necessário para os antibióticos (carbenicilina e gentamicina) ficarem em concentração final igual 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente.

Tabela 3.1. Composição do meio de auto-indução

Componente	Quantidade
N-Z amina	10 g
Extrato de levedura	5 g
Glicerol	5 mL
Água	900 mL
Na_2HPO_4	25 mL de uma solução a 1 M
KH_2PO_4	25 mL de uma solução a 1 M
NH_4Cl	50 mL de uma solução a 1 M
Na_2SO_4	5 mL de uma solução a 1 M
MgSO_4	2 mL de uma solução a 1 M

Fonte: Autoria própria

Depois de preparado o meio, foram separados 50 mL do mesmo para usar como branco na determinação da OD_{600} . Antes de inocular o meio de autoindução, foi determinado a OD_{600}

do pré-inóculo, pois segundo o procedimento descrito por Craik, C. L e colaboradores,⁶⁸ é necessário que a OD₆₀₀ inicial do meio de autoindução esteja igual a 0,16. Por esse motivo a OD₆₀₀ do pré-inóculo foi determinada através de um espectrofotômetro UVvis da Shimadzu e foi feito o cálculo do volume de pré-inóculo que deveria ser adicionado ao meio de autoindução para que atendesse a condição estabelecida por Craik, C. L. *et al.* Ressalta-se novamente que toda etapa foi realizada em capela de fluxo laminar para evitar contaminações. O meio foi dividido em dois erlenmeyers de 1 L ficando em cada um deles 500 mL de meio. Ambos foram levados ao shaker, agora a 18 °C e agitação constante de 250 RPM por 60 h. A cada 24 h a OD₆₀₀ foi medida para acompanhar o crescimento e a estabilização do processo de expressão. Após o período de 60 h, as bactérias foram coletadas através de centrifugação (50000 RPM por 25 min. a 4 °C) e os pellets foram pesados e armazenados em *freezer* a -20 °C.

A etapa de purificação foi realizada segundo o seguinte procedimento: (i) Para cada 5 g de pellet foram preparados 20 mL de tampão de lise (Tabela 3.2). O pellet foi ressuspensão no tampão de lise e mantido em banho de gelo por 1 h. Transcorrido o tempo, a solução foi levada a um desmembrador celular (*Sonic Dismembrator Model 500* da Fisher Scientific) para que as membranas das bactérias fossem rompidas. O sistema foi configurado da seguinte forma: Amplitude de 15%, pulso ligado de 30 s, pulso desligado de 59,9 s e tempo total de 15 min.

Tabela 3.2. Composição do tampão de lise para 5 g de pellet

Componente	Quantidade
Tampão A (50 mM Tris, NaCl 300 mM, Imidazol 10 mM e pH 10,0)	20 mL
CaCl₂	10 µL de um estoque a 1 M
MgSO₄	10 µL de um estoque a 1 M
Lisozima	Suficiente para 0,2 mg mL ⁻¹
PMSF	100 µL de um estoque 0,2 M
DNase	4 µL
RNase	4 µL

Fonte: Autoria própria

Depois do desmembramento das células, a solução foi submetida a uma centrifugação a 20000 RPM por 30 min a 4 °C. Após essa etapa, iniciou-se o procedimento de purificação. O sobrenadante foi misturado com 4 mL de uma solução de Ni-NTA e deixado sob agitação e em banho de gelo por 2 h. Transcorrido esse tempo a solução foi transferida para uma coluna de 25

mL e armazenada em uma geladeira. Foi iniciada a etapa de eluição (nessa parte foi coletada uma alíquota de 10 μ L para estudos de eletroforese). Após eluídos os 20 mL, uma fração com 15 mL apenas de tampão A (Tabela 3.2) foi eluída e também uma alíquota foi coletada. Depois, foi preparado outro tampão (tampão B) que era a mistura do tampão A mais 500 mM de imidazol. Por volta de 25 mL do tampão B foram usados para eluir a cruzaina da coluna de Ni-NTA. A cada 7 mL uma nova fração era coletada para estudos por eletroforese em gel.

Depois de coletada as frações, foi iniciada a etapa de ativação. As frações transferidas para uma membrana de diálise de 10 kDa e deixadas em diálise overnight em 2 L tampão de ativação (NaOAc 100 mM, NaCl 300 mM e pH 5,5). No dia seguinte outra diálise em 2 L tampão de ativação foi realizada, agora por 2 h apenas (uma alíquota foi separada para eletroforese). Depois dessa etapa, a concentração da enzima foi determinada por um *nanodrop* DS-11+ da DeNovix. A enzima, para sua ativação, deve estar com uma concentração de 0,5 mg mL⁻¹. A solução geralmente deve ser diluída e o pH do tampão de ativação deve ser corrigido para 5,2 e adicionou-se 5 mM de DTT (uma alíquota foi coletada para eletroforese). A solução foi levada a banho termostatzado a 37 °C por 2 h e foram retiradas alíquotas a 10, 30, 90, 120 min para estudos de eletroforese. Foi realizado o estudo cinético da atividade enzimática usando um leitor de placas de 96 poços (Biotek Synergy HT) para monitorar a reação de hidrólise do substrato Z-FR-AMC (Z-Phe-Arg-7-amino-4-metilcoumarina). As condições do experimento de determinação do K_M foram em tampão Acetato de sódio 100 mM, pH 5,5 e 5 mM DTT e oito concentrações diferentes de substrato abrangendo a faixa 30,0 – 0,8 μ M, conforme descrito no trabalho de AVELAR, L. A. A., *et al.*⁶⁹ O valor do K_M deve estar entre 1,2 e 2,0 μ M. Ao término da ativação e determinação da atividade, a enzima foi concentrada e teve sua atividade medida. A enzima então foi alíquotada e congelada em nitrogênio líquido e depois estocada em *freezer* a -80 °C.

3.2.2 Expressão e purificação da cruzaina mutante C25S

Para a proteína mutante C25S (desenvolvida pelo aluno de doutorado William Fernandes do NEQUIMED/IQSC/USP), o mesmo procedimento descrito acima foi aplicado para a expressão e purificação com o acréscimo da etapa de trans-ativação, que nada mais é que o uso da enzima W.T. para clivagem do pró-domínio, uma vez que a enzima mutante não

apresenta atividade catalítica, pois não possui a C25. Na trans-ativação usou-se 10% v/v da enzima W.T.

3.2.3 Eletroforese em gel SDS-Page

Foram preparados os géis de resolução e empilhamento seguindo a composição descrita nas Tabela 3.3 e Tabela 3.4. As amostras foram preparadas com 5 μ L de amostra e 25 μ L de tampão de desnaturação. O primeiro poço do gel foi preenchido com 5 μ L de marcador de peso molecular e os demais com 15 μ L de amostra. Foram preparados 500 mL de tampão para preenchimento da cuba através da diluição de uma solução estoque (Tris base 250 mM, glicina 2 M e SDS 1%) na proporção de 1:10. O sistema foi configurado usando tensão constante (~110 V) e corrente variável. A corrida durou 1:30 h. Após o termino da corrida o gel foi corado com CBB, HCl 25 mM por 30 min e deixado para descorar em água desionizada por 1 h.

Tabela 3.3. Composição de gel de resolução 12%

Componente	Volume
Acrilamida/bisacrilamida (29:1) 30%	6,2 mL
Tris-HCl 1 M e pH 8,8	6,0 mL
SDS 20%	76,0 μ L
Água desionizada	2,6 mL
APS 10%	72,0 μ L
TEMED	10,0 μ L

Fonte: Autoria própria

Tabela 3.4. Composição de gel de empilhamento 6%

Componente	Volume
Acrilamida/bisacrilamida (29:1) 30%	1,0 mL
Tris-HCl 1 M e pH 6,8	0,6 mL
SDS 20%	25,0 μ L
Água desionizada	3,6 mL
APS 10%	25,0 μ L
TEMED	5,0 μ L

Fonte: Autoria própria

3.2.4 Estudos de Afinidade através da ITC

Para os estudos de afinidade, inicialmente uma alíquota da cruzaína W.T. foi descongelada (1 mL) e submetida a três etapas de lavagem usando centrifugação (20 min. a 4500 rfc. Os 15 mL de tampão e a enzima foram colocados em uma membrana Amicon 10 de kDa. Cada uma das lavagens continha 15 mL de tampão NaOAc 100 mM, NaCl 300 mM e pH 5,5.⁷⁰ As duas primeiras frações foram coletadas e descartadas. A última fração foi coletada e armazenada para o preparo das soluções para o estudo de afinidade. Essa estratégia foi adotada para que tanto a solução da enzima, quanto a solução do inibidor fossem preparadas com o mesmo tampão. Isso é um procedimento indicado para que não sejam observados ruídos provenientes da disparidade entre as soluções da cela e da seringa.⁷¹ Esse procedimento foi repetido para cada nova alíquota de enzima utilizada. No final a concentração de enzima foi medida usando um *nanodrop* da DeNovix.

Após a lavagem da enzima, foi preparada uma solução de 2 mL contendo a enzima (concentração final de 20 μ M), tampão e DMSO 5%. Essa solução foi usada para o preenchimento da cela de amostra (1,427 mL). A cela foi preenchida usando uma seringa tipo “*gastight*” para evitar a formação de bolhas dentro da cela. A cela de referência foi preenchida com água desionizada e desgaseificada.⁷²

Antes do preparo da solução do inibidor, foi usado um simulador (realizado em Excel por Conceição Minetti/NEQUIMED/IQSC/USP-Universidade Rutgers, USA) das condições do experimento de afinidade para ter-se um ponto de partida.⁷³ Como cada inibidor apresenta valores diferentes de K_i , a concentração inicial do mesmo deve ser ajustada. Com a informação prévia obtida pelo simulador, então pôde-se preparar a solução que seria usada para o preenchimento da seringa do ITC. Foi preparado 1 mL da solução contendo inibidor (concentração variável para cada inibidor), tampão e DMSO a 5%. A solução passou por um processo de desgaseificação e termostatização (com agitação constante) por 5 minutos com o intuito de se eliminarem bolhas de ar da solução que provocam ruídos no sinal obtido pelo aparelho. Após essa etapa a seringa do ITC ($V_{seringa} = 284 \mu$ L) foi preenchida e depois purgada por três vezes. O experimento de determinação da afinidade usando ITC foi configurado de acordo com os parâmetros presentes na Tabela 3.5: Os estudos da influência do tampão e da temperatura na afinidade foram realizados seguindo os mesmos procedimentos acima.

Tabela 3.5. Parâmetros usados para a configuração do experimento de afinidade no ITC

Parâmetro	Valor
[Enz]	20 μ M
Nº de injeções	30
Volume de cada injeção	2 μ L (1º injeção) e 10 μ L as 29 restantes
Temperatura	298 K
Tempo de estabilização pós-injeção	300 s
[Inib]	175 μ M
Tempo pré-injeção	300 s

Fonte: Autoria própria

Foram realizados estudos de afinidade para 16 dipeptidil-nitrilas sintetizadas pelos alunos Cristian Camilo, Erika Meñaca e Leandro Avelar do NEQUIMED/IQSC/USP (Figura 3.1).²⁷⁻⁷⁴⁻⁷⁵ Todos os experimentos foram executados seguindo o procedimento determinado na seção 0 e foram realizados no mínimo em duplicata. Foram feitos também os experimentos para descontar os calores de diluição do tampão e dos ligantes.

De forma complementar, estudos em diferentes tampões (Acetato de Sódio, Citrato/Ácido Cítrico, BisTris e MES) para avaliar o efeito de protonação/desprotonação na interação entre Neq0409 e a cruzaina. Além do estudo em diferentes tampões, foi também realizado experimentos variando a temperatura (15, 20, 25, 30 e 37 °C) para determinar ΔC_p da interação do Neq0409 com a cruzaina.

Figura 3.1. Estrutura dos compostos estudados através da ITC

Fonte: Autoria própria

3.2.5 Estudos de Afinidade da C25A pelo Neq0569

O **Neq0569** foi estudado contra a cruzaina mutante C25A. Para esse estudo foi necessário promover alterações no procedimento calorimétrico. Usou-se uma concentração de proteína igual a 60 μ M e 500 μ M de inibidor. O restante dos parâmetros foi mantido. Os ensaios foram realizados em replicatas e experimentos independentes.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, o NEQUIMED/IQSC/USP produzia a cruzaína seguindo o procedimento desenvolvido pelo laboratório do Prof. Dr. Luis Giuliano. A cruzaína era expressa em corpos de inclusão e com baixo rendimento. Em 2013, com o retorno do aluno de doutorado Willian Fernandes, que realizou estágio sanduíche no Laboratório de Patologia da USFC, passou-se a produzir a cruzaína usando o método de *Autoindução Mínima*.

A *Autoindução Mínima* utiliza toda a maquinaria de regulação gênica naturalmente encontrada no organismo (no caso a *E. coli*). Nesse método, a lactose atua como o agente indutor, e tem como fontes de energia primária e secundária, respectivamente, a glicose e o glicerol. A glicose é completamente utilizada durante o crescimento bacteriano. Depois de atingido o término do estágio de crescimento bacteriano, a lactose disponível no meio passa a ser convertida em alolactose (um dissacarídeo análogo ao IPTG) que libera o repressor *lac*, e induz a expressão enzimática. Assim, a autoindução pode ser regulada pelo ajuste dos níveis de glicose/lactose (Figura 4.1).⁷⁶ A principal vantagem na utilização da Autoindução Mínima sobre a indução por IPTG, é a quantidade de proteína solúvel que é produzida. Na Autoindução a expressão da proteína heteróloga ocorre de maneira lenta e gradual, evitando assim a formação de corpos de inclusão.⁷⁷

Figura 4.1. Representação esquemática do método de Autoindução Mínima dentro da célula bacteriana⁷⁸

Fonte: FERNANDES, W. B., 2015, p. 175

4.1 Expressão e purificação da cruzaína W.T

A primeira etapa do processo de expressão consistiu na transformação da bactéria competente ArticExpress (DE3)RIL com o plasmídeo pET21a com o gene que codifica a enzima cruzaína com cauda de histidina (His₆-tag) na região N-terminal e pró-domínio (Figura 4.2) conforme descrito na seção 2.1.1.

Figura 4.2. Sequência de aminoácidos que serão codificados pelo gene para a produção da cruzaína. Os aminoácidos sublinhados são pertencentes a cauda de histidina na região N-terminal, os em cinza claro são do pró-domínio e os em preto são pertencentes a cruzaína madura

His ₆ + pró-domínio	Cruzaína
-112	<u>HH</u> <u>HHHHGS</u> CLVP
-100	AATASLHAE TLTSQFAEFK QKHGRVYESA AEEAFRLSVF RENLFLARLH
-50	AAANPHATFG VTPFSDLTRE EFRSRYHNGA AHFAAAQERA RVPVKVEVVG
1	APAAVDWRAR GAVTAVKDQG QCGSCWAFSA IGNVECQWFL AGHPLTNLSE
51	QMLVSCDKTD SGC SGGLMNN AFEWIVQENN GAVYTEDSYP YASGEGISPP
101	CTTSGHTVGA TITGHVELPQ DEAQIAAWLA VNGPVAVAVD ASSWMTYTGG
151	VMTSCVSEQL DHGVLLVGYN DSAAPYWI KNSWTTQWGE EGYIRIAGKS
201	NQCLVKEEAS SAVVG

Fonte: Adaptado de Lee, G.M., 2012. p. 10087

Após a transformação, plaqueamento e pré-inoculação, foi preparado 1 L de meio de autoindução para a expressão da enzima conforme o procedimento já descrito. Após 60 horas

foi coletado o pellet, de onde foram obtidos 12,33 gramas de célula (pellet). A proporção de tampão de lise para cada grama de pellet usada foi de 20 mL para 5 g. O volume total preparado foi de 50 mL. Foram coletadas frações nas etapas de lise, centrifugação e purificação em coluna de Ni-NTA para monitoramento em eletroforese em gel SDS-Page (Figura 4.2).

Figura 4.3. Gel para controle da expressão e purificação em coluna de Ni-NTA da cruzaina W.T

Fonte: Autoria própria

A cruzaina é um zimógeno que apresenta com um tamanho aproximado de 36 kDa (14 kDa do pró-domínio mais 22,7 kDa da enzima madura). Através do gel pode-se observar uma banda larga na região de 37 kDa nas trilhas de 4 a 7 que é referente ao zimógeno. As soluções das frações 0-4 foram coletadas, totalizando 25 mL, e o processo de ativação foi iniciado. Nessa etapa, a concentração enzima deve ser inferior a 0,5 mg mL⁻¹. No caso, a solução foi diluída em 8 vezes, totalizando um volume de 200 mL. Após a ativação (seção 2.1.1) outro gel foi preparado para observar o comportamento da cruzaina durante o processo de ativação. Alíquotas de diferentes estágios da ativação foram coletadas e preparadas para correr o gel (Figura 4.4).

Figura 4.4. Gel para acompanhamento da ativação da cruzaína W.T

Fonte: Autoria própria

Através do gel, observou-se que ao longo do processo de ativação a banda referente a cruzaína madura (22,7 kDa) foi ficando mais estreita e as trilhas começaram a ficar mais limpas. Infelizmente, o gel sofreu uma inclinação e a banda referente ao pró-domínio (14 kDa) não ficou evidente em todas as trilhas (apenas na trilha 2). Porém isso não afetou na conclusão de que a cruzaína madura estava presente na solução. Outra confirmação do processo de ativação, é que durante o processo, a solução, inicialmente branca e leitosa, vai clareando até ficar completamente incolor e transparente (Figura 4.5).

Figura 4.5. Ilustração da etapa de ativação da cruzaína (1 a 6) onde é observado o clareamento da solução. Fotos tiradas a (1) 0 min., (2) 10 min., (3) 30 min., (4) 60 min., (5) 90 min. e (6) 120 min.

Fonte: Autoria própria

Após a ativação e confirmação da atividade catalítica, a enzima foi concentrada com o uso de concentradores Amicon de 10 kDa e estocadas em tampão NaOAc 100 mM, 300 NaCl e pH 5,5. Nessa etapa, o volume da cruzaína foi reduzido e a concentração final foi de 79,23 µM. A enzima foi armazenada a -80 °C em alíquotas de 1,5 mL.

4.2 Expressão e purificação da cruzaína mutante C25S

A expressão da cruzaína mutante C25S foi realizada de acordo com o procedimento descrito na seção 3.2.1. Assim como na expressão da cruzaína W.T., foram obtidos em torno de 5 g de pellet que foram lisados seguindo os mesmos procedimentos aplicados para a W.T. Após a identificação da presença da proteína C25S, foi iniciada a etapa de trans-ativação. Como o volume total da C25S foi de 30 mL, usaram-se 3 mL da cruzaína (W.T.) ativa para que o pró-domínio pudesse ser clivado. Para o controle da ativação, foram coletadas frações periodicamente. Com elas, foi corrido um gel (Figura 4.6) e observou-se a banda referente a cruzaína C25S. Após a ativação, a proteína foi deixada O.N em membrana de diálise e no dia seguinte ela foi concentrada com o uso de concentrador Amicon de 10 kDa (176 µM) e estocada em alíquotas de 1 mL a -80 °C. O volume final foi de 7 mL.

Figura 4.6. Gel de ativação da proteína mutante C25S

Fonte: Autoria própria

4.3 Estudos de afinidade das dipeptidil-nitrilas sintetizadas pelo NEQUIMED/IQSC/USP

Após a purificação e estudos de atividade da cruzaína selvagem, foram iniciados os estudos de afinidade das dipeptidil-nitrilas sintetizadas pelo NEQUIMED/IQSC/USP.⁶⁹ A estratégia abordada pelo grupo na síntese das dipeptidil-nitrilas foi variar diferentes substituintes nas três posições (P1, P2 e P3) destacadas na Figura 4.7 e observar o comportamento dos mesmos quanto à interação com o alvo e correlacionar as modificações com a potência. No entanto, há a necessidade de obter mais informações além das providas pela variação da afinidade. Com esse problema em mãos, foi decidido estudá-los através da ITC para que então pudesse ser estabelecida a importante característica termodinâmica dos inibidores.⁷⁹ Através da ITC podemos determinar, diretamente, a estequiometria (n), entalpia de interação (ΔH) e afinidade (ΔG) de uma enzima por um ligante, e indiretamente podemos obter a entropia.

Figura 4.7. Estrutura da dipeptidil-nitrila com as regiões onde as modificações serão realizadas (P1 a P3) e o *warhead* (destacado em uma caixa vermelha)

Fonte: Autoria própria

Ao término do experimento, a isoterma obtida foi tratada usando o programa Origin7.0,⁸⁰ que executa a integração das áreas dos picos observados (Figura 4.8A), resultando em um gráfico do calor absorvido/gerado em função da estequiometria da interação (Figura 4.8B). A diferença entre os patamares é denominada ΔH e o ponto de inflexão provê a estequiometria da reação de interação entre a proteína e o ligante. A partir do ajuste não-linear (usando o algoritmo de Levenberg-Marquardt)⁸⁰ no modelo de sítio único (*one set of sites*), é

determinado o valor da constante de associação (K_a) e através dela, usando a Equação.1.2, o valor de ΔG é facilmente definido. Conhecendo os valores de ΔG e ΔH , aplica-se a Equação 1.3 para se obter o valor de ΔS . Com os parâmetros entálpicos (ΔH) e entrópicos ($T\Delta S$) podemos estabelecer a Assinatura Termodinâmica (TS) para as dipeptidil-nitrilas e com isso observar o balanço de cada um dos termos na construção da afinidade.

Figura 4.8. (A) Isotherma observada pelo experimento usando ITC para o Neq0409. (B) Gráfico obtido a partir a integração das áreas dos picos em A

Fonte: Autoria própria

4.3.1 Influência do tampão na afinidade da cruzaina pelas dipeptidil-nitrilas

Um ponto importante no estudo da afinidade de macromoléculas por ligantes é a influência do efeito de protonação/desprotonação atrelado ao tampão usado no sistema,⁸¹ pois quando presente, tal efeito pode distorcer os valores da entalpia. Para sua avaliação, faz-se necessário o estudo usando diferentes tampões.⁸¹

O pH ideal da cruzaina é 5,5.⁷⁰ Sabendo disso, foram escolhidos, de acordo com a faixa tamponante, quatro tampões para a determinação de sua influência na afinidade pelo Neq0409 (Tabela 4.1). Todos os experimentos foram realizados na presença de NaCl 300 mM, DMSO 5%, TCEP 0,5 mM e a 25 °C.

Tabela 4.1. Valores da entalpia de ionização para os tampões usados no estudo de determinação da influência da protonação/desprotonação na afinidade da cruzafina pelo Neq0409

Tampão	ΔH_{ion} (kcal mol ⁻¹) ⁸²	ΔH (kcal mol ⁻¹)
Acetato de Sódio	-0,0980	-11,48±0,13
Citrato/Ácido cítrico [†]	1,51 [†]	-16,50±1,13
BisTris	6,79	-17,10±1,17
MES	3,54	-16,30±0,18

[†]O tampão Citrato/ácido cítrico é poliprótico e no pH em estudo, dois prótons são liberados. A ΔH_{ion} para esse tampão foi corrigida pela soma das ΔH_{ion} referente a liberação dos dois prótons

⁸² GOLDBERG, R. N.; 2002, p. 231

Fonte: Autoria própria
Os valore descritos na tabela foram obtidos pela média dos experimentos realizados duplicatas, bem como o desvio padrão dos mesmos

Abaixo (Figura 4.9) encontra-se o gráfico de ΔH obtido experimentalmente em função de ΔH_{ion} onde é possível constatar, através a inclinação, que há a liberação de um próton da enzima para o tampão (inclinação = $-1,28 \pm 0,19$) e um valor de $\Delta H_{intrínseco}$ igual a $-11,66 \pm 0,34$ kcal mol⁻¹. Uma hipótese da origem desse próton, é que o resíduo His159 é o responsável por sua liberação. Foram calculados, usando o MarvinSketch e o LigPrep (add-on presente no Maestro), os estados de protonação dos 16 inibidores estudados e nenhum deles apresenta protonação em pH 5,5.

Figura 4.9. Gráfico da relação entre a variação da entalpia de ionização do tampão e da variação da entalpia observada por

$$\Delta H_{obs} = -1,28(0,16)\Delta H_{ion} - 11,66(0,34); R^2 = 0,970; N = 4$$

Fonte: Autoria própria

Tabela 4.2. Análise estatística do ajuste linear aplicado no gráfico da ΔH_{obs} versus ΔH_{ion}

Análise Estatística			
Parâmetro	Valor	Parâmetro	Valor
Número de pontos	4	R	0,985
Graus de liberdade	3	R ²	0,970
Residual da soma dos quadrados	14,881	R ² ajustado	0,955
Coefficiente de Pearson	-0,985	RMSE (SD)	2,727

Fonte: Autoria própria

O valor observado para ΔH do **Neq0409** em tampão Acetato (condição ideal da cruzafina) é igual a -11,48 kcal mol⁻¹ que se mostra muito próximo ao valor de ΔH quando não há influência da ionização proveniente do tampão (-11,66 kcal mol⁻¹). Essa informação ressalta que o fenômeno de interação entre a enzima e o ligante não sofre grandes influências que mascarem os valores dos parâmetros termodinâmicos.⁸³ Os resultados evidenciaram também que os tampões alteram as contribuições entálpicas e entrópicas (Figura 4.10). Porém, não se observou alterações significativas nos valores de ΔG , e consequentemente em K_d .

Figura 4.10. Assinatura termodinâmica do **Neq0409** quando estudado em diferentes tampões

Fonte: Autoria própria

Na Figura 4.11 são apresentadas as curvas obtidas. Em A temos a curva referente ao experimento em tampão NaOc e podemos observar que a intensidade dos picos ($\mu\text{cal s}^{-1}$) no

eixo Y no painel superior, é menor que as observadas quando usado outros tampões. Essa evidência é referente ao calor de ionização dos tampões.

Figura 4.11. Curvas representativas dos estudos de afinidade da cruzafina pelo **Neq0409** nos tampões (A) Acetato de sódio, (B) Citrato/Ácido cítrico, (C) BisTris e (D) MES

Fonte: Autoria própria

4.3.2 Influência da temperatura na afinidade da cruzaína pelas dipeptidil-nitrila e determinação ΔC_p

Os estudos em múltiplas temperaturas são usados para observar o comportamento das outras propriedades termodinâmicas do processo de interação entre a enzima e o ligante. Através da Figura 4.12 pode-se observar que há uma diminuição no valor da constante afinidade (losangos azuis) da cruzaína pelo Neq0409. Quando K_a é convertido a energia livre de Gibbs de interação (ΔG), observa-se que ela mantém-se constante (círculos vermelho).

Figura 4.12. Gráfico das variações de ΔG , ΔH , ΔS e K_a em função da temperatura. As linhas vermelhas representam o ajuste linear.

Fonte: Autoria própria

A Tabela 4.3 mostra todos os valores dos parâmetros termodinâmicos obtidos para as cinco temperaturas estudadas.

Tabela 4.3. Tabela com os parâmetros obtidos no estudo de influência da temperatura na afinidade

T (K)	ΔG (kcal mol⁻¹)	ΔH (kcal mol⁻¹)	$-T\Delta S$ (kcal mol⁻¹)	K_a (M⁻¹)
288,15	-8,70	-12,29	3,57	4,01e ⁶
	±	±	±	±
	0,04	0,11	0,08	2,47e ⁵
293,15	-8,62	-13,88	5,25	2,68e ⁶
	±	±	±	±
	0,02	1,39	1,37	8,49e ⁴
298,15	-8,64	-11,48	2,84	2,15e ⁶
	±	±	±	±
	0,05	0,13	0,08	2,81e ⁵
303,15	-8,61	-15,41	6,79	1,62e ⁶
	±	±	±	±
	0,02	0,24	0,26	4,95e ⁴
310,15	-8,62	-14,33	5,71	1,20e ⁶
	±	±	±	±
	0,09	1,30	1,40	1,56e ⁵

Fonte: Autoria própria

Os valores descritos na tabela foram obtidos pela média dos experimentos realizados duplicatas, bem como o desvio padrão dos mesmos

Para a obtenção do valor da variação da capacidade calorífica a pressão constante, é construído um gráfico de ΔH vs T , e com a aplicação de um ajuste linear encontra-se o valor da inclinação, que é igual a ΔC_p . Com os resultados obtidos, foi traçado o gráfico de ΔH vs T (Figura 4.13) e usando um ajuste linear determinou-se que o ΔC_p foi igual a $-0,156 \pm 0,0725$ kcal mol⁻¹ K⁻¹.

Figura 4.13. Gráfico da variação da entalpia *versus* temperatura. A partir do ajuste linear (linha vermelha) pode-se obter o valor de ΔC_p . Em verde está representado o intervalo de 95 % de confiança

Fonte: Autoria própria

Tabela 4.4. Parâmetros estatísticos do ajuste linear aplicado para a determinação de ΔC_p

Análise Estatística			
Parâmetro	Valor	Parâmetro	Valor
Número de pontos	5	R	0,779
Graus de liberdade	4	R ²	0,606
Residual da soma dos quadrados	62,31	R ² ajustado	0,475
Coefficiente de Pearson	0,779	RMSE (SD)	4,557

Fonte: Autoria própria

4.3.3 Parâmetros termodinâmicos das dipeptidil-nitrilas inibidoras da cruzaina

A Tabela 4.5 apresenta os valores dos parâmetros para as 16 dipeptidil-nitrilas estudadas. Todos os experimentos foram realizados à 25 °C e em tampão NaOAc 100 mM, NaCl 300 mM, DMSO 5%, TCEP 0,5 mM seguindo o procedimento descrito na seção 0.

Tabela 4.5. Parâmetros termodinâmicos das dipeptidil-nitrilas estudadas por ITC

ID	<i>n</i> mol	ΔG kcal mol ⁻¹	ΔH kcal mol ⁻¹	$-T\Delta S$ kcal mol ⁻¹	K_a M ⁻¹	K_d μM	K_i μM ^a
Neq0409	0,998	-8,64	-11,48	2,84	2,15e ⁶	0,465	0,453
	±	±	±	±	±	±	±
	0,0841	0,05	0,13	0,08	2,81e ⁵	0,030	0,032
Neq0413	1,01	-8,65	-11,98	3,03	3,65e ⁶	0,274	0,228
	±	±	±	±	±	±	±
	0,086	0,10	0,15	0,05	1,01e ⁶	0,026	0,012
Neq0414	0,800	-9,87	-15,31	5,44	1,72e ⁷	0,058	0,135
	±	±	±	±	±	±	±
	0,070	0,08	1,67	1,74	2,10e ⁶	0,010	0,008
Neq0415	0,927	-9,76	-16,79	7,02	1,45e ⁷	0,069	0,0710
	±	±	±	±	±	±	±
	0,009	0,08	1,09	1,18	2,05e ⁶	0,010	0,001
Neq0419	0,826	-9,07	-15,05	6,01	3,99e ⁶	0,251	0,227
	±	±	±	±	±	±	±
	0,052	0,19	0,73	0,92	1,82e ⁶	0,061	0,013
Neq0533	0,968	-9,20	-15,07	5,87	5,44e ⁶	0,184	0,068
	±	±	±	±	±	±	±
	0,071	0,11	0,15	0,22	9,69e ⁵	0,033	0,004
Neq0537	0,769	-8,72	-15,00	6,28	2,47e ⁶	0,410	1,368
	±	±	±	±	±	±	±
	0,038	0,06	0,05	0,01	2,45e ⁵	0,041	0,309
Neq0544	1,34	-8,50	-6,02	-2,48	1,71e ⁶	0,585	1,593
	±	±	±	±	±	±	±
	0,020	0,01	0,16	0,15	3,00e ⁴	0,010	0,800
Neq0551	1,33	-9,19	-9,038	-0,16	5,47e ⁶	0,181	0,192
	±	±	±	±	±	±	±
	0,030	0,02	0,21	0,22	1,60e ⁵	0,005	0,010
Neq0552	0,979	-8,78	-17,75	8,97	3,72e ⁶	0,368	0,389
	±	±	±	±	±	±	±
	0,086	0,07	0,22	0,15	4,19e ⁵	0,032	0,066

ID	<i>n</i> mol	ΔG kcal mol ⁻¹	ΔH kcal mol ⁻¹	$-T\Delta S$ kcal mol ⁻¹	K_a M ⁻¹	K_d μM	K_i μM ^a
Neq0554	0,919	-8,78	-12,77	3,99	2,73e ⁶	0,366	0,511
	±	±	±	±	±	±	±
	0,009	0,84	0,20	0,32	3,22e ⁵	0,044	0,063
Neq0568	0,983	-10,00	-11,30	1,30	2,15e ⁷	0,046	0,056
	±	±	±	±	±	±	±
	0,035	0,05	0,07	0,02	1,79e ⁶	0,004	0,003
Neq0569	1,03	-10,32	-13,82	3,50	3,70e ⁷	0,027	0,025
	±	±	±	±	±	±	±
	0,046	0,11	0,13	0,02	8,30e ⁶	0,004	0,001
Neq0570	0,966	-8,97	-10,88	1,91	3,78e ⁶	0,265	0,252
	±	±	±	±	±	±	±
	0,014	0,13	0,22	0,09	1,40e ⁶	0,037	0,019
Neq0575	0,801	-8,68	-13,67	4,99	2,30e ⁶	0,469	1,29
	±	±	±	±	±	±	±
	0,001	0,16	0,28	0,45	6,15e ⁵	0,125	0,24
Neq0577	0,800	-8,78	-15,02	6,24	2,72e ⁶	0,368	0,534
	±	±	±	±	±	±	±
	0,0520	0,01	0,21	0,21	5,00e ³	0,001	0,036

^a Valores publicados em AVELAR, L. A. A. 2015, p. e0003916

Fonte: Autoria própria.

Os valores descritos na tabela foram obtidos pela média dos experimentos realizados duplicatas, bem como o desvio padrão dos mesmos

Analisando de modo geral os resultados calorimétricos (Tabela 4.5), observou-se que os valores de *n* para todos os casos foram próximos de 1. O valor de ΔG é convertido em pK_d (valor escalonado da constante de dissociação através a aplicação do operador *p* ($-\log_{10}$) sobre o valor de K_d). Os valores de pK_d foram comparados com os valores de pK_i (Tabela 4.6)⁶⁹ e foi observado uma correlação linear entre os dois parâmetros de resposta biológica (Figura 4.14). Os pK_d mostraram-se maiores que pK_i . Esse efeito é explicado, experimentalmente, pelo fato de quando se determinam as constantes de inibição (K_i), mede-se cineticamente a interação entre o inibidor na presença de um substrato. Como se sabe, as enzimas tendem a ter maior afinidade pelo substrato do que pelo inibidor. Consequentemente, quando é realizada a cinética

de inibição enzimática observa-se, além da inibição ou não da enzima, um efeito de competição entre o inibidor e o substrato pelo sítio ativo da enzima. Tal efeito não é observado quando realizamos os ensaios calorimétricos, já que vemos apenas a interação entre o inibidor e a enzima, removendo o efeito de competição pelo sítio.

Tabela 4.6. Valores de pK_d e pK_i para as dipeptidil-nitirlas

ID	pK_d	pK_i^a	ID	pK_d	pK_i^a
Neq0409	6,33	6,34	Neq0551	6,74	6,72
	±	±		±	±
	0,03	0,03		0,01	0,02
Neq0413	6,56	6,64	Neq0552	6,43	6,41
	±	±		±	±
	0,04	0,02		0,04	0,07
Neq0414	7,24	6,87	Neq0554	6,44	6,29
	±	±		±	±
	0,07	0,03		0,05	0,05
Neq0415	7,16	7,15	Neq0568	7,33	7,25
	±	±		±	±
	0,06	0,01		0,04	0,02
Neq0419	6,60	6,64	Neq0569	7,57	7,60
	±	±		±	±
	0,11	0,02		0,07	0,02
Neq0533	6,74	7,17	Neq0570	6,58	6,60
	±	±		±	±
	0,08	0,03		0,06	0,03
Neq0537	6,39	5,86	Neq0575	6,36	5,89
	±	±		±	±
	0,04	0,10		0,13	0,08
Neq0544	6,23	5,80	Neq0577	6,43	6,27
	±	±		±	±
	0,01	0,02		0,01	0,03

^a Valores publicado em AVELAR, L. A. A., 2015, p. e0003916

Fonte: Autoria própria.

Os valores descritos na tabela foram obtidos pela média dos experimentos realizados duplicatas, bem como o desvio padrão dos mesmos

Na Figura 4.14 observa-se um *outlier*, no caso é o Neq0533. Provavelmente a diferença entre os valores de pK_d e pK_i seja proveniente de algum erro, ou na medida obtida pela ITC ou no experimento cinético.

Figura 4.14. Projeção gráfica dos valores de pK_i versus pK_d dos inibidores da cruzafina. A linha vermelha representa o ajuste linear e as linhas verdes representam o intervalo de 95% de confiança

$$pK_i = 1,20(0,137)pK_d - 1,49(0,927); R^2 = 0,845; N = 16$$

Fonte: Autoria própria

Tabela 4.7. Parâmetros estatísticos do ajuste linear da relação pK_i versus pK_d

Análise Estatística			
Parâmetro	Valor	Parâmetro	Valor
Número de pontos	16	R	0,919
Graus de liberdade	15	R ²	0,845
Residual da soma dos quadrados	0,640	R ² ajustado	0,834
Coefficiente de Pearson	0,919	RMSE (SD)	0,214

Fonte: Autoria própria

A TS apresentada na Figura 4.15 explicita que a energética da interação das dipeptidil-nitrilas é entalpicamente dirigida e que apenas em dois casos não houve pênalti entrópico (**Neq0551** e **Neq0544**). O **Neq0544** foi o composto que apresentou o menor valor entálpico da série e, interessantemente, foi o também de menor afinidade. No outro extremo, em relação a entalpia, temos o **Neq0552**. Neste composto, observou-se que há o maior pênalti entrópico. Além disso, nota-se que apenas quatro compostos (**Neq0568**, **Neq0570**, **Neq0551** e **Neq0544**) apresentaram diminuição na entalpia com relação ao **Neq0409**.

Figura 4.15. Assinatura termodinâmica das dipeptidil-nitrilas estudadas por ITC presentes neste trabalho

Fonte: Autoria própria

A análise termodinâmica permite contornar armadilhas potenciais, tais como as penalidades entrópicas que compensam as contribuições entálpicas. A curva compensação Entálpica-Entrópica (EEC) é uma ferramenta que facilita a pontuação de compostos com base na fatorização da energética da interação, em função de ΔH e ΔS .⁸⁴ Com a EEC tenta-se observar se há um balanço entre ambos.⁵² A Figura 4.16A mostra a relação entre $-T\Delta S$ e ΔH para as dipeptidil-nitrilas e observa-se um comportamento linear (com inclinação igual -1,01 e $R^2 = 0,965$), confirmando que a série se comporta em um regime de compensação entálpica-entrópica. Esse resultado possibilita a identificação das forças favoráveis e desfavoráveis que orientam a energia livre de Gibbs de interação auxiliando futuras hipóteses para otimização.

Figura 4.16. Gráfico de EEC ($\Delta H = -1,01 \pm 0,05(-T\Delta S) - 9,11 \pm 0,25$; $R^2 = 0,965$; $N = 16$) para as dipeptidil-nitrilas estudadas. A linha vermelha representa o ajuste linear e as linhas verdes representam o limite de confiança de 95%

Fonte: Autoria própria

Na Figura 4.17 temos o Plano Entalpia-Energia Livre de Gibbs (ΔH - ΔG). Com ele podemos dimensionar o impacto das modificações moleculares na entalpia (direita para a esquerda) e na energia livre de Gibbs de interação (cima para baixo). Dos análogos isoenergéticos ao **Neq0409** (isto é, **Neq0554**, **Neq0575**, **Neq0577**, **Neq0537** e **Neq0552**), destaca-se o caso extremo: **Neq0552**. A presença do anel indólico em P2 contribui

mínimamente para a melhoria da afinidade de inibidor apesar da alta entalpia observada. Os compostos **Neq0413** e **Neq0570** apresentam um melhoramento na afinidade mesmo mostrando uma entalpia semelhante ao **Neq0409**. Já o **Neq0551** exibe um perfil interessante, onde apresenta uma contribuição entálpica menor que o **Neq0409**, porém um ganho em afinidade de $-0,55 \text{ kcal mol}^{-1}$. Olhando o outro extremo (**Neq0544**), temos uma redução tanto em ΔG , quanto em ΔH . Nos quatro casos onde observa-se um aumento significativo em ΔG (**Neq0568**, **Neq0569**, **Neq0414** e **Neq0415**), temo que para o **Neq0568** a entalpia é relativamente próxima a apresentada pelo **Neq0409**, o que pode ser traduzido como a eficiência na contribuição entálpica para a composição da energética da afinidade. O mesmo pode ser aplicado para o **Neq0569**, composto com ΔG de interação mais negativo da série estudada. Para os **Neq0414** e **Neq0415**, temos que apesar de melhorarem significativamente a afinidade, a contribuição entálpica não é totalmente favorável. Como conclusão, podemos usar os **Neq0568** e **Neq0569** como ponto de partida para futuras otimizações estruturais.

Figura 4.17. Plano Entalpia-Energia Livre de Gibbs para as dipeptidil-nitrilas

Fonte: Autoria própria

Na Figura 4.18 é mostrada que não existe correlação entre a entalpia e propriedades físico-químicas como o coeficiente de partição octanol-água calculado (LogP) e a massa molecular (MW). Ao analisar a capacidade de realização de ligações de Hidrogênio, aceptadores (HBA) ou doadoras (HBD), também não foi possível estabelecer nenhuma correlação direta com o valor da entalpia de interação. Como exemplo, compostos com três aceptadores de ligação de Hidrogênio têm os dois pontos extremos de entalpia, no caso o **Neq0544** e **Neq0552** (-6,02 e -17,75 kcal mol⁻¹ respectivamente).

Figura 4.18. Correlação entre a entalpia de interação das dipeptidil-nitrilas com o número de aceptadores de ligação de Hidrogênio, Doadores de ligação de Hidrogênio, LogP e massa molecular. Os valores dos parâmetros foram calculados usando o programa Marvin Sketch da Chemaxon

Fonte: Autoria própria

4.3.4 Avaliação das substituições em P1, P2 e P3 sob a óptica da termodinâmica

Segundo Freire, a construção de um gráfico TOP (do inglês *Thermodynamic Optimization Plot*)⁵⁶ possibilita estudar a influência das modificações estruturais feitas em um composto buscando sua otimização frente as propriedades termodinâmicas da afinidade.

Para construir esse tipo de gráfico, inicialmente deve-se definir o composto de partida, no caso o **Neq0409**. O ponto $-T\Delta S, \Delta H$ é gerado com base nos valores dessas propriedades para o composto de partida (2,84, -11,48). Então, traçam-se duas retas (0, ΔH) e $(-T\Delta S, 0)$ e projeta-se um ponto (0, ΔG), que para o **Neq0409** seria (0, -8,64). Agora com os dois pontos, define-se uma reta com inclinação igual a -1. Após essas operações teremos um gráfico com 6 regiões (I a VI).⁵⁶ As regiões I e II, por definição, correspondem a compostos com contribuições entrópicas favoráveis e entálpicas desfavoráveis. Para I, o ganho entrópico é maior que a perda entálpica, assim os compostos nessa região apresentam um ganho em termos de afinidade, proveniente da entropia. A região III corresponde a compostos cujas alterações estruturais resultarem tanto em perdas entálpicas quanto em perdas entrópicas. Os compostos localizados em IV apresentam valores entálpicos muito favoráveis, porém existe a incapacidade de suprir a perda entrópica proporcionada pelas alterações. Já na região apontada como V, os compostos nela situados apresentam altos, e favoráveis, valores entálpicos e já possuem a capacidade de minimizar os efeitos provenientes das penalidades entrópicas. Por fim, a região VI é aquela “almejada” pelos químicos medicinais na etapa de otimização estrutural baseada nas propriedades termodinâmicas.⁸⁵

Figura 4.19. Gráfico de TOP para as dipeptidil-nitrilas inibidoras da cruzafina

Fonte: Autoria própria

De um modo geral, as 16 dipeptidil-nitrilas apresentadas nesta tese ocuparam duas regiões no gráfico TOP (Figura 4.19) a I e V. Foi observada distribuição da maioria dos compostos na região V, mostrando uma congruência com o perfil observado na TS e que as substituições promovidas favoreceram entalpicamente os compostos e minimizaram os efeitos negativos provenientes da entropia.⁸⁵ Com as duas análises gráficas, a hipótese de que os inibidores atuam de forma entalpicamente dirigida ganha sustentação, principalmente quando se observa que, apesar dos valores desfavoráveis da entropia, há uma manutenção e em alguns casos, uma diminuição na energia livre de Gibbs de interação (como são os casos dos **Neq0414** e **Neq0569**).

Para os inibidores **Neq0414** e **Neq0569**, apesar da penalidade entrópica (5,34 e 3,50 kcal mol⁻¹, respectivamente), houve um acréscimo, em relação ao **Neq0409**, de -1,23 e -1,68 kcal mol⁻¹ em ΔG . Esse fenômeno deu-se através inclusão do grupo t-butil-N-metil pirazol na posição P3 (para ambos) e na rigidificação da dipeptidil-nitrila ao adicionar o grupo ciclopropil em P1 (**Neq0569**). Possivelmente, o cliclopropil além de aumentar o caráter eletrofílico do carbono nitrílico,⁸⁶ promove uma rigidez conformacional maior que o di-hidrogênio

(**Neq0414**). Olhando agora para P2, o **Neq0414** contém o grupo fenila proveniente da fenilalanina, enquanto o **Neq0569** apresenta a isopropila oriunda da leucina. O sub-sítio S2 acomoda grupo hidrofóbicos, mas é uma região pouco exposta e pouco flexível. A inclusão de um grupo menos volumoso como a isopropila promove uma menor dessolvatação deste sub-sítio, proporcionando uma penalidade menor para a entropia envolvida no processo de dessolvatação.

Dos compostos estudados, nenhum dos casos foi observado a ocupação da região III, suscitando então que as alterações na estrutura do **Neq0409** sempre apresentaram, mesmo que mínimo, um incremento tanto em ΔH , quanto em ΔS . Nenhum deles foi projetado na região VI, com o composto mais próximo dessa região sendo o **Neq0568**, que ocupa a região I, mas tangente à linha que divide a região I da VI. Como já dito, a região I é interpretada como a região onde apenas contribuição entrópica é favorável em relação ao composto de referência. Comparando a contribuição entrópica do **Neq0409** com o **Neq0568**, ressalta-se uma diminuição na penalidade na ordem de $1,54 \text{ kcal mol}^{-1}$, ao mesmo tempo que observamos uma contribuição desfavorável em termos entálpicos ($0,18 \text{ kcal mol}^{-1}$). Essa pequena piora em termos entálpicos impediu a classificação do **Neq0568** na região VI, no entanto, ele ainda sim se mostra um bom exemplo de sucesso na otimização da afinidade, apresentando uma diferença relativa na energia livre de Gibbs de interação igual a $-1,36 \text{ kcal mol}^{-1}$ quando comparado ao composto prototípico **Neq0409**.

O **Neq0413** apresenta uma particularidade, sua projeção no gráfico TOP é quase que superponível ao **Neq0409**. No caso desse inibidor, houve apenas a alteração em P2, onde foi substituído o grupo fenila por um grupo *o*-cloro-fenila, gerando um acréscimo de $0,31 \text{ kcal mol}^{-1}$ em ΔG . Essa melhoria, provavelmente, se dá devido a uma ocupação mais eficaz em S2. Sabe-se que o Cl do *o*-clorofenil interage com o O amídico da Leu67 (doador de elétrons) através σ -hole formando uma "pinça molecular".⁸⁷⁻⁸⁸

4.3.4.1 Diferença relativa da energia livre de Gibbs, entalpia e entropia ($\Delta\Delta G$, $\Delta\Delta H$ e $-T\Delta\Delta S$) dos inibidores com relação ao Neq0409

A avaliação da diferença relativa da energética ($\Delta\Delta G$, $\Delta\Delta H$ $-T\Delta\Delta S$) das dipeptidil-nitrilas em relação ao **Neq0409** foi uma abordagem usada para a quantificação das alterações estruturais. A série estudada foi dividida em grupos com substituição única, dupla e tripla. Na Tabela 4.8 encontram-se os valores dos parâmetros, e os destacados em vermelho são aqueles que se mostraram desfavoráveis em relação ao **Neq0409**. Apenas o inibidor o **Neq0544** apresentou uma variação desfavorável em termos de $\Delta\Delta G$, dentre todos os testados.

Tabela 4.8. Valores da diferença relativa dos parâmetros termodinâmicos e respostas biológicas em relação ao Neq0409

ID	$\Delta\Delta G$ kcal mol ⁻¹	$\Delta\Delta H$ kcal mol ⁻¹	$-T\Delta\Delta S$ kcal mol ⁻¹	ΔpK_d
Neq0409*	-	-	-	-
Neq0413	-0,31	-0,50	0,19	0,23
Neq0414	-1,23	-3,83	2,50	0,90
Neq0415	-1,12	-5,31	4,18	0,83
Neq0419	-0,4	-3,57	3,17	0,27
Neq0533	-0,56	-3,59	3,03	0,41
Neq0537	-0,08	-3,52	3,44	0,06
Neq0544	0,14	5,46	-5,32	-0,10
Neq0551	-0,55	2,44	-3,00	0,41
Neq0552	-0,14	-6,27	6,13	0,10
Neq0554	-0,14	-1,29	1,15	0,10
Neq0568	-1,36	0,18	-1,54	1,00
Neq0569	-1,68	-2,34	0,66	1,24
Neq0570	-0,33	0,60	-0,93	0,25
Neq0575	-0,04	-2,19	2,15	0,03
Neq0577	-0,14	-3,54	3,40	0,10

*Os valores das propriedades do Neq0409 foram usados como referência

Fonte: Autoria própria.

Os valores descritos na tabela foram obtidos pela média dos experimentos realizados duplicatas, bem como o desvio padrão dos mesmos

A Figura 4.20 é uma representação de todos os substituintes incluídos em P1 (verde), P2 (azul) e P3 (roxo) que estão presentes nos 16 inibidores testados neste trabalho.

Figura 4.20. Diagrama com os substituintes em P1 (verde), P2 (azul) e P3 (roxo)

Fonte: Autoria própria

4.3.4.1.1 Inibidores com substituição única

A grande maioria dos compostos estudados apresentou substituição única (**Neq0413**, **Neq0414**, **Neq0419**, **Neq0533**, **Neq0537**, **Neq0551**, **Neq0552**, **Neq0570** e **Neq0575**) em qualquer uma das três posições em relação ao **Neq0409**. Apenas o **Neq0570** apresentou substituição em P1. Nele foi incluído o grupo ciclopropil (1B), e quando comparado com o **Neq0409**, mostrou um ganho na afinidade proveniente da entropia. Neste caso houve uma diminuição do pênalti entrópico.

Das substituições em P2 (**Neq0413**, **Neq0551** e **Neq0552**), o **Neq0413** mostrou aumento na afinidade em relação ao **Neq0409** ($\Delta\Delta G = -0,31 \text{ kcal mol}^{-1}$) essencialmente de origem entálpica ($\Delta\Delta H = -0,50 \text{ kcal mol}^{-1}$) e uma mínima penalidade entrópica ($-T\Delta\Delta S = 0,19 \text{ kcal mol}^{-1}$). Este resultado é consistente com interações tipo $\sigma\text{-hole}$ que o *o*-clorofenil (2B) é capaz de realizar. Interessantemente, para o **Neq0551** a substituição 2C (*p*-hidroxifenil) resultou em um aumento na afinidade ($\Delta\Delta G = -0,55 \text{ kcal mol}^{-1}$) totalmente devido a uma melhora significativa no caráter entrópico ($\Delta\Delta H = 2,44 \text{ kcal mol}^{-1}$; $-T\Delta\Delta S = -3,00 \text{ kcal mol}^{-1}$) alterando seu perfil termodinâmico. Este composto, assim como o **Neq0544**, apresentou tanto entalpia quanto entropia favoráveis na composição da energética da interação.

Já no **Neq0552**, a substituição 2D confere um aumento discreto na potência, bem como na afinidade da cruzaina ($\Delta\Delta G = -0,14 \text{ kcal mol}^{-1}$; $\Delta pK_d = 0,10$). A dissecação da energética

desse inibidor mostra uma contribuição entálpica que excede a de todos os análogos estudados ($\Delta\Delta H = -6,27 \text{ kcal mol}^{-1}$), mas é quase que completamente compensado por uma penalidade entrópica ($-T\Delta\Delta S = 6,13 \text{ kcal mol}^{-1}$), tornando-o um inibidor modesto. Usando a abordagem estrutural para compreender a grande entalpia de interação, observa-se que seja provavelmente uma consequência da formação de ligação de hidrogênio do N do grupo indol em P2 com Glu208, além da contribuição de interações de *van der Waals* com resíduos do S2 e átomos da cadeia lateral dos resíduos Leu67, Met68 e Ala138. Em contrapartida, a tentativa de associar a penalidade entrópica é mais complexa e restringe-se a questões de mobilidade e adoção de uma conformação desfavorável no complexo **cruzaína-Neq0552**.

Nos compostos onde as substituições acontecem em P3 destacam-se os compostos **Neq0414** e **Neq0419**. Ao substituir 3A por 3F em P3, foi obtido o **Neq0414**. O grupo 3F já se mostrou eficaz em outras cisteíno proteases.⁸⁷ Como esperado, o **Neq0414** apresentou uma diferença relativa na energia livre de interação igual a $-1,23 \text{ kcal mol}^{-1}$ que corresponde a um aumento significativo em pK_d (0,90). Um fato interessante sobre o **Neq0414** é que ele foi o composto com uma substituição simples que mostrou o melhor ganho em termos de energia livre de Gibbs de interação. Avaliando os impactos energéticos desta substituição, observou-se que houveram tanto um aumento da contribuição entálpica quanto da penalidade entrópica.

A possibilidade de formação de ligação de halogênio⁸⁹ com a cadeia principal da Thr59 levou à síntese do **Neq0419** que possui em P3 o *o*-bromopiridina (3D). No entanto, o aumento da afinidade foi modesto ($\Delta pK_d = 0,27$). A análise termodinâmica revelou que a diferença na significativa da entalpia ($\Delta\Delta H = -3,57 \text{ kcal mol}^{-1}$). O ganho de entalpia associada a substituição de 3A para 3D fornece evidências de que a formação da ligação de halogênio ocorre no complexo **cruzaína-Neq0419**. No entanto, o ganho entálpico foi compensada por uma entropia desfavorável quase equivalente ($-T\Delta\Delta S = 3,17 \text{ kcal mol}^{-1}$).

Os **Neq0537** e **Neq0575**, que tem como substituintes o 3C e 3B respectivamente, apresentaram um ganho desprezível em suas afinidades, isso devido equivalência dos termos entálpicos e entrópicos.

4.3.4.1.2 Inibidores com substituição dupla

Dois inibidores apresentaram substituição em P1 e P3 (**Neq0533** e **Neq0577**). Para o **Neq0533** houve uma discrepância significativa nos valores de pK_i e pK_d (conforme discutido na seção 0) e por consequência, estudos mais aprofundados da energética foram descartados.

O composto **Neq0577** apresenta 1B em P1 e 3B em P3, porém as alterações não promoveram um grande aumento na afinidade em relação ao **Neq0409**. Traçando a seguinte linhagem: **Neq0409**→**Neq0575**→**Neq0577**, onde o **Neq0575** apresenta uma mudança de 3ª por 3B em P3 em relação ao **Neq0409**, observou-se que o **Neq0577** se liga a cruzaína com uma maior contribuição entálpica em relação aos seus compostos parentais **Neq0409** ($\Delta\Delta H = -3,54$ kcal mol⁻¹) e **Neq0575** ($\Delta\Delta H = -1,35$ kcal mol⁻¹), que é compensado por um pênalti entrópico significativo ($-T\Delta\Delta S = 3,40$ e $1,25$ kcal mol⁻¹, respectivamente). Como consequência, **Neq0577** exibiu um ganho relativo de $0,10$ kcal mol⁻¹ na energia livre de interação, quando comparado com o **Neq0575** e um ganho líquido com as duas alterações igual $-0,14$ kcal mol⁻¹. Essa evolução estrutural destacada possibilitou ressaltar novamente a importância do grupo ciclopropila (1B) em P1.

O **Neq0544** apresenta duas substituições em relação ao **Neq0409**. Em P2 contém o *o*-clorofenil (2B) e em P3, o *tert*-butil (3G). Ele é o único que possui esse substituinte e P3 e um dos únicos a apresentar uma contribuição entrópica.

Para o **Neq0554** faz-se necessário uma discussão mais aprofundada. Sabendo que a substituição 2B (já discutido para o **Neq0413**) e substituição 3F (discutido para o **Neq0414**) são favoráveis, o NEQUIMED/IQSC/USP incluiu o grupo 3E (Figura 4.20). Então com essas substituições surgiu o **Neq0554**. Quando comparado o efeito da substituição dupla com o **Neq0409** (Figura 4.21), observa-se uma pequena melhora na afinidade ($\Delta\Delta G = -0,14$ kcal mol⁻¹), e embora haja um acréscimo na entalpia, há a compensação através do aumento do pênalti entrópico. Porém, quando a comparação dos valores das energias é feita usando como referência o **Neq0415** (par **Neq0554-Neq0415** na Figura 4.21) há uma diminuição significativa na afinidade ($\Delta pK_d = -0,73$). Observou-se que com a substituição do *tert*-butil pelo CF_3 houve a diminuição na penalidade entrópica ($-T\Delta\Delta S = -3,03$ kcal mol⁻¹), porém a substituição causou uma grande perda entálpica ($\Delta\Delta H = 4,02$ kcal mol⁻¹).

A diferença pode ser atribuída a uma mudança na eletronegatividade do anel heterocíclico que reduz a capacidade de ligação de hidrogênio do N devido a um efeito retirador de elétrons.⁹⁰ Além do efeito observado no anel heterocíclico, o flúor, ao contrário de outros halogênios, não participa de interação do tipo σ -hole e suas interações são repulsivas na natureza, especialmente para CF₃.⁸⁹⁻⁹¹ As substituições mostraram uma conservação na variação da energia. Um exercício perspectivo leva a sugerir que um composto com os seguintes substituintes 1B, 2B e 3E apresente um valor de afinidade melhor que os análogos **Neq0414** e **Neq0415**.

O caso do **Neq0415** mostrou uma particularidade. Embora fora observado um grande aumento na afinidade com relação do **Neq0409** ($\Delta pK_d = 0,83$), era esperado que houvesse um efeito aditivo quando se incluiu os substituintes 2B e 3F, porém quando comparado com o **Neq0414**, o **Neq0415** apresentou uma pequena diminuição na afinidade ($\Delta pK_d = -0,07$).

Ainda com relação as substituições em P2 e P3, temos o **Neq0568**. Ele foi sintetizado com os substituintes 2E e 3F e apresentou um aumento de 1,00 unidade de $\log$ em pK_d com relação ao composto prototípico **Neq0409**. Esse aumento elevado é traduzido energeticamente em afinidade de interação elevada ($\Delta\Delta G = -1,36 \text{ kcal mol}^{-1}$) e entropicamente dirigida ($\Delta\Delta H = 0,18$; $-T\Delta\Delta S = -1,54 \text{ kcal mol}^{-1}$). Estes resultados sustentam a hipótese de que 2E apresenta uma melhor acomodação em S2 e menos contatos desfavoráveis dentro do sub-sítio, resultando em uma diminuição da penalidade entrópica.

Figura 4.21. Ciclo termodinâmico usado para ilustrar o efeito das substituições em P1 e P2

Fonte: Autoria própria

4.3.4.1.3 Inibidores com substituição tripla

Dos 16 compostos estudados, apenas o **Neq0569** continha três substituições. Ele tem 1B, 2E e 3F em P1, P2 e P3 e mostrou a maior constante de afinidade de toda a série. A Figura 4.22 mostra o ciclo termodinâmico que fornece uma melhor visualização das modificações gradativas no **Neq0409**, originando o **Neq0569**. Pode-se, através do ciclo, observar que a variação das energias da interação é conservada ao passo que são realizadas as substituições nas regiões de P1 à P3. Interessantemente, todas as substituições realizadas para a obtenção do

Neq0569 foram positivas em termos da energia livre de Gibbs de interação. A inclusão do 2E, como discutido logo acima, proporcionou em um aumento da contribuição entrópica e por fim, quando inserido 1B, já era esperado o melhoramento da afinidade, que de fato foi observado.

Figura 4.22. Ciclo termodinâmico das substituições em P1, P2 e P3

Fonte: Autoria própria

4.3.5 Estudo da afinidade da cruzaina mutante pelo Neq0569

Inicialmente, foi realizada a expressão da cruzaina mutante C25S no presente projeto. No entanto, após uma série de discussões, foi estabelecida a hipótese que o átomo de O do

resíduo da Ser25 pudesse provocar um deslocamento do carbono da nitrila. Com isso, o aluno de doutorado Jean Francisco Rosa Ribeiro estabeleceu o procedimento de expressão de uma outra forma mutante da cruzaina: a C25A. Onde a cisteína catalítica é substituída por uma alanina, assim o provável efeito estereoquímico provocado pelo átomo de O é evitado.

Para os estudos de afinidade com a proteína mutante, foi levado em consideração que o valor de K_d experimental teria um aumento drástico em sua magnitude (saindo de uma escala sub-nanomolar para baixo micromolar). Feita tal consideração, o experimento foi planejado de acordo com a descrição na seção 3.2.5, e o ligante estudado foi o **Neq0569**, por ser o composto com menor valor de K_d (27 nM ou $pK_d = 7,57$).

Infelizmente o experimento mostrou problemas devido à redução pronunciada do valor da afinidade, tornando a reprodutibilidade complexa. Abaixo segue o resultado obtido.

Figura 4.23. Gráficos dos experimentos de afinidade da C25A pelo Neq0569

Fonte: Autoria própria

A Tabela 4.9 mostra os valores dos parâmetros termodinâmicos da interação entre a C25A e o **Neq0569**. Podemos observar um enorme erro para os valores de K_a e K_d . No entanto, foi possível apontar a existência de interação (Figura 4.23).

Tabela 4.9. Valores dos parâmetros obtidos pela ITC para a interação entre a cruzaina C25A e o Neq0569

ID	<i>n</i> mol	ΔG kcal mol ⁻¹	ΔH kcal mol ⁻¹	$-T\Delta S$ kcal mol ⁻¹	K_a M ⁻¹	K_d μM
Neq0569	1,12	-7,50	-1,03	6,47	4,64e ⁵	4,75
	±	±	±	±	±	±
	0,17	0,56	0,16	0,42	3,43e ⁵	3,51

Fonte: Autoria própria
Os valore descritos na tabela foram obtidos pela média dos experimentos realizados duplicatas, bem como o desvio padrão dos mesmos

De forma qualitativa, os resultados acima mostram uma redução de 176 vezes na afinidade da C25A pelo Neq0569. Tal resultado explicita a importância da ligação covalente reversível. Outro ponto que chama a atenção é a inversão na energética da interação, passando de entalpicamente dirigida para entropicamente dirigida (Figura 4.24).

Figura 4.24. Assinatura Termodinâmica do complexo Neq0569-W.T. e Neq0569-C25A

Fonte: Autoria própria

5 PERSPECTIVAS

Com base nesses resultados, novos inibidores da cruzaina serão propostos e sintetizados e testados com o objetivo de validar a hipótese de que a assinatura termodinâmica pode ser empregada prospectivamente na gênese planejada de fármacos.

A busca por substituições que promovam a diminuição da penalidade entrópica será priorizada. Otimizações na efetividade da contribuição entálpica deverá ser levada em consideração. Os estudos da interação da proteína mutante com as nitrilas foram iniciados, porém há a necessidade de otimizar o procedimento experimental para a redução do erro nos valores de K_a e, conseqüentemente, K_d .

O programa AFFINImeter recentemente apresentou a implementação do tratamento cinético das curvas de titulação isotérmica da interação (KinITC).⁹² Uma abordagem diferente da usual, onde os picos são tratados individualmente fornecendo dois parâmetros extremamente valiosos: k_{on} e k_{off} . A razão de k_{off} sobre k_{on} é igual ao K_d . Com essa descrição cinética é possível determinar o tempo de residência do inibidor no sítio ativo da enzima, e assim modular, não apenas a afinidade da enzima pelo inibidor, bem como quanto tempo a enzima permanece inibida. As dipeptidil-nitrilas estudadas nesta tese foram avaliadas através do AFFINImeter, porém é necessária uma validação ortogonal (SPR por exemplo) para que os resultados possam ser credenciados ou descartados.

6 CONCLUSÕES

A Doença de Chagas, mesmo transcorrido mais de 100 anos de sua descrição completa por Carlos Chagas, ainda não possui um tratamento adequado e eficaz. Na última década diversos grupos de pesquisa têm se dedicado ao descobrimento de compostos com características antichagásicas em potencial. Atualmente, a Iniciativa para Medicamentos de Doenças Negligenciadas (DNDi) mostra uma preocupação para o desenvolvimento de novos medicamentos para a Doença de Chagas e também o desenvolvimento de formulações de uso pediátrico, afinal, cerca de 5 % das crianças infectadas morrem na fase aguda da doença. Além da busca por novos compostos com propriedade tripanossomicida, existe ainda a estratégia de reposicionamento de fármacos que tem hoje como seu composto mais avançado o Fexinidazol.

Inicialmente, as maiores dificuldades encontradas para estudos de ITC a limitação da técnica frente ao intervalo de afinidade dos inibidores e a forma de obtenção da enzima. Usando procedimentos de expressão em meio de autoindução mínima, foi obtida a enzima cruzaina selvagem e a proteína mutante em quantidade suficiente para que fossem iniciados os estudos de afinidade através da ITC. Com a aplicação da síntese orgânica medicinal, foi sintetizada uma série de inibidores da classe dipeptidil-nitrilas com intervalo de inibição de subnanomolar a alto micromolar.

O uso da ITC para estudos de afinidade mostrou-se totalmente eficaz e 16 dipeptidil-nitrilas foram avaliadas. Este estudo explorou o papel da energética da interação como uma ferramenta de diagnóstico para delinear os diferenciais na assinatura termodinâmico, e assim quantificar a afinidade dos inibidores da cruzaina em função das contribuições entálpicas e entrópica através de modificações graduais no composto prototípico **Neq0409**.

Foi possível determinar, pela primeira vez, o perfil termodinâmico para inibidores covalente reversíveis da cruzaina. Após os estudos de afinidade por meio da ITC, observou-se que as dipeptidil-nitrilas apresentam uma característica entálpicamente dirigida, o que era esperado devido à possibilidade da formação de uma ligação covalente entre a Cys25 da cruzaina com o grupo nitrila do ligante. A série mostrou um comportamento de compensação entálpica-entrópica e correlação entre a afinidade (pK_d) e potência (pK_i).

Estudos de pares para avaliação da variação relativa da afinidade ($\Delta\Delta G$) possibilitou concluir que os melhores substituintes para os grupos em P1, P2 e P3 foram ciclopropila, isopropila e terc-butil-N-metil-pirazol.

Quando estudado contra a proteína C25A, o Neq0569 mostrou uma redução de 176 vezes no valor da contate de afinidade, e apresentou uma inversão na energética de interação passando entropicamente dirigida.

Por fim, mais importante que a determinação do ponto de vista termodinâmico dos melhores substituintes das três posições das dipeptidil-nitrilas, foi o desenvolvimento de um procedimento confiável e robusto que pode ser transposto para outras cisteíno proteases, a possibilidade de uma caracterização complementar dos processos de interação bimolecular e validação ortogonal dos estudos cinéticos realizados no NEQUIMED/IQSC/USP.

REFERÊNCIAS

1. RASSI JUNIOR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, 2010.
2. CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159-218, 1909.
3. COURA, J. R.; VÍAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 465, n. 7301 SUPPL., p. S6-S7, 2010.
4. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em 16 set. 2016.
5. LESCURE, F.-X.; LE LOUP, G.; FREILIJ, H.; DEVELOUX, M.; PARIS, L.; BRUTUS, L.; PIALOUX, G. Chagas disease: changes in knowledge and management. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 10, n. 8, p. 556-570, 2010.
6. COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 6, p. 641-645, 2011.
7. LANA, M.; TAFURI, W. L. *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. (Ed.). **Parasitologia Humana**. 11 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2005. 11, p.95-108.
8. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates**. 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/wer/2015/wer9006.pdf>>. Acesso em 16 set. 2016.

9. BERN, C. Chagas disease. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 5, p. 456-466, 2015.
10. PATTERSON, S.; WYLLIE, S. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 6, p. 289-298, 2014.
11. 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.
12. EKINS, S.; WILLIAMS, A. J.; KRASOWSKI, M. D.; FREUNDLICH, J. S. *In silico* repositioning of approved drugs for rare and neglected diseases. **Drug Discovery Today**, v. 16, n. 7-8, p. 298-310, 2011.
13. COURA, J. R. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy - a proposal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 4, p. 549-554, 2009.
14. BAHIA, M. T.; ANDRADE, I. M. D.; MARTINS, T. A. F.; NASCIMENTO, Á. F. D. S. D.; DINIZ, L. D. F.; CALDAS, I. S.; TALVANI, A.; TRUNZ, B. B.; TORREELE, E.; RIBEIRO, I. Fexinidazole: a potential new drug candidate for Chagas disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 11, p. 1870-1879, 2012.
15. PROKOPCZYK, I. M.; RIBEIRO, J. F.; SARTORI, G. R.; SESTI-COSTA, R.; SILVA, J. S.; FREITAS, R. F.; LEITÃO, A.; MONTANARI, C. A. Integration of methods in cheminformatics and biocalorimetry for the design of trypanosomatid enzyme inhibitors. **Future Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 1, p. 17-33, 2014.
16. FREITAS, R. F.; PROKOPCZYK, I. M.; ZOTTIS, A.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D.; TREVISAN, M. T. S.; VILEGAS, W.; SILVA, M. G. V.; MONTANARI, C. A. Discovery of novel *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 6, p. 2476-2482, 2009.
17. CHELESKI, J.; FREITAS, R. F.; WIGGERS, H. J.; ROCHA, J. R.; DE ARAÚJO, A. P. U.; MONTANARI, C. A. Expression, purification and kinetic characterization of His-tagged glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. **Protein Expression and Purification**, v. 76, n. 2, p. 190-196, 2011.

18. SOARES, F. A.; SESTI-COSTA, R.; DA SILVA, J. S.; DE SOUZA, M. C. B. V.; FERREIRA, V. F.; DA C. SANTOS, F.; MONTEIRO, P. A. U.; LEITÃO, A.; MONTANARI, C. A. Molecular design, synthesis and biological evaluation of 1,4-dihydro-4-oxoquinoline ribonucleosides as TcGAPDH inhibitors with trypanocidal activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 16, p. 4597-4601, 2013.
19. WIGGERS, H. J.; CHELESKI, J.; ZOTTIS, A.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D.; MONTANARI, C. A. Effects of organic solvents on the enzyme activity of *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in calorimetric assays. **Analytical Biochemistry**, v. 370, n. 1, p. 107-114, 2007.
20. WIGGERS, H. J.; ROCHA, J. R.; CHELESKI, J.; MONTANARI, C. A. Integration of ligand- and target-based virtual screening for the discovery of cruzain inhibitors. **Molecular Informatics**, v. 30, n. 6-7, p. 565-578, 2011.
21. CHELESKI, J.; ROCHA, J. R.; PINHEIRO, M. P.; WIGGERS, H. J.; DA SILVA, A. B. F.; NONATO, M. C.; MONTANARI, C. A. Novel insights for dihydroorotate dehydrogenase class 1A inhibitors discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 5899-5909, 2010.
22. WIGGERS, H. J.; ROCHA, J. R.; FERNANDES, W. B.; SESTI-COSTA, R.; CARNEIRO, Z. A.; CHELESKI, J.; DA SILVA, A. B. F.; JULIANO, L.; CEZARI, M. H. S.; SILVA, J. S.; MCKERROW, J. H.; MONTANARI, C. A. Non-peptidic cruzain inhibitors with trypanocidal activity discovered by virtual screening and *in vitro* assay. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 8, p. 2370-2381, 2013.
23. CAZZULO, J. J. Cruzipain. In: SALVESEN, N. D. R. (Ed.). **Handbook of proteolytic enzymes**. 3rd ed. London: Academic Press, 2013. v.2, 438, p.1913-1918.
24. CASTRO, H. C.; ABREU, P. A.; GERALDO, R. B.; MARTINS, R. C. A.; DOS SANTOS, R.; LOUREIRO, N. I. V.; CABRAL, L. M.; RODRIGUES, C. R. Looking at the proteases from a simple perspective. **Journal of Molecular Recognition**, v. 24, n. 2, p. 165-181, 2011.
25. EAKIN, A. E.; MILLS, A. A.; HARTH, G.; MCKERROW, J. H.; CRAIK, C. S. The sequence, organization, and expression of the major cysteine protease (cruzain) from *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 11, p. 7411-7420, 1992.

26. MCGRATH, M. E.; EAKIN, A. E.; ENGEL, J. C.; MCKERROW, J. H.; CRAIK, C. S.; FLETTERICK, R. J. The crystal structure of cruzain - a therapeutic target for Chagas disease. **Journal of Molecular Biology**, v. 247, n. 2, p. 251-259, 1995.
27. AVELAR, LEANDRO ANTONIO ALVES. **Síntese de inibidores das enzimas cruzaina e diidroorotato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi***. 211 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica e Biológica)- Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75133/tde-21112014-155848/>>. Acesso em 16 mar. 2016.
28. SCHECHTE, I.; BERGER, A. On size of active site in proteases. I. papain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 27, n. 2, p. 157-162, 1967.
29. OTTO, H.-H.; SCHIRMEISTER, T. Cysteine proteases and their inhibitors. **Chemical reviews**, v. 97, n. 1, p. 133-172, 1997.
30. STEVERDING, D.; CAFFREY, C. R.; SAJID, M. Cysteine proteinase inhibitors as therapy for parasitic diseases: advances in inhibitor design. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 9, p. 1025-1032, 2006.
31. PALMER, J. T.; RASNICK, D.; KLAUS, J. L.; BROMME, D. Vinyl sulfones as mechanism-based cysteine protease inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 38, n. 17, p. 3193-3196, 1995.
32. 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.
33. CHOE, Y.; BRINEN, L. S.; PRICE, M. S.; ENGEL, J. C.; LANGE, M.; GRISOSTOMI, C.; WESTON, S. G.; PALLAI, P. V.; CHENG, H.; HARDY, L. W.; HARTSOUGH, D. S.; MCMAKIN, M.; TILTON, R. F.; BALDINO, C. M.; CRAIK, C. S. Development of α -keto-based inhibitors of cruzain, a cysteine protease implicated in Chagas disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 6, p. 2141-2156, 2005.

34. LÖSER, R.; SCHILLING, K.; DIMMIG, E.; GÜTSCHOW, M. Interaction of papain-like cysteine proteases with dipeptide-derived nitriles. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 24, p. 7688-7707, 2005.
35. GUAY, D.; BEAULIEU, C.; JAGADEESWAR REDDY, T.; ZAMBONI, R.; METHOT, N.; RUBIN, J.; ETHIER, D.; DAVID PERCIVAL, M. Design and synthesis of dipeptidyl nitriles as potent, selective, and reversible inhibitors of cathepsin C. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 18, p. 5392-5396, 2009.
36. HANZLIK, R. P.; ZYGMUNT, J.; MOON, J. B. Reversible covalent binding of peptide nitriles to papain. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1035, n. 1, p. 62-70, 1990.
37. FRIZLER, M.; STIRNBERG, M.; SISAY, M. T.; GUTSCHOW, M. Development of nitrile-based peptidic inhibitors of cysteine cathepsins. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 294-322, 2010.
38. GAUTHIER, J. Y.; CHAURET, N.; CROMLISH, W.; DESMARAIS, S.; DUONG, L. T.; FALGUEYRET, J.-P.; KIMMEL, D. B.; LAMONTAGNE, S.; LÉGER, S.; LERICHE, T.; LI, C. S.; MASSÉ, F.; MCKAY, D. J.; NICOLL-GRIFFITH, D. A.; OBALLA, R. M.; PALMER, J. T.; PERCIVAL, M. D.; RIENDEAU, D.; ROBICHAUD, J.; RODAN, G. A.; RODAN, S. B.; SETO, C.; THÉRIEN, M.; TRUONG, V.-L.; VENUTI, M. C.; WESOLOWSKI, G.; YOUNG, R. N.; ZAMBONI, R.; BLACK, W. C. The discovery of odanacatib (MK-0822), a selective inhibitor of cathepsin K. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 3, p. 923-928, 2008.
39. BEAULIEU, C.; ISABEL, E.; FORTIER, A.; MASSÉ, F.; MELLON, C.; MÉTHOT, N.; NDAO, M.; NICOLL-GRIFFITH, D.; LEE, D.; PARK, H.; BLACK, W. C. Identification of potent and reversible cruzipain inhibitors for the treatment of Chagas disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 24, p. 7444-7449, 2010.
40. FREYER, M. W.; LEWIS, E. A. Isothermal titration calorimetry: experimental design, data analysis, and probing macromolecule/ligand binding and kinetic interactions. **Methods in cell biology**, v. 84, p. 79-113, 2008.
41. WARD, W. H. J.; HOLDGATE, G. A. Isothermal titration calorimetry in drug discovery. In: KING, F. D.; OXFORD, A. W. (Ed.). **Progress in Medicinal Chemistry**. Amsterdam: Elsevier, 2001. v.38, 7, p. 309-376.

42. OLSSON, T. S. G.; WILLIAMS, M. A.; PITT, W. R.; LADBURY, J. E. The thermodynamics of protein–ligand interaction and solvation: insights for ligand design. **Journal of Molecular Biology**, v. 384, n. 4, p. 1002-1017, 2008.
43. LADBURY, J. E.; KLEBE, G.; FREIRE, E. Adding calorimetric data to decision making in lead discovery: a hot tip. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 1, p. 23-27, 2010.
44. BEAUDETTE, N. V.; LANGERMAN, N. An improved method for obtaining thermal titration curves using micromolar quantities of protein. **Analytical Biochemistry**, v. 90, n. 2, p. 693-704, 1978.
45. SCHÖN, A.; LAM, S. Y.; FREIRE, E. Thermodynamics-based drug design: strategies for inhibiting protein-protein interactions. **Future Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 9, p. 1129-1137, 2011.
46. THOMSON, J. A.; LADBURY, J. E. Isothermal titration calorimetry: a tutorial. In: LADBURY, J. E.; DOYLE, M. L. (Ed.). **Biocalorimetry 2**. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2004. 2, p.35-57.
47. PRIVALOV, P. L.; DRAGAN, A. I. Microcalorimetry of biological macromolecules. **Biophysical Chemistry**, v. 126, n. 1–3, p. 16-24, 2007.
48. TURNBULL, W. B.; DARANAS, A. H. On the value of c: can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry? **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 48, p. 14859-14866, 2003.
49. MINETTI, C. A. S. A.; PRIVALOV, P. L.; REMETA, D. P. Calorimetric methods to characterize the forces driving macromolecular association and folding processes. In: RUSO, J. M.; PINEIRO, A. (Ed.). **Proteins in Solution and at Interfaces**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2013. p.139-177.
50. PETHICA, B. A. Misuse of thermodynamics in the interpretation of isothermal titration calorimetry data for ligand binding to proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 472, p. 21-29, 2015.

51. KUHNERT, M.; DIEDERICH, W. E. Structure-based drug design in medicinal chemistry: the devil is in the detail. **Synlett**, v. 27, n. 05, p. 641-649, 2016.
52. KLEBE, G. Applying thermodynamic profiling in lead finding and optimization. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 95-110, 2015.
53. FREIRE, E. Do enthalpy and entropy distinguish first in class from best in class? **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19-20, p. 869-874, 2008.
54. NEEB, M.; BETZ, M.; HEINE, A.; BARANDUN, L. J.; HOHN, C.; DIEDERICH, F.; KLEBE, G. Beyond affinity: enthalpy–entropy factorization unravels complexity of a flat structure–activity relationship for inhibition of a tRNA-modifying enzyme. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 13, p. 5566-5578, 2014.
55. RUBEN, A. J.; KISO, Y.; FREIRE, E. Overcoming roadblocks in lead optimization: a thermodynamic perspective. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 67, n. 1, p. 2-4, 2006.
56. FREIRE, E. A thermodynamic approach to the affinity optimization of drug candidates. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 74, n. 5, p. 468-472, 2009.
57. PERSCH, E.; DUMELE, O.; DIEDERICH, F. Molecular recognition in chemical and biological systems. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 54, n. 11, p. 3290-3327, 2015.
58. FREIRE, E. Isothermal titration calorimetry: controlling binding forces in lead optimization. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 1, n. 3, p. 295-299, 2004.
59. CHODERA, J. D.; MOBLEY, D. L. Entropy-enthalpy compensation: role and ramifications in biomolecular ligand recognition and design. **Annual Review of Biophysics**, v. 42, p. 121-142, 2013.

60. RÜHMANN, E.; BETZ, M.; FRICKE, M.; HEINE, A.; SCHÄFER, M.; KLEBE, G. Thermodynamic signatures of fragment binding: validation of direct *versus* displacement ITC titrations. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1850, n. 4, p. 647-656, 2015.
61. O'BRIEN, R.; HAQ, I. Applications of biocalorimetry: binding, stability and enzyme kinetics. In: LADBURY, J. E.; DOYLE, M. L. (Ed.). **Biocalorimetry 2**. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2004. 1, p.3-31.
62. OHTAKA, H.; FREIRE, E. Adaptive inhibitors of the HIV-1 protease. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 88, n. 2, p. 193-208, 2005.
63. VELAZQUEZ-CAMPOY, A.; KISO, Y.; FREIRE, E. The binding energetics of first- and second-generation HIV-1 protease inhibitors: implications for drug design. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 390, n. 2, p. 169-175, 2001.
64. OHTAKA, H.; MUZAMMIL, S.; SCHÖN, A.; VELAZQUEZ-CAMPOY, A.; VEGA, S.; FREIRE, E. Thermodynamic rules for the design of high affinity HIV-1 protease inhibitors with adaptability to mutations and high selectivity towards unwanted targets. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, n. 9, p. 1787-1799, 2004.
65. TODD, M. J.; LUQUE, I.; VELÁZQUEZ-CAMPOY, A.; FREIRE, E. Thermodynamic basis of resistance to HIV-1 protease inhibition: calorimetric analysis of the V82F/I84V active site resistant mutant. **Biochemistry**, v. 39, n. 39, p. 11876-11883, 2000.
66. PETROVA, T.; STEUBER, H.; HAZEMANN, I.; COUSIDO-SIAH, A.; MITSCHLER, A.; CHUNG, R.; OKA, M.; KLEBE, G.; EL-KABBANI, O.; JOACHIMIAK, A.; PODJARNY, A. Factorizing selectivity determinants of inhibitor binding toward aldose and aldehyde reductases: structural and thermodynamic properties of the aldose reductase mutant Leu300Pro–fidarestat complex. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 18, p. 5659-5665, 2005.
67. STUDIER, F. W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. **Protein Expression and Purification**, v. 41, n. 1, p. 207-234, 2005.

68. LEE, G. M.; BALOUCH, E.; GOETZ, D. H.; LAZIC, A.; MCKERROW, J. H.; CRAIK, C. S. Mapping inhibitor binding modes on an active cysteine protease via nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Biochemistry**, v. 51, n. 50, p. 10087-10098, 2012.
69. AVELAR, L. A. A.; CAMILO, C. D.; DE ALBUQUERQUE, S.; FERNANDES, W. B.; GONÇALEZ, C.; KENNY, P. W.; LEITÃO, A.; MCKERROW, J. H.; MONTANARI, C. A.; OROZCO, E. V. M.; RIBEIRO, J. F. R.; ROCHA, J. R.; ROSINI, F.; SAIDEL, M. E. Molecular design, synthesis and trypanocidal activity of dipeptidyl nitriles as cruzain inhibitors. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 7, p. 1-24, 2015.
70. JUDICE, W. A. S.; CEZARI, M. H. S.; LIMA, A. P. C. A.; SCHARFSTEIN, J.; CHAGAS, J. R.; TERSARIOL, I. L. S.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L. Comparison of the specificity, stability and individual rate constants with respective activation parameters for the peptidase activity of cruzipain and its recombinant form, cruzain, from *Trypanosoma cruzi*. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 24, p. 6578-6586, 2001.
71. TELLINGHUISEN, J.; CHODERA, J. D. Systematic errors in isothermal titration calorimetry: concentrations and baselines. **Analytical Biochemistry**, v. 414, n. 2, p. 297-299, 2011.
72. VELAZQUEZ-CAMPOY, A.; FREIRE, E. Isothermal titration calorimetry to determine association constants for high-affinity ligands. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 186-191, 2006.
73. BISWAS, T.; TSODIKOV, O. V. An easy-to-use tool for planning and modeling a calorimetric titration. **Analytical Biochemistry**, v. 406, n. 1, p. 91-93, 2010.
74. REYES, CRISTIAN DAVID CAMILO. **Síntese de dipeptidil-nitrilas como inibidores da enzima cruzaina**. 95 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica e Biológica)- Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75133/tde-29072014-153915/>>. Acesso em 16 mar. 2016.
75. OROZCO, ERIKA VANESSA MEÑACA. **Estudo da relação estrutura-atividade de dipeptidilnitrilas na enzima cruzaina**. 150 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica e Biológica)- Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75133/tde-06052015-141806/>>. Acesso em 16 mar. 2016.

76. GRABSKI, A.; MEHLER, M.; DROTT, D. The overnight express autoinduction system: high-density cell growth and protein expression. **Nature Methods**, v. 2, p. 233 - 235, 2005.

77. VILLAVERDE, A.; CARRIÓ, M. M. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 1385-1385, 2003.

78. FERNANDES, WILLIAM BORGES. **Determinação do modo de interação de inibidores reversíveis da cruzaina de *Trypanosoma cruzi* via cristalografia de raios X**. 175 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica e Biológica)- Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75133/tde-28082015-081328/>>. Acesso em 16 mar. 2016.

79. KLEBE, G. The use of thermodynamic and kinetic data in drug discovery: decisive insight or increasing the puzzlement? **ChemMedChem**, v. 10, n. 2, p. 229-231, 2015.

80. MALVERN. MicroCal ITC-ORIGIN Analysis Software User Manual. 2016. MAN0577. Disponível em: <<http://www.malvern.com/en/support/resource-center/user-manuals/MAN0577EN.aspx>>. Acesso em 16 mar. 2016.

81. BIANCONI, M. L. Avoiding buffer interference in itc experiments: a case study from the analysis of entropy-driven reactions of glucose-6-phosphate dehydrogenase. In: ANDREW, L. F. (Ed.). **Methods in Enzymology**. London: Academic Press, 2016. v.567, 10, p.237-256.

82. GOLDBERG, R. N.; KISHORE, N.; LENNEN, R. M. Thermodynamic quantities for the ionization reactions of buffers. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, v. 31, n. 2, p. 231-370, 2002.

83. BAKER, B. M.; MURPHY, K. P. Evaluation of linked protonation effects in protein binding reactions using isothermal titration calorimetry. **Biophysical Journal**, v. 71, n. 4, p. 2049-2055, 1996.

84. BARON, R.; MCCAMMON, J. A. Molecular recognition and ligand association. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 64, n. 1, p. 151-175, 2013.

85. FREIRE, E. Some practical rules for the thermodynamic optimization of drug candidates. In: GOHLKE, H. (Ed.). **Protein-Ligand Interactions**. Darmstadt: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012. v.53, 2, p.23-31.
86. OBALLA, R. M.; TRUCHON, J.-F.; BAYLY, C. I.; CHAURET, N.; DAY, S.; CRANE, S.; BERTHELETTE, C. A generally applicable method for assessing the electrophilicity and reactivity of diverse nitrile-containing compounds. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, n. 4, p. 998-1002, 2007.
87. ASAAD, N.; BETHEL, P. A.; COULSON, M. D.; DAWSON, J. E.; FORD, S. J.; GERHARDT, S.; GRIST, M.; HAMLIN, G. A.; JAMES, M. J.; JONES, E. V.; KAROUTCHI, G. I.; KENNY, P. W.; MORLEY, A. D.; OLDHAM, K.; RANKINE, N.; RYAN, D.; WELLS, S. L.; WOOD, L.; AUGUSTIN, M.; KRAPP, S.; SIMADER, H.; STEINBACHER, S. Dipeptidyl nitrile inhibitors of cathepsin L. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 15, p. 4280-4283, 2009.
88. WILCKEN, R.; ZIMMERMANN, M. O.; LANGE, A.; JOERGER, A. C.; BOECKLER, F. M. Principles and applications of halogen bonding in medicinal chemistry and chemical biology. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 4, p. 1363-1388, 2013.
89. HARDEGGER, L. A.; KUHN, B.; SPINNLER, B.; ANSELM, L.; ECABERT, R.; STIHLE, M.; GSELL, B.; THOMA, R.; DIEZ, J.; BENZ, J.; PLANCHER, J.-M.; HARTMANN, G.; BANNER, D. W.; HAAP, W.; DIEDERICH, F. Systematic investigation of halogen bonding in protein–ligand interactions. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n. 1, p. 314-318, 2011.
90. KENNY, P. W.; MONTANARI, C. A.; PROKOPCZYK, I. M.; RIBEIRO, J. F. R.; SARTORI, G. R. Hydrogen bond basicity prediction for medicinal chemistry design. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 9, p. 4278-4288, 2016.
91. XU, Z.; YANG, Z.; LIU, Y.; LU, Y.; CHEN, K.; ZHU, W. Halogen bond: its role beyond drug–target binding affinity for drug discovery and development. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 54, n. 1, p. 69-78, 2014.
92. BURNOUF, D.; ENNIFAR, E.; GUEDICH, S.; PUFFER, B.; HOFFMANN, G.; BEC, G.; DISDIER, F.; BALTZINGER, M.; DUMAS, P. kinITC: a new method for obtaining joint thermodynamic and kinetic data by isothermal titration calorimetry. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 1, p. 559-565, 2012.

**APÊNDICE A – Modelo de ajuste usado pelo programa Origin 7.0 para a
obtenção dos parâmetros termodinâmicos da interação
entre macromolécula e ligante**

Equação de ajuste aplicado pelo MicroCal Origin 7.0 para conjunto único de sítios idênticos (Single set sites).⁸⁰

Parâmetro	Descrição
K	Constante de interação
n	Fração molar
$[M]$	Concentração livre da macromolécula no volume ativo
M_t	Concentração total da macromolécula
$[X]$	Concentração livre do ligante no volume ativo
X_t	Concentração total do ligante
V_0	Volume ativo
Θ	Fração de sítios ocupados pelo ligante
ΔH	Variação da entalpia de interação do ligante

Fonte: Autoria própria

Equação A.1.
$$K = \frac{\Theta}{(1-\Theta)[X]}$$

Equação A.2.
$$X_t = [X] + n\Theta M_t$$

As equações acima são combinadas resultando em:

Equação A.3.
$$\Theta^2 - \Theta \left[1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nKM_t} \right] + \frac{X_t}{nM_t} = 0$$

O calor (Q), medido dentro da cela de amostra, pode ser descrito em função de V_0 e Θ , da seguinte forma:

Equação A.4.
$$Q = n\Theta\Delta HV_0$$

resolvendo a Equação A.3 em Θ e substituindo na Equação A.4, tem-se:

Equação A.5.
$$Q = nM_t\Delta HV_0/2 \left[1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nKM_t} - \sqrt{\left(1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nKM_t}\right)^2 - \frac{4X_t}{nM_t}} \right]$$

A Equação A.5 é aplicada para definir o valor de Q apenas contido dentro da cela de amostra. Ela é aplicada para cada injeção i provendo o valor de $Q_{(i)}$. Como mencionado na seção, o volume excedente não é componente de Q , no entanto é aplicada uma equação de correção ($\Delta Q_{(i)}$).

Equação A.6.
$$\Delta Q_{(i)} = Q_{(i)} + \frac{dV_i}{V_0} \left[\frac{Q_{(i)} + Q_{(i-1)}}{2} \right] - Q_{(i-1)}$$

O programa Origin7.0 aplica a seguinte rotina para a determinação do ajuste: (i) “chute inicial” dos parâmetros n , K e ΔH ; (ii) cálculo dos valores de $\Delta Q_{(i)}$ para cada injeção e comparação com o calor medido para a injeção correspondente; (iii) aplicação do modelo de Marquardt padrão para otimização dos valores de n , K e ΔH ; (iv) iteração do procedimento (iii) até que haja convergência dos valores dos parâmetros ajustados.⁸⁰

APÊNDICE B – Gráficos dos experimentos realizados

Gráficos dos experimentos em diferentes tampões

Figura B.1. Gráficos dos experimentos em diferentes tampões Acetato, Citrato, BisTris e MES (respectivamente)

Fonte: Autoria própria

Gráficos dos experimentos em diferentes temperaturas

Figura B.2. Gráficos dos experimentos a 15 °C

Fonte: Autoria própria

Figura B.3 Gráficos dos experimentos a 20 °C

Fonte: Autoria própria

Figura B.4. Gráficos dos experimentos a 25 °C

Fonte: Autoria própria

Figura B.5 Gráficos dos experimentos a 30 °C

Fonte: Autoria própria

Figura B.6 Gráficos dos experimentos a 37 °C

Fonte: Autoria própria

Gráficos dos experimentos de interação da cruzaina e as dipeptidil-nitrilas

Figura B.7. Gráficos dos experimentos do Neq0409

Fonte: Autoria própria

Figura B.8. Gráficos dos experimentos do Neq0413

Fonte: Autoria própria

Figura B.9. Gráficos dos experimentos do Neq0414 **Fonte:** Autoria própria**Figura B.10.** Gráficos dos experimentos do Neq0415 **Fonte:** Autoria própria

Figura B.11. Gráficos dos experimentos do Neq0419

Fonte: Autoria própria

Figura B.12. Gráficos dos experimentos do Neq0533

Fonte: Autoria própria

Figura B.13. Gráficos dos experimentos do Neq0537

Fonte: Autoria própria

Figura B.14. Gráficos dos experimentos do Neq0544

Fonte: Autoria própria

Figura B.15. Gráficos dos experimentos do Neq0551

Fonte: Autoria própria

Figura B.16. Gráficos dos experimentos do Neq0552

Fonte: Autoria própria

Figura B.17. Gráficos dos experimentos do Neq0554

Fonte: Autoria própria

Figura B.18. Gráficos dos experimentos do Neq0568

Fonte: Autoria própria

Figura B.19. Gráficos dos experimentos do Neq0569

Fonte: Autoria própria

Figura B.20. Gráficos dos experimentos do Neq0570

Fonte: Autoria própria

Figura B.21. Gráficos dos experimentos do Neq0575

Fonte: Autoria própria

Figura B.22. Gráficos dos experimentos do Neq0577

Fonte: Autoria própria