RICARDO RODRIGUES GOULART

**Otimização do Flavonoide Tilirosídeo como Inibidor da Enzima Gliceraldeído-3-
fosfato Desidrogenase de *Trypanosoma cruzi***

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

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari

São Carlos

2012

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

Goulart, Ricardo Rodrigues

Otimização do flavonoide tilirosídeo como inibidor da enzima gliceraldeído-
3-fosfato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi*. / Ricardo Rodrigues Goulart. -
- São Carlos, IQSC, 2012.

159 p.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos /
Universidade de São Paulo, 2012.

Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari

1. Química Medicinal. 2. Ensaios Virtuais. 3. Inibidores
Enzimáticos. I. Título.

*Referências Bibliográficas
conferidas pelo SBTIC/IQSC*

Este exemplar foi revisado e alterado com relação à versão original, sob a exclusiva responsabilidade do autor.

São Carlos, 13/07/2012

Ricardo Rodrigues Goulart

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus avós paternos Melchiades Rodrigues Goulart, Ana Lazara Goulart (in memoriam) e maternos Lazaro Luiz de Oliveira (in memoriam) e Maria da Luz Nascimento Oliveira, por serem exemplos de pessoas de grande honra, honestidade e empenho, tendo grande contribuição na minha formação humana. Saudades de todos.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus por me dar forças para sempre continuar crescendo.

À minha família, em especial aos meus pais Benevaldo e Heliamar pelo apoio e por me ensinar coisas que vão muito além do que é aprendido no ambiente acadêmico.

Ao meu irmão Rodrigo pelos inúmeros momentos de alegria.

À minha namorada Fabyana pelo amor, carinho, apoio e parceria, e por me proporcionar muitos momentos de felicidade.

Aos meus amigos Jean, Virgínia, Daniella, Francielle, Sara, Geraldo, Igor e Leandro, que foram um grande suporte mesmo nos momentos difíceis.

A todos os colegas (membros e ex-membros) do NEQUIMED, Dr. Josmar Rocha, Dr. Helton Wiggers, Dr. Juliana Cheleski, M.Sc. Igor Prokopczyk, M.Sc. Geraldo Sartori, M.Sc. Fabiana Rosini, M.Sc. Fabyana Soares, M.Sc. Emanuella Fonseca, Jean Ribeiro, Leandro Avelar, M.Sc. William Fernandes, Cristian Reyes, M.Sc. Cesar Kurohane, Prof. Dr. Andrei Leitão, Irwin Linares e Prof. Dr. Rosivaldo Borges pela ambiência científica, pelas discussões, que certamente contribuíram para a realização desse trabalho, e pelos momentos de alegria e de descontração.

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Montanari por me ajudar a superar esse desafio com paciência e por confiar em mim e à sua esposa Dra. Maria Luiza Montanari pelas conversas e bons conselhos.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa concedida (Processo 2009/12476-4) e pelo apoio financeiro.

“Não tireis de vosso aprendizado a conclusão de que sabeis tudo, mas sim a de que vos resta infinitamente a saber”.

Pascal

RESUMO

A doença de Chagas afeta milhões de pessoas e os fármacos existentes não são seguros e apresentam eficácia limitada. Muitos produtos naturais mostraram efeitos inibitórios contra uma enzima importante para a sobrevivência do *Trypanosoma cruzi*, a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Dentre esses produtos naturais destacam-se aqueles da classe dos flavonoides, sendo que um deles, o tilirosídeo, mostrou-se interessante por inibir a enzima com valores de IC_{50} e K_i iguais a 46 e 25 μM , respectivamente, além de ter sido eficaz contra a cepa do *T. cruzi* resistente a fármacos (cepa Y) mostrando um valor de IC_{50} igual a 770 μM . Com objetivo de identificar novos potenciais inibidores da TcGAPDH baseados no tilirosídeo foram empregados métodos computacionais nos quais combinaram-se duas diferentes estratégias: os ensaios virtuais baseados na estrutura do ligante (LBVS) e os ensaios virtuais baseados na estrutura do receptor (SBVS). Os compostos que se ajustaram ao sítio catalítico da enzima e preditos para interagir de forma efetiva com o alvo foram adquiridos e testados contra a TcGAPDH. Os estudos de inibição enzimática foram realizados utilizando as técnicas de calorimetria de titulação isotérmica e espectroscopia de fluorescência obtendo como resultados as constantes de inibição dos compostos selecionados e seus modos de inibição. Dois flavonoides, o Nequimed 214 e o Nequimed 215 inibiram a TcGAPDH na mesma grandeza que o composto de partida, o tilirosídeo, mas como possuem cerca da metade da massa molecular, houve grande aumento da eficiência do ligante. A partir dessa informação, foram selecionados uma segunda geração de compostos preditos a interagir com a TcGAPDH. Deste modo, foram adquiridos bioisósteros de flavonoides que foram testados contra essa enzima, sendo que dois dos mesmos mostraram-se ativos e com alta eficiência do ligante. Foram adquiridos também compostos pertencentes à classe das hidantoínas, rodaninas, tiohidantoínas e pirrolidina-2,4-dionas sendo que muitos dos mesmos foram ativos e mostraram os maiores valores de eficiência do ligante já relatados para a TcGAPDH, tornando-os excelentes candidatos para otimização molecular. Os resultados obtidos sugerem que vários inibidores possuem inibição não competitiva com relação ao substrato G3P. Os inibidores mais potentes foram testados contra a GAPDH de humanos e não foi verificada seletividade relevante.

Palavras-chave: Doença de Chagas; GAPDH, Ensaios Virtuais, Inibidores Enzimáticos.

ABSTRACT

Chagas disease affects millions of people worldwide. The available drugs are not safe and show limited efficacy. Many natural products inhibit the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), an important *Trypanosoma cruzi* enzyme. Among them, flavonoids have stood out and one of them, the tiliroside, inhibited the enzyme with IC_{50} and K_i values of 46 and 25 μ M, respectively. Furthermore, unpublished results showed that this compound was effective against the drug-resistant strain of *T. cruzi* (Y strain) with IC_{50} value of 770 μ M. In order to select potential inhibitors of TcGAPDH based on the tiliroside structure, computational methods were used combining two different strategies, the ligand-based virtual screening (LBVS) and the structure-based virtual screening (SBVS). The compounds predicted to interact effectively with the target and fit into the active site of the enzyme were purchased and tested. Enzyme inhibition studies were performed using isothermal titration calorimetry and fluorescence spectroscopy from which the constants and mode of inhibition of the compounds were determined. Two of the tested flavonoids, Nequimed 214 and Nequimed 215, showed inhibition activity against TcGAPDH in the same magnitude values as the starting compound, the tiliroside, in spite of their lower molecular weight, thus greatly enhancing the ligand efficiency (LE). These data prompted us to search for some flavonoid bioisosters that were obtained and tested against this enzyme, and two of them proved to be active with high ligand efficiencies. We also purchased compounds belonging to the class of hydantoins, pyrrolidine-2,4-dione, thio-hydantoin and rhodanine. Many of them were active at low micromolar concentration range and exhibited the highest ligand efficiencies ever reported for this enzyme, therefore becoming excellent candidates for molecular optimization. The obtained results suggest that most of inhibitors tested behave as non-competitive inhibitors with respect to the G3P substrate. The most potent inhibitors were tested against human GAPDH and relevant selectivity was not observed.

Keywords: Chagas Disease, GAPDH, Virtual Screening, Enzyme Inhibitors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.1 - Etapas da descoberta de fármacos. As etapas são divididas em estudos pré-clínicos e clínicos. O químico medicinal tem atuação ativa principalmente durante os estudos pré-clínicos. 31
- Figura 1.2 - Ilustração que representa o espaço químico e o espaço químico-biológico de alguns alvos macromoleculares e de regiões do espaço químico que contêm compostos com propriedades farmacocinéticas. 32
- Figura 1.3 - Distribuição geográfica de casos de pessoas que sofrem doença de Chagas fora da América Latina. Sua distribuição tem sido influenciada por movimentos migratórios que levam esta doença a diferentes regiões do planeta. 33
- Figura 1.4 - Ilustração do ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi* e suas formas evolutivas nos hospedeiros vertebrados, neste caso o homem, e nos invertebrados, insetos da subfamília dos triatomíneos. 35
- Figura 1.5 - Esquematisação da reação catalisada pela gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Fosforilação oxidativa do gliceraldeído-3-fosfato a 1,3-bifosfoglicerato com concomitante redução do NAD^+ a NADH .¹⁵ 36
- Figura 1.6 - Esquematisação do mecanismo da reação da enzima GAPDH. (1) Formação do complexo entre a GAPDH e o gliceraldeído-3-fosfato. (2) Formação do intermediário hemitioacetal, facilitado pela catálise ácido-base promovida pelo resíduo de aminoácido histidina adjacente. (3) Formação do intermediário tioéster pela redução do NAD^+ a NADH . (4) Saída do NADH e posterior entrada de NAD^+ no sítio ativo da GAPDH e ataque nucleofílico do fosfato inorgânico ao grupo tioéster levando à (5) liberação do produto 1,3-BPG. 38
- Figura 1.7 - (a) Estrutura quaternária da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *T. cruzi*. Observar os quatro monômeros em diferentes cores. (b) Sítio ativo da GAPDH de *T. cruzi* (superfície hidrofóbica, sendo regiões hidrofóbicas mostradas em laranja e hidrofílicas em azul). Os ligantes cocrystalizados são NAD^+ à esquerda e o S70 (análogo do 1,3-bifosfoglicerato) à direita. Observar a localização da cisteína catalítica em amarelo. A

estrutura da enzima foi obtida do PDB sob o código 1QXS.¹⁷ Essas ilustrações foram obtidas com auxílio do programa Chimera.²⁵ 39

Figura 1.8 - (a) Estrutura básica típica de flavonas. Observe a nomenclatura dos anéis e a numeração dos átomos de carbono, que é comum aos flavonoides. (b) Estrutura química do tilirosídeo. As ilustrações foram feitas usando o programa Marvin Sketch. 42

Figura 3.1 - Ilustração mostrando a superposição máxima do volume de dois compostos. A partir dos volumes moleculares sobrepostos é possível calcular a similaridade por forma molecular, sendo que o valor varia de 0 (sem sobreposição) a 1 (sobreposição perfeita). 59

Figura 3.2 - (a) fotografia que exemplifica um relevo de aspecto suave, o que descreve uma relação ideal entre estrutura e atividade de uma série de compostos, onde pequenas mudanças da estrutura não alteram significativamente a atividade. (b) fotografia de relevo de aspecto áspero, descrevendo uma relação estrutura e atividade que é encontrada mais facilmente, onde pequenas mudanças na estrutura podem alterar significativamente a atividade biológica. 60

Figura 3.3 - Representação do processo de docagem, no qual são escolhidos compostos preditos a interagirem com o alvo macromolecular para ensaios bioquímicos. Destaque é dado à complementaridade espacial entre ligante e receptor..... 62

Figura 3.4 - Filtros hierárquicos empregados como algoritmo de busca pelo programa Glide. 66

Figura 3.5 - Fluxograma simplificado das atividades executadas nesse trabalho. Em laranja são mostrados os programas empregados e em lilás os bancos de dados virtuais, representando os arquivos de entrada e saída de cada antes e após cada etapa..... 68

Figura 3.6 - (a) Superposição das estruturas cristalográficas das enzimas GAPDH humana (1U8F)⁵⁹ e de *T. cruzi* (1QXS).A GAPDH humana é mostrada em azul e a de *T. cruzi* em branco. Observar grande semelhança entre as mesmas. (b) Existem diferenças entre alguns resíduos de aminoácido da GAPDH, que enquanto na enzima de humanos são observados os resíduos de aminoácidos Ala232, Ala209 e Leu195 (em azul), na GAPDH de *T. cruzi* os mesmos estão substituídos pelos resíduos de Ser247, Ser224 e Asp210, respectivamente. Esses resíduos podem ser explorados para a busca de inibidores seletivos. São mostradas

também em laranja as ligações de hidrogênio formadas entre o análogo do produto, o S70, com os resíduos Arg249, Ser247 e outros resíduos.....76

Figura 3.7 – (a) Representação tridimensional do ligante S70 cocrystalizado junto com a GAPDH de *T. cruzi*. São mostrados os principais resíduos de aminoácidos formadores dos sítios de interação do fosfato inorgânico (à direita) e orgânico (à esquerda). (b) Representação bidimensional do S70 e de suas interações.....77

Figura 3.8 – (a) Representação tridimensional do NAD⁺ cocrystalizado em seu sítio e de suas interações. (b) Representação bidimensional do NAD⁺ destacando suas interações. Observar os contatos hidrofóbicos feitos pelo anel nicotinamida.....78

Figura 3.9. Distribuição dos compostos de diferentes bancos virtuais de compostos de acordo com os valores de similaridade por forma molecular calculada pelo programa ROCS e eletrostática calculada pelo programa EON.78

Figura 3.10. Distribuição dos compostos dos diferentes bancos virtuais de compostos de acordo com os valores de pontuação calculados pelo Glide.82

Figura 3.11. Representação da pose de um bioisómero (Nequimed 345) que apresentou alto valor de pontuação pela docagem molecular e mostrou alta complementaridade com o sítio ativo da GAPDH de *T. cruzi*. Observe que essa molécula ocupa a região onde se encontra a cisteína catalítica, interagindo com a mesma, e ligações de hidrogênio com os dois sítios de interação de fosfato (a) Representação tridimensional do composto no sítio e de suas interações. (b) Representação bidimensional do Nequimed 345 e de suas interações. Interações em vermelho são ligações de hidrogênio e em amarelo são hidrofóbicas.85

Figura 3.12 – Representação do resultado da docagem molecular para o Nequimed 342. (a) Representação tridimensional do composto no sítio ativo da enzima e suas interações. (b) Representação bidimensional do compostos e de suas interações com alguns dos resíduos de aminoácidos que compõem o sítio ativo da enzima.85

Figura 3.13 – Ilustração dos compostos selecionados distribuídos de acordo com as classes químicas às quais os mesmos pertencem.....87

Figura 4.1 - Representação da relação entre a formação de produto no decorrer do tempo. Cada linha representa uma concentração de substrato diferente, e o aumento da concentração

e substrato é linear. Observar que depois de um determinado momento, acréscimos da concentração de substrato não resultam em aumento da velocidade de formação do produto. A inclinação da reta é igual à velocidade de formação de produto. 102

Figura 4.2 - Gráfico que relaciona a velocidade de formação de produto de acordo com a concentração de substrato. O ajuste adotado foi de acordo com a equação de Michaelis-Menten, e como tal, assume forma de uma hipérbole retangular. 102

Figura 4.3 - Esquema que mostra o equilíbrio envolvido diferentes passos em uma reação enzimática na presença e na ausência de um inibidor..... 105

Figura 4.4 - Representação que correlaciona a velocidade de uma reação catalisada por uma enzima em função da concentração de substrato em diferentes concentrações de inibidor. Conforme aumenta a concentração de inibidor é observado acréscimo do valor de α 106

Figura 4.5 - Gráfico de Lineweaver-Burk que exemplifica o padrão de retas que resultam de diferentes experimentos, sendo um deles na ausência de inibidor (reta verde) e os outros na presença de diferentes concentrações de um inibidor (retas azul e lilás)..... 107

Figura 4.6 - Gráfico de Lineweaver-Burk que exemplifica o padrão de retas resultante de diferentes experimentos, na ausência de inibidor (reta verde) e presença de diferentes concentrações de um inibidor não competitivo (retas azul e lilás). 108

Figura 4.7 – Gráfico de Lineweaver-Burk característico de inibição incompetitiva. 109

Figura 4.8 - Representação esquemática de um calorímetro de titulação isotérmica. (a) As celas de amostra e de referência permanecem na mesma temperatura. (b) Após a injeção ocorre variação da temperatura da cela de amostra, que leva a um fornecimento diferencial de energia à mesma de forma a compensar a diferença de temperatura. O resultado obtido é a diferença entre a potência térmica fornecida às celas de amostra e de referência de acordo com o tempo..... 111

Figura 4.9 - Termograma obtido através de um ensaio calorimétrico de injeções múltiplas utilizando a enzima TcGAPDH. A diminuição da potência térmica (dQ_n/dt) é proporcional à velocidade com que a reação ocorre. 112

Figura 4.10 - Método para a determinação do calor total da reação com o substrato na seringa. Esse valor pode ser calculado pela integração da área da curva obtida.	113
Figura 4.11 - Método para a determinação do calor total da reação com a enzima na seringa. O valor de ΔH_{app} pode ser calculado pela diferença entre as áreas obtidas após a primeira e a segunda injeção.....	113
Figura 4.12 – Diagrama de Jablonski modificado. (S_0) estado fundamental; (S_1) primeiro estado excitado singleto; (S_2) segundo estado excitado singleto; (T_1) primeiro estado excitado tripleto; ($h\nu_A$) absorção de um fóton; ($h\nu_{FLU}$) emissão de fótons por fluorescência; ($h\nu_{FOS}$) emissão de fótons por fosforescência.	114
Figura 4.13 - Ajuste não linear dos dados obtidos pelo ITC ao modelo de Michaelis Menten.	123
Figura 4.14. Ajuste não linear dos dados obtidos pelo ITC ao modelo de Michaelis-Menten.	124
Figura 4.15. Ajuste dos dados à curva de Michaelis-Menten para os compostos testados no subsítio do G3P. Estão representadas as estruturas químicas. $I = 0$, ausência de inibidor; $I = 50$, presença de inibidor na concentração de 50 μM , $I = 100$, presença de inibidor na concentração de 100 μM . (a) Nequimed 214; (b) Nequimed 215; (c) Nequimed 216; (d) Nequimed 217.....	126
Figura 4.16. Ajuste dos dados à curva de Michaelis-Menten para os compostos testados no subsítio do NAD^+ . Estão representadas as estruturas químicas. $I = 0$, ausência de inibidor; $I = 100$, presença de inibidor na concentração de 100 μM . (a) Nequimed 214; (b) Nequimed 215; (c) Nequimed 216; (d) Nequimed 217.....	128
Figura 4.17 – Ajuste dos dados à curva de Michaelis-Menten e de Lineweaver-Burk para os compostos testados no subsítio do G3P em diferentes concentrações. Estão representadas as estruturas químicas. O primeiro composto é o Nequimed 214, o segundo composto é o Nequimed 215 e o terceiro é o Nequimed 216.	130
Figura 4.18 – Variando a razão entre $[S]/K_M$ é possível determinar o modo de inibição de inibidores enzimáticos através da mudança dos valores de IC_{50}	134

Figura 4.19 – Curva de dose-resposta do inibidor Nequimed 204 frente à TcGAPDH.....	135
Figura 4.20 – Distribuição dos compostos testados da segunda geração com relação ao percentual de inibição à concentração de 300µM. Os compostos estão separados de acordo com suas respectivas classes. Em vermelho estão incluídos flavonoides e seus bioisósteros e em azul estão incluídos os compostos da classe das hidantoínas e correlatas.	136
Figura 4.21 – Distribuição dos compostos mais potentes com relação à eficiência do ligante (LE).	142
Figura 4.22 – Ajuste linear entre a unidade relativa de fluorescência (RFU) e unidade de concentração do composto fluorogênico (NADH). A linha vermelha representa o ajuste linear e em verde estão as linhas que representam o intervalo de confiança a 95%. ($R^2 = 0,999$). .	144
Figura 4.23 - Ajuste dos dados à curva de Michaelis-Menten para os compostos mais potentes testados no subsítio do G3P em diferentes concentrações.	145
Figura 4.24 – Representação do esqueleto principal da hidantoína mostrando a numeração de seu anel e as substituições apresentadas pelos compostos testados (R1 e R2). Está circulada em vermelho a região que contribui negativamente para a interação e em azul positivamente.	148

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Modificações feitas no filtro de seleção de moléculas aplicado aos flavonoides glicosilados.	71
Tabela 3.2. Relação entre constante de dissociação (K_d) e energia livre de interação (ΔG) em kcal.mol ⁻¹	82
Tabela 4.1. Parâmetros cinéticos calculados para a enzima TcGAPDH com relação ao substrato G3P.....	123
Tabela 4.2. Parâmetros cinéticos calculados para a TcGAPDH com relação ao cofator NAD ⁺	124
Tabela 4.3. Valores comparativos dos valores de K_M na presença e ausência de inibidor, valores de K_i^{app} e o mecanismo de inibição com relação ao subsítio do G3P.	126
Tabela 4.4. Parâmetros estatísticos dos ajustes dos estudos experimentais.	127
Tabela 4.5. Valores comparativos dos valores de K_M na presença e ausência de inibidor, valores de K_i^{app} e o modo de inibição com relação ao subsítio do NAD ⁺	129
Tabela 4.6. Parâmetros estatísticos dos ajustes dos estudos experimentais.	129
Tabela 4.7 – Modo de inibição que melhor se ajustou aos dados obtidos experimentalmente e parâmetros estatísticos do ajuste.....	131
Tabela 4.8. Eficiência do ligante dos flavonoides testados contra o subsítio do G3P.....	133
Tabela 4.9 – Compostos da segunda geração testados na TcGAPDH. São mostrados dados de percentual de inibição à concentração de inibidor de 300 μ M, IC ₅₀ e da eficiência do ligante (LE), levando em consideração os valores de IC ₅₀	137
Tabela 4.10 – Relação dos compostos mais potentes e seus respectivos modo e constantes de inibição. São mostrados os valores calculados para a eficiência do ligante (LE) dos mesmos e os parâmetros estatísticos do ajuste dos dados ao modelo não linear.	147

Tabela 4.11 – Constates de inibição dos compostos sobre a GAPDH de humanos com relação ao substrato G3P e seletividade dos compostos frente à GAPDH de humanos (Razão entre K_i^{app} para a HsGAPDH pelo K_i^{app} para a TcGAPDH).	150
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Å	Angström
µL	Microlitro
µM	Micromolar
ΔG	Variação da Energia Livre de Gibbs
$\Delta G'^{\circ}$	Variação da Energia Livre de Gibbs Padrão Bioquímica
ΔH	Variação de Entalpia
ΔS	Variação de Entropia
R^2	Ajuste dos dados experimentais ao modelo
1,3-BPG	1,3-Bifosfoglicerato
ADMET	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade
AICc	Critério de Informação Akaike
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Ala	Resíduo de Aminoácido Alanina
Arg	Resíduo de Aminoácido Arginina
Asp	Resíduo de Aminoácido Aspartato
BSA	Albumina Sérica Bovina
Cys	Resíduo de Aminoácido Cisteína
D,L-G3P	Forma Racêmica do Gliceraldeído-3-Fosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
E	Enzima

<i>E</i>	Potência Térmica
EC	Número da Comissão de Enzimas (Enzyme Commission)
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ERR- α	Receptor Relacionado ao Estrogênio- α
ES	Complexo Enzima-Substrato
FDA	Administração Federal de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos da América (Food and Drug Administration)
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase
GPCR	Receptor Acoplado à Proteína G
G3P	D-Gliceraldeído-3-fosfato
Gly	Resíduo de Aminoácido Glicina
HAC	Número de Átomos Diferentes de Hidrogênio
H ⁺	Átomo de Hidrogênio Ionizado
:H-	Íon Hidreto
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfônico
His	Resíduo de Aminoácido Histidina
HTS	Ensaio em Larga Escala (High Throughput screening)
IC ₅₀	Concentração Inibitória a 50%
Ile	Resíduo de Aminoácido Isoleucina
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
ITC	Calorimetria de Titulação Isotérmica
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
k_1	Constante de Velocidade da Reação Direta

k_{-1}	Constante de Velocidade da Reação Inversa
K_a	Constante de Associação
k_{cat}	Constante Catalítica
K_d	Constante de Dissociação
K_i	Constante de Inibição
K_M	Constante de Michaelis-Menten
LB	Luria Broth
LBVS	Ensaio Virtuais Baseados na Estrutura do Ligante
LE	Eficiência do Ligante
logP	Logaritmo do coeficiente de partição octanol/água
mM	Milimolar
MM	Massa Molecular
n	Estequiometria
n	número de mol
nm	Nanômetro
ns	Nanossegundo
NAD^+	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADH	Forma reduzida da Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
P	Produto
PDB	Banco de Dados de Proteínas (Protein Data Bank)
PSA	Área Superficial Polar
Q	Calor Total Liberado
Q_d	Calor de Diluição

Q_r	Calor da Reação
QSAR	Relação Quantitativa Estrutura Atividade
RFU	Unidade Relativa de Fluorescência
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido Ribonucleico
rpm	Rotações por Minuto
ROCS Structures)	Rápida Sobreposição de Estruturas Químicas (Rapid Overlay of Chemical Structures)
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
s	Segundo
S	Substrato
SAR	Relação Estrutura Atividade
SBVS	Ensaio Virtual Baseado na Estrutura do Receptor
Ser	Resíduo de Aminoácido Serina
Sy.x	Desvio Padrão dos Resíduos
TcGAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase de <i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>T. brucei</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
Thr	Resíduo de Aminoácido Treonina
V	Velocidade
V	Volume
Val	Resíduo de Aminoácido Valina
V_{max}	Velocidade Máxima

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	30
1.1	Química Medicinal.....	30
1.2	Doença de Chagas.....	33
1.3	Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase de <i>Trypanosoma cruzi</i>	36
1.4	Produtos Naturais.....	40
1.4.1	Flavonoides.....	41
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
2.	OBJETIVOS	52
3	ENSAIOS VIRTUAIS	56
3.1	A Quiminformática e o Planejamento de Fármacos	56
3.1.1	Banco Virtual de Compostos.....	56
3.1.2	Ensaio Virtual.....	57
3.1.3	Planejamento baseado na estrutura do ligante.....	58
3.1.4	Ensaio virtual baseado na estrutura do receptor	61
3.1.4.1	Algoritmos de Busca Conformacional.....	63
3.1.4.2	Funções de Pontuação.....	64
3.1.4.3	O Programa Glide	65
3.2	Métodos Computacionais.....	68
3.2.1	Banco virtual de compostos.....	69
3.2.2	Ensaio virtual baseado na estrutura do ligante.....	72
3.2.3	Ensaio virtual baseado na estrutura do receptor	74
3.3	Resultados e Discussão	76
3.3.1	Análise do sítio ativo da GAPDH de <i>T. cruzi</i>	76
3.3.2	Ensaio virtual baseado na estrutura do ligante.....	78

3.3.3	Ensaios virtuais baseados na estrutura do receptor	81
3.3.4	Inspeção visual	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		89
4	ENSAIOS ENZIMÁTICOS	100
4.1	Cinética Enzimática.....	100
4.1.1	Constantes Cinéticas: K_M , k_{cat} e Eficiência Catalítica (k_{cat}/K_M)	103
4.1.1.1	K_M	103
4.1.1.2	k_{cat}	103
4.1.1.3	Eficiência Catalítica (k_{cat}/K_M)	104
4.1.2	Inibição Enzimática.....	104
4.1.2.1	Inibidores Reversíveis	104
4.1.2.1.1	Inibição Competitiva	105
4.1.2.1.2	Inibição não Competitiva.....	108
4.1.2.1.3	Inibição Incompetitiva	109
4.1.3	Calorimetria de Titulação Isotérmica.....	110
4.1.4	Fluorimetria.....	114
4.2	Materiais e Métodos Experimentais	116
4.2.1	Materiais.....	116
4.2.2	Procedimento Experimental	117
4.2.3	Determinação dos Parâmetros Cinéticos da Enzima GAPDH de <i>T. cruzi</i>	118
4.2.4	Ensaios de Inibição Enzimática (ITC)	118
4.2.5	Análise dos Dados.....	119
4.2.6	Ensaios de Inibição Enzimática (Fluorímetro).....	120
4.2.7	Ensaio de Seletividade frente à GAPDH de Humanos	121
4.3	Resultados e discussão	122

4.3.1	Determinação dos Parâmetros Cinéticos da TcGAPDH com Relação ao Substrato G3P.....	122
4.3.2	Determinação dos Parâmetros Cinéticos da TcGAPDH com Relação ao Cofator NAD ⁺	123
4.3.3	Estudos de Inibição Enzimática (1 ^a geração)	125
4.3.4	Estudos de Inibição Enzimática no Subsítio do G3P (1 ^a geração)	125
4.3.4.1	Estudos de Inibição Enzimática no Subsítio do NAD ⁺	128
4.3.4.2	Estudos de Variação da Concentração dos Inibidores da Enzima TcGAPDH	130
4.3.5	Eficiência do Ligante (1 ^a geração).....	132
4.3.6	Estudos de Inibição Enzimática (2 ^a geração)	133
4.3.6.1	Determinação das constantes e do modo de inibição.....	143
4.3.7	Ensaio de Seletividade frente à GAPDH de Humanos	149
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	152
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	158
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	161

Capítulo 1

Introdução

Neste capítulo é apresentada uma breve introdução sobre o papel da Química Medicinal na descoberta de fármacos, a doença de Chagas, ressaltando a necessidade da descoberta de novos fármacos para seu tratamento e os alvos que estão sob estudo, incluindo a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi*.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Química Medicinal

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

“uma área do conhecimento baseada na química, também envolvendo aspectos das ciências biológicas, médicas e farmacêuticas. Está interessada na descoberta, planejamento, identificação e preparação de compostos biologicamente ativos, no estudo do metabolismo, na interpretação de seus modos de ação a nível molecular e na construção de uma relação entre estrutura e atividade”.¹

A Química Medicinal envolve uma ampla área de atuação, sendo assim, considerada como multidisciplinar. Essa área do conhecimento se preocupa em preparar ou selecionar compostos apropriados para testes biológicos. Caso um ou uma série de compostos apresentem atividade contra determinado alvo, o químico medicinal procura conhecer o mecanismo de ação desses compostos bem como entender como ocorre o processo de interação molecular a nível topográfico, estrutural e, se possível, energético. Também é importante o conhecimento a respeito da forma com que esses compostos são inativados pelo metabolismo *in vivo* e os parâmetros físico-químicos que regulam a biodisponibilidade dos compostos quando administrados por via oral. Além de tudo isso, ainda é preciso estabelecer uma relação entre a estrutura química e a atividade de uma série de compostos visando eficácia em modelos *in vitro* e segurança em modelos *in vivo*.²

A descoberta de fármacos é um processo longo, dispendioso, arriscado, necessário e, dependendo do fármaco, muito lucrativo. Existem vários estágios durante o processo de descoberta de novos fármacos (Figura 1.1). Primeiramente, para que seja desenvolvido um novo fármaco é preciso uma necessidade médica ou deficiência na terapêutica existente, o que motiva pesquisas que podem ser efetuadas na indústria ou no meio acadêmico. Após essa etapa é necessário conhecer e delimitar as estratégias que podem ser empregadas para que a doença possa ser combatida, sendo imprescindível o conhecimento completo da fisiopatologia da doença, de forma a selecionar os melhores alvos macromoleculares, sejam eles proteínas, DNA, RNA, entre outros. Assim, são selecionados compostos químicos que possam intervir na função fisiológica do organismo humano ou do eventual parasita de forma a causar um efeito terapêutico adequado. Atualmente, esta seleção é baseada em conhecimento prévio, como do alvo ou de moléculas que mostram atividade biológica semelhante. São realizados

testes biológicos *in vitro* com as moléculas selecionadas, e caso algum composto mostre atividade biológica relevante, o mesmo é testado em um modelo animal apropriado junto com compostos análogos. Caso algum se mostre promissor, é possível selecionar o composto candidato a fármaco, que é submetido a testes toxicológicos em animais. Caso esse candidato a fármaco passe em todos os testes, as informações referentes são submetidas ao órgão regulamentador do uso de medicamentos (no Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA; e nos Estados Unidos da América, o Food and Drug Administration, FDA) para que possam ser implementados os estudos clínicos em humanos.²

Figura 1.1 - Etapas da descoberta de fármacos. As etapas são divididas em estudos pré-clínicos e clínicos. O químico medicinal tem atuação ativa principalmente durante os estudos pré-clínicos.

Após todas essas etapas são efetuados os ensaios clínicos, que objetivam descobrir ou verificar os efeitos farmacológicos e clínicos de uma determinada substância química. Esses ensaios podem ser divididos em quatro: ensaios clínicos de fase I, no qual são avaliadas a tolerância e a toxicidade do candidato a fármaco em voluntários humanos saudáveis. Os ensaios clínicos de fase II, que buscam estabelecer a eficácia e dosagem para humanos, e caso o candidato a fármaco mostre baixa toxicidade e alta eficácia, o mesmo entra nos ensaios clínicos de fase III, no qual triagens com milhares de pacientes são feitas para que uma avaliação mais confiável seja feita com relação à eficácia, efeitos colaterais e adversos do composto em estudo. Se o composto obtém êxito em todos esses ensaios, as informações

referentes a esses testes são submetidas ao órgão regulamentador que poderá aprovar o composto como fármaco. A fase IV dos ensaios clínicos ocorre depois de que fármaco é lançado no mercado e tem a finalidade de descobrir efeitos adversos que são pouco frequentes, tendo grande importância nesse processo a farmacovigilância.²

Desta forma, como a Química Medicinal tem como foco a escolha de compostos para testes biológicos, é presumível que grandes quantidades de compostos químicos sejam avaliadas quanto à capacidade de interagir com os alvos propostos. Nesse contexto insere a ideia do espaço químico que pode ser definido como todas as possibilidades de compostos que podem existir e de espaço químico biológico, que são regiões deste espaço que contêm compostos que interagem com algum componente biológico e que consequentemente apresentam atividade biológica (Figura 1.2). Assim, o desafio é vasculhar o espaço químico com objetivo de encontrar espaços químico-biológicos utilizando métodos que sejam velozes e eficientes. Caso se aplique a síntese orgânica na busca de fármacos em um espaço químico constituído de substâncias com massa molar menor que 500 Da e átomos comumente encontrados em fármacos como H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br, I, é estimado que seria necessário sintetizar mais de 10^{60} moléculas candidatas a novas substâncias químicas bioativas, o que é praticamente impossível. Portanto, é razoável assumir que a identificação de moléculas pequenas que modulem alvos biológicos se dá através do uso de métodos científicos estratégicos e bem estabelecidos.^{3,4}

Figura 1.2 - Ilustração que representa o espaço químico e o espaço químico-biológico de alguns alvos macromoleculares e de regiões do espaço químico que contêm compostos com propriedades farmacocinéticas.

Fonte: Adaptado de LIPINSKI, C.; HOPKINS, A. Navigating chemical space for biology and medicine. **Nature**, v. 432, n. 7019, p. 855, 2004.

1.2 Doença de Chagas

A doença de Chagas é causada pelo parasita tripanossomatídeo *Trypanosoma cruzi*. Esta doença é endêmica na América Latina, afetando cerca de 10 milhões de indivíduos, sendo que mais de 25 milhões de pessoas estão sob risco de infecção.⁵ Além disso, a doença de Chagas tem se espalhado ao redor do mundo principalmente devido a movimentos migratórios de pessoas provenientes de regiões endêmicas (América Latina) para não endêmicas (América do Norte, Europa, Austrália e Japão) (Figura 1.3).^{6,7} A transmissão da doença de Chagas ocorre principalmente pelo inseto vetor (80 a 90%), transfusão sanguínea (5 a 20%) e por via vertical ou congênita (0.5 a 8%), além de que tem sido relatado transmissão através de alimentos contaminados.⁸ A etiologia dessa doença foi descrita em 1909 pelo médico sanitário brasileiro Carlos Chagas, e ainda mesmo depois de 100 anos não há qualquer fármaco seguro para seu tratamento.⁹

Figura 1.3 - Distribuição geográfica de casos de pessoas que sofrem doença de Chagas fora da América Latina. Sua distribuição tem sido influenciada por movimentos migratórios que levam esta doença a diferentes regiões do planeta.

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

São três os estágios da doença: aguda, indeterminada e crônica. Na fase aguda, sem o tratamento específico a mortalidade é de cerca de 5%, especialmente entre as crianças. Os principais sintomas são febre, edema facial e linfadenopatia generalizada. Os sintomas

desaparecem em geral dentro de quatro a seis semanas. Os pacientes que não obtiveram cura entram na fase indeterminada que é caracterizada por ser assintomática, perdurando de 10 a 30 anos. A doença manifesta-se então na fase crônica que se desenvolve em cerca de 10 a 30% das pessoas infectadas, desenvolvendo sintomas como distúrbios cardíacos, neurológicos e digestivos.^{8,9}

O ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi* é heteroxênico, ou seja, envolve dois hospedeiros, sendo um vertebrado (geralmente mamíferos) e o outro invertebrado (insetos pertencentes à subfamília dos triatomíneos). Nos hospedeiros vertebrados podem ser encontradas duas diferentes formas evolutivas: as formas amastigotas (intracelulares) e as formas tripomastigotas (extracelulares e infectantes). No hospedeiro invertebrado são encontradas duas formas evolutivas: a epimastigota, que está presente no intestino do triatomíneo, e a forma tripomastigota metacíclica, que se encontra no reto do triatomíneo e que é a principal forma infectante do hospedeiro vertebrado.¹⁰

O ciclo biológico natural do *Trypanosoma cruzi* (Figura 1.4) começa com a infecção do hospedeiro vertebrado com tripomastigotas metacíclicos provenientes das fezes do inseto vetor expelidas durante o processo de repasto sanguíneo. As formas tripomastigotas metacíclicos, que são infectivas, mas não proliferativas, escapam do sistema imunológico do hospedeiro invadindo várias células e posteriormente se transformando em amastigotas em seu citosol. Os amastigotas se multiplicam por divisão binária simples e se diferenciam em tripomastigotas que são liberados no meio extracelular. Os tripomastigotas, por sua vez, podem invadir outras células ou ser ingeridos pelo triatomíneo durante seu repasto sanguíneo, o que leva ao estágio do ciclo que ocorre no hospedeiro invertebrado. Nessa fase, o tripomastigota se transforma em epimastigota e se multiplica por divisão binária no intestino médio. Na parte terminal do intestino, na região do reto o epimastigota se transforma em tripomastigotas metacíclicos. Caso estes parasitas alcancem a corrente sanguínea de um hospedeiro vertebrado, o ciclo começa novamente.¹⁰

Figura 1.4 - Ilustração do ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi* e suas formas evolutivas nos hospedeiros vertebrados, neste caso o homem, e nos invertebrados, insetos da subfamília dos triatomíneos.

Fonte: Adaptado de CLAYTON, J. Chagas disease 101. *Nature*, v. 465, n. 7301, p. S5, 2010.

Atualmente, a doença de Chagas é tratada por dois fármacos, o benzonidazol e o nifurtimox. Esses fármacos apresentam eficácia limitada, sérios efeitos adversos, genotoxicidade, requerem administração por longo período de tempo e são conhecidas cepas resistentes aos mesmos. O benzonidazol é usado para o tratamento da doença na fase aguda e é administrado por até 60 dias e a sua eficácia depende da cepa de *T. cruzi* que está sendo combatida.¹¹ O nifurtimox que também é usado essencialmente na fase aguda e começo da fase indeterminada não é mais comercializado no Brasil. O mecanismo de ação do nifurtimox baseia na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) como o ânion superóxido e peróxido de hidrogênio e a ação do benzonidazol é resultado da modificação covalente de macromoléculas por derivados reduzidos. Não existem tratamentos para a forma indeterminada e crônica.¹² Existem, no entanto, tentativas de se empregar outras substâncias, sendo que poucas apresentaram resultados promissores até o momento. O posaconazol, por exemplo, levou à cura parasitológica modelos murinos com doença de Chagas nas fases aguda e crônica.¹²

Devido ao rápido aumento do conhecimento da fisiopatologia da doença de Chagas e da biologia do *Trypanosoma cruzi* tem surgido várias estratégias para o tratamento desta doença. Têm sido propostas estratégias baseadas na relação entre o sistema imunológico do hospedeiro e o parasita bem como na intervenção em vias metabólicas essenciais para a vida do parasito. Muitos alvos macromoleculares de várias vias metabólicas vêm sendo investigados para o tratamento da doença de Chagas, como por exemplo: enzimas envolvidas na via de síntese de esteróis, enzimas da classe das cisteíno proteases, como a cruzafina, no metabolismo do pirofosfato, na síntese da tripanotona, da via da salvação das purinas e pirimidinas, da via glicolítica e outras.^{12,13}

1.3 Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase de *Trypanosoma cruzi*

A glicólise tem um papel fundamental na produção de energia em tripanossomatídeos. Estudos feitos por Engel *et al.* sugerem que culturas axênicas da forma amastigota do *T. cruzi* têm como fonte de energia apenas a via glicolítica e que a habilidade de utilizar a via de oxidação de aminoácidos para a produção de energia ocorre após a diferenciação em formas epimastigotas.¹⁴ Assim, as enzimas que participam da via glicolítica são possíveis alvos de fármacos tripanossomicidas.¹³ Uma das enzimas que participam da via glicolítica é a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH, EC 1.2.1.12). Esta enzima catalisa a sexta reação da via glicolítica, que é a fosforilação oxidativa do D-gliceraldeído-3-fosfato (G3P) a 1,3-bisfosfoglicerato (1,3-BPG) com concomitante redução da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) a NADH (Figura 1.5).

Figura 1.5 - Esquematização da reação catalisada pela gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Fosforilação oxidativa do gliceraldeído-3-fosfato a 1,3-bisfosfoglicerato com concomitante redução do NAD^+ a NADH.¹⁵

Fonte: ROCHA, J. R. **Planejamento de Inibidores das Enzimas Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase e Diidroorotato Desidrogenase de *Trypanosoma cruzi***. 2010. (Tese). Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010, p.79.

O mecanismo de reação da enzima GAPDH (Figura 1.6) ocorre através do ataque nucleofílico pelo resíduo de cisteína catalítico (Cys166), que estava estabilizada pelo resíduo His194, ao carbono carbonílico do G3P em seu sítio ativo. A fosforilação oxidativa do substrato D-gliceraldeído-3-fosfato (G3P) para 1,3-bifosfoglicerato (1,3-BPG) ocorre por meio do cofator NAD^+ . Inicialmente, há a formação de um intermediário covalente hemitioacetil entre o G3P e o resíduo de cisteína catalítico da GAPDH e consequente protonação do resíduo de histidina com o hidrogênio proveniente do resíduo de cisteína e redução concomitante do NAD^+ para NADH. O passo da redução do NAD^+ ocorre pela transferência do íon hidreto (H^-) do grupo aldeído do gliceraldeído-3-fosfato para o anel nicotinamida do NAD^+ e resultante formação de tioéster. Após esses processos, ocorre saída do NADH e entrada de outra molécula de NAD^+ , ataque nucleofílico do fosfato inorgânico ao tioéster e consequente saída do produto 1,3-bifosfoglicerato, e também o outro átomo de hidrogênio (H^+) proveniente do fosfato inorgânico é liberado na solução. Depois desses passos a enzima volta ao seu estado original e se torna suscetível a outro ciclo de reação. Esta reação apresenta variação de energia livre padrão bioquímica ($\Delta G'^\circ$) igual a 6,3 kJ/mol, mas sua principal contribuição é para a geração de um produto altamente energético, o 1,3-bifosfoglicerato, um acilfosfato que apresenta alta energia de hidrólise ($\Delta G'^\circ = -49,3$ kJ/mol), conservando a energia acumulada nas cinco primeiras reações da glicólise.¹⁶

A GAPDH é um alvo interessante para o planejamento de inibidores pelo fato de: 1) A estrutura tridimensional da GAPDH do *T. cruzi* já foi obtida por cristalografia, o que permite estudos estruturais detalhados do seu sítio ativo, investigação do modo de interação do ligante cocrystalizado e o planejamento *in silico* de inibidores enzimáticos;¹⁷ 2) A GAPDH é uma das enzimas da glicólise que tem grande importância no controle cinético do fluxo glicolítico. Apesar de a aldolase e a fosfoglicerato quinase mostrarem esta mesma característica, a aldolase apresenta sítio ativo altamente carregado, o que dificulta as chances de encontrar inibidores competitivos que tenham alta afinidade e que apresentem propriedades físico-químicas apropriadas para terem alta biodisponibilidade por via oral, e a fosfoglicerato quinase, que apesar de possuir inibidores conhecidos, ainda não se tem conhecida a estrutura tridimensional desta enzima no *T. cruzi*;^{13,18} 3) Simulações computacionais apontam que uma deficiência maior que 95% de GAPDH em eritrócitos humanos não causam sintomas clínicos significativos;¹⁹ 4) Estudos utilizando o planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor foram eficazes em encontrar inibidores potentes e seletivos com relação à GAPDH de humanos.^{20,21}

Figura 1.6 - Esquemática do mecanismo da reação da enzima GAPDH. (1) Formação do complexo entre a GAPDH e o gliceraldeído-3-fosfato. (2) Formação do intermediário hemitioacetil, facilitado pela catálise ácido-base promovida pelo resíduo de aminoácido histidina adjacente. (3) Formação do intermediário tioéster pela redução do NAD^+ a NADH . (4) Saída do NADH e posterior entrada de NAD^+ no sítio ativo da GAPDH e ataque nucleofílico do fosfato inorgânico ao grupo tioéster levando à (5) liberação do produto 1,3-BPG.

Fonte: Adaptado de NELSON, D. L. C., M. M. Glycolysis, gluconeogenesis, and the pentose phosphate pathway. In: Lehninger: Principles of Biochemistry. New York: W. H. Freeman, 2005. p. 530.

A enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *T. cruzi* é um homotetrâmero de massa molecular de aproximadamente de 156 kDa (Figura 1.7). Cada monômero da GAPDH é constituído por dois domínios, sendo um deles o domínio de ligação do NAD^+ , que contém cerca de 150 resíduos de aminoácidos próximos à terminação N-terminal e os resíduos 331-359 próximos ao C-terminal. O domínio de ligação de NAD^+ compreende dois “Rossmann fold”. O “Rossmann fold” é um domínio conservado que existe na maioria das enzimas da classe das desidrogenases que usam NAD^+ ou NADP^+ e consiste de uma folha- β com seis

fitas β paralelas associadas com quatro α -hélices. O outro domínio, o catalítico, compreende os resíduos 151-330. No mesmo se encontram os resíduos de aminoácidos essenciais para a atividade catalítica, que são os resíduos Cys166 e a His194. O sítio catalítico da GAPDH pode ser dividido em dois subsítios, o sítio de ligação do NAD^+ e o do G3P (Figura 1.7b). É mostrado que o subsítio do NAD^+ da GAPDH de tripanossomatídeos, mais especificamente na região onde interage a porção adenina, possui um bolsão hidrofóbico de cerca de 10 Å, que é ausente na enzima humana.^{22,23} Essa região foi explorada para encontrar inibidores potentes e seletivos da GAPDH de *T. brucei* com relação à enzima humana.²⁴ O sítio catalítico é formado pela região que envolve a metade nicotinamida do NAD^+ e os resíduos envolvidos na catálise. Nesse sítio o resíduo de aminoácido Arg249 é essencial para a estabilização de cargas ao redor do sítio do fosfato do substrato, regulando a interação com o mesmo, e para a liberação do produto. Outro resíduo de aminoácido apontado como importante nesse sítio é o Asp210 que na enzima humana é substituído por uma leucina, resultando em possibilidade de explorar seletividade.²²

Figura 1.7 - (a) Estrutura quaternária da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *T. cruzi*. Observar os quatro monômeros em diferentes cores. (b) Sítio ativo da GAPDH de *T. cruzi* (superfície hidrofóbica, sendo regiões hidrofóbicas mostradas em laranja e hidrofílicas em azul). Os ligantes cocrystalizados são NAD^+ à esquerda e o S70 (análogo do 1,3-bifosfoglicerato) à direita. Observar a localização da cisteína catalítica em amarelo. A estrutura da enzima foi obtida do PDB sob o código 1QXS.¹⁷ Essas ilustrações foram obtidas com auxílio do programa Chimera.²⁵

1.4 Produtos Naturais

Muitos fármacos são produtos naturais ou seus derivados. Os produtos naturais são compostos derivados de fontes naturais como de plantas, animais e de microrganismos,²⁶ apresentam alta diversidade química e especificidade para algum alvo biológico, ou seja, são moléculas privilegiadas, pois interagem com macromoléculas. Assim, os produtos naturais se encontram no chamado espaço químico-biológico, o que os colocam numa posição estratégica para a busca de moléculas bioativas e como consequência de fármacos. Apesar do grande valor já demonstrado na terapêutica, atualmente os produtos naturais se encontram negligenciados pelas grandes indústrias farmacêuticas por mostrarem dificuldades no acesso e fornecimento, problemas com técnicas experimentais, como no fracionamento de extratos e com os ensaios biológicos; e principalmente pela grande aplicação de ensaios em larga escala (HTS) (do inglês, High Throughput Screening) junto com o desenvolvimento da química combinatorial, que é uma área da química que se preocupa em gerar grandes coleções de compostos a partir de combinações de pequenas moléculas.

Quanto às propriedades físico-químicas, os produtos naturais apresentam características diferentes quando comparados com fármacos ou coleções de compostos provenientes de química combinatorial, como maiores massa molecular, número de centros quirais, número de ligações simples e de átomos que são doadores ou aceptores de ligação de hidrogênio. Assim, os produtos naturais, que são exceções à regra dos cinco de Lipinski,²⁷ têm uma distribuição mais ampla quanto ao coeficiente de partição octanol-água e maior complexidade molecular que fármacos ou compostos sintetizados por química combinatorial.²⁸

Em um levantamento feito por Newman *et al.* é mostrado que, no período entre 1981 e 2002, 6% dos fármacos descobertos são produtos naturais e 28% são derivados de produtos naturais, obtidos geralmente através de modificações semissintéticas.²⁹ De acordo com Harvey, no ano de 2008 existiam mais de 100 produtos naturais em fase de testes clínicos, sendo as principais aplicações como antibióticos e antineoplásicos.³⁰ Esses dados mostram a importância que os produtos naturais tiveram e ainda têm como um excelente ponto de partida para a busca de moléculas bioativas, já que aumentam a diversidade do espaço químico em estudo e fornecem estruturas moleculares ainda desconhecidas, portanto, orientam a síntese orgânica de potenciais moléculas bioativas.³¹

1.4.1 *Flavonoides*

Muitos produtos naturais exercem efeitos inibitórios sobre a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase,³² sendo que alguns destes compostos se encontram na classe dos flavonoides.^{33,34} Os flavonoides são compostos polifenólicos que se caracterizam por apresentar estrutura química com dois núcleos aromáticos A e B interconectados através de três átomos de carbono, formando, em algumas classes, um heterociclo, o ciclo C (Figura 1.8). Assim, sua estrutura química possui esqueleto do tipo C₆-C₃-C₆, sendo que os átomos presentes em C₆ formam anéis aromáticos e os átomos em C₃ são aqueles que definem a classe de flavonoide. Em algumas classes de flavonoides como nas flavonas, flavonóis, flavanonas, flavanonóis, isoflavonas, antocianinas e flavan-3,4-diois os átomos em C₃ formam um heterociclo de seis átomos, nas auronas é formado um heterociclo de cinco átomos e nas chalconas e diidroxichalconas não são formados heterociclos. Portanto, os flavonoides formam uma vasta e diversa classe de compostos.³⁵ A numeração dos átomos dos flavonoides bem como seus anéis podem ser vistos na flavona, um flavonoide com estrutura bastante simplificada (Figura 1.8). Além disso, os flavonoides muitas vezes ocorrem em plantas como glicosídeos, no qual uma ou mais hidroxilas são combinadas com resíduos de açúcar.

Os flavonoides guajaverina, quercetina e o tilirosídeo, apresentaram IC₅₀ quando ensaiadas contra a GAPDH igual a 140, 142 e 46 µM, respectivamente.³³ Em vista desses resultados houve o interesse em investigar essa classe de compostos para que se possa descobrir novos inibidores da GAPDH que pertençam à classe dos flavonoides ou que sejam similares e/ou bioisósteros, de forma a encontrar no final uma relação entre a estrutura destes compostos e a atividade biológica contra a GAPDH. Além disso, vários flavonoides se mostraram ativos em ensaios contra o parasito *Trypanosoma cruzi*.³⁶⁻³⁹ O flavonoide tilirosídeo (Figura 1.8) apresentou grande interesse por apresentar inibição da GAPDH com IC₅₀ na faixa de concentração de micromolar, por ser eficaz contra a cepa do *T. cruzi* resistente a fármacos (cepa Y) com IC₅₀ igual a 770 µM e por não apresentar citotoxicidade contra células humanas,^{40,41} o que coloca o tilirosídeo como um composto com grande potencial de otimização.

Figura 1.8 - (a) Estrutura básica típica de flavonas. Observe a nomenclatura dos anéis e a numeração dos átomos de carbono, que é comum aos flavonoides. (b) Estrutura química do tilirosídeo. As ilustrações foram feitas usando o programa Marvin Sketch.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

3 LIPINSKI, C.; HOPKINS, A. Navigating chemical space for biology and medicine. **Nature**, v. 432, n. 7019, p. 855-861, 2004.

4 DOBSON, C. M. Chemical space and biology. **Nature**, v. 432, n. 7019, p. 824-828, 2004.

5 OMS. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>. Acesso em: 30 jan. 2012

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

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

8 COURA, J. R.; CASTRO, S. L. D. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3-24, 2002.

9 TARLETON, R. L.; REITHINGER, R.; URBINA, J. A.; KITRON, U.; GÜRTLER, R. E. The challenges of Chagas disease - grim outlook or glimmer of hope? **PLoS Medicine**, v. 4, n. 12, p. 1852-1857, 2007.

10 LANA, M.; TAFURI, W. L. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. In: NEVES, D. P. M., A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. (Ed.). **Parasitologia humana**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2005. v. 1, p. 85-108.

11 URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 495-501, 2003.

12 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.

13 VERLINDE, C. L. M. J.; HANNAERT, V.; BLONSKI, C.; WILLSON, M.; PÉRIÉ, J. J.; FOTHERGILL-GILMORE, L. A.; OPPERDOES, F. R.; GELB, M. H.; HOL, W. G. J.; MICHELS, P. A. M. Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs. **Drug Resistance Updates**, v. 4, n. 1, p. 50-65, 2001.

14 ENGEL, J. C.; FRANKE DE CAZZULO, B. M.; STOPPANI, A. O. M.; CANNATA, J. J. B.; CAZZULO, J. J. Aerobic glucose fermentation by *Trypanosoma cruzi* axenic culture amastigote-like forms during growth and differentiation to epimastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 26, n. 1-2, p. 1-10, 1987.

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

16 NELSON, D. L.; COX, M. M. Glycolysis, gluconeogenesis, and the pentose phosphate pathway. In: NELSON, D. L.; COX, M. M. (Ed.). **Lehninger: principles of biochemistry**. New York: W. H. Freeman, 2005. v. 1, p. 521-559.

17 LADAME, S.; CASTILHO, M. S.; SILVA, C. H. T. P.; DENIER, C.; HANNAERT, V.; PÉRIÉ, J.; OLIVA, G.; WILLSON, M. Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with an analogue of 1,3-bisphospho-d-glyceric acid. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 22, p. 4574-4586, 2003.

18 BAKKER, B. M.; MICHELS, P. A. M.; OPPERDOES, F. R.; WESTERHOFF, H. V. What controls glycolysis in bloodstream form *Trypanosoma brucei*? **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 21, p. 14551-14559, 1999.

19 SCHUSTER, R.; HOLZHÜTTER, H.-G. Use of mathematical models for predicting the metabolic effect of large-scale enzyme activity alterations. **European Journal of Biochemistry**, v. 229, n. 2, p. 403-418, 1995.

20 ARONOV, A. M.; SURESH, S.; BUCKNER, F. S.; VOORHIS, W. C. V.; VERLINDE, C. L. M. J.; OPPERDOES, F. R.; HOL, W. G. J.; GELB, M. H. Structure-based design of submicromolar, biologically active inhibitors of Trypanosomatid glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 8, p. 4273-4278, 1999.

21 BRESSI, J. C.; VERLINDE, C. L. M. J.; ARONOV, A. M.; SHAW, M. L.; SHIN, S. S.; NGUYEN, L. N.; SURESH, S.; BUCKNER, F. S.; VAN VOORHIS, W. C.; KUNTZ, I. D.; HOL, W. G. J.; GELB, M. H. Adenosine analogues as selective inhibitors of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of Trypanosomatidae via structure-based drug design. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 13, p. 2080-2093, 2001.

22 SOUZA, D. H. F.; GARRATT, R. C.; ARAÚJO, A. P. U.; GUIMARÃES, B. G.; JESUS, W. D. P.; MICHELS, P. A. M.; HANNAERT, V.; OLIVA, G. *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: structure, catalytic mechanism and targeted inhibitor design. **FEBS Letters**, v. 424, n. 3, p. 131-135, 1998.

23 PAVÃO, F.; CASTILHO, M. S.; PUPO, M. T.; DIAS, R. L. A.; CORREA, A. G.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F. G. F.; MAFEZOLI, J.; VIEIRA, P. C.; OLIVA, G. Structure of *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with chalepin, a natural product inhibitor, at 1.95 Å resolution. **FEBS Letters**, v. 520, n. 1, p. 13-17, 2002.

24 VERLINDE, C. L. M. J.; CALLENS, M.; VAN CALENBERGH, S.; VAN AERSCHOT, A.; HERDEWIJN, P.; HANNAERT, V.; MICHELS, P. A. M.; OPPERDOES, F. R.; HOL, W. G. J. Selective inhibition of Trypanosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by protein structure-based design: toward new drugs for the treatment of sleeping sickness. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 37, n. 21, p. 3605-3613, 1994.

25 PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S.; GREENBLATT, D. M.; MENG, E. C.; FERRIN, T. E. Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.

26 JI, H.-F.; LI, X.-J.; ZHANG, H.-Y. Natural products and drug discovery. **EMBO Reports**, v. 10, n. 3, p. 194-200, 2009.

27 LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, n. 1-3, p. 3-25, 1997.

28 KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 3, p. 206-220, 2005.

29 NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.

30 HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19-20, p. 894-901, 2008.

31 NEWMAN, D. J. Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery? **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 9, p. 2589-2599, 2008.

32 LEITÃO, A.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G.; PUPO, M. T.; DE MARCHI, A. A.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. F. G. F.; FERREIRA, V. F.; DE SOUZA, M. C. B. V.; SÁ, M. M.; MORAES, V. R. S.; MONTANARI, C. A. Structure-activity relationships of novel inhibitors of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n. 9, p. 2199-2204, 2004.

33 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.

34 TOMAZELA, D. M.; PUPO, M. T.; PASSADOR, E. A. P.; DA SILVA, M. F. D. G. F.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; RODRIGUES FO, E.; OLIVA, G.; PIRANI, J. R. Pyrano chalcones and a flavone from *Neoraputia magnifica* and their *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-inhibitory activities. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 643-651, 2000.

35 IKAN, R. Acetogenins. In: IKAN, R. (Ed.). **Natural products: a laboratory guide**. San Diego: Academic Press, 1991. v. 1, p. 1-22.

36 GRECCO, S. D. S.; REIMÃO, J. Q.; TEMPONE, A. G.; SARTORELLI, P.; CUNHA, R. L. O. R.; ROMOFF, P.; FERREIRA, M. J. P.; FÁVERO, O. A.; LAGO, J. H. G. In vitro antileishmanial and antitrypanosomal activities of flavanones from *Baccharis retusa* DC. (Asteraceae). **Experimental Parasitology**, v. 130, n. 2, p. 141-145, 2012.

37 BOUTALEB-CHARKI, S. S.-M., M.; DÍAZ, J. G.; ROSALES, M. J.; HUERTAS, O.; GUTIERREZ-SÁNCHEZ, R.; MARÍN, C. Activity and Mode of Action of Flavonoids Compounds Against Intracellular and Extracellular Forms of *Trypanosoma cruzi*. **The Open Natural Products Journal**, v. 4, n., p. 1-7, 2011.

38 UCHIYAMA, N. Antichagasic activities of natural products against *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Health Science**, v. 55, n. 1, p. 31-39, 2009.

39 NOUR, A. M. M.; KHALID, S. A.; KAISER, M.; BRUN, R.; ABDALLA, W. L. E.; SCHMIDT, T. J. The antiprotozoal activity of methylated flavonoids from *Ageratum conyzoides* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, n. 1, p. 127-130, 2010.

40 NSHIMO, C.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D.; FARNSWORTH, N. R. Cytotoxic constituents of *Muntingia calabura* leaves and stems collected in Thailand. **Pharmaceutical Biology**, v. 31, n. 1, p. 77-81, 1993.

41 MITROKOTSA, D.; MITAKU, S.; DEMETZOS, C.; HARVALA, C.; MENTIS, A.; PEREZ, S.; KOKKINOPOULOS, D. Bioactive compounds from the buds of *Platanus orientalis* and isolation of a new kaempferol glycoside. **Planta Medica**, v. 59, n. 6, p. 517-520, 1993.

Capítulo 2

Objetivos

Este capítulo apresenta os objetivos desta dissertação de mestrado.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- ✓ Construção de uma coleção virtual de compostos contendo análogos, similares e bioisósteros do tilirosídeo
- ✓ A aplicação de métodos em quiminformática de forma a eliminar compostos preditos a serem tóxicos, reativos, que apresentem propriedades farmacocinéticas inadequadas com a finalidade de obter um banco virtual de compostos enriquecido e adequado para a busca de compostos bioativos.
- ✓ Seleção de compostos com potencial para inibir a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *T. cruzi* utilizando o planejamento baseado na estrutura do ligante (LBVS) e do receptor (SBVS)
- ✓ Avaliação *in vitro* da inibição dos compostos selecionados, quantificando suas inibições e desvendando seus mecanismos de inibição
- ✓ Avaliação da seletividade dos inibidores mais potentes frente à enzima GAPDH de humanos

Capítulo 3

Planejamento computacional de Inibidores da GAPDH de T. cruzi

Neste capítulo são apresentados os métodos em quiminformática utilizados para o planejamento de compostos com potencial para inibir a GAPDH de *T. cruzi* e os critérios utilizados para a seleção dos compostos.

3 ENSAIOS VIRTUAIS

3.1 A Quiminformática e o Planejamento de Fármacos

3.1.1 *Banco Virtual de Compostos*

A construção de um banco virtual de compostos é a primeira etapa para a realização de um ensaio virtual e representa a delimitação do espaço químico em estudo. Geralmente para a construção de um banco de dados se parte de compostos que existem, ou seja, já foram sintetizados e que, de preferência, sejam comercializáveis. Além disso, é interessante conhecimento prévio a respeito da atividade biológica dos compostos que participam do banco. De tal modo, cria-se uma biblioteca de compostos focada para um determinado alvo, tornando possível buscar por compostos relacionados permitindo a construção de uma coleção de compostos que ainda não foram testados contra aquele alvo e que tem maiores chances de serem ativos, quando comparado com uma coleção construída de forma aleatória.¹ Uma vez que o banco de dados foi construído, é indicado que sejam utilizados filtros moleculares que excluam compostos preditos como inadequados para ensaios *in vitro* e *in vivo* ou para se tornarem fármacos, como por exemplo, aquelas que possuem grupos reativos; ou que são conhecidas por serem tóxicas; que são preditas a formar agregados; que possuem propriedades físico-químicas indesejáveis (massa molecular maior que 500 Da, logP, logaritmo do coeficiente de partição octanol/água, maior que 5 ou menor que 0, número de átomos doadores de ligação de hidrogênio maior que 5 e número de átomos aceitadores de ligação de hidrogênio maior que 10), sendo esse conjunto de regras chamado de regras dos cinco de Lipinski,² que foi formulada a partir de um estudo retrospectivo que mostra que a maioria fármacos oralmente absorvidos não apresentam as características descritas anteriormente, sendo excluídos dessa regra os produtos naturais.

Existem bases de dados virtuais de moléculas como o Zinc database³ e o PubChem,⁴ de onde são disponibilizadas as estruturas de um grande número de compostos possibilitando a execução de ensaios virtuais. Outra base de dados que pode ser utilizada para encontrar compostos é o eMolecules, site que apresenta grande aplicabilidade, pois mostra todos os compostos comercializáveis, sendo útil no processo de aquisição de compostos, já que especifica os fornecedores e os preços praticados no mercado. O Zinc database é uma base de dados de compostos comercialmente disponíveis, gratuita, acessível pela internet e adequada

para ensaios virtuais como a docagem molecular, já que os compostos estão representados em 3D, sendo possível ainda buscar por subestruturas, por compostos que são similares ou que tenham determinadas características desejadas pelo usuário. Atualmente, o Zinc database conta com uma coleção de cerca de 21 milhões de compostos. O PubChem é uma base de dados de moléculas e bioensaios, sendo que as moléculas depositadas existem, mas não são necessariamente comerciais. O PubChem conta, no total, com mais de 27 milhões de moléculas depositadas, sendo que 1,8 milhão das mesmas foram testadas por bioensaios *in vitro* e celulares tendo como alvo mais de 7000 genes e proteínas.⁵

Um problema comum durante os ensaios virtuais é que muitas vezes as estruturas das moléculas são disponibilizadas em 2D, enquanto que muitos dos ensaios virtuais exigem que as mesmas estejam representadas em 3D. Para que esse problema seja resolvido, é necessário mudar a forma com que as moléculas são representadas de 2D para 3D, e para tal podem ser utilizados programas como o Omega.⁶ Esse programa também tem aplicação para a geração de possíveis conformações de moléculas.

3.1.2 *Ensaios Virtuais*

Os ensaios virtuais (do inglês, virtual screening) formam uma etapa que é realizada *in silico* e tem como objetivo complementar etapas realizadas *in vitro*,⁷ já que durante o processo de descoberta de compostos que apresentam atividade biológica, a utilização de etapas racionais e bem fundamentadas, reduz custos e aumenta a probabilidade de descobrir compostos bioativos e, portanto, acelera o processo de desenvolvimento de novos fármacos. Os ensaios virtuais são dirigidos pelo conhecimento e logo, são dependentes de informação prévia a respeito de ligantes conhecidos e da estrutura tridimensional do alvo em estudo.⁸

A Quiminformática trata do gerenciamento, manipulação e otimização das propriedades úteis no processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. Esta é uma nova subárea da Química, que entra nesse contexto fornecendo técnicas computacionais, algoritmos confiáveis e acurados, e modelos preditivos que tornam a escolha dos compostos para testes biológicos um processo coerente. Já que tem se tornado evidente que ensaios *in vitro* “cegos” de coleções de centenas de milhares de compostos contra milhares de proteínas muitas vezes não geram resultados satisfatórios.⁸ Uma abordagem alternativa é realizar

simulações que buscam por compostos químicos que complementem o sítio que garante a atividade do alvo molecular.⁹

Na etapa de planejamento racional de substâncias bioativas podem ser aplicados diferentes tipos de ensaios virtuais, como os ensaios virtuais baseados na estrutura do receptor, (SBVS, do inglês, structure-based virtual screening) tais como a docagem molecular¹⁰ ou o “*de novo design*”¹¹ que partem do conhecimento da estrutura tridimensional do alvo macromolecular, e os ensaios virtuais baseados na estrutura do ligante, (LBVS, do inglês, ligand-based virtual screening), que exigem para sua execução o conhecimento de ligantes que interajam com o alvo macromolecular. Dentre esses métodos são incluídos aqueles baseados em similaridade, que comparam a similaridade química entre diferentes compostos, e aqueles nos quais são identificados farmacóforos, que são um conjunto de características eletrônicas e espaciais necessárias para que haja interação entre compostos com um determinado alvo macromolecular.¹² Outros ensaios virtuais que têm ganhado destaque são aqueles que procuram prever propriedades farmacocinéticas: absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET).¹³ Assim, essas estratégias têm o objetivo de reduzir e “enriquecer” coleções de compostos para serem utilizados em ensaios *in vitro*, ou seja, testando apenas os compostos que apresentam maior probabilidade de serem ativos e biodisponíveis por via oral.

3.1.3 *Planejamento baseado na estrutura do ligante*

É conhecido que compostos similares quanto à forma, tamanho ou distribuição eletrônica apresentam maior probabilidade de apresentarem semelhante atividade biológica. Partindo desse conhecimento, buscas que usam similaridade se tornaram muito frequentes em ensaios virtuais baseados na estrutura do ligante. Nesses ensaios um composto com conhecida atividade biológica se torna o composto referência e é comparado com cada composto de uma coleção virtual de compostos resultando em uma pontuação da similaridade e classificando as mesmas de acordo com um índice de similaridade.^{14,15}

A similaridade química pode ser mensurada por métodos topológicos (2D) ou que utilizam superposição (3D), sendo os métodos 2D são mais rápidos que os 3D. Isso ocorre, pois métodos 3D levam em consideração as conformações que podem ser adotadas pelos

compostos bem como a forma molecular. O programa ROCS (Rapid Overlay of Chemical Structures)¹⁶ realiza busca por similaridade em 3D alinhando e superpondo compostos de um banco virtual com um composto referência de forma a obter a superposição máxima dos volumes moleculares, os quais estão intimamente ligados com a forma molecular (Figura 3.1).

Figura 3.1 - Ilustração mostrando a superposição máxima do volume de dois compostos. A partir dos volumes moleculares sobrepostos é possível calcular a similaridade por forma molecular, sendo que o valor varia de 0 (sem sobreposição) a 1 (sobreposição perfeita).

Fonte: Adaptado de NICHOLLS, A. *et al.* Molecular Shape and Medicinal Chemistry: A Perspective. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 3863, 2010.

No processo de escolha dos compostos para testes biológicos, normalmente evita-se testar compostos com altíssima similaridade, de forma a explorar um conjunto mais diverso de potenciais ligantes, e com isso aumentar a diversidade do espaço químico.¹⁷ No estudo desenvolvido por Martin *et al.* é mostrado que em um grupo de compostos que apresentaram índice de similaridade maior que 0,85 (métrica de Tanimoto) com relação a um composto ativo têm probabilidade média de apresentar atividade biológica igual a 30%.¹⁸ Apesar de ser um valor alto quando comparado com ensaios do tipo HTS, ou até mesmo quando se utiliza outros ensaios virtuais, era esperado que as chances de que compostos altamente similares a um ativo de apresentarem atividade contra o mesmo alvo fossem maiores. Como apontado pelos autores deste trabalho, isso pode se dever a falhas na métrica que calcula o índice de similaridade entre os compostos, ou ao fato de que compostos altamente similares não necessariamente interagem da mesma forma com o alvo macromolecular.¹⁸

Uma interessante analogia descreve a similaridade como paisagens do relevo. Assim, para os compostos que não apresentam mudanças bruscas quanto à relação estrutura atividade (SAR), ou seja, possuem atividade semelhante mesmo com pequenas mudanças da estrutura química, o relevo apresenta aspecto suave, e dessa forma uma descrição quantitativa da

relação estrutura atividade (QSAR) se torna altamente viável e preditiva, o que é o ideal. Entretanto, sistemas assim são raros, prevalecendo aqueles nos quais pequenas mudanças estruturais nos compostos mudam o perfil de atividade de uma série de compostos. Por conseguinte, o relevo que descreve a atividade desses compostos apresenta aspecto altamente áspero, dificultando a construção de um modelo que descreva ou que possa prever a atividade biológica (Figura 3.2).¹⁹⁻²¹

Figura 3.2 - (a) fotografia que exemplifica um relevo de aspecto suave, o que descreve uma relação ideal entre estrutura e atividade de uma série de compostos, onde pequenas mudanças da estrutura não alteram significativamente a atividade. (b) fotografia de relevo de aspecto áspero, descrevendo uma relação estrutura e atividade que é encontrada mais facilmente, onde pequenas mudanças na estrutura podem alterar significativamente a atividade biológica.

Fonte: MAGGIORA, G. M.; SHANMUGASUNDARAM, V.; LAJINESS, M. S.; DOMAN, T. N.; SCHULTZ, M. W. A Practical Strategy for Directed Compound Acquisition. In: Chemoinformatics in Drug Discovery. Weinheim: Wiley-VCH, 2005. v. p. 315-332.

O objetivo primário de um ensaio virtual baseado na estrutura do ligante é identificar compostos que, partindo do composto referência, apresentem atividade biológica desejada e que representem novos quimiotipos ou esqueletos moleculares que ainda possuem desconhecida atividade biológica. Assim, há o desafio de escolher compostos que sejam similares ao de referência e que varram o máximo possível o espaço químico, ou seja, que apresentem um nível adequado de diversidade química.²² Sendo a diversidade química uma forma de definir a presença de diferentes tipos de estruturas químicas em uma coleção de compostos,²³ e o espaço químico definido como todas as possibilidades de compostos químicos.²⁴ Com o objetivo de aumentar a diversidade química do banco de dados e a probabilidade de encontrar inibidores deparando com novos esqueletos moleculares utiliza-se a estratégia de procurar por bioisósteros, que são compostos que apesar de possuírem

diferenças na estrutura química, exibem semelhante atividade biológica. Essa estratégia tem sido amplamente utilizada em laboratórios e indústrias farmacêuticas com objetivo de desenvolver novos análogos de fármacos ou compostos matrizes para adequar propriedades físico-químicas, melhorar o perfil farmacocinético e farmacodinâmico e por fim aumentar a diversidade química.²⁵

Diante dessa situação, quando se conhece a estrutura tridimensional do receptor e de compostos que interajam contra esse determinado alvo, recomenda-se a integração das abordagens de planejamento baseado na estrutura do ligante, no qual se utiliza o composto com conhecida atividade biológica para encontrar outros, e o planejamento baseado na estrutura do receptor, no qual se utiliza o receptor como “molde” para encontrar novos compostos bioativos. Diante disto, a construção de um modelo para encontrar compostos preditos a apresentarem atividade biológica (compostos que apresentam complementaridade estérica e eletrônica com o sítio ativo) e que varram um maior espaço químico se torna mais viável pela utilização dessas abordagens de forma integrada.²⁶⁻²⁸

3.1.4 *Ensaios virtuais baseados na estrutura do receptor*

Uma abordagem computacional bastante empregada é conhecida como ensaios virtuais baseados na estrutura do receptor (SBVS). Esta abordagem procura identificar e otimizar as interações entre ligantes e macromoléculas. A docagem molecular é a sua principal representante. Nesse método cada ligante de uma coleção de compostos tem seu modo de interação com o sítio ativo da macromolécula predito e após essa etapa um algoritmo mensura a interação entre os mesmos. Essa informação, que é uma estimativa da interação intermolecular, classifica os compostos levando em consideração as complementaridades estérica e eletrônica com o objetivo de permitir a seleção daqueles que são julgados como tendo maior probabilidade de serem complementares ao sítio de ligação (Figura 3.3). Para que sejam realizados esses ensaios é necessário o conhecimento da estrutura do receptor e dos critérios espaciais e energéticos responsáveis pela interação entre um candidato a ligante e o receptor sob investigação.²⁹ Entretanto, essa abordagem enfrenta alguns desafios como a amostragem conformacional de compostos flexíveis e o cálculo das energias de interação em meio aquoso. No entanto, esse método se mostrou promissor por libertar o planejamento de

compostos bioativos do empirismo, da busca por análogos de substratos e da modificação da estrutura química dos compostos de forma empírica, além de se mostrar superior quando comparado com essas estratégias. Outro aspecto a ser considerado é a maior diversidade química dos ligantes descobertos quando é utilizado esse método.⁹

Figura 3.3 - Representação do processo de docagem, no qual são escolhidos compostos preditos a interagirem com o alvo macromolecular para ensaios bioquímicos. Destaque é dado à complementaridade espacial entre ligante e receptor.

Fonte: Adaptado de SHOICHET, B. K. Virtual screening of chemical libraries. *Nature*, v. 432, n. 7019, p. 863, 2004.

Esses ensaios virtuais complementam técnicas experimentais e quando auxiliados pela biologia estrutural levam a um aumento significativo das taxas de sucesso em identificar compostos matrizes, que são compostos que são ativos e possuem grande potencial para otimização. Juntamente com o avanço das técnicas computacionais tem se verificado um rápido aumento do número de estruturas tridimensionais de alvos macromoleculares proveniente de técnicas como cristalografia por difração de raios X,³⁰ ressonância magnética nuclear (RMN)³¹ ou por modelagem por homologia,³² possibilitando planejar compostos que interajam com o sítio ativo do alvo e com isso interfiram no sistema biológico.

Os programas que realizam docagem molecular possuem dois diferentes algoritmos, um deles, o algoritmo de busca, que idealmente geraria exaustivamente todas as possíveis conformações dos ligantes que se orientariam para se ajustar à estrutura do sítio ativo da macromolécula, explorando todos os seis graus de liberdade rotacional e translacional do ligante e da proteína. Contudo, isso é impraticável já que estes programas têm como meta

permitir uma avaliação de milhares de compostos em um tempo computacionalmente curto e serem razoavelmente precisos.²⁹ O outro algoritmo, chamado de função de pontuação, tem como objetivo avaliar as interações e mensurar a energia livre de Gibbs das melhores “poses” do ligante no sítio ativo do alvo, ou seja, daquelas que têm melhor complementaridade eletrostática e espacial. Assim, é possível classificar as diferentes moléculas de acordo com suas energias livres de interação.³³

3.1.4.1 Algoritmos de Busca Conformacional

Existem diversos tipos de algoritmos de busca e de pontuação. Dentre os algoritmos de busca mais conhecidos podem ser incluídos os de busca sistemática, estocástica e por simulação. Dentre os métodos por busca sistemática se destaca o método de crescimento incremental, que se baseia numa busca por todo o espaço conformacional. Nesse método o ligante é dividido em um fragmento base, uma parte rígida da molécula que pode formar pelo menos uma interação com o alvo, que é “docado” no sítio depois de ter todo seu espaço conformacional varrido; e partes flexíveis, que apresentam maior flexibilidade que o fragmento base. Amostram-se seus graus de liberdade rotacional das partes flexíveis que então são acrescentadas de forma incremental no sítio ativo da macromolécula e fundidas subsequentemente com o fragmento base. Esse método tem como vantagem o fato de que uma busca conformacional de um fragmento, que apresenta menor flexibilidade, é muito menos computacionalmente dispendiosa que a de uma molécula com razoável flexibilidade. Esse algoritmo de busca conformacional é utilizado nos programas FlexX³⁴ e DOCK4.0.³⁵

Os métodos estocásticos operam realizando mudanças aleatórias nos ligantes e depois avaliando os mesmos. As duas abordagens mais utilizadas são aquelas que utilizam Monte Carlo e algoritmos genéticos. Algumas versões do programa AutoDock utilizaram ou a abordagem por algoritmos genéticos ou Monte Carlo para a busca conformacional dos ligantes.³⁶

Entre os métodos de simulação a abordagem mais utilizada é a baseada na dinâmica molecular. Essa abordagem é executada através de um campo de força de mecânica molecular como o AMBER,³⁷ OPLS³⁸ e outros. Nesse método o resultado é a solução das equações de movimento de Newton com objetivo de encontrar o mínimo global de energia do ligante

“docado” na macromolécula. Uma deficiência deste método é que frequentemente a trajetória de mínima energia do complexo ligante-proteína fica presa em um mínimo local. Para que esse problema possa ser superado uma alternativa é simular variações de temperatura deste sistema, o que pode retirar o sistema do mínimo de energia local. Assim, nesse método a qualidade do sistema que é utilizado como entrada interfere de modo significativo no resultado final.^{29,33}

3.1.4.2 Funções de Pontuação

As funções de pontuação buscam prever a energia de interação entre o ligante e macromolécula, e assim, fornecem um modo de discriminar os compostos com maior probabilidade de interagir com o alvo. Apesar de serem cruciais na docagem molecular, as mesmas ainda têm muito a evoluir, já que para que seja possível calcular um grande número de interações e simular o processo de reconhecimento molecular são feitas muitas simplificações e suposições, sendo exemplos os efeitos entrópicos e fenômenos de solvatação. Existem três diferentes tipos de funções de pontuação: Funções baseadas em campos de força, as empíricas e as baseadas no conhecimento.³³

Nas funções baseadas em campo de força é calculada a energia entre o ligante e macromolécula, sendo que o enfoque é dado nos termos energéticos eletrostáticos e de van der Waals. Os termos eletrostáticos são calculados em dependência da distância entre os átomos levando em conta as interações ditas Coulombianas, ou seja, que envolvem diferenças nas cargas eletrostáticas. As interações de van der Waals são modeladas pelos potenciais de Lenard-Jones, os quais podem levar a repulsões muito fortes. Essas funções são limitadas por não levarem em consideração a solvatação e os termos entrópicos, já que são formuladas para considerar apenas contribuições entálpicas que ocorrem em fase gasosa, superestimando as mesmas. Exemplos de programas de docagem que utilizam funções de pontuação baseadas em campo de força são o DOCK, o AutoDock e o Glide.³⁹

As funções de pontuação empíricas realizam a soma das interações individuais entre o ligante e a macromolécula, particularmente ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, e realiza uma extrapolação se ajustando a dados experimentais. Os termos dessas funções são derivados pela relação entre os valores da constante de dissociação (K_d) de

complexos ligante-macromolécula e das interações realizadas pelo ligante visualizadas através das estruturas cristalográficas dos mesmos complexos. As desvantagens dessa função de pontuação são a dependência do conjunto de informações experimentais para a construção do algoritmo e como os contatos repulsivos não podem ser percebidos na estrutura cristalográfica, alguns algoritmos levam em consideração apenas termos atrativos. No entanto, em alguns algoritmos foram adicionados termos repulsivos, corrigindo o problema supracitado.⁴⁰ Exemplos de funções de pontuação empíricas bastante conhecidas são o ChemScore⁴¹ e o LUDI.¹¹

As funções de pontuação baseadas no conhecimento são constituídas de análises estatísticas de estruturas obtidas experimentalmente, nas quais são realizadas análises em que determinados contatos entre determinados grupos são considerados como positivos ou negativos de acordo com a frequência com que estes contatos ocorrem na estrutura obtida experimentalmente. Uma função de pontuação baseada no conhecimento muito conhecida é a DrugScore.⁴²

3.1.4.3 O Programa Glide

O programa utilizado para a docagem molecular foi o Glide⁴³. Diferentemente de outros programas de docagem o Glide foi projetado para gerar e orientar as possíveis conformações das moléculas no sítio ativo da macromolécula realizando buscas exaustivas de suas posições e conformações. Apesar de realizar buscas exaustivas, o Glide é ágil o suficiente para realizar ensaios virtuais com coleções de milhares de compostos. Isso é devido à existência de uma série de filtros hierárquicos que rapidamente eliminam conformações inadequadas para a interação com o sítio ativo (Figura 3.4). Primeiramente é gerado um conjunto de conformações, que tem seu número variando de acordo com o número de ligações livres, tipicamente menos que 500 conformêmeros. Todas as conformações são “docadas”, sendo realizadas buscas exaustivas de orientações no sítio ativo da proteína para cada uma das conformações. A busca inicia com a seleção dos “site points” (Estágio 1), pontos que podem ocorrer interações, que são mensurados de acordo com a superfície do receptor e do ligante. Essas distâncias são classificadas como se fossem “caixas” (do inglês, bins) que têm largura igual a 1 Å. Da mesma forma as distâncias entre as superfícies do ligante são classificadas em

“bins”. Assim, para um dado “site point” as faixas de distância entre o “site point” do receptor são comparadas com as faixas de distâncias do “site point” do ligante, e caso ocorra correspondência suficiente entre as diferentes distâncias, a conformação é levada adiante, caso não ocorra, a mesma é eliminada. O segundo estágio inicia pela avaliação do posicionamento dos átomos do ligante que inserem dentro de uma determinada cavidade do receptor, assim nessa etapa é levado em consideração o diâmetro do ligante (Passo 2a). Se há muitos choques estereoquímicos com o receptor, a conformação é eliminada. No próximo passo (Passo 2b) é considerada a rotação sobre o diâmetro do ligante e as interações dos átomos capazes de realizar, como por exemplo, ligações de hidrogênio (Subteste). Se a pontuação for boa o suficiente, todas as interações com o receptor são pontuadas (Pontuação Generalizada). O último passo do estágio 2 (refinamento) é pontuar novamente as conformações mais bem pontuadas pelo passo anterior. Apenas um pequeno número das melhores poses passa no terceiro estágio dos filtros hierárquicos, que é a minimização dos “grids” eletrostáticos e de van der Waals para o receptor, que é feito utilizando o campo de força OPLS.⁴⁴

Figura 3.4 - Filtros hierárquicos empregados como algoritmo de busca pelo programa Glide.

Fonte: Adaptado de FRIESNER, R. A. *et al.* Glide: A new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 7, p. 1740, 2004.

Depois do fim da etapa de minimização são escolhidas de três a seis melhores conformações de menor energia que por sua vez são submetidas a uma simulação de Monte Carlo. Para a predição energia de interação entre o ligante e a macromolécula o Glide utiliza o GlideScore, uma modificação expandida do ChemScore.⁴¹

Comparações entre diferentes programas de docagem mostraram que o Glide foi superior quando comparado com o FlexX, ao Surflex⁴⁵ e o GOLD⁴⁶ na acurácia da docagem, mostrando menores valores de RMS quando compararam os resultados da docagem com os ligantes provenientes das estruturas cristalográficas dos complexos ligante-proteína.⁴³

3.2 Métodos Computacionais

Para melhor visualização, um fluxograma dos ensaios virtuais desenvolvidos nesse trabalho é mostrado a seguir:

Figura 3.5 - Fluxograma simplificado das atividades executadas nesse trabalho. Em laranja são mostrados os programas empregados e em lilás os bancos de dados virtuais, representando os arquivos de entrada e saída de cada antes e após cada etapa.

3.2.1 *Banco virtual de compostos*

Neste trabalho a construção foi baseada no fato de que alguns flavonoides, de forma mais específica, um flavonoide glicosilado apresentou atividade inibitória contra a GAPDH de *T. cruzi*. Dessa forma, foi buscado no Zinc e no eMolecules por compostos que apresentam como subestrutura flavonoides. Um subgrupo é constituído por flavonoides glicosilados. Ênfase foi dada nesses compostos devido à grande similaridade com o composto referência, o tilirosídeo. Entretanto, como discutido na seção 4.3.4, os flavonoides com menor massa molecular foram os mais potentes. Diante disto, foi empregada uma estratégia de simplificação molecular com o intuito de facilitar a busca de análogos e similares que estejam inseridos dentro das características fármaco similares. Além disso, o ganho de potência diminuindo a massa molecular do composto é algo desejável na Química Medicinal, pois permite o aumento da eficiência do ligante (seção 4.3.5) e torna o composto mais suscetível à otimização molecular.

O segundo banco virtual de compostos é formado por compostos preditos a serem bioisósteros de flavonoides, que foram obtidos pelo programa BROOD.⁴⁷ Os possíveis bioisósteros foram gerados por substituição de um fragmento da molécula referência por outros com propriedades semelhantes. A vantagem dessas substituições é a possibilidade que as mesmas dão ao químico medicinal de modular as propriedades físicas, químicas e biológicas de uma molécula enquanto que a atividade biológica primária é mantida, identificando substituições interessantes para a otimização do composto alvo. A desvantagem do programa é que os compostos gerados não necessariamente existem. Dessa forma, foram gerados diversos bioisósteros do tilirosídeo pela substituição do fragmento flavona do tilirosídeo (Figura 1.8). Como foi verificado que muitos dos bioisósteros do fragmento flavona não existiam, foi realizada uma busca virtual por compostos que tivessem com subestrutura algum fragmento que seja bioisótero do grupo flavona.

O terceiro banco virtual de compostos é baseado em três compostos que possuem como subestrutura o anel hidantoínico. Este é um novo esqueleto molecular identificado como inibidores da GAPDH de *T. cruzi* pelo Pos-doc do grupo Nequimed Dr. Josmar Rocha. Esses compostos não possuem correspondência direta com flavonoides, mas há trabalhos que relataram a existência de uma correlação entre a presença de estruturas que possuem carbonilas (sendo nesse caso específico, os compostos pertenciam às classes das

tiazolidinedionas, pirido[1,2- α]pirimidin-4-onas e flavonoides) em interagir com o receptor ERR- α (receptor relacionado ao estrogênio-alfa) atuando como agonistas ou antagonistas.⁴⁸

Primeiramente, como supracitado foram identificados três compostos (Nequimed 196, 204 e 212), sendo dois pertencentes à classe das hidantoínas e um da classe das pirrolidina-2,4-dionas, como inibidores da GAPDH de *T. cruzi* mostrando IC₅₀ na escala de médio a baixo micromolar. No entanto, o aspecto mais interessante desses compostos foi o fato de que apresentam características semelhantes com as de fragmentos moleculares, ou seja, são compostos com baixa complexidade e massa molecular, além de mostrarem alta eficiência do ligante. Assim, partindo do esqueleto básico de hidantoínas e heterociclos correlacionados como tio-hidantoínas e rodaninas foi construído um banco virtual de compostos que possuíssem esses fragmentos como subestruturas.

Para que se realizem ensaios virtuais é necessário, primeiramente, excluir compostos inapropriados e indesejados, sendo utilizados para tal os chamados filtros moleculares, que têm função de “enriquecer” uma coleção virtual de compostos e diminuir a taxa de insucesso em programas de desenvolvimento de fármacos.⁴⁹ Para executar tal tarefa foi utilizado o programa FILTER.⁵⁰ Como as coleções de compostos são bastante heterogêneas, diferentes filtros moleculares foram aplicados. O primeiro, o filtro denominado como fármaco-similar é derivado de diversos estudos retrospectivos que mostram as características que compostos devem possuir para serem similares aos fármacos quanto às propriedades supracitadas. Esse filtro foi aplicado aos bancos virtuais de flavonoides, bioisósteros de flavonoides e para os compostos hidantoínicos e similares. A escolha deste filtro para os flavonoides decorreu do fato de que um grande número de compostos tiveram como subestrutura uma das estruturas básicas que definem um composto como flavonoide, assim foi possível reduzir bastante o tamanho do banco retirando uma série de compostos indesejados. O segundo filtro, um filtro adaptado a partir do fármaco-similar, foi utilizado nas coleções de flavonoides glicosilados. Essa adaptação foi feita de forma a diminuir a restrição imposta pelo filtro, já que a maioria dos flavonoides glicosilados (incluindo o tilirosídeo) não atende a todas as especificações impostas por filtros fármaco-similares. As modificações feitas no filtro fármaco-similar são mostradas na Tabela 3.1.

As modificações são justificadas devido ao fato de que produtos naturais são exceções às regras que limitam os compostos como fármaco-similares.² Os parâmetros envolvidos com a predição de toxicidade, reatividade, formação de agregados, e outras

características indesejáveis dos compostos não foram alterados do filtro fornecido pelo programa.

Tabela 3.1. Modificações feitas no filtro de seleção de moléculas aplicado aos flavonoides glicosilados.

Propriedades do filtro molecular	Filtro fármaco-similar	Filtro adaptado
Massa molecular máxima	600 g.mol ⁻¹	700 g.mol ⁻¹
Número máximo de átomos diferentes de hidrogênio	35	50
Número máximo de anéis	6	8
Número máximo de átomos que participam de anéis	20	35
Numero máximo de átomos que não participam de anéis	15	25
Número máximo de grupos funcionais	18	20
Número máximo de ramificações	6	8
Número máximo de átomos de carbono	35	45
Número máximo de heteroátomos	20	25
Razão máxima entre o número de heteroátomos pelo número de átomos de carbono	1,0	1,25
Número máximo de rotações livres	20	30
Número máximo de ligações rígidas	35	40
Número máximo de átomos doadores de ligação de hidrogênio	5	10
Número máximo de átomos aceptadores de ligação de hidrogênio	10	15
Área superficial polar máxima	240	150

Para a geração das estruturas em três dimensões (3D) foi utilizado o programa Omega que primeiramente divide a molécula em fragmentos por programa auxiliar chamado de makefraglib. Depois de fragmentadas foram geradas as conformações desses fragmentos e a molécula foi reconstruída, mas dessa vez representada em 3D e em sua conformação de menor energia, sendo essa conformação gerada pelo campo de força MMFF94.⁵¹ Dessa forma, com o banco virtual de compostos feito, a próxima etapa é a realização dos ensaios virtuais. Para os ensaios de docagem molecular apenas uma conformação em 3D é gerada, já que o próprio programa de docagem considera o ligante como flexível já que o mesmo possui um algoritmo de busca conformacional. Como será discutido adiante, no caso dos ensaios

virtuais baseados na estrutura do ligante, foram geradas multiconformações de uma mesma molécula.

3.2.2 *Ensaaios virtuais baseados na estrutura do ligante*

Após o processo de filtragem e construção do banco virtual de compostos, foi utilizado o programa OMEGA para a geração de multiconformações de cada uma das moléculas do banco de dados. Essas multiconformações foram geradas de acordo com as delimitações impostas pelo programa, que podem ser personalizadas de acordo com o usuário. É mostrado por Boström *et al.* que o programa OMEGA é muito sensível às mudanças nos seus parâmetros quando se tem como objetivo a reprodução das conformações bioativas dos ligantes no momento em que estão interagindo com seu alvo macromolecular e que moléculas mais rígidas são menos sensíveis às mudanças destes parâmetros, sendo que moléculas com mais de oito ligações simples apresentam grande número de conformações de baixa energia, o que diminui a eficiência do programa.⁵² Como os compostos em estudo são complexos, grandes e muitas vezes com muitas ligações simples, os parâmetros do OMEGA foram adaptados de forma a permitir maior varredura do espaço conformacional e gerar grande número de confôrmeros, para que aumente a probabilidade de que a conformação bioativa de um determinado ligante esteja no banco de dados. As modificações mais importantes foram com relação ao número máximo de conformações geradas (400 confôrmeros), à quantidade de energia fornecida para que as moléculas explorassem seu espaço conformacional (25 kJ.mol⁻¹) e com relação ao RMS máximo entre as mesmas (0.8).

Partindo dos confôrmeros gerados pelo OMEGA foi utilizado o programa ROCS para superpor e pontuar as sobreposições entre as formas moleculares e dos átomos da coleção virtual de compostos com a molécula referência. A molécula referência para o banco de virtual de flavonoides (glicosilados e não glicosilados) foi o tilirosídeo; para o banco virtual de bioisósteros foi o flavonoide Nequimed 214, o mais potente da primeira geração; e para o banco virtual de hidantoínas e compostos correlacionados foi o Nequimed 204, que foi o composto mais potente entre os três previamente testados.

O programa ROCS utiliza funções Gaussianas centradas nos átomos para representar o volume, o que permite uma diminuição do número de sobreposições máximas, e assim o

mínimo global pode ser encontrado rapidamente. A pontuação dos compostos foi realizada de acordo com a métrica “Tanimoto Combo”, que é a soma das pontuações obtidas das funções “Shape Tanimoto” e “Color Tanimoto”, sendo que os valores se situam na faixa entre 0 e 2, sendo 2 o valor máximo. A pontuação “Shape Tanimoto” é calculada pela sobreposição das formas moleculares, variando de 0 a 1, sendo 1 o valor máximo. A pontuação “Color Score” é calculada de acordo com a sobreposição dos átomos de forma individual, levando em consideração a natureza dos átomos constituintes, sendo que os valores permanecem entre 0 e 1. Tem sido relatado que a pontuação “Color Score” tem grande importância no fator de enriquecimento do ROCS, além de que a seleção do composto referência influi de forma decisiva no resultado final e a conformação bioativa do composto referência não limitou a qualidade dos resultados obtidos.^{53,54} Como resultado tem-se uma avaliação da superposição da forma molecular e com isso obtendo uma classificação das moléculas com relação a um índice de similaridade.

Outra forma de mensurar similaridade é através da similaridade eletrostática em 3D é utilizando o programa EON. O programa EON usa a métrica de Tanimoto para comparar os potenciais eletrostáticos entre duas pequenas moléculas. As moléculas alinhadas pelo programa ROCS foram utilizadas como arquivo de entrada para o EON, e a similaridade eletrostática entre as moléculas e o tilirosídeo foram calculadas. Os potenciais eletrostáticos de diferentes compostos previamente alinhados pelo programa ROCS foram comparados com os compostos referência, tornando foi possível obter como resultado uma medida da similaridade eletrostática que varia de 0 a 1, sendo 1 o valor máximo.

Nesse tipo de abordagem os compostos têm suas estruturas alinhadas e superpostas com a estrutura referência, com conhecida atividade biológica, e as que apresentam alta similaridade com a relação à forma molecular, tipos de átomos e campo eletrostático são classificadas com altos valores de pontuação. Foi realizado um consenso entre a pontuação obtida do ROCS e do EON de forma a pontuar os compostos que apresentaram alta pontuação em todas essas métricas de similaridades.

3.2.3 *Ensaaios virtuais baseados na estrutura do receptor*

Como a docagem molecular é uma simulação do processo de reconhecimento molecular, é essencial que antes da realização da mesma sejam cumpridas algumas etapas para que o modelo possa ter maior probabilidade de acerto. Dentre essas etapas incluem a preparação e refinamento da macromolécula e a preparação do ligante. Como a qualidade dos resultados é dependente das estruturas iniciais, a preparação de uma macromolécula para a docagem molecular, geralmente uma proteína, envolve alguns passos como: i) remoção de moléculas de água, desde que não sejam moléculas de água estruturais, ou seja, moléculas de água ligadas à proteína permanentemente; ii) ajuste das cargas formais e ordens de ligação dos cofatores, ligantes e de íons metálicos e checagem da estrutura da proteína, pois muitas vezes existem choques estereoquímicos em estruturas proveniente do Banco de Dados de Proteínas (PDB, do inglês, Protein Data Bank),⁵⁵ que é um banco de dados onde estão depositadas as estruturas tridimensionais de diversas proteínas; iii) adicionar os átomos de hidrogênio polares, já que a estrutura cristalográfica não identifica átomos de hidrogênio; iv) definição de qual molécula é o ligante, para que este seja tomado como um referencial, já que o mesmo é subtraído da proteína para permitir o encaixe das moléculas do banco virtual durante a docagem. A outra etapa é a preparação das moléculas do banco virtual para a docagem, na qual como requisito primordial é necessário que as moléculas estejam sendo representadas em três dimensões (3D).

Na preparação da proteína para a docagem foi utilizado o Protein Preparation Wizard, uma das funções do pacote de programas Maestro,⁵⁶ no qual foram excluídas todas as moléculas de água; adicionados os átomos de hidrogênios polares; atribuídas as ordens de ligação; otimização das ligações de hidrogênio reorientando grupos hidroxila, amina, amida, além de selecionar os estados apropriados e orientações dos anéis imidazóis dos resíduos de histidina e foi realizada uma minimização utilizando o campo de força OPLS-2005.

Para que possam ser obtidos bons resultados é necessário que as moléculas que serão docadas sejam representadas na forma com que as mesmas ocorrem na realidade. Para tal, as mesmas devem estar representadas em 3D. A conformação de menor energia dos ligantes foi obtida através do programa OMEGA. Após esse processo os ligantes foram submetidos ao programa LigPrep⁵⁷ que produziu estruturas em 3D, com energia minimizada, quiralidade correta, além de produzir os estados de ionização entre o pH escolhido, que foi entre 7,0 e 9,0,

que representa a faixa de pH que será utilizado nos ensaios *in vitro*. Foram gerados também os possíveis tautômeros.

Na docagem molecular foi utilizada a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase do *Trypanosoma cruzi* obtida do PDB sob o código 1QXS.⁵⁸ Seu emprego nos ensaios virtuais é devido ao fato de que a mesma estar em sua forma holo e de possuir ligantes cocrystalizados nos dois sítios de ligação do sítio ativo, o NAD⁺ (cofator), e o S70 (análogo do produto). Além disso, a molécula S70 é um inibidor competitivo e nenhum desses ligantes se encontra ligado à enzima através de ligações covalentes, tornando-a mais viável para a busca por inibidores competitivos e evitando problemas nas etapas de preparação da estrutura da proteína.

Para que seja feita uma docagem é necessário que a forma e as propriedades do receptor sejam representadas na forma de um “grid”. Para a geração do grid foi utilizado o campo de força OPLS-2005. Nessa etapa são definidos os parâmetros que definem como será feita a docagem como: (i) qual o ligante que será utilizado como centro do grid e que é posteriormente excluído do receptor para a docagem; (ii) o tamanho do grid; (iii) restrições para a docagem, como restrições relacionadas com ligação de hidrogênio, hidrofóbica.; (iv) delimitação do centróide, que é a demarcação da região onde podem ser docadas as moléculas; (v) determinação de quais grupos que podem sofrer rotações e o dimensionamento dos raios de van der Waals. Sendo esses últimos responsáveis pela relativa flexibilidade do receptor durante a docagem (função implementada no Glide v.5.5). O ligante escolhido para ser o centro do “grid” foi o S70, sendo que o centróide ficou situado a uma distância de 20 Å do mesmo, dependendo do banco de compostos a ser docados, a molécula de NAD⁺ foi excluída, pois como as moléculas a serem docadas eram muito grandes, a docagem que utilizou o sítio da enzima com o NAD⁺ não se comportou bem, já que a molécula usualmente se situava muitas vezes fora do sítio de ligação do G3P, mas em geral foram realizadas docagens com e sem o NAD⁺ em seu subsítio. Para fazer o “grid” foi utilizada como restrição o resíduo de aminoácido Ser247, que na enzima humana é substituída pelo resíduo Ala232, e a Ser224 (Figura 3.6), sendo assim uma oportunidade de explorar seletividade. Entretanto, inicialmente a docagem foi feita sem restrições para que pudesse ser visto de maneira mais clara o posicionamento das moléculas no sítio ativo. O valor do dimensionamento dos raios de van der Waals foi ajustado para 1,0. Dessa forma, com o “grid” feito, o próximo passo é a docagem molecular.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Análise do sítio ativo da GAPDH de *T. cruzi*

As estruturas cristalográficas da GAPDH de *T. cruzi* e de humanos mostram grande semelhança (Figura 3.6a). Entretanto, no subsítio do G3P existem alguns resíduos de aminoácidos que se mostram promissores na busca por seletividade. Esses resíduos de aminoácidos são: Ser247, que interage com o S70, Ser224 e Asp210 (Figura 3.6b).

Figura 3.6 - (a) Superposição das estruturas cristalográficas das enzimas GAPDH humana (1U8F)⁵⁹ e de *T. cruzi* (1QXS). A GAPDH humana é mostrada em azul e a de *T. cruzi* em branco. Observar grande semelhança entre as mesmas. (b) Existem diferenças entre alguns resíduos de aminoácido da GAPDH, que enquanto na enzima de humanos são observados os resíduos de aminoácidos Ala232, Ala209 e Leu195 (em azul), na GAPDH de *T. cruzi* os mesmos estão substituídos pelos resíduos de Ser247, Ser224 e Asp210, respectivamente. Esses resíduos podem ser explorados para a busca de inibidores seletivos. São mostradas também em laranja as ligações de hidrogênio formadas entre o análogo do produto, o S70, com os resíduos Arg249, Ser247 e outros resíduos.

Os resíduos que se mostraram mais passíveis de explorar seletividade foram a Ser247 e a Ser224, pois o Asp210, que na humana é uma Leu195, se situa muito longe da região onde normalmente atua um inibidor competitivo, pois é um resíduo de aminoácido que se situa distante do sítio de interação do G3P. Para a inibição da enzima, um resíduo de aminoácido que apresenta bastante interesse é a Arg249, o qual tem sido relatado como estabilizador do substrato e tem importância na liberação do produto. Além disso, esse resíduo se encontra carregado positivamente, aumentando a possibilidade de reconhecimento de compostos aniônicos, orientado a seleção de compostos.⁶⁰ Outros sítios que podem ser explorados para o planejamento de inibidores são os dois sítios de reconhecimento de fosfato, sendo um deles do

fosfato inorgânico (P_i) e o outro do fosfato orgânico (ligado ao substrato G3P). Estes sítios apresentam como característica a presença de diversos resíduos de treonina e serina aptos para atuar como doadores de ligação de hidrogênio, ou seja, são sítios de reconhecimento de compostos aceitadores de ligação de hidrogênio ou mesmo aniônicos (Figura 3.7). Seria plausível acreditar que carboxilas interagissem em tais sítios com sucesso, inclusive em simulações computacionais compostos carboxilados interagem apresentando alta pontuação, mas quando se observa retrospectivamente os ligantes já testados nota-se que há alta taxa de falsos positivos associados a tais compostos. Assim, não é aconselhável uma série contendo apenas compostos carboxilados.

Figura 3.7 – (a) Representação tridimensional do ligante S70 cocristalizado junto com a GAPDH de *T. cruzi*. São mostrados os principais resíduos de aminoácidos formadores dos sítios de interação do fosfato inorgânico (à direita) e orgânico (à esquerda). (b) Representação bidimensional do S70 e de suas interações.

Outros resíduos de aminoácidos explorados foram a Ile13 e Tyr339 que se situam adjacentes ao anel nicotinamida do NAD^+ . De acordo com as simulações, muitos dos compostos analisados interagiram com esses resíduos de aminoácidos por meio de interações hidrofóbicas, especialmente ligantes com maior massa molecular e que possuem anéis aromáticos (Figura 3.8).

Figura 3.8 – (a) Representação tridimensional do NAD^+ cocrystalizado em seu sítio e de suas interações. (b) Representação bidimensional do NAD^+ destacando suas interações. Observar os contatos hidrofóbicos feitos pelo anel nicotinamida.

3.3.2 Ensaios virtuais baseados na estrutura do ligante

Para ter melhor visualização do perfil dos bancos virtuais de compostos quanto à similaridade com relação aos compostos utilizados como referências, são mostrados gráficos que mostram a distribuição dos mesmos de acordo com as métricas de Tanimoto Combo e EON Shape Tanimoto, as métricas utilizadas pelos programas ROCS e EON, respectivamente (Figura 3.9).

Figura 3.9. Distribuição dos compostos de diferentes bancos virtuais de compostos de acordo com os valores de similaridade por forma molecular calculada pelo programa ROCS e eletrostática calculada pelo programa EON.

Distribuição dos flavonoides de acordo com os valores de similaridade calculados pelo ROCS

Distribuição dos flavonoides de acordo com os valores de similaridade calculados pelo EON

Distribuição dos bioisósteros de acordo com os valores de similaridade calculados pelo ROCS

Distribuição dos bioisósteros de acordo com os valores de similaridade calculados pelo EON

Distribuição das hidantoínas e compostos correlacionados de acordo com os valores de similaridade calculados pelo ROCS

Distribuição das hidantoínas e compostos correlacionados de acordo com os valores de similaridade calculados pelo EON

Os menores valores de similaridade são aqueles mostrados pelos bioisósteros, já que as estruturas químicas dos mesmos apresentam maior variação com relação ao composto referência quando comparadas com os outros bancos virtuais de compostos. Nota-se que

utilizando a métrica de Tanimoto Combo, a pontuação obtida para os bioisósteros não é muito alta, mostrando valores que não ultrapassam 0,7, sendo o máximo igual a 2,0, enquanto que a similaridade eletrostática é razoavelmente alta, já que muitos compostos apresentam valores de pontuação entre 0,6 e 0,7, de um total de 1,0. Assim, para a seleção dos bioisósteros utilizando como parâmetro a similaridade química foi estabelecido um ponto de corte não muito alto, 0,6 para ambas as métricas.

No grupo de flavonoides não glicosilados é visto que os valores de similaridade por forma molecular são mais altos que os valores apresentados pelos bioisósteros, enquanto que para a similaridade eletrostática é menor. Foram estabelecidos como pontos de corte para seleção os valores de pontuação 0,8 para similaridade por forma molecular e 0,5 para similaridade eletrostática. Como esperado os valores de similaridade por forma molecular e eletrostática mostrados pelos flavonoides glicosilados são mais altos que os valores mostrados pelos flavonoides não glicosilados, uma vez que o composto referência para ambos os bancos é um flavonoide glicosilado, o tilirosídeo. Pode ser visto que uma parte considerável do banco apresenta similaridade por forma molecular maior que 1,0 e eletrostática maior que 0,7, entretanto como os flavonoides glicosilados são o menor grupo de compostos, um ponto de corte muito alto poderia restringir muito a quantidade destes compostos para posteriores análises, assim os valores de ponto de corte estabelecidos foram 1,0 para similaridade por forma molecular e 0,6 para similaridade eletrostática. Para o grupo dos compostos hidantoínicos e compostos que possuem anéis correlacionados foi estabelecido como ponto de corte para etapas posteriores os valores 1,2 para similaridade por forma molecular e 0,7 para similaridade eletrostática. De todos os bancos virtuais de compostos este foi o que apresentou maiores valores de ponto de corte. Isso é esperado, uma vez que o composto referência (Nequimed 204) é uma hidantoína como boa parte de banco, apresenta baixa complexidade molecular e este banco de compostos não apresenta diversidade química tão elevada quanto os outros, que são formados por produtos naturais (flavonoides) ou por diversas classes de compostos com potencial de serem bioisósteros de flavonoides.

3.3.3 *Ensaios virtuais baseados na estrutura do receptor*

A distribuição dos resultados da pontuação dos compostos dos três bancos virtuais de compostos é mostrada na Figura 3.10. Pode ser visto que os compostos mais bem pontuados são os bioisósteros e os flavonoides glicosilados, que mostraram energia livre de interação muitas vezes próxima de $-10 \text{ kcal.mol}^{-1}$, que em termos práticos corresponde a uma inibição da enzima na escala de nanomolar, como observado na Tabela 3.2. Para os bancos virtuais de flavonoides (glicosilados e não glicosilados) e bioisósteros foram tomados como ponto de corte o valor de pontuação igual ou menor que -6 kcal.mol^{-1} e para o grupo das hidantoínas e compostos correlacionados o ponto de corte foi para compostos com valor de pontuação menor ou igual a -5 kcal.mol^{-1} . Isso se deve ao fato de que esse banco apresenta compostos com menor massa molecular e também porque a quantidade de compostos com valores altos de pontuação não foi grande.

Dessa forma puderam ser selecionadas moléculas dos quatro grupos de compostos que possuem os maiores índices de similaridade e que apresentam os maiores valores de pontuação. Após a integração destes métodos se tornou possível a etapa de inspeção visual da complementaridade espacial entre as moléculas “docadas” com o sítio ativo da GAPDH, levando em consideração também a eficiência do ligante teórica bem como observar quais as interações são realizadas com o sítio ativo e com quais resíduos de aminoácidos, sendo o resíduo Ser247 bastante explorada nesse trabalho, já que a mesma pode levar à seleção de inibidores que mostrem seletividade com relação à GAPDH de humanos.

Figura 3.10. Distribuição dos compostos dos diferentes bancos virtuais de compostos de acordo com os valores de pontuação calculados pelo Glide.

Tabela 3.2. Relação entre constante de dissociação (K_d) e energia livre de interação (ΔG) em kcal.mol^{-1} .⁶¹

K_d (M)	ΔG_{bind} (kcal.mol^{-1})
10^{-3} (mM)	- 4.08
10^{-4}	- 5.44
10^{-5}	- 6.80
10^{-6} (μM)	- 8.16
10^{-7}	- 9.52
10^{-8}	- 10.87
10^{-9} (nM)	- 12.23
10^{-10}	- 13.59
10^{-11}	-14.95
10^{-12} (pM)	- 16.31

Fonte: Adaptado de COPELAND, R. A. Protein–ligand binding equilibria. In: Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism and data analysis. John Wiley, 2002. v. 1, p. 77.

A eficiência do ligante teórica é outro parâmetro que foi levado em consideração, pois é visto que a massa molecular de um composto está altamente correlacionada a sua potência. A eficiência do ligante pode ser calculada através da relação entre a energia livre de interação (ΔG_{bind}) pelo número de átomos diferentes de hidrogênio ou também chamados de pesados (HAC). Esse parâmetro será discutido em detalhes na seção 4.3.5.⁶²

Essa métrica se tornou muito útil, pois é uma maneira de normalizar a potência com a massa molecular de um composto.⁶³ Isto provê informação comparativa útil entre compostos com um intervalo definido de atividade de massa molecular. Kuntz *et al.* mostraram que a partir dos valores de afinidade de ligantes, a afinidade máxima por átomo em compostos orgânicos é 1,5 kcal mol⁻¹ por átomo pesado (outro que não átomo de hidrogênio).^{64,65} Dessa forma, a eficiência do ligante pode ser usada para avaliar a qualidade do ligante e também monitorar a sua otimização. Fármacos têm eficiência do ligante entre 0,3 e 1,5 e próximo de 0,3 estão a maioria dos fragmentos e compostos com características de ligantes; abaixo de 0,3 está à maioria das substâncias obtidas de programas de ensaio em massa (HTS). Em um processo de identificação de novas substâncias bioativas, os fragmentos ideais são aqueles em que a potência é independente da massa molecular. Isto representa a interação intermolecular obtida por reconhecimento molecular e não da interação fortuita.⁶³

3.3.4 *Inspeção visual*

Para a escolha dos compostos, foram levados em consideração os critérios descritos anteriormente quanto à similaridade por forma molecular e eletrostática, pelos valores de pontuação apresentados pela docagem, interação com resíduos de aminoácidos importantes para a catálise da enzima e complementaridade com o sítio de forma a ocupar a região ocupada pelo resíduo Cys166.

Para melhor visualização dos modos de interação dos compostos foram realizados ensaios de docagem molecular com e sem o cofator NAD⁺. A docagem sem o NAD⁺ se fundamenta, pois muitos dos compostos estudados, especialmente flavonoides glicosilados, exigem grande espaço no sítio para realizar interações com o mesmo, uma vez que são compostos com alta complexidade e massa molecular. As outras classes de compostos

estudadas foram analisadas com e sem o NAD^+ , sendo que em geral os compostos foram docados com melhor pontuação quando o NAD^+ não estava presente no sítio.

Na Figura 3.11 é mostrada uma molécula que possui como subestrutura um bioisótero da flavona, mostrou alto valor de pontuação pelo programa Glide e que apresenta alta complementaridade com sítio ativo da GAPDH de *T. cruzi* na ausência do NAD^+ . Puderam ser identificados sítios nos quais muitas moléculas interagiram, como por exemplo, na região hidrofílica ocupada pelos resíduos de aminoácidos Ser247, Arg249, Thr226 e Gly227 (lado direito da Figura 3.11a), que é o sítio de ligação do fosfato inorgânico e interação com o sítio de interação do fosfato orgânico, representado pela região hidrofílica delimitada pelos resíduos de aminoácidos Thr197 e Trh199 que formam ligações de hidrogênios com átomos doadores de ligação de hidrogênio das moléculas. No caso do composto Nequimed 345 além dessas interações, o fragmento quinolina se posicionou de forma a ocupar a região onde se situa o anel nicotinamida do NAD^+ , um sítio hidrofóbico formado pelos resíduos de aminoácidos Ile13 e Tyr339 (lado esquerdo na Figura 3.11a), que interage com regiões hidrofóbicas das moléculas. Entretanto, esse composto foi um exemplo de falso negativo, pois o mesmo se mostrou inativo nos ensaios bioquímicos (seção 4.3.6). Uma razão que pode ser levantada para esse falso positivo pode ser a alta energia necessária para a dessolvatação desse composto no meio aquoso, já que o mesmo possui duas carboxilas que se encontram negativamente carregadas nas condições de ensaio. Além do fato de que em simulações de docagem molecular as penalizações devido à perda de entropia não são bem delineadas. No entanto, houve compostos que corroboraram aquilo que era esperado através das simulações. Um exemplo foi o Nequimed 342 que aparentemente interage com sua carboxila no sítio de interação do fosfato inorgânico, delineado pelos resíduos de aminoácido Thr226, Thr167, Ser247 e Arg226 (Figura 3.12). Este composto se mostrou ativo nos ensaios *in vitro* apesar de ser carboxilado.

Figura 3.11. Representação da pose de um bioisótero (Nequimed 345) que apresentou alto valor de pontuação pela docagem molecular e mostrou alta complementaridade com o sítio ativo da GAPDH de *T. cruzi*. Observe que essa molécula ocupa a região onde se encontra a cisteína catalítica, interagindo com a mesma, e ligações de hidrogênio com os dois sítios de interação de fosfato (a) Representação tridimensional do composto no sítio e de suas interações. (b) Representação bidimensional do Nequimed 345 e de suas interações. Interações em vermelho são ligações de hidrogênio e em amarelo são hidrofóbicas.

Figura 3.12 – Representação do resultado da docagem molecular para o Nequimed 342. (a) Representação tridimensional do composto no sítio ativo da enzima e suas interações. (b) Representação bidimensional do compostos e de suas interações com alguns dos resíduos de aminoácidos que compõem o sítio ativo da enzima.

Os compostos pertencentes às classes das hidantoínas e de anéis correlacionados tiveram melhor pontuação e melhor ajuste ao sítio da enzima quando docados na ausência do NAD^+ . Isso indica que seus possíveis modos de interação sejam no sítio do NAD^+ . Um exemplo destes compostos é o Nequimed 325, que mostrou interagir com vários resíduos de aminoácidos hidrofóbicos como a Ile13, Val203 e Ala135, além de interagir diretamente com

o resíduo de cisteína catalítica (Cys166) e foi um dos compostos ativos dessa série. Sua estrutura não é mostrada, pois esse composto é um dos compostos enviados para ensaios futuros.

Observando os critérios adotados foram selecionados os compostos que passaram por todas essas etapas. Foram realizadas pesquisas no PubChem para conhecer os ensaios já realizados, no SciFinder para que se conhecesse a respeito de propriedades dessas moléculas como solubilidade em água e no eMolecules para que fosse verificada a disponibilidade comercial e fornecedores das mesmas. As estruturas dos compostos selecionados, adquiridos e testados são mostrados na Figura 3.13. São mostradas também as respectivas classes às quais os compostos pertencem e também os nomes baseado no banco de dados no grupo Nequimed.

Figura 3.13 – Ilustração dos compostos selecionados distribuídos de acordo com as classes químicas às quais os mesmos pertencem.

Pirrolidina-2,4-diona

(*)

Flavonoides

Nequimed 214

Nequimed 215

Nequimed 216

Nequimed 217

Nequimed 314

Nequimed 196

Pirido[1,2- α]pirimidin-4-onas

Nequimed 305

Nequimed 320

(*)

Nequimed 338

Nequimed 344

Benzotiazóis

Nequimed 307

Nequimed 309

Rodanina

Nequimed 327

Pirimidina

Nequimed 347

Tio-hidantoínas

Nequimed 212

Nequimed 310

Quinazolina

Nequimed 324

Quinazolidin-4-onas

Nequimed 308

Nequimed 343

Nequimed 315

Quinolinas

Nequimed 316

Nequimed 321

Nequimed 322

Nequimed 328

Nequimed 331

Nequimed 336

Nequimed 342

Nequimed 345

Nequimed 346

(*)Estruturas protegidas para que futuros ensaios sejam realizados.

Hidantoínas

(*) Estruturas protegidas para que futuros ensaios sejam realizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 MILLER, M. A. Chemical database techniques in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, n. 3, p. 220-227, 2002.

- 2 LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, n. 1-3, p. 3-25, 1997.

- 3 IRWIN, J. J.; SHOICHET, B. K. ZINC – A free database of commercially available compounds for virtual screening. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 45, n. 1, p. 177-182, 2004.

- 4 LI, Q.; CHENG, T.; WANG, Y.; BRYANT, S. H. PubChem as a public resource for drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 23-24, p. 1052-1057, 2010.

- 5 XIE, X. Q. S. Exploiting PubChem for virtual screening. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 5, n. 12, p. 1205-1220, 2010.

- 6 OMEGA. versão 2.0.1. Santa Fe: OPENEYE, 2008. 1CD-ROM.

- 7 BAJORATH, J. Integration of virtual and high-throughput screening. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, n. 11, p. 882-894, 2002.

- 8 KLEBE, G. Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations. **Drug Discovery Today**, v. 11, n. 13-14, p. 580-594, 2006.

- 9 SHOICHET, B. K. Virtual screening of chemical libraries. **Nature**, v. 432, n. 7019, p. 862-865, 2004.
- 10 LYNE, P. D. Structure-based virtual screening: an overview. **Drug Discovery Today**, v. 7, n. 20, p. 1047-1055, 2002.
- 11 BÖHM, H.-J. The computer program LUDI: A new method for the de novo design of enzyme inhibitors. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 6, n. 1, p. 61-78, 1992.
- 12 YANG, S.-Y. Pharmacophore modeling and applications in drug discovery: challenges and recent advances. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 11-12, p. 444-450, 2010.
- 13 VAN DE WATERBEEMD, H.; GIFFORD, E. ADMET *in silico* modelling: towards prediction paradise? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 3, p. 192-204, 2003.
- 14 HERT, J.; WILLETT, P.; WILTON, D. J.; ACKLIN, P.; AZZAOU, K.; JACOBY, E.; SCHUFFENHAUER, A. Comparison of topological descriptors for similarity-based virtual screening using multiple bioactive reference structures. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 2, n. 22, p. 3256-3266, 2004.
- 15 FRANKE, L.; SCHWARZ, O.; MÜLLER-KUHRT, L.; HOERNIG, C.; FISCHER, L.; GEORGE, S.; TANRIKULU, Y.; SCHNEIDER, P.; WERZ, O.; STEINHILBER, D.; SCHNEIDER, G. Identification of natural-product-derived inhibitors of 5-lipoxygenase activity by ligand-based virtual screening. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 11, p. 2640-2646, 2007.
- 16 ROCS. versão 2.4.1. Santa Fe: OPENEYE, 2009. 1CD-ROM.

17 MARSHALL, G. R. Introduction to chemoinformatics in drug discovery – A personal view. In: OPREA, T. I. (Ed.). **Chemoinformatics in drug discovery**. Weinheim: Wiley-VCH, 2005. v. 1, p. 1-22.

18 MARTIN, Y. C.; KOFRON, J. L.; TRAPHAGEN, L. M. Do structurally similar molecules have similar biological activity? **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 19, p. 4350-4358, 2002.

19 MAGGIORA, G. M.; SHANMUGASUNDARAM, V.; LAJINESS, M. S.; DOMAN, T. N.; SCHULTZ, M. W. A practical strategy for directed compound acquisition. In: OPREA, T. I. (Ed.). **Chemoinformatics in drug discovery**. Weinheim: Wiley-VCH, 2005. v. 1, p. 315-332.

20 STUMPFE, D.; BAJORATH, J. Exploring activity cliffs in Medicinal Chemistry. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 2932-2942, 2012.

21 MAGGIORA, G. M. On outliers and activity cliffs: why QSAR often disappoints. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 46, n. 4, p. 1535-1535, 2006.

22 FITZGERALD, S. H.; SABAT, M.; GEYSEN, H. M. Diversity space and its application to library selection and design. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 46, n. 4, p. 1588-1597, 2006.

23 WILLETT, P. Chemoinformatics - similarity and diversity in chemical libraries. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 85-88, 2000.

24 LIPINSKI, C.; HOPKINS, A. Navigating chemical space for biology and medicine. **Nature**, v. 432, n. 7019, p. 855-861, 2004.

25 LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 23-49, 2005.

26 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.

27 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.

28 CORTÉS-CABRERA, Á.; GAGO, F.; MORREALE, A. A reverse combination of structure-based and ligand-based strategies for virtual screening. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 26, n. 3, p. 319-327, 2012.

29 TAYLOR, R. D.; JEWSBURY, P. J.; ESSEX, J. W. A review of protein-small molecule docking methods. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 16, n. 3, p. 151-166, 2002.

30 BLUNDELL, T. L.; JHOTI, H.; ABELL, C. High-throughput crystallography for lead discovery in drug design. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, n. 1, p. 45-54, 2002.

31 PELLECCIA, M.; SEM, D. S.; WUTHRICH, K. NMR in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, n. 3, p. 211-219, 2002.

32 CAVASOTTO, C. N.; PHATAK, S. S. Homology modeling in drug discovery: current trends and applications. **Drug Discovery Today**, v. 14, n. 13-14, p. 676-683, 2009.

33 KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 11, p. 935-949, 2004.

34 RAREY, M.; KRAMER, B.; LENGAUER, T.; KLEBE, G. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. **Journal of Molecular Biology**, v. 261, n. 3, p. 470-489, 1996.

35 EWING, T. J. A.; MAKINO, S.; SKILLMAN, A. G.; KUNTZ, I. D. DOCK 4.0: Search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 15, n. 5, p. 411-428, 2001.

36 MORRIS, G. M.; GOODSELL, D. S.; HALLIDAY, R. S.; HUEY, R.; HART, W. E.; BELEW, R. K.; OLSON, A. J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of Computational Chemistry**, v. 19, n. 14, p. 1639-1662, 1998.

37 PEARLMAN, D. A.; CASE, D. A.; CALDWELL, J. W.; ROSS, W. S.; CHEATHAM III, T. E.; DEBOLT, S.; FERGUSON, D.; SEIBEL, G.; KOLLMAN, P. AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules. **Computer Physics Communications**, v. 91, n. 1-3, p. 1-41, 1995.

38 JORGENSEN, W. L.; TIRADO-RIVES, J. The OPLS potential functions for proteins. Energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 110, n. 6, p. 1657-1666, 1988.

39 FRIESNER, R. A.; BANKS, J. L.; MURPHY, R. B.; HALGREN, T. A.; KLICIC, J. J.; MAINZ, D. T.; REPASKY, M. P.; KNOLL, E. H.; SHELLEY, M.; PERRY, J. K.; SHAW, D. E.; FRANCIS, P.; SHENKIN, P. S. Glide: A new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 7, p. 1739-1749, 2004.

40 SCHULZ-GASCH, T.; STAHL, M. Scoring functions for protein-ligand interactions: a critical perspective. **Drug Discovery Today**, v. 1, n. 3, p. 231-239, 2004.

41 ELDRIDGE, M. D.; MURRAY, C. W.; AUTON, T. R.; PAOLINI, G. V.; MEE, R. P. Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 11, n. 5, p. 425-445, 1997.

42 GOHLKE, H.; HENDLICH, M.; KLEBE, G. Knowledge-based scoring function to predict protein-ligand interactions. **Journal of Molecular Biology**, v. 295, n. 2, p. 337-356, 2000.

43 FRIESNER, R. A.; BANKS, J. L.; MURPHY, R. B.; HALGREN, T. A.; KLICIC, J. J.; MAINZ, D. T.; REPASKY, M. P.; KNOLL, E. H.; SHELLEY, M.; PERRY, J. K.; SHAW, D. E.; FRANCIS, P.; SHENKIN, P. S. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 7, p. 1739-1749, 2004.

44 JORGENSEN, W. L.; MAXWELL, D. S.; TIRADO-RIVES, J. Development and testing of the OPLS All-Atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, n. 45, p. 11225-11236, 1996.

45 JAIN, A. N. Surflex: fully automatic flexible molecular docking using a molecular similarity-based search engine. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 4, p. 499-511, 2003.

46 VERDONK, M. L.; COLE, J. C.; HARTSHORN, M. J.; MURRAY, C. W.; TAYLOR, R. D. Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins: structure, function, and bioinformatics**, v. 52, n. 4, p. 609-623, 2003.

47 BROOD: fragment replacement for medicinal chemistry. versão 1.1.1. Santa Fe: OPENEYE, 2007. 1CD-ROM.

48 PENG, L.; GAO, X.; DUAN, L.; REN, X.; WU, D.; DING, K. Identification of pyrido[1,2- α]pyrimidine-4-ones as new molecules improving the transcriptional functions of Estrogen-Related Receptor α . **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 21, p. 7729-7733, 2011.

49 HODGSON, J. ADMET - turning chemicals into drugs. **Nature Biotechnology**, v. 19, n. 8, p. 722-726, 2001.

50 FILTER. versão 2.0.2. Santa Fe: OPENEYE, 2009. 1CD-ROM.

51 HALGREN, T. A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. **Journal of Computational Chemistry**, v. 17, n. 5-6, p. 490-519, 1996.

52 BOSTRÖM, J.; GREENWOOD, J. R.; GOTTFRIES, J. Assessing the performance of OMEGA with respect to retrieving bioactive conformations. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 21, n. 5, p. 449-462, 2003.

53 NICHOLLS, A.; MCGAUGHEY, G. B.; SHERIDAN, R. P.; GOOD, A. C.; WARREN, G.; MATHIEU, M.; MUCHMORE, S. W.; BROWN, S. P.; GRANT, J. A.; HAIGH, J. A.; NEVINS, N.; JAIN, A. N.; KELLEY, B. Molecular shape and medicinal chemistry: a perspective. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 3862-3886, 2010.

54 KIRCHMAIR, J.; DISTINTO, S.; MARKT, P.; SCHUSTER, D.; SPITZER, G. M.; LIEDL, K. R.; WOLBER, G. How to optimize shape-based Virtual Screening: choosing the right query and including chemical information. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, n. 3, p. 678-692, 2009.

55 BERNSTEIN, F. C.; KOETZLE, T. F.; WILLIAMS, G. J. B.; MEYER, E. F.; BRICE, M. D.; RODGERS, J. R.; KENNARD, O.; SHIMANOUCHI, T.; TASUMI, M. The protein data bank: A computer-based archival file for macromolecular structures. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 185, n. 2, p. 584-591, 1978.

56 MAESTRO. versão 9.1. New York: SCHRÖDINGER, 2009. 1CD-ROM.

57 LIGPREP. versão 2.3. New York: SCHRÖDINGER, 2009. 1CD-ROM.

58 LADAME, S.; CASTILHO, M. S.; SILVA, C. H. T. P.; DENIER, C.; HANNAERT, V.; PÉRIÉ, J.; OLIVA, G.; WILLSON, M. Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with an analogue of 1,3-bisphospho-d-glyceric acid. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 22, p. 4574-4586, 2003.

59 JENKINS, J. L.; TANNER, J. J. High-resolution structure of human d-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Acta Crystallographica Section D**, v. 62, n. 3, p. 290-301, 2006.

60 SOUZA, D. H. F.; GARRATT, R. C.; ARAÚJO, A. P. U.; GUIMARÃES, B. G.; JESUS, W. D. P.; MICHELS, P. A. M.; HANNAERT, V.; OLIVA, G. *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: structure, catalytic mechanism and targeted inhibitor design. **FEBS Letters**, v. 424, n. 3, p. 131-135, 1998.

61 COPELAND, R. A. Protein–ligand binding equilibria. In: COPELAND, R. A. (Ed.). **Enzymes**. New York: John Wiley, 2002. v. 1, p. 76-108.

62 HOLDGATE, G. A.; WARD, W. H. J. Measurements of binding thermodynamics in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 22, p. 1543-1550, 2005.

63 HOPKINS, A. L.; GROOM, C. R.; ALEX, A. Ligand efficiency: a useful metric for lead selection. **Drug Discovery Today**, v. 9, n. 10, p. 430-431, 2004.

64 KUNTZ, I. D.; CHEN, K.; SHARP, K. A.; KOLLMAN, P. A. The maximal affinity of ligands. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 18, p. 9997-10002, 1999.

65 GOHLKE, H.; KLEBE, G. Approaches to the Description and Prediction of the Binding Affinity of Small-Molecule Ligands to Macromolecular Receptors. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 41, n. 15, p. 2644-2676, 2002.

Capítulo 4

Ensaaios cinéticos e de inibição enzimática da GAPDH de T. cruzi e de humanos

Neste capítulo é apresentada uma introdução a respeito da cinética enzimática e das técnicas utilizadas para os ensaios. Além disso, são mostrados os métodos utilizados e os resultados obtidos.

4 ENSAIOS ENZIMÁTICOS

4.1 Cinética Enzimática

Descrições detalhadas da cinética e do mecanismo do funcionamento de enzimas surgiram apenas no decorrer do século XX. Em 1902, Brown sugeriu que para que ocorra uma reação catalisada pela enzima é necessária a existência de um complexo enzima-substrato,¹ sendo a reação descrita através do seguinte esquema:

Experimentos que verificaram aumento não linear da velocidade inicial da reação de acordo com o incremento da concentração de substrato e aumento linear da velocidade da reação proporcional ao acréscimo da concentração de enzima permitiram que Henri, em 1903, derivasse a primeira equação de velocidade geral que descreve reações catalisadas por enzimas. Em 1913, Michaelis e Menten confirmaram os experimentos de Henri e apresentaram uma versão modificada da equação. Essa equação, chamada de equação de Michaelis-Menten, representou um marco nos estudos de cinética enzimática, uma vez que é um modelo simples que descreve a cinética de uma reação catalisada por uma enzima.²

Este modelo assume que enzima (E), substrato (S), complexo enzima-substrato (ES) e produto (P) se encontram em um rápido equilíbrio e a velocidade de dissociação de ES em E + S é muito maior que a formação E + P, ou seja, k_{-1} é muito maior que k_2 . Portanto, a velocidade da reação (V) é limitada pela conversão de ES em E + P, ou seja, k_2 é a constante cinética da etapa lenta da reação. Assim:

Equação 2

$$V = k_2[ES]$$

Assume-se que a [S] é muito maior que [E] e, portanto, a formação de ES praticamente não altera a [S]. Além disso, a velocidade é mensurada durante estágios iniciais da reação de forma que a reação inversa não seja significativa.²

Briggs e Haldane, em 1925, derivou uma equação geral de velocidade que não requer a suposição da existência de equilíbrio entre E + S e ES, ao contrário da equação proposta por

Michaelis e Menten. Nesse modelo considera-se que logo após o início da reação a concentração do complexo ES permanece constante.² Como mostrado na equação a seguir:

Equação 3
$$\frac{d[ES]}{dt} = 0$$

Assim, assume-se a existência de um estado estacionário, e, portanto, a velocidade de formação de ES é igual à velocidade de seu consumo. Para a existência deste estado cinético é requerido que a concentração de substrato seja muito maior que a da enzima. A partir dessa suposição, com um pouco de álgebra, é possível derivar a equação de Michaelis-Menten na sua forma mais conhecida atualmente, que é mostrada a seguir:

Equação 4
$$V = \frac{V_{\max}[S]}{K_M + [S]}$$

Esta equação descreve a velocidade de uma reação catalisada por uma enzima como uma função hiperbólica da [S], sendo a velocidade máxima descrita através da seguinte equação:

Equação 5
$$V_{\max} = k_{\text{cat}}[E]_T$$

É demonstrado que a velocidade de transformação de um substrato em um produto não depende linearmente da concentração de substrato. Quando se analisa o curso de uma reação catalisada por uma enzima em diferentes concentrações iniciais de substrato, observa-se que a velocidade inicial em cada uma das reações aumenta até atingir um estado de saturação (Figura 4.1), ou seja, na presença de uma determinada concentração de substrato o acréscimo de mais substrato não causa aumento da velocidade inicial.

Um gráfico que relaciona as velocidades iniciais da reação com as respectivas concentrações de substrato (Figura 4.2) permite identificar regiões distintas: a primeira ocorre em baixas concentrações de substrato, na qual a velocidade aumenta linearmente com a concentração de substrato. Na segunda região, as velocidades se encontram em uma região intermediária, onde a velocidade exibe dependência curvilínea com relação à concentração de substrato. Na terceira região, na qual se observam altas concentrações de substrato, as velocidades se comportam de acordo com cinética de ordem zero. Esse fenômeno ocorre, uma vez que em baixas concentrações de substrato a concentração do complexo ES, que é limitante para a velocidade da reação, é diretamente proporcional à [S]. No entanto, em altas

concentrações de S, praticamente todas as enzimas estão na forma do complexo ES. Logo, a adição de mais substrato não leva a mudanças na velocidade da reação.

Figura 4.1 - Representação da relação entre a formação de produto no decorrer do tempo. Cada linha representa uma concentração de substrato diferente, e o aumento da concentração de substrato é linear. Observar que depois de um determinado momento, acréscimos da concentração de substrato não resultam em aumento da velocidade de formação do produto. A inclinação da reta é igual à velocidade de formação de produto.

Figura 4.2 - Gráfico que relaciona a velocidade de formação de produto de acordo com a concentração de substrato. O ajuste adotado foi de acordo com a equação de Michaelis-Menten, e como tal, assume forma de uma hipérbole retangular.

4.1.1 *Constantes Cinéticas: K_M , k_{cat} e Eficiência Catalítica (k_{cat}/K_M)*

4.1.1.1 K_M

A constante cinética K_M (constante de Michaelis-Menten) um parâmetro que está presente na equação de Michaelis-Menten (Equação 4) pode ser definida como sendo numericamente igual à concentração de substrato requerida para que a velocidade da reação seja igual à metade da velocidade máxima. Portanto, uma enzima que possui valor pequeno de K_M alcança máxima eficiência catalítica em baixas concentrações de substrato.

O valor de K_M varia bastante entre enzimas e entre diferentes substratos de uma enzima particular. Há variações também quando se altera a temperatura ou o pH do meio. O K_M pode também ser definido matematicamente através da equação a seguir:

Equação 6

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Caso k_2 seja muito menor que k_{-1} , o valor de K_M (uma constante cinética) torna-se próximo da constante de equilíbrio entre $E + S$ e ES . Dessa forma, o K_M tem sido considerado uma medida relativa da interação entre substrato e enzima.

4.1.1.2 k_{cat}

A constante catalítica k_{cat} é igual ao número de ciclos catalíticos que cada enzima realiza por unidade de tempo. Essa constante é definida matematicamente de acordo com a Equação 5, sendo igual à razão de V_{max} por $[E]_T$. O valor de k_{cat} reflete os passos químicos que estão posteriores ao passo de interação entre enzima e substrato. Dessa forma, diferentes valores de k_{cat} em uma mesma enzima refletem perturbações em sua estrutura tridimensional ou a presença diferentes substratos. Essas mudanças podem ser devido a mutações, alterações do pH, da temperatura, da força iônica, etc.¹

4.1.1.3 *Eficiência Catalítica (k_{cat}/K_M)*

A eficiência catalítica é definida matematicamente como a razão dos valores do k_{cat} pelo K_M . A eficiência catalítica é utilizada para comparar diferentes enzimas e diferentes substratos de uma determinada enzima. Esse parâmetro cinético é capaz de integrar em uma só constante, informações relacionadas com a interação entre a enzima e seu substrato e também do estado de transição. Sendo assim, a eficiência catalítica é considerada como a melhor medida da especificidade de um substrato.

4.1.2 *Inibição Enzimática*

Compostos químicos que interagem com enzimas competindo ou não com seu substrato de forma a reduzir ou bloquear sua atividade catalítica são referidos como inibidores enzimáticos. Primariamente, existem dois tipos de inibidores, os reversíveis e os irreversíveis. Inibidores reversíveis são aqueles que interagem com a enzima através de interações fracas. Esses inibidores se associam ou dissociam-se de acordo com a constante de equilíbrio do processo. Essa característica garante maior controle quando o mesmo é administrado em um organismo, e por isso, inibidores reversíveis são mais visados em projetos de desenvolvimento de fármacos. Inibidores irreversíveis são aqueles que se ligam covalentemente às enzimas, inativando-as, ou se ligando muito fortemente através de um grande número ligações fracas, de forma a ficarem permanentemente ligados.³ Existem vários inibidores enzimáticos irreversíveis na terapêutica, e ultimamente alguns inibidores irreversíveis têm se mostrado superiores aos reversíveis no tratamento de algumas doenças.⁴

4.1.2.1 *Inibidores Reversíveis*

Inibidores reversíveis são capazes de ligar de forma específica e com razoável afinidade a um alvo enzimático. A afinidade dessa interação está relacionada com a potência do inibidor e pode ser mensurada através da constante de dissociação. No caso particular de

interações entre enzimas e inibidores, a constante de dissociação é referida como K_i . No esquema a seguir são mostradas as relações entre enzima, inibidor, substrato e as constantes de dissociação que caracterizam o processo.

Figura 4.3 - Esquema que mostra o equilíbrio envolvido diferentes passos em uma reação enzimática na presença e na ausência de um inibidor.

Fonte: Adaptado de COPELAND, R. A. Reversible Inhibitors. In: Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis. John Wiley, 2002. v. 1, p. 268.

O fator α evidencia a influência do inibidor sobre a interação da enzima com o substrato, enquanto que o fator β demonstra a influência do inibidor sobre a formação de produto. Esses fatores variam de acordo com o modo de inibição. Existem diferentes modos de inibição reversível, dentre eles compreendem os modos: competitivo, não competitivo e incompetitivo.

4.1.2.1.1 Inibição Competitiva

Um inibidor competitivo é caracterizado por interagir apenas com a enzima livre. Geralmente essa interação ocorre na mesma região onde se liga o substrato. Esse modo de inibição é caracterizado por alterar o valor do K_M aparente, aumentando a concentração de substrato para que a reação atinja metade de $V_{\max}$, e por não influenciar o valor de $V_{\max}$. A inibição competitiva pode ser superada pela simples adição de substrato, já que o substrato é capaz deslocar o inibidor do sítio e a enzima se torna capaz de catalisar a reação.

Para identificar o modo de inibição é necessário realizar experimentos que relacionam a velocidade inicial da reação com a adição de substrato na presença de diferentes concentrações de inibidor. O estabelecimento das concentrações de inibidor que serão

utilizadas no ensaio cinético é baseado no conhecimento da influência deste inibidor sobre a cinética da enzima quando se mantém fixa a concentração de substrato, de preferência em um valor igual ao K_M . Isso é necessário porque um ensaio para determinação do modo de inibição é mais efetivo quando as concentrações escolhidas de inibidor sejam capazes de inibir a enzima em um intervalo entre 30 e 75% de inibição. Ou seja, antes de realizar um ensaio para verificar o modo de inibição é interessante verificar o percentual de inibição em diferentes concentrações de inibidor, de preferência um ensaio de IC_{50} . Estabelecidas as concentrações de inibidor para o ensaio, basta realizar experimentos que verificam a velocidade em função da concentração de substrato em diferentes concentrações de inibidor. Para cada concentração de inibidor é possível determinar o valor de K_M aparente e V_{max} aparente a partir dos ajustes não lineares da equação de Michaelis-Menten.³

A equação que define matematicamente a inibição competitiva é mostrada a seguir:

Equação 7
$$V = \frac{V_{max} [S]}{\alpha K_M + [S]}$$

Sendo que α é definido como:

Equação 8
$$\alpha = \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

Figura 4.4 - Representação que correlaciona a velocidade de uma reação catalisada por uma enzima em função da concentração de substrato em diferentes concentrações de inibidor. Conforme aumenta a concentração de inibidor é observado acréscimo do valor de α .

Fonte: Adaptado de VOET, D. V., VOET, J. G. Rates of Enzymatic Reactions. In: Biochemistry. John Wiley, 2011. v. 1, p. 494.

Além disso, para facilitar a visualização do modo de inibição é possível obter uma função linear através de um gráfico de duplos recíprocos, ou seja, que relaciona o inverso da velocidade pelo inverso da concentração de substrato. Esse gráfico é conhecido como gráfico de Lineweaver-Burk e já foi muito utilizado antes da utilização de computadores para obter os valores de $V_{\max}$, K_M , determinação dos valores de K_i , e revelar o modo de inibição. Esse gráfico é caracterizado por um padrão específico das retas que indica o possível modo de inibição e todos os parâmetros cinéticos da reação. Esse gráfico deve ser utilizado com precaução, pois tem a desvantagem de fornecer muito peso nos pontos onde a concentração de substrato é menor e com isso amplificar erros experimentais.⁵

Figura 4.5 - Gráfico de Lineweaver-Burk que exemplifica o padrão de retas que resultam de diferentes experimentos, sendo um deles na ausência de inibidor (reta verde) e os outros na presença de diferentes concentrações de um inibidor (retas azul e lilás).

Fonte: Adaptado de VOET, D. V., VOET, J. G. Rates of Enzymatic Reactions. In: Biochemistry. John Wiley, 2011. v. 1, p. 494.

A partir do padrão das retas infere-se que esse inibidor apresenta modo de inibição competitivo, pois não ocorre alteração no valor de $V_{\max}$ (todas as retas se cruzam no eixo $1/V$ no mesmo ponto) e há alteração no valor de K_M .

4.1.2.1.2 Inibição não Competitiva

Inibição não competitiva ocorre quando o inibidor interage com a enzima em sua forma livre ou quando complexada com seu substrato. Inibidores não competitivos não competem com o substrato pelo sítio ativo da enzima, se ligando em um sítio distinto. Portanto, esse tipo de inibição não pode ser superado pelo incremento da concentração de substrato, diminuindo o valor de $V_{\max}$, e o valor de K_M permanece o mesmo.

A inibição enzimática por um inibidor não competitivo pode ser descrita matematicamente pela seguinte equação:

Equação 9
$$V = \frac{V_{\max} [S]}{\alpha K_M + \alpha' [S]}$$

Sendo que o significado de α é mostrado na Equação 8 e o significado de α' é mostrado a seguir:

Equação 10
$$\alpha' = \left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i} \right)$$

O gráfico dos duplos recíprocos que representa o modo de inibição não competitivo é mostrado na Figura 4.6.

Figura 4.6 - Gráfico de Lineweaver-Burk que exemplifica o padrão de retas resultante de diferentes experimentos, na ausência de inibidor (reta verde) e presença de diferentes concentrações de um inibidor não competitivo (retas azul e lilás).

Diferentemente de um inibidor competitivo, o padrão de retas que caracteriza um inibidor não competitivo se comporta de forma que as mesmas se intercruzem à esquerda do eixo y. O gráfico também fornece valores da inclinação da reta ($\alpha K_M/V_{\max}$), do intercepto com o eixo $1/V$ ($\alpha'/V_{\max}$), do intercepto com o eixo $1/[S]$ ($-\frac{\alpha'}{\alpha K_M}$), como mostrado na Figura 4.6.

4.1.2.1.3 Inibição Incompetitiva

Inibidores incompetitivos se caracterizam por ligar exclusivamente ao complexo ES. O efeito deste tipo de inibição é de diminuir $V_{\max}$ e o K_M . Acredita-se que a ligação de um inibidor incompetitivo leve a uma distorção estrutural do sítio ativo tornando a enzima inativa. A equação que descreve a inibição incompetitiva é mostrada a seguir.

Equação 11

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + \alpha' [S]}$$

Da mesma forma que a inibição não competitiva, uma inibição incompetitiva não é superada pela adição de substrato. Observando a Figura 4.7 verifica-se que esse tipo de inibição não altera a inclinação da reta ($K_M/V_{\max}$), ou seja, uma série de gráficos de Lineweaver-Burk em várias concentrações de inibidor consiste de um conjunto de retas paralelas.

Figura 4.7 – Gráfico de Lineweaver-Burk característico de inibição incompetitiva.

Fonte: Adaptado de VOET, D. V., VOET, J. G. Rates of Enzymatic Reactions. In: Biochemistry. John Wiley, 2011. v. 1, p. 495.

4.1.3 *Calorimetria de Titulação Isotérmica*

A calorimetria de titulação isotérmica (ITC) é uma técnica bem descrita e amplamente utilizada para a determinação direta da variação de entalpia (ΔH), estequiometria (n) e da constante de associação (K_a) do processo de interação bimolecular. Através desse conhecimento é possível calcular a variação de entropia (ΔS) e a variação da energia livre de Gibbs (ΔG). Além disso, se o experimento for realizado em diferentes temperaturas é possível determinar a mudança da capacidade calorífica à pressão constante. Portanto, essa técnica é capaz de realizar uma caracterização completa da termodinâmica do processo de interação molecular.⁶

Essa técnica se baseia em um sistema composto por duas celas, uma de referência que contém apenas água ou tampão e outra, de amostra, que contém o sistema em estudo em constante agitação (Figura 4.8). Injeções de alíquotas de um ligante ou macromolécula que se associa ou reage com o componente que se encontra na cela de amostra leva a uma mudança na temperatura do sistema. Isso ocorre devido às trocas de calor decorrentes da diluição e do calor de interação entre as moléculas, no caso de experimentos que monitoram a associação entre moléculas; ou da diluição e do calor de reação, no caso de experimentos que monitoram uma reação química. A diferença de temperatura entre a cela de referência e a de amostra é medida, e uma determinada quantidade variável de calor é fornecida à cela de amostra de forma que a diferença de temperatura entre as celas seja igual a zero. Esse calor é registrado na forma de um termograma, que é o dado bruto obtido como resultado do calorímetro. No entanto, a ITC se mostrou uma técnica eficaz no monitoramento e para a determinação de parâmetros cinéticos de uma reação catalisada por uma enzima. Esse método é baseado na proporcionalidade entre a velocidade da reação e da potência térmica gerada. A velocidade de uma reação enzimática é medida através da mudança na potência térmica após a injeção de substrato. Se a reação gerar energia (exotérmica) o calorímetro deve fornecer menos energia para que a temperatura das celas seja a mesma, observado no termograma como uma deflexão. Inversamente, se a reação consome energia (endotérmica), o calorímetro deve fornecer uma quantidade de energia adicional para manter as condições isotérmicas, e, portanto, será observado uma inflexão no termograma. O calor (Q) medido pelo calorímetro em função do tempo (t) define a potência térmica (E).⁷

Figura 4.8 - Representação esquemática de um calorímetro de titulação isotérmica. (a) As celas de amostra e de referência permanecem na mesma temperatura. (b) Após a injeção ocorre variação da temperatura da cela de amostra, que leva a um fornecimento diferencial de energia à mesma de forma a compensar a diferença de temperatura. O resultado obtido é a diferença entre a potência térmica fornecida às celas de amostra e de referência de acordo com o tempo.

Fonte: Adaptado de LADBURY, J. E. Application of Isothermal Titration Calorimetry in the Biological Sciences: Things Are Heating Up! **Techniques Essay**, v. 37, n. 6, p. 885, 2004.

Equação 12

$$E = \frac{dQ}{dt}$$

A quantidade de calor associada com a conversão de n mol de substrato em produto é dada pela seguinte equação:

Equação 13

$$Q = n \cdot \Delta H_{\text{app}} = [P] \cdot V \cdot \Delta H_{\text{app}}$$

Na qual, ΔH_{app} representa a entalpia molar da reação que é obtida experimentalmente, V é o volume de solução na cela de amostra e P é a concentração molar de produto formado. Dessa forma, torna-se possível relacionar a potência térmica com a velocidade da reação (v), que é diretamente proporcional à concentração de produto formado. Assim, a velocidade por ser representada pela seguinte equação:

Equação 14

$$v = \frac{dP}{dt} = \frac{1}{V \cdot \Delta H_{\text{app}}} \cdot \frac{dQ}{dt}$$

Como resultado de um experimento cinético no calorímetro de titulação isotérmica é obtido um termograma que relaciona a potência térmica (requerida para que as celas permaneçam à mesma temperatura) com o tempo (Figura 4.9). A velocidade da reação é equivalente ao decréscimo na potência térmica (dQ/dt) após a injeção de substrato. No caso

ilustrado na Figura 4.9 a reação é exotérmica, uma vez que há diminuição da potência térmica, e o processo resultante da diluição é endotérmico, como evidenciado pelos picos no termograma.

Para estabelecer uma relação entre a potência térmica (dQ/dt) e a velocidade da reação enzimática ($\mu\text{M/s}$) é necessário que seja conhecida a entalpia molar aparente (ΔH_{app}). A ΔH_{app} pode ser determinada permitindo com que a reação termine, ou seja, que todo o substrato adicionado ao meio reacional seja consumido, e então integrando o sinal para obter o calor total envolvido na reação (Q_r). Como o substrato é completamente consumido, a potência térmica volta ao nível da linha de base. Finalmente, para a obtenção do valor de ΔH_{app} , é subtraído o calor total da reação pelo calor resultante da diluição (Q_d).

Figura 4.9 - Termograma obtido através de um ensaio calorimétrico de injeções múltiplas utilizando a enzima TcGAPDH. A diminuição da potência térmica (dQ_r/dt) é proporcional à velocidade com que a reação ocorre.

Existem dois métodos distintos para o cálculo da ΔH_{app} . Um deles, descrito por Todd e Gomez,⁷ estabelece que o substrato é injetado na cela de amostra que contém uma grande quantidade de enzima (Figura 4.10). A reação ocorre até a depleção total de substrato e há uma seguinte injeção de substrato na cela de amostra (que contém o produto) para verificar se há inibição pelo produto da reação. Caso as duas curvas sejam semelhantes, significa que não há inibição pelo produto da reação. O ΔH_{app} pode ser calculado pela seguinte equação:

Equação 15

$$\Delta H_{\text{app}} = \frac{1}{[S]_{\text{Total}} \cdot V} \int_{t=0}^{t=\infty} \frac{dQ(t)}{dt} dt$$

Figura 4.10 - Método para a determinação do calor total da reação com o substrato na seringa. Esse valor pode ser calculado pela integração da área da curva obtida.

Fonte: Adaptado de TODD, M. J.; GOMEZ, J. Enzyme Kinetics Determined Using Calorimetry: A General Assay for Enzyme Activity? **Analytical Biochemistry**, v. 296, n. 2, p. 181, 2001.

O outro método para obter o ΔH_{app} foi descrito por Bianconi.⁸ Nesse método a enzima, em alta concentração, é titulada sobre a cela de amostra de todo o substrato seja consumido. Após o término da reação, ocorre uma segunda injeção para a determinação do calor de diluição da enzima (Figura 4.11). O valor de ΔH_{app} pode ser obtido pela subtração do calor total da reação pelo valor do calor de diluição do substrato. Para obter o valor de ΔH_{app} molar, é necessário dividir o valor encontrado para o ΔH_{app} pelo número de mol de substrato presente na cela de amostra (n), como mostrado na Equação 15.

Equação 16

$$\Delta H_{\text{app, molar}} = \frac{Q_r - Q_d}{n}$$

Figura 4.11 - Método para a determinação do calor total da reação com a enzima na seringa. O valor de ΔH_{app} pode ser calculado pela diferença entre as áreas obtidas após a primeira e a segunda injeção.

Fonte: Adaptado de BIANCONI, M. L. Calorimetric determination of thermodynamic parameters of reaction reveals different enthalpic compensations of the yeast hexokinase isozymes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 21, p. 18711, 2003.

4.1.4 Fluorimetria

A fluorimetria é um tipo de luminescência caracterizada pela emissão de fótons em decorrência da passagem de um elétron do estado singlete para o estado fundamental. Como os elétrons se encontram emparelhados (spins contrários), essa transição torna-se permitida e por isso o fenômeno de fluorescência possui um tempo de meia vida muito curto, normalmente na escala de nanossegundos.

Uma forma de representar as possíveis transições de níveis de energia de elétrons e suas conseqüentes absorção ou emissão de fótons é através do diagrama de Jablonski (Figura 4.12).⁹

Figura 4.12 – Diagrama de Jablonski modificado. (S_0) estado fundamental; (S_1) primeiro estado excitado singlete; (S_2) segundo estado excitado singlete; (T_1) primeiro estado excitado tripleto; ($h\nu_A$) absorção de um fóton; ($h\nu_{FLU}$) emissão de fótons por fluorescência; ($h\nu_{FOS}$) emissão de fótons por fosforescência.

Fonte: Adaptado de LAKOWICZ, J. R. Introduction to Fluorescence. In: Principles of Fluorescence Spectroscopy. New York: Springer, 2006. v. 1, p. 5.

Nesse diagrama observa-se que a absorção de radiação por um composto pode levá-lo para um estado eletrônico distinto (S_1 , S_2 , etc.). Em cada um destes estados eletrônicos, esse composto pode existir em um determinado nível de energia vibracional (retas mais finas, 0, 1, 2). Na conversão interna, o fluoróforo, que estava excitado em um estado energético superior ao do primeiro estado singlete, rapidamente (10^{-12} s) relaxa para o estado S_1 . Como a fluorescência apresenta tempo de meia vida próximo de 10^{-8} s, a conversão interna ocorre antes da emissão de fótons. O fenômeno de fluorescência acontece quando a transição ocorre entre o primeiro estado excitado singlete e o estado fundamental. Quando ocorre esse

fenômeno há emissão de radiação, que possui energia menor que aquela absorvida pelo mesmo composto, ou seja, maior comprimento de onda. Isso ocorre devido à perda de energia quando a molécula sofre uma rápida transição para o nível vibracional de menor energia de S_1 , processo chamado de deslocamento de Stokes, ou então devido à colisão com solvente. Pode ainda haver o cruzamento intersistema, caracterizado pelo fato de um elétron no estado S_1 sofrer uma conversão de spin convertendo ao primeiro estado tripleto T_1 . A emissão de fótons decorrente da transição do estado T_1 para o S_0 é chamada de fosforescência.

Existem diversas sondas fluorescentes, sendo que muitas das mesmas são aplicadas em estudos cinéticos enzimáticos. Um exemplo de fluoróforo é o NADH, um dos produtos da reação catalisada pela GAPDH. Essa é uma sonda intrínseca, ou seja, participa do meio reacional, assim, para acompanhar a reação catalisada pela GAPDH não é necessário a adição de nenhum composto. O NADH absorve radiação eletromagnética no comprimento de onda de 340 nm e emite em 460 nm, sendo que sua forma oxidada, NAD^+ , não exhibe fluorescência. O grupo fluorescente é o anel nicotinamida reduzido, sendo a fluorescência do mesmo suprimida pela metade adenina presente na molécula de NADH. O tempo de meia vida de fluorescência do NADH em tampão é próximo de 0,4 ns enquanto que, quando ligado a proteínas, esse tempo prolonga para cerca de 1,2 ns. Portanto, torna-se possível acompanhar a cinética da GAPDH monitorando a formação de NADH.¹⁰ Deste modo, a espectroscopia de fluorescência é mais uma ferramenta que permite avaliar a cinética e a inibição de compostos químicos sobre a GAPDH.

4.2 Materiais e Métodos Experimentais

4.2.1 *Materiais*

Os reagentes utilizados nos ensaios cinéticos foram D,L-gliceraldeído-3-fosfato (D,L-G3P), o tampão ácido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinaetanosulfônico (HEPES), o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 2-mercaptoetanol, nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+), dimetilsulfóxido (DMSO), Triton X-100, todos adquiridos da empresa Sigma Aldrich, e o arseniato de sódio heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) da empresa Vetec. A água foi obtida através do sistema de purificação Milli-Q[®] da Millipore Corporation.

A enzima GAPDH de *T. cruzi* foi produzida seguindo o protocolo de expressão e purificação desenvolvido no grupo Nequimed.¹¹ Para tal, foram utilizados os reagentes meio de cultura Luria Broth (LB), tampões fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) e dibásico (Na_2HPO_4), cloreto de sódio (NaCl), e imidazol da empresa Sigma Aldrich, Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) da empresa Invitrogen, canamicina da empresa Calbiochem, a resina Ni-NTA para a coluna de afinidade adquirida da empresa Qiagen, e membrana de diálise Amicon da empresa Milipore.

Ensaio de determinação da concentração da enzima foram realizados utilizando o reagente de Bradford (corante Coomassie[®] Brilliant Blue G-250) da empresa Bio-Rad, seguindo o método de Bradford,¹² albumina sérica bovina (BSA) da empresa Sigma Aldrich como padrão, e filtros Whatman para filtrar a solução contendo o corante.

Foram adquiridos quatro compostos químicos da empresa Sigma Aldrich, três compostos da empresa Enamine, 42 da empresa Specs e um da empresa Princeton BioMolecular Research para testes de inibição contra a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) de *T. cruzi*. A enzima GAPDH de humanos utilizada nos testes de seletividade foi adquirida da empresa Sigma Aldrich.

4.2.2 *Procedimento Experimental*

Os experimentos de determinação dos parâmetros cinéticos da enzima GAPDH de *T. cruzi* e da constante de inibição (K_i) dos inibidores enzimáticos foram realizados no calorímetro de titulação isotérmica (ITC) modelo VP-ITC da empresa Microcal (Northampton, MA). Antes de iniciar os experimentos no calorímetro foram efetuadas lavagens com água MiliQ para remoção de contaminantes provenientes de outros ensaios. Quando necessário, de tempos em tempos, a cela foi lavada seguindo as recomendações da Microcal. As amostras para ensaio foram previamente desgaseificadas por um período de 5 minutos sob agitação constante no ThermoVac, uma bomba a vácuo com controle de temperatura. Esse procedimento é realizado com a finalidade de eliminar bolhas de ar na solução, que podem levar à formação de ruídos no sinal obtido pelo equipamento. A temperatura que foi estabelecida no ThermoVac foi 5°C inferior à temperatura na qual ocorreu o experimento (25°C), isso foi feito com objetivo de evitar um longo período de estabilização da linha base. Para preencher a cela de amostra e de referência foi utilizada uma seringa de 2,5 mL do tipo “gastight” (Hamilton). A solução foi injetada vagarosamente com o intuito de evitar a formação de bolhas. Foram preparadas soluções com volumes de 2 mL para o preenchimento da cela de amostra, que apresentam volume de 1,427 mL. Dessa forma, no final da injeção sobrou um pouco do volume de líquido no lado externo da cela, permitindo assim, a movimentação da seringa de 2,5 mL nos sentidos vertical e circular, para que fosse possível retirar todas as bolhas da amostra. Após esse processo, a seringa de 2,5 mL é posicionada sobre uma saliência na cela de amostra e o excesso de solução é retirado.

Outro componente necessário para a titulação é a seringa do calorímetro. Essa seringa apresenta volume de 284,21 µL. Antes do experimento foi realizada a lavagem da mesma com água MiliQ para remoção de contaminações. Após esse processo a mesma foi preenchida com a solução e purgada duas vezes para que não formassem bolhas. A velocidade de rotação da seringa foi estabelecida em 307 rpm e a temperatura dos experimentos em 25°C. A potência térmica foi registrada em função do tempo e os dados coletados pelo programa VPViwer.

4.2.3 *Determinação dos Parâmetros Cinéticos da Enzima GAPDH de T. cruzi*

Os parâmetros cinéticos da enzima com relação ao substrato G3P (K_M e k_{cat}) foram determinados tendo como base trabalhos anteriores realizados no grupo Nequimed.¹³ A seringa foi preenchida com solução de D,L-G3P 5mM em tampão contendo DMSO 5%, HEPES 100 mM, EDTA 1 mM e 2-mercaptoetanol 1 mM em pH 8,0. A cela de amostra foi preenchida com o mesmo tampão, NAD^+ 1,5 mM, $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$ 30 mM, DMSO 5%, e a enzima TcGAPDH na concentração de 5 nM em pH 8,0. Foram realizadas 25 injeções, cada uma de 4 μ L com duração de 8 segundos e intervalo entre injeções igual a 90 segundos.

Os parâmetros cinéticos da TcGAPDH com relação ao cofator NAD^+ (k_{cat} e K_M) foram determinados. Para tal, a seringa foi preenchida com NAD^+ 5 mM, DMSO 5% e tampão contendo HEPES 100 mM, EDTA 1 mM e 2-mercaptoetanol 1mM em pH 8,0. A cela de amostra foi preenchida com o mesmo tampão, D,L-G3P 1 mM, DMSO 5%, $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$ 30 mM, e a TcGAPDH na concentração de 5 nM. A titulação foi realizada através de 25 injeções de 3 μ L cada, com duração de 6 segundos, e intervalo entre injeções de 90 segundos.

A utilização de arseniato de sódio ao invés de fosfato é justificada pelo fato de que com o substrato natural o produto formado é o 1,3-bifosfoglicerato, que atua como inibidor da reação, além de evitar a reação contrária, que exigiria um modelo cinético mais complexo para a correta análise dos resultados. Quando se utiliza arseniato é formado o 1-arseno-3-fosfoglicerato que é rapidamente degradado a 3-fosfoglicerato em solução, diminuindo a inibição pelo produto da reação.¹⁴

4.2.4 *Ensaio de Inibição Enzimática (ITC)*

A avaliação da inibição e modo de inibição dos compostos selecionados por meio dos estudos *in silico* foi realizada preenchendo a seringa com o substrato D,L-G3P 5 mM (no caso estudos que avaliam a inibição competitiva no subsítio do G3P) ou com o cofator NAD^+ 5 mM (no caso de estudos que avaliam a inibição competitiva no subsítio do NAD^+), DMSO 5%, tampão HEPES 100 mM, EDTA 1 mM e 2-mercaptoetanol 1 mM em pH 8,0. A cela de

amostra foi preenchida com o mesmo tampão, D,L-G3P 1 mM, (no caso de avaliação de inibição no subsítio do G3P), NAD^+ 1,5 mM (no caso de avaliação de inibição no sítio do cofator NAD^+), DMSO 5%, $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 30 mM, e a TcGAPDH na concentração de 5 nM. A titulação foi realizada através de 25 injeções de 4 μL (G3P na seringa) ou 3 μL (NAD^+ na seringa) e intervalo entre injeções de 90 segundos.

Previamente aos experimentos de avaliação da inibição enzimática, foram realizados experimentos controle. Em seguida, os ensaios de inibição foram realizados nas mesmas condições que os ensaios controle. Nos ensaios de inibição o composto teste era adicionado juntamente com o DMSO na cela de amostra em concentrações maiores ou iguais a 50 μM . A adição de DMSO é necessária para a dissolução dos compostos testes, já que muitas vezes moléculas orgânicas não solubilizam bem em água. Sendo descrita anteriormente a influência desse co-solvente na cinética da reação catalisada pela GAPDH de *T. cruzi*.¹³

4.2.5 *Análise dos Dados*

Neste trabalho, os experimentos foram realizados no mínimo em duplicata. De forma geral, os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados obtidos por meio de ensaios cinéticos no ITC foram coletados e analisados usando o programa Origin 7.0,¹⁵ por meio do modo ensaio enzimático seguindo o método 2, apenas substrato. Como a reação catalisada pela TcGAPDH libera um átomo de hidrogênio, o valor obtido de ΔH_{app} utilizando um tampão não representa o ΔH decorrente apenas da reação, mas também da ionização. Dessa forma, no grupo Nequimed o valor de ΔH utilizado para calcular os parâmetros cinéticos enzimáticos no ITC se baseou em um trabalho, no qual foram obtidos vários valores de ΔH_{app} em diferentes tampões com calores de ionização conhecidos, podendo assim, descontar o fenômeno de ionização, obtendo apenas ΔH da reação.

Os dados obtidos do programa Origin 7.0 foram então exportados para o programa SigmaPlot 10.0.1¹⁶ para a determinação dos parâmetros cinéticos da TcGAPDH através do ajuste não linear dos mínimos quadrados da equação de Michaelis-Menten, e para a determinação da constante de inibição (K_i) dos compostos testados, bem como do possível modo de inibição. Para a determinação dos valores de K_i e dos modos de inibição dos

compostos testados foram realizados ajustes não lineares dos dados experimentais com relação às equações que determinam os modos de inibição competitivo, não competitivo e incompetitivo.

4.2.6 *Ensaio de Inibição Enzimática (Fluorímetro)*

Os ensaios de percentual de inibição e de IC_{50} foram realizadas em um fluorímetro da empresa BioTek (modelo Synergy HT). Os ensaios fluorimétricos foram conduzidos em placas de 96 poços, sendo os ensaios realizados em triplicata. Os ensaios de IC_{50} foram realizados em tampão Hepes 100 mM em pH 8,0, DMSO 5% (v/v), NAD^+ 200 μ M, D,L-G3P 400 μ M, ou seja, D-G3P 200 μ M, TcGAPDH 2 nM, $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$ 30 mM e Triton X-100 0,01% (v/v), sendo o último componente necessário para evitar a formação de agregados e, assim, evitar resultados falso-positivos. Para a realização desses experimentos foi preparada a solução com os componentes supracitados exceto o DMSO e o $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$. O DMSO foi introduzido de forma separada poço por poço, já que o mesmo continha o inibidor. O inibidor em DMSO estava em uma concentração de seis mM nos ensaios de percentual de inibição e na concentração de 20 mM nos ensaios de IC_{50} . Dessa forma, como foram adicionados 10 μ L de DMSO em um meio reacional com volume igual a 200 μ L, o inibidor se encontrava em uma concentração de 300 μ M nos ensaios de percentual de inibição. Para a realização dos ensaios de IC_{50} foram preparadas diluições seriadas de duas vezes, assim as concentrações testadas foram da maior para a menor: 1000 μ M, 500 μ M, 250 μ M, 125 μ M, 62,5 μ M, 31,25 μ M, 15,62 μ M, 7,81 μ M, 3,9 μ M, 1,95 μ M, e 0,98 μ M. Assim, foi adicionado 140 μ L da solução contendo todos os componentes, exceto o arseniato, em 10 μ L de DMSO puro (ensaio controle positivo) e 10 μ L de DMSO com inibidor dissolvido. Por fim, para a ativação da reação foi adicionado 50 μ L de arseniato à concentração de 30 mM no meio reacional. Foi medida a velocidade inicial em cada poço durante um período de tempo de 5 minutos, à sensibilidade de 80 %, medindo a velocidade inicial em uma unidade arbitrária de RFU/s, sendo levados para a análise os 10 primeiros pontos da reta. O programa utilizado para recolher as informações do fluorímetro foi o Gen5 e para a análise dos dados foi utilizado o programa Origin 7.0. Os dados foram ajustados de acordo com o modelo de dose-resposta.

Para realizar os ensaios de determinação de K_i e do modo de inibição dos compostos realizados no fluorímetro foram utilizados os mesmos materiais e reagentes utilizados para a determinação dos valores de IC_{50} . Esses ensaios foram realizados utilizando Hepes 100 mM em pH 8,0, DMSO 5% (v/v), NAD^+ 1500 μ M, Triton X-100 0,01% (v/v), TcGAPDH 2 nM e $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$ 30 mM. O substrato que teve sua concentração variada foi o G3P, sendo que as soluções foram preparadas seguindo uma diluição seriada de duas vezes, assim no meio reacional as concentrações de G3P foram: 1000 μ M, 500 μ M, 250 μ M, 125 μ M, 62,5 μ M, 31,25 μ M, 15,62 μ M, 7,81 μ M, 3,9 μ M e 1,95 μ M. Dessa forma, a solução contendo G3P foi adicionada separadamente, seguida da adição dos outros componentes do meio reacional e por último, para iniciar a reação foi adicionado o arseniato. Foi medida a velocidade inicial em cada poço durante um período de tempo de 5 minutos, sendo levados para a análise os 10 primeiros pontos da reta. O programa utilizado para recolher as informações do fluorímetro foi o Gen5 e para a análise dos dados foi utilizado o programa SigmaPlot 10.

4.2.7 *Ensaio de Seletividade frente à GAPDH de Humanos*

Para realizar os ensaios de determinação de K_i dos compostos empregaram o tampão Hepes 100 mM em pH 8,0, DMSO 5% (v/v), NAD^+ 1500 μ M, Triton X-100 0,01% (v/v), HsGAPDH 1 nM e $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$ 30 mM. A concentração da HsGAPDH foi determinada a partir da absorbância no comprimento de 280 nm, sendo seu coeficiente de extinção molar calculado igual a 119640. O substrato que teve sua concentração variada foi o G3P. As soluções foram preparadas seguindo uma diluição seriada de duas vezes, assim no meio reacional as concentrações de G3P foram: 1000 μ M, 500 μ M, 250 μ M, 125 μ M, 62,5 μ M, 31,25 μ M, 15,62 μ M, 7,81 μ M e 3,9 μ M. A solução contendo G3P foi adicionada separadamente, seguida da adição dos outros componentes do meio reacional e por último, para iniciar a reação foi adicionado o arseniato. Foi medida a velocidade inicial em cada poço durante um período de tempo de 5 minutos, sendo levados para a análise os 10 primeiros pontos da reta. O programa utilizado para recolher as informações do fluorímetro foi o Gen5 e para a análise dos dados foi utilizado o programa SigmaPlot 10.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 *Determinação dos Parâmetros Cinéticos da TcGAPDH com Relação ao Substrato G3P*

Observando o termograma na Figura 4.9 é possível inferir que a reação catalisada pela TcGAPDH é exotérmica, pois há uma estabilização da linha base em um nível inferior. Esse fenômeno ocorre porque menor quantidade de calor deve ser fornecida na cela de amostra para que a mesma se mantenha na mesma temperatura da cela de referência. Observa-se que com o decorrer das injeções a diferença na potência térmica diminui, isso ocorre devido à saturação dos sítios ativos da enzima pelo substrato em excesso.

Partindo desse conhecimento foi possível realizar estudos cinéticos através do monitoramento contínuo do calor liberado em uma reação enzimática. É mostrada a influência de múltiplas injeções do substrato G3P sobre a velocidade da reação catalisada pela TcGAPDH. O primeiro ponto do termograma é excluído, pois o mesmo não mostra reprodutibilidade em diferentes experimentos.

Dessa forma, é possível acompanhar a catálise da TcGAPDH em diferentes concentrações de G3P. Essa informação é necessária para uma descrição quantitativa da catálise enzimática. Deste modo, ajustando-se os dados a um modelo quantitativo como o de Michaelis-Menten (Figura 4.13), torna-se possível a determinação de parâmetros cinéticos da enzima com relação ao substrato com concentração variável (Tabela 4.1). Em estudos como esse, no qual a enzima apresenta substrato e cofator, é necessário que os componentes que não tenham suas concentrações variadas estejam em uma concentração muito elevada, para que a enzima siga cinética de pseudo primeira ordem com relação ao componente em menor concentração.

Figura 4.13 - Ajuste não linear dos dados obtidos pelo ITC ao modelo de Michaelis-Menten.

Tabela 4.1. Parâmetros cinéticos calculados para a enzima TcGAPDH com relação ao substrato G3P.

Parâmetros	Valores	95% Intervalo de confiança
$V_{\max}$ ($\mu\text{M s}^{-1}$)	$0,804 \pm 0,003$	0,798 a 0,810
K_M (μM)	$28,73 \pm 0,42$	27,89 a 29,58
k_{cat} (s^{-1})	$172,00 \pm 0,47$	
k_{cat}/K_M ($10^6 \times \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	5,99	
R^2		0,997
Sy.x		6×10^{-3}

Sy.x: desvio padrão dos resíduos; R^2 : Ajuste dos dados experimentais ao modelo.

4.3.2 *Determinação dos Parâmetros Cinéticos da TcGAPDH com Relação ao Cofator NAD^+*

O sítio catalítico da TcGAPDH possui dois subsítios distintos, o de ligação do cofator NAD^+ e o de ligação do substrato G3P. Para uma caracterização completa da cinética da reação catalisada pela GAPDH foram realizados ensaios que verificaram a velocidade da reação variando as concentrações do cofator NAD^+ , mantendo a de G3P constante e muito alta. Desta forma, foi possível determinar os parâmetros cinéticos da TcGAPDH com relação ao NAD^+ através do ajuste não linear dos dados de acordo com a equação de Michaelis-Menten (Figura 4.14).

Figura 4.14. Ajuste não linear dos dados obtidos pelo ITC ao modelo de Michaelis-Menten.

Os valores dos parâmetros cinéticos da TcGAPDH com relação ao cofator NAD⁺ foram calculados e são mostrados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Parâmetros cinéticos calculados para a TcGAPDH com relação ao cofator NAD⁺.

Parâmetros	Valores	95% Intervalo de confiança
$V_{\max}$ ($\mu\text{M s}^{-1}$)	$0,596 \pm 0,001$	0,593 a 0,599
K_M (μM)	$14,14 \pm 0,23$	13,67 a 14,61
k_{cat} (s^{-1})	$125,00 \pm 0,17$	
k_{cat}/K_M ($10^6 \times \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	8,84	
R^2		0,994
Sy.x		$4,2 \times 10^{-3}$

Comparando os resultados dos estudos cinéticos observa-se que o valor do K_M do NAD⁺ é menor que o valor do K_M do G3P. Isso mostra que a TcGAPDH tem maior afinidade pelo cofator do que pelo seu substrato. O valor da $V_{\max}$ da reação catalisada pela TcGAPDH com o NAD⁺ variando sua concentração é menor que o $V_{\max}$ da reação quando o G3P tem sua concentração variada. Consequentemente, o valor do k_{cat} da reação quando o NAD⁺ tem sua concentração variada é menor que o k_{cat} da reação quando o G3P tem sua concentração variada. Como a eficiência catalítica é igual à razão do k_{cat} pelo K_M , no caso do NAD⁺, os valores tanto do numerador quanto do denominador diminuem com relação aos valores observados para o G3P. Por conseguinte, observa-se que não há grande alteração da eficiência catalítica da enzima quando são avaliados o substrato e o cofator nos estudos cinéticos.

4.3.3 *Estudos de Inibição Enzimática (1ª geração)*

Na primeira etapa desse trabalho foram selecionados ligantes preditos a interagir com a TcGAPDH, sendo testados quatro compostos químicos. Inicialmente, foi avaliada a inibição dos flavonoides com relação ao subsítio do G3P e ao subsítio do NAD⁺. Os dados experimentais com relação ao subsítio do G3P e os compostos testados são mostrados na Figura 4.15.

4.3.4 *Estudos de Inibição Enzimática no Subsítio do G3P (1ª geração)*

Os quatro flavonóides foram ensaiados contra a enzima GAPDH de *T. cruzi*, tornando possível a determinação dos valores das constantes de inibição dos mesmos. Esses foram obtidos utilizando o programa SigmaPlot 10 no modo “análise cinética enzimática” através do ajuste não linear dos dados obtidos.

Na Tabela 4.3 é mostrada a comparação entre os valores de K_M obtidos no experimento controle e na presença do composto teste, os valores de K_i dos compostos testados e os modos de inibição que apresentaram melhores ajustes com relação aos parâmetros estatísticos.

Figura 4.15. Ajuste dos dados à curva de Michaelis-Menten para os compostos testados no subsítio do G3P. Estão representadas as estruturas químicas. I = 0, ausência de inibidor; I = 50, presença de inibidor na concentração de 50 μM , I = 100, presença de inibidor na concentração de 100 μM . (a) Nequimed 214; (b) Nequimed 215; (c) Nequimed 216; (d) Nequimed 217.

Tabela 4.3. Valores comparativos dos valores de K_M na presença e ausência de inibidor, valores de K_i^{app} e o mecanismo de inibição com relação ao subsítio do G3P.

Compostos	K_M (μM)	K_i^{app} (μM)	Modo de inibição
Nequimed 214	$57,64 \pm 4,47$ ($22,21 \pm 1,31$)	$55,07 \pm 4,56$	Competitivo
Nequimed 215	$23,23 \pm 0,47$ ($17,81 \pm 0,29$)	$101,38 \pm 5,29$	Competitivo
Nequimed 216	$14,90 \pm 0,56$ ($20,03 \pm 0,85$)	$397,28 \pm 21,30$	Não competitivo
Nequimed 217	$62,57 \pm 2,33$ ($37,13 \pm 1,93$)	$633,96 \pm 25,57$	Não competitivo

Entre parênteses estão os valores de K_M do experimento controle.

Os parâmetros estatísticos dos dados referentes à Tabela 4.3 estão descritos na Tabela 4.4.

Tabela 4.4. Parâmetros estatísticos dos ajustes dos estudos experimentais.

Compostos	AICc^a	R²	Soma dos Quadrados	Sy.x^b	Valor teste p^c
Nequimed 214	-583,50	0,959	0,202	0,047	< 0,001
Nequimed 215	-749,47	0,980	0,036	0,019	<0,001
Nequimed 216	-761,19	0,970	0,032	0,018	<0,001
Nequimed 217	-870,10	0,992	0,010	0,010	<0,001

^a Parâmetro relacionado ao ajuste do modelo aos dados experimentais. Quanto menor o valor, melhor o ajuste.

^b Este parâmetro quantifica o tamanho dos resíduos, e quanto menor o seu valor melhor será o ajuste dos dados na regressão não linear. ^c Quanto menor o valor de p, melhor o ajuste do modelo estatístico.

Dentre os compostos testados contra o subsítio do G3P, o Nequimed 214 foi o que mostrou maior potência, apesar de ser o composto com menor massa molecular. Portanto, a eficiência do ligante do Nequimed 214 é muito superior à dos outros flavonoides testados, especialmente quando comparada ao composto de partida, o tilirosídeo. Dessa forma, a etapa de simplificação molecular foi proveitosa, já que foi possível verificar inibição enzimática com potência próxima à apresentada pelo tilirosídeo mesmo quando foram testados esqueletos moleculares muito mais simples e menores que o do mesmo. Assim, a simplificação molecular da estrutura do tilirosídeo em uma subestrutura do mesmo facilitou a seleção por outros compostos que são preditos a interagir com a TcGAPDH, e possibilita futuras otimizações, além de permitir seleções de compostos que se adequem às propriedades físico-químicas adequadas para uma possível administração oral.

Os dois compostos com estrutura mais simples e menor massa molecular agiram como inibidores competitivos no subsítio do G3P. Esses resultados indicam que esses inibidores interagem de forma a competirem com o substrato natural prejudicando a interação do mesmo e consequentemente dificultando a formação do complexo enzima substrato. Contudo, os outros dois compostos testados, flavonoides glicosilados, inibem a TcGAPDH mostrando modos de inibição não competitivos com relação ao subsítio do G3P. É provável que eles não alterem a ligação entre a enzima e seu substrato, mas promovam modificações conformacionais que prejudiquem a catálise enzimática.

4.3.4.1 Estudos de Inibição Enzimática no Subsítio do NAD^+

Com a finalidade de validar os estudos de modo de inibição os mesmos compostos foram testados contra o subsítio do NAD^+ . Curvas que comparam o controle (ensaio sem inibidor) com experimentos com inibidor são mostrados na Figura 4.16.

Na Tabela 4.5 é mostrada a comparação entre os valores de K_M obtidos no experimento controle e na presença do inibidor, os valores de K_i dos compostos testados e os modos de inibição que apresentaram melhores ajustes com relação aos parâmetros estatísticos.

Figura 4.16. Ajuste dos dados à curva de Michaelis-Menten para os compostos testados no subsítio do NAD^+ . Estão representadas as estruturas químicas. I = 0, ausência de inibidor; I = 100, presença de inibidor na concentração de 100 μM . (a) Nequimed 214; (b) Nequimed 215; (c) Nequimed 216; (d) Nequimed 217.

Tabela 4.5. Valores comparativos dos valores de K_M na presença e ausência de inibidor, valores de K_i^{app} e o modo de inibição com relação ao subsítio do NAD^+ .

Compostos	K_M (μM)	K_i^{app} (μM)	Modo de inibição
Nequimed 214	$28,71 \pm 0,57$ ($14,14 \pm 0,23$)	$61,13 \pm 2,31$	Competitivo
Nequimed 215	$30,03 \pm 0,87$ ($18,72 \pm 0,80$)	$181,29 \pm 12,80$	Competitivo
Nequimed 216	$14,90 \pm 0,56$ ($20,03 \pm 1,66$)	$1282,52 \pm 78,63$	Não competitivo
Nequimed 217	$23,03 \pm 1,66$ ($43,59 \pm 3,26$)	$447,37 \pm 34,13$	Incompetitivo

Entre parênteses estão os valores de K_M do experimento controle.

Na Tabela 4.6 são mostrados os parâmetros estatísticos referentes aos dados apresentados na Tabela 4.5.

Tabela 4.6. Parâmetros estatísticos dos ajustes dos estudos experimentais.

Compostos	AICc ^a	R ²	Soma dos Quadrados	Sy.x ^b	Valor teste p ^c
Nequimed 214	-920,17	0,988	0,006	0,008	<0,001
Nequimed 215	-858,72	0,980	0,011	0,011	<0,001
Nequimed 216	-861,67	0,966	0,011	0,011	<0,001
Nequimed 217	-674,81	0,917	0,077	0,029	<0,001

^a Parâmetro relacionado ao ajuste do modelo aos dados experimentais. Quanto menor o valor, melhor o ajuste.

^b Este parâmetro quantifica o tamanho dos resíduos, e quanto menor o seu valor melhor será o ajuste dos dados na regressão não linear. ^c Quanto menor o valor de p, melhor o ajuste do modelo estatístico.

De forma a confrontar com os resultados anteriores, o mecanismo de inibição que apresentou melhor ajuste para os compostos Nequimed 214 e Nequimed 215 foi o competitivo para o subsítio do NAD^+ . De forma inesperada, ambos mostraram o mesmo mecanismo de inibição mesmo em sítios distintos. Espera-se, portanto, que esses compostos interajam em uma região que prejudique tanto a ligação do substrato quanto do cofator, uma vez que os subsítios não são definidos precisamente, ou seja, o sítio ativo da TcGAPDH é contínuo, e para a catálise enzimática é necessário que o NAD^+ e o G3P se aproximem.

4.3.4.2 Estudos de Variação da Concentração dos Inibidores da Enzima TcGAPDH

Para confirmar o modo de inibição dos flavonoides testados o ensaio de inibição foi repetido em diferentes concentrações dos inibidores. Três dos compostos em estudo foram testados em diferentes concentrações com relação ao subsítio do G3P (Figura 4.17). Através do ajuste não linear das curvas de Michaelis-Menten foi possível determinar o quanto cada inibidor se ajusta aos modelos competitivo, não competitivo e incompetitivo. Além disso, para melhor visualização, os dados foram ajustados ao modelo linear de Lineweaver-Burk. Na Tabela 4.7 são mostrados os ajustes e o modo de inibição mais provável de cada inibidor.

Figura 4.17 – Ajuste dos dados à curva de Michaelis-Menten e de Lineweaver-Burk para os compostos testados no subsítio do G3P em diferentes concentrações. Estão representadas as estruturas químicas. O primeiro composto é o Nequimed 214, o segundo composto é o Nequimed 215 e o terceiro é o Nequimed 216.

Tabela 4.7 – Modo de inibição que melhor se ajustou aos dados obtidos experimentalmente e parâmetros estatísticos do ajuste.

Compostos	Modo de inibição	AICc ^a	R ²	Sy.x ^b
Nequimed 214	Competitivo	-1193,74	0,987	$1,57 \cdot 10^{-2}$
Nequimed 215	Não competitivo	-989,73	0,925	$7,49 \cdot 10^{-2}$
Nequimed 216	Não competitivo	-1189,48	0,983	$1,58 \cdot 10^{-2}$

^a Parâmetro relacionado ao ajuste do modelo aos dados experimentais. Quanto menor o valor, melhor o ajuste.

^b Este parâmetro quantifica o tamanho dos resíduos, e quanto menor o seu valor melhor será o ajuste dos dados na regressão não linear.

Esses dados permitiram inferir que o modo de inibição do Nequimed 214 é competitivo com relação ao sítio do G3P, que no caso da TcGAPDH apresenta maior interesse, pois há resíduos de aminoácidos distintos da GAPDH de humanos, permitindo futuros estudos que buscam seletividade. Apesar de pequena diferença estrutural entre os flavonoides Nequimed 214 e Nequimed 215, experimentalmente não foi possível determinar de forma inequívoca o mecanismo de inibição do Nequimed 215. Se forem consideradas as concentrações de 0, 100 e 300 μM do Nequimed 215 os dados experimentais se ajustam melhor para o modelo de inibição competitiva, mas quando se consideram todas as diferentes concentrações os dados experimentais do Nequimed 215 se ajustam melhor ao modelo de inibição não competitiva.

Na Tabela 4.7 é possível observar que apesar dos dados experimentais se ajustarem melhor ao modelo não competitivo, nota-se que o valor de R² não foi satisfatório para poder inferir a respeito de seu modo de inibição. O outro flavonoide testado em diferentes

concentrações apresentou modo de inibição não competitivo com um valor alto de R^2 . Assim, foi possível determinar o modo de inibição de dois flavonoides estruturalmente distintos, já que um deles contém um resíduo de açúcar. Portanto, por meio desses estudos foi possível verificar a influência de um resíduo de açúcar (poliidroxilado) na interação entre os compostos e a enzima.

Uma vez que não é conhecido o modo de interação entre nenhum flavonoide e a TcGAPDH, ou seja, ainda não existem estruturas cristalográficas conhecidas do complexo da enzima com flavonoides em seu sítio, esses estudos fazem parte de uma investigação para tentar entender o modo de inibição de flavonoides e principalmente, em qual subsítio os mesmos interagem. Tal abordagem foi necessária uma vez que com essa informação foi possível retroalimentar o modelo computacional com informações experimentais, permitindo planejar compostos com maior embasamento.

4.3.5 *Eficiência do Ligante (1ª geração)*

A eficiência do ligante (LE) leva em consideração a contribuição de cada átomo diferente de hidrogênio para a interação entre o ligante e o alvo macromolecular. Assim, esse parâmetro pode ser utilizado para determinar a qualidade dos ligantes obtidos em um ensaio inicial.¹⁷ A eficiência do ligante é definida matematicamente de acordo com a equação a seguir:

$$\text{Equação 17} \quad LE = -\frac{\Delta G}{HAC} = -\frac{RT \ln K_i}{HAC}$$

Sendo que ΔG representa a energia livre de Gibbs, R é a constante universal dos gases, T a temperatura na qual o experimento é realizado, e HAC o número de átomos diferente de hidrogênio. Um valor de eficiência de ligante que tem sido considerado adequado para otimizações é 0,3. Ou seja, cada átomo do ligante tem que contribuir na média com 0,3 kcal.mol⁻¹ para a interação. Essa métrica é amplamente utilizada, pois é visto que a massa molecular de um composto está altamente correlacionada a sua potência. Assim sendo, essa métrica não visa somente a potência em si, mas sim por interações específicas com o alvo macromolecular. Nesse sentido, a eficiência do ligante é uma maneira de normalizar a potência com a massa molecular de um composto.

Com os resultados obtidos foi possível verificar que os flavonoides testados apresentaram maior eficiência do ligante que a do tilirosídeo (LE = 0,14), especialmente aqueles que possuem menor massa molecular (Tabela 4.8).

Tabela 4.8. Eficiência do ligante dos flavonoides testados contra o subsítio do G3P.

Compostos	MM (g mol ⁻¹)	HAC	K_i^{app} (μM)	LE (kcal mol ⁻¹ átomo ⁻¹)
Nequimed 214	270,24	20	55,07 ± 4,56	0,29
Nequimed 215	276,24	21	101,38 ± 5,29	0,26
Nequimed 216	464,39	33	397,28 ± 21,30	0,16
Nequimed 217	448,38	32	633,96 ± 25,57	0,16

MM: massa molecular; HAC: número de átomos diferentes de hidrogênio; LE: eficiência do ligante

O composto Nequimed 214 apresentou eficiência do ligante maior que a dos outros flavonoides testados, é uma estrutura molecular simples e possui massa molecular não muito alta. Essas características a torna uma molécula com potencial para otimizações tanto para aumento de potência quanto para aprimorar características físico-químicas que levem à melhoria do perfil farmacocinético dos compostos selecionados.

4.3.6 Estudos de Inibição Enzimática (2ª geração)

Um dos ensaios que possibilitam quantificar a inibição é o ensaio de IC₅₀, (concentração do composto necessária para inibir a enzima em 50%), que é obtido a partir de uma curva dose-resposta, descrito matematicamente pela equação a seguir.

Equação 18
$$\% \text{ de inibição} = 100 \cdot \left(1 - \frac{v_i}{v_0}\right)$$

Sendo que v_i e v_0 são as velocidades iniciais da reação na presença e na ausência de inibidor.

Esse método tornou-se popular por se adequar muito bem a ensaios em larga escala e, fazendo uso de diluições seriadas do inibidor, conseguir varrer a influência de um inibidor em várias ordens de magnitude de concentrações.

Entretanto, o ensaio de IC_{50} apresenta alguns problemas, especialmente relacionados com a reprodutibilidade em diferentes condições experimentais. Dessa forma, uma série de compostos deve ser ensaiada na mesma condição experimental para que os valores de IC_{50} de diferentes compostos possam ser comparados entre si. Além disso, a concentração do substrato influi nos valores de IC_{50} , inclusive, caso seja realizado ensaios nos quais são variadas as concentrações de substrato é possível determinar o modo de inibição de um inibidor (Figura 4.18).¹⁸

Nesse ensaio, caso a adição de substrato leve a um aumento do valor de IC_{50} , significa que o substrato e o inibidor competem pelo mesmo sítio da enzima, caracterizando assim, um inibidor competitivo. Se a concentração de substrato for diminuída e consequentemente houver aumento do valor de IC_{50} é indicativo de que o inibidor é incompetitivo, já que o mesmo interage apenas com o complexo enzima-substrato. Se não houver aumento do IC_{50} decorrente do incremento ou da diminuição da concentração de substrato, pode-se inferir que o inibidor é não competitivo.³

Figura 4.18 – Variando a razão entre $[S]/K_M$ é possível determinar o modo de inibição de inibidores enzimáticos através da mudança dos valores de IC_{50} .

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

Uma forma de representar curvas de dose-resposta é através de um gráfico que relaciona o percentual de inibição com o logaritmo da concentração do inibidor (Figura 4.19).

Geralmente, esse tipo de curva apresenta um padrão sigmoide, com o IC_{50} definido como o ponto médio da curva. Essa curva é caracterizada por apresentar dois platôs, um deles em baixas concentrações de inibidor e o outro em altas concentrações de inibidor.

Figura 4.19 – Curva de dose-resposta do inibidor Nequimed 204 frente à TcGAPDH.

Caso seja conhecido o modo de inibição, a concentração de substrato utilizada no ensaio e o valor de K_M , é possível estabelecer uma relação matemática entre os valores de IC_{50} e de K_i de um inibidor, como descrito por Cheng e Prusoff.¹⁹

Nessa etapa do trabalho (segunda geração de inibidores) foram testados 48 compostos químicos. Esses compostos foram selecionados com o intuito de inibir a TcGAPDH, sendo boa parte dos mesmos bioisómeros de flavonoides, um deles um flavonoide, e alguns outros representantes das classes das hidantoínas, tio-hidantoínas, rodaninas e pirrolidina-2,4-dionas. Essas novas classes de inibidores (possuem representantes que são fármacos) apresentam relação estrutural com flavonoides por possuírem esqueletos carbonilados. Além disso, são conhecidos vários exemplos na literatura de alvos enzimáticos inibidos por flavonoides que também experimentam inibição por substâncias químicas representantes dessas classes de bioisómeros.²⁰⁻²² Portanto, nesse trabalho foram investigadas também essas classes de compostos.

Primeiramente, para verificar a inibição desses compostos foi realizada uma triagem inicial observando o percentual de inibição dos mesmos na concentração de 300 μM . Como a

TcGAPDH tem como produto o NADH, que absorve em 340 nm e emite sinal de fluorescência a 460 nm, foi possível determinar o percentual de inibição através da diminuição da intensidade do sinal de fluorescência, que por sua vez é proporcional à velocidade da reação (Tabela 4.9). Esse ensaio prévio foi realizado, pois havia um grande número de compostos. Este tipo de ensaio, apesar de ser menos acurado, é muito mais rápido que ensaios tradicionais para mensurar a potência de inibidores como a determinação de IC_{50} e principalmente ensaios para a determinação de K_i .

A distribuição dos compostos frente ao percentual de inibição é mostrada na Figura 4.20. Observa-se que a distribuição dos compostos não é muito desigual, exceto para a faixa que representa o percentual de inibição entre 20 e 30%. Nessa região se encontram muito dos bioisósteros e derivados hidantoínicos. Observa-se também que a distribuição dos flavonoides e seus bioisósteros é mais desigual que a das hidantoínas e correlatos. Com relação a esse ensaio os compostos mais potentes são aqueles pertencentes à classe das hidantoínas e um flavonoide. Dentre os bioisósteros de flavonoides apenas três mostraram percentual de inibição maior que 50% na concentração de 300 μ M.

Figura 4.20 – Distribuição dos compostos testados da segunda geração com relação ao percentual de inibição à concentração de 300 μ M. Os compostos estão separados de acordo com suas respectivas classes. Em vermelho estão incluídos flavonoides e seus bioisósteros e em azul estão incluídos os compostos da classe das hidantoínas e correlatas.

Obtidos os resultados do percentual de inibição, os compostos que inibiram a TcGAPDH em mais de 50% na concentração de 300 μM foram testados em várias concentrações, obtendo assim, os valores de IC_{50} . De um total de 48 compostos testados nessa segunda geração, 20 apresentaram percentual de inibição maior que 50% à concentração de 300 μM (Tabela 4.9).

Tabela 4.9 – Compostos da segunda geração testados na TcGAPDH. São mostrados dados de percentual de inibição à concentração de inibidor de 300 μM , IC_{50} e da eficiência do ligante (LE), levando em consideração os valores de IC_{50} .

Estrutura Química	Código Nequimed	Percentual de Inibição à concentração de 300 μM (%)	IC_{50} (μM)	LE ($\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{átomo}^{-1}$)
(*)	Nequimed 196		$49,2 \pm 2,29$	0,37
(*)	Nequimed 204	$75,79 \pm 0,47$	$41,57 \pm 4,96$	0,43
Nequimed 212		$81,3 \pm 4,71$	0,29
(*)	Nequimed 303	$58,39 \pm 2,04$	$162,86 \pm 23,33$	0,32
(*)	Nequimed 304	$84,39 \pm 0,23$	$51,5 \pm 2,11$	0,28
Nequimed 305	Não foi possível testar esse composto, pois fluoresce no mesmo comprimento de onda que o NADH.
Nequimed 306	$51,27 \pm 1,44$	$225,75 \pm 15,45$	0,25
(*)	Nequimed 307	$85,99 \pm 0,92$	$48,38 \pm 4,8$	0,35

Nequimed 308	$20,97 \pm 0,92$
Nequimed 309	$21,25 \pm 1,96$
Nequimed 310	$62,19 \pm 2,45$	$206,87 \pm 35,01$	0,25
Nequimed 311	Não foi possível testar este composto nessas condições de ensaio, pois o composto forma precipitado
Nequimed 312	$27,32 \pm 2,77$		
(*)	Nequimed 313	$79,3 \pm 0,88$	$57,29 \pm 6,03$	0,32
Nequimed 314	$91,29 \pm 1,53$	$41,64 \pm 7,64$	0,27
Nequimed 315	$38,04 \pm 2,07$
Nequimed 316	Não foi possível testar esse composto, pois fluoresce no mesmo comprimento de onda que o NADH.
Nequimed 317	$63,25 \pm 1,22$	$290,86 \pm 31,42$	0,24

Nequimed 318	$61,07 \pm 1,40$	$759,79 \pm 33,31$	0,19
Nequimed 319	$49,74 \pm 0,66$
Nequimed 320	$52,88 \pm 1,71$	$311,6 \pm 12,05$	0,23
Nequimed 321	$21,57 \pm 0,83$
Nequimed 322	$18,68 \pm 2,57$		
(*)	Nequimed 323	$71,92 \pm 4,00$	$52,1 \pm 8,75$	0,42
Nequimed 324	$6,26 \pm 2,14$		
(*)	Nequimed 325	$77,63 \pm 1,94$	$73,17 \pm 6,16$	0,38
(*)	Nequimed 326	$77,24 \pm 0,70$	$30,92 \pm 2,11$	0,36
Nequimed 327	$39,27 \pm 1,62$
Nequimed 328	$29,54 \pm 3,91$

Nequimed 329	54,26 ± 4,48	347,33 ± 45,44	0,19
Nequimed 330	27,50 ± 1,75
Nequimed 331	36,91 ± 0,36
Nequimed 332	17,41 ± 2,64
Nequimed 333	26,35 ± 1,38
Nequimed 334	45,28 ± 2,14
Nequimed 335	52,98 ± 2,95	763,20 ± 38,73	0,19
Nequimed 336	31,17 ± 1,26

Nequimed 337	25,95 ± 1,98		
(*)	Nequimed 338	63,85 ± 1,32	160,11 ± 33,56	0,37
Nequimed 339	37,56 ± 0,08
Nequimed 340	26,71 ± 2,77
Nequimed 341	47,66 ± 2,16
Nequimed 342	65,66 ± 6,55	131,80 ± 6,30	0,26
Nequimed 343	15,07 ± 2,53
Nequimed 344	49,51 ± 2,14
Nequimed 345	6,89 ± 1,26

Nequimed 346	Não foi possível testar esse composto, pois formou precipitado nas condições experimentais.
Nequimed 347	$6,14 \pm 3,12$

(*) Estruturas protegidas para que futuros ensaios sejam realizados.

Muitos dos compostos testados apresentaram altos valores de inibição quando testados à concentração e 300 μM . Aqueles que apresentaram percentual de inibição maior que 50% nessa concentração foram submetidos a ensaios de IC_{50} e dez dos mesmos mostraram valores de IC_{50} menores que 100 μM . Entretanto, quando se analisam ligantes não se deve atentar apenas para a potência, mas também para a eficiência do ligante. Dentre os compostos testados nove dos mesmos apresentaram eficiência do ligante maior que 0,3, sendo que dois deles apresentaram eficiência do ligante maior que 0,4. Para ter uma noção do panorama atual, até o momento não existe nenhum inibidor da TcGAPDH com eficiência do ligante maior que 0,4 descrito na literatura. A Figura 4.21 mostra a distribuição dos compostos ativos com relação à eficiência do ligante.

Figura 4.21 – Distribuição dos compostos mais potentes com relação à eficiência do ligante (LE).

A distribuição dos compostos com relação à eficiência do ligante não é muito desigual exceto pelas faixas de 0,25 a 0,30 e de 0,35 a 0,40. Dentre os inibidores mais potentes e com alta eficiência do ligante incluem os derivados de hidantoína (Nequimed 204, 304, 307, 313, 323, 325 e 326), tio-hidantoína (Nequimed 212) e pirrolidina-2,4-diona (Nequimed 196), e uma pirido[1,2- α]pirimidin-4-ona (Nequimed 338). Foram selecionados vários compostos pertencentes à classe das quinolinas, mas apenas um deles apresentou inibição relevante nos ensaios, que foi o Nequimed 342. Esse composto apesar de ser carboxilado (que tem um histórico de gerar falsos positivos em ensaios virtuais) foi um dos mais bem pontuados nos ensaios virtuais e se mostrou um inibidor nos experimentos. Isso não foi o caso do Nequimed 345, que nos ensaios virtuais se mostrou como um potencial inibidor (pelo fato de possuir duas carboxilas que nos ensaios virtuais interagiam em dois sítios de interação do fosfato), nos experimentos foi inativo. Dentre os compostos da classe das pirido[1,2- α]pirimidin-4-ona, o mais ativo foi aquele que tem a estrutura mais simplificada (Nequimed 338), outro exemplar dessa classe se mostrou ativo (Nequimed 320), entretanto sua eficiência do ligante não é alta. Dentre os mais potentes incluem os derivados de hidantoína que em geral apresentam maior inibição quando apresentam apenas uma substituição no anel imidazolidina-2,4-diona. Foi possível reconhecer que substituições no átomo de nitrogênio do anel são prejudiciais à interação e que grandes substituintes também são prejudiciais. O composto que mostrou melhor interação (Nequimed 204) possui apenas uma substituição do anel imidazolidina e como substituinte um grupo pequeno, um metiltiofeno. Portanto, pelas características apresentadas por muitos desses compostos (moléculas pequenas e com alta eficiência do ligante) os mesmos se mostram como potenciais compostos a serem otimizados futuramente. Para novos ciclos de planejamento, seleção e teste é preciso que se tenha conhecimento do modo de inibição ou de interação destes compostos.

4.3.6.1 *Determinação das constantes e do modo de inibição*

Para quantificar os resultados em ensaios fluorimétricos é utilizada a unidade relativa de fluorescência (RFU), que é uma unidade arbitrária que não mensura a concentração do composto fluorogênico. Assim, para poder quantificar os valores da velocidade de formação

do produto, que é a sonda fluorescente, foi necessário estabelecer uma curva de calibração (Figura 4.22) que relaciona a fluorescência do NADH com a unidade relativa de fluorescência.

Figura 4.22 – Ajuste linear entre a unidade relativa de fluorescência (RFU) e unidade de concentração do composto fluorogênico (NADH). A linha vermelha representa o ajuste linear e em verde estão as linhas que representam o intervalo de confiança a 95%. ($R^2 = 0,999$).

Apesar de a curva de calibração não ser necessária para a determinação das constantes de inibição dos compostos, através da mesma foi possível determinar com relativa segurança a $V_{\max}$.

Com o intuito de determinar os valores das constantes e dos modos de inibição dos compostos foram realizados ensaios com 12 dos inibidores mais potentes. Os compostos foram testados contra o sítio do G3P, sendo a concentração de NAD^+ mantida muito alta. Os gráficos dos estudos de variação de concentração do inibidor são mostrados na Figura 4.23. Os valores de K_i apresentados pelos compostos e os parâmetros estatísticos dos ajustes ao modelo de Michaelis-Menten são mostrados na Tabela 4.10.

Foi observado que todos os compostos apresentaram melhores ajustes ao modelo não competitivo com relação ao subsítio do G3P. Dessa forma, é esperado que os mesmos interajam preferencialmente no subsítio do cofator NAD^+ .

Figura 4.23 - Ajuste dos dados à curva de Michaelis-Menten para os compostos mais potentes testados no subsítio do G3P em diferentes concentrações.

Tabela 4.10 – Relação dos compostos mais potentes e seus respectivos modo e constantes de inibição. São mostrados os valores calculados para a eficiência do ligante (LE) dos mesmos e os parâmetros estatísticos do ajuste dos dados ao modelo não linear.

Compostos	K_i^{app} (μ M)	Modo de inibição	AICc ^a	R ²	Sy.x ^b
Nequimed 196	83,74 $\pm$ 2,88	Não competitivo	-1.251,90	0,991	5,31 . 10 ⁻³
Nequimed 204	101,63 $\pm$ 3,52	Não competitivo	-1.042,41	0,997	2,96 . 10 ⁻³
Nequimed 212	235,32 $\pm$ 10,03	Não competitivo	-1.326,19	0,995	3,90 . 10 ⁻³
Nequimed 304	77,87 $\pm$ 2,10	Não competitivo	-1.128,00	0,994	1,84 . 10 ⁻³
Nequimed 307	56,74 $\pm$ 2,66	Não competitivo	-1.212,05	0,98	3,57 . 10 ⁻³
Nequimed 313	47,82 $\pm$ 4,27	Não competitivo	-1.126,42	0,949	8,96 . 10 ⁻³
Nequimed 314	55,55 $\pm$ 3,41	Não competitivo	-1.172,71	0,948	7,38 . 10 ⁻³
Nequimed 323	109,16 $\pm$ 3,64	Não competitivo	-1.336,15	0,994	3,74 . 10 ⁻³
Nequimed 325	72,53 $\pm$ 1,51	Não competitivo	-1.406,33	0,997	2,79 . 10 ⁻³
Nequimed 326	30,54 $\pm$ 3,12	Não competitivo	-1.135,35	0,971	8,63 . 10 ⁻³
Nequimed 338	482,40 $\pm$ 45,52	Não competitivo	-899,44	0,925	6,56 . 10 ⁻³
Nequimed 342	119,13 $\pm$ 2,94	Não competitivo	-1.123,97	0,996	1,88 . 10 ⁻³

^a Parâmetro relacionado ao ajuste do modelo aos dados experimentais. Quanto menor o valor, melhor o ajuste.

^b Este parâmetro quantifica o tamanho dos resíduos, e quanto menor o seu valor melhor será o ajuste dos dados na regressão não linear.

Com o intuito de estabelecer um estudo de relação estrutura atividade dentre os compostos mais potentes, foi possível observar que grandes substituintes no nitrogênio (N3) do anel hidantoína (R1) são prejudiciais à atividade, enquanto que, aparentemente, pequenos substituintes como metilas, etilas ou mesmo 1-propenilas não diminuem a potência, mas também não são essenciais para a mesma. No entanto, foi verificado que o substituinte trimetilamina (Nequimed 333) nessa posição diminuiu consideravelmente a potência do composto, indicando que o átomo de nitrogênio desse substituinte sofreu repulsão eletrostática de algum outro resíduo de aminoácido. Substituintes como anéis heteroaromáticos (furano, tiofeno, pirrol) e fenilas no carbono (C5) do anel são favoráveis para a atividade. (Figura 4.24) No entanto, quando são adicionados mais de um anel, na maioria das vezes há perda de potência, e mesmo quando não há, observa-se que os mesmos não contribuem para a atividade.

Em muitos casos, essas classes de compostos apresentam ligações duplas exocíclicas que estão conjugadas com a dupla ligação da carbonila do anel. Deste modo, tais compostos possuem o potencial de reagir com nucleófilos biológicos, ou seja, podem se comportar como aceitadores de Michael. Mendgen, *et al.* estudaram a capacidade de tais compostos de promoverem adições de Michael em um modelo de reatividade que utilizou glutatona como um nucleófilo biológico e não observaram reação. Diante disso, os autores julgaram que a eletrofilicidade desse sistema de Michael é insignificante. Além disso, os mesmos autores observaram que esses compostos não sofreram agregação, não atuando, portanto, como inibidores inespecíficos.²³

Figura 4.24 – Representação do esqueleto principal da hidantoína mostrando a numeração de seu anel e as substituições apresentadas pelos compostos testados (R1 e R2). Está circulada em vermelho a região que contribui negativamente para a interação e em azul positivamente.

Com relação às outras classes de compostos, observa-se que o composto pertencente à classe das quinolinas mais potente tem na sua estrutura uma carboxila, a qual se acredita que interaja no sítio do fosfato inorgânico da GAPDH. Quanto à pirido[1,2- α]pirimidin-4-ona mais potente tem sua estrutura simplificada com dois anéis fundidos e acredita-se que a mesma interaja no subsítio onde normalmente interagiria a metade nicotinamida do NAD^+ . Enquanto que o composto da classe dos flavonoides testado na segunda geração possui potência comparada com o Nequimed 214, o flavonoide mais potente testado na primeira geração. Acredita-se que sua interação ocorra tanto nos subsítios do G3P e da metade nicotinamida do NAD^+ .

4.3.7 *Ensaio de Seletividade frente à GAPDH de Humanos*

No contexto da Química Medicinal, um dos pontos a serem verificados é a seletividade de compostos bioativos. Há várias tentativas de aumentar a seletividade ainda durante o planejamento explorando aspectos como forma, eletrostática, flexibilidade, presença de água no sítio ativo e alosterismo.²⁴ Alguns estudos buscaram estabelecer relações entre a promiscuidade ou falta de especificidade de compostos químicos (presença de efeitos “off target”, interação com um grande número de macromoléculas) com suas estruturas e propriedades físico-químicas. De acordo com os autores do estudo, a inespecificidade tem relação direta com a lipofilicidade, presença de cargas positivas e número de anéis aromáticos e inversa com o número de átomos aceitadores e doadores de ligação de hidrogênio. Normalmente compostos promíscuos são descartados nas etapas iniciais em projetos de descoberta de fármacos. Portanto, com objetivo de evitar futuros efeitos colaterais, adversos e até mesmo toxicidade, candidatos a fármacos são comumente avaliados com relação à seletividade para o alvo em estudo.²⁵

É comum que mesmo entre enzimas que catalisam a mesma reação, mas em diferentes organismos, tenham valores de K_M diferentes para um mesmo substrato, o que diminui a confiança em resultados provenientes de ensaios de IC_{50} . Além disso, para enzimas que são multissubstrato a interação entre os substratos e a interação dos mesmos com o inibidor refletem nos valores de IC_{50} . Assim, uma forma coerente de avaliar seletividade é através da medida das constantes de inibição (K_i). A razão entre as constantes de inibição encontradas para o inibidor e enzima alternativa e inibidor e enzima alvo tem sido apontada como a melhor forma para mensurar a seletividade encontrada para um determinado inibidor.^{26, 27}

Tem sido relatado que heterociclos com cinco átomos e com múltiplos heteroátomos aparecem como ligantes frequentes em ensaios de larga escala, ou seja, são compostos inespecíficos, tendo assim baixo valor em programas de descoberta de fármacos. Entretanto, alguns autores os consideram como esqueletos privilegiados, inserindo-os na abordagem polifarmacológica da descoberta de fármacos.²⁸ Dentre estes compostos estão incluídos derivados hidantoínicos, tio-hidantoínicos, rodaninínicos e tiazolidinediônicos.²³ Uma vez que o objetivo é, a princípio, que os inibidores identificados inibam a enzima GAPDH do parasito

e não a de humanos foi avaliada a seletividade de 12 dos inibidores mais potentes frente à enzima GAPDH de humanos, sendo que boa parte dos mesmos pertencem à classe das hidantoínas (Tabela 4.11).

Tabela 4.11 – Constates de inibição dos compostos sobre a GAPDH de humanos com relação ao substrato G3P e seletividade dos compostos frente à GAPDH de humanos (Razão entre K_i^{app} para a HsGAPDH pelo K_i^{app} para a TcGAPDH).

Compostos	K_i^{app} (μ M)	Seletividade	AICc ^a	R ²	Sy.x ^b
Nequimed 196	70,37 $\pm$ 1,83	0,84	-835,96	0,997	9,00 . 10 ⁻⁴
Nequimed 204	114,64 $\pm$ 3,85	1,13	-827,54	0,997	9,65 . 10 ⁻⁴
Nequimed 212	163,12 $\pm$ 5,38	0,70	-853,99	0,998	7,74 . 10 ⁻⁴
Nequimed 304	57,76 $\pm$ 2,34	0,74	-777,07	0,992	1,47 . 10 ⁻³
Nequimed 307	67,56 $\pm$ 1,69	1,19	-838,75	0,997	8,79 . 10 ⁻⁴
Nequimed 313	83,88 $\pm$ 1,78	1,75	-866,64	0,998	6,97 . 10 ⁻⁴
Nequimed 314	148,41 $\pm$ 3,31	2,67	-899,23	0,999	5,31 . 10 ⁻⁴
Nequimed 323	131,87 $\pm$ 2,96	1,21	-890,33	0,999	5,72 . 10 ⁻⁴
Nequimed 325	102,14 $\pm$ 3,30	1,41	-829,44	0,997	9,50 . 10 ⁻⁴
Nequimed 326	93,62 $\pm$ 2,86	3,07	-831,14	0,997	9,36 . 10 ⁻⁴
Nequimed 338	234,80 $\pm$ 13,76	0,49	-817,49	0,996	1,05 . 10 ⁻³
Nequimed 342	323,29 $\pm$ 16,68	2,71	-858,59	0,998	7,45 . 10 ⁻⁴

^a Parâmetro relacionado ao ajuste do modelo aos dados experimentais. Quanto menor o valor, melhor o ajuste.

^b Este parâmetro quantifica o tamanho dos resíduos, e quanto menor o seu valor melhor será o ajuste dos dados na regressão não linear.

Como os compostos testados, aparentemente, interagem preferencialmente na região onde interage a nicotinamida no subsítio do NAD⁺ e essa região não apresenta resíduos de aminoácidos que podem ser explorados para seletividade (alta homologia entre as duas enzimas neste subsítio), esperou-se que não fosse verificada seletividade relevante entre as duas enzimas. O composto que mostrou ser mais seletivo para inibir a TcGAPDH foi o Nequimed 326, que apresenta como substituinte uma anilina, sendo possível uma interação

deste substituinte na TcGAPDH e que não há na HsGAPDH. Entretanto, em geral os inibidores não mostraram seletividade com relação a uma das enzimas. Para tal, retroalimentando o modelo computacional, poderiam ser propostos novos inibidores que direciona substituintes em direção ao subsítio do G3P de forma a interagir com resíduos de aminoácidos que podem ser explorados para a seletividade como a Ser247, Ser224 e Asp210.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 COPELAND, R. A. Kinetics of single-substrate enzyme reactions. In: COPELAND, R. A. (Ed.). **Enzymes**. New York: John Wiley, 2002. v. 1, p. 109-145.
- 2 SEGEL, I. H. Kinetics of unireactant enzymes. In: SEGEL, I. H. (Ed.). **Enzyme Kinetics**. New York: John Wiley, 1993. v. 1, p. 18-99.
- 3 COPELAND, R. A. Reversible inhibitors. In: COPELAND, R. A. (Ed.). **Enzymes**. New York: John Wiley, 2002. v. 1, p. 266-304.
- 4 SINGH, J.; PETTER, R. C.; BAILLIE, T. A.; WHITTY, A. The resurgence of covalent drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 4, p. 307-317, 2011.
- 5 VOET, D.; VOET, J. G. Rates of enzymatic reactions. In: VOET, D. ;VOET, J. G. (Ed.). **Biochemistry**. New York: John Wiley, 2011. v. 1, p. 482-505.
- 6 O'BRIEN, R.; HAQ, I. Applications of biocalorimetry: binding, stability and enzyme kinetics. In: LADBURY, J. E. (Ed.). **Biocalorimetry 2**. New York: John Wiley & Sons, 2005. v. p. 1-34.
- 7 TODD, M. J.; GOMEZ, J. Enzyme kinetics determined using calorimetry: a general assay for enzyme activity? **Analytical Biochemistry**, v. 296, n. 2, p. 179-187, 2001.
- 8 BIANCONI, M. L. Calorimetric determination of thermodynamic parameters of reaction reveals different enthalpic compensations of the yeast hexokinase isozymes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 21, p. 18709-18713, 2003.

9 LAKOWICZ, J. R. Introduction to fluorescence. In: LAKOWICZ, J. R. (Ed.). **Principles of fluorescence spectroscopy**. New York: Springer, 2006. v. 1, p. 1-26.

10 LAKOWICZ, J. R. Fluorophores. In: LAKOWICZ, J. R. (Ed.). **Principles of fluorescence spectroscopy**. New York: Springer, 2006. v. 1, p. 63-95.

11 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.

12 BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

13 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.

14 TAWFIK, D. S.; VIOLA, R. E. Arsenate replacing phosphate: alternative life chemistries and ion promiscuity. **Biochemistry**, v. 50, n. 7, p. 1128-1134, 2011.

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

16 SIGMAPLOT 10. versão 10.0.1. Richmond: SYSTAT, 2006. 1CD-ROM.

17 HOPKINS, A. L.; GROOM, C. R.; ALEX, A. Ligand efficiency: a useful metric for lead selection. **Drug Discovery Today**, v. 9, n. 10, p. 430-431, 2004.

18 COPELAND, R. A. Lead optimization and structure-activity relationships for reversible inhibitors. In: COPELAND, R. A. (Ed.). **Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery**. New Jersey: John Wiley, 2005. v. 1, p. 111-140.

19 YUNG-CHI, C.; PRUSOFF, W. H. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (IC_{50}) of an enzymatic reaction. **Biochemical Pharmacology**, v. 22, n. 23, p. 3099-3108, 1973.

20 LA MOTTA, C.; SARTINI, S.; MUGNAINI, L.; SIMORINI, F.; TALIANI, S.; SALERNO, S.; MARINI, A. M.; DA SETTIMO, F.; LAVECCHIA, A.; NOVELLINO, E.; CANTORE, M.; FAILLI, P.; CIUFFI, M. Pyrido[1,2- α]pyrimidin-4-one derivatives as a novel class of selective aldose reductase inhibitors exhibiting antioxidant activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 20, p. 4917-4927, 2007.

21 SABATINI, S.; GOSETTO, F.; MANFRONI, G.; TABARRINI, O.; KAATZ, G. W.; PATEL, D.; CECCHETTI, V. Evolution from a natural flavones nucleus to obtain 2-(4-propoxyphenyl)quinoline derivatives as potent inhibitors of the *S. aureus* NorA efflux pump. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 16, p. 5722-5736, 2011.

22 PENG, L.; GAO, X.; DUAN, L.; REN, X.; WU, D.; DING, K. Identification of pyrido[1,2- α]pyrimidine-4-ones as new molecules improving the transcriptional functions of Estrogen-Related Receptor α . **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 21, p. 7729-7733, 2011.

23 MENDGEN, T.; STEUER, C.; KLEIN, C. D. Privileged scaffolds or promiscuous binders: a comparative study on rhodanines and related heterocycles in medicinal chemistry. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 2, p. 743-753, 2011.

24 HUGGINS, D. J.; SHERMAN, W.; TIDOR, B. Rational approaches to improving selectivity in drug design. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 1424-1444, 2012.

25 PETERS, J.-U.; HERT, J.; BISSANTZ, C.; HILLEBRECHT, A.; GEREBTZOFF, G.; BENDELS, S.; TILLIER, F.; MIGEON, J.; FISCHER, H.; GUBA, W.; KANSY, M. Can we discover pharmacological promiscuity early in the drug discovery process? **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 7–8, p. 325-335, 2012.

26 COPELAND, R. A. Reversible modes of inhibitor interactions with enzymes. In: COPELAND, R. A. (Ed.). **Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery**. New Jersey: John Wiley, 2005. v. 1, p. 48-81.

27 CHÈNE, P. Can biochemistry drive drug discovery beyond simple potency measurements? **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 7–8, p. 388-395, 2012.

28 TOMASIC, T.; MASIC, L. P. Rhodanine as a privileged scaffold in drug discovery. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 13, p. 1596-1629, 2009.

Capítulo 5

Conclusões e Perspectivas

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

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Ferramentas computacionais são úteis no processo de busca de moléculas que interajam com um alvo macromolecular, pois aumentam a probabilidade de encontrar substâncias bioativas, apresentam custo muito menor que ensaios em larga escala, além de proporcionar maior agilidade a esse processo. Dessa forma foi possível selecionar um conjunto de moléculas que apresentaram ao mesmo tempo diferentes esqueletos moleculares, aumentando a diversidade química. A integração de duas diferentes abordagens computacionais, o planejamento baseado na estrutura do ligante e do receptor foi eficaz em encontrar moléculas preditas em interagir com a GAPDH de *T. cruzi*. Recentemente, foram relatados sucesso em ensaios virtuais que combinaram essas duas abordagens computacionais.^{1, 2} Contudo, apesar de várias tentativas de combinar essas duas abordagens, ainda não há uma estratégia que seja “melhor”, até porque em ensaios virtuais, as adequações são feitas de acordo com o sistema que está sendo estudado. Para determinados conjuntos de ligantes e proteínas, a integração das abordagens baseadas na estrutura do receptor e do ligante fornece resultados superiores às abordagens utilizadas de forma isolada, sendo que essa integração de métodos necessita de mais estudos comparativos para seu melhor entendimento.

No decorrer deste trabalho foram testados compostos que fazem parte de diferentes classes químicas. No total foram testados 52 compostos, sendo que sete dos mesmos mostraram valores de K_i menores que 100 μ M contra a TcGAPDH. No entanto, nenhum dos compostos inibiu esta enzima na escala de concentração nanomolar, onde normalmente estão incluídos os fármacos. Contudo, muitos dos compostos testados apresentam características de fragmentos moleculares, fazendo com que os mesmos tenham eficiências do ligante próximas daquelas apresentadas por fármacos. Além disso, muitos desses compostos são passíveis de modificações moleculares, pois são compostos com baixa complexidade e massa molecular. É importante ressaltar, entretanto, que a GAPDH apresenta-se como um grande desafio para a química medicinal considerando que até a finalização deste trabalho nenhum inibidor em concentração nanomolar fora identificado. As razões para isso ainda estão em níveis especulativos e não serão apresentados formalmente neste trabalho.

Foi possível verificar que a estratégia de modificação molecular baseada em bioisosterismo e os estudos baseados na estrutura do ligante e do receptor foram adequados para a descoberta de inibidores da TcGAPDH, validando o modelo computacional empregado. As técnicas utilizadas se mostraram eficientes para verificar a inibição por esses compostos, sendo que a fluorimetria é mais adequada para estudos que exigem maior velocidade, enquanto que a calorimetria de titulação isotérmica é uma técnica mais robusta e acurada, sendo adequada para refinar as informações obtidas em ensaios menos sofisticados. Os desafios ainda não vencidos para ITC estão relacionados à capacidade de determinação dos parâmetros termodinâmicos da interação como forma lateral de validação dos resultados aqui apresentados. Esses estudos estão em realização por outros membros do grupo Nequimed.

Os compostos mais potentes mostraram excelente potencial para futuras otimizações: são moléculas pequenas, simples, apresentam propriedades físico-químicas dentro das características fármaco-similares (algumas, fragmento-similares) e mostraram-se ativas, sendo que duas delas com eficiência do ligante maior que 0,4, (feito ainda inédito), caracterizando as mesmas como excelentes ligantes. No entanto, essas informações ainda não são suficientes para o nível atual de requerimentos para o entendimento do processo de reconhecimento molecular.

Tem sido discutido que para a descoberta de novas entidades moleculares, pesquisadores da academia e da indústria estão investindo pesado apenas em ensaios de potência e seletividade, e em alguns casos para melhor entendimento do modo de interação combinam esses resultados associados com dados estruturais (elucidação estrutural do complexo proteína-ligante). Porém, estudos que podem gerar informações importantes a respeito do processo de reconhecimento molecular como aqueles que visam o entendimento da energética e da cinética da interação não estão sendo explorados adequadamente, apesar dos vários exemplos de sucesso já relatados.³⁻⁵

A próxima etapa deste trabalho foca no melhor entendimento do modo de interação dos compostos mais potentes através da cocristalização dos ligantes junto com a enzima. Tais resultados são importantes, pois permitem novos ciclos de planejamento que se tornam embasados em informações computacionais e, sobretudo, experimentais. Certamente, com essa informação torna-se mais clara a otimização dos compostos e proposição de

modificações moleculares que possibilitem aumento de potência, seletividade, diminuição de reatividade e até mesmo adequação dos compostos frente a aspectos farmacocinéticos.

Sete dos compostos testados foram enviados para ensaios com o *Trypanosoma cruzi* (colaboração com o Laboratório de Imunoparasitologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, liderado pelo Prof. Dr. João Santana da Silva).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 KHANFAR, M. A.; HILL, R. A.; KADDOUMI, A.; EL SAYED, K. A. Discovery of novel GSK-3 β inhibitors with potent *in vitro* and *in vivo* activities and excellent brain permeability using combined ligand- and structure-based virtual screening. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 24, p. 8534-8545, 2010.

2 CORTÉS-CABRERA, Á.; GAGO, F.; MORREALE, A. A reverse combination of structure-based and ligand-based strategies for virtual screening. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 26, n. 3, p. 319-327, 2012.

3 CHÈNE, P. Can biochemistry drive drug discovery beyond simple potency measurements? **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 7–8, p. 388-395, 2012.

4 COPELAND, R. A.; POMPLIANO, D. L.; MEEK, T. D. Drug-target residence time and its implications for lead optimization. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 9, p. 730-739, 2006.

5 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.