IGOR MUCCILO PROKOPCZYK

**Planejamento de Inibidores da Enzima Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase de
Trypanosoma cruzi e Avaliação Bioquímica por Calorimetria de Titulação
Isotérmica**

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

Área de concentração: Físico-química

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari

São Carlos, 2012

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

Prokopczyk, Igor Muccilo

Planejamento de inibidores da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi* e avaliação bioquímica por calorimetria de titulação isotérmica. / Igor Muccilo Prokopczyk. -- São Carlos, 2012.
98 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. *Trypanosoma cruzi* I.Título.

*Referências Bibliográficas
conferidas pelo SBI/IQSC*

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

São Carlos, 07/05/2012

Igor Muccilo Prokopczyk

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que me apoiaram e incentivaram

“Born to lose live to win”

NEQUIMED

AGRADECIMENTOS

Assim como tudo na vida, esse trabalho não foi feito por uma pessoa apenas, contei em vários momentos com amigos, não só na parte científica, mas também no cotidiano onde sempre foi provido total apoio. Gostaria de dedicar e agradecer a todos!

Começo os agradecimentos com as três pessoas mais importantes: meu pai, Luiz Alberto Prokopczyk, que antes de tudo sempre foi um dos meus maiores exemplos e que eu tenho orgulho de ser seu legado e que um dia eu torne, no mínimo, igual; e a minha mãe, Vera Lúcia Muccilo Prokopczyk, que como um anjo da guarda nunca me abandonara e sempre me manteve “em pé” e com força para lutar e jamais desistir. Ao meu “fiel escudeiro” e irmão Yuri Muccilo Prokopczyk por sempre me apoiar.

Em um parágrafo à parte, agradeço a minha “magrela” que se postou ao meu lado em minhas decisões, aguentou minhas lamurias e chatices, e que sem ela as coisas não teriam graça. Obrigado Aline!

Agora, agradeço a uma pessoal fundamental, meu orientador e amigo, Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari por confiar o presente trabalho a mim e sabiamente me guiar para uma rota de sucesso! À Malú, por ser uma “mãezona” e sempre estar presente.

À CNPq pelo apoio financeiro concedido ao longo dos dois anos. Ao IQSC e a seção de pós-graduação, em especial a Silvia e Andreia por sempre mostrarem-se prestativas.

Aos meus amigos do NEQUIMED, Geraldo, Josmar, Jean, Leandro, Ricardo, Fabiana (chefa), Prof. Dr. Andrei, Willian, Cristian, Alexander, Daiane e Patricia. Não só pelas discussões científicas que enriqueceram este trabalho, mas também pelos churrascos e pizzadas. Aos meus amigos Jão e Amanda, Bezzerra e Mari, Boi, Galinhão, Buda, Gustavão, Vitinho, Galdinho, Zé, Iuri, Marcos, Luiz, Katia e Nathan, Sabrina, Nath, Helton, Jú, Bauab, Renatinho, Biulinha e Manú. Vinicius e outros tantos outros igualmente importantes.

Por fim, agradeço aos meus amados, padrinho e tio, João Muccilo Neto e, madrinha e tia, Maria Aparecida Muccilo, que foram acertadamente escolhidos por meus pais, e desempenham com perfeição seus papéis de padrinhos!

EPÍGRAFE

“Todos os dias você pode fazer progressos. Cada passo pode ser frutífero. Você sabe que nunca vai chegar ao fim da jornada. Mas isso, longe de desencorajar, só contribui para a alegria e a glória do sucesso.”

Sir Winston Leonard Spencer Churchill

RESUMO

A doença de Chagas representa um grave problema de saúde em regiões endêmicas que vão desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina. O protozoário tripanossomatídeo *Trypanosoma cruzi* é o agente causador dessa devastadora doença, que afeta milhões de pessoas. Existem em torno de 10 milhões de indivíduos contaminados e pelo menos 25 milhões de pessoas vivem em locais riscos de infecção. Os dois medicamentos, o nifurtimox e o benzonidazol, apresentam sérios efeitos colaterais além de se mostrarem ineficazes na fase crônica da doença. Esse triste perfil, felizmente, tem se alterado com recentes avanços que levaram o ravuconazol, pozaconazol e K11777 para estudos em fase clínica. Com base em seu papel fundamental no ciclo do *T. cruzi*, a sexta enzima da via glicolítica, a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) vem sendo considerada um alvo promissor para a descoberta e o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos para o tratamento da doença de Chagas. É amplamente conhecida a importância do planejamento de compostos tanto por método baseado na estrutura do alvo quanto do ligante. A docagem molecular foi usada para a seleção inicial dos compostos para o teste biocalorimétrico, e a partir dessa estratégia foi possível, de 25 compostos. Os parâmetros cinéticos da catálise da TcGAPDH foram determinados ($K_M = 10,51 \pm 0,91 \mu\text{M}$, $V_{max} = 4,18 \pm 0,09 \times 10^{-4} \text{ mM s}^{-1}$ e $k_{cat} = 85,88 \pm 3,22 \text{ s}^{-1}$). Os experimentos cinéticos por ITC possibilitou na identificação de cinco compostos bioativos, sendo três com constante de inibição abaixo de $100 \mu\text{M}$ ($13,21 \pm 0,88$, $35,00 \pm 1,70$ e $78,45 \pm 2,69 \mu\text{M}$). Processos de simulação de dinâmica molecular foram aplicados para a predição do modo de interação dos três compostos com K_i^{app} menores que $100 \mu\text{M}$.

Palavras-chave: Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, GAPDH, Quiminformática, Docagem, Biocalorimetria

ABSTRACT

Chagas disease is a serious health problem in endemic regions ranging from the southern the United States to Argentina. The protozoan *Trypanosoma cruzi* is the causative agent of this devastating disease that affects millions of people. Exist about 10 million people infected and at least 25 million people live in risk of local infection. There are only two drugs used to treat Chagas disease during acute phase and it show harmful side effects. This gloomy outlook has changed due to major advances in research of anti-trypanosomatid agents; an example is posaconazole, ravuconazole and K11777 both, which currently is in clinical phase. A promising target that is receiving considerable attention is the enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, EC 1.2.1.12) a key protein in the glycolytic pathway of trypanosomatids. SBVS methods were used for the selection of 25 compounds and these were assayed against GAPDH using Isothermal Titration Calorimetry. The kinetic parameters of catalysis were determined TcGAPDH ($K_M = 10.91 \pm 0.91 \mu\text{M}$, $V_{max} = 4.18 \pm 0.09 \times 10^{-4} \text{ mM s}^{-1}$ and $k_{cat} = 85.88 \pm 3.22 \text{ s}^{-1}$). The kinetic experiments by ITC allowed the identification of five bioactive compounds, three with inhibition constant below 100 μM . Simulation process of molecular dynamics were applied to predict the mode of interaction for the three compounds with K_i^{app} less than 100 μM .

Keywords: Chagas Disease, *Trypanosoma cruzi*, GAPDH, Chemoinformatics, Biocalorimetry

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Distribuição da Doença de Chagas pelo mundo ³	16
Figura 1.2. Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	18
Figura 1.3. Estruturas de alguns fármacos usados no tratamento da Doença de Chagas, juntamente com o Nifurtimox e o Benzonidazol.....	19
Figura 1.4. Ilustração das etapas de descoberta de um novo fármaco.....	21
Figura 1.5. Distribuição dos medicamentos em uso clínico de acordo com suas classes de alvos ¹⁷	22
Figura 1.6. Etapas do planejamento de fármacos	23
Figura 1.7. Representação esquemática do espaço químico-biológico e a distribuição dos compostos bioativos de acordo com seus alvos (elipsóides) ²⁰	23
Figura 1.8. Esquema representando as etapas da docagem: usando a estrutura de um receptor e um conjunto de moléculas, os programas de docagem avaliam a complementaridade do ligante em relação ao sítio ativo do receptor. Aquelas mais bem pontuadas são avaliadas numa próxima etapa através de um ensaio experimental.	25
Figura 1.9. Esquema da via glicolítica	28
Figura 1.10. Estrutura cristalográfica por Raios-X, código PDB 1QXS, da GAPDH de <i>T. cruzi</i> (A). Sítio do substrato, no caso um análogo do 1,3-BPG, em cinza e em laranja o NAD ⁺ . A região destacada em amarelo é a cisteína catalítica (B)	30
Figura 1.11. Reação simplificada da conversão do G3P a 1,3-BPG pela enzima GAPDH	31
Figura 1.12. Representação do ciclo catalítico na enzima GAPDH.....	31
Figura 1.13. Representação gráfica de uma curva cinética típica de Michaelis-Menten. Através da análise gráfica podem-se observar os parâmetros cinéticos como o K_M e o V_{max} ..	33
Figura 1.14. Representação esquemática do mecanismo de inibição competitiva.....	34
Figura 1.15. Gráfico teórico de Lineweaver–Burk para inibidores do tipo competitivo.....	35
Figura 1.16. Representação esquemática do mecanismo de inibição não-competitivo.....	35

Figura 1.17. Gráfico teórico de Lineweaver-Burk para inibidores do tipo não-competitivo ...	36
Figura 1.18. Representação esquemática do mecanismo de inibição incompetitiva.....	36
Figura 1.19. Gráfico teórico Lineweaver-Burk para inibidores do tipo incompetitivo.....	37
Figura 1.20. Representação esquemática de ITC: (a) antes do início da titulação as celas de referência e amostra são mantidas na mesma temperatura. A cela de referência é mantida sempre na temperatura do experimento; (b) Durante a titulação, quando uma injeção é feita, ocorre uma variação na temperatura da cela de amostra e uma alteração na energia fornecida a esta cela se faz necessária para manter a diferença de temperatura entre as celas igual a zero	38
Figura 3.1. Fluxograma do processo adotado para a seleção dos compostos e o teste contra a enzima GAPDH.....	44
Figura 3.2. Gráfico da potência térmica <i>versus</i> o tempo. A cada injeção a linha base se estabiliza num nível inferior e a quantidade de calor gerado é proporcional à velocidade da reação ⁵¹ (A). Gráfico de Michaelis-Menten obtido através do tratamento matemático, descrito nesta sessão, do conjunto de dado coletado pelo ITC (B)	46
Figura 3.3. Fluxograma do procedimento adotado para o ensaio biocalorimétrico dos compostos selecionados por SBVS	48
Figura 3.4. Gráfico da variação de temperatura durante o processo de simulação (A) com a etapa de anelamento destacada (B).....	52
Figura 3.5. Fluxograma do processo de dinâmica molecular para a compreensão da interação entre os ligantes e a TcGAPDH.....	53
Figura 4.1. Gráficos de distribuição dos compostos presentes na coleção virtual após a aplicação do filtro molecular. (A) Peso Molecular, (B) XlogP, (C) Aceitadores de ligação de Hidrogênio, (D) Doadores de ligação de Hidrogênio.....	55
Figura 4.2. Resultado da docagem dos compostos (cinza) selecionados por inspeção visual na presença do NAD ⁺ (laranja)	58
Figura 4.3. (a) Posição da docagem do Nequimed111 (cinza) e as interações com os aminoácidos; (b) Posição no sítio (gerados pelo Chimera). (c) Mapa de interações 2D ⁸⁴	59

Figura 4.4. (a) Posição da docagem do Nequimed104 (cinza) e as interações com os aminoácidos. (b) Posição no sítio (gerados pelo Chimera). (c) Mapa de interações 2D ⁸⁴	60
Figura 4.5 (a) Posição da docagem do Nequimed125 (cinza) e as interações com os aminoácidos. (b) Posição no sítio (gerados pelo Chimera). (c) Mapa de interações 2D ⁸⁴	61
Figura 4.6. Estruturas 2D dos 25 compostos adquiridos comercialmente que foram selecionados através de SBVS para os ensaios bioquímicos por ITC	62
Figura 4.7. Gráfico do experimento para determinação do $\Delta H_{app\ molar}$	64
Figura 4.8. Curva de Michaelis-Menten, na ausência (pontos pretos) e na presença (pontos vermelhos) de inibidor, para os 5 inibidores	67
Figura 4.9. Gráfico de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk do Nequimed104, Nequimed111 e Nequimed125	68
Figura 4.10. Gráfico de RMSD <i>versus</i> tempo simulação de dinâmica molecular para o Nequimed104 e do NAD ⁺ (A). Imagem da posição predita por docagem (B). Imagem da posição do composto após 10 ns de simulação (C)	73
Figura 4.11. Gráfico de RMSD <i>versus</i> tempo simulação de dinâmica molecular para o R-Nequimed111 modelo 1 e NAD ⁺ (A). Imagem da posição predita por docagem (B). Imagem da posição do composto após 10 ns de simulação (C)	76
Figura 4.12. Gráfico de RMSD <i>versus</i> tempo simulação de dinâmica molecular para o S-Nequimed111 modelo 3 e NAD ⁺ (A). Imagem da posição predita por docagem (B). Imagem da posição do composto após 12 ns de simulação (C)	77
Figura 4.13. Gráfico de RMSD <i>versus</i> tempo simulação de dinâmica molecular para o Nequimed125 modelo 1 NAD ⁺ (A). Imagem da posição predita por docagem (B). Imagem da posição do composto após 10 ns de simulação (C)	79

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1. Enzimas envolvidas no controle da glicólise, cuja inibição individual leva a uma redução de 50% fluxo glicolítico.....	29
Tabela 4.1. Alguns parâmetros moleculares usados no filtro fármaco-similar aplicado pelo programa FILTER e a media dos valores encontrados no banco selecionado	55
Tabela 4.2. Valores dos parâmetros cristalográficos das estruturas tridimensionais da enzima TcGAPDH depositados no banco PDB	56
Tabela 4.3. Tabela de pontuação obtida através do programa Glide no modo XP para a docagem realizada com o NAD ⁺ no sítio	58
Tabela 4.4. Valores de Q_r e Q_d usados para a determinação do $\Delta H_{app \text{ molar}}$ da reação de conversão do G3P a 1-arseno-3-fosfoglicerato	64
Tabela 4.5. Parâmetros cinéticos da catalise do G3P a 1-arseno-3-fosfoglicerato pela enzima TcGAPDH em tampão HEPES 100mM e pH 8,0	65
Tabela 4.6. Valores da massa molecular, K_i^{app} e intervalo de confiança (95%) para os cinco compostos ativos contra a TcGAPDH.....	66
Tabela 4.7. Estudo de múltiplas concentrações (0 μ M, 50 μ M e 100 μ M) dos três compostos com valores de K_i^{app} menores que 100 μ M e os valores dos parâmetros cinéticos, mecanismo de inibição e ajuste dos modelos e da cinética de conversão do G3P a 1,3-BPG	70
Tabela 4.8. Parâmetros estatísticos dos três compostos estudados em múltiplas concentrações	70
Tabela 4.9. Valores do coeficiente de Hill para os três compostos estudados em múltiplas concentrações.....	71
Tabela 4.10. Valores de energia preditos por MM/GBSA e docagem para os modelos Nequimed111 R e S	74
Tabela 4.11. Valores de energia preditos por MM/GBSA e docagem para os modelos do Nequimed125	78

INDÍCE DE ABREVIACÕES E SIGLAS

1,3 - BPG	1,3-bisfosfoglicerato
Å	Angstroms
ADME/Tox	Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e Toxidez
G3P	Gliceraldeído 3-fosfato
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico
HTS	Ensaio em Larga Escala
IC ₅₀	Concentração inibitória necessária para reduzir em 50% a atividade enzimática
k_{cat}	Constante catalítica
K_i	Constante de inibição
K_M	Constante de Michaelis-Menten
LBVS	Planejamento de Fármaco Baseado no Ligante
MM/GBSA	do inglês Molecular Mechanics/Generalized Born Surface Area
MM/PBSA	do inglês Molecular Mechanics/Poisson-Boltzmann Surface Area
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NCE	do inglês New Chemical Entity (Nova Entidade Química)
QSAR	Relação Estrutura-Atividade Quantitativa
RMSD	Desvio quadrático médio
S70	Ácido 3-hidroxi-2-oxo-4-fosfonoxi-butil-fosfônico
SAR	Relação Estrutura-Atividade
SBVS	Planejamento de Fármaco Baseado na Estrutura do Receptor
TEA	Trietanolamina
V_{max}	Velocidade máxima
WDI	Índice Mundial de Fármacos
WHO	Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 A DOENÇA DE CHAGAS	16
<i>1.1.1 Tratamento</i>	<i>19</i>
1.2 PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS E A QUÍMICA MEDICINAL	20
<i>1.2.1 Espaço químico-biológico e a Quiminformática</i>	<i>23</i>
1.2.1.1 Planejamento baseado na estrutura do alvo.....	24
1.2.1.2 Dinâmica Molecular	26
1.3 ALVOS PARA O PLANEJAMENTO DE NOVOS FÁRMACOS.....	27
<i>1.3.1 Via Glicolítica.....</i>	<i>27</i>
1.3.1.1 Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH)	30
1.4 CINÉTICA ENZIMÁTICA	32
<i>1.4.1 Significados de K_M, k_{cat} e k_{cat}/K_M.....</i>	<i>33</i>
<i>1.4.2 Mecanismo de inibição enzimática</i>	<i>34</i>
1.4.2.1 Inibidores reversíveis	34
1.4.2.1.1 Inibidores competitivos.....	34
1.4.2.1.2 Inibidores não-competitivos	35
1.4.2.1.3 Inibidores incompetitivos	36
1.5 CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA (ITC)	37
2 OBJETIVOS.....	39
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.1 MATERIAIS	40
3.2 SELEÇÃO DE COMPOSTOS ATRAVÉS DE SBVS.....	40
<i>3.2.1 Algoritmos de busca</i>	<i>40</i>
3.2.1.1 Algoritmos de busca sistemática (construção incremental)	41
3.2.1.2 Algoritmos de busca estocásticos.....	41
<i>3.2.2 Funções de pontuação.....</i>	<i>42</i>
3.2.2.1 Funções de pontuação baseadas em campos de força.....	42
3.2.2.2 Funções empíricas	42
3.2.2.3 Funções baseadas no conhecimento	43
<i>3.2.3 Procedimentos computacionais para a seleção dos compostos através de SBVS.....</i>	<i>43</i>
3.3 ESTUDOS CINÉTICOS DOS COMPOSTOS SELECIONADOS PARA A TCGAPDH ATRAVÉS DE ITC	44
<i>3.3.1 Procedimentos experimentais de cinética enzimática</i>	<i>47</i>

3.3.1.1 Determinação do $\Delta H_{app\ molar}$ da catálise do G3P à 1-arseno-3-fosfoglicerato.....	48
3.3.1.2 Determinação dos parâmetros cinéticos da enzima TcGAPDH	49
3.3.1.3 Estudos da inibição enzimática da TcGAPDH.....	49
3.3.1.4 Análise dos dados.....	49
3.4 ESTUDO DE DINÂMICA MOLECULAR DOS COMPOSTOS BIOATIVOS	50
3.4.1 <i>Simulação de dinâmica molecular</i>	50
3.4.2 <i>Procedimentos para simulação por dinâmica molecular e MM/GBSA</i>	51
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1 SELEÇÃO DE COMPOSTOS ATRAVÉS DE SBVS	54
4.1.1 <i>Filtro molecular</i>	54
4.1.2 <i>Docagem molecular</i>	56
4.1.3 <i>Inspeção visual</i>	59
4.2 PARÂMETROS CINÉTICOS DA CATÁLISE DO G3P A 1-ARSENO-3-FOSFOGLICERATO E ENSAIOS DE INIBIÇÃO	63
4.2.1 <i>Determinação do $\Delta H_{app\ molar}$ da catálise do G3P a 1-arseno-3-fosfoglicerato</i>	63
4.2.2 <i>Compostos bioativos</i>	66
4.2.3 <i>Estudo de múltiplas concentrações</i>	68
4.3 ESTUDOS DE DINÂMICA MOLECULAR	72
4.3.1 <i>Dinâmica molecular do Nequimed104</i>	72
4.3.2 <i>Dinâmica molecular do Nequimed111</i>	74
4.3.3 <i>Dinâmica molecular do Nequimed125</i>	78
5 CONCLUSÕES	80
6 PERSPECTIVAS	82
REFERÊNCIAS	83
APÊNDICE.....	93

1. INTRODUÇÃO

1.1 A DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas, atualmente considerada uma doença super-negligenciada,¹ é causada pelo protozoário parasito *Trypanosoma cruzi* e foi descrita pelo médico sanitário Carlos Chagas em 1909. Sabe-se que os protozoários são responsáveis por causar diversas doenças aos seres humanos, como os diversos tipos de Leishmaniose e doença do sono que é causada pelo *Trypanosoma brucei*.²

A doença de Chagas é endêmica da América latina (Figura 1.1), porém há sua difusão para outros países devido a fenômenos migratórios, e por não ser uma doença comum em países europeus, asiáticos e da América do Norte, não há um controle rigoroso, fazendo com que a contaminação por transplantes e transfusões seja recorrente.³

Figura 1.1. Distribuição da Doença de Chagas pelo mundo³

Fonte: Coura, J. R.; Vinas, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*, v. 465, n. n7301_supp, p. S6-S7, 2010

Atualmente, há cerca de 10 milhões de casos e 10 mil pessoas morreram em 2008 devido às complicações dessa doença. Além disso, 400 mil indivíduos estão privados de suas atividades cotidianas e estima-se que 25 milhões de pessoas apresentem risco de adquirir a doença.⁴

As principais formas de contaminação são pela picada do inseto vetor comumente, chamado de “barbeiro” (*Triatoma infestans*), por rotas congênicas (transmissão vertical) que são aquelas transmitidas durante a gravidez da mãe, por transplantes de órgãos e transfusão sanguínea e por fim, o que vem ocorrendo, é a ingestão de alimentos contaminados como no caso em 2007 onde foi ingerido açaí contaminado com o *T. cruzi*.⁵

A Figura 1.2. mostra o ciclo da doença de Chagas quando transmitida pelo inseto vetor. O inseto ingere o parasito em sua forma tripomastigota (forma presente na corrente sanguínea), este então é levado ao tubo digestório do “barbeiro” onde passa a forma epimastigota (forma reprodutiva do parasito no inseto vetor). Ao picar os seres humanos e outros mamíferos,¹ o inseto defeca e ao coçar a região onde ocorreu o repasto sanguíneo, as fezes são levadas para a região ferida e os parasitos presentes nas fezes entram em contato com a corrente sanguínea ocasionando então a contaminação. A transmissão da doença através do inseto vetor ainda é a forma majoritária de contração.

A forma tripomastigota, após atingir a corrente sistêmica, invade as células dos hospedeiros e passa para a forma amastigota (forma reprodutiva). Nesse período o parasito se reproduz até o rompimento da célula liberando os parasitos que por sua vez penetram em outras células dando continuidade ao ciclo.⁶ Os parasitos enquanto livres na corrente sistêmica ficam propensos a transferência ao inseto vetor caso haja a picada.

Figura 1.2. Ciclo de vida do *T. cruzi*

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

A doença apresenta duas fases clínicas, a aguda e a crônica. A fase aguda se dá entre 4 e 10 dias após a picada. Neste período o enfermo apresenta febre, mal-estares e cefaleia. Posteriormente ocorre o aparecimento do “Sinal de Romaña” ou chagomas e invasão do sistema circulatório ocorrendo à migração do parasito para, praticamente, todos os tecidos e órgãos.⁷

A fase crônica é caracterizada por um período longo de latência, em que os indivíduos não apresentam sintomas, a ausência de sintomas pode permanecer por toda a vida do chagásico.⁸ Seus principais sintomas, quando ocorrem, são: danos ao trato intestinal,

causando as chamadas dilatações (megaesôfago e megacólon) e danos ao coração, ocasionando a megalocardia, insuficiência cardíaca, arritmias, lesão das fibrocélulas do miocárdio entre outros.⁶

1.1.1 Tratamento

Atualmente o tratamento da doença de Chagas se dá através de dois medicamentos (Nifurtimox e Benzonidazol), ambos eficazes apenas na fase aguda da doença e com severos efeitos adversos. Por causa dos efeitos indesejados, o nifurtimox teve seu uso descontinuado no Brasil. Existem, no entanto, tentativas de se empregar outros compostos⁹ (Figura 1.3). Estratégias como o reposicionamento de fármacos para doenças negligenciadas tem sido aplicada como forma de suprir a deficiência de medicamentos para seus tratamentos,¹⁰ exemplos dessa estratégia são o posaconazol e o ravuconazol que encontram-se em fase clínica.¹¹

Figura 1.3. Estruturas de alguns fármacos usados no tratamento da Doença de Chagas, juntamente com o Nifurtimox e o Benzonidazol

1.2 PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS E A QUÍMICA MEDICINAL

Durante a segunda metade do século vinte, a descoberta de novos medicamentos, dava-se, por parte dos químicos medicinais, através quase que exclusivamente por ensaios *in vivo*. Com o avanço tecnológicos, a partir da década de 80 este âmbito mudou, e então os químicos medicinais passaram a priorizar os estudos *in vitro* e *in silico*.¹² A Química Medicinal, em sua essência é uma ciência interdisciplinar que, para ser compreendida, faz-se necessário o entendimento de diversas áreas que vão da química e bioquímica à farmacologia e imunologia.¹³ Por definição da IUPAC, a Química Medicinal é:¹⁴

"A Química Medicinal envolve a descoberta, o desenvolvimento e a identificação e interpretação do modo de ação de compostos biologicamente ativos ao nível molecular. A ênfase é colocada em fármacos, mas o interesse da Química Medicinal também está voltado para o estudo, identificação e síntese de seus produtos metabólicos bem como dos compostos relacionados."

O processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos englobado pela Química Medicinal é dividido em duas grandes fases: Fase pré-clínica (descoberta) e Fase clínica (desenvolvimento).¹⁵

Na Figura 1.4 é demonstrado o processo de descoberta de fármacos. Inicialmente, é necessário ter uma disfunção biológica como alvo, fase pré-clínica, para isso deve-se avaliar sua viabilidade, se ela já apresenta terapêutica, caso sim se a terapêutica é eficaz ou não (como é o caso da maioria das doenças negligenciadas) para o tratamento. Feito esse levantamento, estudos para a seleção de moléculas com potencial atividade contra a disfunção proposta são realizados e então estas são testadas *in vitro*, e em seguida, levadas para estudos *in vivo* em modelos animais mais adequados. As melhores moléculas, *compostos-matriz*, avançam na gênese seguido para etapas de otimização da atividade, culminando com a seleção de um *candidato*. Este composto é então submetido a testes toxicológicos em animais, se a substância avançar em todos os testes, é enviada aos órgãos reguladores do governo (no caso do Brasil, por exemplo, a ANVISA), para uma rigorosa avaliação antes que o mesmo seja levado para a fase clínica.¹⁶

Na fase clínica, iniciam-se os ensaios em humanos. A primeira fase (Fase I) avalia a tolerância em voluntários humanos saudáveis Na Fase II, eficácia e o intervalo da dose em

pacientes. A Fase III compreende em realizar ensaios difundidos em milhares de pacientes para desenvolver um amplo banco de dados de eficácia e segurança. Na Fase IV, são realizados os monitoramentos pós-comercialização dos novos fármacos.¹²

Figura 1.4. Ilustração das etapas de descoberta de um novo fármaco

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

Na fase pré-clínica, como já mencionado, inicia-se com a definir uma disfunção e avaliação sua viabilidade, quanto a sua terapêutica e seu impacto na sociedade. Em seguida é necessário identificar e validar o alvo terapêutico, os mais importantes e estudados são enzimas, DNA, receptores hormonais, receptores nucleares e células. Na terapêutica são conhecidos cerca de 348 alvos com medicamentos aprovados e em uso clínico.¹⁷ A Figura 1.5 mostra a distribuição dos mesmos.

Figura 1.5. Distribuição dos medicamentos em uso clínico de acordo com suas classes de alvos¹⁷

Fonte: Adaptada de Hopkins, A. L.; Groom, C. R. The druggable genome. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 1, n. 9, p. 727-730, 2002

A aplicação da Química Medicinal¹² como ciência fundamental para a descoberta e o desenvolvimento de NCE (do inglês New Chemical Entity) estabelece-se pela interação de compostos químicos com alvos biológicos e pode resultar em um fenômeno de ação-perturbação do sistema biológico escolhido. A sua descrição de forma qualitativa é realizada e as classes de compostos são identificadas com atividade potencial fármaco-biológica. O parâmetro biológico quantitativo obtido através da medida da resposta farmacológica é usado para o estabelecimento de relações quantitativas estrutura-atividade (QSAR).¹⁸ Para isto, há delineamento da estrutura e subestrutura moleculares por determinação experimental ou cálculo de parâmetros físico-químicos.

A descoberta de novos compostos químicos bioativos está fundamentada no processo de descoberta, identificação e validação do alvo biomacromolecular, seleção de compostos bioativos através de métodos em quiminformática, identificação de compostos matrizes e suas respectivas otimizações (Figura 1.6).

Figura 1.6. Etapas do planejamento de fármacos

1.2.1 Espaço químico-biológico e a Quiminformática

Atualmente, indexados no Chemical Abstracts, existem algo próximo a 60 milhões de compostos químicos.¹⁹ No entanto, a quantidade teórica de compostos sintetizáveis que apresentem massa molecular de 500 Da e apenas átomos como C, O, H, N, P, S, F, Cl, Br, e I é da ordem de 10^{40} a 10^{60} . Isso faz com que o espaço químico seja considerado infinito. É claro que nem todas essas estruturas apresentam atividade e muito menos atinjam o rótulo de fármaco. Avaliando apenas os compostos bioativos pode-se classificá-los de acordo com o alvo que os mesmos interagem, estabelecendo então o que em Química Medicinal é chamado de espaço químico-biológico²⁰ (Figura 1.7). Este por sua vez, nada mais é que a distribuição das substâncias químicas com atividades frente a diferentes alvos biológicos.

Figura 1.7. Representação esquemática do espaço químico-biológico e a distribuição dos compostos bioativos de acordo com seus alvos (elipsóides)²⁰

Fonte: Adaptada de Lipinski, C.; Hopkins, A. Navigating chemical space for biology and medicine. *Nature*, v. 432, n. 7019, p. 855-861, 2004.

A quiminformática é uma ferramenta da Química Medicinal onde se faz uso de métodos e modelos computacionais para a seleção com compostos com propriedades biológicas desejadas.²¹

Depois de identificado(s) o(s) alvo(s), a descoberta e o desenvolvimento de ligantes são realizados pelo uso de coleções virtuais e reais de compostos baseadas em bancos de dados, coleções combinatórias e produtos naturais. Os modelos *in silico* são amplamente usados nesta fase para definir o espaço químico-biológico ligante-similar com a inclusão de informações referentes à afinidade pelo alvo, potência e propriedades farmacocinéticas constituídas de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxidez (ADME/Tox).

Para a seleção de compostos bioativos o método mais aplicado ainda é o ensaio em larga escala (HTS), no entanto métodos computacionais têm sido usados com certo sucesso, tais métodos são os de planejamento baseado na estrutura do ligante (LBVS), do receptor (SBVS), ou na melhor das hipóteses, um planejamento baseado tanto na estrutura do ligante quanto a do receptor.

1.2.1.1 Planejamento baseado na estrutura do alvo

O conhecimento do modo de interação entre o complexo ligante-receptor é um dos mais ansiados na química medicinal. Para isso modelos computacionais foram desenvolvidos, tais como docagem molecular, que fornece uma posição onde se observa a interação entre o ligante e o receptor.²² Além disso, a dinâmica molecular fornece, ao longo de um determinado período de tempo, a trajetória do ligante, elencando as interações que são estabelecidas ou perdidas no decorrer da etapa de dinâmica. Uma grande vantagem da dinâmica molecular é que ela trata tanto o ligante quanto o receptor como flexíveis.

A docagem pode ser definida como uma tentativa de prever a estrutura do complexo formado entre um ligante (uma pequena molécula ou até mesmo uma proteína) e um receptor (enzima, DNA, canais iônicos, receptores, etc).²³ Essa técnica é aplicada em diferentes estágios no processo de desenvolvimento de fármacos com o objetivo de cumprir três propostas principais: descrever o modo de interação de uma molécula conhecida, identificar novos ligantes usando o ensaio virtual e prever a afinidade de ligação de compostos relacionados a partir de uma série de ligantes ativos.²⁴ Extensas coleções de compostos,

geralmente disponíveis comercialmente, são docadas na estrutura do receptor em estudo por um programa computacional de docagem.²⁵ Cada composto é amostrado em milhares de possíveis conformações e pontuado com base na sua complementaridade com o receptor.²⁶ De centenas de milhares de moléculas no banco de dados, as dezenas de ligantes (hits) previstos, mais bem pontuados são subsequentemente avaliados num ensaio experimental (Figura 1.8).²⁷

Figura 1.8. Esquema representando as etapas da docagem: usando a estrutura de um receptor e um conjunto de moléculas, os programas de docagem avaliam a complementaridade do ligante em relação ao sítio ativo do receptor. Aquelas mais bem pontuadas são avaliadas numa próxima etapa através de um ensaio experimental.

Fonte: Adaptada de Shoichet, B. K. Virtual screening of chemical libraries. **Nature**, v. 432, n. 7019, p. 862-865, 2004

Existem três questões-chave que devem ser levadas em consideração na “docagem”: a representação do sistema, a busca no espaço conformacional e a pontuação dos potenciais candidatos.²⁸

O receptor pode ser representado de três formas diferentes: atômica, superficial e através de uma grade. A representação mais básica da superfície da proteína é a representação atômica dos resíduos de aminoácidos expostos. Ela é geralmente usada em comunhão com a função de energia potencial e muitas vezes somente durante o procedimento de pontuação final, em virtude da complexidade computacional de se avaliar os pares de interações interatômicas.²⁸

Os protocolos de docagem podem ser descritos como a combinação de dois componentes: um algoritmo de busca dos graus de liberdade configuracional e conformacional e uma função de pontuação ou avaliação.²⁹ O algoritmo de busca deve exaustivamente elucidar todos os possíveis modos de ligação entre o ligante e o receptor. Todos os seis graus de liberdade translacional e rotacional do ligante devem ser explorados junto com os graus de liberdade conformacionais internos de ambos, o ligante e o receptor. A geração de um grande número de modos de ligação não tem efeito sem um modelo para pontuar cada conformação de maneira acurada e eficiente.³⁰ A função de pontuação deve ser capaz de distinguir os modos de ligação experimental entre todos os outros modos explorados através do algoritmo de busca. Usualmente, as funções de pontuação indicam a complementaridade estérea e química entre o ligante e o receptor.²⁷

1.2.1.2 Dinâmica Molecular

A Dinâmica Molecular é uma técnica robusta que é aplicada para a compreensão de fenômenos físicos. Tal técnica tem como função avaliar o comportamento de um sistema ligante-receptor, por exemplo, através da física *Newtoniana* para cada átomo presente no sistema.³¹ Em cada passo de tempo da dinâmica, as equações de movimento são integradas numericamente definindo então as energias e trajetórias para todo o sistema estudado.³² Os passos resultam na trajetória que descrevem como as posições e velocidades das partículas no sistema se alteram no decorrer de um tempo.³³

Uma desvantagem das simulações de dinâmica molecular, é que elas são incapazes de ultrapassar barreiras de energéticas muito altas, o que pode fazer com que a amostragem conformacional se limite a estruturas com energias em torno de um poço energético,

tornando-a ineficiente. Além disso, este método é computacionalmente dispendioso e por isso limita-se a pequenos conjuntos de ligantes.

O método de dinâmica molecular apresenta uma grande congruência aos resultados experimentais, fornecendo explicações detalhadas a nível microscópico dos fenômenos observados experimentalmente.

1.3 ALVOS PARA O PLANEJAMENTO DE NOVOS FÁRMACOS

Atualmente são conhecidas algumas rotas metabólicas essenciais para a manutenção da vida do parasito. Com essas informações, tem sido realizado o planejamento de novos fármacos e com isso novas alternativas para o tratamento vêm sendo propostas, porém ainda longe de se tornarem tratamento efetivo para a doença. Vias como a glicolítica, digestão proteolítica e de síntese de novo de pirimidinas^{34, 35} vêm apresentando-se como promissoras no desenvolvimento de novos fármacos.

1.3.1 Via Glicolítica

Uma das rotas metabólicas mais promissoras para o desenvolvimento de novos compostos anti-chagásicos consiste na inibição de enzimas da via glicolítica (Figura 1.9.). O *T. cruzi* depende exclusivamente da glicólise para a obtenção de energia, já que não apresentam um ciclo de Krebs funcional.³⁶ Esta grande dependência na glicólise como fonte de energia é que faz das enzimas da via glicolítica alvos importantes para o planejamento de substâncias tripanossomicidas.

Extensos estudos do metabolismo do *T. brucei* mostraram que a forma tripomastigota utiliza a glicólise como sua única fonte para a obtenção de energia.³⁷ Engel *et al.* mostraram que uma cultura da forma amastigota do *T. cruzi* possui um metabolismo essencialmente glicolítico, e que ela adquire a habilidade de oxidar substratos, tais como aminoácidos, somente após a diferenciação para a forma tripomastigotas.³⁸

Figura 1.9. Esquema da via glicolítica

Em estudo realizado por Bakker *et al.*(1999) identificou os alvos mais promissores para o desenvolvimento de fármacos tripanossomicidas utilizando modelos matemáticos para calcular quais as etapas da glicólise precisam ser menos inibidas para induzir a inibição de certa quantidade do fluxo glicolítico.³⁶ A Tabela 1.1. reporta a porcentagem em que cada enzima da via glicolítica precisa ser inibida para que o fluxo glicolítico diminua em 50%. O transporte de glicose aparece como sendo o alvo mais promissor, já que a inibição de apenas 51% dessa etapa é suficiente para inibir o fluxo glicolítico em 50%. As enzimas ALD,

glicerol-3-fosfato desidrogenase (GDH) e PGK também aparecem como sendo alvos promissores para o planejamento de novos fármacos, já que elas também exercem um controle significativo do fluxo glicolítico.

Tabela 1.1. Enzimas envolvidas no controle da glicólise, cuja inibição individual leva a uma redução de 50% fluxo glicolítico

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

ALD, Frutose-1,6-difosfato aldolase; GDH, Glicerol-3-fosfato desidrogenase; GAPDH, Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; PGK, 3-fosfoglicerato cinase; HK, Hexocinase; PFK, 6-fosfofruto-cinase; PYK, Piruvato cinase

Fonte: Adaptado de Bakker, B. M.; *et al.* What Controls Glycolysis in Bloodstream Form *Trypanosoma brucei*? **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 21, p. 14551-14559, 1999.

Além das enzimas ALD, GDH e PGK, a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) também exerce papel significativo no controle do fluxo glicolítico. A inibição dessa enzima em 84% provoca a redução do fluxo glicolítico em 50%.³⁹

A alta dependência da via glicolítica para a obtenção de energia pelos tripanossomatídeos, a organização particular das enzimas dessa via no glicossomo e a singularidade de características estruturais de muitas enzimas envolvidas na glicólise oferece uma série de oportunidades para o desenvolvimento de novos agentes tripanossomicidas. Esse conjunto de características explica o motivo pelo qual as enzimas da via glicolítica se tornaram alvos promissores na busca por novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas.

1.3.1.1 Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH)

A sexta enzima da via glicolítica, a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH)⁴⁰ é um dos principais alvos na busca de novos fármacos para a doença de Chagas.⁴¹ Ela é uma enzima homotetramérica com dois domínios, o catalítico e o do cofator (NAD⁺). Ela possui diversas estruturas cristalográficas (Figura 1.10) depositadas no *Protein Data Bank* (PDB) tanto de *T. cruzi* quanto de humanos.

Figura 1.10. Estrutura cristalográfica por Raios-X, código PDB 1QXS, da GAPDH de *T. cruzi* (A). Sítio do substrato, no caso um análogo do 1,3-BPG, em cinza e em laranja o NAD⁺. A região destacada em amarelo é a cisteína catalítica (B)

O mecanismo de reação da enzima GAPDH ocorre através do sítio catalítico essencial que é constituído por uma cisteína. A fosforilação oxidativa do substrato gliceraldeído 3-fosfato (G3P) para 1,3-bisfosfoglicerato (1,3-BPG) ocorre por meio do co-fator NAD⁺ (Figura 1.11.).

Figura 1.11. Reação simplificada da conversão do G3P a 1,3-BPG pela enzima GAPDH

,Inicialmente, há a formação de um intermediário covalente hemitioacetal entre o G3P e a cisteína (Cys-166 de GAPDH). O hemitioacetal é oxidado ao tioéster, com redução concomitante do NAD^+ para NADH. O produto 1,3-BPG é liberado por fosforilação do tioéster através de um fosfato inorgânico. O NAD^+ também ajuda na fosforólise do tioéster (Figura 1.12.). Os inibidores enzimáticos são aqueles que interagem nesse sítio da GAPDH e assim inativam-na.⁴²

Figura 1.12. Representação do ciclo catalítico na enzima GAPDH

Fonte: FREITAS, R. F. *Integração de métodos em quiminformática e biocalorimetria para o planejamento de inibidores da enzima gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi**. 2009. 154 f. (Doutorado em Ciências - área de concentração: Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

Várias classes de moléculas foram testadas contra essa enzima, mas nenhuma ainda se mostrou muito promissora. Dentre essas classes podem-se citar as cumarinas,⁴³ flavonóides,⁴⁴ análogos de nucleosídeos e análogos do 1,3-BPG. Entretanto, em estudos recentes realizados em nosso grupo de pesquisa novas classes químicas identificadas como inibidores da GAPDH⁴⁵ mostraram-se ativas contra as duas formas infectivas do *T. cruzi*, a tripomastigota e a amastigota.

1.4 CINÉTICA ENZIMÁTICA

Enzimas são macromoléculas altamente específicas que atuam catalisando reações químicas biológicas,⁴⁶ que podem ser descritas da seguinte forma

Na representação acima, E é a quantidade de enzima livre, S o substrato, ES o complexo enzima-substrato e P o produto formado pela reação. Ela é dividida em duas etapas, a reversível que é a formação do complexo enzima-substrato e a irreversível que é a conversão do substrato a produto. Os termos k_1 , k_{-1} e k_2 são as constantes de velocidade de cada etapa.⁴⁷

Em 1913 dois pesquisadores, Leonor Michaelis e Maud Menten, propuseram uma teoria para a compreensão da cinética enzimática, a teoria de Michaelis-Menten.

No modelo proposto por Michaelis-Menten, é assumido que o processo de formação do ES é reversível e o equilíbrio é rapidamente atingido, sendo possível definir então a aproximação do estado estacionário.⁴⁶ A segunda etapa, a determinante, é de conversão do substrato em produto. Com a determinação do estado estacionário pode-se, através de um tratamento matemático, determinar a *Equação de Michaelis-Menten*.

$$v = \frac{v_{max} [S]}{K_M + [S]} \quad \text{Equação 1}$$

Está equação é definida a velocidade da reação em função da [S] e fornece importantes parâmetros para o estudo de reações catalisadas por enzimas, como K_M , V_{max} e k_{cat} . A representação gráfica da equação de *Michaelis-Menten* está exibida na Figura 1.13..

Figura 1.13. Representação gráfica de uma curva cinética típica de Michaelis-Menten. Através da análise gráfica podem-se observar os parâmetros cinéticos como o K_M e o V_{max}

1.4.1 Significados de K_M , k_{cat} e k_{cat}/K_M

O valor de K_M pode ser descrito como a concentração de substrato onde velocidade de reação é exatamente metade da velocidade máxima.⁴⁸ Uma maneira equivalente de dizer isso é que o K_M representa a concentração de substrato em que metade dos sítios ativos da enzima estão preenchidos pelo substrato, em outras palavras, o K_M representa a *afinidade* do substrato pela enzima, sendo que quanto menor o valor do K_M , maior será a afinidade do substrato pela enzima. Isto, entretanto, não é sempre verdadeiro. Para reações que obedeçam a cinética de Michaelis-Menten, K_M é uma medida da concentração de substrato necessário para a catálise ocorrer. Isto é, uma enzima com um elevado valor de K_M requer maior concentração de substrato para alcançar uma dada velocidade de reação do que uma com um baixo valor de K_M .

O k_{cat} é uma constante cinética que refere-se à quantidade de ciclos catalíticos que a enzima pode apresentar, ou seja, a quantidade, em mols, que a enzima pode converter do substrato em produto em uma certa unidade tempo.⁴⁸ A determinação de k_{cat} pode ser feita apenas quando a condição de saturação da enzima esteja atingida.

A razão k_{cat}/K_M é usada para mensurar a eficiência de uma enzima, ela é denominada com eficiência catalítica. Ela é geralmente usada para comparar a eficiência de enzimas diferentes entre si e também para avaliar o comportamento de diferentes substratos para uma mesma enzima.⁴⁸

1.4.2 Mecanismo de inibição enzimática

Existem dois tipos de inibidores enzimáticos, reversíveis e irreversíveis. Os inibidores irreversíveis ligam-se covalentemente as enzimas inativando-as permanentemente,⁴⁹ isso, em um organismo, proporciona diversos efeitos indesejados. Em química medicinal há a busca, preferencial, por inibidores reversíveis, pois estes - diferentemente dos irreversíveis - não se ligam covalentemente com aminoácidos da enzima, e consequentemente apresentam associação e dissociação devido às interações intermoleculares que elas realizam como ligação de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas.

1.4.2.1 Inibidores reversíveis

Os inibidores reversíveis podem ser divididos em três grupos: Competitivos, não competitivos e incompetitivos.

1.4.2.1.1 Inibidores competitivos

Na inibição competitiva ocorre a competição entre o substrato e o inibidor pelo sítio catalítico da enzima. Neste tipo de inibição é observada a interação do inibidor apenas com a enzima livre (Figura 1.14.).⁵⁰

Figura 1.14. Representação esquemática do mecanismo de inibição competitiva

Fonte: Copeland, R. A. Reversible Modes of Inhibitor Interactions with Enzymes. In: COPELAND, R. A. (Ed.). **Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists**. John Wiley & Sons, Inc., 2005. Cap.3. p. 48 - 80

O tratamento matemático do mecanismo de inibição enzimática proposto por Michaelis-Menten é apresentado abaixo pela equação 2.

$$v = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_M(1 + [I]/K_i)} \quad \text{Equação 2}$$

Os inibidores competitivos têm como característica manter o V_{max} inalterado e por haver a competição entre o substrato e o inibidor, é observado um aumento na concentração do substrato para que se atinja o V_{max} , ou seja, o valor do K_M é alterado (Figura 1.15.).

Figura 1.15. Gráfico teórico de Lineweaver–Burk para inibidores do tipo competitivo

1.4.2.1.2 Inibidores não-competitivos

No mecanismo de inibição não-competitivo o inibidor pode ter afinidade tanto pelo sítio do substrato quanto por outro sítio. Inibidores não-competitivos podem ligar-se direto a enzima livre como no complexo ES formando o complexo ESI (Figura 1.16.).⁵⁰

Figura 1.16. Representação esquemática do mecanismo de inibição não-competitivo

Fonte: Copeland, R. A. Reversible Modes of Inhibitor Interactions with Enzymes. In: COPELAND, R. A. (Ed.). **Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists**. John Wiley & Sons, Inc., 2005. Cap.3. p. 48 - 80

A equação de Michaelis-Menten para inibição não-competitiva é:

$$v = \frac{V_{max}[S]}{[S](1 + [I]/K_i) + K_M(1 + [I]/K_i)} \quad \text{Equação 3}$$

Inibidores não-competitivos diferentemente dos competitivos, não apresentam alteração no valor de K_M e sim no valor de V_{max} , pois o inibidor não compete com substrato pelo sítio catalítico (Figura 1.17.).

Figura 1.17. Gráfico teórico de Lineweaver-Burk para inibidores do tipo não-competitivo

1.4.2.1.3 Inibidores incompetitivos

Inibidores que atuam pelo mecanismo incompetitivo ligam-se apenas ao complexo ES.⁵⁰ Esse tipo de inibidor não apresentando nenhum tipo de afinidade pela enzima livre (Figura 1.18).

Figura 1.18. Representação esquemática do mecanismo de inibição incompetitiva

Fonte: Copeland, R. A. Reversible Modes of Inhibitor Interactions with Enzymes. In: COPELAND, R. A. (Ed.). **Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists**: John Wiley & Sons, Inc., 2005. Cap.3. p. 48 - 80

A redução efetiva da concentração do complexo ESI aumenta a afinidade aparente da enzima pelo substrato havendo então o deslocamento do equilíbrio para a formação do complexo ES. Para inibição incompetitiva é observada a seguinte equação de Michaelis-Meten:

$$v = \frac{V_{max}[S]}{[S](1 + [I]/\alpha K_I) + K_M} \quad \text{Equação 4}$$

Os inibidores que respondem de forma incompetitiva apresentam tanto alteração nos valores de K_M quanto o de V_{max} (Figura 1.19.).

Figura 1.19. Gráfico teórico Lineweaver-Burk para inibidores do tipo incompetitivo

1.5 CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA (ITC)

A maioria dos calorímetros de titulação isotérmica usados é baseada em celas com sistema de retorno,⁵¹ que mede os efeitos diferenciais do calor entre uma cela de referência (preenchida geralmente com tampão ou água) e uma cela de amostra (Figura 1.20.a). Isso é conhecido como energia compensatória diferencial. A diferença de temperatura entre as duas celas é constantemente monitorada e uma energia constante é aplicada na cela de referência, a qual ativa o circuito de retorno para aplicar uma quantidade de energia variável sobre a cela de amostra para manter uma diferença de temperatura entre as duas celas próxima de zero (Figura 1.20.b).

Figura 1.20. Representação esquemática de ITC: (a) antes do início da titulação as células de referência e amostra são mantidas na mesma temperatura. A célula de referência é mantida sempre na temperatura do experimento; (b) Durante a titulação, quando uma injeção é feita, ocorre uma variação na temperatura da célula de amostra e uma alteração na energia fornecida a esta célula se faz necessária para manter a diferença de temperatura entre as células igual a zero

Fonte: FREITAS, R. F. *Integração de métodos em quiminformática e biocalorimetria para o planejamento de inibidores da enzima gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase de Trypanosoma cruzi*. 2009. 154 f. (Doutorado em Ciências - área de concentração: Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009

Quando uma reação ocorre, há uma alteração no valor da temperatura na célula de amostra, o que leva a uma diferença de temperatura entre as duas células. Isto é detectado pelo calorímetro e a energia aplicada pela célula de retorno é ajustada. O sinal observado num experimento calorimétrico é a energia fornecida à célula de amostra. A velocidade de uma reação enzimática pode ser determinada medindo-se a variação na quantidade de energia que é fornecida pelo instrumento à célula de amostra após a adição do substrato ou da enzima através de uma seringa em constante agitação.⁵² Se a reação gera calor (exotérmica), o calorímetro precisa fornecer menos energia para manter constante a temperatura, e uma deflexão na energia (linha base) é observada. Ao contrário, se a reação consome calor (endotérmica), o calorímetro precisa fornecer uma energia adicional para manter as condições isotérmicas, e uma inflexão é observada na energia.

2 OBJETIVOS

Seleção de compostos inibidores da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi* e compreensão do mecanismo de ação dos mesmos. Isso será realizado da seguinte forma:

- ✓ Aplicação de ferramentas em quiminformática no planejamento baseado na estrutura do alvo (SBVS) para a seleção de compostos com potencial inibição da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi*;
- ✓ Avaliação bioquímica dos compostos selecionados usando micro calorimetria de titulação isotérmica (ITC);
 - Determinação de K_i e mecanismo de inibição;
- ✓ Estudos de simulação por dinâmica molecular para a compreensão do mecanismo de ação dos compostos com atividade contra a TcGAPDH

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Para a parte computacional foram usados: um microcomputador Core i7 870 2,91GHz, 4Gb DDR3 com OS Linux Fedora 13, para a etapa de seleção de compostos; uma estação de trabalho com a seguinte configuração: 2 processadores Xeon 5600, 24Gb DDR3 ECC, 2 placas nvidia TESLA C2070 com OS Linux Fedora 13, para os processos de dinâmica molecular. Os programas para a seleção dos compostos foram os do pacote da Schrödinger e Openeye, enquanto para a dinâmica molecular foi usado o AMBER11.

Para a etapa experimental foram usados os seguintes reagentes D,L-gliceraldeído-3-fosfato (G3P), ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico (HEPES), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), 2-mercaptoetanol, arseniato de sódio hepta hidratado($\text{NaHAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) e o dimetilsulfóxido (DMSO). A enzima TcGAPDH foi expressada e purificada no grupo NEQUIMED.⁴⁰ Foram comprados 25 compostos selecionados por métodos computacionais para o teste contra a enzima TcGAPDH que foram testados no microcalorímetro VP-ITC da Microcal.

3.2 SELEÇÃO DE COMPOSTOS ATRAVÉS DE SBVS

Na etapa de seleção de compostos deve ser estabelecida uma estratégia, que neste caso foi a SBVS. Como mencionado na seção 1.2.1.1, o protocolo de docagem molecular é dividido em dois componentes: os algoritmos de busca e as funções de pontuação.

3.2.1 Algoritmos de busca

Os principais tipos de algoritmos de busca são divididos em duas categorias: sistemáticos e estocásticos. Abaixo segue uma breve descrição de cada um deles.

3.2.1.1 Algoritmos de busca sistemática (construção incremental)

Em sua essência, estes algoritmos varrem todos os graus de liberdades de uma molécula. A desvantagem é que com essa varredura sistemática, gera-se uma quantidade enorme de combinações, no entanto para se evitar essa busca massiva,⁵³ o método de construção incremental é usado. Tal método consiste basicamente em: selecionar o fragmento principal, ajustar a posição do mesmo e, então, estabelecer o crescimento incremental do ligante.⁵⁴ A vantagem desta técnica é que pode ser restrita somente as conformações que se ajustam no sítio de interesse, mantendo a maior rapidez quando comparada com métodos estocásticos.

3.2.1.2 Algoritmos de busca estocásticos

Algoritmos estocásticos realizam uma busca aleatória por um ligante ou uma população de ligantes, onde cada ligante complexado com o receptor é avaliado segundo uma função de probabilidade. Os algoritmos estocásticos geram as conformações dos ligantes que são docadas e pontuadas num primeiro momento, então as melhores (conformações de menor energia) soluções são usadas como configurações de entrada para a próxima sequência de docagem e pontuação de forma sucessiva até que o final dos passos de docagem estabelecidos inicialmente. Tais métodos apresentam bom desempenho em termos de velocidade e enriquecimento, porém o tempo de processo é maior que os protocolos que usam algoritmos de busca sistemáticos. Os algoritmos estocásticos mais usados são o de Monte Carlo e Algoritmo Genético.⁵⁵

Para os algoritmos de Monte Carlo, basicamente, a geração da conformação inicial do ligante no sítio ativo é dada de forma aleatória e esta é usada como referência, então as conformações seguintes são geradas, e se caso a conformação gerada apresentar menor energia, imediatamente esta é tomada como referência, já se ela apresentar maior energia ela será avaliada segundo um critério binário conhecido como Metrópolis,⁵⁶ que é comparado com o fator de Boltzmann, e se o fator for maior que o número aleatório gerado, a conformação é aceita.

Algoritmos genéticos descrevem a translação, orientação e a conformação do ligante com respeito ao receptor como uma sequência de *genes*.⁵³ sendo assim o estado do ligante corresponde ao genótipo e suas coordenadas atômicas ao fenótipo. Basicamente em docagem

é observado à energia referente à interação do ligante com o receptor. Quando se usa algoritmo genético, a energia do complexo ligante-receptor é tomada como a *adaptação*, e esta é determinada por funções energéticas que relacionam as posições do ligante com alterações em seus *genes*, tais alterações dão-se de forma análoga a *reprodução e mutação*.⁵³ Analogamente a teoria evolucionária, onde o mais apto se sobressai, em docagem o ligante com menor energia é selecionado.

3.2.2 Funções de pontuação

Depois de geradas as posições através dos algoritmos de buscas, as mesmas são pontuadas de acordo com diferentes funções. As funções de pontuação são baseadas na suposição de que a afinidade de ligação possa ser descrita como uma soma de termos independentes.⁵⁷ Sendo assim, todas as funções de pontuação apresentam uma dependência entre o tamanho do ligante e a sua pontuação: quanto maior a molécula, maior é a probabilidade de que esta seja pontuada favoravelmente.

A maioria das funções de pontuação desconsidera os efeitos entrópicos na avaliação da interação entre o ligante e o receptor e os efeitos de solvatação e dessolvatação. Desta forma, ao aplicar uma função de pontuação o valor de energia estimado não é a energia livre de interação (ΔG_{int}), e sim a determinação da complementaridade ligante pelo receptor.⁵³ Existem três tipos de funções de pontuação que são aplicadas atualmente: funções de pontuação baseadas em campos de força, empíricas e baseadas no conhecimento.

3.2.2.1 Funções de pontuação baseadas em campos de força

Funções baseadas em campo de força têm como característica aproximar a ΔG_{int} do complexo ligante-receptor como uma soma das energias de interações eletrostáticas e de van der Waals. Os campos de força moleculares mais utilizados são GROMOS,⁵⁸ AMBER⁵⁹ e CHARMM.⁶⁰ Em geral, os campos de força separam a função de energia potencial, fazendo a distinção entre átomos ligados e entre átomos não-ligados avaliando assim suas contribuições.

Funções empíricas

Estas funções têm como característica traduzir termos de parâmetros estruturais, como ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas como energia de interação. Em funções

empíricas quanto mais apropriada for a modelagem dos termos e o balanceamento das interações (ligação de hidrogênio e hidrofóbicas), melhores serão os resultados.⁶¹

As funções empíricas reproduzem dados experimentais associados à ΔG_{int} , assumindo que esta pode ser decomposta como uma soma de diversas funções básicas que dependem das coordenadas do ligante e do receptor.⁶² Dentre as funções de pontuação empíricas, a mais comumente utilizada é ChemScore.

3.2.2.2 Funções baseadas no conhecimento

Essas funções são construídas exclusivamente a partir de uma análise estatística da estrutura de complexos determinados experimentalmente.⁶³ Assim como nos métodos empíricos, essas funções tem como objetivo descrever implicitamente efeitos da ligação que são complexos de determinar explicitamente. Desta forma, o ΔG_{int} é proveniente da soma de todos esses os potenciais calculados.⁶⁴ As vantagens deste tipo de função são simplicidade computacional que permite avaliar extensas coleções virtuais de compostos, pode ser aplicada a diferentes sistemas, mesmo que eles não tenham sido usados para construí-la. Ela tem como desvantagem ter uma derivação essencialmente baseada em informações implícitas, extraídas de conjuntos limitados de estruturas experimentais de complexos ligante-receptor.

3.2.3 Procedimentos computacionais para a seleção dos compostos através de SBVS

Ao se adotar a estratégia de SBVS, duas etapas são essenciais, a construção do banco de dados de ligantes e a seleção da estrutura cristalográfica ou por modelo de homologia.⁶⁵ Inicialmente foi construído um banco de dados de compostos extraídos da base de dados ZINC no módulo “*drug-like in stock*”.⁶⁶ Após a seleção do banco, foi necessário aplicar alguns filtros para que fosse reduzido o número de compostos. Para essa etapa foi usado o programa FILTER da Openeye. O passo seguinte consistiu em gerar as estruturas 3D foram e na minimização conformacional através do programa LigPrep presente no pacote da Schroedinger. Neste ponto os ligantes apresentam-se preparados para o protocolo de docagem.

Antes de iniciar a docagem, é necessário selecionar a melhor estrutura do alvo em estudo. Para isso, faz-se necessário estudar quais as melhores estruturas depositadas no Protein Data

Bank (PDB), para a TcGAPDH foi escolhida a estrutura 1QXS.⁶⁷ Depois de adquiridas as estruturas, estas passaram por um processo de preparo onde foram removidos os ligantes co-cristalizados e as moléculas de água mantendo apenas o cofator, no caso o NAD⁺. A preparação da estrutura foi realizada através do módulo *ProteinPreparation* presente no Maestro. Esse módulo ajustou as ordens de ligação de toda a proteína, corrigiu as cadeias laterais incompletas, adicionou átomos de hidrogênio e realizou a predição do estado de protonação das histidinas.

Usando o banco e o alvo previamente preparados, foi iniciado o planejamento baseado na estrutura do alvo (docagem molecular). Para o processo de docagem, foi usado o programa Glide, também presente no pacote da Schroedinger. A Figura 3.1. é uma representação esquemática da estratégia abordada e acima descrita.

Figura 3.1. Fluxograma do processo adotado para a seleção dos compostos e o teste contra a enzima GAPDH

3.3 ESTUDOS CINÉTICOS DOS COMPOSTOS SELECIONADOS PARA A TCGAPDH ATRAVÉS DE ITC

Um método prático para se estudar a cinética enzimática é por ITC, pois ela é capaz de medir a velocidade da geração de calor e acompanhar a conversão do substrato em produto propiciando a medida da velocidade de uma reação enzimática.⁶⁸ O calor (Q) medido como uma função do tempo (dt) é definido como potência térmica:

$$E = \frac{dQ}{dt} \quad \text{Equação 5}$$

A quantidade de calor associado na conversão de n moles de substrato em produto é dada por:

$$Q = n\Delta H_{app} = [P]_{total}V\Delta H_{app} \quad \text{Equação 6}$$

onde V é o volume da solução na cela de amostra, [P] é a concentração molar do produto gerado e ΔH_{app} é a entalpia molar aparente determinada experimentalmente para a reação.

$$E = \frac{dQ}{dt} = \frac{d[P]}{dt}V\Delta H_{app} \quad \text{Equação 7}$$

A potência térmica gerada por uma enzima na conversão do substrato em produto é igual a $d[P]/dt$ que por sua vez é diretamente proporcional à velocidade de formação do produto (velocidade da reação). Rearranjando a Equação 7 temos:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{1}{V\Delta H_{app}} \frac{dQ}{dt} \quad \text{Equação 8}$$

A Figura 3.2. mostra uma curva típica da velocidade de reação através do uso da técnica de ITC. Após a injeção do substrato, observa-se um pico inicial, nesse caso endotérmico, correspondente ao calor de diluição. A linha base então se estabiliza num valor de potência térmica menor que o observado antes da injeção (linha vermelha). Isso ocorre porque certa quantidade de calor é gerada pela reação enzimática e, portanto, a energia necessária, fornecida pelo instrumento, para manter o equilíbrio entre as celas de referência e amostra é menor.⁵¹ A cada injeção a linha base se estabiliza num nível inferior, isto indica que esta reação particular ocorre com entalpia negativa, ou seja, é uma reação exotérmica. Uma segunda injeção é feita e o processo se repete. A velocidade do calor gerado ($E = dQ_n/dt$) para cada concentração de substrato é proporcional à velocidade da reação.

Figura 3.2. Gráfico da potência térmica *versus* o tempo. A cada injeção a linha base se estabiliza num nível inferior e a quantidade de calor gerado é proporcional à velocidade da reação⁵¹ (A). Gráfico de Michaelis-Menten obtido através do tratamento matemático, descrito nesta sessão, do conjunto de dado coletado pelo ITC (B)

A entalpia molar aparente da reação pode ser determinada permitindo-se que a reação se complete e a integração da área do sinal obtido fornece a quantidade total de calor (Q_r) gerado na reação. O substrato é injetado na cela de reação contendo uma elevada concentração de enzima. Após a injeção do substrato, há uma diminuição no valor da linha base, o que indica a natureza exotérmica da reação. Após todo o substrato ser consumido, a linha base retorna ao seu valor inicial. A integração da área descrita pela curva (menos o calor associado à diluição do substrato) fornece o valor de Q_r que é igual à entalpia aparente da reação.⁶⁹

Após a reequilibração, uma segunda injeção do substrato na cela de amostra (agora contendo o produto da reação) fornece uma curva com a mesma forma e área,⁵² confirmando o valor de ΔH_{app} e evidenciando que a inibição pelo produto é desprezível. A entalpia molar aparente ($\Delta H_{app,molar}$) é obtida subtraindo-se o valor do calor de diluição do substrato (Q_d), o qual é obtido num experimento separado na ausência da enzima, do calor gerado na reação, e dividindo-se pelo número de moles do substrato presentes na cela de amostra.

$$\Delta H_{app\ molar} = \frac{Q_r - Q_d}{n} \quad \text{Equação 9}$$

Outra maneira de se determinar a entalpia aparente da reação é colocar a enzima na seringa numa concentração suficientemente elevada de modo que através de uma única injeção, a enzima seja capaz de converter todo o substrato presente na cela de amostra em produto. Após o termino da reação, uma segunda injeção é feita para se calcular o calor de diluição da enzima.

3.3.1 Procedimentos experimentais de cinética enzimática

Antes do início dos experimentos, lavou-se a cela de amostra e a seringa do calorímetro com 500 mL de uma solução água. O volume da cela de referência foi completado com água previamente desgaseificada com agitação constante durante 5 minutos através do ThermoVac, que é uma bomba de vácuo com controle de temperatura fornecida pelo fabricante do calorímetro.

As soluções usadas na cela de amostra e na seringa também foram previamente desgaseificadas e termostatizadas (com agitação constante) por 5 minutos com o intuito de se eliminarem bolhas de ar da solução que provocam ruídos no sinal obtido pelo aparelho. Além disso, as soluções foram desgaseificadas a uma temperatura 5°C inferior a que seria realizada no experimento, ou seja a 20° C. Com isso, evita-se que haja um tempo muito longo para que a linha base se estabilize. Uma seringa de 2,5 mL do tipo “gaslight” (Hamilton) foi usada para preencher as celas de amostra e de referência. A solução foi injetada de forma a evitar a formação de bolhas.

Antes do preenchimento da cela de amostra e da seringa com as soluções para o ensaio, as mesmas foram lavadas com tampão HEPES para que o houvesse uma menor interferência na análise. A cela do calorímetro usado apresenta um volume nominal de 1,4273 mL foi preenchida sempre com 2 mL de solução e o excedente fora removido, garantindo assim que a cela de amostra encontra-se preenchida com seu volume nominal. A seringa do calorímetro apresenta um volume de 284,21 µL. Esta foi preenchida lentamente, e em seguida purgada duas vezes novamente para eliminar qualquer bolha. A superfície da seringa após o preenchimento apresenta pequenas gotas de líquido que foram secadas com papel para evitar a introdução de erros no volume.

Ao se iniciarem os experimentos, é requerido um tempo para a estabilização da temperatura. Em todos os experimentos a velocidade de rotação da seringa foi de 307 rpm e a temperatura do experimento foi de 25°C. O fluxo de calor ($\mu\text{cal s}^{-1}$) foi registrado como uma função do tempo. A Figura 3.3. é uma representação esquemática da estratégia abordada e acima descrita.

Figura 3.3. Fluxograma do procedimento adotado para o ensaio biocalorimétrico dos compostos selecionados por SBVS

3.3.1.1 Determinação do $\Delta H_{\text{app molar}}$ da catálise do G3P à 1-arseno-3-fosfoglicerato

A entalpia molar aparente da reação de conversão do G3P a 1-arseno-3-fosfoglicerato foi determinada preenchendo-se a cela de amostra com tampão HEPES (100 mM; pH 8,0), NaHAsO_4 30 mM, NAD^+ 1 mM e TcGAPDH 5 nM. A seringa foi preenchida com D,L-G3P 5 mM em um tampão idêntico ao da cela de amostra, com o intuito de minimizar ao máximo os calores de mistura e diluição. Nos experimentos realizados neste trabalho, o fosfato, que é um

dos substratos da GAPDH, foi substituído pelo arseniato já que o produto formado durante a reação (1,3-BPG) inibe a enzima. Foi realizada a titulação de 40 μ L de G3P durante 80 segundos. O tempo de duração do experimento foi de 30 minutos. Para a determinação do calor de diluição uma única injeção de 40 mL de D,L-G3P 5 mM foi feita nas mesmas condições experimentais descritas para a determinação do calor de reação, porém na ausência de enzima.

3.3.1.2 Determinação dos parâmetros cinéticos da enzima TcGAPDH

Os parâmetros cinéticos do G3P (K_M , k_{cat} e V_{max}) foram determinados de acordo com o protocolo previamente estabelecido em nosso laboratório.⁴⁰ A seringa foi preenchida com D,L-G3P 5 mM no tampão HEPES 100 mM e pH 8,0. A cela de amostra foi preenchida com o mesmo tampão, NaHAsO₄ 30 mM, NAD⁺ 1 mM e a enzima GAPDH 5 nM. A enzima foi titulada através de 20 injeções, sendo o volume de cada injeção igual a 2 μ L, com intervalos entre elas de 90 segundos. O experimento foi realizado em triplicata.

3.3.1.3 Estudos da inibição enzimática da TcGAPDH

A avaliação dos compostos selecionados como possíveis inibidores da enzima TcGAPDH foi realizada preenchendo-se a seringa com D,L-G3P 5 mM no tampão HEPES (100 mM e pH 8,0) e 5% de DMSO. A cela de amostra foi preenchida com o mesmo tampão, NaHAsO₄ 30 mM, NAD⁺ 1 mM, 5% de DMSO e a enzima GAPDH 5 nM. Os compostos estudados como inibidor foram adicionados à cela de amostra numa concentração final de 50 μ M. Em seguida, titulou-se o G3P através de 20 injeções, sendo que o volume de cada injeção foi de 2 μ L, com intervalos entre elas de 90 segundos. Um experimento controle (na ausência do inibidor) foi realizado antes de cada ensaio de inibição seguindo o protocolo descrito acima. Todos os ensaios foram feitos em triplicatas.

3.3.1.4 Análise dos dados

Os dados referentes à concentração do substrato, [S], e a velocidade da reação, v, foram obtidos usando-se o programa Origin 7.0 através do modo “Ensaio Enzimático” desse programa de acordo com o “método 2: somente substrato”. Esse método é usado quando o

experimento é realizado através de múltiplas injeções. As constantes K_M , k_{cat} e V_{max} foram determinadas a partir dos dados obtidos experimentalmente, através do ajuste não-linear dos mínimos quadrados à equação de Michaelis-Menten usando o programa SigmaPlot 10.0.

3.4 ESTUDO DE DINÂMICA MOLECULAR DOS COMPOSTOS BIOATIVOS

3.4.1 Simulação de dinâmica molecular

Como introduzido na seção 1.2.1.2, a dinâmica desempenha uma papel importante na compreensão de fenômenos de interação entre ligante-receptor e outros sistemas. No entanto, ela é uma técnica que requer uma demanda computacional grande. Os processos de dinâmica necessitam de varias etapas, uma delas é a parametrização dos campos de força. Esta é parte essencial para o processo, pois são efetuados os cálculos de estrutura eletrônica. Para pequenas moléculas o ajuste é menos complexo do que para proteínas. O campo de força e sua qualidade são diretamente responsáveis pelo desempenho da dinâmica. Uma gama de campos de força foi desenvolvida como o AMBER, GROMOS, CHARMM e OPLS (Optimized Potentials for Liquid Simulations), que apresenta parâmetros mais apropriados para biomacromoléculas, lipídeos, sacarídeos e outros.

O campo de força é o conjunto de parâmetros necessários para descrever todas essas interações. A escolha dos potenciais de interação intra- e intermolecular é fundamental, pois estes determinam as forças atuantes em cada partícula delineando o comportamento do sistema no decorrer do tempo, e assim gerar suas trajetórias.

Um problema em métodos por dinâmica molecular é que eles frequentemente ficam presos em mínimos locais de energia, pois há a impossibilidade de atravessarem altas barreiras de energia em um tempo de simulação viável computacionalmente. Como alternativa para essa limitação, as seguintes estratégias têm sido aplicadas: iniciar os processos de dinâmica com diferentes posições iniciais do ligante, simular picos de temperatura,³¹ suavizar a superfície de energia potencial e simular diferentes partes do sistema receptor-ligante com diferentes temperaturas.³²

Métodos de simulação do tipo MM/PBSA⁷⁰ e MM/GBSA, diferentemente da maioria das funções de pontuação empíricas usadas em protocolos de docagem molecular, permitem uma rigorosa decomposição da energia livre de interação (ΔG_{int}) em contribuições provenientes de diferentes grupos de átomos ou tipos de interações.⁷¹

$$\Delta G_{int} = \Delta H - T\Delta S \approx \Delta E_{MM} + \Delta G_{sol} - T\Delta S \quad \text{Equação 10}$$

Onde

$$\Delta E_{MM} = \Delta E_{interno} + \Delta E_{eletrostatico} + \Delta E_{vdw} \quad \text{Equação 11}$$

Sendo o termo $\Delta E_{interno}$ correspondente às ligações, ângulos e diedros. O $\Delta E_{eletrostatico}$ proveniente das interações eletrostáticas e o ΔE_{vdw} proveniente as interações de van der Waals. O termo ΔG_{sol} é referente à energia livre de solvatação que é decomposta em:

$$\Delta G_{sol} = \Delta G_{PB/GB} + \Delta G_{SA} \quad \text{Equação 12}$$

Que é proveniente da soma de termos polares ($\Delta G_{PB/GB}$) que é calculado usando, tanto GB (Born-generalizado) quanto PB (Poisson-Boltzmann) e apolares (ΔG_{SA}) que são calculados através de uma estimativa da área de superfície acessível ao solvente. Os valores de $-T\Delta S$ são gerados por análise do conjunto de imagens obtidos a partir do processo de simulação de dinâmica.⁷²

3.4.2 Procedimentos para simulação por dinâmica molecular e MM/GBSA

Os três compostos com valores de K_i^{app} menores que 100 μM foram submetidos à dinâmica molecular utilizando o programa Amber11,⁷³ com campo de força mmff99sb. A estrutura de partida foi o complexo enzima-ligante obtido através da docagem, e pelo fato de o complexo apresentar moléculas distintas dos aminoácidos foi necessário realizar a parametrização do ligante. Para tal procedimento, foi calculada a carga parcial dos átomos do ligante, na conformação obtida pela docagem. Para a parametrização foi usado o programa Gaussian03, com o método/função de base HF/6-31G* para o cálculo das cargas. Terminada esta etapa, para que o programa Amber11 pudesse ler o arquivo, foram adicionados os valores das cargas, as posições e os tipos dos átomos, para isso foram usados os programas Antechamber e tLeap. Após o tratamento dos ligantes, foi iniciada a preparação da estrutura do complexo. Inicialmente, o dado de saída da docagem foi tratado removendo-se os átomos

de hidrogênio e o estado de protonação das histidinas foi corrigido pelo programa H++. Através do tLeap, o complexo foi carregado, e antes de colocar água e íons, teve seus parâmetros salvos. Passada a etapa de adição de cargas, o sistema foi neutralizado adicionando íons cloreto (Cl⁻), para então adicionar uma caixa octaédrica truncada de água, do tipo TIP3, de 10 Å em volta do sistema.

O processo de dinâmica foi separado em duas etapas: a primeira que é chamada de pré-dinâmica, que consistiu em uma minimização, aquecimento do sistema, equilíbrio e tratamento de densidade; e uma segunda, que foi a dinâmica.⁷⁴ A etapa de dinâmica foi fragmentada em três partes uma que durou de 0 a 2 ns, seguida de um passo de anelamento com pico máximo de 500 K e mínimo de 200 K, essa variação de temperatura durou 170 ps. O sistema, durante o anelamento, partiu de 310 K e foi aquecido até 500 K, essa etapa durou 20 ps. Depois do aquecimento o sistema passou por uma equilíbrio a temperatura constante com duração de 50 ps. Após a equilíbrio o sistema foi resfriamento a 200K com duração de 30 ps e por equilíbrio durante 50 ps. Por fim, o sistema foi aquecimento, durante 20 ps, até a temperatura inicial (Figura 3.4). Depois do anelamento, a simulação foi novamente submetida ao sistema NpT, à pressão constante, 310 K de temperatura que durou 8 ns, totalizando 10 ns de simulação.

Figura 3.4. Gráfico da variação de temperatura durante o processo de simulação (A) com a etapa de anelamento destacada (B)

O cálculo de MM/GBSA foi feito tomando metade das imagens geradas na simulação (400 imagens) e foi estabelecida após a etapa de anelamento com duração de 8 ns. O valor de energia obtido usado para a comparação entre os valores de atividade determinados experimentalmente por ITC. A Figura 3.5. é uma representação esquemática da estratégia abordada e acima descrita.

Figura 3.5. Fluxograma do processo de dinâmica molecular para a compreensão da interação entre os ligantes e a TcGAPDH

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SELEÇÃO DE COMPOSTOS ATRAVÉS DE SBVS

Em trabalho anterior, Freitas, R.F.⁷⁵ identificou uma possível região de seletividade entre a TcGAPDH e a HsGAPDH. Esta região compreendia em dois aminoácidos a THR167 e SER247 na TcGAPDH. Esses aminoácidos então foram usados como restrições no processo de docagem, onde ao menos uma interação do tipo ligação de H deveria ser realizada com os ligantes docados.

4.1.1 Filtro molecular

O primeiro passo é o estabelecimento do banco de dados, este foi obtido através do ZINC no módulo “*druk-like in stock*”. O banco inicial continha aproximadamente 3 milhões de estruturas. A construção da coleção de compostos deve ser bem estabelecida, para isso a etapa de filtragem é crucial. O programa usado para a filtragem foi o FILTER v2.1.1 da Openeye.⁷⁶ Este programa usa os seguintes critérios para que uma dada molécula seja selecionada ou descartada: propriedades físicas, conteúdo atômico, grupos funcionais e propriedades topológicas. O processo de filtragem é dado de acordo com um modelo de filtro, no caso foi o *fármaco-similar*.

A aplicação do filtro molecular, além de gerar um banco de dados de compostos com características similares, reduz drasticamente o número de estruturas, pois o programa tem como princípio remover do banco inicial os compostos que possam formar agregados, apresentarem grupos reativos, potencialmente tóxicos, com grupos funcionais indesejados e corantes.

O filtro *fármaco-similar* foi utilizado para remover da coleção de moléculas que não se adequam as características moleculares (Tabela 4.1) definidas por Lipinski⁷⁷ e Veber.⁷⁸ A solubilidade é outro fator crítico, principalmente nos ensaios iniciais e por isso, tal informação foi levada em consideração na filtração dos compostos. Após esta etapa, o número de compostos do banco reduziu-se a 100 mil.

Tabela 4.1. Alguns parâmetros moleculares usados no filtro fármaco-similar aplicado pelo programa FILTER e a média dos valores encontrados no banco selecionado

Descritor	Intervalo	Média
Massa Molecular (MW)	200 a 500 Da	420,54 Da
Doador de ligação de hidrogênio	0 a 5	1
Aceitador de ligação de hidrogênio	0 a 10	4
XLogP	-1 a 5	2,75

Figura 4.1. Gráficos de distribuição dos compostos presentes na coleção virtual após a aplicação do filtro molecular. (A) Peso Molecular, (B) XlogP, (C) Aceitadores de ligação de Hidrogênio, (D) Doadores de ligação de Hidrogênio

A Figura 4.1. mostra a distribuição dos compostos do banco após a aplicação do FILTER. A distribuição do peso molecular dos compostos após a etapa de filtragem mostra que eles apresentam valores próximos a faixa de fármaco-similares, mostrando que a aplicação do

filtro gerou uma coleção focada e com as características determinadas inicialmente. É possível observar que todos os compostos do banco podem realizar interações do tipo ligação de Hidrogênio, tanto doador como aceitador.

4.1.2 Docagem molecular

A etapa que antecede a docagem é a escolha apropriada da estrutura cristalográfica tridimensional. Para essa seleção é necessário fazer a avaliação de parâmetros cristalográficos como a resolução da estrutura e R_{free} e R_{factor} (Tabela 4.2).

Tabela 4.2. Valores dos parâmetros cristalográficos das estruturas tridimensionais da enzima TcGAPDH depositados no banco PDB

Código PDB	Resolução (Å)	R_{free}	R_{factor}	$R_{\text{free}} - R_{\text{factor}}$
1QXS	2,75	0,276	0,202	0,074
1K3T	1,95	0,280	0,201	0,079
1ML3	2,50	0,264	0,199	0,065
3DMT	2,30	0,252	0,190	0,062

O principal parâmetro cristalográfico é a resolução, através dele é possível observar a qualidade dos modelos depositados no PDB. Quanto menor for o valor, em Angstroms, da resolução, melhor é o modelo. Para modelos com resolução altas ($<1,5$ Å) maior a confiança de que o resultado observado corresponda à estrutura do complexo estudado. Porém em modelos com baixa resolução ($>2,5$ Å), maior a probabilidade de um ajuste menos criterioso com relação aos dados experimentais. No entanto, não apenas a resolução deve ser levada em consideração. Os valores de R_{factor} e R_{free} , que descrevem respectivamente a habilidade de descrever o modelo e validação cruzada no refinamento cristalográfico.⁷⁹

O R_{factor} mede a concordância entre o modelo cristalográfico e os dados experimentais. Um problema nesse parâmetro é o superajuste do modelo, que proporciona à geração de modelos não reais. Uma alternativa para esse problema é a aplicação de outro parâmetro, o

R_{free} que tem a mesma definição que R_{factor} , porém, é calculado para um número bem menor de reflexões que não são usados para a construção do modelo final.⁸⁰

Embora a estrutura escolhida (1QXS) não apresente os melhores ajustes cristalográficos, ela foi definida como alvo por apresentar-se cocrystalizada com um análogo (S70) do produto 1,3-BPG, ocupando assim a região desejada no planejamento e também por apresentar o cofator em seu respectivo sítio.

Os processos de docagem foram feitos usando o programa Glide v5.5 da Schrödinger. Ele realiza buscas do espaço conformacional do ligante mantendo a estrutura do receptor rígido. O Glide aplica diversos filtros hierárquicos tentando descrever as possíveis localizações do ligante na região do sítio ativo do receptor, produzindo assim o conjunto de conformações iniciais dos ligantes e com isso realizar as buscas iniciais em todo o espaço disponível para o ligante identificando as melhores posições do mesmo. Esta etapa descrita reduz drasticamente a fase de busca da região do espaço e cálculo de energia, minimizando a demanda computacional.⁸¹

As posições selecionadas pela etapa acima têm sua minimização, no domínio do alvo, através de uma função de padrão de energia mecânica molecular (que no programa Glide é: o campo de força OPLS-AA) e também da distância dielétrica.⁸² Finalizada a etapa de minimização do ligante no domínio do alvo, de três a seis posições de menor energia são submetidos a um procedimento de Monte Carlo. Este procedimento ajuda a orientação mais adequada de grupos periféricos e são necessários em alguns casos.

A função de pontuação do programa Glide é uma função empírica chamada GlideScore e está possui um módulo de precisão extra, o XP. Ela aplica penalidades para posições conformacionais que violam princípios físico-químicos estabelecidos, como grupos polares ou com carga ser expostos ao solvente. O modo XP reduz a taxa de falsos positivos, porém ela exige um alto custo computacional, o que a torna aplicável a pequenas coleções de moléculas ou em fase de otimização de ligante.^{82, 83}

A docagem molecular do banco obtido após a etapa de filtragem classificou os composto de acordo com a energia de interação dos mesmos com o alvo. O protocolo de docagem usou duas restrições, com os aminoácidos THR167 e SER247, a caixa gerada (grid) foi centralizada

na região do S70 (análogo ao substrato) e com 20 Å². A Tabela 4.3 mostra a pontuação dos ligantes selecionados por inspeção visual.

Tabela 4.3. Tabela de pontuação obtida através do programa Glide no modo XP para a docagem realizada com o NAD⁺ no sítio

Molécula	Pontuação (kcal mol ⁻¹)	Molécula	Pontuação (kcal mol ⁻¹)
Nequimed86	-4,52	Nequimed116	-3,35
Nequimed87	-3,71	Nequimed117	-4,13
Nequimed88	-4,84	Nequimed119	-3,98
Nequimed89	-1,42	Nequimed121	-5,15
Nequimed90	-1,43	Nequimed122	-3,70
Nequimed93	-5,28	Nequimed123	-3,67
Nequimed103	-3,74	Nequimed124	-4,01
Nequimed104	-2,14	Nequimed125	-3,00
Nequimed111	-5,87	Nequimed126	-1,51
Nequimed113	-4,75	Nequimed127	-4,77
Nequimed114	-4,66	Nequimed129	-3,92

Os valores de pontuação estão entre -5,87 e -1,42 kcal mol⁻¹. No entanto, a etapa fundamental na seleção foi a inspeção visual, onde foi buscado uma melhor complementaridade com o sítio e interações cruciais com aminoácidos (Figura 4.2).

Figura 4.2. Resultado da docagem dos compostos (cinza) selecionados por inspeção visual na presença do NAD⁺ (laranja)

4.1.3 Inspeção visual

Na Figura 4.3A observa-se em cinza o composto Nequimed111 e as interações com os aminoácidos e NAD (em laranja). Na Figura 4.3B é possível observar a acomodação do composto no sítio. O composto alocou-se, com o grupo *metil-sulfonamida*, em uma região com aminoácidos hidrofóbicos (GLY227, SER165 e PRO136). O anel *diidro-pirazol*, ficou a uma distância de 3,72 Å CYS166, região em amarelo na Figura 4.3B. A terceira porção do composto, o anel *nitro-benzeno*, apresentou interação com a ARG249 e THR199 e ficou próximo do grupo nicotinamida do NAD⁺. Na Figura 4.3C é possível observar as interações que o ligante realiza com o alvo.

Figura 4.3. (A) Posição da docagem do Nequimed111 (cinza) e as interações com os aminoácidos; (B) Posição no sítio (gerados pelo Chimera). (C) Mapa de interações 2D⁸⁴

O Nequimed104, diferentemente do nequimed111, não explorou a região dos aminoácidos hidrofóbicos, porém explorou a região da ASP210 (no canto inferior esquerdo da Figura 4.4A). O grupo sulfona apresenta uma distância de 4,38 Å da CYS166 e novamente um grupo hidrofóbico, no caso um tolueno, ficou orientado para o grupo nicotinamida do NAD⁺.

Figura 4.4. (A) Posição da docagem do Nequimed104 (cinza) e as interações com os aminoácidos. (B) Posição no sítio (gerados pelo Chimera). (C) Mapa de interações 2D⁸⁴

O Nequimed125 ocupou uma região mais externa do sítio posicionando-se próximos a LYS230 (parte superior esquerda da Figura 4.5A) fazendo uma interação com O carbonílico e faz interação hidrofóbica com a PRO126. A porção sulfonamida apresenta interações com os dois aminoácidos usados como restrição pelo programa de docagem (SER247 e THR167) e com a HIS194, que é um aminoácido catalítico. Ele manteve uma distância de 3,92 Å da CYS166 e não apresentou interações ou proximidade com relação ao NAD⁺ (Figura 4.5B).

Figura 4.5 (A) Posição da docagem do Nequimed125 (cinza) e as interações com os aminoácidos. (B) Posição no sítio (gerados pelo Chimera). (C) Mapa de interações 2D⁸⁴

Os mapas de interações foram gerados pelo programa Poseview disponível online.⁸⁴ A análise visual foi feita de forma cuidadosa e através das informações como as citadas acima, proporcionaram a seleção de 25 compostos adquiridos comercialmente (Figura 4.6.). Uma característica levada em consideração na hora da seleção foi a diversidade química abrangida pelo conjunto estudado.

Figura 4.6. Estruturas 2D dos 25 compostos adquiridos comercialmente que foram selecionados através de SBVS para os ensaios bioquímicos por ITC

Nequimed120

Nequimed121

Nequimed122

Nequimed123

Nequimed124

Nequimed125

Nequimed126

Nequimed127

Nequimed128

Nequimed129

4.2 PARÂMETROS CINÉTICOS DA CATÁLISE DO G3P A 1-ARSENO-3-FOSFOGLICERATO E ENSAIOS DE INIBIÇÃO

4.2.1 Determinação do $\Delta H_{app\ molar}$ da catálise do G3P a 1-arseno-3-fosfoglicerato

A determinação do $\Delta H_{app\ molar}$ foi feita segundo o procedimento descrito na seção 3.3.1.1. O número de mols (n) de G3P usado na reação foi de 0,1 μ M. Por realizar o experimento a temperatura e pressão constantes, e que a variação do volume é desprezível, assume-se que o calor observado é igual a entalpia.

Figura 4.7. Gráfico do experimento para determinação do $\Delta H_{app\ molar}$.

Tabela 4.4. Valores de Q_r e Q_d usados para a determinação do $\Delta H_{app\ molar}$ da reação de conversão do G3P a 1-arseno-3-fosfoglicerato

Experimento	Q_r ($\times 10^{-6}$ Kcal)	Q_d ($\times 10^{-6}$ Kcal)	$\Delta H_{app\ molar}$ (Kcal mol^{-1})
1	-0,38	-0,040	-3,40
2	-0,40	-0,036	-3,63
Média	-0,39 $\pm$ 0,02	-0,038 $\pm$ 0,002	-3,52 $\pm$ 0,16

Para o cálculo da $\Delta H_{app\ molar}$ foi usado a equação 9 e os valores do Q_r e Q_d encontram-se na Tabela 4.4. Os valores usados para o cálculo foram os médios entre os experimentos realizados. O valor do $\Delta H_{app\ molar}$ foi de $-3,52 \pm 0,16$ Kcal mol^{-1} .

Cheleski, J. *et al* determinou os parâmetros cinéticos para a TcGAPDH,⁴⁰ porém após estudos foi verificado que a mesma mantém maior estabilidade e, conseqüentemente, sua atividade apresenta um pequeno decréscimo, quando é estocada em tampão HEPES 100 mM e pH 8,0, do que quando armazenada em tampão TEA-HCl 100 mM e pH 7,5. Por apresentar alterações em seu armazenamento foi necessário realizar a determinação dos parâmetros cinéticos da catálise do G3P a 1-arseno-3-fosfoglicerato. Outra contribuição importante, é que o pico de diluição do tampão HEPES é menor que o tampão TEA-HCl, melhorando a

qualidade da medida feita por ITC. O procedimento de determinação dos parâmetros foram de acordo com o descrito no tópico 3.2.1.

Para uma melhor avaliação foram feitos ensaios durante 3 dias para acompanhar a estabilidade e a atividade da enzima. Foi observado um pequeno decaimento na atividade da enzima. Para a resolução do problema do decréscimo da atividade da enzima, experimentos de controle foram realizando após as triplicatas dos testes de inibição. Os valores dos parâmetros para a TcGAPDH estocada em HEPES encontra-se na Tabela 4.5.5.

Tabela 4.5. Parâmetros cinéticos da catalise do G3P a 1-arseno-3-fosfoglicerato pela enzima TcGAPDH em tampão HEPES 100mM e pH 8,0

Parâmetros	Valor	± Desvio padrão	95% Intervalo de Confiança
K_M (μM)	10,51	0,91	8,67 a 12,34
V_{max} ($\times 10^{-4} \text{ mM s}^{-1}$)	4,18	0,09	4,00 a 4,36
k_{cat} (s^{-1})	85,88	3,22	-
k_{cat} / K_M ($\times 10^6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$)	8,17	-	-
R^2	0,921		
$Sy.x^a$	$1,630 \times 10^{-5}$		

^a - Desvio padrão dos resíduos

É conhecido que os compostos farmacologicamente ativos necessitam de certo grau de lipofilia, pois precisam atravessar membranas celulares, o que por sua vez proporciona um problema de solubilidade em meio aquoso.⁸⁵ Para isso faz-se necessário o uso de cossolventes polares apróticos, porém estes alteram os valores de atividade das enzimas. Wiggers, H.J., *et al*, estudaram a influência de DMSO na atividade da TcGAPDH, e foi constatado que na presença de 5% de DMSO a enzima apresentava melhor eficiência.⁸⁶ Os compostos foram solubilizados em DMSO puro e com as informações sobre os experimentos na presença de cossolvente, os ensaios cinéticos foram planejados para que ficassem sempre com 5% de DMSO.

Após definidos os parâmetros cinéticos da reação, foram iniciados os ensaios de inibição com os compostos selecionados. Foram testados 25 compostos sendo destes cinco ativos. Em condição inicial os compostos foram testados apenas em uma concentração que foi de 50 μM .

4.2.2 Compostos bioativos

A Tabela 4.6.6 mostra os parâmetros cinéticos dos 5 compostos que apresentaram o atividade inibitória. Os valores de K_i^{app} variaram de 13,21 a 350,81 μM e que os compostos Nequimed104, Nequimed111 e Nequimed125 apresentaram valores de K_i^{app} abaixo de 100 μM , sendo então considerados compostos de atividade razoavelmente elevada.

Tabela 4.6. Valores da massa molecular, K_i^{app} e intervalo de confiança (95%) para os cinco compostos ativos contra a TcGAPDH

Composto	MM* (Da)	K_i^{app} (μM)	Intervalo de confiança (95%)
Nequimed104	482,57	$35,00 \pm 1,70$	31,66 a 38,36
Nequimed111	433,46	$78,45 \pm 2,69$	73,12 a 83,79
Nequimed114	439,48	$262,16 \pm 4,59$	252,98 a 271,34
Nequimed125	374,45	$13,21 \pm 0,88$	11,46 a 14,96
Nequimed126	441,52	$210,60 \pm 7,59$	195,48 a 225,73

* - Massa Molecular

Na Figura 4.8. são apresentadas as curvas de Michaelis-Menten dos compostos presentes na Tabela 4.6.. Os gráficos foram obtidos através do programa *SigmaPlot* e os ajustes dos dados foram feitos para as equações de mecanismos de inibição competitivo, não competitivo e incompetitivo.

A inferência do mecanismo de inibição com apenas uma concentração de inibidor é muito vaga, então estudos e múltiplas concentrações são necessárias. A determinação do mecanismo fornece um indicio do modo de interação do ligante com a enzima e a constante de inibição é

correlacionada com a constante de dissociação do complexo enzima-inibidor e mostra-se independente da concentração de inibidor.

Figura 4.8. Curva de Michaelis-Menten, na ausência (pontos pretos) e na presença (pontos vermelhos) de inibidor, para os 5 inibidores

4.2.3 Estudo de múltiplas concentrações

Para os compostos com valores de K_i^{app} menores que 100 μM , foram realizados os experimentos em duas concentrações de inibidores (50 e 100 μM), além do experimento na ausência de inibidor (0 μM). Com isso foi possível definir o mecanismo de inibição destes compostos usando três pontos. Foi observado um desvio no ajuste dos compostos Nequimed104 e 111, o que sugere a ocorrência de fenômenos como a cooperatividade.

Os ensaios em múltiplas concentrações possibilitaram descrever o mecanismo de inibição do Nequimed104 (Figura 4.9.A e B) como competitivo, ou seja, que compete pelo sítio do substrato com o próprio, alterando o valor de K_M e mantendo o valor de V_{max} , porém os desvios nos ajustes possibilitam inferir que o mecanismo não é totalmente competitivo e que há a influência do NAD^+ . O Nequimed111 (Figura 4.9.C e D) apresentou um mecanismo de inibição do tipo alostérico. Já o Nequimed125 (Figura 4.9.E e F) apresentou um mecanismo do tipo competitivo e os menores desvios da linearidade.

Figura 4.9. Gráfico de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk do Nequimed104, Nequimed111 e Nequimed125

C

D

E

F

A Tabela 4.7.7 mostra os valores dos parâmetros cinéticos e mecanismo de inibição dos 3 compostos acima citados, e a Tabela 4.8.8 contém os parâmetros estatístico dos ajustes feitos pelo programa *SigmaPlot*.

Dos valores de K_M para os compostos com mecanismo de inibição competitivo, o do Nequimed125 se mostrou interessante, pois é menor que o valor do K_M do G3P, o que significa que a enzima apresenta uma melhor afinidade pelo inibidor do que pelo substrato.

Tabela 4.7. Estudo de múltiplas concentrações (0 μM , 50 μM e 100 μM) dos três compostos com valores de K_i^{app} menores que 100 μM e os valores dos parâmetros cinéticos, mecanismo de inibição e ajuste dos modelos e da cinética de conversão do G3P a 1,3-BPG

Composto	K_M (μM)	V_{max} ($\times 10^{-4} \text{ mM s}^{-1}$)	Mecanismo de inibição
Nequimed104	$11,61 \pm 0,61$	$4,07 \pm 0,05$	Competitivo
Nequimed111	$11,60 \pm 0,76$	$4,53 \pm 0,08$	Incompetitivo
Nequimed125	$8,24 \pm 0,62$	$4,27 \pm 0,07$	Competitivo
TcGAPDH			
G3P	$10,51 \pm 0,91$	$4,18 \pm 0,09$	

Tabela 4.8. Parâmetros estatísticos dos três compostos estudados em múltiplas concentrações

Composto	Graus de liberdade	AICc ^a	Sy.x ($\times 10^{-5}$) ^b	Soma dos quadrados ($\times 10^{-8}$)	Valor do teste p ^c	R ²
Nequimed104	111	-2.600,52	1,09	1,31	< 0,001	0,979
Nequimed111	111	-2.512,15	1,60	2,85	< 0,001	0,962
Nequimed125	149	-3.349,19	1,61	3,88	< 0,001	0,970

^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

É conhecido que a GAPDH é uma enzima com dois sítios, o do G3P e o do NAD^+ , e que para ser possível estudar a cinética desta, faz-se necessário o artifício de forçar uma pseudo-primeira ordem, seja quando se estuda a interação com o substrato ou com o cofator. Para o caso, usou-se uma alta concentração de NAD^+ para garantir que o sítio do mesmo sempre se encontrasse ocupado. Ou seja, é forçada uma condição para que possa se observar um comportamento “michaeliano” na cinética realizada pela GAPDH.

Os desvios de linearidade apresentados pelos compostos Nequimed104 e 111 podem ser provenientes do efeito de cooperatividade. Para tal estudo é necessário determinar o

coeficiente de Hill (h) e classifica-lo quanto positivo ($h>1$), negativo ($h<1$) ou não-cooperativo ($h=1$).⁸⁷ O coeficiente de Hill é calculado a partir da seguinte equação:

$$v = \frac{V_{max}[S]^h}{K' + [S]^h} \quad \text{Equação 13}$$

Onde K' é um termo relacionado ao K_M e considera a afinidade do substrato tanto pelo sítio catalítico quanto por outro sítio. A Tabela 4.9 mostra os valores de h calculados para os três compostos nas três concentrações estudadas.

Embora tenha sido observados desvios da linearidade dos modelos, o valores de h para os três compostos ficaram próximos de 1 o que indica a ausência de cooperatividade, o que provavelmente requer mais estudos para a sua definição.

Tabela 4.9. Valores do coeficiente de Hill para os três compostos estudados em múltiplas concentrações

Composto	[I] μM	h^a	Intervalo de confiança (95%)	R^2
Nequimed104	0	$1,05 \pm 0,08$	0,88 a 1,21	0,982
	50	$1,02 \pm 0,07$	0,88 a 1,16	0,991
	100	$1,01 \pm 0,13$	0,75 a 1,26	0,966
Nequimed111	0	$1,06 \pm 0,02$	1,01 a 1,11	0,999
	50	$1,04 \pm 0,05$	0,94 a 1,14	0,994
	100	$1,12 \pm 0,15$	0,81 a 1,43	0,933
Nequimed125	0	$1,06 \pm 0,02$	1,01 a 1,11	0,999
	50	$1,01 \pm 0,01$	0,99 a 1,05	1,000
	100	$1,01 \pm 0,08$	0,85 a 1,17	0,990

^a - Coeficiente de Hill

4.3 ESTUDOS DE DINÂMICA MOLECULAR

Os compostos com valores de K_i^{app} inferiores a 100 μ M foram estudados por dinâmica molecular para a predição do modo de interação dos mesmos com o alvo. Inicialmente as estruturas do complexo obtido por docagem foram submetidos ao processo descrito na seção 3.4.2 para a preparação do complexo. O resultado da docagem apresentou mais de uma conformação com energias similares para os compostos Nequimed111 e 125, sendo então necessário avaliar estas conformações. A simulação de dinâmica durou 10 ns com uma etapa de anelamento de 170 ps onde o sistema foi aquecido a 500 K e resfriado a 200 K.

Com a dinâmica molecular, além de observar as alterações nas posições obtidas por docagem é possível fazer a predição de valores de energia através de métodos como MM/GBSA e MM/PBSA. Tais métodos têm sido bastante explorados para o cálculo de energia livre de interação (ΔG_{int}) e ambas tem mostrado enorme sucesso em seus cálculos e tratam de forma mais efetiva as alterações entre as interações dos ligantes.⁸⁸

4.3.1 Dinâmica molecular do Nequimed104

Para o Nequimed104, apenas uma conformação foi obtida por docagem, então um único modelo foi usado para os cálculos de dinâmica molecular. Os valores de energia preditos por MM/GBSA e docagem foram respectivamente de $-26,81 \pm 3,42$ e $-2,14$ kcal mol⁻¹.

Através dos estudos de dinâmica foi possível observar as alterações da posição do composto quanto à posição observada a partir da docagem. A Figura 4.10.A mostra o RMSD em função do tempo, o processo de anelamento ocorre em 2 ns com duração de 170 ps. Através do gráfico pode-se observar que há uma alteração no início da simulação que vai até próximo a 1 ns e que durante a etapa de anelamento o Nequimed104 adota uma conformação perto da inicial. No decorrer da simulação o composto manteve oscilações que foram ocasionadas pela variação no grupo 2-(furan-3-il)-2,3-diidro-1,3-oxazol.

O Nequimed104 apresentou um mecanismo de inibição do tipo competitivo. Esta evidência experimental foi confirmada através da simulação de dinâmica molecular, pois, há a permanência do ligante no sítio do substrato, e pode ser observada também uma pequena variação na posição do cofator proveniente de uma aproximação do anel benzílico do ligante

ao grupo nicotinamida. Foi observado também que o ligante (Figura 4.10.D) sofre uma torção aproximando o grupo sulfona da CYS166 (região em amarelo) e uma exposição do grupo 2-(furan-3-il)-2,3-diidro-1,3-oxazol.

O Nequimed104 apresentou a pior energia (através de docagem) dos três compostos com valores de K_i^{app} menores que 100 μ M. No entanto, ele foi o que apresentou o segundo melhor valor de atividade.

Figura 4.10. Gráfico de RMSD *versus* tempo simulação de dinâmica molecular para o Nequimed104 e do NAD⁺ (A). Imagem da posição predita por docagem (B). Imagem da posição do composto após 10 ns de simulação (C)

4.3.2 Dinâmica molecular do Nequimed111

O Nequimed111 apresenta um centro estereogênico, tendo então, dois enantiômeros: o *R* e o *S*. No estudo de dinâmica foram levados em consideração os dois isômeros. Como o programa LigPrep, que é um aplicativo do pacote da Schrödinger usado para preparo dos ligantes, fornece o enantiômero *R*, foi necessário desenhar as duas estruturas isoméricas do Nequimed111 e então a *S* foi docada seguindo os mesmos protocolos.

Os valores de energia foram calculados por MM/GBSA para os dois enantiômeros e para cada uma das conformações selecionadas. Para o enantiômero *R* foram gerados quatro modelos, sendo o modelo 1 o que apresentou melhores valores de energia, tanto por MM/GBSA quanto por docagem.⁸⁹ O mesmo não foi observado para o enantiômero *S* (gerados três modelos), onde o modelo 1 foi o melhor pontuado por docagem enquanto o modelo 3 foi o melhor por MM/GBSA. No entanto, os valores de energia calculados por MM/GBSA para os melhores modelos do *R*-Nequimed111 e do *S*-Nequimed111, respectivamente 1 e 3, não apresentaram diferenças significativas. A Tabela 4.10. apresenta os valores de energia preditos por MM/GBSA e por docagem para os modelos do Nequimed111 *R* e *S*.

O Nequimed111 apresentou os melhores valores de energia, junto como o Nequimed125, para a simulação de dinâmica molecular, e para a docagem, porém ele foi o que apresentou o pior valor de atividade dentre os três estudados.

Tabela 4.10. Valores de energia preditos por MM/GBSA e docagem para os modelos Nequimed111 *R* e *S*

<i>R</i>			<i>S</i>		
Modelo	MM/GBSA (kcal mol ⁻¹)	Docagem (kcal mol ⁻¹)	Modelo	MM/GBSA (kcal mol ⁻¹)	Docagem (kcal mol ⁻¹)
1	-32,40 ± 2,92	-5,87	1	-20,59 ± 4,15	-3,70
2	-25,91 ± 3,61	-3,61	2	-29,98 ± 5,13	-2,63
3	-7,52 ± 4,04	-3,54	3	-31,09 ± 4,30	-2,85
4	-20,79 ± 3,04	-1,92			

O modelo 1 do *R*-Nequimed111 apresentou um salto de 1,5 Å após o anelamento (2 ns) e no restante da dinâmica o ligante mostrou-se estável com uma variação de 0,5 Å (Figura

4.11.A). Para os outros modelos (ver as Figuras i, ii e iii no apêndice) foram observadas posições completamente distintas da encontrada no modelo 1, porém em todos os modelos houve o deslocamento do NAD^+ de seu sítio, sugerindo que, independente da posição do ligante no sítio, o Nequimed111 apresente interação com o cofator. No modelo 1 o grupo metil-sulfonamida ficou posicionado em um vale formado pelos aminoácidos ALA228, THR168 e PRO136, e houve um distanciamento do nitro-benzeno devido ao deslocamento do nitrogênio do diidro-pirazol em direção da CYS166.

Os modelos 2 e 3 (Figura i.A, Figura ii.A respectivamente) apresentaram um maior valor de RMSD. O modelo 2 teve um deslocamento de 3,5 Å, saltando de 1 para 4,5 Å e a partir de 4 ns de simulação atingiu o equilíbrio próximo a 5 Å. Na Figura i.C observou-se a proximidade do Nequimed111 (cinza) como NAD^+ (laranja) e que o mesmo exerce uma influencia no cofator o deslocando do sítio. O modelo 3 foi o pior dos 4 estudados para o enantiomero *R*, ele teve um comportamento pouco estável, apresentando um RMSD de 3 Å, partindo de 1 para 4 Å após o anelamento e retornou para 2 Å após 3 ns, e manteve-se estável até 6,5 ns onde começou a oscilar até o final da simulação, e em estudo de MM/GBSA apresentou o pior valor de energia de todos os compostos estudados. Neste modelo foi observada uma grande deformação do sítio que foi proveniente da instabilidade do ligante. O grupo nitro-benzeno tem orientação para a região do NAD^+ , o que pode ter ocasionado o seu deslocamento.

Por fim, o modelo 4 apresentou um pico pós anelamento de 4,5 Å e do 3º ns até o final da simulação estabilizou-se em 2,5 Å. (Figura iii.A presente no apêndice). Já o NAD^+ apresentou um grande deslocamento, como pode ser observado na Figura iii.C (em laranja presente no apêndice). O cofator, após a simulação, obteve um RMSD próximo a 4 Å (Figura iii.A presente no apêndice) quando comparado com a estrutura inicial do processo de simulação, o que indica uma influência do inibidor na região do sítio do cofator.

Figura 4.11. Gráfico de RMSD *versus* tempo simulação de dinâmica molecular para o *R*-Nequimed111 modelo 1 e NAD⁺ (A). Imagem da posição predita por docagem (B). Imagem da posição do composto após 10 ns de simulação (C)

O estudo de dinâmica molecular do enantiomero *S* do Nequimed111 apresentou três modelos sendo que o modelo 3 foi o de menor energia com praticamente o mesmo valor do modelo 1, no entanto o tempo de simulação foi de 12 ns devido ao ligante não apresentar estabilização até 10 ns. Assim como observado nos modelos do *R*-Nequimed111, o NAD⁺ também sofre deslocamento de sua posição cristalográfica. No modelo 3 (Figura 4.12.C) foi observado um envolvimento do Nequimed111 pela enzima e uma completa deslocalização do NAD⁺ (estrutura laranja) assim como uma deformação drástica no sítio da enzima. A fim de estudar melhor esse comportamento duas novas simulação de dinâmica foram feitas com duração de 20 ns ao invés de 12 ns. Neste processo foi observado que, em ambos os casos, os valores de energia eram piores que o do modelo 3 feito inicialmente, e que nessas duas novas

simulações o NAD^+ não apresentou deslocamento, sendo possível correlacionar o valor de energia com o deslocamento do NAD^+ .

O ligante no modelo 1 (Figura iv presente no apêndice) apresentou um salto de aproximadamente 6 Å durante a etapa de anelamento e estabilizou em 4,5 Å após 5 ns. Houve uma maior exposição do ligante e uma pequena variação na posição do NAD^+ , que como observado no modelo anterior proporcional uma maior energia. No modelo2 (Figura v presente no apêndice), o ligante apresentou pequeno deslocamento, enquanto o NAD^+ teve o grupo nicotinamida exposto ocasionando em um fechamento da estrutura.

Figura 4.12. Gráfico de RMSD *versus* tempo simulação de dinâmica molecular para o S-Nequimed111 modelo 3 e NAD^+ (A). Imagem da posição predita por docagem (B). Imagem da posição do composto após 12 ns de simulação (C)

4.3.3 Dinâmica molecular do Nequimed125

O Nequimed125 teve duas conformações obtidas por docagem, portando foram gerados dois modelos para os processos de simulação por dinâmica molecular. A Tabela 4.11. apresenta os valores de energia preditos por MM/GBSA e por docagem para os modelos do Nequimed125.

A avaliação e classificação do Nequimed125 por dinâmica molecular foi condizente com o resultado por ITC, embora o valor de MM/GBSA foi igual para o Nequimed111. O mesmo não foi observado pelo estudo de docagem. No entanto o mais surpreendente foi a acurácia na definição do mecanismo de inibição, onde a simulação de dinâmica possibilitou inferir que o inibidor agisse de modo competitivo e que foi confirmado por ITC.

Tabela 4.11. Valores de energia preditos por MM/GBSA e docagem para os modelos do Nequimed125

Modelo	MM/GBSA (kcal mol ⁻¹)	Docagem (kcal mol ⁻¹)
1	-32,47 ± 4,49	-3,00
2	-27,89 ± 3,99	-2,65

O modelo 1, junto com Nequimed111, apresentou o melhor valor de energia predita por MM/GBSA e o gráfico da RMSD (Figura 4.13.A) observou-se que durante o início da simulação até o anelamento (2 ns) o modelo 1 mostra uma estabilidade perto de 2 Å e após o anelamento, o Nequimed125 apresenta um grande desvio com relação a estrutura inicial, subindo até 6 Å mantendo-se estável até o final da dinâmica. Não foi observado grande influência do ligante ao cofator. O NAD⁺ (Figura 4.13.A) apresentou um RMSD de aproximadamente 2 Å. Avaliando a posição do ligante no sítio após a simulação (Figura 4.13.C) pode-se inferir que o mecanismo de inibição do ligante é do tipo competitivo, pois o mesmo encontra-se no sítio do G3P. O Nequimed125 assim como o Nequimed111 também apresentou um grupo sulfonamida, e este se deslocou drasticamente de sua posição docada, assim como todo o ligante (Figura 4.13.C em cinza).

Figura 4.13. Gráfico de RMSD *versus* tempo simulação de dinâmica molecular para o Nequimed125 modelo 1 NAD⁺ (A). Imagem da posição predita por docagem (B). Imagem da posição do composto após 10 ns de simulação (C)

O modelo 2 (Figura vi.A presente no apêndice) apresentou um RMSD oscilatório de 0,5 Å que é provinda de vibração devido a influência térmica. O estudo de dinâmica (Figura vi.C) mostrou que o ligante sofreu uma variação considerável em sua posição quando comparado com a docagem. Porém, o composto não abandona o sítio do G3P. No decorrer da simulação é verificada uma grande alteração no sítio da enzima, tanto na região do G3P quanto a do NAD⁺. Foi observada também uma mobilidade do cofator, o açúcar do NAD⁺ ao termino da dinâmica ficou menos exposto do que a posição cristalizada na estrutura 1QXS.

5 CONCLUSÕES

A Doença de Chagas, atualmente considerada como uma das mais negligenciadas é carente de um tratamento eficaz, pois os dois únicos medicamentos que são usados para, de forma paliativa, controlá-la foram desenvolvidos na década de 70, e além de mostrarem-se ineficazes na fase crônica são altamente tóxicos.

A via glicolítica mostra-se essencial para a manutenção da vida de tripanosomatídeos, o que faz desta uma potente via para identificação de alvos para o planejamento de composto que desempenhem algum tipo de atividade inibitória. A GAPDH, 6ª enzima desta via, é um promissor alvo e apresenta estrutura cristalográfica resolvida e depositada no PDB. O planejamento baseado na estrutura do alvo (SBVS) é uma importante ferramenta em quiminformática para a seleção de compostos com potencial atividade biológica.

O estabelecimento de relações entre modelos computacionais e resultados experimentais é fundamental para a compreensão do fenômeno de inibição. É amplamente conhecida a importância do planejamento de compostos tanto por método baseado na estrutura do alvo quanto do ligante. A docagem molecular foi usada para a seleção inicial dos compostos para o teste biocalorimétrico, e a partir dessa estratégia foi possível, de 25 compostos.

Para a determinação de inibição, necessitou-se estabelecer as condições da cinética da reação de catalise da enzima TcGAPDH visando definir os parâmetros cinéticos como K_M e V_{max} da conversão do G3P a 1,3-BPG em condição na qual a enzima apresenta maior estabilidade (tampão HEPES 100 mM, EDTA 1mM, NAD^+ 1mM e β -mercaptoetanol 1mM), os valores foram $10,51 \pm 0,91 \mu M$, e $4,18 \pm 0,09 \times 10^{-4} \text{ mM s}^{-1}$ respectivamente.

Após estabelecidos os parâmetros cinéticos, foram realizados os ensaios de inibição que possibilitou a identificação de cinco compostos bioativos. Destes, três apresentaram valores de inibição menores que $100 \mu M$. A ITC mostrou-se totalmente eficaz em ensaios cinéticos de inibição enzimática e de seu mecanismo. Para a determinação do mecanismo de inibição dos compostos, foram realizados ensaios e múltiplas concentrações de inibidores. Os compostos com valores de K_i^{app} menores que $100 \mu M$ tiveram avaliação em duas concentrações diferentes, ($50 \mu M$ e $100 \mu M$). Esse estudo possibilitou a determinação inequívoca do mecanismo de inibição enzimática.

O protocolo de docagem predisse que o Nequimed111 tinha o melhor valor de energia ($-5,87 \text{ kcal mol}^{-1}$), seguido pelo Nequimed125 ($-3,00 \text{ kcal mol}^{-1}$) e por último o Nequimed104 com $-2,14 \text{ kcal mol}^{-1}$, no entanto após estudos biocalorimétricos foi observado quem não havia uma correlação com os valores de K_i^{app} nem com a ordem de potencia dos compostos, sendo que a sequência de potencia experimental foi a seguinte: Nequimed125 com $K_i^{app} = 13,21 \text{ } \mu\text{M}$, Nequimed104 com $K_i^{app} = 35,00 \text{ } \mu\text{M}$ e Nequimed111 com $K_i^{app} = 78,45 \text{ } \mu\text{M}$.

Os estudos de simulação de dinâmica molecular apresentaram diferenças com a docagem molecular. A simulação de dinâmica classificou (em ordem de energia) os compostos com a seguinte sequência: Nequimed125, Nequimed111 e Nequimed104. Porém, o ponto crítico no estudo de dinâmica molecular é predição do modo de ação. Este mostrando um acerto nos três mecanismos dos compostos estudado. A simulação por dinâmica molecular predisse que o composto Nequimed125 apresentava um mecanismo de inibição competitivo, assim como o Nequimed104, confirmando o resultado obtido através da ITC. Para o Nequimed111 o mecanismo, devido à alta influencia no NAD^+ , mostrou que há um comportamento alostérico, o que também foi confirmado pelos experimentos por ITC.

6 PERSPECTIVAS

A aplicação de métodos em quiminformática possibilitou a identificação de compostos bioativos frente à TcGAPDH. Esses compostos ainda precisam ser avaliados quanto a seletividade frente à enzima GAPDH de humanos e não havendo a inibição da mesma eles devem ser estudados diretamente contra o parasito *T. cruzi* e a realização de estudos de toxidez deve ser feita. Com todos os resultados em mãos, os compostos serão ótimos pontos de partida para o planejamento baseado na estrutura do ligante (LBVS) e, que conhecidamente, junto com os métodos de SBVS tem maiores chances de sucesso. Então series de análogos deverão ser selecionados e adquiridos para ensaios biocalorimetricos a fim de determinar relações estrutura-atividade (SAR).

REFERÊNCIAS

1. RASSI JUNIOR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, 2010.
2. CAVALLI, A.; BOLOGNESI, M. L. Neglected tropical diseases: multi-target-directed ligands in the search for novel lead candidates against *Trypanosoma* and *Leishmania*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 23, p. 7339-7359, 2009.
3. COURA, J. R.; VINAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 465, n. 7301_suppl, p. S6-S7, 2010.
4. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Special programme for research and training in tropical diseases**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>>. Acesso em: 16 jan. 2012
5. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/resources/onepage.pdf>>. Acesso em: 16 jan. 2012
6. LANA, M.; TAFURI, W. L. *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas. In: NEVES, D. P. ; MELO, A. L. ; LINARDI, P. M. ; VITOR, R. W. A. **Parasitologia humana**. 11ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2005. cap. 11, p. 95-108.
7. LESCURE, F.-X.; LE LOUP, G.; FREILIJ, H.; DEVELOUX, M.; PARIS, L.; BRUTUS, L.; PIALOUX, G. Chagas disease: changes in knowledge and management. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 10, n. 8, p. 556-570, 2010.
8. COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 6, p. 641-645, 2011.
9. 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.
10. EKINS, S.; WILLIAMS, A. J.; KRASOWSKI, M. D.; FREUNDLICH, J. S. *In silico* repositioning of approved drugs for rare and neglected diseases. **Drug Discovery Today**, v. 16, n. 7-8, p. 298-310, 2011.

11. COURA, J. R. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy - a proposal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 4, p. 549-554, 2009.
12. 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.
13. WERMUTH, C. G. Medicinal chemistry: definition and objectives, the three main phases of drug activity, drug and disease classifications. In: WERMUTH, C. G. **The practice of medicinal chemistry**. 3rd ed. Amsterdam: Academic Press, 2008. cap. 2, p. 63-71.
14. WERMUTH, C. G.; GANELLIN, C. R.; LINDBERG, P.; MITSCHER, L. A. Glossary of terms used in medicinal chemistry. **Pure Applied Chemistry**, v. 33, n. C, p. 385, 1998.
15. DA ROCHA, J. R. **Planejamento de inibidores das enzimas gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e diidroorotato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi***. 2010. 201 f. (Doutorado em Ciências - área de concentração: Físico-Química, Instituto de Química de São Carlos), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.
16. LEITÃO, A. M., M. L. C.; MONTANARI, C. A. Desenvolvimento de fármacos. In: MONTANARI, C. A. **Química medicinal: métodos e fundamentos em planejamento de fármacos**. São Paulo: Edusp, 2011. cap. 3, p. 67-90.
17. HOPKINS, A. L.; GROOM, C. R. The druggable genome. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, n. 9, p. 727-730, 2002.
18. KNITTIEL, J. J.; ZAVOD, R. M. Drug desing and relationship of functional groups to pharmacologic activity. In: WILLIAMS, D. A. ; LEMKE, T. L. ;FOYE, W. O. **Foye's principles of medicinal chemistry**. 6th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2008. cap. 2, p. 26-53.
19. CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE (CAS). **Informação sobre a quantidade de substâncias químicas catalogadas**. Disponível em: <<http://www.cas.org/newsevents/releases/60millionth052011.html>>. Acesso em: 16 jan. 2012
20. LIPINSKI, C.; HOPKINS, A. Navigating chemical space for biology and medicine. **Nature**, v. 432, n. 7019, p. 855-861, 2004.

21. VARNEK, A.; BASKIN, I. I. Chemoinformatics as a theoretical chemistry discipline. **Molecular Informatics**, v. 30, n. 1, p. 20-32, 2011.
22. KALYAANAMOORTHY, S.; CHEN, Y.-P. P. Structure-based drug design to augment hit discovery. **Drug Discovery Today**, v. 16, n. 17-18, p. 831-839, 2011.
23. YURIEV, E.; AGOSTINO, M.; RAMSLAND, P. A. Challenges and advances in computational docking: 2009 in review. **Journal of Molecular Recognition**, v. 24, n. 2, p. 149-164, 2011.
24. WASZKOWYCZ, B. Towards improving compound selection in structure-based virtual screening. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 5-6, p. 219-226, 2008.
25. DE MOLFETTA, F.; DE FREITAS, R.; DA SILVA, A.; MONTANARI, C. A. Docking and molecular dynamics simulation of quinone compounds with trypanocidal activity. **Journal of Molecular Modeling**, v. 15, n. 10, p. 1175-1184, 2009.
26. KOLB, P.; FERREIRA, R. S.; IRWIN, J. J.; SHOICHET, B. K. Docking and chemoinformatic screens for new ligands and targets. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 4, p. 429-436, 2009.
27. SHOICHET, B. K. Virtual screening of chemical libraries. **Nature**, v. 432, n. 7019, p. 862-865, 2004.
28. HALPERIN, I.; MA, B.; WOLFSON, H.; NUSSINOV, R. Principles of docking: an overview of search algorithms and a guide to scoring functions. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, v. 47, n. 4, p. 409-443, 2002.
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. GROSDIDIER, S.; RECIO, J. F. Docking and scoring: applications to drug discovery in the interactomics era. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 4, n. 6, p. 673-686, 2009.
31. DURRANT, J.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations and drug discovery. **BMC Biology**, v. 9, n. 1, p. 71, 2011.

32. ADCOCK, S. A.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics: survey of methods for simulating the activity of proteins. **Chemical Reviews**, v. 106, n. 5, p. 1589-1615, 2006.

33. KARPLUS, M.; PETSKE, G. A. Molecular dynamics simulations in biology. **Nature**, v. 347, n. 6294, p. 631-639, 1990.

34. 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.

35. 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.

36. 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.

37. OPPERDOES, F. R. Biochemical peculiarities of trypanosomes, African and South American. **British Medical Bulletin**, v. 41, n. 2, p. 130-136, 1985.

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

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

40. 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.

41. 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.

42. 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.

43. MENEZES, I. R. A.; LOPES, J. C. D.; MONTANARI, C. A.; OLIVA, G.; PAVÃO, F.; CASTILHO, M. S.; VIEIRA, P. C.; PUPO, M.; ONICA, T. 3D QSAR studies on binding affinities of coumarin natural products for glycosomal GAPDH of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 17, n. 5, p. 277-290, 2003.

44. 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.

45. DE MACEDO, E. M. S.; WIGGERS, H. J.; SILVA, M. G. V.; BRAZ-FILHO, R.; ANDRICOPULO, A. D.; MONTANARI, C. A. A new bianthron glycoside as inhibitor of *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 5, p. 947-953, 2009.

46. VOET, D.; VOET, J. G. Velocidade da reação enzimática. In: VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. cap. 14, p. 472 - 491.

47. GARRET, R. H.; GRISHAM, C. M. Enzyme kinetics. In: GARRET, R. H. ;GRISHAM, C. M. **Biochemistry**. 3rd ed. Belmont: Thomson Learning, 2004. cap 13, p. 426-459.

48. COPELAND, R. A. Kinetics of single-substrate enzyme reactions. In: COPELAND, R. A. **Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis**. 2nd ed. New York: WILEY-VCH, 2000. cap. 5, p. 109 - 145.

49. SAURO, H. M. Enzyme inhibition and activation. In: SAURO, H. M. **Enzyme kinetics for systems biology**. Seattle: Ambrosius, 2011. cap. 4, p. 81 - 109.

50. COPELAND, R. A. Reversible modes of inhibitor interactions with enzymes. In: COPELAND, R. A. **Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery**: a guide for medicinal chemists and pharmacologists. 2nd ed. New York: John Wiley, 2005. cap. 3, p. 48 - 80.

51. HAQ, I. **Use of isothermal titration calorimetry to measure enzyme kinetics parameters**. Disponível em: <<http://www.microcal.com/documents/enzymekinetickappnote.pdf>>. Acesso em: 16 jan. 2012

52. 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.

53. MOITESSIER, N.; ENGLEBIENNE, P.; LEE, D.; LAWANDI, J.; CORBEIL, C. R. Towards the development of universal, fast and highly accurate docking/scoring methods: a long way to go. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, n. S1, p. S7-S26, 2008.

54. 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.

55. ZOETE, V.; GROSDIDIER, A.; MICHIELIN, O. Docking, virtual high throughput screening and in silico fragment-based drug design. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 13, n. 2, p. 238-248, 2009.

56. METROPOLIS, N.; ROSENBLUTH, A. W.; ROSENBLUTH, M. N.; TELLER, A. H.; TELLER, E. Equation of state calculations by fast computing machines. **The Journal of Chemical Physics**, v. 21, n. 6, p. 1087-1092, 1953.

57. VELEC, H. F. G.; GOHLKE, H.; KLEBE, G. DrugScoreCSD-knowledge-based scoring function derived from small molecule crystal data with superior recognition rate of near-native ligand poses and better affinity prediction. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 20, p. 6296-6303, 2005.

58. CHRISTEN, M.; HÜNENBERGER, P. H.; BAKOWIES, D.; BARON, R.; BÜRGI, R.; GEERKE, D. P.; HEINZ, T. N.; KASTENHOLZ, M. A.; KRÄUTLER, V.; OOSTENBRINK, C.; PETER, C.; TRZESNIAK, D.; VAN GUNSTEREN, W. F. The GROMOS software for biomolecular simulation: GROMOS05. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1719-1751, 2005.

59. CASE, D. A.; CHEATHAM, T. E.; DARDEN, T.; GOHLKE, H.; LUO, R.; MERZ, K. M.; ONUFRIEV, A.; SIMMERLING, C.; WANG, B.; WOODS, R. J. The Amber biomolecular simulation programs. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1668-1688, 2005.

60. BROOKS, B. R.; BROOKS III, C. L.; MACKERELL JR, A. D.; NILSSON, L.; PETRELLA, R. J.; ROUX, B.; WON, Y.; ARCHONTIS, G.; BARTELS, C.; BORESCH, S.; CAFLISCH, A.; CAVES, L.; CUI, Q.; DINNER, A. R.; FEIG, M.; FISCHER, S.; GAO, J.; HODOSCEK, M.; IM, W.; KUCZERA, K.; LAZARIDIS, T.; MA, J.; OVCHINNIKOV, V.; PACI, E.; PASTOR, R. W.; POST, C. B.; PU, J. Z.; SCHAEFER, M.; TIDOR, B.; VENABLE, R. M.; WOODCOCK, H. L.; WU, X.; YANG, W.; YORK, D. M.; KARPLUS, M. CHARMM: The biomolecular simulation program. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 10, p. 1545-1614, 2009.

61. KRAMER, C.; GEDECK, P. Global free energy scoring functions based on distance-dependent atom-type pair descriptors. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 3, p. 707-720, 2011.

62. KORB, O.; STÜTZLE, T.; EXNER, T. E. Empirical scoring functions for advanced Protein-Ligand docking with PLANTS. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, n. 1, p. 84-96, 2009.

63. SHEN, Q.; XIONG, B.; ZHENG, M.; LUO, X.; LUO, C.; LIU, X.; DU, Y.; LI, J.; ZHU, W.; SHEN, J.; JIANG, H. Knowledge-based scoring functions in drug design: 2. can the knowledge base be enriched? **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 2, p. 386-397, 2011.

64. 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.

65. LYNE, P. D. Structure-based virtual screening: an overview. **Drug Discovery Today**, v. 7, n. 20, p. 1047-1055, 2002.

66. 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.

67. 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.

68. CHELESKI, J.; WIGGERS, H. J.; CITADINI, A. P.; DA COSTA FILHO, A. J.; NONATO, M. C.; MONTANARI, C. A. Kinetic mechanism and catalysis of *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase enzyme evaluated by isothermal titration calorimetry. **Analytical Biochemistry**, v. 399, n. 1, p. 13-22, 2010.

69. RECHT, M. I.; TORRES, F. E.; BRUYKER, D. D.; BELL, A. G.; KLUMPP, M.; BRUCE, R. H. Measurement of enzyme kinetics and inhibitor constants using enthalpy arrays. **Analytical Biochemistry**, v. 388, n. 2, p. 204-212, 2009.

70. KOLLMAN, P. A.; MASSOVA, I.; REYES, C.; KUHN, B.; HUO, S.; CHONG, L.; LEE, M.; LEE, T.; DUAN, Y.; WANG, W.; DONINI, O.; CIEPLAK, P.; SRINIVASAN, J.; CASE, D. A.; CHEATHAM, T. E. Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models. **Accounts of Chemical Research**, v. 33, n. 12, p. 889-897, 2000.

71. YANG, T.; WU, J. C.; YAN, C.; WANG, Y.; LUO, R.; GONZALES, M. B.; DALBY, K. N.; REN, P. Virtual screening using molecular simulations. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 79, n. 6, p. 1940-1951, 2011.

72. DESHENG, L.; JIAN, G.; YUANHUA, C.; WEI, C.; HUAI, Z.; MINGJUAN, J. Molecular dynamics simulations and MM/GBSA methods to investigate binding mechanisms of aminomethylpyrimidine inhibitors with DPP-IV. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 22, p. 6630-6635, 2011.

73. AMBER MOLECULAR DYNAMICS. **Manual do programa Amber11**. Disponível em: <<http://ambermd.org/doc11/Amber11.pdf>>. Acesso em: 16 jan. 2012

74. FONSECA, E. M. B. **Planejamento de inibidores da cruzaina baseado em fragmentos**. 2011. 90 f. (Mestrado em química - área de concentração: química orgânica), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

75. FREITAS, R. F. **Integração de métodos em quiminformática e biocalorimetria para o planejamento de inibidores da enzima gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi***. 2009. 154 f. (Doutorado em Ciências - área de concentração: Físico-Química), Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

76. OPENEYE. **Manual do programa FILTER v2.1.1**. Disponível em:
<<http://www.eyesopen.com/docs/filter/current/html/index.html>>. Acesso em: 16 jan. 2012
77. 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.
78. VEBER, D. F.; JOHNSON, S. R.; CHENG, H.-Y.; SMITH, B. R.; WARD, K. W.; KOPPLE, K. D. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615-2623, 2002.
79. DAVIS, A. M.; TEAGUE, S. J.; KLEYWEGT, G. J. Application and limitations of x-ray crystallographic data in structure-based ligand and drug design. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 42, n. 24, p. 2718-2736, 2003.
80. READ, RANDY J.; ADAMS, PAUL D.; ARENDALL III, W. B.; BRUNGER, AXEL T.; EMSLEY, P.; JOOSTEN, ROBBIE P.; KLEYWEGT, GERARD J.; KRISSINEL, EUGENE B.; LÜTTEKE, T.; OTWINOWSKI, Z.; PERRAKIS, A.; RICHARDSON, JANE S.; SHEFFLER, WILLIAM H.; SMITH, JANET L.; TICKLE, IAN J.; VRIEND, G.; ZWART, PETER H. A new generation of crystallographic validation tools for the Protein Data Bank. **Structure**, v. 19, n. 10, p. 1395-1412, 2011.
81. SCHRÖEDINGER. **Manual do programa Glide v5.5**. Disponível em:
<http://isp.ncifcrf.gov/cms/wp-content/uploads/2010/07/gli55_user_manual.pdf>. Acesso em: 16 jan. 2012
82. 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.
83. HALGREN, T. A.; MURPHY, R. B.; FRIESNER, R. A.; BEARD, H. S.; FRYE, L. L.; POLLARD, W. T.; BANKS, J. L. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 7, p. 1750-1759, 2004.
84. POSEVIEW. **Programa usado para gerar os mapas de interação 2D**. Disponível em:
<<http://poseview.zbh.uni-hamburg.de/>>. Acesso em: 16 jan. 2012

85. HEWITT, M.; CRONIN, M. T. D.; ENOCH, S. J.; MADDEN, J. C.; ROBERTS, D. W.; DEARDEN, J. C. *In silico* prediction of aqueous solubility: the solubility challenge. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, n. 11, p. 2572-2587, 2009.
86. 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.
87. COPELAND, R. A. Cooperativity in enzyme catalysis. In: COPELAND, R. A. **Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis**. 2nd ed. New York: Wiley-VCH, 2000. cap. 12, p. 367-384.
88. HOU, T.; WANG, J.; LI, Y.; WANG, W. Assessing the performance of the MM/PBSA and MM/GBSA Methods. 1. The accuracy of binding free energy calculations based on molecular dynamics simulations. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 1, p. 69-82, 2010.
89. HOU, T.; WANG, J.; LI, Y.; WANG, W. Assessing the performance of the molecular mechanics/Poisson Boltzmann surface area and molecular mechanics/generalized Born surface area methods. II. The accuracy of ranking poses generated from docking. **Journal of Computational Chemistry**, v. 32, n. 5, p. 866-877, 2011.

APÊNDICE

Figura i. Gráfico de RMSD *versus* tempo simulação de dinâmica molecular para o *R*-Nequimed111 modelo 2 e NAD^+ (A). Imagem da posição predita por docagem (B). Imagem da posição do composto após 10 ns de simulação (C)

Figura ii. Gráfico de RMSD *versus* tempo simulação de dinâmica molecular para o *R*-Nequimed111 modelo 3 e NAD^+ (A). Imagem da posição predita por docagem (B). Imagem da posição do composto após 10 ns de simulação (C)

Figura iii. Gráfico de RMSD *versus* tempo simulação de dinâmica molecular para o *R*-Nequimed111 modelo 4 e NAD⁺ (A). Imagem da posição predita por docagem (B). Imagem da posição do composto após 10 ns de simulação (C)

Figura iv. Gráfico de RMSD *versus* tempo simulação de dinâmica molecular para o S-Nequimed111 modelo 1 e NAD^+ (A). Imagem da posição predita por docagem (B). Imagem da posição do composto após 10 ns de simulação (C)

Figura v. Gráfico de RMSD *versus* tempo simulação de dinâmica molecular para o s-Nequimed111 modelo 2 e NAD^+ (A) Imagem da posição predita por docagem (B). Imagem da posição do composto após 15 ns de simulação (C)

Figura vi. Gráfico de RMSD *versus* tempo simulação de dinâmica molecular para o Nequimed125 modelo 2 e NAD^+ (A). Imagem da posição predita por docagem (B). Imagem da posição do composto após 10 ns de simulação (C)