MATHEUS PEREIRA POSTIGO

Planejamento racional de inibidores da purina nucleosídeo fosforilase de *Schistosoma mansonii*.

Dissertação apresentada ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Adriano D. Andricopulo

São Carlos
2008

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

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação IFSC/USP

Postigo, Matheus Pereira

Planejamento racional de inibidores da purina nucleosídeo fosforilase de *Schistosoma mansoni* / Matheus Pereira Postigo; orientador Adriano C. Andricopulo.-- São Carlos, 2008.
111 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Área de concentração: Física Biomolecular) – Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.

1. Esquistossomose. 2. Inibidores. 3. Planejamento de fármacos.
I. Título.

DEDICATÓRIA

A Bruno Henrique Martins, grande amigo, pela incondicional lealdade, bom humor inabalável e respeito sincero. Por sua amizade durante os últimos 6 turbulentos anos, lhe dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Antonio e Isabel, por terem durante anos, acreditado e principalmente investido em mim, todo o seu melhor. Por terem incentivado algo que muitas vezes não compreenderam, e por nunca terem duvidado da minha capacidade.

Às minhas duas melhores amigas, Camila e Julia, pelo convívio desde que nasceram, quando começaram a me ensinar o significado de uma verdadeira amizade, e por terem feito tão bem seus papéis de irmãs, apoiando e brigando.

À minha namorada, Marcela, que em tão pouco tempo se mostrou uma amiga de longa data, me ensinando o significado de algumas palavras, como Companheirismo, Admiração, Orgulho, Amor e Carinho. Sem você, nesse finalzinho, não teria conseguido, Beija-Flor.

Ao meu orientador, Adriano Andricopulo, pelo apoio durante a iniciação científica, estendido ao mestrado, e pela orientação durante estes últimos 5 anos.

Aos Profs. Glaucius Oliva, Richard Garratt, Otavio Thiemann e Marcelo Castilho, pelo apoio e colaboração durante as pesquisas.

À BioCryst Pharmaceuticals e ao Prof. Eugene Cordes, pela disponibilização de diversos inibidores da PNP para este trabalho.

À Profa. Julianna Ferreira Cavalcanti de Albuquerque, do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, pela colaboração com novos inibidores da PNP.

Ao CNPq, pela bolsa concedida, e ao Serviço de Pós-Graduação e Setor Financeiro do Instituto de Física de São Carlos, pelo apoio acadêmico e financeiro durante meu mestrado.

Aos Técnicos e Funcionários do IFSC, José Geraldo Catarino, José Augusto Lopes da Rocha, Norma Bianca Saes, Susana Andréa Sculaccio, Luciana Lavezzo e Fernando Falvo,

pela excelente convivência, acompanhada sempre de intensa disposição em colaborar com os experimentos e atividades realizadas neste mestrado.

Aos companheiros de laboratório Ricardo Nicoluci, Humberto Pereira e Rafael Guido, pela imensa ajuda com a parte computacional deste trabalho, especialmente no aprendizado dos programas, e pelas valiosas dicas, sem as quais esse trabalho não teria boa parte de seus resultados.

À aluna de iniciação científica Marcela Terni, pelo trabalho sempre criterioso, pela colaboração com essa dissertação, e pelo contínuo esforço em aperfeiçoar-se no laboratório.

Aos grandes eternos amigos de graduação, que mesmo depois de 2 anos afastados pela carreira, nunca deixaram de me lembrar a razão de haver tanta amizade entre nós. Caio Moreira (Tamanco), Caio Hayasaka (Dennis), Luciano dos Santos (Tarzan), Rafael Piva (Tukano), José Antônio Alves Jr. (Polenta), Leandro Deziderio (Pamonha), Flávio Nikkuni (Koxô), Vitor Siqueira (Bigato), Elias Tessaro (Salsicha), Ranylson Savedra (Tequila) e Elton Sitta (Xororó), valeu mesmo, galera.

Ao meu irmão de pais diferentes, Bruno Martins, pela imensa amizade que me dedica há 6 anos, sempre me fazendo rir dos absurdos, e valorizar os bons momentos aos sábados à tarde, pelas risadas, histórias, apelidos e boa música.

Ao meu companheiro de quarto em congressos, e grande amigo de boas conversas e risadas Tiago Moda, que desde sua chegada se mostrou um excelente profissional, e uma pessoa de caráter inigualável.

Aos grandes amigos de laboratório, que desde o início, como vizinhos de bancada sempre caminhando juntos com bom humor, me acompanharam e apoiaram neste tempo. E que hoje são pessoas das quais sempre vou me lembrar: Marcelo Liberato (Tavin), Victor Caldas (Wally), Fernanda Costa, Maria Amélia Oliva (Mamé), Alexandre Cassago, Carol Guzzi, Carol Hoff, Ana Letícia Lusa, Aderson Zottis, Karime Stevanatto, Tatiane Balliano,

Deise Borchhardt, Ney Leite, Renata Krogh, Gustavo Mercaldi, Fernando Bachega (Lerdo),
Lívia Salum, Napoleão Valadares e Alécio Pimenta Jr.

A todos, meus mais sinceros agradecimentos.

EPÍGRAFE

"A nossa ciência pode parecer primitiva e infantil comparada com a realidade, mas é a coisa mais preciosa que temos".

Albert Einstein

"Nenhum passo atrás que não seja para tomar impulso".

Ernesto "Che" Guevara de la Serna

RESUMO

As doenças tropicais têm sido alvo de constantes pesquisas nos últimos anos, em diversos centros em todo o mundo. A procura por novos tratamentos eficazes contra estas desordens estimula a identificação de novos alvos moleculares. A esquistossomose é uma doença parasitária crônica, que afeta cerca de 200 milhões de indivíduos em todo o mundo, causada pelo platelminto trematodo do gênero *Schistosoma*. No Brasil, a única espécie encontrada é o *Schistosoma mansoni*. Neste trabalho de mestrado, a enzima purina nucleosídeo fosforilase (PNP, EC 2.4.2.1) do parasita *Schistosoma mansoni* foi selecionada como alvo molecular para a identificação de novos inibidores e sua caracterização cinética através de potência biológica, seletividade e mecanismo de ação. Adicionalmente, dois complexos cristalográficos foram obtidos na presença de inibidores potentes da PNP, tornando-se assim parâmetros para a modelagem molecular empregando a técnica de docagem. Os estudos computacionais permitiram boa compreensão das interações intermoleculares, fornecendo as bases para um estudo detalhado das relações entre a estrutura e atividade destes compostos. Esse conjunto de informações será de grande utilidade nas etapas de planejamento de novas moléculas bioativas mais potentes e seletivas, candidatas a agentes quimioterápicos contra a esquistossomose.

Palavras-chave: Esquistossomose, Inibidores, Planejamento de fármacos.

ABSTRACT

Tropical diseases have been a target of constant research for several years. The search for new efficient treatments against these parasitic diseases has been stimulating the identification of new molecular targets and new drug candidates. Schistosomiasis is a chronic parasitic disease, which affects about 200 million people in the world, caused by a trematode worm of *Schistosoma* genus. In Brazil, *Schistosoma mansoni* is the only specie found. In this Master's dissertation, the enzyme purine nucleoside phosphorylase (PNP, EC 2.4.2.1) from *S. mansoni* was selected as a molecular target for the identification and kinetic characterization, including potency, affinity and mechanism of action, of new inhibitors from two chemical classes. In addition, two complexes enzyme-inhibitor were characterized by X-ray diffraction, and were useful for molecular modeling studies employing the docking method. These provided important insights about the main intermolecular interactions responsible for the process of molecular recognition and enzyme inhibition. The information gathered in this work should be useful for future medicinal chemistry efforts in the design of new inhibitors of *S. mansoni* PNP having increased potency and affinity.

Keywords: Schistosimiasis, Inhibitors, Drug design.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mapa da distribuição da esquistossomose no mundo. Em destaque, as manifestações predominantes em cada região geográfica.	22
Figura 2	Diferenças físicas encontradas entre <i>Schistosoma mansoni</i> fêmea e macho.	23
Figura 3	Caramujo do gênero <i>Biomphalaria</i> e os reservatórios onde é frequentemente encontrado.	23
Figura 4	Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i> .	25
Figura 5	Estrutura química do praziquantel, empregado no tratamento da esquistossomose.	26
Figura 6	Via de salvação de purinas.	27
Figura 7	Reação bioquímica catalisada pela PNP.	28
Figura 8	Equilíbrio cinético estabelecido entre enzima e substrato.	30
Figura 9	Equilíbrio em presença de um inibidor competitivo.	33
Figura 10	Gráfico de Lineweaver-Burk para um inibidor competitivo.	34
Figura 11	Equilíbrio em presença de um inibidor não-competitivo.	38
Figura 12	Gráfico de Lineweaver-Burk para um inibidor não-competitivo.	37
Figura 13	Equilíbrio em presença de um inibidor incompetitivo.	38
Figura 14	Gráfico de Lineweaver-Burk para um inibidor incompetitivo.	39
Figura 15	Estruturas do estado fundamental da inosina, do estado de transição, e da Imucilina H, um análogo do estado de transição.	41
Figura 16	Espectros de absorção na região do ultravioleta da inosina e hipoxantina.	46
Figura 17	Espectros de absorção da inosina, hipoxantina e do ácido úrico produzido pela ação da XO .	47

Figura 18	Exemplo de curva concentração-resposta utilizada na determinação de IC_{50} pelo método de regressão não-linear de melhor ajuste dos dados cinéticos coletados experimentalmente.	50
Figura 19	Gráfico padrão empregado na determinação da constante K_i .	52
Figura 20	Análise de interações estéreas realizada através do servidor DrugScore Online.	56
Figura 21	SDS-PAGE da expressão e primeira purificação da PNP.	58
Figura 22	Cromatograma da purificação em HPLC.	59
Figura 23	SDS-PAGE da segunda purificação (HPLC).	60
Figura 24	Gráfico de atividade vs. tempo para teste de condições de estoque ideais.	61
Figura 25	Estabilidade da PNP na condição escolhida.	62
Figura 26	Determinação da constante de Michaelis-Menten (K_M).	63
Figura 27	Gráfico de duplo-recíproco para o inibidor 3.	87
Figura 28	Gráfico de duplo-recíproco para o inibidor 10.	87
Figura 29	Gráfico de duplo-recíproco para o inibidor 22.	88
Figura 30	Gráfico de duplo-recíproco para o inibidor 22.	88
Figura 31	Gráfico de duplo-recíproco para o inibidor 35.	89
Figura 32	Gráfico de duplo-recíproco para o inibidor 42.	89
Figura 33	Gráfico de duplo-recíproco para o inibidor 45.	90
Figura 34	Gráfico de duplo-recíproco para o inibidor 47.	90
Figura 35	Gráfico de duplo-recíproco para o inibidor 48.	91
Figura 36	Gráfico de duplo-recíproco para o inibidor 55.	91
Figura 37	Imagem cristalográfica.	93
Figura 38	Mapa de densidade eletrônica.	95
Figura 39	Docagem vs. Cristalografia.	96
Figura 40	Alinhamento das 9-deazaguaninas na docagem.	97

Figura 41	Ambiente químico do sitio ativo da PNP para 9-deazaguaninas.	98
Figura 42	Análise estérica (DrugScore) para 9-deazaguaninas.	99
Figura 43	Superfície apolar na entrada do sítio ativo.	100
Figura 44	Docagem e seletividade.	101
Figura 45	Ambiente químico do sitio ativo da PNP para 4-tioxo-2-tiazolidinas.	102
Figura 46	Alinhamento das 4-tioxo-2-tiazolidinas na docagem.	103
Figura 47	Análise estérica (DrugScore) para 4-tioxo-2-tiazolidinas.	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Triagem de novos inibidores da PNP.	65
Tabela 2	IC ₅₀ para 9-deazaguaninas.	69
Tabela 3	IC ₅₀ para 4-tioxo-2-tiazolidinas.	77
Tabela 4	Seletividade frente à enzima humana.	80
Tabela 5	K _i dos inibidores da PNP de <i>S. mansoni</i> .	86
Tabela 6	Resultados e estatísticas da coleta de dados de raios-X.	93

LISTA DE ABREVIACÕES

AD	Adenosina Desaminase
ADP	Adenosina Difosfato
AK	Adenosina Quinase
AMP	Adenosina Monofosfato
AP	Adenosina Fosforilase
APRT	Adenosina Fosforribosil Transferase
ATP	Adenosina Trifosfato
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CEPID	Centro de Pesquisa Inovação e Difusão
CBME	Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural
CNPq	Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento
DMSO	Dimetilssulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EC	Enzyme Commission
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EI	Complexo Enzima-Inibidor
ES	Complexo Enzima-Substrato
ESI	Complexo Ternário Enzima-Substrato-Inibidor
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo
GDP	Guanosina Difosfato
GMP	Guanosina Monofosfato
GTP	Guanosina Trifosfato
HGPRT	Hipoxantina-guanina Fosforribosil Transferase

HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IFSC	Instituto de Física de São Carlos
IMP	Inosina Monofosfato
IPTG	β -D-1 Isopropiltiogalactosídeo
MBP	Maltose Binding Protein
MES	Ácido N-morfolinoetilenossulfônico
NCE	Nova Entidade Química
P&D	Pesquisa e Desenvolvimento
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polietilenoglicol
PNP	Purina Nucleosídeo Fosforilase
RNA	Acido Ribonucléico
SAR	Relações Estrutura-Atividade
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
USP	Universidade de São Paulo
OMS (WHO)	Organização Mundial de Saúde (World Health Organization)
XO	Xantina Oxidase

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
Å	Ângstrom (10^{-10} m)
K_i	Constante de Dissociação do Complexo EI (afinidade)
K_M	Constante de Michaelis-Menten
UI	Unidades Internacionais
nm	Nanômetro (10^{-9} m)
M	Molar (mol/L)
$V_{\max}$	Velocidade Máxima de Reação
U. A.	Unidades Arbitrárias
IC₅₀	Potência Biológica
L	Litro
pH	Potencial Hidrogeniônico
kDa	Kilodalton (10^3 g/mol)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1. 1. A Indústria Farmacêutica	19
1.2. O Processo de Desenvolvimento de Fármacos	20
1.3. O Panorama das Doenças Tropicais.....	20
1.4. A Esquistossomose.....	21
1.5. O Metabolismo de Purinas	26
1.6. Purina Nucleosídeo Fosforilase.....	28
1.7. Inibidores Enzimáticos	29
1.8. Potência	30
1.9. Seletividade	31
1.10. Modo de Ligação e Mecanismo de Ação	32
1.11. Inibidores da PNP.....	40
2. OBJETIVOS.....	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
3.1. Expressão e Purificação da PNP de <i>S. mansoni</i>	43
3.2. Cinética da PNP de <i>S. mansoni</i>	45
3.2.1. Padronização e Validação dos Ensaios	45
3.2.2. Triagem, Identificação e Seleção de Inibidores da PNP de <i>S.mansoni</i>	48
3.2.3. Determinação de Valores de IC ₅₀ e Seletividade Enzimática	49
3.2.4. Determinação do Mecanismo de Ação e Afinidade.....	51
3.3. Estudos Estruturais de Complexos Enzima-Inibidor	52
3.4. Modelagem Molecular	54
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57

4.1. Expressão e Purificação da PNP	57
4.2. Padronização dos Ensaios Cinéticos	63
4.3. Triagem e Identificação de Novos Candidatos a Inibidores da PNP de <i>S. mansoni</i>	64
4.4. Determinação de Potência (IC ₅₀).....	69
4.5. Seletividade Enzimática	79
4.6. Determinação do Mecanismo de Ação e do K_i	85
4.7. Estudos Estruturais de Complexos Enzima-Inibidor	92
4.8. Modelagem Molecular	96
5. CONCLUSÕES	105
6. SUGESTÕES E PERSPECTIVAS.....	106
REFERÊNCIAS	107

1. INTRODUÇÃO

1. 1. A Indústria Farmacêutica

A indústria farmacêutica está constantemente voltada às inovações científicas e tecnológicas. Nos últimos anos, o mercado farmacêutico teve um considerável crescimento, acompanhando a forte demanda por novos tratamentos seguros e eficazes para uma série importante de doenças e desordens, buscando a melhoria da qualidade de vida das mais diversas populações mundiais.¹⁻³ Os avanços tecnológicos obtidos nas últimas décadas permitiram a descoberta de várias substâncias bioativas capazes de controlarem ou curarem muitas destas condições de doença em humanos.

Nesse âmbito, a indústria farmacêutica tem feito grandes investimentos em P&D (Pesquisa e Desenvolvimento) de fármacos, visando primordialmente o desenvolvimento e a descoberta de novos fármacos da categoria *blockbuster* (termo do inglês que designa os fármacos com vendas anuais superiores a US\$ 1 bilhão). Desta forma, o crescimento do setor em nível mundial está ligado diretamente ao potencial das companhias farmacêuticas em gerar lucros através da comercialização de um conjunto atrativo de fármacos.⁴⁻⁶

Vários fármacos de enorme sucesso podem ser incluídos nesta lista de *blockbusters*, como o agente hipolipemiante atorvastatina (Lípitor[®], da Pfizer), o antitrombótico clopidogrel (Plavix[®], da Sanofi Aventis), o antiulceroso esomeprazol (Nexium[®], da AstraZeneca) e o antipsicótico olanzapina (Zyprexa[®], da Eli Lilly), entre outros que contribuíram efetivamente com novas opções terapêuticas notáveis.

Para atender as constantes e rigorosas exigências em P&D, a indústria farmacêutica tem investido em ações multidisciplinares efetivas buscando a integração de várias técnicas e

estratégias experimentais e computacionais, o que nos últimos anos tem contribuído com avanços significativos em seus vários setores.

1.2. O Processo de Desenvolvimento de Fármacos

O processo de descoberta e desenvolvimento de uma nova entidade química (NCE, do inglês, *New Chemical Entity*),⁷ que engloba as etapas desde o início da pesquisa básica até o lançamento do fármaco no mercado farmacêutico, apresenta custos e tempo extremamente elevados. Neste processo são investidos cerca de US\$ 500-850 milhões, sendo que não é raro o processo ultrapassar as cifras de US\$ 1 bilhão, num tempo de P&D que pode chegar a 15 anos.^{1,8-10}

1.3. O Panorama das Doenças Tropicais

As doenças tropicais parasitárias, como a malária, esquistossomose, doença de Chagas, tripanossomíase africana e leishmaniose, são alvos de grande preocupação da Organização Mundial de Saúde (OMS).^{11,12} Dentre as principais áreas atingidas, destacam-se a África, a América Latina e o sudeste da Ásia, onde frequentemente as doenças assumem forma endêmica, atingindo cerca de 1 bilhão de pessoas em todo o mundo.¹³⁻¹⁵ As doenças tropicais destacam-se não somente pelo expressivo número de indivíduos afetados em diversas regiões geográficas do planeta, mas também pelas altas taxas de morbidade e mortalidade em crianças, mulheres e homens.¹⁶

Devido às características socioeconômicas típicas dessas regiões, as condições de prevenção e controle das doenças parasitárias são ineficazes, além disso, o repertório de fármacos utilizado no tratamento dos indivíduos infectados é geralmente limitado e apresenta

baixos índices de eficácia e segurança na maioria dos casos. Soma-se, ainda, o constante surgimento de novas cepas de parasitas resistentes, o que afeta de maneira significativa a eficácia dos fármacos empregados nos tratamentos quimioterápicos.

1.4. A Esquistossomose

A esquistossomose, conhecida também como bilharzia, bilharziose ou “barriga d’água”, é uma doença parasitária crônica que se manifesta de forma endêmica em várias regiões do planeta. Segundo dados da OMS, a esquistossomose atinge 74 países em 3 continentes, com de cerca de 200 milhões de indivíduos infectados¹⁷ (Figura 1). Estima-se que 600 milhões de pessoas vivam em áreas de risco constante de infecção,¹⁸ número que corresponde a 10% da população mundial. Em seu aspecto relevante socioeconômico, a esquistossomose situa-se apenas atrás da malária, devido principalmente ao grande número de indivíduos infectados.

Figura 1. Mapa da distribuição da esquistossomose no mundo. Em destaque as manifestações predominantes em cada região geográfica: hepato-intestinal (em rosa), urinária (em púrpura) e ambas (em verde).¹⁹

O agente etiológico da esquistossomose é um platelminto trematodo do gênero *Schistosoma*, sendo que no Brasil, a única espécie encontrada é o *Schistosoma mansoni*, mostrado na Figura 2. Outras espécies de *Schistosoma* são encontradas em diversas regiões, como o *Schistosoma intercalatum* na África Central e China, o *Schistosoma haematobium* no Oriente Médio e África, o *Schistosoma mekongi* no sudeste asiático e o *Schistosoma japonicum* na China e Indonésia. Todas as espécies atacam as vias mesentéricas (intestinos, principalmente), com exceção do *S. haematobium*, que se manifesta nas vias urinárias e vesícula biliar.²⁰

Figura 2. Diferenças físicas encontradas entre *Schistosoma mansoni* fêmea (A) e macho (B); *Schistosoma mansoni* macho (mais grosso) mantendo a fêmea (mais delgada) dentro de sua cavidade ventral no momento da cópula (C); micrografia eletrônica de um par de *Schistosomas* no durante a cópula. É possível ver parte do corpo da fêmea saindo da cavidade ventral do macho (D).

A falta de infra-estrutura de saneamento básico e condições de higiene mínimas são os principais obstáculos à erradicação da doença, uma vez que o vetor que a transmite, um caramujo do gênero *Biomphalaria* (Figura 3), vive principalmente em reservatórios de água estagnada (e.g.; lagos, lagoas, represas e açudes, Figura 3), que são utilizados pelas populações próximas como fonte de água para o consumo direto e para os mais diversos afazeres domésticos, além de serem usados por crianças como local de lazer.

Figura 3. Caramujo do gênero *Biomphalaria* e os reservatórios onde é frequentemente encontrado.

O ciclo de vida do parasita consiste em duas fases, uma no caramujo e outra no hospedeiro final, o homem.²⁰ O início do ciclo ocorre com a deposição de dejetos contaminados com ovos de *Schistosoma* nas imediações de reservatórios de água, quando os ovos eclodem e liberam os miracídios, que infectam os caramujos. Após um período curto de desenvolvimento, o parasita é liberado na água na forma de cercárias. Estas possuem considerável resistência, podendo permanecer por dias na água, até encontrarem um hospedeiro definitivo. Devido à sua capacidade de penetrar ativamente na pele íntegra, a infecção é consideravelmente fácil, não sendo necessária a ingestão da água para que aconteça. Uma vez no organismo, as cercárias concentram-se nos pulmões e posteriormente no fígado, baço e finalmente nos intestinos, onde os parasitas encontram-se em idade adulta e iniciam sua reprodução sexuada. Uma única fêmea de *Schistosoma* pode colocar até 300 ovos por dia, e essa grande quantidade produz um dos sintomas mais evidentes da doença, o acentuado aumento da região abdominal, vulgarmente denominado de “barriga d’água” em algumas regiões. Deve-se salientar que esse aumento não é provocado pelo volume dos ovos, mas sim pelas reações decorrentes da infecção. Em regiões onde o saneamento básico é precário ou mesmo inexistente, as fezes contendo ovos atingem os reservatórios de água, reiniciando o ciclo, conforme mostrado na Figura 4.

Figura 4. Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*. Nos reservatórios de água estagnada (1), os ovos eclodem, liberando os miracídios (2), que irão infectar os caramujos (3). Dentro dos caramujos, o *Schistosoma* evolui para a forma de cercarias (4) que podem contaminar o ser humano (5). Dentro do organismo humano, o *Schistosoma* atinge a idade adulta, e a fêmea inicia a oviposição. Os ovos são liberados com as fezes e podem atingir os reservatórios, reiniciando o ciclo.

O fármaco preferencial contra a esquistossomose atualmente é o anti-helmíntico praziquantel (Biltricide[®], da Bayer Pharmaceuticals),^{18,21} mostrado na Figura 5, sendo consideravelmente eficiente e possuindo um histórico moderado de efeitos colaterais. Sua principal limitação é o custo, que apesar de pouco elevado (entre US\$ 0,08 e US\$ 0,20 por dose) torna proibitivo em populações numerosas como a africana, que concentra metade do total de indivíduos infectados no mundo.

Além disso, há o constante surgimento de novas cepas de parasitas resistentes,^{23,24} devido ao fator recontaminação, provocado por indivíduos que depois de tratados voltam a contrair a doença, o que permite ao parasita adquirir meios metabólicos alternativos de proteção.

Praziquantel

Figura 5. Estrutura química do praziquantel, fármacos utilizado atualmente no tratamento da esquistossomose.

No panorama atual, a descoberta de novos agentes quimioterápicos capazes de mostrar segurança e eficácia no combate à esquistossomose é de grande urgência, o que estimula a identificação de novos alvos moleculares e os estudos de suas interações com moléculas pequenas no planejamento de novas substâncias bioativas candidatas a fármacos.

1.5. O Metabolismo de Purinas

Nucleosídeos purinas são moléculas essenciais aos seres vivos, para a manutenção do DNA e RNA. Existem dois mecanismos descritos para a obtenção dos mesmos, sendo um deles predominante em seres humanos, a via de síntese ou via *de novo*, onde uma quantidade de energia significativa é gasta para a produção de novas moléculas a partir de precursores conhecidos. A segunda via, a de salvação, é aquela onde as bases provenientes de células mortas, bem como de DNA e RNA não mais utilizados, são recicladas para posterior reutilização. Estudos envolvendo o *S. mansoni* mostraram que o mesmo não possui uma via de síntese, como a maioria dos parasitas, dependendo exclusivamente da via de salvação para sua reprodução e manutenção.^{12,24} Este contexto sugere que a interrupção desta rota levaria o parasita a uma condição metabólica bastante instável, possivelmente letal.

Para a manutenção da via de salvação, o parasita emprega um conjunto complexo de enzimas (Figura 6), partindo da adenosina, o principal precursor purínico nas células.^{25,26}

Figura 6. Esquema representativo da via de salvação de purinas. As enzimas representadas na via são: adenosina quinase (AK), adenosina fosforilase (AP), adenosina desaminase (AD), adenosina fosforribosil transferase (APRT), hipoxantina guanina fosforribosil transferase (HGPRT) e a purina nucleosídeo fosforilase (PNP). São mostrados os nucleosídeos empregados como fonte de energia: inosina monofosfato (IMP), adenosina monofosfato (AMP), adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP), guanosina monofosfato (GMP), guanosina difosfato (GDP) e guanosina trifosfato (GTP).

Como evidenciado na Figura 6, o parasita dispõe de duas vias no metabolismo de adenosina: (i) uma direta, pela conversão de adenosina em AMP através da ação da adenosina quinase; e, (ii) uma indireta, pela seqüência adenosina-inosina-hipoxantina-IMP-AMP, sendo esta via consideravelmente mais ativa que a direta. Estudos da via de purinas revelaram a importância de uma enzima-chave, a purina nucleosídeo fosforilase (PNP, EC 2.4.2.1), como alvo biológico potencial para a interrupção da via de salvação de purinas através da ação de moléculas capazes de modular sua atividade (e.g., inibidores enzimáticos reversíveis).^{27,28}

1.6. Purina Nucleosídeo Fosforilase

A purina nucleosídeo fosforilase, ou simplesmente PNP, é a enzima responsável pela conversão de inosina em hipoxantina, a qual é posteriormente convertida em IMP, o principal precursor de ATP e GTP nas células. A Figura 7 mostra a reação de conversão catalisada pela PNP.

Figura 7. Reação bioquímica catalisada pela ação da PNP.

Devido ao seu importante papel na via de salvação de purinas, a PNP foi selecionada em nossos laboratórios no Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural (CBME-CEPID/FAPESP) como alvo macromolecular para o planejamento de novos candidatos a fármacos contra esquistossomose. As primeiras estruturas tridimensionais (3D) da PNP foram obtidas a partir de cristais da enzima do baço bovino submetidos à difração de raios-X, nos anos de 1998 e 1999.^{29,30} Somente em 2005 a primeira estrutura cristalográfica da PNP de *S. mansoni* foi elucidada pelo grupo coordenado pelo Prof. Richard C. Garratt do CBME,³¹ revelando uma proteína trimérica de estrutura quaternária semelhante à humana, porém com características sequenciais únicas. O cristal obtido cresceu na presença de uma sulfobetaina não-detergente, a qual se ligou no sítio ativo, permitindo assim a demarcação dos resíduos responsáveis pela estabilização do substrato durante a catálise. Essa informação ilustrou um

conjunto de ligações muito fortes e um padrão constante de interações, que permitiu posteriormente, através de análises mais detalhadas, a compreensão do modo de ligação de alguns ligantes estudados.

Os principais resíduos responsáveis pela ligação do substrato inosina no sítio ativo da enzima³¹ são ASN245 e GLU203, realizando simultaneamente duas ligações de hidrogênio cada, além do resíduo TYR202, que através de interação pelos orbitais π colabora para a estabilidade do substrato através do caráter aromático de seu anel purínico. Essa mobilidade limitada permite ao resíduo HYS88 atuar na ligação da ribose com o anel purina, permitindo o ataque do íon fosfato à ligação glicosídica, clivando-a e dando origem aos produtos.

1.7. Inibidores Enzimáticos

As reações bioquímicas catalisadas por enzimas ocorrem em geral pela associação de uma enzima (E) ao seu substrato (S) formando um complexo, chamado de complexo enzima-substrato (E•S). Em seguida, a espécie E•S passa por um rápido estado de transição (E•S[‡]) resultando no complexo enzima-produto (E•P), que por sua vez, se dissocia rapidamente liberando a enzima íntegra e o produtos no meio reacional. Esse processo é mostrado no esquema da Figura 8.

Figura 8. Equilíbrio cinético estabelecido entre enzima e substrato. A formação das espécies E•S, E•P e E•S[‡] é determinante na velocidade da reação e formação de produtos.

A atividade catalítica de uma enzima pode ser alterada na presença de substâncias químicas que podem interagir com as diferentes formas associadas da enzima através de ligações reversíveis ou irreversíveis, interferindo assim no equilíbrio estabelecido entre E, S e P, caracterizando o seu modo de ligação e mecanismo de ação.

Os inibidores enzimáticos formam uma classe extremamente importante na clínica médica. Vários fármacos de sucesso na terapêutica são inibidores de enzimas-alvo.³²⁻³⁵ Sua aplicação terapêutica pode consistir em bloquear uma enzima cujo produto seja o causador de uma desordem, ou então provocar o acúmulo de um substrato cuja deficiência esteja relacionada a uma doença ou disfunção do organismo.

Um exemplo bastante ilustrativo da aplicação de um inibidor enzimático é o caso do alopurinol, isômero estrutural da hipoxantina, substrato natural da xantina oxidase (XO, EC 1.1.3.22). A ação da XO no organismo converte a hipoxantina em ácido úrico, que em concentrações elevadas (hiperuricemia) provoca a gota. A inibição da XO pelo alopurinol impede esta conversão, evitando assim a formação de cristais de ácido úrico nas articulações.

1.8. Potência

A triagem de substâncias químicas frente a uma enzima (alvo macromolecular) geralmente é abordada pelos aspectos da avaliação em dose única (% inibição) e determinação da potência biológica (IC₅₀). Durante as triagens bioquímicas (ensaios *in vitro*), a capacidade de uma substância química (candidato a inibidor) em inibir a enzima-alvo é avaliada a partir de doses únicas, que se referem a concentrações padrões preestabelecidas. As substâncias que mostram inibição significativa nesse ensaio são selecionadas para estudos mais detalhados, visando à determinação da potência.

A potência dos candidatos a inibidores, por sua vez, é estabelecida através de experimentos que leva a geração de gráficos do tipo *concentração X resposta*. A análise por regressão não-linear desses gráficos leva à determinação do fator de potência IC_{50} , que se refere a concentração de inibidor necessária para reduzir em 50% a atividade enzimática em condições experimentais padrões. Esse importante parâmetro cinético permite a análise quantitativa comparativa dentro de séries de compostos, gerando dados úteis para o estabelecimento de relações entre a estrutura e atividade (SAR, do inglês, *Structure-Activity Relationships*).

1.9. Seletividade

Quando uma série de inibidores é planejada para exercer uma ação farmacológica com finalidade terapêutica, é muito importante a determinação da seletividade. No planejamento de fármacos antiparasitários, por exemplo, é comum que tanto o parasita quanto o hospedeiro possuam a mesma enzima-alvo, contudo com características particulares, por razões evolutivas, de maneira que ambos podem ser afetados pela ação de um inibidor. É necessário, portanto, o planejamento de inibidores potentes, mas também altamente seletivos, capazes de interferir o mínimo possível nas vias metabólicas do ser humano. Devido às diferenças estruturais (que dependendo do caso podem variar de modestas a significativas) entre a mesma enzima de organismos distintos, o efeito de um inibidor no valor de K_M (constante de Michaelis-Menten, definida como a concentração de substrato responsável por metade da velocidade máxima de reação) será diferente para cada forma, o que permite a determinação do parâmetro de seletividade, fundamental no planejamento de fármacos nesta categoria. Para isso, a potência de cada inibidor é determinada para a enzima humana e do parasita, sendo o resultado dessa razão, a seletividade enzimática.

Através desta informação é possível correlacionar a maior ou menor inibição às características estruturais, e assim, dentro da série, procurar pelos compostos que possam produzir um efeito mais significativo, sem interferir na atividade da enzima do hospedeiro. Além disso, é de grande importância que um inibidor candidato a fármaco seja seletivo apenas para a enzima-alvo relacionada com o estado de doença, não interagindo de forma significativa com outras enzimas metabólicas ou alvo presentes no organismo.

1.10. Modo de Ligação e Mecanismo de Ação

No planejamento racional de fármacos através da inibição enzimática é desejável que o inibidor se ligue a enzima de forma rápida e reversível, formando o complexo enzima-inibidor ($E \cdot I$) como mostrado na Figura 9. A reversibilidade característica das interações intermoleculares da espécie ($E \cdot I$) é uma vantagem em termos de administração, controle de propriedades farmacocinéticas e redução de efeitos adversos, uma vez que a enzima não é modificada quimicamente e nem inativada irreversivelmente, como ocorre no caso dos inibidores enzimáticos do tipo irreversível. Inibidores desta categoria (irreversíveis) não são o escopo desta dissertação e para uma abordagem extensiva a respeito deste tema, recomenda-se leitura especializada.³²

Os inibidores enzimáticos do tipo reversível podem ser divididos em três categorias: (i) competitivos; (ii) não-competitivos; e, (iii) incompetitivos.

Inibidores Competitivos. Os inibidores desta categoria muitas vezes possuem semelhança estrutural com o substrato natural da enzima, como resultado do planejamento baseado no estado fundamental. Essa semelhança ao estado fundamental resulta em uma mimetização dos padrões intermoleculares de ligação, e faz com que a enzima reconheça o inibidor como um

“possível substrato”. Porém, por sua estrutura química diferente, o inibidor não sofre a reação química característica do substrato, não levando a formação de produto pela ação da enzima. Inibidores que apresentam alta afinidade pela enzima impedem o acesso do substrato ao sítio ativo por intervalos de tempo consideráveis em condições de equilíbrio, reduzindo drasticamente a velocidade de reação (inibição). O equilíbrio estabelecido por inibidores do tipo competitivo é ilustrado na Figura 9.

Figura 9. Equilíbrio estabelecido na presença de um inibidor competitivo. Substrato e inibidor competem pelo mesmo sítio de ligação na enzima, ligando-se de forma mútua e exclusiva no equilíbrio.

De acordo com a Figura 9, inibidores do tipo competitivo se ligam no mesmo sítio do substrato natural (chamado de sítio ativo) para formar o complexo E•I, sendo que, ocorre uma competição pela ocupação desta cavidade de interação através de ligação mútua e exclusiva (i.e., formação de E•S ou E•I). O perfil característico de um inibidor competitivo pode ser

observado pelo gráfico de Lineweaver-Burk³² (ou de duplo recíproco), conforme mostrado na Figura 10. De acordo com o gráfico, obtido variando-se a concentração de inibidor, as interseções com o eixo y (valores recíprocos da velocidade de reação) fornecem valores de recíproco da velocidade máxima ($1/V_{\max}$), que não se alteram na presença de um inibidor competitivo. Por outro lado, as interseções do gráfico com o eixo x (valores recíprocos da concentração de substrato) fornecem valores de recíproco do K_m aparente ($-1/K_M$), que aumentam com a elevação da concentração de um inibidor competitivo por um fator igual a $(1 + [I]/K_i)$. Esse efeito característico do modo de ação de inibidores competitivos ocorre uma vez que mais substrato é requerido para manter a metade da $V_{\max}$. Os valores de $V_{\max}$ permanecem inalterados devido à capacidade do substrato (em concentrações de saturação) de deslocar totalmente o inibidor, já que competem pelo mesmo sítio da enzima.

Figura 10. Gráfico de Lineweaver-Burk de um inibidor competitivo.

Alguns exemplos de inibidores competitivos empregados na clínica médica são: o antiinflamatório celecoxib (Celebra[®], da Pharmacia/Pfizer) inibidor isoforma-específico da ciclooxigenase-2 (COX-2), o anti-hipertensivo captopril (Capoten[®], da Bristol-Myers Squibb), inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), e um dos maiores sucessos da

história da indústria farmacêutica, o redutor de colesterol atorvastatina (Lipitor[®], da Pfizer), inibidor da 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A redutase, enzima que atua na síntese do mevalonato, precursor bioquímico do colesterol no organismo.

Inibidores Não-Competitivos. Os inibidores do tipo não-competitivo não se ligam ao mesmo sítio de reação do substrato, e sim a outra região da enzima, denominada sítio alostérico. Os inibidores não-competitivos podem se ligar à enzima livre para formar o complexo (E•I), ou então ao complexo enzima-substrato para formar o complexo (E•S•I). Nos dois casos, a ligação ao sítio alostérico induz mudanças conformacionais na estrutura da enzima, modificando a conformação do sítio ativo e impedindo a interação eficaz com o substrato (encaixe do substrato na enzima). Um esquema ilustrativo da inibição do tipo não-competitiva é mostrado na Figura 11.

Figura 11. Equilíbrio estabelecido na presença de um inibidor do tipo não-competitivo. A ligação do inibidor a enzima livre ou ao complexo E•S produz alterações conformacionais no sítio ativo, afetando o processo catalítico.

De acordo com o gráfico, obtido em condições semelhantes ao dos inibidores competitivos, observa-se uma redução em V_{max} (V_{max} aparente) por um fator igual a $(1 + [I]/K_i')$, como mostra o gráfico de Lineweaver-Burk da Figura 12. Isso pode ser explicado pelo fato de que V_{max} depende diretamente da concentração de enzima ativa, uma vez que parte da enzima livre encontra-se modificada (conformação) pelo inibidor, afetando de maneira proporcional a concentração da mesma. Desta forma, o substrato não desloca o

inibidor como ocorre no caso dos inibidores competitivos. O decréscimo nos valores de $V_{\max}$ se acentua com o aumento da concentração de inibidor.

Uma vez que inibidores desta categoria podem apresentar afinidades diferentes pela enzima livre e para o complexo $E \cdot S$, é necessário expressar suas constantes de dissociação na forma de K_i (para a enzima livre) e αK_i (para o complexo $E \cdot S$). Se $\alpha = 1$, a afinidade do inibidor é idêntica tanto para a enzima livre como para o complexo $E \cdot S$,

Figura 12. Gráfico de Lineweaver-Burk de um inibidor não-competitivo.

Alguns exemplos de inibidores não-competitivos empregados atualmente são o Efavirenz e a Nevirapina, inibidores da transcriptase reversa do HIV (vírus da imunodeficiência humana) empregados no tratamento de pacientes com AIDS, além da Tacrina, inibidor da acetilcolinesterase, empregado no tratamento do mal de Alzheimer.

Inibidores Incompetitivos. Inibidores desta categoria se ligam exclusivamente ao complexo $E \cdot S$, e não possuem afinidade por qualquer sítio da enzima livre. Esse equilíbrio é ilustrado na Figura 13.

Figura 13. Equilíbrio característico na presença de um inibidor do tipo incompetitivo. A ligação do substrato à enzima produz uma mudança conformacional que permite a ligação do inibidor.

De acordo com a Figura 13, a formação do complexo ternário $E \cdot S \cdot I$ representa um ciclo termodinâmico entre as espécies $E \cdot S$, $E \cdot I$ e $E \cdot S \cdot I$. Portanto, o aumento da afinidade de um inibidor incompetitivo que acompanha a formação do complexo $E \cdot S$ requer um balanço por um aumento igual da afinidade de substrato pelo complexo $E \cdot I$. Como resultado, o efeito observado de um inibidor incompetitivo é a diminuição nos valores aparentes de K_M e V_{max} , de acordo com o aumento da concentração de inibidor, por um fator igual a $(1 + [I]/K_i')$, conforme mostra o gráfico duplo-recíproco da Figura 14.

Figura 14. Gráfico de Lineweaver-Burk característico de um inibidor incompetitivo.

Embora de uso terapêutico menos comum, existem inibidores incompetitivos relevantes, como o metotrexato, inibidor da diidrofolato redutase (neste caso, incompetitivo com relação ao NAD), e a camptotecina, inibidor da topoisomerase I, ambos empregados na terapia câncer.

Mecanismo de Ação. A determinação do mecanismo de ação de inibidores enzimáticos é de extremo valor no planejamento de candidatos a novos fármacos. O entendimento do mecanismo é fundamental na determinação do sítio de ação alvo e assim, o processo de planejamento pode ser racionalizado visando à otimização das interações intermoleculares não-covalentes predominantes na associação de alta complementaridade entre as diversas formas possíveis da enzima e seus inibidores. O mecanismo de ação enzimático pode ser determinado experimentalmente, permitindo o estabelecimento racional de estudos de modelagem molecular, empregando-se, por exemplo, técnicas avançadas de docagem molecular (do inglês, *molecular docking*). A determinação da modalidade de um inibidor fornece também informações valiosas a respeito da afinidade do inibidor pela enzima-alvo,

quantificada em termos da constante K_i , que se refere à dissociação do complexo enzima-inibidor (i.e., K_d para inibição). Isso permite definir a energia livre de ligação de Gibbs ($\Delta G_{\text{ligação}} = RT \ln K_d$) e acompanhar as mudanças de energia associadas às mudanças estruturais dos complexos E•I, determinadas pelas diferenças de interações específicas entre os resíduos de aminoácidos da enzima e as funcionalidades químicas (estrutura molecular) dos inibidores.

1.11. Inibidores da PNP

A PNP é considerada como um promissor alvo molecular para o desenvolvimento de novos fármacos. Além de ter papel fundamental na salvação de purinas (Figura 6), a PNP está associada à disfunção seletiva das células T, sem envolvimento de células B.^{29,36} Sua importância para a integridade do sistema imunológico ficou evidente pela primeira vez em 1975, com a descrição de uma forma severa imunodeficiência celular causada por perdas das funções normais das células T, em crianças que apresentavam perda parcial ou total da atividade dessa enzima.^{37,38} Além disso, tem sido caracterizada como importante alvo no desenvolvimento de novos candidatos a agentes quimioterápicos contra doenças parasitárias.²⁷

Os primeiros estudos envolvendo inibidores da PNP foram realizados na década de 70, onde a atividade da formicina B, análogo estrutural da inosina, foi descrita.³⁹ Posteriormente outros inibidores foram sintetizados e estudados,⁴⁰⁻⁴⁶ todos do tipo análogo do estado fundamental.⁴⁷⁻⁴⁸

No final da década de 90, os primeiros análogos do estado de transição da inosina foram descritos,⁴⁹⁻⁵³ constituindo-se nos primeiros inibidores superpotentes da PNP. Uma análise comparativa das estruturas moleculares da inosina (estado fundamental e de transição) e da imucilina H é mostrada na Figura 15.

Figura 15. Estruturas do estado fundamental da inosina, do estado de transição, onde os comprimentos de ligação são alterados pelo ataque do grupo fosfato, e da imucilina H, um análogo do estado de transição.

Embora os inibidores da classe das imucilinas apresentem potência extraordinária contra a PNP, os altos custos aliados à dificuldade de síntese e purificação limitam maiores perspectivas de introdução no mercado farmacêutico, principalmente para o tratamento de doenças tropicais.

2. OBJETIVOS

Os objetivos fundamentais dessa dissertação de mestrado incluem:

- Padronização e validação de ensaios cinéticos para a PNP de *S. mansoni*;
- Triagem bioquímica, identificação e seleção de inibidores da PNP de *S. mansoni*;
- Determinação da potência (IC_{50}) dos inibidores selecionados;
- Determinação da seletividade enzimática frente à enzima humana;
- Estabelecimento do mecanismo de ação dos inibidores mais promissores, bem como a determinação das constantes de afinidade (K_i);
- Estudos das interações intermoleculares de complexos enzima-inibidor através de modelagem molecular e cristalografia.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Expressão e Purificação da PNP de *S. mansoni*

Tendo em vista a realização de um número expressivo de ensaios cinéticos nesta dissertação de mestrado, foi de extrema importância a obtenção da enzima do parasita em boas quantidades e com alto grau de pureza. Desta maneira, nas etapas iniciais deste projeto, os protocolos de expressão e purificação da PNP de *S. mansoni* (enzima PNP de *S. mansoni*) foram estabelecidos, bem como as condições ideais de estoque.

A expressão da enzima foi feita através de uma cepa de bactérias *Escherichia coli* geneticamente modificadas, contendo o inserto gênico correspondente à expressão da PNP. Por razões práticas, este inserto foi obtido através do vetor de clonagem pMAL c,⁵⁴ que faz com que a proteína derivada do gene alvo seja expressa em fusão com a proteína de ligação de maltose (MBP, do inglês, *maltose binding protein*), que permite uma purificação satisfatória através de cromatografia de afinidade empregando-se resina de amilose. Essas bactérias foram cultivadas em meio 2XYT, contendo: 16 g de triptona, 10 g de extrato de levedura, 5 g de NaCl, em pH 7,0.

A cultura foi incubada a 37°C sob agitação constante (250 rpm) durante aproximadamente 2,5 h, quando a densidade ótica do meio atingiu cerca de 0,6 U.A., correspondente à um número de bactérias no meio razoável para a expressão da enzima. Nesta etapa, adicionou-se à cultura 0,3 M de isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG), que mimetiza lactose no meio, ativando a transcrição do operon lac, iniciando assim a expressão da MBP-PNP.

Após 1,5 h o meio foi centrifugado, sedimentando as bactérias no fundo do frasco. A solução sobrenadante foi descartada. Esse *pellet* bacteriano foi então ressuspenso no tampão

da primeira cromatografia, a fim de garantir um meio propício à enzima tão logo haja a lise celular. Este tampão contém: 1 mM de azida sódica, 1 mM de EDTA, 10 mM de β -mercaptoetanol, 200 mM de NaCl, 20 mM de TRIS-HCl, 10 mM de maltose (somente para o tampão utilizado na eluição), em pH 7,4.

A lise celular foi realizada através de pulsos de ultrassom aplicados em banho de gelo a fim de se evitar o superaquecimento da amostra. Após esta etapa, uma nova centrifugação sedimentou as partículas indesejadas, como membranas celulares e organelas citoplasmáticas. O sobrenadante, contendo a MBP-PNP, proteínas inerentes à bactéria, DNA, RNA, açúcares, e outros compostos, foi então separado e acondicionado nas condições ideais para a purificação.

A aplicação deste sobrenadante na coluna de amilose previamente limpa e condicionada fez com que a MBP-PNP fosse retida, devido à afinidade da MBP pela amilose, cuja estrutura química assemelha-se à maltose. Após a aplicação lenta da amostra, a resina foi lavada com tampão durante 16 h a fim de se garantir a pureza da amostra na eluição, realizada com uma solução de maltose a 10 mM, que desliga a MBP-PNP da resina.

Em seguida, a proteína em fusão foi submetida à reação de clivagem com a protease Fator XA (New England Biolabs, Inc.), em concentração apropriada. A reação durou de 96 a 120 h, sendo mantida em repouso a 4 °C durante o processo. O produto de clivagem foi então dialisado, a fim de se promover a troca do tampão da coluna de amilose por tampão MES (ácido N-morfolinoetilenossulfônico) livre de sal, sendo de extrema importância a manutenção e controle do pH 6,0 nesta etapa, mantendo-se a temperatura de 4°C, na qual a próxima purificação foi realizada.

O tampão MES foi preparado em duas versões, sendo uma delas para a injeção e lavagem da coluna (A) e outra para o gradiente salino de eluição (B).

Tampão A: 20 mM de MES e 10 mM de β -mercaptoetanol.

Tampão B: 20 mM de MES, 10 mM de β -mercaptoetanol e 1 M de NaCl.

Assim que o pH da solução contendo a enzima foi estabilizado em torno de 6,0, iniciou-se a purificação cromatográfica em coluna de troca catiônica POROS 20 HS, empregando-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC). O pI (ponto isoelétrico) da PNP livre é de 6,8, ao passo que da MBP livre é de 5,2. Ou seja, em pH 6,0, a PNP está na forma protonada e fica retida pela coluna, enquanto a MBP encontra-se desprotonada, passando diretamente pela mesma.

Após a injeção, observou-se a saída da MBP, retida apenas pelo período correspondente ao *tempo morto* da coluna, e logo após o início do gradiente salino, através da troca gradual pelo tampão contendo NaCl, a PNP foi eluída da coluna. Os tubos relacionados aos picos das duas enzimas foram separados e seu conteúdo foi visualizado por eletroforese em gel de poliacrilamida, a fim de se verificar a proporção de enzima em cada um deles, e garantir uma concentração final satisfatória da mesma para a realização dos ensaios cinéticos.

A determinação das condições ideais para o estoque da enzima foi feita através de diversos experimentos variando-se as condições de temperatura (e.g., 4, -20 e -80°C) com o subsequente acompanhamento da atividade por um período de até um ano, através de medidas cinéticas padrões de atividade.

3.2. Cinética da PNP de *S. mansoni*

3.2.1. Padronização e Validação dos Ensaios

Os ensaios cinéticos da enzima PNP de *S. mansoni* foram desenvolvidos com base nos ensaios reportados na literatura para a enzima bovina,⁵⁵⁻⁵⁹ empregando-se inosina como substrato, tampão Tris-HCl, e fosfato de potássio. Inicialmente a reação catalisada pela PNP

(Figura 7) produz hipoxantina no meio reacional (Figura 6, via de salvação). Contudo, os máximos de absorção da inosina e hipoxantina (substrato e produto de reação, respectivamente) encontram-se muito próximos na região do ultravioleta, conforme mostra a Figura 16. Isso impossibilita naturalmente a leitura direta da velocidade de reação.

Figura 16. Espectros de absorção na região do ultravioleta da inosina (em azul, máximo em 249 nm) e hipoxantina (em vermelho, máximo em 252 nm).

A solução encontrada para contornar este problema foi à utilização de um ensaio combinado, onde um excesso considerável (0,04 UI) de uma segunda enzima disponível comercialmente, a xantina oxidase, foi empregado no meio reacional. A XO é responsável pela conversão rápida e quantitativa da hipoxantina do meio (formada pela ação da PNP) em ácido úrico, cuja absorção tem um máximo bem definido em 293 nm (Figura 17).

Figura 17. Espectros de absorção da inosina (azul), hipoxantina (vermelho) e do ácido úrico produzido pela ação da XO (verde, máximo de absorção em 293 nm).

As concentrações dos demais reagentes foram determinadas conforme as exigências para otimização dos experimentos. A concentração de tampão adotada foi de 100 mM, procurando-se a menor concentração possível com capacidade satisfatória de manutenção do pH do meio na faixa ideal de 7,4. A concentração de fosfato foi escolhida entre dois valores padrões (de 1 e 50 mM) encontrados na literatura.^{57,60} Contudo, em nossos experimentos, devido ao fato do valor de K_M para o fosfato frente à PNP de *S. mansoni* ser em torno de 10 mM, os ensaios não foram bem sucedidos à concentração de 1 mM. Portanto, a concentração de 50 mM foi adotada obtendo-se reações com perfil cinético bem definido, sendo ainda possível a comparação de resultados com os encontrados na literatura para as enzimas PNP humana e bovina.⁶¹

A concentração de substrato (inosina), por sua vez, foi selecionada após a determinação experimental do valor de K_M para a inosina frente à PNP de *S. mansoni*. Essa determinação envolveu a medida de velocidade de reação frente a diferentes concentrações de

substrato, até que fosse atingido um patamar claro de saturação, onde o aumento da concentração de substrato não produz mais mudanças notáveis na velocidade de reação. Através do método de regressão não-linear de melhor ajuste dos dados cinéticos, foi possível, de forma pioneira, a determinação do valor de K_M . A repetição destes experimentos em diferentes ocasiões e com preparações distintas da enzima, propiciou maior segurança no processo de padronização e validação do ensaio cinético.

3.2.2. Triagem, Identificação e Seleção de Inibidores da PNP de *S.mansoni*

A identificação de moléculas com capacidade de modular a atividade da PNP *in vitro* foi conduzida inicialmente através da triagem bioquímica, onde os compostos foram avaliados em dose única padrão de 200 μ M. A comparação da atividade enzimática na ausência e na presença de inibidor forneceu o percentual de inibição, através da equação 1,

$$\% \text{ inibição} = \left(1 - \frac{v_i}{v_c} \right) \times 100 \quad (1)$$

onde v_i é a velocidade de reação observada na presença do inibidor, e v_c é a velocidade de controle da atividade, na ausência de inibidor.

Os inibidores estudados nesta dissertação podem ser classificados em duas classes distintas: (i) derivados de 9-deazaguaninas; e, (ii) derivados de 4-tioxo-2-tiazolidinas. No primeiro caso, os inibidores da tradicional série das 9-deazaguaninas foram planejados com base no substrato natural e sintetizados por cientistas da BioCryst dos Estados Unidos, que gentilmente cederam amostras para nossos estudos.^{47,55,60,61} Os compostos que apresentaram significativa inibição da PNP nos testes de triagem foram selecionados para a etapa posterior

de determinação de valores de IC_{50} . O processo de triagem, além de ser importante na identificação de candidatos a inibidor, é também uma ferramenta útil no estabelecimento da faixa de potência na qual o inibidor está situação. Algumas moléculas comercialmente disponíveis, como a formicina-B e a 9-benzilguanina, foram também incluídas no conjunto de dados por possuírem similaridade estrutural adequada.

No segundo caso, os inibidores da classe das 4-tioxo-2-tiazolidinas foram sintetizados no grupo colaborador coordenado pela Profa. Julianna Ferreira Cavalcanti de Albuquerque do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Inicialmente foi realizada uma triagem de várias substâncias em dose única de 200 μ M. Nesta concentração foi possível identificar possíveis candidatos para estudos posteriores e determinação de valores de IC_{50} . Nesta etapa, diversas substâncias foram descartadas, pois não apresentavam inibição significativa (padrão de inibição em 200 μ M < 50%).

3.2.3. Determinação de Valores de IC_{50} e Seletividade Enzimática

A determinação da potência dos compostos selecionados nas etapas de triagem foi realizada de maneira direta empregando-se o ensaio cinético padronizado neste trabalho de dissertação. Desta forma, o percentual de inibição correspondente foi obtido em diferentes concentrações de inibidor (usualmente de 5 a 7, em triplicata). Nesta etapa, procurou-se idealmente explorar a faixa de inibição entre 15 e 90%, construindo-se assim uma curva concentração X resposta com perfil bem definido. Os dados cinéticos experimentais foram tratados e coletados, sendo os valores de IC_{50} determinados através do método de regressão não-linear de melhor ajuste empregando-se o programa de cinética SigmaPlot 9.0. Uma curva típica de cinética empregada na análise de regressão não-linear é mostrada na Figura 18.

Figura 18. Exemplo de curva concentração X resposta utilizada na determinação de IC_{50} pelo método de regressão não-linear de melhor ajuste dos dados cinéticos coletados experimentalmente.

Nos experimentos de determinação de potência, a observação da faixa empregada na coleta dos dados é de extrema importância. Os valores aproximados de mínimo (15%) e máximo (90%) devem ser respeitados, uma vez que valores fora desta faixa incluem erros experimentais significativos. Acima de 90% de inibição, por exemplo, entra-se em uma região onde grandes variações na concentração de inibidor produzem variações insignificantes na inibição, tornando a quantidade de informação extraída pouco interessante e confiável, devido ao erro ser mais significativo.

A seletividade dos inibidores estudados foi estabelecida a partir do mesmo tipo de experimento de potência realizado anteriormente. Contudo, nos novos experimentos foi empregada a enzima humana, adquirida junto à CalBioChem para a determinação dos valores de IC_{50} . A razão entre os valores de IC_{50} fornece uma medida da seletividade enzimática, determinada pela equação 2,

$$S = \left(\frac{IC_{50} \text{ Homo sapiens}}{IC_{50} \text{ S. mansoni}} \right) \quad (2)$$

onde valores iguais à unidade indicam inexistência de seletividade; valores maiores do que 1 indicam seletividade frente a enzima do parasita; ao passo que valores menores do que 1 representam seletividade frente a enzima humana.

3.2.4. Determinação do Mecanismo de Ação e Afinidade

Os estudos de mecanismo de ação dos inibidores estudados nesta dissertação envolveram a coleta experimental de diversos conjuntos de dados e o tratamento adequado usando-se o método de Lineweaver-Burk, conforme discutido no item de Introdução desta dissertação (Item 1.10). O método experimental consiste em se medir a velocidade de reação em 5 ou 6 concentrações diferentes de substrato, primeiramente na ausência de inibidor e logo após na presença de 3 concentrações diferentes de inibidor. A escolha das concentrações de inibidor é feita com base no valor de IC_{50} , optando-se por valores de concentração logo acima e abaixo desse, que sejam capazes de produzir boas curvas quando do emprego do método do duplo-recíproco. As concentrações de substrato foram testadas e escolhidas experimentalmente, sendo que neste trabalho, usou-se os valores de 5, 7,5, 10, 15 e 20 μM de inosina em todos os casos. Os dados foram coletados e deram origem a gráficos de duplo-recíproco, ou seja, tendo-se o inverso da velocidade de reação ($1/v_0$, em y) em função do inverso da concentração de substrato ($1/[S]$, em x). Através do padrão de intersecção das curvas no plano de coordenadas cartesianas (Figuras 10, 12 e 14), foi possível determinar o mecanismo em que os inibidores selecionados atuam.

Empregando-se os mesmos dados dos estudos de mecanismo, foi possível também a determinação da constante de dissociação do complexo $E \cdot I$ (K_i). Para isso, construiu-se o gráfico da razão entre K_M aparente e V_{max} observados em função da concentração de inibidor

(Figura 19). A intersecção da curva no eixo das abcissas (eixo x) fornece o valor da constante K_i .

Figura 19. Gráfico padrão empregado na determinação da constante K_i .

3.3. Estudos Estruturais de Complexos Enzima-Inibidor

Inicialmente, foram obtidos cristais de PNP pura, a partir de condições já estabelecidas, empregando-se 18–20% de PEG (polietilenoglicol) 1500, 20% de glicerol, pH 4.9–5.0 PNP a uma concentração de 6 mg/mL. O método empregado para a cristalização foi o de difusão de vapor com gota suspensa de 4 mL, contendo 2 mL de solução de proteína e 2 mL da solução do poço, a uma temperatura de 4°C.³¹ Dentre os cristais obtidos foram selecionados os de maior tamanho e formato o mais regular e uniforme possível, a fim de submetê-los ao *soaking*, técnica que consiste em mergulhar cristais da enzima pura em uma solução similar à de cristalização, contendo uma concentração consideravelmente alta de inibidor. Dependendo da concentração e da afinidade do inibidor pelo sítio ativo da enzima, este pode permear o cristal, ligando-se na forma apropriada de complexo E•I. A principal vantagem do *soaking* em relação à co-cristalização é a obtenção dos cristais na ausência de

um composto estranho à condição de cristalização, o que pode prejudicar, ou até mesmo impedir o seu crescimento, principalmente devido ao fato de que a maioria dos inibidores é solúvel apenas em dimetilsulfóxido (DMSO), componente que pode interferir no processo de empacotamento cristalino. Uma vez obtidos os cristais, a adição de DMSO pouco interfere na estrutura do mesmo. Contudo, a técnica apresenta uma desvantagem em relação a uma possível co-cristalização, que é a necessidade de um número considerável de cristais para os experimentos, já que frequentemente observa-se rupturas e rachaduras nos cristais mergulhados na solução contendo o inibidor.

Os cristais submetidos ao *soaking* ficaram incubados durante 24 h para garantir uma melhor ligação do inibidor aos sítios ativos da enzima, a uma temperatura de 4°C, a fim de se evitar a degradação da enzima. Após este período, foi feita uma inspeção visual dos melhores cristais, avaliando-se o tamanho, regularidade, e a ausência de fraturas. Os cristais escolhidos foram coletados e congelados a -196°C (N₂ líquido) para transporte até o Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em Campinas – SP, onde foram testados na linha MX2 de difração de raios-X.

Os padrões de difração coletados foram analisados no programa MOSFLM,⁶² onde os parâmetros de cela, bem como resolução máxima foram obtidos. A seguir, com o auxílio dos programas existentes no pacote CCP4,⁶³ a estrutura tridimensional da PNP foi gerada através de substituição molecular, empregando-se o módulo MOLREP (*Molecular Replacement*), usando como modelo a estrutura da proteína depositada no *Protein Data Bank* (código PDB: 1TD1), uma vez que se trata da mesma forma da enzima. O programa SCALA foi utilizado no escalonamento das fases.

A densidade gerada a partir dos mapas de difração foi então empregada, juntamente com o arquivo de coordenadas do PDB no refinamento, que teve por objetivo ajustar a estrutura usada como modelo à densidade observada, já que esta é a que contém as

informações reais, uma vez que foi obtida a partir do cristal coletado. Nesta etapa de refinamento, foi utilizado o programa PHENIX.⁶⁴ Os arquivos de saída do PHENIX, um arquivo PDB e um arquivo de densidade eletrônica MTZ foram submetidos à análise visual, no programa COOT,⁶⁵ onde os ajustes da estrutura dentro da densidade foram feitos, bem como a colocação do inibidor, dos íons sulfato (presentes na condição de cristalização), moléculas de solvente e de água observadas na difração.

Alternando-se a análise e ajustes visuais da estrutura com ciclos de refinamento, o modelo gerado foi assumindo uma posição cada vez mais favorável dentro da densidade eletrônica, preenchendo-a completamente, e fazendo com que os parâmetros R e R_{free} , que descrevem como o modelo encontra-se dentro da densidade sejam diminuídos ao máximo, resultado de um modelo mais próximo do real.

3.4. Modelagem Molecular

Nesta dissertação foram realizados estudos de modelagem molecular através do emprego da técnica de docagem molecular, empregando-se o algoritmo de construção incremental do programa FlexX,⁶⁶ disponível na plataforma SYBYL 7.3, (Tripos, Inc.). O sítio ativo da PNP foi estudado com base nos resíduos com importante participação na ligação e reação catalítica da enzima: TYR202, GLU203 e ASN245.³¹ Estes resíduos possuem papel fundamental na estabilização da porção purina do substrato, mantendo a molécula em posição favorável para que a clivagem e fosforilação subseqüentes aconteçam, através da ação do resíduo HYS88. Logo, foi importante que estes resíduos fossem abrangidos na seleção da região de docagem que representou o sitio ativo.

Uma inspeção visual criteriosa foi realizada com o programa FlexX e a melhor condição de sítio ativo foi escolhida pela seleção dos resíduos TYR 202 e ASN 245 como

centro da região e um raio de 6,5 Å (padrão do FlexX) ao redor dos mesmos, o que garantiu que todos os resíduos considerados essenciais fossem incorporados com boa margem de segurança.

O processo de docagem foi conduzido com três arquivos do tipo multi-mol2, correspondendo a três séries distintas empregadas neste trabalho. Cada molécula foi acoplada 30 vezes dentro do sítio e suas posições relativas foram organizadas e classificadas. Em seguida, os arquivos de saída foram submetidos à inspeção visual no programa Pymol,⁶⁷ que permite uma série de análises a fim de facilitar a compreensão dos resultados, como medidas de distâncias e ângulos interatômicos (essenciais para identificação de possíveis ligações de hidrogênio) e desenho de superfícies de área polar (para a verificação de interações estéricas e eletrostáticas). Uma outra ferramenta importante aliada ao PyMOL é o DrugScore Online,⁶⁸ um servidor disponível na internet, localizado na Universidade de Märburg, Alemanha, que permite a análise quantitativa das interações estéricas existentes.

Os arquivos de entrada (pdb da enzima e mol2 dos ligantes) foram submetidos ao servidor, que retornou em poucos minutos com scripts para o PyMOL, usados para traçar esferas de acordo com as interações encontradas. Esferas azuis representam interações estéricas favoráveis, ao passo que esferas vermelhas representam interações negativas. O raio das esferas diz respeito à contribuição das mesmas, sendo que raios maiores representam interações mais expressivas (tanto positiva, quanto negativa). A Figura 20 ilustra um exemplo de análise através do DrugScore Online.

Figura 20. Análise de interações estéreas realizada através do servidor DrugScore Online. Esferas azuis representam interações estéreas positivas, ao passo que esferas vermelhas representam interações negativas. O raio das esferas diz respeito à intensidade relativa de cada interação.

Ambas as séries empregadas neste trabalho (9-deazaguaninas e 4-tioxo-2-tiazolidinas) foram submetidas ao mesmo tipo de procedimento geral de modelagem molecular, caracterizando um conjunto de propriedades estéreo-eletrônicas responsáveis pelo processo de reconhecimento molecular e inibição enzimática.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Expressão e Purificação da PNP

Um aspecto de extrema importância na concepção deste projeto de dissertação de mestrado era a realização de um número expressivo de ensaios com a enzima PNP de *S. mansoni*. Tornava-se assim indispensável à obtenção de boas quantidades da enzima-alvo com alto grau de pureza para garantir um padrão apropriado de qualidade dos ensaios bioquímicos. Desta maneira, os protocolos de expressão e purificação da enzima PNP de *S. mansoni* foram otimizados para atender a essa demanda.

Após a realização da expressão da enzima e da primeira etapa de purificação envolvendo cromatografia de afinidade em coluna de resina de amilose, a eletroforese em gel de poliacrilamida permitiu a avaliação do sucesso destes procedimentos. Isso foi de grande importância para assegurar que a MBP-PNP foi expressa em quantidades satisfatórias e, principalmente, em sua forma solúvel. A Figura 21 mostra o resultado da eletroforese em gel.

Figura 21. SDS-PAGE da primeira etapa (expressão e purificação em coluna de resina de amilose). As colunas referem-se a diferentes amostras injetadas no gel: padrão de massa molecular (1); extrato-bruto de coluna, contendo todas as proteínas da bactéria (2); lavagem da coluna (3); eluição da MBP-PNP (4). Os números à esquerda correspondem às massas moleculares de cada banda do padrão (em KDa).

A análise do gel da Figura 21 revelou uma banda de maior destaque na expressão total (extrato bruto celular, coluna 2), ligeiramente acima da marca de 66 KDa, correspondente à MBP-PNP, cuja massa molecular é de 73 KDa (42 KDa da MBP e 31 KDa da PNP). O tamanho relativo desta banda em relação as demais na mesma coluna se deve a super-expressão da proteína em fusão induzida pelo vetor pMAL. Na coluna 3 não é possível ver a mesma banda, já que esta aplicação corresponde ao coletado da lavagem da coluna com tampão, mostrando que a proteína em fusão fica totalmente retida pela resina, como desejado. A coluna 4 traz o resultado da eluição da MBP-PNP com solução de maltose. Dois fatores destacam-se nesta coluna, concentração e pureza. A concentração da enzima é notável nesta coluna, como pode ser verificado no tamanho pronunciado da banda. A pureza também é evidenciada uma vez que não existem outras bandas na mesma coluna, comprovando a eficiência do método de purificação.

A segunda purificação, feita em coluna de troca catiônica, foi acompanhada através de leitura na região do UV, sendo obtido um cromatograma onde é possível identificar a saída de cada produto da clivagem. A Figura 22 mostra o cromatograma com o resultado da segunda purificação.

Figura 22. Cromatograma da purificação em coluna de troca catiônica, mostrando a absorção resultante da saída das proteínas (azul) e o gradiente salino, em % do tampão B (verde), em função do tempo de purificação.

No cromatograma da Figura 22 podem ser observadas duas bandas distintas bem definidas. A primeira, com início no tempo de 1 min e término em 15 min de purificação, corresponde à saída da MBP, que não é retida pela coluna. Durante aproximadamente 25 min, não foi observada nenhuma alteração significativa na absorção, e quando o gradiente salino atingiu aproximadamente 400 mM (40% do tampão B, um pouco antes de 40 min de purificação), a PNP foi eluída da coluna cromatográfica, resultando em uma banda intensa, que se estendeu por apenas 5 min (correspondentes a 5 tubos de coleta). A coleta rápida da

PNP foi um alvo de grande interesse neste processo, assegurando uma concentração maior da enzima. Nesta etapa de purificação o acompanhamento por eletroforese evidenciou a pureza real dos produtos. O gel de poliacrilamida correspondente a esta etapa é mostrado na Figura 23.

Figura 23. SDS-PAGE da segunda purificação, em coluna de troca catiônica empregando a técnica de HPLC. As colunas correspondem ao padrão de massa molecular (1), produto da clivagem (2), MBP livre (3 e 4), alíquota entre a saída da MBP e da PNP, mostrando a ausência de produtos (5), MBP-PNP (6 e 7), e PNP livre (8, 9 e 10). Os números à esquerda correspondem às massas empregadas no padrão de massa molecular (dados em KDa).

Através da análise das bandas encontradas na coluna de número 2 do gel da Figura 23 é possível notar a presença de três proteínas de massas distintas. Estas bandas correspondem a proteína em fusão não clivada antes da injeção (massa molecular de 73 KDa, próxima a 66 KDa), a MBP livre (massa molecular de 42 KDa) e a PNP livre (massa molecular de 31 KDa), mostrando que o processo de clivagem não foi totalmente eficiente. As bandas de número 3 e 4 correspondem a tubos coletados durante a banda da MBP, e mostram a saída da proteína na forma pura, livre de subprodutos.

As bandas de número 6 a 10 mostram a proteína em fusão não clivada, bem como a PNP em sua forma livre, que foram eluídas no mesmo intervalo de tempo, sendo que a MBP-

PNP foi coletada nos dois primeiros tubos e a PNP livre nos três tubos restantes. Este fato reforçou a importância de se realizar a eletroforese para verificação dos produtos de purificação, uma vez que no cromatograma, estas proteínas produzem a mesma banda, sendo impossível distingui-las.

A PNP de *S. mansoni* foi coletada e na sequência diferentes alíquotas da enzima foram preparadas e estocadas a fim de se estabelecer as condições ideais para o armazenamento da proteína em um período de tempo que assegure a estabilidade e manutenção da atividade enzimática em padrões normais. Primeiramente, foram avaliados os efeitos da temperatura sobre a atividade da PNP. A Figura 24 mostra o gráfico da atividade da enzima em função do tempo para três diferentes condições de temperatura.

Figura 24. Gráfico de atividade vs. tempo para três diferentes condições de temperatura (4°C sem congelamento; e congelamento a -20 e -80°C)

A condição de estoque a temperatura de -80°C mostrou-se mais apropriada para a conservação da enzima. Logo, essa condição de estoque foi selecionada para a PNP de *S. mansoni*, com o acréscimo de 10% de glicerol. Um outro estudo importante realizado foi o monitoramento da atividade da enzima com o tempo, a fim de se estabelecer margens seguras para o uso das alíquotas em ensaios cinéticos. A Figura 25 ilustra o perfil da atividade enzimática acompanhada por um período de um ano.

Figura 25. Monitoramento da estabilidade da enzima em -80°C (10% de glicerol) durante o período de 12 meses.

As alíquotas analisadas perderam cerca de 60% de sua atividade no período de 12 meses, sendo que nos 5 primeiros meses a perda foi de apenas 20%. Assim, adotou-se o período de 150 dias como seguro para a utilização da enzima purificada, sem prejuízos aos

ensaios cinéticos. Vale ressaltar que todas as alíquotas utilizadas neste trabalho foram sempre testadas para verificação dos níveis ideais de atividade enzimática.

4.2. Padronização dos Ensaios Cinéticos

Após o estabelecimento de protocolos confiáveis de obtenção e armazenamento da enzima PNP de *S. mansoni*, foi necessário o desenvolvimento de um ensaio cinético padrão para a avaliação de substâncias químicas candidatas a inibidores da enzima-alvo. Para viabilizar esse procedimento, inicialmente foi realizada a determinação experimental do valor de K_M para a inosina frente à enzima PNP de *S. mansoni*. Isso foi possível através de medidas da velocidade inicial de reação para diferentes concentrações crescentes de substrato. O método de regressão não-linear de melhor ajuste foi aplicado aos dados coletados, gerando o gráfico mostrado na Figura 26.

Figura 26. Curva para determinação da constante de Michaelis-Menten (K_M) do substrato inosina frente à PNP de *S. mansoni*.

A equação 3 representa a equação de Michaelis-Menten e evidencia que a velocidade de reação varia em função de $V_{\max}$, da concentração de substrato e do K_M .

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]} \quad (3)$$

Através dos dados experimentais coletados foi determinado um valor de K_M para a inosina de 6,4 μM . Por conveniência, foi estabelecida uma concentração padrão de inosina de 10 μM para os ensaios cinéticos, obtendo-se a relação $[S]/K_M$ igual a 1,56. Em ensaios de cinética enzimática envolvendo a avaliação de substâncias químicas candidatas a inibidores, é importante que se trabalhe com concentrações de substrato próximas ao valor de K_M . O valor de K_M é uma medida relativa de afinidade da formação do complexo E•S em condições do estado estacionário, que se caracteriza pela alta concentração do mesmo quando comparado com a espécie E (enzima livre). O emprego indevido de altas concentrações de substrato poderia levar a problemas experimentais críticos para a identificação de inibidores competitivos, já que esse tipo de inibidor compete diretamente com o substrato pelo sítio de ligação na enzima, sendo deslocado pelo mesmo.

Como um dos objetivos deste trabalho é o estudo da seletividade enzimática, o K_M para a inosina frente à enzima humana foi também determinado, com valor de 41 μM . Assim, para se manter a mesma razão $[S]/K_M$ (1,56), foi estabelecida uma concentração de 64 μM de inosina para os ensaios com a PNP humana.

4.3. Triagem e Identificação de Novos Candidatos a Inibidores da PNP de *S. mansoni*

Em nossos laboratórios no CBME são realizadas triagens bioquímicas em larga escala de compostos de origem natural e sintética contra diversas enzimas-alvo de parasitas. Em

particular, o trabalho intensivo de triagem de um grande número de substâncias químicas puras contra a PNP de *S. mansoni* resultou na identificação de moléculas capazes de modular de forma significativa a atividade da enzima. Estima-se que mais de 400 compostos foram avaliados contra a PNP de *S. mansoni*, durante este trabalho. Os resultados de inibição (%) na concentração de 200 μ M, nas condições padrões de ensaio, são mostrados na Tabela 1 para vários compostos pertencentes a classe das 4-tioxo-2-tiazolidinas, identificadas em triagem biológica.

Tabela 1. Efeitos inibitórios de uma série de 4-tioxo-2-tiazolidinas frente à PNP de *S. mansoni*.

Composto	Estrutura	Inibição (%)* 200 μ M
1		63
2		88
3		95
4		89

Composto	Estrutura	Inibição (%)* 200 μ M
5		77
6		85
7		70
8		78
9		5
10		100

Composto	Estrutura	Inibição (%)* 200 μ M
11	<chem>O=[N+]([O-])c1ccccc1C=C2SC(=O)NC=S2</chem>	7
12	<chem>Cc1ccc(cc1)C=C2SC(=O)NC=S2</chem>	79
13	<chem>CC(=O)Nc1ccc(cc1)C=C2SC(=O)NC=S2</chem>	21
14	<chem>Fc1ccc(cc1)C=C2SC(=O)NC=S2</chem>	26
15	<chem>Clc1ccc(cc1)C=C2SC(=O)NC=S2</chem>	87
16	<chem>[O-][N+]([O-])c1ccc(cc1)C=C2SC(=O)NC=S2</chem>	5

Composto	Estrutura	Inibição (%)* 200 μ M
17		100
18		70
19		91
20		6

*Valores (%) representativos da média de três experimentos, com desvio da média mantido na faixa limite entre 3 e 10%.

Como pode ser observado na Tabela 1, vários compostos apresentaram inibição substancial na concentração padrão empregada, sendo que as 4-tioxo-2-tiazolidinas mais promissoras foram selecionadas para avaliação de potência (IC_{50}), uma parâmetro cinético quantitativo.

4.4. Determinação de Potência (IC₅₀)

Todos os compostos estudados nesta dissertação de mestrado foram avaliados empregando-se os ensaios cinéticos que foram desenvolvidos e padronizados neste trabalho. Duas classes químicas foram consideradas em nossos estudos: (i) a das 9-deazaguaninas; e, (ii) a das 4-tioxo-2-tiazolidinas. Inicialmente foram estudados candidatos da classe das 9-deazaguaninas, inibidores tradicionais das enzimas PNP humana e bovina. Por terem conhecida atividade contra estas formas da enzima, estes compostos não foram alvo de triagem, sendo esta etapa unicamente empregada para a identificação da faixa de potência em que cada um dos compostos se encontrava.

A série estudada consiste de 45 compostos em sua maioria de 9-deazaguaninas (BioCryst), com exceção dos derivados de guanina e guanosina (Sigma) **50** (8-aminoguanina), **51** (tubercidina), **52** (formicina B), **53** (6-mercaptoguanosina) e **54** (9-benzilguanina), além do análogo do estado de transição **55** (imucilina H, BioCryst), para os quais foram determinados valores de IC₅₀. A Tabela 2 apresenta as estruturas destes compostos associadas aos respectivos valores de IC₅₀.

Tabela 2. Avaliação da potência da série de 9-deazaguaninas frente à enzima PNP de *S. mansoni*.

Inibidor	Estrutura	IC ₅₀ (μM)
21		1,4 ± 0,09

Inibidor	Estrutura	IC ₅₀ (μM)
22	<chem>Nc1nc2c(nc(=O)[nH]2)c(c3ccccc3C1)CC4=CC=CC=C4Cl</chem>	0,50 ± 0,03
23	<chem>Nc1nc2c(nc(=O)[nH]2)c(c3ccccc3C1)CC4=CC=CSC4</chem>	0,77 ± 0,08
24	<chem>Nc1nc2c(nc(=O)[nH]2)c(c3ccccc3C1)CC4=CC=CC=C4Cl</chem>	0,87 ± 0,06
25	<chem>Nc1nc2c(nc(=O)[nH]2)c(c3ccccc3C1)CC4=CC=C(O)C=C4</chem>	0,79 ± 0,06
26	<chem>Nc1nc2c(nc(=O)[nH]2)c(c3ccccc3C1)CC4CCCCC4</chem>	22 ± 1,8

Inibidor	Estrutura	IC ₅₀ (μM)
27		28 ± 2,1
28		18 ± 1,5
29		12 ± 0,8
30		18 ± 1,7
32		72 ± 5,5

Inibidor	Estrutura	IC ₅₀ (μM)
33		39 ± 3,2
34		200 ± 18
35		0,80 ± 0,05
36		0,50 ± 0,08
37		171 ± 12

Inibidor	Estrutura	IC ₅₀ (μM)
38		200 ± 16
39		2,1 ± 0,3
40		6,4 ± 0,7
41		16 ± 1,2
42		3 ± 0,4

Inibidor	Estrutura	IC ₅₀ (μM)
43		200 ± 22
44		7 ± 0,8
45		4,2 ± 0,3
46		4,5 ± 0,4
47		0,10 ± 0,01

Inibidor	Estrutura	IC ₅₀ (μM)
48		0,15 ± 0,01
49		24 ± 2,2
50		23 ± 2
51		200 ± 17
52		47 ± 3,8

Inibidor	Estrutura	IC ₅₀ (μM)
53		95 ± 6,6
54		39 ± 2,6
55		0,045 ± 0,002

O fator de potência deste conjunto, representado pela razão entre os compostos de maior (**55**, IC₅₀ = 0,045 μM) e de menor (**38**, **43** e **51**, IC₅₀ = 200 μM) potência (IC₅₀^{<potência} / IC₅₀^{>potência}), é da ordem de cerca de 4500. Esses dados representam de forma clara a ótima faixa de distribuição da propriedade biológica, de mais de 3 ordens de magnitude. A presença de inibidores nas faixas de alta, moderada e baixa potência é amplamente desejada em estudos em química medicinal, fornecendo informações mais detalhadas sobre a natureza das relações entre a estrutura e atividade (SAR) desta série de compostos.

Os inibidores da série das 9-deazaguaninas (incluindo os compostos **50** a **55**) possuem notável similaridade estrutural com o substrato inosina, sendo oriundos, portanto de planejamento racional baseado na estrutura do estado fundamental. Vale ressaltar a atividade pronunciada do composto **55** (imucilina H), cuja estrutura é análoga ao estado de transição da

inosina. A diversidade estrutural dentro da série é representada por diferentes grupos substituintes na posição 9 do anel purínico. Também foram estudados compostos estruturalmente diversos (não relacionados à inosina) como promissores efeitos inibitórios frente a PNP de *S. mansoni*, como os inibidores da classe das 4-tioxo-2-tiazolidinas, identificados inicialmente através da triagem bioquímica com nossos ensaios padronizados. Uma série de 10 compostos foi avaliada para determinação da potência, de acordo com os dados exibidos na Tabela 3.

Tabela 3. Avaliação da potência da série de 4-tioxo-2-tiazolidinas frente à enzima PNP de *S. mansoni*.

Inibidor	Estrutura	IC ₅₀ (μM)
2		74 ± 6,3
3		38 ± 2,9
4		70 ± 6,6

Inibidor	Estrutura	IC ₅₀ (μM)
5		220 ± 18
6		121 ± 10
8		191 ± 17
10		18 ± 2
17		12,4 ± 1,1

Inibidor	Estrutura	IC ₅₀ (μM)
18		72 ± 6,8
19		86 ± 7,1

O fator de potência deste conjunto é da ordem de 17,4, relativamente baixo quando comparado ao encontrado para a série das 9-deazaguaninas. Isso se deve à atividade mais modesta encontrada para esta série, bem como ao menor número de moléculas bioativas estudadas. Contudo, esta série de inibidores tem grande valor, pois é estruturalmente e quimicamente inédita para a enzima-alvo, representando, portanto, importante contribuição deste trabalho. Os dados coletados foram também valiosos nas etapas de modelagem molecular, introduzindo novos desafios no estabelecimento de SAR úteis no entendimento das interações intermoleculares predominantes na formação de complexos E•I.

4.5. Seletividade Enzimática

Os estudos realizados nesta dissertação de mestrado têm por objetivo principal a descoberta de novos candidatos a compostos líderes, capazes de representarem NCEs candidatas a fármacos contra a esquistossomose. Assim, é de grande interesse compostos

nesta categoria apresentem limitada interação com a enzima-alvo do hospedeiro humano. Para tanto, fez-se um estudo comparativo da potência da série das 9-deazaguaninas através da determinação de valores de IC₅₀ para 20 compostos selecionados frente à enzima humana. A Tabela 4 mostra os resultados da avaliação da seletividade enzimática para esta série de inibidores.

Tabela 4. Seletividade enzimática de um subconjunto de 9-deazaguaninas.

Inibidor	Estrutura	IC ₅₀ ^{<i>S. mansoni</i>} (μM)	IC ₅₀ ^{humana} (μM)	S*
21		1,4	0,06 ± 0,003	0,042
22		0,5	0,05 ± 0,003	0,1
23		0,77	0,01 ± 0,001	0,013
27		28	0,1 ± 0,009	0,035

Inibidor	Estrutura	IC ₅₀ ^{<i>S. mansoni</i>} (μM)	IC ₅₀ ^{humana} (μM)	S*
28		18	0,03 ± 0,001	0,002
33		39	0,9 ± 0,04	0,023
35		0,8	0,2 ± 0,008	0,25
36		0,5	0,3 ± 0,01	0,6
39		2,1	0,5 ± 0,009	0,24

Inibidor	Estrutura	IC ₅₀ ^{<i>S. mansoni</i>} (μM)	IC ₅₀ ^{humana} (μM)	S*
40		6,4	4,9 ± 0,5	0,77
42		3	0,1 ± 0,007	0,033
43		200	4,4 ± 0,3	0,022
44		7	0,023 ± 0,001	0,003
46		4,5	0,20 ± 0,02	0,04

Inibidor	Estrutura	IC ₅₀ ^{<i>S. mansoni</i>} (μM)	IC ₅₀ ^{humana} (μM)	S*
48		0,15	0,27 ± 0,03	1,8
49		24	2,6 ± 0,3	0,11
50		23	0,2 ± 0,01	0,008
51		200	300 ± 23	1,5
52		47	300 ± 19	6,4

Inibidor	Estrutura	IC ₅₀ ^{<i>S. mansoni</i>} (μM)	IC ₅₀ ^{humana} (μM)	S*
53		95	315 ± 27	3,3

*S = seletividade enzimática, dada pela razão ($S = \text{IC}_{50}^{\text{humana}} / \text{IC}_{50}^{\text{S. mansoni}}$).

Muitos compostos apresentam alta seletividade para a enzima humana, como é o caso do composto **28**, cerca de 500 vezes seletivo para a mesma. Contudo, alguns dos compostos estudados possuem notável seletividade para a enzima do parasita, como é o caso do composto **52**, seletivo em mais de 6 vezes para esta forma da enzima.

Apesar da maior parte dos compostos ser seletivo para a enzima humana, e esse grupo incluir os inibidores mais potentes da série, os estudos de seletividade forneceram informações interessantes no aspecto estrutural. Como citado anteriormente, a diversidade do conjunto é representada pelos diferentes grupos substituintes na posição 9 do anel purínico. Apesar de singular, essa variação proporciona grande efeito na distribuição de potência do conjunto de inibidores, além de certamente conferir seletividade enzimática. Os resultados obtidos evidenciam que os inibidores que possuem alta seletividade frente à enzima humana são substituídos por grupos hidrofóbicos na posição 9 (e.g., compostos **21**, **27**, **35**, **36** e **44**). Por outro lado, moléculas substituídas por ribose (de caráter hidrofílico, compostos **51**, **52** e **53**) apresentam considerável seletividade frente à enzima do parasita, a despeito da menor potência relativa apresentada.

Mesmo que a busca por novas moléculas esteja sempre focada em NCEs com elevada potência e seletividade, os estudos apresentados nesta dissertação podem ilustrar de maneira

satisfatória as vantagens do estabelecimento de SAR para o planejamento de novas séries otimizadas. A hidrofília dos grupos ribose na posição 9 sugere que a seletividade dos compostos é determinada por diferenças estruturais entre as duas formas da enzima, sendo que os grupos hidrofílicos da posição 9 podem ser estabilizados de alguma maneira dentro do ambiente químico da PNP de *S. mansoni*, não encontrando as mesmas interações na PNP humana. Assim, uma análise detalhada das diferenças estruturais entre as enzimas PNP humana e do parasita pode esclarecer os meios pelos quais a polaridade atua sobre a estrutura da enzima, permitindo assim, no futuro a proposição de novas moléculas mais seletivas e potentes.

As quantidades disponíveis de amostra dos compostos da série das 4-tioxo-2-tiazolidinas não foram suficientes para a determinação da seletividade enzimática. Por se tratar de uma classe totalmente inédita de inibidores da PNP de *S. mansoni*, optou-se preferencialmente pela investigação do mecanismo de ação dos compostos mais potentes da série.

4.6. Determinação do Mecanismo de Ação e do K_i

Os compostos mais potentes do conjunto das 9-deazaguaninas foram selecionados para estudos de determinação do mecanismo de inibição. Este subconjunto inclui 7 inibidores da classe das 9-deazanaguaninas (incluindo a imucilina H), além de outros 3 inibidores da classe das 4-tioxo-2-tiazolidinas.

A determinação da afinidade de inibidor pela enzima-alvo na formação do complexo E•I é de grande interesse no processo de planejamento de candidatos a novos fármacos. Esse parâmetro, definido pelo valor de K_i , pode ser estabelecido através de dados cinéticos obtidos

em experimentos padrões de mecanismo de ação. A Tabela 5 mostra os valores de K_i para os inibidores estudados.

Tabela 5. Determinação da afinidade para uma série de inibidores da enzima PNP de *S. mansoni*.

Inibidor	IC ₅₀ (μM)	K _i (μM)	IC ₅₀ /K _i
3	38	17,9	2,1
10	18	12,6	1,4
17	12,4	8,8	1,4
22	0,5	0,120	4,2
35	0,8	0,451	1,8
42	3	0,689	4,4
45	4,2	2,03	2,1
47	0,1	0,071	1,4
48	0,15	0,038	3,9
55	0,045	0,01	4,5

A determinação da afinidade para a série apresenta boa consistência, mostrada pela razão IC₅₀/K_i, que varia entre 1,4 e 4,5 (um fator de 3,21) dentro da série. Esta variação é bastante pequena quando se leva em conta que a série possui inibidores de alta afinidade e potência altas (**55**, K_i = 0,01 μM) e modestas (**3**, K_i = 8,8 μM). Isso demonstra uma robustez satisfatória das condições experimentais para determinação da afinidade.

Os experimentos de determinação de mecanismo foram realizados de acordo com os procedimentos descritos anteriormente, gerando para cada um dos inibidores um gráfico de duplo-recíproco (Lineweaver-Burk), como mostrado nas Figuras 27 a 36. Em todos os gráficos, a curva de menor inclinação refere-se à ausência de inibidor, e as demais a concentrações crescentes do mesmo.

Figura 27. Gráfico de duplo-recíproco para o inibidor **3**.

Figura 28. Gráfico de duplo-recíproco para o inibidor **10**.

Figura 29. Gráfico de duplo-recíproco para o inibidor 17.

Figura 30. Gráfico de duplo-recíproco para o inibidor 22.

Figura 31. Gráfico de duplo-recíproco para o inibidor 35.

Figura 32. Gráfico de duplo-recíproco para o inibidor 42.

Figura 33. Gráfico de duplo-recíproco para o inibidor 45.

Figura 34. Gráfico de duplo-recíproco para o inibidor 47.

Figura 35. Gráfico de duplo-recíproco para o inibidor **48**.

Figura 36. Gráfico de duplo-recíproco para o inibidor **55**.

Todos os inibidores pertencentes à classe das 9-deazaguaninas apresentam comportamento característico de mecanismo competitivo em relação ao substrato inosina (representado por [INO] no eixo x), como demonstram os gráficos de duplo-recíproco ($1/v_0$ vs $1/[INO]$). Este comportamento confirma uma tendência clara, uma vez que estes inibidores foram planejados com base no substrato natural, mimetizando assim seu padrão de ligação no processo de reconhecimento molecular no sítio de ligação.

No caso das 4-tioxo-2-tiazolidinas, porém, a determinação do mecanismo de ação permitiu o entendimento do modo de ligação e dos padrões de reconhecimento molecular na enzima-alvo. O fato de ser uma classe química nova para a enzima PNP e por estes inibidores não serem análogos da inosina, o conhecimento do mecanismo de ação tornou-se de vital importância. Desta maneira, de acordo com os gráficos das Figuras 27, 28 e 29 podemos verificar que estes inibidores (3, 10 e 17) atuam por um mecanismo de ação do tipo competitivo, ou seja, competem pelo sítio de ligação com a inosina em condições de equilíbrio, de forma mútua e exclusiva.

4.7. Estudos Estruturais de Complexos Enzima-Inibidor

Dois complexos do tipo E•I com a enzima PNP de *S. mansoni* foram obtidos nesta dissertação, sendo um com o inibidor 35 e o outro com o inibidor 55 (imucilina H) (Tabela 2). Os cristais foram obtidos em nossos laboratórios empregando-se a técnica de *soaking*. O complexo obtido com o inibidor 35 foi testado e submetido à difração de raios-X na linha MX-2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron em Campinas-SP, apresentando resolução de 2,3 Å. O cristal do complexo PNP-imucilina H foi coletado na linha MX-1, com alta resolução (1,8 Å). Em ambos os casos 100 imagens foram coletadas com intervalo de rotação

de 1°. A Figura 37 ilustra a interface do programa MOSFLM usada para o processamento de imagens cristalográficas e identificação das reflexões observadas.

Figura 37. Reflexões obtidas na difração de raios-X, visualizadas na interface do programa MOSFLM.

Devido à simetria dos cristais, do grupo $P2_12_12_1$, a coleta de imagens durante 90° garante que todo o cristal seja coberto. Logo, 100 imagens (a 1° cada uma) fornecem ao conjunto uma completeza satisfatória. A Tabela 6 apresenta os resultados da coleta de dados.

Tabela 6. Resultados do processo de coleta de dados e refinamento dos conjuntos de dados obtidos.

Parâmetros de Coleta de Dados	Inibidor 35	Inibidor 55
Grupo Espacial	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
Dimensões da Cella (Å)	49,38/132,98/119,11	47,16/117,38/129,54
Detector	Marmosaic 225	Marccd 165

Parâmetros de Coleta de Dados	Inibidor 35	Inibidor 55
Fonte de Raios-X	LNLS MX-2	LNLS MX-1
Comprimento de Onda (Å)	1,43	1,43
Faixa de Resolução (Å)	49,39-2,30	37,45-1,84
Redundância	3,8 (3,9)	5,0 (4,9)
R_{meas} (%)	11 (56,7)	5,8 (27,5)
R_{sym} (%)	9,3 (48,6)	2,6 (12,2)
Completeza (%)	99,8 (99,8)	99,4 (98,6)
Reflexões Totais	135833 (19998)	316057 (44224)
Reflexões Únicas	35710 (5135)	62601 (8937)
I/σI	11,4 (3,4)	19,2 (5,1)
Parâmetros de Refinamento		
R (%)	20,1	17,6
R_{Free} (%)	25,9	22,3
Gráfico de Ramachandran		
Reg. Altamente Favorecidas (%)	91,8	91,4
Nº de Resíduos em Regiões Desfavorecidas	5	5
B-fator Geral (proteína) (Å²)	36	23,2
B-fator Médio (inibidor)	61,6	16,9
Nº de Átomos na Proteína	6368	6272
Nº de Moléculas de Água	348	676
Nº de Átomos em Ligantes	81	92
R.M.S. Comp. de Ligação (Å)	0,008	0,011
R.M.S. Ângulos de Ligação (°)	1,063	1,493

Os dois conjuntos de dados foram obtidos em alta resolução, o que permite um refinamento mais preciso. No caso do cristal obtido com o inibidor 55, a elevada resolução do conjunto de dados permitiu o refinamento até um R de 17,6% e R_{Free} de 22,3%. O desvio destes valores ($R - R_{Free} = 4,7\%$) reflete a boa qualidade dos dados, bem como o seu refinamento adequado. O conjunto obtido com o inibidor 35 resultou em um R de 20,1% e

R_{Free} de 25,9%. Mesmo com menor robustez estatística ($R - R_{\text{Free}} = 5,8\%$), o conjunto possui também informação de elevada qualidade, garantindo assim um modelo consistente ao final.

Os mapas de densidade eletrônica gerados através do processamento são de ótima qualidade, favorecendo o ajuste das cadeias laterais da proteína de maneira bastante eficiente. A densidade do ligante é também visualizada com bastante clareza, mostrando que o mesmo encontra-se de fato ligado ao sítio através das interações a serem discutidas no item 8 (modelagem molecular). A Figura 38 mostra a estrutura do sítio ativo da PNP obtida por substituição molecular localizada dentro do mapa de densidade eletrônica.

Figura 38. Estrutura da PNP (região do sítio ativo) ajustada dentro do mapa de densidade eletrônica (verde) para os complexos obtidos com os inibidores **55** (A) e **35** (B).

Os dois complexos são inéditos, representando os primeiros conjuntos de dados para inibidores potentes em complexo com enzima PNP de *S. mansoni*.

4.8. Modelagem Molecular

Nesta dissertação foram realizados estudos de modelagem molecular empregando-se o programa FlexX para os trabalhos de docagem molecular. Primeiramente, a docagem do conjunto das 9-deazaguaninas foi efetuado, a fim de se validar os modelos, uma vez que obtivemos duas estruturas cristalográficas em complexo com inibidores deste conjunto em complexo com a enzima.

Estas estruturas permitiram uma análise comparativa entre a posição real do inibidor dentro do sítio, fornecida pelos mapas de densidade eletrônica observados na difração, e a posição sugerida pela docagem para todo o conjunto. A Figura 39 mostra os resultados de docagem molecular, e o mapa de densidade eletrônica obtido a partir do cristal.

Figura 39. Comparativo entre os resultados de docagem e de cristalografia para inibidor **35**.

Através da Figura 39, é possível notar que o modelo de docagem gerado é capaz de inferir com precisão o modo de ligação desta classe de moléculas no sítio ativo da PNP de *S. mansoni*. Outra informação que reforça a robustez desse modelo é a sua capacidade de reconhecer o anel purínico como sendo a porção responsável pelas interações com os resíduos

do sítio ativo, reforçada pelo alinhamento desta porção para 42 das 45 moléculas do conjunto, ao passo que os substituintes da posição 9 assumem conformações distintas. A Figura 40 mostra o alinhamento obtido para todas as moléculas do conjunto.

Figura 40. Alinhamento obtido para as moléculas do conjunto das 9-deazaguaninas.

Através do alinhamento obtido, é possível concluir que os resíduos GLU 203 e ASN 245 são os responsáveis pelo reconhecimento do anel purínico. As distâncias encontradas entre as moléculas de inibidor e estes resíduos sugerem a existência de interações intermoleculares importantes para o reconhecimento molecular. A Figura 41 mostra o resultado da docagem para o inibidor **35**, destacando as distâncias encontradas dentro do ambiente químico do mesmo.

Figura 41. Distâncias interatômicas encontradas no ambiente químico do sítio ativo, em ângstrons (Å), para o inibidor 35 (somente a porção do anel purínico é mostrada).

As distâncias encontradas (em torno de 3 Å), bem como os caracteres dos átomos em questão sugerem que seis ligações de hidrogênio são formadas no reconhecimento, envolvendo uma molécula de água que participa destas ligações, conferindo grande estabilidade ao inibidor na cavidade de ligação no sítio ativo.

Além do considerável número de interações eletrostáticas dentro do sítio ativo, os inibidores deste conjunto possuem boas interações estéreas com os resíduos do mesmo. A ferramenta DrugScore Online é bastante útil para ilustrar esta ocupação, como mostra a Figura 42.

Figura 42. Análise de ocupação estérica através do DrugScore Online para os inibidores **47** (A), e **35** (B). As esferas azuis referem-se a interações estéricas positivas.

No caso dos inibidores mostrados na Figura 42, o raio das esferas (maiores) reforça que a ocupação do sítio pela porção do anel purínico é bastante favorável, contribuindo significativamente para a potência dos mesmos ($IC_{50} = 100$ nM (A) e 800 nM (B)). Estas interações são, juntamente com as ligações de hidrogênio, as responsáveis pela atividade pronunciada deste conjunto.

Contudo, a grande variação de potência dentro da série (fator de potência da ordem de 4500 vezes) não se justifica através das interações dentro do sítio, uma vez que para todos os inibidores, são formadas as mesmas ligações. Para compreender essa variação estudou-se as interações entre a porção substituinte da posição 9 (variável estrutural) e a estrutura da proteína. Os substituintes são alocados quase sempre na parte externa do sítio ativo, onde uma grande superfície hidrofóbica é formada principalmente através da contribuição do resíduo PHE161 pertencente ao monômero vizinho. A Figura 43 mostra a região externa ao sítio, bem como os grupos substituintes de alguns inibidores.

Figura 43. Superfície hidrofóbica localizada na entrada do sítio ativo da PNP, criada pela presença do resíduo PHE 161 (destacado na figura).

Inibidores com substituintes hidrofóbicos na posição 9 do anel purínico encontram um ambiente favorável, o que resulta em uma melhor interação com a estrutura protéica, refletindo em maior potência (A, $IC_{50} = 500$ nM e B, $IC_{50} = 100$ nM). Por outro lado, inibidores com substituintes hidrofílicos (C, $IC_{50} = 47$ μ M e D, $IC_{50} = 171$ μ M), tendem a realizar menos interações com essa região. Os compostos com grupos hidrofílicos tendem a apresentar menor potência do que aqueles contendo substituintes alifáticos, e principalmente aromáticos (hidrofóbicos) na posição 9.

Contudo, grupos hidrofílicos na posição 9 do anel favorecem uma maior seletividade para a enzima do parasita, como mostra a Tabela 4. Através dos estudos de docagem empregando-se a enzima humana, pôde-se encontrar as causas dessa seletividade através de diferenças observadas no sítio ativo das duas isoformas da enzima. Um dos resíduos pertencentes ao sítio é a TYR 202, que não é encontrado na enzima humana, sendo substituído pelo resíduo PHE 200. A Figura 44 mostra um inibidor contendo substituinte hidrofílico alocado nos sítios da PNP humana e de *S. mansoni*.

Figura 44. Resultado da docagem para o inibidor **52** (formicina B), seletivo em mais de 6 vezes para a enzima do parasita, nas enzimas de *S. mansoni* (A) e humana (B).

A presença do resíduo TYR 202 no sítio ativo da PNP de *S. mansoni* permite a formação de uma ligação de hidrogênio extra entre a proteína e o substituinte ribose da formicina B. Na enzima humana, contudo, a presença de uma fenilalanina no mesmo lugar impossibilita esta ligação. O resultado disso é uma menor estabilização do inibidor e conseqüentemente uma menor afinidade do mesmo pelo sítio. Essa informação, aliada aos estudos de atividade e mecanismo deve servir de base, no futuro para a proposição de novas moléculas, com potência biológica incrementada, e satisfatória seletividade, a fim de

responderem melhor nas etapas de testes clínicos, onde se deseja o máximo de atividade aliado à menor agressividade possível às vias metabólicas do hospedeiro.

Os padrões de validação do modelo de docagem molecular foram de extrema importância em estudos subsequentes com os inibidores da série das 4-tioxo-2-tiazolidinas foram estudados a fim de se procurar razões estruturais para a atividade observada. Inicialmente, o composto mais potente da série (**17**, $IC_{50} = 12,4 \mu M$, Tabela 3) foi submetido à docagem com auxílio do programa FlexX. O resultado é mostrado na Figura 45.

Figura 45. Docagem do composto **17**, mostrando as distâncias interatômicas (em Å) encontradas no ambiente químico do sítio ativo.

As distâncias observadas no sítio ativo sugerem a formação de três ligações de hidrogênio entre o inibidor e os resíduos GLU 203 e ASN 245, mostrando que os mesmos são

responsáveis pelo reconhecimento desta série, analogamente às 9-deazaguaninas. Este fato é reforçado pelo alinhamento observado para 7 dos 10 inibidores da série, mostrado na Figura 46.

Figura 46. Alinhamento das 4-tioxo-2-tiazolidinas no sítio da PNP, mostrando que a mesma porção das moléculas é reconhecida pelo sítio.

Novamente, a utilização do servidor DrugScore Online demonstrou a importância das interações estéreas das moléculas bioativas na manutenção do complexo E•I, como mostra a Figura 47.

Figura 47. Interações estéreas para o inibidor **17**. As esferas azuis maiores sobre o heterociclo demonstram uma boa ocupação do sítio pelo inibidor. A esfera vermelha representa a única interação espacial desfavorável para este composto.

A boa ocupação do sítio ativo por estas moléculas, aliada às interações eletrostáticas (ligações de hidrogênio) forneceu um bom entendimento da potência relativa observadas para esta série. Porém, o menor número de ligações de hidrogênio observadas em relação às 9-deazaguaninas, além da ausência de interações com a parte hidrofóbica externa ao sítio podem ser a causa da menor atividade em relação àquela série de compostos.

5. CONCLUSÕES

- ✓ As condições de expressão, purificação e estoque da PNP de *S. mansoni* foram otimizadas, a partir de protocolos previamente descritos, assegurando quantidades de enzima e estabilidade apreciáveis para o desenvolvimento da parte cinética do trabalho.
- ✓ A padronização e validação dos bioensaios permitiram a determinação da constante de Michaelis-Menten para a inosina, bem como a avaliação de um grande conjunto de moléculas através de triagem bioquímica, resultando na identificação e seleção de novos inibidores da PNP.
- ✓ Os novos inibidores da classe 4-tioxo-2-tiazolidinas, bem como os análogos da inosina (9-deazaguaninas) tiveram sua potência, seletividade, afinidade e mecanismo de ação determinados, constituindo uma sólida base de dados cinéticos para um conjunto consideravelmente diverso de inibidores desta enzima.
- ✓ Estudos de modelagem molecular e cristalografia foram de enorme utilidade no entendimento das interações intermoleculares predominantes nos complexos E•I, caracterizando importante informação no processo de planejamento de inibidores enzimáticos candidatos a novos fármacos.
- ✓ A vasta quantidade de informação gerada é inédita para a enzima-alvo do parasita, constituindo uma grande contribuição científica em química medicinal do presente trabalho de dissertação de mestrado.

6. SUGESTÕES E PERSPECTIVAS

Este trabalho de dissertação de mestrado possui a característica de envolver dados experimentais desde a expressão e purificação da PNP de *S. mansoni* até os estudos de modelagem molecular auxiliados por estudos estruturais, passando por toda a caracterização cinética pertinente à enzima do parasita, incluindo dados inéditos de inibição para a mesma. Uma nova classe de inibidores foi identificada, constituindo assim uma promissora ferramenta para a proposição de novos inibidores mais potentes e seletivos, uma vez que vem acrescentar novas características químico-estruturais à compreensão dos mecanismos de inibição da PNP de *S. mansoni*.

Modificações químicas na classe das 4-tioxo-2-tiazolidinas, como a extensão e/ou aumento dos substituintes, podem conferir maior potência à série, tornando-a ainda mais interessante na busca por novos inibidores candidatos a fármacos.

A síntese de novos inibidores para esta enzima pode então partir das informações fornecidas pelos estudos de potência e seletividade das 9-deazaguaninas, procurando aliar as características que notadamente contribuem para o aumento da potência àquelas que proporcionam seletividade para o alvo do parasita.

Finalmente, as moléculas mais promissoras resultantes desta nova etapa deverão ser avaliadas contra a cultura do parasita, a fim de comprovar sua eficácia como inibidores da PNP, tendo paralelamente sua toxicidade avaliada nos estudos clínicos apropriados.

REFERÊNCIAS

1. ANDRICOPULO, A. D.; MONTANARI, C. A. structure-activity relationships for the design of small-molecule inhibitors. *Mini Rev. Med. Chem.*, v. 5, p. 585-593, 2005.
2. YAGO, G.; AMRAM, M.; MAGULA, T. Financial innovations for funding early-stage. *Drug Discov. Dev.*, v. 12, p. 22-28, 2006.
3. PFIZER, INC. *Princípios básicos da farmacoeconomia*. Disponível em: <<http://www.pfizer.com.br/pdf/farmacoeconomia.pdf>>. Acesso em 20 de fevereiro de 2008.
4. AGNEW, B. When pharma merges, R&D is the dowry. *Science*, v. 287, p. 1952-1953, 2000.
5. COHEN, F. J. Macro trends in pharmaceutical innovation. *Nat. Rev. Drug Discov.*, v. 4, p. 78-84, 2005.
6. COUZIN, J. Brains behind blockbuster. *Science*, v. 309, p. 728-730, 2005.
7. BERNDT, E. R. et al. Industry funding of FDA: Effects of PDUFA on approval times and withdrawal rates. *Nat. Rev. Drug Discov.*, v. 4, p. 545-554, 2005.
8. LOMBARDINO, J. G.; LOWE III, J. A. The role of the medicinal chemist in drug discovery – then and now. *Nat. Rev. Drug Discov.*, v. 3, p. 853-862, 2004.
9. DIMASI, J. A.; HANSEN, R. W.; GRABOWSKI, H. G. The price of innovation: new estimates of drug development cost. *J. Health Econom.*, v. 22, p. 151-185, 2003.
10. DICKSON, M.; GAGNON, J. P. Key factors in the rising cost of new drug discovery and development. *Nat. Rev. Drug Discov.*, v. 5, p. 417-429, 2004.
11. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Schistosomiasis fact sheet*. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>>. Acesso em: 20 de fevereiro de 2008.
12. SILVEIRA, N. J. F. et al. W. F. Structural bioinformatics study of PNP from *Schistosoma mansoni*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 322, p. 100-104, 2004.
13. HOPKINS, A. J.; WITTY, M. J.; NWAKA, S. Mission Possible. *Nature*, v. 449, p. 166-169, 2007.
14. HIRST, S.I.; STAPLEY, L.A. Parasitology: the dawn of a new millennium. *Parasitology Today*, v. 16, p. 1-3, 2000.

15. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Control of Neglected Tropical Diseases (NTD)*. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/en/>. Acesso em: 19 de fevereiro de 2008.
16. URBINA, J.A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol.*, v. 19, p. 495-501, 2003.
17. THE CARTER CENTER. *The Carter Center Schistosomiasis Control Program*. Disponível em: <www.cartercenter.org/health/schistosomiasis/>. Acesso em: 19 de fevereiro de 2008.
18. WOLRD HEALTH ORGANIZATION. *Preventive chemotherapy in human helminthiasis*. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/schistosomiasis/en/>>. Acesso em: 20 de fevereiro de 2008.
19. CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Travelers' Health: Yellow Book*. Chapter 4: Schistosomiasis. Disponível em: wwwn.cdc.gov/travel/yelllowBookCh4-Schistosomiasis. Acesso em 19 de fevereiro de 2008.
20. CENTER FOR DISEASE CONTROL & PREVENTION – DIVISION OF PARASITIC DISEASES. *Schistosomiasis facts*. Disponível em <<http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/>>. Acesso em: 17 de fevereiro de 2008.
21. REIS, E. A. G. et al. Biochemical and immunologic predictors of efficacy of treatment or reinfection risk for *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 75, p. 904–909, 2005.
22. GRYSEELS, B. et al. Are poor responses to praziquantel for the treatment of *Schistosoma mansoni* infections in Senegal due to resistance? An overview of the evidence., *Trop. Med. Int. Health*, v. 6, p. 864-873, 2006.
23. LIANG, Y.S. et al. Biological characteristics of praziquantel-resistant and – susceptible isolates of *Schistosoma mansoni*., *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 95, p. 715-723, 2001.
24. PEREIRA, H. M. et al. Cloning, expression and preliminary crystallographic studies of the potential drug target purine nucleoside phosphorylase from *Schistosoma mansoni*. *Acta Crystallographica Section D*, v. D59, p. 1096-1099, 2003.
25. CRABTREE G.W.; SENFT A.W. Pathways of nucleoside metabolism in *schistosoma mansoni*. V. adenosine cleavage enzyme and effects of purine analogues on adenosine metabolism *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.*, v. 23, p. 649-660, 1974.
26. GHÉRARDI, A.; SARCIRON, M. A. Molecules targeting the purine salvage pathway in apicomplexan parasites. *Trends in Parasitology*, v. 23, p. 384-389, 2007.
27. BZOWSKA A.; KULIKOWSKA E.; SHUGAR D. Purine nucleoside phosphorylases: properties, functions and clinical aspects. *Pharmacol. Ther.*, v. 88, p. 349-425, 2000.

28. KICSKA G.A. et al. Purine-less death in *Plasmodium falciparum* induced by immucillin-H, a transition state analogue of purine nucleoside phosphorylase. *J. Biol. Chem.*, v. 277, p. 3226-3231, 2002.
29. MAO, C. et al. Calf spleen purine nucleoside phosphorylase complexed with substrates and substrate analogues. *Biochemistry*, v. 37, p. 7135-7146, 1998.
30. LUIC, M. et al. Calf spleen purine nucleoside phosphorylase: structure of its ternary complex with an N(7)-acycloguanosine inhibitor and a phosphate anion. *Acta Cryst.*, v. D57, p. 30-36, 2001.
31. PEREIRA, H. M. et al. Structures for the potential drug target purine nucleoside phosphorylase from *Schistosoma mansoni* causal agent of schistosomiasis. *J. Mol. Biol.*, v. 353, p. 584–599, 2005.
32. COPELAND, R. A. *Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery: a guide for medicinal chemists and pharmacologists*, New Jersey: Wiley & Sons, 2005.
33. SHOKHEN, M.; KHAZANOV, N.; ALBECK, A. Enzyme isoselective inhibitors: application to drug design. *ChemMedChem*, v. 1, p. 639-643, 2006.
34. SYKES, N. O.; MACDONALD, S. J. F.; PAGE, M. I. Acylating agents as enzyme inhibitors and understanding their reactivity for drug design. *J. Med. Chem.*, v. 45, p. 2850-2856, 2002.
35. FIORE, A. et al. Carbonic anhydrase inhibitors: Binding of an antiglaucoma glycosyl-sulfanilamide derivative to human isoform II and its consequences for the drug design of enzyme inhibitors incorporating sugar moieties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 17, p. 1726–1731, 2007.
36. BENNETT JR, L. L. et al. Purine nucleoside phosphorylase – biochemical and pharmacological studies with 9-benzyl-9-deazaguanine and related-compounds. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* v. 266, p. 707-714, 1993.
37. GIBLETT, E. R. et al. Nucleoside-phosphorylase deficiency in a child with severely defective T-cell immunity and normal B-cell immunity. *Lancet*, v. i, p. 1010-1013, 1975.
38. MARKERT, M. L. Purine nucleoside phosphorylase deficiency. *Immun. Rev.*, v. 3, p. 45-81, 1991.
39. SHEEN, M. R.; KIM, B., K.; PARKS, R. E. Purine nucleoside phosphorylase from human erythrocytes. III. Inhibition by the inosine analog formycin B of the isolated enzyme and of nucleoside metabolism in intact erythrocytes. *Mol. Pharmacol.* v. 4, p. 293-299, 1968.
40. MONTGOMERY, J. A. Inhibitors of purine nucleoside phosphorylase. *Exp. Opin. Invest. Drugs*, v. 3, p. 1303-1313, 1994.

41. STOECKLER, J. D. et al. Inhibitors of purine nucleoside phosphorylase C(8) and C(5') substitutions. *Biochemical Pharmacology*, v. 31, p. 163-171, 1982.
42. STOECKLER, J. D. *Purine nucleoside phosphorylase: a target for chemotherapy*. Developments in Cancer Chemotherapy. Boca Raton: RC Press, 1984. p. 35-60.
43. MONTGOMERY, J. A. Structure-based drug design: inhibitors of purine nucleoside phosphorylase. *Drug Des. Discov.*, v. 11, p. 289-305, 1994.
44. MORRIS, P. E.; MONTGOMERY, J. A. Inhibitors of the enzyme purine nucleoside phosphorylase. *Exp. Opin. Ther. Pat.*, v. 8, p. 283-299, 1998.
45. GUIDA, W. C. et al. Structure-based design of inhibitors of purine nucleoside phosphorylase. 4. A study of phosphate mimics. *J. Med. Chem.*, v. 37, p. 1109-1114, 1994.
46. DONG, M. D. et al. The biochemistry and pharmacology of PD 116124 (8-amino-2'-nordeoxyguanosine), an inhibitor of purine nucleoside phosphorylase (PNP). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 260, p. 319-326, 1992.
47. ANDRICOPULO, A. D.; YUNES, R. A. Structure-activity relationships for a collection of structurally diverse inhibitors of purine nucleoside phosphorylase. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 49, p. 10-17, 2001.
48. ERION, M. D. et al. Structure-based design of inhibitors of purine nucleoside phosphorylase. 3. 9-Arylmethyl derivatives of 9-deazaguanine substituted on the methylene group. *J. Med. Chem.*, v. 36, p. 3771-3783, 1993.
49. MILES, R. W. et al. One-third-the-sites transition-state inhibitors for purine nucleoside phosphorylase. *Biochemistry*, v. 37, p. 8615-8621, 1998.
50. BANTIA, S. et al. Purine nucleoside phosphorylase inhibitor BCX-1777 (Immucillin-H) - a novel potent and orally active immunosuppressive agent. *International Immunopharmacology*. v.1, p. 1199-1210, 2001.
51. EVANS, G. B. et al. Synthesis of second-generation transition state analogues of human purine nucleoside phosphorylase. *J. Med. Chem.*, v. 46, p. 5271-5276, 2003.
52. EVANS, G. B. et al. Exploring structure-activity relationships of transition state analogues of human purine nucleoside phosphorylase. *J. Med. Chem.*, v. 46, p. 3412-3423, 2003.
53. LEWANDOWICZ, A. et al. Achieving the ultimate physiological goal in transition state analogue inhibitors for purine nucleoside phosphorylase. *J. Biol. Chem.*, v. 278, p. 31465-31468, 2003.
54. PEREIRA, H. M. Estudos da enzima purina nucleosideo fosforilase de *Schistosoma mansoni*. 1999. 127 f. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1999.

55. NIWAS, S. et al. Structure-based design of inhibitors of purine nucleoside phosphorylase. 5. 9-Deazahypoxanthines. *J. Med. Chem.*, v. 37, p. 2477-2480, 1994.
56. FARUTIN, V. et al. Structure-activity relationships for a class of inhibitors of purine nucleoside phosphorylase. *J. Med. Chem.*, v. 42, p. 2422-2431, 1999.
57. TUTTLE, J. V.; KRENITSKY, T. A. Effects of acyclovir and its metabolites on purine nucleoside phosphorylase. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 259, p. 4065-4069, 1984.
58. KELLEY, J. L. et al. [(Guaninylalkyl)phosphinicolmethyl]phosphonic acids multisubstrate analogue inhibitors of human erythrocyte purine nucleoside phosphorylase. *J. Med. Chem.*, v. 38, p. 1005-1014, 1995.
59. CASTILHO, M. S. et al. Bi- and three dimensional quantitative structureactivity relationships for a series of purine nucleoside phosphorylase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. v. 14, p. 516-527, 2006.
60. SECRIST III, J. A. et al. Structure-based design of inhibitors of purine nucleoside phosphorylase. 2. 9-allycyclic and 9-heteroallycyclic derivatives of 9-deazaguanine . *J. Med. Chem.*, v. 36, p. 1847-1854, 1993.
61. MONTGOMERY, J. A. et al. Structure-based design of inhibitors of purine nucleoside phosphorylase. 1. 9-(Arylmethyl) derivatives of 9-deazaguanine. *J. Med. Chem.*, v. 36, p. 55-69, 1993.
62. POWELL, H. R. The rossmann fourier autoindexing algorithm in MOSFLM. *Acta Cryst.*, v. D55, p. 1690-1695, 1999.
63. COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, NUMBER 4. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Cryst.*, v. Dr0, p. 760-763, 1994.
64. ADAMS, P. D. et al. PHENIX: building new software for automatedcrystallographic structure determination. *Acta Cryst.*, v. D58, p. 1948-1954, 2002.
65. EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D*, v. 60, p. 2126-2132, 2004.
66. RAREY, M. et al. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *J. Mol. Biol.*, v. 261, p. 470-489, 1996.
67. DELANO, W.L. *The PyMOL molecular graphics system*. San Carlos: DeLano Scientific, 2002.
68. VELEC, H. F. G.; GOHLKE, H.; KLEBE, G. DrugScore^{CSD} knowledge-based scoring function derived from small molecule crystal data with superior recognition rate of near-native ligand poses and better affinity prediction. *J. Med. Chem.*, v. 48, p. 6296-6303, 2005.