UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

FERNANDO VASCONCELOS MALUF

Estudos estruturais e de química medicinal aplicados às enzimas da via glicolítica de protozoários: enolase de *Plasmodium falciparum* e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi*

São Carlos
2015

FERNANDO VASCONCELOS MALUF

Estudos estruturais e de química medicinal aplicados às enzimas da via glicolítica de protozoários: enolase de *Plasmodium falciparum* e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Rafael V. C. Guido
Co-orientador: Prof. Dr. Glaucius Oliva

Versão corrigida
(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2015

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 do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Vasconcelos Maluf, Fernando

Estudos estruturais e de química medicinal aplicados às enzimas da via glicolítica de protozoários: enolase de Plasmodium falciparum e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de Trypanosoma cruzi / Fernando Vasconcelos Maluf; orientador Rafael Victorio Carvalho Guido; co-orientador Glaucius Oliva - versão corrigida -- São Carlos, 2015.

153 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2015.

1. Via Glicolítica. 2. Biologia Estrutural. 3. Modelagem Molecular. 4. Inibidor Enzimático. I. Victorio Carvalho Guido, Rafael, orient. II. Oliva, Glaucius, co orient. III. Título.

Ao poeta e escritor Fernando Vasconcelos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo suporte e orientação para que todos os objetivos fossem alcançados e fases superadas.

À família, que sempre me fortaleceu mesmo à distância.

À Fernanda, pelo crescimento pessoal e carinho durante estes últimos anos e especial paciência durante a fase de escrita.

Ao Prof. Glaucius Oliva, pela acolhida ao IFSC e por ser um grande modelo de inspiração para ciência brasileira.

Ao Prof. Rafael V. C. Guido, pela orientação e especialmente amizade desenvolvida ao longo desta jornada. Sabemos que não foi fácil.

Ao Prof. Richard C. Garratt, pelo modelo de professor brilhante.

À Prof. Célia R. S. Garcia, por todas as oportunidades de trabalho conjunto e colaborações frutíferas estabelecidas.

À Maria Amélia e Fábio Dotta, parceiros deste momento louco e empreendedor de nossas vidas.

Ao Dr. José Fernando Ruggiero Bachega, pela grande amizade e trabalhos conjuntos desenvolvidos até hoje.

Aos amigos que fiz durante esta jornada, em especial, Gustavo Lima (Udinho), Renata Bueno (Rena) e Andrew (Bisco), por mostrarem a importância de um grupo unido e tornarem todos os dias mais agradáveis. A todos os colegas de trabalho do grupo de Cristalografia e Biofísica.

Aos técnicos e funcionários do IFSC, em especial a Dra. Susana Andrea, Dr. Humberto D'Muniz e Me. Andressa Alves por toda a ajuda prestada.

Ao pessoal da Secretaria, Fernando e Luciana, e do Serviço de Pós-Graduação, Silvio, Ricardo e Patrícia.

Aos funcionários da biblioteca do IFSC, especialmente, a Neusa e Cristina pela rápida e calma assessoria para o depósito desta tese.

Ao LNLS pela disponibilização das linhas de luz para o desenvolvimento do trabalho estrutural.

À FAPESP pela concessão da bolsa de doutorado e apoio financeiro de oportunidades científicas memoráveis.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que esse projeto se tornasse realidade, meu sincero muito obrigado!

***“Só se pode alcançar um grande êxito quando
nos mantemos fiéis a nós mesmos.”***
Friedrich Nietzsche

RESUMO

MALUF, F. V. **Estudos estruturais e de química medicinal aplicados às enzimas da via glicolítica de protozoários: enolase de *Plasmodium falciparum* e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi*.** 2015. 151 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Carlos, São Carlos, 2015.

A melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos e farmacológicos aliados a métodos modernos de investigação tornaram possível a descoberta e o desenvolvimento de fármacos para diversas doenças e disfunções orgânicas em humanos. Os fármacos desenvolvidos atualmente são resultados de intensos esforços em pesquisa por equipes multidisciplinares, impactando diretamente na qualidade de vida das diversas populações no mundo. Nesse cenário, os grupos de pesquisas estabelecidos em Universidades com foco no planejamento de fármacos para doenças tropicais têm crescido. A Malária e a Doença de Chagas figuram com especial importância, a primeira pela expressiva mortalidade mundial, enquanto a segunda pela morbidade e seus impactos na população brasileira. O tratamento de ambas possui limitações que se agravam, seja pelo baixo número de opções terapêuticas, ou pelo desenvolvimento de cepas resistentes. As enzimas investigadas nesse doutoramento, enolase (*Pf*Enolase) de *Plasmodium falciparum* e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi* (*Tc*GAPDH), são componentes da via glicolítica destes parasitas e são considerados alvos moleculares atrativos para o desenvolvimento de inibidores enzimáticos, dada a importância destas enzimas no processo de obtenção de energia do parasita. Os estudos fundamentam-se na busca por modulação seletiva da atividade biológica dos alvos selecionados através do desenvolvimento de novas moléculas bioativas. O estabelecimento de protocolo de expressão e purificação para enzima *Pf*enolase permitiu sua obtenção em quantidade e pureza suficiente para condução de estudos cinéticos e de triagem biológica, com a identificação de cinco novas classes químicas bastante promissoras; além de ensaios de cristalização, que culminaram na determinação da enzima em diversos complexos cristalográficos. Os dados estruturais produzidos foram fundamentais para condução da abordagem computacional de triagem virtual, que permitiu a identificação de 31 moléculas candidatas a inibidoras de *Pf*enolase. Avanços significativos foram obtidos também com a enzima *Tc*GAPDH, destacando-se as adaptações nos processos de obtenção da proteína recombinante e ensaio cinético, condução de ensaio de bioprospecção orientada com a identificação e caracterização da molécula isolada (tilirosídeo). Novas condições de cristalização foram identificadas e poderão ser empregadas no processo de obtenção de complexos cristalográficos futuros. Adicionalmente, desenvolveu-se uma ferramenta computacional, Kinecteasy, para processamento automatizado dos dados produzidos das etapas de triagem biológica. Os trabalhos integrados de biologia estrutural e química medicinal desenvolvidos contribuem significativamente para o avanço no processo de planejamento de novos inibidores para as enzimas selecionadas.

Palavras-chaves: Glicólise. Biologia estrutural. Modelagem molecular. Inibidor enzimático

ABSTRACT

MALUF, F. V. **Structural studies and medicinal chemistry on glycolysis pathway of protozoan enzymes:** enolase from *Plasmodium falciparum* and glyceraldehyde-3-phosphate from *Trypanosoma cruzi*. 2015. 151 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Carlos, São Carlos, 2015.

A better understanding of the pathophysiological and pharmacological mechanisms together with the modern research methods made possible the discovery and development of drugs for several humans' diseases. The drugs currently developed are the result of intense efforts in research of multidisciplinary teams having as a direct consequence a remarkable impact on life quality of populations all over the world. In this scenario, research groups established at universities, with their focus on drug development for tropical diseases, are increasing. Malaria and Chagas disease deserve special attention, the former by the expressive world mortality, while the second by the morbidity and its impact on Brazilian population. Treatment for both has limitations, whether by the low number of therapeutic options, or by development of resistance. The target enzymes for this PhD project, enolase (*Pf*Enolase) of *Plasmodium falciparum* and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi* (*Tc*GAPDH), are essential components of glycolytic pathway and therefore related to the parasite energy production, thus, are considered attractive molecular targets for enzyme inhibitors development. Essentially, the proposed studies seek selective modulation of the target's biological activity through the development of new bioactive molecules. The expression and purification protocols developed for *Pf*enolase have allowed us to obtain recombinant protein at suitable yield and purity for conducting screening assays, which has revealed five new chemical classes as *Pf*enolase inhibitors. Crystallization experiments were successfully conducted and 3D structure were determined for different complexes. Structural data was essential for performing the computational approach of virtual screening, which has allowed us to identify 31 inhibitor candidates for *Pf*enolase. Significant advances were obtained with *Tc*GAPDH, highlighting the adaptations on recombinant protein protocol and kinetic assay. Assay-guided bioprospecting experiments were successfully performed with identification and characterization of isolated inhibitor (tiliroside). New crystallization conditions were identified and will be employed in future co-crystallization and soaking studies. Additionally, Kinecteasy, a computational tool, were developed for automated data processing of biological screening assays. The structure and medicinal chemistry studies presented here contribute significantly in the process of drug development for the selected enzymes.

Keywords: Glycolysis. Structural biology. Molecular modeling. Enzyme inhibitor

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1 - Número de NMEs aprovadas pelo FDA no período de 2005-2014.....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 2 – Número acumulado de NMEs de três grandes indústrias farmacêuticas, na qual pode-se evidenciar a tendência linear no incremento das NMEs lançadas no mercado ao longo dos anos (1950-2007).</i>	<i>30</i>
<i>Figura 3 - Distribuição geográfica da malária no mundo.....</i>	<i>33</i>
<i>Figura 4 - Estrutura química da cloroquina (A) e artemisinina (B).</i>	<i>34</i>
<i>Figura 5 - (A) Reação enzimática catalisada pela enolase. (B) Estrutura 3D representativa da enzima enolase. (C) Sobreposição do sítio catalítico da enolase em complexo com o substrato 2-fosfoglicerato (2-PG, amarelo) e o produto fosfoenolpiruvato (PEP, roxo).</i>	<i>35</i>
<i>Figura 6 - Estrutura química do benznidazol (A) e nifurtimox (B).</i>	<i>36</i>
<i>Figura 7 - Reação catalisada pela enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH).</i>	<i>37</i>
<i>Figura 8 - Estrutura cristalográfica de TcGAPDH. (A) Organização espacial das quatro subunidades que compõe a forma funcional da enzima TcGAPDH. As linhas indicam os eixos de simetria de ordem 222, que relacionam as subunidades do tetrâmero. Em azul e laranja, estão destacados os domínios de ligação do substrato e de ligação ao NAD⁺, respectivamente. (B) Perfil do monômero que compõe o tetrâmero funcional da TcGAPDH.....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 9 – Condições experimentais empregadas na reação de amplificação, por reação em cadeia da polimerase (PCR), da enzima enolase de P. falciparum.</i>	<i>46</i>
<i>Figura 10 – Condições experimentais empregadas no tratamento do fragmento amplificado e vetores de expressão pETM-11/LIC, pETTrx-1a/LIC e pETNus-1a/LIC; com T4 DNA polimerase, para produção das extremidades coesivas do sistema de clonagem independente de ligação (LIC) utilizado.</i>	<i>46</i>
<i>Figura 11 – Gel de eletroforese em agarose 1%. Reação de amplificação da enzima enolase, empregando como molde o cDNA produzido com parasitas sincronizados nas fases esquizonte (EZ) e trofozoíto (TZ).</i>	<i>69</i>

Figura 12 – Gel de eletroforese em agarose 1%. Reação de PCR dos clones recombinantes para verificação da positividade das construções nos diferentes vetores de expressão.....	70
Figura 13 - Gel SDS-PAGE 15%. Perfil da expressão proteica de Pfenolase conduzida a 37 °C.	72
Figura 14 – Gel SDS-PAGE 15%. Perfil da expressão proteica de Pfenolase conduzida a 20 °C.	72
Figura 15 - Etapas cromatográficas empregadas na purificação de PfEnolase, onde E indica a fração em que a proteína de interesse foi eluída. (A) Cromatografia de afinidade - HisTrap HP 5 mL. (B) Cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-25. (C) Segundo passo de cromatografia de afinidade em HisTrap HP 5mL (D) Cromatografia de exclusão molecular em Superdex 200 16/60.	73
Figura 16 – Gel de eletroforese SDS-PAGE 15%. Etapas de purificação de PfEnolase. MK (Marcador de massa molecular), IF (Fração insolúvel), SF (Fração solúvel), FT (Fração não ligada na primeira cromatografia de afinidade), EF (Fração eluída da primeira cromatografia de afinidade), TT (Digestão com TEV protease), 2EF (Fração eluída da segunda cromatografia de afinidade) e GF (Fração eluída da cromatografia de exclusão molecular).....	74
Figura 17 - Determinação pelo método direto do parâmetro cinético K_M , por regressão não-linear, para o substrato 2-PG. Todas as medidas foram realizados em triplicata.	75
Figura 18 – (A) Esquema da reação combinada ao sistema de luciferase para monitoramento da atividade enzimática enolase. (B) Curva de velocidades iniciais obtidos pela reação acoplada ao sistema bioluminescente. Todas as medidas foram realizados em triplicata.	75
Figura 19 – Compostos da coleção Malaria Box promissores com atividade inibitória superior a 80% na concentração de 50 μ M frente a enzima Pfenolase.	78
Figura 20 - Técnicas de cristalização por difusão de vapor, gota assentada e gota suspensa, empregadas na triagem e otimização das condições de cristalização da PfEnolase, respectivamente.....	79
Figura 21 – Cristais de Pfenolase obtidos durante a fase de otimização das condições de cristalização.....	80

<i>Figura 22 – Imagem representativa do padrão de difração de raios X obtidos para os cristais de Pfenolase, obtidos na linha de luz MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS).</i>	80
<i>Figura 23 - Representação do modelo cristalográfico construído para enzima enolase de P. falciparum. Em destaque as cadeias A (vermelho) e B (verde) que compõe o homodímero cristalizado.</i>	83
<i>Figura 24 – (A) Diagrama de Ramachandran para a estrutura cristalográfica apo da Pfenolase. (B) Resíduos Arg413 outliers localizados na interface de dimerização.</i>	83
<i>Figura 25 - Distribuição de domínios da enzima Pfenolase. (A) Domínio N-terminal. (B) Domínio C-terminal.</i>	84
<i>Figura 26 - Alinhamento das sequências de aminoácidos para as enzimas enolase de P.falciparum e as três isoformas humanas. Em verde, resíduos; resíduos catalíticos; em vermelho, pentapeptídeo inserido; e roxo, resíduos a uma distância de até 10Å do substrato.</i>	86
<i>Figura 27 – Alinhamento estrutural da enzima Pfenolase e homóloga humana (PDB 3UCC). Em azul, o pentapeptídeo inserido presente na enzima de P. falciparum.</i>	87
<i>Figura 28 – Sítio I de coordenação com íon Mg^{+2} na estrutura apo, ocupado mesmo sem haver a adição durante a purificação ou cristalização.</i>	87
<i>Figura 29 – Mapas de densidade eletrônica $2Fo - Fc$ (contornados a 1σ) dos complexos cristalográficos da enzima Pfenolase, obtidos com o substrato (2PG) e produto (PEP).</i>	88
<i>Figura 30 – Distribuição dos RMSD por resíduo a partir do alinhamento das estruturas apo e complexo iii (PEP + Mg). Em destaque as três regiões (alças) que se adaptam em virtude da ligação com o substrato/produto.</i>	89
<i>Figura 31 – Alinhamento estrutural das estruturas apo e complexo PEP + Mg. Em azul, a estrutura apo e em vermelho, o complexo onde evidencia-se as mudanças conformacionais de três alças próximas ao sítio catalítico mediada pela interação com o substrato/produto e estabilizada pela entrada do íon Mg^{+2} adicional.</i>	89
<i>Figura 32 – À esquerda, estrutura química 2D do Enoblock. À direita, Mapas de densidade eletrônica $Fo - Fc$ (contornados a 3σ) obtidos para o complexo da enzima Pfenolase com o inibidor Enoblock.</i>	90

Figura 33 – Sítio ativo empregado nos processos de docagem molecular. Em destaque, o grid, formado por uma caixa 3D com arestas de 10 Å centrada nas coordenadas do substrato; e em azul, a cavidade explorada.....	94
Figura 34 – Validação do sítio de ligação por redocagem do substrato natural, empregado durante os estudos de docagem molecular. Em verde, o ligante cocrystalizado; em ciano a pose docada com RMSD calculado em 1.46 Å.	94
Figura 35 – Distribuição da pontuação obtida pela função Docking Score para as moléculas docadas durante a rotina SP. Em verde, região com compostos promissores e pontuações distintas; em amarelo, região com o maior número de compostos e com baixa distinção entre eles; em vermelho, compostos cujas interações são bastante desfavoráveis, chegando a apresentar pontuação positiva.	99
Figura 36 – Redundância na recuperação de compostos pelas estratégias empregadas na triagem virtual, comparadas com a estratégia que mimetiza a abordagem QM-PLD da Schrödinger. Onde Precalc 321G, representa a estratégia com cálculo de cargas parciais anteriores à submissão da rotina SP; e XP, representa a estratégia típica SP-XP do programa Glide.....	100
Figura 37 – Composto ZINC13492899 , maior divergência apresentada entre as metodologias de docagem empregadas. À esquerda, estrutura química 2D. À direita, poses obtidas pelo processo de docagem molecular, destaca-se em azul a pose obtida pela estratégia I com pontuação divergente das demais estratégias.	103
Figura 38 – Determinação do parâmetro cinético K_M , por regressão não-linear, para o cofator NAD^+ . (A) Enzima TcGAPDH com cauda hexahistidina (B) Enzima TcGAPDH após remoção da cauda de hexahistina por digestão com trombina. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.	107
Figura 39 - (Esquerda) Eletroforese em gel de agarose (1%), amplificação inicial da TcGAPDH a partir do molde de TcGAPDH-pET28a. (Direita) Eletroforese em gel de agarose (1%), reação de PCR de colônia dos clones recombinantes obtidos, onde a presença das bandas demonstra a incorporação do plasmídeo TcGAPDHpETTrx-1a.	108

Figura 40 - Etapas cromatográficas empregadas na purificação de TcGAPDH, onde G indica a fração em que a proteína de interesse foi eluída. (A) Cromatografia de afinidade em HisTrap HP. (B) Cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-25. (C) Cromatografia de afinidade em HisTrap HP (D) Cromatografia de exclusão molecular em Superdex 200 16/60.....	109
Figura 41 - Gel de eletroforese SDS-PAGE 15% referente as etapas finais de purificação de TcGAPDH, onde MK, C, D são marcador de massa molecular, fração após a segunda cromatografia de afinidade e fração após cromatografia de exclusão por tamanho, respectivamente.	110
Figura 42 - Varredura espectral (220-750 nm) para um extrato de produto natural, obtida em Nanodrop (Thermo Scientific). Destaca-se a alta e baixa absorção nos comprimentos de onda 340 e 400 nm, respectivamente. O perfil de absorção elevado na região UV para os produtos naturais testados impede a utilização da metodologia 1	111
Figura 43 - Exemplo ilustrativo das análises dos candidatos a inibidores da TcGAPDH. A comparação com os controles positivo e negativo, bem como, a reprodutibilidade observada indica a estabilidade do método e consistência dos resultados.....	112
Figura 44 – Estrutura química do composto isolado, tilirosideo (kaempferol-3-(p-cumaryl)-glucosideo), nos ensaios de bioprospecção guiada.....	113
Figura 45 – Curva dose-resposta obtida para o composto tilirosideo. Determinação da potência inibitória IC_{50} por regressão não-linear. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.	114
Figura 46 - (A) Perfil de inibição não-competitiva para o inibidor tilirosideo na presença do substrato G3P. (B) Perfil de inibição não-competitiva para o inibidor tilirosideo na presença do cofator TNAD ⁺ . Ensaios cinéticos foram realizados na presença de concentrações crescente de inibidor (•) ausência de inibidor (○) 5 μ M (▼) 10 μ M. (C) Esquema de Michaelis-Menten para inibidores não-competitivo. (D) Esquema representativo de inibição não-competitiva	115
Figura 47 - Modo de ligação predito para o composto 9 no sítio de ligação da enzima TcGAPDH. (A) Resíduos da proteína (bastão) envolvidos na ligação com o composto 9 (bastão e esferas) com as ligações de hidrogênio representadas em amarelo. (B) Modo de ligação predito sobreposto no	

<i>modelo farmacofórico. (C) Estrutura representada como superfície Connolly.</i>	<i>118</i>
<i>Figura 48 - Determinação dos parâmetros cinéticos K_M para substrato (A) e cofator (B) da enzima TcGAPDH, pela metodologia cinética fluorimétrica com sistema acoplado a diaforase. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.</i>	<i>119</i>
<i>Figura 49 - Linearidade do ensaio acoplado frente a acréscimos da enzima TcGAPDH, evidenciando a etapa limitante do ensaio proposto. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.</i>	<i>120</i>
<i>Figura 50 - Distribuição dos valores obtidos para os controles positivo (substrato, G3P) e negativo (ausência de substrato) do ensaio cinético acoplado de TcGAPDH. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.</i>	<i>121</i>
<i>Figura 51 - Moléculas bioativas identificadas na triagem da coleção Malaria Box.</i>	<i>122</i>
<i>Figura 52 – Padrões de difração obtidos a partir de cristais de TcGAPDH. (A) Cristal da proteína na sua forma apo (B) Cristal após soaking com 1 mM tilirósideo por 2 min.</i>	<i>123</i>
<i>Figura 53 – Cristais obtidos na etapa de triagem de condições de cristalização de TcGAPDH. (A) JCSG I Suite – A09. (B) JCSG I Suite – D12. (C) JCSG IV Suite – E07. (D) JCSG IV Suite – E08. (E) Index Suite – H02. (F) Index Suite – H04.</i>	<i>125</i>
<i>Figura 54 – Sítio catalítico da enzima TcGAPDH para o modelo construído com dados de difração de raios-X de cristal obtido na condição H08 da suíte PEGs. Em destaque, os mapas de densidade eletrônica 2Fo-Fc, contornados a 1 σ, para o cofator e íons fosfato complexados.</i>	<i>126</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características moleculares das construções da enzima Pfenolase nos vetores pETM-11/LIC, pETTrx-1a/LIC e pETNus-1a/LIC.	47
Tabela 2 – Compostos da coleção Malaria Box que apresentaram atividade inibitória superior a 40 % na concentração única de 50 μ M frente a Pfenolase.	77
Tabela 3 – Parâmetros estatísticos obtidos durante o processamento e refinamento dos dados cristalográficos coletados para os cristais da enzima Pfenolase.....	82
Tabela 4 – Compostos selecionados para aquisição e avaliação experimental oriundos das três estratégias de triagem virtual adotadas.	101
Tabela 5 – Pontuação e classificação obtida para a melhor pose dos compostos selecionados para aquisição nas três estratégias de triagem virtual empregadas.	103
Tabela 6 – Valores de IC ₅₀ determinados para as moléculas selecionadas pela triagem virtual.....	116
Tabela 7 – Comparação dos parâmetros cinéticos K _M para enzima TcGAPDH obtidos por métodos espectrofotométricos e fluorimétricos.	119
Tabela 8 – Novas condições de cristalização identificadas para TcGAPDH.....	124

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-PG	2-fosfoglicerato
DFT	<i>Density Functional Theory</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA
HTS	<i>High-Throughput Screening</i>
IPTG	Isopropil- β -D-galactosídeo
ITC	<i>Isothermal titration calorimetry</i>
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LIC	<i>Ligation Independent Cloning</i>
MMV	<i>Medicines for Malaria Venture</i>
NAD+	Nicotinamida adenina dinucleotideo
NME	New molecular entity
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	Polietilenoglicol
PEP	Fosfoenolpiruvato
PMSF	Fluoreto de fenilmetanosulfonil
PPP	Parceria Público-Privada
QM/MM	<i>Quantum Mechanics/Molecular Mechanics</i>
QM-PLD	<i>Quantum Mechanics -Polarized Ligand Docking</i>
RMSD	<i>Root-mean-square deviation</i>
SBDD	<i>Structure-based drug design</i>
SCF	<i>Self-consistent field</i>
SOB	<i>Super Optimal Broth</i>
SOC	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	29
1.1	O processo de descoberta de fármacos.....	29
1.2	Doenças Tropicais	31
1.2.1	Malária	32
1.2.1.1	Via Glicolítica e a enzima enolase	34
1.2.2	Doença de Chagas.....	36
1.2.2.1	Via glicolítica e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (<i>TcGAPDH</i>).....	37
2	OBJETIVOS	41
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	45
3.1	<i>Pf</i> Enolase	45
3.1.1	Clonagem e construção de sistemas de expressão.....	45
3.1.2	Avaliação dos sistemas de expressão e expressão em larga escala.....	47
3.1.3	Purificação da enzima <i>Pf</i> enolase	48
3.1.4	Estudos de cinética enzimática, triagem e caracterização de inibidores da enzima <i>Pf</i> enolase.....	49
3.1.5	Ensaio de cristalização da enzima <i>Pf</i> enolase	51
3.1.6	Coleta e processamento dos dados de difração de raios-X.....	51
3.1.7	Determinação da estrutura cristalográfica de <i>Pf</i> enolase.....	53
3.1.8	Triagem virtual de inibidores da enolase de <i>P. falciparum</i>	54
3.1.8.1	Sítio de ligação para o processo de docagem molecular	54
3.1.8.2	Base de dados de compostos.....	55
3.1.8.3	Preparação da base de compostos	55
3.1.8.4	Procedimento de docagem molecular.....	56
3.1.8.5	Seleção dos compostos para aquisição.....	57
3.2	<i>TcGAPDH</i>	58
3.2.1	Clonagem no vetor de expressão pET28a	58
3.2.2	Clonagem no vetor de expressão pETTrx-1a	58
3.2.7	Desenvolvimento da ferramenta computacional Kinecteasy	64
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO: Enolase de <i>P. falciparum</i> (<i>Pf</i> enolase)	69
4.1	Clonagem da enzima <i>Pf</i> enolase	69
4.2	Avaliação dos sistemas de expressão proteica.....	71
4.3	Expressão e purificação da enzima <i>Pf</i> enolase.....	73
4.4	Ensaio de cinética enzimática - <i>Pf</i> enolase	74
4.5	Triagem de inibidores	76
4.5.1	<i>Malaria Box</i>	76

4.6	Ensaio de cristalização e coleta de dados de difração de raios-X da <i>Pfenolase</i>	79
4.7	Análises Estruturais – <i>Pfenolase</i>	84
4.8	Triagem virtual de candidatos a inibidores da enzima <i>Pfenolase</i>	91
4.8.1	Sítio de ligação.....	92
4.8.2	Base de dados de compostos - ZINC	95
4.8.3	Processo de docagem molecular	96
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de <i>T. cruzi</i> (<i>TcGAPDH</i>).....	107
5.1	Clonagem, expressão e purificação de <i>TcGAPDH</i>	107
5.2	Triagem de candidatos a inibidores de <i>TcGAPDH</i>	110
5.2.1	Produtos naturais	111
5.2.2	Compostos selecionados por ensaio de triagem virtual	115
5.2.3	Ensaio cinético fluorimétrico	118
5.2.4	<i>Malaria Box</i>	121
5.3	Estudos cristalográficos com <i>TcGAPDH</i>	122
5.4	Kinecteasy – Uma ferramenta para análise de dados cinéticos	126
6	CONCLUSÃO.....	131
	PERSPECTIVAS	133
	REFERÊNCIAS	135
	APÊNDICE A – Visão geral do programa Kinecteasy	149
	APÊNDICE B – Produção científica	153

CAPÍTULO 1

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 O processo de descoberta de fármacos

Os esforços para o desenvolvimento de novos fármacos são historicamente recompensados com aumento de expectativa e qualidade de vida da população.¹⁻² Os fármacos desenvolvidos para os principais problemas de saúde dos seres humanos permitem a modulação do estado patológico reduzindo drasticamente as taxas de morbidade e mortalidade dessas doenças. Além disso, o desenvolvimento de alguns desses fármacos mudou significativamente o modo de investigação sobre os mecanismos fisiopatológicos bem como o tratamento das enfermidades (e.g., inibidores da enzima conversora de angiotensina e beta bloqueadores para controle hipertensão arterial; inibidores da HMG-CoA redutase para controle dos níveis das lipoproteínas séricas, etc.).

Estimativas feitas a mais de uma década, indicavam que o tempo médio desde a concepção do projeto até o lançamento de um novo fármaco no mercado era de 8-12 anos, com custo médio de 800 milhões de dólares.³ Estes valores não contabilizavam gastos inerentes aos estudos de fase clínica IV (pós aprovação do agente regulatório), custos financeiros e outros gastos relativos a órgãos regulatórios de outros países.⁴ Com os devidos ajustes realizados, esta estimativa que já foi superior a 1 bilhão de dólares,⁴ recentemente, bateu a marca de 2,6 bilhões de dólares.⁵ A exemplo, a farmacêutica Pfizer gastou entre 2000 e 2008 aproximadamente 60 bilhões com seu setor de pesquisa e desenvolvimento, e neste período, teve apenas 9 novas entidades moleculares (NMEs, do inglês, *new molecular entities*) aprovadas, totalizando gastos superiores a 6 bilhões de dólares por NME.⁴

A análise da evolução do número de NMEs aprovadas pelo órgão de regulamentação norte-americano (FDA, do inglês, *US Food and Drug Administration*) indica uma situação curiosa na qual, apesar dos intensos esforços, não houve aumento significativo no número de aprovações anuais nos últimos anos (Figura 1). Ademais, o incremento linear do acumulado de fármacos aprovados pelas principais indústrias farmacêuticas (Figura 2), desde 1950 até 2007, revela a dificuldade em elevar a produtividade no cenário atual, com aumento crescente da rigorosidade das

agências regulatórias,⁶⁻⁷ mesmo considerando os inúmeros avanços tecnológicos e científicos obtidos durante este período.

Figura 1 - Número de NMEs aprovadas pelo FDA no período de 2005-2014.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 2 – Número acumulado de NMEs de três grandes indústrias farmacêuticas, na qual pode-se evidenciar a tendência linear no incremento das NMEs lançadas no mercado ao longo dos anos (1950-2007).

Fonte: MUNOS, B.⁴

O processo de descoberta de fármacos emprega diversas ferramentas e abordagens modernas com potencial de aumentar significativamente o número de inovações farmacêuticas. No entanto, em um mercado cada vez mais competitivo, interesses financeiros pressionam e guiam as decisões e o futuro dos projetos de descoberta de fármacos, apresentando como impacto direto aumento no número de fármacos da categoria *me-too* (*i.e.*, moléculas estruturalmente semelhantes ao fármaco referência) e declínio no número de moléculas inovadoras como novos agentes terapêuticos.⁸

Esse cenário tem beneficiado a inclusão de instituições acadêmicas e institutos de pesquisa, financiados pela iniciativa pública, no desenvolvimento de projetos inovadores que não dependem da análise de risco por parte de investidores.^{9,10} Devido as características peculiares, grandes avanços científicos podem ser realizados na academia sem a pressão e a necessidade de retorno financeiro, favorecendo o processo de inovação, a investigação de doenças negligenciadas e a formação de profissionais qualificados capazes de conduzir projetos científicos desafiadores.⁹

1.2 Doenças Tropicais

Dentre as diversas enfermidades que acometem a saúde humana, as doenças tropicais tornaram-se uma preocupação mundial por sua elevada prevalência, especialmente na população mais pobre.¹¹ Consequência marcante do subdesenvolvimento e pobreza (falta de condições adequadas de higiene, habitação e acesso a serviços de saúde eficientes) as doenças tropicais apresentam elevadas taxas de morbidade e mortalidade.¹¹ Contudo, durante um longo período estiveram marginalizadas e pouco se evoluiu em termos de prevenção e tratamento, justificando o título de doenças tropicais negligenciadas (DTNs).¹¹⁻¹²

Dezessete infecções parasitárias são atualmente classificadas como DTNs pela Organização Mundial de Saúde (OMS): doença de Chagas, tripanossomose africana, leishmaniose, esquistossomose, lepra, filariose, dengue, oncocercose, tracoma, raiva, úlcera de Buruli, dracunculose, equinococose, teníase/cisticercose, trematodioses, helmintoses e treponematoses; e juntamente com outras doenças

tropicais afetam aproximadamente 2,7 bilhões de pessoas.¹² É importante mencionar que malária e tuberculose são doenças tropicais de grande impacto mundial, contudo, não fazem parte da lista atual de DTNs devido ao aumento significativo no número de iniciativas, investimentos e esforços aplicados para a prevenção e tratamento.

O tratamento para grande maioria das DTNs é bastante limitado e ineficaz, sendo agravado pelo surgimento de cepas resistentes.¹³⁻¹⁴ O investimento em P&D de novos fármacos para DTNs é significativamente reduzido quando comparado aos investimentos para as doenças não comunicáveis. Contudo, há uma tendência em diminuir essa discrepância através da associação entre empresas públicas e privadas (PPP, parcerias público-privadas)¹⁵ sendo grande parte dessas parcerias intermediadas pela OMS.^{11,16}

As PPPs têm como objetivo principal desenvolver medidas eficazes para a prevenção e tratamento das DTNs. Os avanços científicos sobre as DTNs ocorreram majoritariamente na academia e instituições de pesquisa públicas, financiadas por organizações não governamentais com destaque para o *Drugs for Neglected Diseases initiative* (DNDi), *Medicines for Malaria Venture* (MMV) e *Wellcome Trust*. Nesse contexto, destaca-se o importante papel dos grupos de pesquisa no Brasil, entre eles, o Laboratório de Química Medicinal e Computacional do Instituto de Física de São Carlos – USP; o qual aplica seus esforços para o aprofundamento dos conhecimentos sobre os mecanismos moleculares e identificação de moléculas bioativas que servirão para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento de DTNs.

1.2.1 Malária

A malária é causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e transmitidos pela picada da fêmea do mosquito *Anopheles*. O *P. falciparum* é o agente etiológico responsável pela forma mais severa desta parasitose.¹⁷ A distribuição geográfica da malária revela relação direta com a pobreza e o grau de desenvolvimento das populações afetadas. Nesse cenário, destaca-se a elevada prevalência na região tropical do planeta (Figura 3). Em 2013, aproximadamente, 584.000 de pessoas

morreram vítimas de malária.¹⁸ Atualmente, mais da metade da população mundial vive em áreas de risco de contágio, ilustrando o impacto mundial da patologia.

Figura 3 - Distribuição geográfica da malária no mundo.

Fonte: ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. ¹⁹

O tratamento da malária foi durante muito tempo fundamentado na utilização de derivados de cloroquina (Figura 4 A), no entanto, a ampla utilização do fármaco determinou o surgimento de cepas resistentes.^{20,21} Diante disso, a OMS passou a preconizar terapias combinadas com artemisinina (Figura 4 B) que visam aumentar a eficácia e segurança do tratamento com os fármacos disponíveis no mercado. Esse esquema terapêutico apresenta elevada eficácia no combate à parasitose, contudo, casos de resistência a artemisinina foram recentemente reportados.²¹⁻²⁴ Portanto, a identificação de novos alvos moleculares e o planejamento de agentes quimioterápicos inovadores são extremamente necessários para obtenção de alternativas terapêuticas para o tratamento da malária.

Figura 4 - Estrutura química da cloroquina (A) e artemisinina (B).

Fonte: Elaborada pelo autor.

1.2.1.1 Via Glicolítica e a enzima enolase

Dentre as vias bioquímicas consideradas como alvos metabólicos para o desenvolvimento de novos fármacos para a malária, destaca-se a glicólise. A glicólise é uma via metabólica essencial para o desenvolvimento do *Plasmodium spp*, pois figura com papel central no processo para obtenção de energia do parasita.^{25,26} Como consequência marcante dessa característica, o nível de fluxo glicolítico em células infectadas pelo parasita aumenta significativamente em relação às células não infectadas, além disso, há aumento expressivo da atividade catalítica das enzimas hexoquinase (~20 vezes), piruvatoquinase (~10 vezes) e enolase (~15 vezes).²⁷

A enolase (E.C. 4.2.1.11), nona enzima da via glicolítica, catalisa a conversão do substrato 2-fosfoglicerato (2-PG) em fosfoenolpiruvato (PEP) (Figura 5 A); é uma metaloenzima dimérica dependente de íons magnésio e massa molecular de aproximadamente 100 KDa (Figura 5 B e C).^{28,29}

Figura 5 - (A) Reação enzimática catalisada pela enolase. (B) Estrutura 3D representativa da enzima enolase. (C) Sobreposição do sítio catalítico da enolase em complexo com o substrato 2-fosfoglicerato (2-PG, amarelo) e o produto fosfoenolpiruvato (PEP, roxo).

Fonte: Elaborada pelo autor.

As enzimas enolases de protozoários (e.g., *P. falciparum*,^{30,31} *Leishmania mexicana*³² e *T. brucei*³³ *E. histolítica*³⁴) são consideradas alvos moleculares atrativos para o desenvolvimento de novos agentes antiparasitários, pois, além da função chave no metabolismo energético, apresentam distribuição celular e funções pouco compreendidas até o momento, porém ligadas a modulações metabólicas. Adicionalmente, a enolase de *P. falciparum* (*Pfenolase*) apresenta uma diferença significativa quando comparada às isoformas da homóloga humana, uma inserção na região entre os aminoácidos 104-108 altamente conservada entre as enolases de organismos apicomplexos e ausente na enzima humana.³⁰ Estudos evolutivos, de mutagênese sítio-dirigida e deleção indicaram que o inserto é essencial para a atividade catalítica da enzima, além disso, estaria envolvido no processo de reconhecimento molecular entre proteínas do parasita.^{30,35}

1.2.2 Doença de Chagas

A doença de Chagas ou tripanossomose americana é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, sendo transmitida principalmente pelo inseto conhecido, popularmente, como barbeiro (vetor-hematófago, pertencente ao gênero *Triatoma*). Esse inseto habita as frestas das paredes de barro ou de madeira de habitações peculiares, conhecidas como “cafuas”, característica de algumas regiões menos favorecidas economicamente. Portanto, o principal método de prevenção é o controle biológico do inseto-vetor domiciliado através da aplicação de inseticidas e melhoria das condições de habitação. Paralelamente, estratégias alternativas são aplicadas para controle dos insetos não domiciliados, entre elas destaca-se o emprego de telas de contenção.³⁶

Os dados de epidemiologia da doença de Chagas indicam, aproximadamente, 6 a 7 milhões de pessoas infectadas pelo *T. cruzi*, concentradas primordialmente na América Latina.³⁷ O tratamento fundamenta-se na utilização dos fármacos nifurtimox e benznidazol (Figura 6), que apresentam eficácia extremamente limitada (i.e., apenas na fase aguda) e efeitos adversos bastante agressivos.

Figura 6 - Estrutura química do benznidazol (A) e nifurtimox (B).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A determinação do genoma³⁸ e proteoma³⁹ do *T. cruzi* permitiu a identificação de alvos moleculares e vias bioquímicas que podem ser exploradas para o desenvolvimento de novos fármacos mais seguros e eficazes para a doença de Chagas. Nesse sentido, destaca-se a via glicolítica e a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*TcGAPDH*).

1.2.2.1 Via glicolítica e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (TcGAPDH)

O *T. cruzi* apresenta uma organela especializada denominada glicossoma, característica da família *Trypanosomatidae*, na qual estão localizadas as principais enzimas (nove das dez enzimas responsáveis pela catálise de glicose a piruvato) envolvidas na via glicolítica.^{40–42} Essa via é a principal fonte de energia da forma infectiva,⁴³ que não apresenta mitocôndrias ativas nesta fase do ciclo celular.^{40–42} As enzimas envolvidas na glicólise apresentam-se como alvos moleculares atrativos para o planejamento de inibidores, pois a modulação seletiva das enzimas dessa via - extremamente importante para a produção de energia - determina a morte do parasita.

A avaliação criteriosa sobre a influência da atividade de enzimas específicas e o fluxo glicolítico nos tripanossomatídeos indicou enzimas chaves para o controle do fluxo glicolítico,^{44,45} dentre elas, destaca-se a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). A GAPDH (EC. 1.2.1.12) catalisa a conversão do substrato gliceraldeído-3-fosfato no produto 1-3 bifosfoglicerato na presença do cofator NAD^+ e fosfato inorgânico (Figura 7). Experimentos de RNA de interferência conduzidos com a GAPDH de tripanossomatídeo mostraram que depleções parciais de GAPDH são suficientes para promover a morte do parasita.⁴⁶ Esses dados indicam que a GAPDH tem papel essencial para a manutenção do parasita, portanto, um alvo molecular atrativo para o desenvolvimento de novos fármacos.⁴⁶

Figura 7 - Reação catalisada pela enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A TcGAPDH é um homotetrâmero com massa molecular de, aproximadamente, 150 KDa e subunidades relacionadas por um eixo de simetria não-cristalográfica de ordem 222 (Figura 8 A). Cada subunidade é composta de dois domínios distintos

(Figura 8 B), o domínio de ligação do substrato e o domínio de ligação do cofator NAD^+ .

Figura 8 - Estrutura cristalográfica de *TcGAPDH*. **(A)** Organização espacial das quatro subunidades que compõe a forma funcional da enzima *TcGAPDH*. As linhas indicam os eixos de simetria de ordem 222, que relacionam as subunidades do tetrâmero. Em azul e laranja, estão destacados os domínios de ligação do substrato e de ligação ao NAD^+ , respectivamente. **(B)** Perfil do monômero que compõe o tetrâmero funcional da *TcGAPDH*

Fonte: MALUF et al.⁴⁷

CAPÍTULO 2

Objetivos

2 OBJETIVOS

O objetivo fundamental dessa tese de doutoramento é fornecer as bases estruturais e de química medicinal para o avanço no processo de descoberta de fármacos para malária e doença de Chagas. Para tanto, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

TcGAPDH:

- a. Adaptações do processo de obtenção do alvo molecular;
- b. Estabelecimento novo ensaio cinético;
- c. Triagem bioquímica de inibidores de origem natural, sintética e semissintética;
- d. Determinação da potência e do mecanismo de ação dos compostos identificados;
- e. Estudos estruturais através da cocrystalização e/ou soaking dos compostos selecionados;

Pfenolase:

- a. Clonagem, expressão e purificação da enzima alvo;
- b. Cristalização e determinação da estrutura tridimensional;
- c. Caracterização cinética;
- d. Padronização e validação de ensaios enzimáticos in vitro;
- e. Triagem bioquímica de inibidores;
- f. Ensaio virtual em larga escala visando à identificação, seleção e aquisição de candidatos a novos inibidores.

CAPÍTULO 3

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 *Pf*Enolase

3.1.1 Clonagem e construção de sistemas de expressão

A sequência do gene que codifica a enzima enolase (446 aminoácidos - ~ 49 kDa) em *P. falciparum* (*Pf*enolase) foi obtida no banco de dados GenBank acesso **AAN35353.1**. O processo de amplificação do gene de interesse através de reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), teve início com o planejamento e síntese (Sigma® Life Science) do par de oligonucleotídeos iniciadores:

*Pf*Enolase_LIC_Fw – CAGGGCGCCA TGGCTCATGTAATAACTCGTATTAATG *

*Pf*Enolase_LIC_Rv – GACCCGACGCGG TTAATTTAATTGTAATCTAAATTTTCTCCAG †

onde, destaca-se em azul a sequência de bases adicionais requerida pelo sistema de clonagem empregado.

Na reação de amplificação empregou-se o sistema *Phusion*[™] (Finnzymes), conforme as recomendações do fabricante (Figura 9). Uma biblioteca de cDNA de *P. falciparum* preparada a partir de parasitas sincronizados nos ciclos celulares de trofozoítos e esquizontes, cedida gentilmente pela Prof. Dr. Célia Regina da Silva Garcia (Instituto Biológico - Universidade de São Paulo), foi utilizada como DNA molde.

A amplificação do gene (1.341 pares de base) foi confirmada através de eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 11) e o produto da reação purificado com auxílio do kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega).

Após quantificação espectrofotométrica (NanoVue – GE Healthcare Life Sciences), o fragmento foi submetido a tratamento com a enzima T4 DNA polimerase (Fermentas), na presença de dATP (Figura 10), para a formação das extremidades coesivas de ligação ao sistema LIC (do inglês, *Ligation Independent Cloning*)⁴⁸

* Senso (5' – 3')

† Antissenso (5' – 3')

utilizado. A reação foi incubada por 30 min a 22 °C, seguida de inativação da polimerase por 20 min a 75 °C e centrifugação (1 min 12.000 g) do produto da reação.

Figura 9 – Condições experimentais empregadas na reação de amplificação, por reação em cadeia da polimerase (PCR), da enzima enolase de *P. falciparum*.

Reação de PCR		Parâmetros	
Tampão da polimerase 5X (HF)	10 µL	98 °C	30 s
Molde DNA	50 ng	98 °C	10 s
Oligonucleotídeo senso	1 µL (10 µM)	60 °C	30 s
Oligonucleotídeo antissenso	1 µL (10 µM)	72 °C	30 s
dNTP 10 mM	1 µL	72 °C	10 min
DNA Polimerase - Phusion	0.5 µL (1 U)	} 30 ciclos	
Água	qsp. 50 µL		

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 10 – Condições experimentais empregadas no tratamento do fragmento amplificado e vetores de expressão pETM-11/LIC, pETTrx-1a/LIC e pETNus-1a/LIC; com T4 DNA polimerase, para produção das extremidades coesivas do sistema de clonagem independente de ligação (LIC) utilizado.

Reação T4 DNA Polimerase - Fragmento		Reação T4 DNA Polimerase - Vetor	
Tampão da T4 DNA polimerase (5X)	4 µL	Tampão da T4 DNA polimerase (5X)	4 µL
Fragmento	200 ng	Vetor digerido com Bsal	600 ng
dATP (100 mM)	0,5 µL	dATP (100 mM)	0,5 µL
DTT (100 mM)	1 µL	DTT (100 mM)	1 µL
BSA 100X	0,2 µL	BSA 100X	0,2 µL
T4 DNA polimerase	0.4 µL (1 U)	T4 DNA polimerase	0.4 µL (1 U)
Água	qsp. 20 µL	Água	qsp. 20 µL

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os vetores de expressão pETM-11/LIC, pETTrx-1a/LIC e pETNus-1a/LIC foram submetidos a reação de digestão com a enzima endonuclease Bsal (New England Biolabs), de acordo com as recomendações do fabricante, para linearização e remoção da região de inserção (do inglês, *stuffer*). O anelamento do fragmento tratado aos vetores de expressão, previamente tratados com T4 DNA Polimerase, na presença de dTTP - Figura 10, foi realizada pela simples mistura de 40 ng de fragmento com 50 ng de cada vetor. Após a incubação por 5 min a temperatura ambiente, as reações foram utilizadas para transformar células quimiocompetentes.⁴⁹ Brevemente, a transformação das células quimiocompetentes foi realizada pela exposição de 100 µL de células a uma mistura de 20 µL de DNA e 80 µL de tampão de transformação (100 mM KCl, 30 mM CaCl₂, 50 mM MgCl₂, 1,5% PEG 6.000) incubados no gelo por 30 min. Em seguida, a mistura reacional foi incubada por 10

min à temperatura ambiente e, após esse período, adicionou-se 800 µL de meio líquido SOC. As células, incubadas por 50 min a 37 °C sob agitação (200 rpm), foram semeadas em placas de Petri contendo meio sólido SOB suplementado com o antibiótico adequado, neste caso 30 µg/mL de canamicina.

Após a transformação, os clones recombinantes foram avaliados por PCR de colônia (Figura 12). As colônias positivas foram utilizadas para produção de material plasmidial que, após confirmação da integridade por sequenciamento, foi empregado na transformação de bactérias competentes de expressão Rosetta DE3.

3.1.2 Avaliação dos sistemas de expressão e expressão em larga escala

Para identificar o melhor sistema de expressão proteica, ou seja, o sistema de expressão com a maior capacidade de produzir proteína na fração solúvel, testes de expressão em pequena escala, para todas construções (Tabela 1), foram conduzidos.

Tabela 1 – Características moleculares das construções da enzima Pfenolase nos vetores pETM-11/LIC, pETTrx-1a/LIC e pETNus-1a/LIC.

Vetor de expressão	Proteína de fusão	Enolase + Proteína de fusão	Após clivagem da fusão
pETM11	Cauda Hexahistidina (3 KDa)	52 KDa	49 KDa
pETTrx-1a	Tiorredoxina (14 KDa)	63 KDa	49 KDa
pETNus-1a	NusA (57 KDa)	106 KDa	49 KDa

Fonte: Elaborada pelo autor.

Colônias isoladas, representantes de cada construção, foram cultivadas aerobicamente a 37 °C em 3 mL de meio líquido LB (suplementados com 30 µg/mL canamicina e 34 µg/mL cloranfenicol) até atingirem a densidade ótica (DO, em 600 nm) entre 0,6-0,8. Induziu-se a expressão proteica com a adição de IPTG (isopropil-β-D-galactosídeo) – concentração final de 1 mM. Em seguida, dois protocolos distintos foram empregados para avaliação das condições de expressão mais apropriadas: i. expressão por 3 h a 37 °C e ii. expressão por 16 h a 20 °C. Após o período de

expressão, as células foram obtidas por centrifugação a 10.000 g por 5 min e ressuspensas em um décimo do volume de cultura inicial com tampão de lise (50 mM Tris pH 8.0, 500 mM NaCl, 1% v/v Tween 20), suplementado com 1 mM PMSF - fluoreto de fenilmetanosulfonil, 2 mM DTT - Ditioneitol, 1 mg/mL lisozima e 3 U/mL benzonase. As células foram lisadas através de ciclos de congelamento /descongelamento, seguido por incubação em gelo por 30 minutos. As frações solúveis e insolúveis dos clarificados produzidos foram separadas por centrifugação a 16.000 g por 10 min e submetidas à análise de eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE), corado com 0,02% de Coomassie Brilliant Blue G-250, para avaliação do perfil de expressão (Figura 13 e Figura 14).

Os testes de expressão conduzidos em menor escala indicaram que a expressão empregando a construção fusionada com cauda de hexahistina e tiorredoxina (vetores pETM11/LIC e pETTrx-1a/LIC) conduzidas a 20 °C apresentaram o melhor perfil de expressão (Figura 14). No entanto, devido às dificuldades nas etapas de purificação posteriores, elegeu-se para continuidade dos ensaios a construção de *Pfenolase* no vetor pETTrx-1a/LIC.

Assim, utilizando esta construção, um pré-inóculo de 10 mL de meio LB foi cultivado por 16 h a 37 °C para inoculação de 1 L de meio autoindutor ZYM-5052,⁵⁰ ambos suplementados com os antibióticos canamicina (30 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL). O crescimento da cultura a 37 °C foi monitorado pela densidade ótica obtida no comprimento de onda de 600 nm (DO_{600nm}). Atingida a DO_{600nm} de ~ 1.0 a temperatura foi reduzida para 20 °C e a expressão conduzida por 16 h. As células foram obtidas por centrifugação a 6.000 g por 20 min a 4 °C e ressuspensas em tampão de lise (50 mM Tris pH 8,0, 500 mM NaCl e 20 mM imidazol).

3.1.3 Purificação da enzima *Pfenolase*

O concentrado de células produzido na etapa anterior, suplementado com 1 mM PMSF, 2 mM DTT e 100 µg/mL lisozima foi submetido ao processo de lise celular por sonicação em gelo (10 ciclos de 30 s seguidos com intervalo de 45 s entre cada ciclo). Os debris celulares foram separados por centrifugação a 20.000 g por 30 min a 4 °C. A fração solúvel foi filtrada em dispositivo Millex® (Millipore) de 0,45 µm e, em

seguida, aplicada na coluna de afinidade Histrap HP 5 mL (GE Healthcare Life Sciences).

Todas as etapas cromatográficas foram realizadas em sistema cromatográfico semiautomatizado Äkta (GE Healthcare Life Sciences) com monitoramento da absorbância no UV ($\lambda = 280$ nm). A primeira etapa da purificação consistiu em cromatografia de afinidade (coluna Histrap HP) realizada com os tampões: A (50 mM Tris pH 8,0, 500 mM NaCl, e 20 mM imidazol) e B (50 mM Tris pH 8,0, 500 mM NaCl, e 500 mM imidazol); utilizando-se uma estratégia de gradiente de 0-100% de imidazol (tampão A $\rightarrow$ tampão B) em um volume de 20 volumes de coluna (VC), mantendo constante o percentual de tampão B durante a eluição de frações proteicas (Figura 15 A). A fração contendo as proteínas com caudas de hexahistidina foram coletadas e submetidas a uma cromatografia de exclusão molecular (HiTrap Desalting – GE Healthcare Life Sciences) utilizando o tampão C (50 mM Tris pH 8,0, 500 mM NaCl), para a remoção do imidazol (Figura 15 B). Em seguida, incubou-se as frações obtidas da etapa anterior com a protease TEV na proporção de 1:25 mg a 4 °C por 20 h para clivagem das proteínas fusionadas. A enolase livre foi separada das proteínas de fusão, enolase fusionada remanescente e da protease TEV em solução por um segundo passo de cromatografia de afinidade - Histrap HP (Figura 15 C). Uma etapa final de polimento da purificação foi realizada utilizando-se cromatografia de exclusão molecular com a coluna Hiload 16/60 Superdex 200 (GE Healthcare Life Sciences), em tampão 20 mM Tris pH 8,0 e 200 mM NaCl (Figura 15 D). A pureza final, bem como a evolução das etapas de purificação, foi acompanhada por eletroforese desnaturante em gel de acrilamida 10% (Figura 16).

3.1.4 Estudos de cinética enzimática, triagem e caracterização de inibidores da enzima *Pfenolase*

Os ensaios de atividade e caracterização cinética da *Pfenolase* foram realizados através do acompanhamento da reação direta de formação de fosfoenolpiruvato (PEP) a partir de 2-fosfoglicerato (2-PG), por espectrofotometria em 240 nm, conforme descrito anteriormente.⁵¹ Brevemente, a mistura reacional foi composta de 100 mM Tampão MOPS pH 7.4, 1,5 mM MgCl₂, 2 nM *Pfenolase* e

concentrações variáveis do substrato 2-PG. A reação foi acompanhada por 5 min em um cubeta de 1 mL a temperatura ambiente. As curvas de velocidade inicial foram empregadas na determinação dos parâmetros cinéticos pelo método da regressão não linear usando o programa *GraphPad Prism* (Figura 17).

O impedimento da realização de experimentos de triagem de inibidores empregando a metodologia cinética descrita acima, resultado da intensa absorção que a maioria dos compostos orgânicos apresenta em 240 nm, acarretou na adaptação de ensaios enzimático com sistema acoplado bioluminescente.⁵² Essencialmente, a catálise promovida pela enzima *Pfenolase* foi acoplada as reações catalisadas pelas enzimas piruvato cinase e luciferase, sequencialmente, permitindo que a atividade enzimática da *Pfenolase* fosse medida indiretamente pela produção de ATP e consequente emissão de luz (Figura 18 A).

A mistura reacional do ensaio acoplado foi composta de 100 mM MOPS pH 7.4, 1 mM β -mercaptoetanol, 1,5 mM $MgCl_2$, 1 mM adenosina difosfato (ADP), 2 U/mL piruvato cinase, 500 pM enolase e concentrações variáveis de 2-PG. A reação, com volume final de 100 μ L, foi incubada por 20 min a temperatura ambiente, seguida da adição de 100 μ L *Kinase-Glow Plus* (Promega) e mediu-se a luminescência após 5 min de incubação. Para assegurar que a emissão de luz (bioluminescência) do ensaio era diretamente proporcional ao resultado da atividade enzimática catalisada pela *Pfenolase*, determinou-se o parâmetro cinético K_M novamente (Figura 18 B).

Na etapa de triagem de inibidores, empregou-se a metodologia acima descrita, incubando os compostos com a mistura reacional (incluindo a *Pfenolase*) pelo tempo mínimo de 10 min. A reação foi disparada pela adição do substrato 2-PG na concentração de $\sim 1 \times K_M$ (i.e., 40 μ M). Os compostos com atividade inibitória promissora foram atestados contra o sistema acoplado, reduzindo as chances de obtenção de resultados falso positivos.

A potência dos inibidores (IC_{50} – i.e., concentração de inibidor que determina 50% de inibição da atividade enzimática) foi determinada por regressão não linear de curvas de dose resposta,⁵³ obtidas em ensaios em triplicata e com no mínimo 5 concentrações do inibidor em estudo.

3.1.5 Ensaios de cristalização da enzima *Pfenolase*

A pureza da enzima *Pfenolase* produzida foi atestada pela análise da eletroforese SDS-PAGE, onde evidenciou-se uma banda única (pureza > 95%) para a fração obtida após a cromatografia de exclusão molecular (Figura 16). A proteína foi concentrada em dispositivo Amicon Ultra-15 (Millipore) com corte de 30 kDa a concentração final de 30 mg/mL. Para a triagem inicial de condições de cristalização, utilizou-se a técnica da matriz esparsa com o auxílio de micropipetas multicanais para montagem dos ensaios miniaturizados em placa de 96 poços. Empregando-se a técnica de gota sentada (do inglês, *sitting drop* - Figura 20), gotas de cristalização foram montadas contendo uma mistura de 1,2 μ L da amostra proteica e 1,2 μ L da solução de cristalização proveniente dos kits comerciais da Qiagen (*Classics*, *ClassicsII*, *PEG*, *PEGII*) e Hampton Research (*IndexHT*), totalizando, aproximadamente, 500 experimentos, incubados a 18 °C.

Os experimentos de cristalização foram inspecionados visualmente, com auxílio de estereoscópio binocular, no 1°, 3°, 5°, 7°, 15°, 30° dia e as condições promissoras assinaladas para etapa de otimização. A otimização das condições baseou-se na avaliação sistemática de parâmetros próximos ao identificado na etapa de triagem, especificamente, avaliou-se a influência da concentração proteica, concentração dos agentes precipitantes e pH do experimento. A técnica utilizada, nesta etapa, foi a gota suspensa (do inglês, *hanging drop* - Figura 20).

3.1.6 Coleta e processamento dos dados de difração de raios-X

Os cristais de *Pfenolase* obtidos foram retirados da solução de cristalização com auxílio de um *loop* de nylon (Hampton Research) e após passagem por solução crioprotetora (condição de cristalização adicionada de 20% de glicerol) os cristais foram resfriados e armazenados em N₂ líquido. Complexos cristalográficos entre a *Pfenolase* e seus substrato (2-PG) e produto (PEP), foram obtidos pela técnica de “soaking” com os referidos compostos na concentração mínima de 1 mM e tempo superior a 5 min.

Experimentos de difração de raios-X foram conduzidos no difratômetro Micromax-007HF com sistema de detecção Rigaku R-Axis IV++, disponível no laboratório do Grupo de Cristalografia do Instituto de Física de São Carlos, realizados a temperatura de 100 K. Durante este Doutorado, coletas de dados de difração de raios X, foram também realizadas na linha de luz MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – Campinas/SP.

A coleta de dados de difração de raios X foi realizada pelo método de rotação-oscilação ($\Delta\phi$), onde o cristal sofre pequenas e sucessivas rotações (ϕ°) em torno do eixo perpendicular à direção do feixe de raios X incidentes. Coletou-se, inicialmente, quatro imagens de difração separadas por 90° para determinação dos parâmetros da cela unitária (a , b , c , α , β e γ) e grupo pontual do cristal obtido com auxílio do programa iMOSFLM.⁵⁴ A obtenção destes parâmetros é essencial para o planejamento de uma estratégia eficiente para coleta de dados, onde, minimiza-se a exposição do cristal aos raios X e maximiza-se a qualidade dos dados. Baseado neste planejamento, um conjunto completo de dados de difração de raios X foi coletado.

A indexação, refinamento dos parâmetros cristalinos e integração dos dados de difração foram conduzidas com o programa XDS.⁵⁵ Neste processo, gera-se uma lista com todas as reflexões coletadas, identificadas por índices de Miller – hkl , e seus respectivos valores de intensidade.

Até este momento, as múltiplas reflexões foram tratadas de maneira independente, no entanto, para que as reflexões relacionadas possam ser comparadas, deve-se aplicar escalas para correção de desvios oriundos das condições experimentais (e.g. danos por radiação, diferenças do volume de cristal expostos, flutuações na intensidade do feixe de raios X, etc.). Este processo, de redução e escalonamento dos dados foi realizado utilizando o programa SCALA,⁵⁶ parte do pacote de programas cristalográficos CCP4 (*Collaborative Computational Project N°4*).⁵⁷

Para identificação de possíveis problemas ou falhas durante o processamento, assim como patologias do cristal (e.g. *twinning*) validou-se os dados processados com o programa *phenix.xtriage*.⁵⁸ A estimativa do número de moléculas presentes na unidade assimétrica e o conteúdo de solvente do cristal foram obtidas com o programa *Matthews_coeff*,⁵⁹ incluso no pacote CCP4.⁵⁷

3.1.7 Determinação da estrutura cristalográfica de *Pfenolase*

Para resolver o problema das fases aplicou-se o método de substituição molecular, utilizando o programa PHASER.⁶⁰ Este programa estima fases, baseado em informações de similaridade estrutural, permitindo a obtenção de mapas de densidade eletrônica iniciais e estes são empregados nas etapas de reconstrução e refinamento do modelo. A cadeia **A** da estrutura da enzima enolase de *T. brucei* (PDB, 2PTY),⁶¹ sem águas, cofatores ou ligantes foi utilizada como modelo de busca.

Após a obtenção das fases iniciais iniciou-se o processo de refinamento, no qual busca-se encontrar a melhor concordância entre o modelo proposto e os dados experimentais coletados. Esta concordância é avaliada pela comparação entre os fatores de estrutura calculados (F_{calc}) e fatores de estrutura observados (F_{obs}), expressa por um parâmetro denominado R_{factor} :

$$R = \frac{\sum_h |F_{obs} - F_{calc}|}{\sum_h F_{obs}} \quad (1)$$

assim, acompanha-se a qualidade do processo de refinamento monitorando-se os valores de R_{factor} obtidos para cada ciclo. Devido as possíveis minimizações artificiais a que este avaliador está sujeito, e considerando a multiplicidade dos dados de raios X coletados, excluiu-se um grupo de reflexões (5%) que foi empregado como conjunto teste no cálculo de um novo fator R , denominado R_{free} , que é isento de minimizações artificiais.

As etapas de reconstrução manual e refinamento no espaço real foram conduzidas no programa COOT,⁶² guiadas pela inspeção dos mapas de densidade eletrônica $2Fo - Fc$ (contornado a 1σ) e $Fo - Fc$ (contornado a 3σ). O refinamento das coordenadas no espaço recíproco foi realizado com o programa phenix.refine,⁵⁸ tendo como estratégia a aplicação de restrições estereoquímicas (i.e. o conhecimento prévio de distâncias e ângulos de ligações químicas são considerados, não permitindo que o modelo adote valores não compatíveis quimicamente), fatores de temperatura refinados individualmente e adição de hidrogênios automática.

O refinamento foi considerado finalizado no momento em que os ciclos de reconstrução não acarretaram em redução adicional dos valores de R_{factor} e R_{free} , bem

como, os parâmetros geométricos e estereoquímicos estavam aceitáveis. A validação do modelo final foi realizada com o programa Molprobity⁶³ e os arquivos de coordenadas (i.e. pdb) e fatores de estrutura (i.e. mmCIF) depositados no Banco de Dados de Proteínas (PDB). Todas as representações da estrutura tridimensional foram produzidas com o programa Pymol (*The PyMOL Molecular Graphics System, Versão 1.4, Schrödinger, LLC*).

O processamento e refinamento dos dados de difração de raios X coletados a partir dos complexos cristalográficos obtidos foram realizados de modo automatizado, com auxílio dos programas autoPROC e BUSTER (Global Phasing).

3.1.8 Triagem virtual de inibidores da enolase de *P. falciparum*

3.1.8.1 Sítio de ligação para o processo de docagem molecular

A estrutura cristalográfica da enzima enolase de *P. falciparum* escolhida para o ensaio de triagem virtual foi o modelo determinado durante este projeto de doutoramento. Todos os avaliadores estatísticos globais são satisfatórios (Tabela 3) e nenhum erro foi detectado durante a inspeção visual. A escolha do modelo apo deveu-se pela conformação da alça formada pelos resíduos 39-46, em sua forma aberta com exposição total do sítio catalítico (Figura 31).

A interface Maestro (Schrödinger) possui um conjunto de ferramentas dedicada ao preparo da proteína alvo e geração do grid que é empregado durante o processo de docagem, denominados “Protein Preparation Wizard” e “Receptor Grid Generation”, respectivamente. Estas duas rotinas foram empregadas com seus parâmetros configurados no modo padrão, e o *grid* foi gerado, sendo um cubo com arestas de 10 Å e centro localizado no substrato natural.

3.1.8.2 Base de dados de compostos

Dentre os banco de dados de compostos, livre de custos e disponíveis online, destaca-se o ZINC,⁶⁴ contendo mais de 35 milhões de compostos disponíveis comercialmente, fornecidos em arquivos de coordenadas tridimensionais. O foco desta base de dados é a oferta de uma ferramenta útil no processo de descoberta de fármacos, desta maneira, além da base de dados são fornecidos subconjuntos com característica pré-definidas, ferramentas de busca e transferência facilitados.

O subconjunto de moléculas da base ZINC empregado neste estudo foi o “Leads Now”, do qual integram compostos com características de compostos líderes,⁶⁵ seguindo a chamada “regra dos 3,5” (i.e., compostos massa molecular entre 250 e 350 Da, cLogP inferior a 3,5, número de ligações rotacionáveis menor que 7).⁶⁴ Além disso, este subconjunto possui a classificação “Now” devido sua disponibilidade imediata de envio (inferior a 2 semanas).

Com o intuito de reduzir a base inicial de compostos (2.419.472 – disponível em Maio/2014), assegurando, no entanto, a manutenção da diversidade química, aplicou-se o conceito de similaridade química e apenas os compostos com no máximo 60% de similaridade, indicada pelo coeficiente de Tanimoto,⁶⁴ foram considerados para etapa posterior. Para contornar as dificuldades na recuperação das 26.697 moléculas resultantes e assegurar a total integridade do banco de dados proposto, rotinas em linguagem Python foram escritas para realizar a transferência dos arquivos em formato mol2 do servidor ZINC.

3.1.8.3 Preparação da base de compostos

A exclusão de compostos que apresentem em sua estrutura química grupos funcionais reativos tornou-se uma prática comum,⁶⁶ embora algumas vezes considerada controversa.^{64,67} A inserção de compostos na base de dados ZINC é realizada após passagem por filtro molecular que remove compostos contendo grupos funcionais altamente tóxicos/reativos (e.g., triflatos, haletos de alquila e percloratos).⁶⁴ Estão disponíveis também subconjuntos que foram submetidos a um processo de

filtragem adicional, denominados “Clean”, dos quais foram removidas as moléculas com reatividade moderada (e.g., aceptores de Michael, aldeídos e tióis).⁶⁴

Para eliminar os compostos com reatividade moderada, do subconjunto selecionado (“Leads Now”), empregou-se o processo de filtragem molecular disponível na rotina “Ligand Filtering”, dentro da interface Maestro (Schrödinger), empregando as mesmas regras de exclusão de compostos adotadas pelo banco de dados ZINC para seus subconjuntos “Clean”.⁶⁴

As etapas de preparo e otimização das estruturas tridimensionais para o processo de docagem molecular dos 14.783 compostos resultantes da etapa anterior, foram realizadas no programa LigPrep 3.0⁶⁸ (Schrödinger). Solicitou-se nesta etapa: i. eliminação de compostos na forma salina; ii. geração de tautômeros; iii. geração de estados de ionização, considerando solução aquosa e pH 7.0 ± 2.0 ; iv. manutenção da quiralidade especificada em arquivo e exploração de demais centros quirais; v. emprego do campo de força OPLS_2005.⁶⁹ Obteve-se ao final do procedimento 43.910 moléculas.

3.1.8.4 Procedimento de docagem molecular

Neste trabalho, as 43.910 moléculas obtidas na etapa anterior, foram submetidas ao processo de docagem molecular com precisão padrão (SP) do Glide 6.5 (Schrödinger), empregando os parâmetros recomendados pelo desenvolvedor e considerando flexibilidade dos ligantes. Em seguida, as poses dos primeiros 1.000 compostos ranqueados foram submetidas a etapa de precisão extra (XP).

Para simular o mesmo tratamento disponível no módulo QM-PLD da Schrödinger, as cargas parciais para os ligantes já modelados no sítio receptor foram recalculadas no programa Orca⁷⁰ (livre para uso acadêmico) usando método híbrido da Teoria do Funcional de Densidade (DFT, do inglês “density functional theory”) B3LYP, conjunto de bases químicas Pople 6-31 G** e convergência do método SCF (do inglês, “Self-consistent field”) normal.

Rotinas em linguagem Python foram estabelecidas para automatização de todo o processo, incluindo a montagem dos arquivos de entrada para o programa Orca,

submissão dos cálculos nas máquinas, extração das cargas parciais calculadas e remontagem dos arquivos no formato mol2.

Finalmente, buscando avaliar os efeitos das cargas parciais dos ligantes nos resultados da triagem virtual, adotou-se estratégia adicional, onde foram calculadas cargas parciais iniciais (i.e., anterior à submissão da rotina SP do programa Glide) com o programa Orca, empregando o método *ab initio* DFT - B3LYP, conjunto de bases químicas Pople 3-21G, e convergência do método SCF normal.

Todos os procedimentos de docagem molecular foram realizados em computador iMac (processador Intel i5 com 4GB de memória RAM) disponível no Laboratório de Química Medicinal e Computacional do Instituto de Física de São Carlos (LQMC - IFSC). Os cálculos empregando o programa Orca foram divididos entre 5 máquinas virtuais (8 núcleos de processamento ~ Intel i7 e 16 GB de memória RAM) disponível através do Portal Nuvem USP da Universidade de São Paulo (USP).

3.1.8.5 Seleção dos compostos para aquisição

Neste trabalho, as moléculas foram avaliadas e ordenadas pelo emprego da função de pontuação GlideScore (Schrödinger), que é derivada da função ChemScore,⁷¹ e que tem apresentado resultados bastante aceitáveis, especialmente considerando fatores de enriquecimento.^{72,73}

As moléculas de cada estratégia (i. módulo padrão Glide – SP e XP; ii. recálculo de cargas parciais simulando módulo QM-PLD; iii. Cálculo de cargas iniciais) foram ranqueadas, exclusivamente, pela função DockingScore (GlideScore ajustada com penalidades); e as 20 moléculas melhores ranqueadas para cada estratégia foram selecionadas para aquisição e avaliação experimental.

3.2 TcGAPDH

3.2.1 Clonagem no vetor de expressão pET28a

A expressão e purificação da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi* (TcGAPDH), conduzida em nosso grupo de pesquisa, consistia na sucessão de etapas de fracionamento com sulfato de amônio, seguida por etapas cromatográficas.^{74,75} Ainda que satisfatório, o protocolo fornece proteína com rendimento reduzido e com custo temporal elevado. Visando otimizar o processo de expressão e purificação proteica, propôs-se a troca do vetor de expressão no qual a TcGAPDH estava clonada (pET3a - Novagen) para uma versão mais moderna pET28a (Novagen). Para tanto, a sequência codificante da enzima foi extraída do seu vetor original através da digestão com as enzimas endonucleases NdeI e BamHI (Fermentas) e ligada ao vetor pET28a (previamente digerido com as mesmas enzimas endonucleases) com o auxílio da enzima T4 ligase (Fermentas) e conforme as indicações do fabricante.

O vetor de expressão construído (pET28a-TcGAPDH) foi empregado para a transformação da cepa bacteriana *E. coli* DH10B™ (Life Technologies) para propagação do material plasmidial, conforme protocolo descrito na seção 3.1.1.

3.2.2 Clonagem no vetor de expressão pETTrx-1a

Durante a fase de caracterização cinética da enzima TcGAPDH produzida e purificada a partir da construção descrita acima, demonstrou-se a necessidade de remoção da cauda de hexahistidina. Desta maneira, considerando as boas experiências obtidas com a família de vetores LIC optou-se pela reclonagem deste alvo molecular. Assim, a sequência codificante para TcGAPDH foi amplificado através da técnica de PCR, empregando sistema Phusion™ (Finnzymes), e seguindo as recomendações do fabricante. Na reação empregou-se o plasmídeo pET28a-

TcGAPDH (descrito na seção 3.2.1) como molde para a amplificação e os seguintes oligonucleotídeos iniciadores (Sigma® Life Science):

TcGAPDH_LIC_Fw - CAGGGCGCCATGCCCATCAAGGTCTG[‡]

TcGAPDH_LIC_Rv - GACCCGACGCGGTTACAACCTTGCCGAACG[§]

onde, destaca-se em azul a sequência de bases adicionais requerida pelo sistema de clonagem empregado.

A amplificação do fragmento (1080 bp) foi confirmada através de eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 39) e o produto da reação de amplificação purificado com auxílio do kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Após quantificação espectrofotométrica (NanoDrop 2000 – Thermo Scientific), o fragmento foi submetido ao tratamento com a enzima T4 polimerase (Fermentas), conforme descrito na seção 3.1.1, na presença de dATP, para formação de extremidades coesivas de ligação ao sistema LIC. O fragmento foi anelado ao vetor de expressão pETTrx-1a/LIC (temperatura ambiente por 30 min), previamente tratado com T4 polimerase, na presença de dTTP. O produto desta reação foi empregado para transformação em células quimiocompetentes de *E. coli* DH5α, conforme descrito na seção 3.1.1.

A presença do plasmídeo nos clones recombinantes foi avaliada através de PCR de colônia (Figura 39). Em seguida, as colônias positivas foram cultivadas em meio líquido LB por 16 h a 37° C e o DNA plasmidial da construção foi obtido com o auxílio do kit *Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega). Após a confirmação da sequência clonada através de sequenciamento, o DNA plasmidial foi utilizado para transformar células de expressão *E. coli* Rosetta (DE3). Testes de expressão proteica iniciais foram realizados para avaliar o sistema de indução e a proporção de proteína obtida na fração solúvel para a construção.

[‡] Senso (5' – 3')

[§] Antissenso (5' – 3')

3.2.3 Expressão e purificação da enzima *TcGAPDH*

Para a expressão em maior escala utilizou-se um pré-inóculo de 10 mL de meio LB incubado por 16 h a 37 °C para inoculação de 1 L de meio de auto indução ZYM-5052⁵⁰ (proporção de 1:100), ambos suplementados com os antibióticos canamicina (30 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL). O crescimento da cultura a 37 °C foi monitorado pela densidade ótica obtida no comprimento de onda de 600 nm (DO_{600nm}). Atingida a DO_{600nm} de 1,0 a temperatura foi reduzida para 20 °C para expressão proteica durante 20 h.

Após o tempo de expressão, as células foram centrifugadas a 6.000 g por 30 min na temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas no tampão de lise (50 mM Tris pH 7,4, 500 mM NaCl, 10% glicerol e 10 mM imidazol). Após a adição de 1 mM de PMSF e 4 mM de DTT, um lisado celular foi obtido através da sonicação em gelo (8 ciclos de 30 s seguidos com intervalo de 30 s entre cada ciclo). Os debris celulares foram separados por centrifugação a 20.000 g por 60 min a 4 °C. A fração solúvel foi filtrada em dispositivo Millex® (Millipore) de 0,45 µm e, em seguida, aplicada na coluna de afinidade Histrap HP 5 mL (GE Lifesciences).

Todas as etapas cromatográficas foram realizadas em sistema cromatográfico semiautomatizado Äkta (GE Lifesciences) com monitoramento da absorbância no UV ($\lambda = 280$ nm). A primeira etapa da purificação consistiu em cromatografia de afinidade (coluna Histrap HP) realizada com os tampões: A (50 mM Tris pH 7,4, 500 mM NaCl, 10% glicerol e 10 mM imidazol) e B (50 mM Tris pH 7,4, 500 mM NaCl, 10% glicerol e 500 mM imidazol), utilizando-se a estratégia de gradiente de 0-100% de imidazol (tampão A → tampão B) em um volume de 20 volumes de coluna (VC), mantendo constante o percentual de tampão B durante a eluição de frações proteicas.

A estratégia de purificação da *TcGAPDH* produzida a partir do vetor pET28a consistiu na coleta das frações contendo a proteína fusionada a cauda de hexahistidina, seguida de etapa de polimento por cromatografia de exclusão molecular com coluna Hiloal 16/60 Superdex 200 (GE Lifesciences), em tampão (100 mM trietanolamina pH 7,5, 200 mM NaCl, 1mM DTT).

Para a purificação da enzima produzida a partir do vetor pETTrx-1a, etapas adicionais foram empregadas. A fração contendo a *TcGAPDH* fusionada a cauda de hexahistidina foi coletada e submetida a uma cromatografia de gel filtração (HiTrap

Desalting – GE Lifesciences) utilizando o tampão A, para a remoção do excesso de imidazol (Figura 40).

A clivagem da 6xHis-Trx-*TcGAPDH* foi obtida pela incubação, da fração obtida na etapa anterior, com a protease TEV na proporção de 1:25 mg a 4°C por 16 h. Após a digestão, a *TcGAPDH* foi separada da 6xHis-Trx-*TcGAPDH* não digerida, caudas 6xHis-Trx e da protease TEV remanescentes em solução por um segundo passo de cromatografia de afinidade (Histrap HP) - Figura 40.

A etapa final de purificação foi realizada utilizando a cromatografia de exclusão molecular em coluna HiloLoad 16/60 Superdex 200 (GE Lifesciences), com tampão 100 mM trietanolamina pH 7,5, 200 mM NaCl, 1mM DTT. A pureza final, bem como a evolução da purificação em de cada etapa foi acompanhada por eletroforese desnaturante em gel de acrilamida 15% (SDS-PAGE) - Figura 41.

3.2.4 Avaliação cinética e triagem de inibidores da enzima *TcGAPDH*

Os ensaios de cinética enzimática e triagem dos candidatos a inibidores de *TcGAPDH* seguiu protocolos validados e padronizados, baseado em três metodologias:

Método Direto 1 ($\lambda = 340$ nm): Meio reacional constituído de 10 nM *TcGAPDH*; 100 mM solução-tampão trietanolamina pH 7,5; 30 mM arseniato de sódio; 400 μ M nicotinamida adenina dinucleotideo (NAD^+); 1 mM β -mercaptoetanol; 600 μ M gliceraldeído-3-fosfato (DL-G3P) e 1 mM ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). ⁷⁶

Método Direto 2 ($\lambda = 400$ nm): Meio reacional constituído de 20 nM *TcGAPDH*; 100 mM solução-tampão trietanolamina pH 7,5; 30 mM arseniato de sódio; 250 μ M Tio- NAD^+ ; 1 mM β -mercaptoetanol; 800 μ M DL-G3P e 1 mM EDTA. ⁷⁷

Método fluorimétrico acoplado ($\lambda_{\text{exc}} = 530$ nm e $\lambda_{\text{em}} = 590$ nm): Meio reacional constituído de 0,5 nM *TcGAPDH*; 100 mM solução-tampão trietanolamina pH 7,5; 30 mM arseniato de sódio; 1 mM β -mercaptoetanol; 1 mM EDTA; 40 μ M resazurina; 2 U/mL diaforase; 45 μ M NAD^+ e 400 μ M DL-G3P.

Em ambos os métodos, a reação foi iniciada com a adição do substrato G3P. A evolução da reação foi acompanhada por 15 min a 25 °C no respectivo comprimento de onda da metodologia adotada.

O método 1 foi empregado na validação das construções produzidas, assim como, indicador de qualidade para cada lote de purificação da *TcGAPDH*, por tratar-se de método direto puro. O método 2 foi empregado nos ensaios de triagem de inibidores, considerando a leitura espectrofotométrica na faixa de 400 nm e consequente redução dos efeitos de absorção da amostra, comparado aos ensaios conduzidos na região UV (método 1) - Figura 42.

O método 3 foi desenvolvido durante este Doutorado com intuito de reduzir os efeitos absorptivos das amostras analisadas, pois frequentemente esta absorção é pronunciada mesmo empregando a metodologia 2. Para tanto, adaptou-se um ensaio fluorimétrico com sistema acoplado resazurina-diaforase.⁷⁸ O ensaio foi validado pela determinação dos parâmetros cinéticos e para assegurar que a etapa catalisada pela enzima *TcGAPDH* é a etapa limitante do ensaio acoplado, observou-se a linearidade do sinal em resposta a concentrações crescente desta enzima (Figura 48).

Os ensaios foram adaptados para placa de 96 poços, realizados em triplicata com controles negativo (água ou 10% DMSO) e positivo (ácido iodoacético 400 μ M - inibidor conhecido da GAPDH⁷⁹). Para a identificação de inibidores de ligação lenta, os candidatos a inibidores foram incubados por 10 min com a mistura reacional antes do início do ensaio. Para assegurar que as atividades inibitórias mensuradas não provinham de inibição promíscua, tipicamente causada pela formação de agregados do inibidor com ele mesmo ou com a proteína,⁸⁰ os ensaios cinéticos foram repetidos na presença do detergente não iônico Triton X-100, na concentração final de 0.01 % (v/v). Em todos os casos, as medidas na presença do detergente não divergiram das medidas tomadas na sua ausência.

A habilidade de identificar compostos ativos a partir da triagem de grandes bibliotecas de compostos de maneira acurada e rápida é o requerimento fundamental para o ensaio bioquímico de triagem.⁵³ Com objetivo de comparar a qualidade dos ensaios definiu-se o coeficiente *Z-factor*, que essencialmente avalia quão clara é a discriminação entre os resultados obtidos por um número elevado de experimentos com controles positivos e negativos.⁸¹ Assim, determinou-se o coeficiente *Z* pela seguinte equação:

$$Z = 1 - \frac{(3\sigma_p + 3\sigma_n)}{|\mu_p - \mu_n|} \quad (1)$$

onde σ_p , σ_n , μ_p e μ_n são desvio padrão do controle positivo, desvio padrão do controle negativo, média do controle positivo e média do controle negativo, respectivamente.

Os compostos triados durante este Doutorado tiveram suas origens em: i. extratos/compostos puros derivados de produtos naturais oriundos do trabalho de bioprospecção guiada, conduzido em colaboração com o Prof. Dr. Paulo Cesar Vieira (UFSCar); ii. 31 compostos selecionados por estudo de triagem virtual,⁴⁷ e iii. 400 compostos pertencentes a coleção Malaria Box.⁸²

3.2.5 Caracterização dos inibidores identificados

Os inibidores que apresentaram inibição igual ou superior a 50% na concentração testada inicialmente, tiveram sua potência (IC_{50}) determinada em experimentos posteriores. Curvas cinéticas de inibição foram obtidas com concentrações variáveis dos compostos (concentrações que determinam entre 15-80% de inibição da atividade enzimática), obtendo no mínimo cinco pontos para a análise de regressão não-linear de melhor ajuste realizada no módulo de cinética enzimática do programa *GraphPad Prism*.

Para o estudo do mecanismo de inibição dos compostos selecionados, a velocidade inicial de reação foi determinada na ausência e presença de concentrações crescentes de inibidor. Em seguida, determinou-se as constantes cinéticas K_{Mapp} e V_{max} para substrato e cofator (G3P e NAD^+). Após a obtenção das curvas cinéticas, os dados foram analisados em gráficos de duplo-recíproco (gráficos de Lineweaver-Burk) para determinação do mecanismo de inibição dos compostos em estudo.

3.2.6 Ensaios de cristalização, cocrystalização e *soaking*

A TcGAPDH pura foi concentrada a 10 mg/mL com dispositivos Amicon® Ultra 15 Centrifugal Filter 30KDa (Millipore). Os ensaios de cocrystalização foram conduzidos com a condição de cristalização previamente identificada: 100 mM cacodilato de sódio pH 7,3, 100 mM de acetato de cálcio e 18% de PEG 8.000.⁷⁹ Para a obtenção de cocrystalais a solução proteica foi suplementada com concentrações variáveis (1-10 mM) dos ligantes selecionados e incubados por 30 min em gelo imediatamente anterior a montagem do ensaio. Para os experimentos de *soaking*, os crystalais formados na condição de cristalização descrita, foram transferidos e incubados em solução de crioproteção (15 % de glicerol na condição inicial) suplementada com o ligante (1-10 mM). A técnica de gota suspensa (do inglês, *hanging drop*) foi empregada para a montagem de todos dos experimentos de cristalização, assim como, incubação a temperatura controlada de 18 °C.

Para identificar e explorar outras condições de cristalização foram conduzidos ensaios de triagem com os kits comerciais da Qiagen (*Classics*, *ClassicsII*, *PEG*, *PEGII*, *JCSG I-IV suite*) e Hampton Research (*IndexHT*) com a proteína TcGAPDH na ausência de ligantes e presença.

Experimentos de difração de raios X foram conduzidos no difratômetro Micromax-007HF com sistema de detecção Rigaku R-Axis IV++, assim como, na linha de luz MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – Campinas/SP, conforme descrito na seção 3.1.6.

3.2.7 Desenvolvimento da ferramenta computacional Kinecteasy

Iniciou-se o desenvolvimento de um programa direcionado ao processamento automatizado de dados provenientes de ensaios de triagem de inibidores por técnicas espectrofotométricas. O programa, intitulado Kinecteasy, foi desenvolvido em Python versão 2.7.3, com base na plataforma Eclipse, em computador com sistema operacional Linux Ubuntu 12.04. A interface gráfica foi gerada com o auxílio do ambiente de desenvolvimento gráfico GTK+ Glade 3.8.3 (The Glade Project).

Adotou-se o desenvolvimento evolucionário, no qual a proposta primária é estabelecer uma implementação inicial e após a exposição aos usuários promover o aprimoramento através de novas versões. A implementação inicial almejada por Kinecteasy foi automatizar o processamento dos dados provenientes dos ensaios de triagem de inibidores, evitando possíveis erros pelo processo repetitivo e por manipulações não assistidas. Durante o desenvolvimento do Kinecteasy diversas funcionalidades foram implementadas, entre as quais, procurou-se estabelecer um fluxo padrão de processamento dos dados, através de etapas obrigatórias, padronizando a análise dos dados. A atual versão do programa pode ser obtida diretamente com o autor, porém algumas rotinas não estão completamente implementadas.

CAPÍTULO 4

Resultados e Discussão:
Enolase de *P. Falciparum*

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO: Enolase de *P. falciparum* (*Pfenolase*)

4.1 Clonagem da enzima *Pfenolase*

A adoção de um sistema de clonagem independente de ligação – LIC, ⁴⁸ possui vantagens que incluem: tornar o sistema independente do uso de enzimas endonucleases e DNA ligase e permitir a paralelização eficiente da clonagem do fragmento desejado em diferentes vetores de expressão através de protocolo simplificado.

O processo de clonagem iniciou-se com o planejamento diferenciado dos oligonucleotídeos iniciadores empregados na reação de amplificação do fragmento, onde inclui-se na porção 5' uma sequência específica para o sistema de clonagem LIC utilizado (descrito na seção 3.1.1). A amplificação da região codificante da enzima enolase de *P. falciparum* (1.344 pares de bases) foi realizada com sucesso (Figura 11), a partir das bibliotecas de cDNA produzidas com parasitas sincronizados nas fases de esquizonte (EZ) e trofozoíto (TF).

Figura 11 – Gel de eletroforese em agarose 1%. Reação de amplificação da enzima enolase, empregando como molde o cDNA produzido com parasitas sincronizados nas fases esquizonte (EZ) e trofozoíto (TZ).

Fonte: Elaborada pelo autor.

O fragmento amplificado foi submetido ao tratamento com a enzima T4 DNA polimerase, enzima que possui dupla atividade (polimerase no sentido 5' – 3' e exonuclease no sentido 3' – 5'). Esta última é explorada pelo sistema de clonagem

independente de ligação, onde a presença de apenas um deoxinucleotídeo na reação combinado com as sequências de nucleotídeos inseridas no planejamento dos oligonucleotídeos iniciadores, permitem a formação de extremidades coesivas.

O tratamento com a enzima T4 DNA polimerase foi aplicado de maneira similar aos vetores de expressão empregados, adaptados para este sistema, gerando extremidades coesivas compatíveis. As energias das interações entre as bases das extremidades coesivas do fragmento e do vetor são suficientemente altas para estabilizar a construção (vetor + fragmento), não havendo necessidade de uma etapa de ligação com DNA ligase dedicada. Assim, os fragmentos são anelados aos vetores de expressão através de uma reação de simples mistura, com incubação a temperatura ambiente. O produto desta reação é empregado diretamente na transformação de bactérias e a ligação fosfodiéster entre fragmento e vetor é estabelecida pelo sistema de reparo do próprio hospedeiro bacteriano.

O fragmento tratado foi clonado nos vetores de expressão pETM11/LIC, pETTrx-1a/LIC e pETNus-1a/LIC. Após a transformação das bactérias, os clones recombinantes foram avaliados por PCR de colônia (Figura 12). As colônias positivas foram utilizadas para produção de material plasmidial que, após confirmação da integridade por sequenciamento, foi empregado na transformação de bactérias competentes de expressão (Rosetta DE3).

Figura 12 – Gel de eletroforese em agarose 1%. Reação de PCR dos clones recombinantes para verificação da positividade das construções nos diferentes vetores de expressão.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2 Avaliação dos sistemas de expressão proteica

Para aumentar as chances de identificação do sistema de expressão mais adequado para condução de estudos estruturais, tipicamente, estabelece-se construções e condições de expressão em paralelo, que são testadas em pequena escala. Desta maneira, muitos parâmetros podem ser avaliados com redução dos custos (tempo e dinheiro), permitindo que a escolha do sistema de expressão torne-se mais racional.⁸³

Nesse trabalho, avaliou-se o efeito da cauda de hexahistina e das proteínas de fusão tiorredoxina e proteína NusA, no perfil de expressão do alvo proteico. As três estratégias selecionadas contemplam os melhores agentes solubilizantes e facilitadores de purificação reportados.⁹⁶⁻⁹⁷ A temperatura de expressão também foi um dos parâmetros avaliados (20 e 37 °C) devido ao seu grande impacto no perfil de expressão proteico. A expressão recombinante conduzida a baixa temperatura apresenta aumento da solubilidade de proteínas com tendência a agregação e redução da ação de proteases,⁸⁶ além de permitir cinética de enovelamento mais adequada. Para evitar o aumento do número de parâmetros avaliados, selecionou-se apenas a cepa de *E. coli* Rosetta (DE3) como hospedeiro para realizar a expressão. A cepa escolhida apresenta, além da baixa expressão de proteases, suplementação especial de tRNAs, assegurando níveis de expressão adequados mesmo em situações de divergência de uso de códons entre o organismo de origem da macromolécula e hospedeiro de expressão.

Os testes de expressão foram conduzidos e a influência dos parâmetros citados foi avaliada pelo perfil de expressão proteica (proporção de proteína expressa na fração solúvel) obtido por análise eletroforética desnaturante. Na Figura 14, observa-se o ganho na proporção de proteína solúvel para todas as construções, quando a expressão é conduzida em menor temperatura (20 °C), comparada com a expressão conduzida a 37 °C (Figura 13). Adicionalmente, é notável o rendimento superior resultante da expressão nos vetores pETM11/LIC e pETTrx-1a/LIC comparado a expressão no vetor pETNus-1a (Figura 14).

Ensaio iniciais de purificação foram conduzidos e indicaram dificuldades durante a purificação da *Pfenolase* quando expressada apenas com a cauda de

hexahistidina (*i.e.*, no vetor pETM11), portanto, o sistema de expressão escolhido para o escalonamento foi o vetor pETTrx-1a/LIC com expressão conduzida a 20 °C.

Figura 13 - Gel SDS-PAGE 15%. Perfil da expressão proteica de *P*fenolase conduzida a 37 °C.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 14 – Gel SDS-PAGE 15%. Perfil da expressão proteica de *P*fenolase conduzida a 20 °C.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3 Expressão e purificação da enzima *Pfenolase*

A expressão da *Pfenolase* no vetor pETTrx-1a/LIC foi conduzida em 8 L de meio autoindutor, temperatura de expressão de 20 °C por 16 h. A purificação baseou-se em etapas cromatográficas sucessivas, sendo os objetivos para cada etapa: **i.** isolar a 6xHisTrx*Pfenolase* do lisado proteico por afinidade (Figura 15 A); **ii.** substituir o tampão para aumentar a eficiência da reação de digestão com a protease TEV (Figura 15 B); **iii.** isolar a *Pfenolase* das remanescentes 6xHisTrx*Pfenolase*, 6xHisTrx e TEV (Figura 15 C); **iv.** garantir a homogeneidade do estado oligomérico e conformacional (Figura 15 D).

Figura 15 - Etapas cromatográficas empregadas na purificação de *Pfenolase*, onde E indica a fração em que a proteína de interesse foi eluída. (A) Cromatografia de afinidade - HisTrap HP 5 mL. (B) Cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-25. (C) Segundo passo de cromatografia de afinidade em HisTrap HP 5mL (D) Cromatografia de exclusão molecular em Superdex 200 16/60.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O alto grau de pureza obtido pode ser constatado pela eluição com pico isolado, bem determinado e simétrico durante a etapa cromatográfica de exclusão molecular

(Figura 15 D), bem como, pela presença de uma banda única no gel de eletroforese desnaturante (Figura 16). O rendimento final típico obtido foi superior a 50 mg/L de expressão.

Figura 16 – Gel de eletroforese SDS-PAGE 15%. Etapas de purificação de PfEnolase. MK (Marcador de massa molecular), IF (Fração insolúvel), SF (Fração solúvel), FT (Fração não ligada na primeira cromatografia de afinidade), EF (Fração eluída da primeira cromatografia de afinidade), TT (Digestão com TEV protease), 2EF (Fração eluída da segunda cromatografia de afinidade) e GF (Fração eluída da cromatografia de exclusão molecular).

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4 Ensaios de cinética enzimática - *Pfenolase*

A atividade enzimática da enzima enolase foi avaliada através de ensaio espectrofotométrico, no qual monitorou-se diretamente a formação do produto fosfoenolpiruvato (PEP) a partir do substrato 2-fosfoglicerato (2-PG). As curvas de velocidades iniciais (Figura 17) foram utilizadas para a determinação do valor de K_M para o substrato de $38 \pm 4 \mu M$. Esse dado está coerente com o valor de $41 \pm 4 \mu M$ reportado anteriormente.³¹

Devido às limitações do emprego do ensaio espectrofotométrico direto (leitura em 240 nm) para a triagem de pequenas moléculas candidatas a inibidores da *Pfenolase*, houve a necessidade do desenvolvimento de ensaio cinético alternativo. Nesse sentido, optou-se pelo sistema bioluminescente da luciferase, através de sistema combinado com a enzima piruvato quinase (Figura 18 A). A padronização e validação do ensaio ocorreu pela determinação do parâmetro cinético K_M para o

substrato (2-PG) da enolase. O valor de K_M obtido no ensaio acoplado foi de $30 \pm 4 \mu\text{M}$ (Figura 18 B), o qual é coerente com o valor determinado no ensaio direto. Ensaio empregando bioluminescência são amplamente empregados em ensaios de triagem em larga escala.⁸⁷ Este novo ensaio foi empregado na etapa de triagem da coleção de compostos Malaria Box.⁸²

Figura 17 - Determinação pelo método direto do parâmetro cinético K_M , por regressão não-linear, para o substrato 2-PG. Todas as medidas foram realizados em triplicata.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 18 – (A) Esquema da reação combinada ao sistema de luciferase para monitoramento da atividade enzimática enolase. (B) Curva de velocidades iniciais obtidos pela reação acoplada ao sistema bioluminescente. Todas as medidas foram realizados em triplicata.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.5 Triagem de inibidores

4.5.1 Malaria Box

O *Malaria Box* é uma coleção de 400 compostos com atividade antimalárica observada em ensaios fenotípicos, resultado de campanhas de triagem das empresas farmacêuticas GSK e Novartis, juntamente com o Hospital St. Jude Children's Research.⁸² Os compostos foram organizados por esforço da *Medicines for Malaria Venture* (MMV), com o objetivo de distribuir gratuitamente compostos bioativos que visam catalisar/acelerar a pesquisa para descoberta de fármacos para o tratamento da malária e doenças negligenciadas.⁸²

O envio dessa coleção é feito em placas de 96 poços contendo 10 µL dos compostos na concentração de 10 mM. A coleção foi diluída para 500 µM e os compostos foram avaliados na concentração de 50 µM. Do total de 400 compostos disponíveis no *Malaria Box*, identificou-se 50 compostos com atividade inibitória superior a 40% na concentração máxima avaliada (Tabela 2). Este número representa 12,5% de compostos ativos frente a *Pfenolase*. Um número bastante significativo quando comparado ao número tipicamente esperado para uma campanha HTS (i.e., ~ 1%).⁸⁸ Ressalta-se aqui o diferencial desta coleção de compostos, já avaliada anteriormente, assim como, o potencial de relação da enzima *Pfenolase* com os efeitos fenotípicos observados.

No total, 10 compostos apresentaram atividade inibitória superior a 80% (Figura 19). Estes compostos, com no máximo 43% de similaridade entre eles, diferem dos inibidores de enolase reportados anteriormente, tipicamente análogos do substrato da enzima.⁸⁹ Destaca-se as classes de derivados de quinolina, benzodiazol hidrazina, dihidroxinaftaleno, bromofenolpiridazina e tiazopirimidina que promoveram 100% de inibição na concentração avaliada. Essas moléculas com estruturas químicas inovadoras são, portanto, altamente promissoras e apresentam-se como candidatos a compostos líderes para o desenvolvimento de novos inibidores mais potentes e seletivos para a enzima *Pfenolase*. Estes compostos serão adquiridos para os ensaios posteriores de determinação de potência, mecanismo de inibição, juntamente com os estudos estruturais do modo de ligação.

Tabela 2 – Compostos da coleção *Malaria Box* que apresentaram atividade inibitória superior a 40% na concentração única de 50 μ M frente a *P*fenolase.

Malaria Box Cod.	% inibição 50 μ M	Malaria Box Cod.	% inibição 50 μ M
MMV000570	100	MMV396679	54
MMV666607	100	MMV019700	54
MMV085203	100	MMV008149	53
MMV665934	100	MMV008127	53
MMV665971	100	MMV666062	52
MMV306025	97	MMV009060	52
MMV085583	93	MMV006913	52
MMV396672	90	MMV019127	52
MMV020439	85	MMV665987	52
MMV019110	81	MMV007228	52
MMV007224	78	MMV008416	50
MMV080034	78	MMV008956	50
MMV018984	76	MMV665827	50
MMV011522	75	MMV008270	49
MMV020885	70	MMV007907	48
MMV084940	67	MMV667487	48
MMV019871	65	MMV000442	48
MMV006172	63	MMV020912	47
MMV007574	60	MMV666693	46
MMV001038	59	MMV665940	46
MMV665899	59	MMV011944	46
MMV007181	57	MMV645672	46
MMV000620	55	MMV000653	45
MMV007127	55	MMV665909	45
MMV007113	55	MMV665857	45

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 19 – Compostos da coleção *Malaria Box* promissores com atividade inibitória superior a 80% na concentração de 50 μ M frente a enzima *Pf*enolase.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.6 Ensaios de cristalização e coleta de dados de difração de raios X da *Pf*enolase

A *Pf*Enolase pura foi concentrada inicialmente a 10 mg/mL e submetida a triagem de ~500 condições de cristalização, empregando-se a estratégia de matriz esparsa (kits *Classics*, *ClassicsII*, *Peg*, *PegII* – Qiagen e *IndexHT* – Hampton Research), e a técnica de difusão por vapor com gota assentada (do inglês, *sitting drop* - Figura 20). Durante a montagem das caixinhas de cristalização observou-se precipitação intensa nas gotas, no entanto, no dia posterior a montagem elas estavam completamente translúcidas e, assim, permaneceram até o final do experimento. Portanto, nova triagem foi estabelecida com a proteína concentrada a 30 mg/mL.

Figura 20 - Técnicas de cristalização por difusão de vapor, gota assentada e gota suspensa, empregadas na triagem e otimização das condições de cristalização da *Pf*Enolase, respectivamente.

Fonte: Maluf et al ⁸³

A condição mais promissora identificada (condição D10 do kit *Pegs Suite* - Qiagen) composta de 0,1 M Tris pH 8,5 e 25% PEG 8.000, foi submetida ao processo de otimização para obtenção de cristais apropriados aos ensaios de difração de raios X. Os experimentos de otimização buscaram explorar a influência de diferentes fatores que influenciam o processo de cristalização, realizados com a técnica da gota suspensa (do inglês, *hanging drop* - Figura 20). Dentre eles cita-se: **i.** concentração dos componentes da condição de cristalização; **ii.** concentração da macromolécula; **iii.** pH da condição de cristalização.

Cristais promissores foram obtidos nos pHs 8,0 e 8,5 no intervalo de concentração proteica entre 30 e 60 mg/mL, 20-26% PEG 8.000 e com tempo de crescimento de 10 a 20 dias (Figura 21). O comportamento atípico de precipitação da

proteína aliado a concentração extremamente elevada necessária para produzir os cristais, podem explicar o insucesso na tentativa de cristalização da *Pfenolase* por outros pesquisadores.⁹⁰

Figura 21 – Cristais de *Pfenolase* obtidos durante a fase de otimização das condições de cristalização.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os cristais obtidos na etapa de otimização foram resfriados a temperatura criogênica (-196 °C) e testes de difração de raios X foram conduzidos no difratômetro disponível no Instituto de Física de São Carlos (IFSC - USP). Um conjunto completo de dados de difração de raios X foi obtido a resolução de 1,75 Å. Paralelamente, cristais foram também encaminhados para o Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS – Campinas), linha de luz MX2, onde uma série de conjuntos de dados foram coletados. A Figura 22 indica uma imagem representativa do padrão de difração de raios X obtido durante a coleta de dados realizada na linha MX2. Pode-se perceber que os pontos de difração na imagem são bem definidos, reflexo da qualidade dos cristais obtidos.

Figura 22 – Imagem representativa do padrão de difração de raios X obtidos para os cristais de *Pfenolase*, obtidos na linha de luz MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os conjuntos de dados de difração coletados para a forma apo, complexo com substrato fosfoenolglicerato (2-PG), complexo fosfoenolpiruvato (PEP), complexo PEP + Mg^{+2} e complexo com o inibidor ENOBLOCK foram processados e os principais parâmetros estatísticos do processamento podem ser observados na Tabela 3.

O problema das fases foi resolvido por substituição molecular utilizando a cadeia A (i.e., apenas os elementos proteicos) da estrutura cristalográfica da homóloga, proveniente *T. brucei* (PDB ID, 2PTY), como modelo de busca e o programa Phaser.⁶⁰ A solução fornecida pelo programa foi verificada pelos parâmetros estatísticos favoráveis, assim como, pelos mapas de densidade eletrônica iniciais. A unidade assimétrica, composta de duas cadeias (A e B), contém o homodímero funcional (Figura 23).

Os mapas iniciais ($2Fo - Fc$ contornado a 1σ e $Fo - Fc$ contornado a 3σ) foram empregados nas etapas de construção e refinamento das coordenadas no espaço real, seguido por refinamento com restrições estereoquímicas no espaço recíproco. Os ciclos de reconstrução/refinamento foram acompanhados pela avaliação dos parâmetros estatístico R e R_{free} . O modelo foi considerado finalizado no momento em que alterações nas coordenadas atômicas não produziram redução adicional dos avaliadores estatísticos, e assim, o processo de validação final foi conduzido.

O modelo foi validado no servidor Molprobit, ⁶³ que essencialmente realiza avaliações geométricas e estereoquímicas, entre elas: **i.** Análise de contato incluindo todos os átomos; **ii.** Análise de cadeias laterais dos resíduos Asn, Gln e His; **iii.** Análise de ângulos de torção (Ramachandran) e rotâmeros. Além disso, o modelo final passou por inspeção visual local, para assegurar que artefatos não pudessem ser mascarados pelos avaliadores estatísticos globais.⁹¹ Não houve a identificação de qualquer falha no modelo construído, no entanto, ressalta-se a presença de dois resíduos Arg413 das cadeias A e B posicionadas em regiões “não permitidas” no Diagrama de Ramachandran (Figura 24). Muito embora tais resíduos encontrem-se em regiões não favoráveis, eles não comprometem a qualidade global do modelo, pois estão muito bem posicionados na densidade eletrônica local, sendo este fenômeno comumente observado em outras estruturas de enolase depositadas no Banco de Dados de Proteínas (PDB). Estes resíduos encontram-se na interface de dimerização, portanto, são forçados a adotar esta conformação menos frequente do diagrama.

Tabela 3 – Parâmetros estatísticos obtidos durante o processamento e refinamento dos dados cristalográficos coletados para os cristais da enzima Pfenolase.

	APO	2-PG	PEP	PEP+MG	ENOBLOCK
<u>Coleta</u>					
Fonte	Micromax-007	Micromax-007	Micromax-007	MX2 - LNLS	Micromax-007
Detector	R-AXIS IV ++	R-AXIS IV ++	R-AXIS IV ++	PILATUS 2M	R-AXIS IV ++
$\Delta\phi$	0,5	0,5	0,5	0,2	0,5
Imagens	391	326	230	1800	267
<u>Processamento</u>					
Resolução (Å)	89,64 – 1,60	77,78 – 1,88	77,53 – 1,80	47,74 – 1,80	47,28 – 1,80
Grupo espacial	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁
Parâmetros de cela - a,b,c (Å)	60,56; 77,46; 90,18	60,62; 77,78; 90,16	60,65; 77,53; 90,09	61,12; 77,01; 87,42	59,94; 77,74; 90,28
Parâmetros de cela (°)	$\alpha=\gamma=90,00$ $\beta=96,28$	$\alpha=\gamma=90,00$ $\beta=96,01$	$\alpha=\gamma=90,00$ $\beta=95,72$	$\alpha=\gamma=90,00$ $\beta=95,55$	$\alpha=\gamma=90,00$ $\beta=96,43$
N° reflexões totais	376.538	222.422	178.424	422.277	143.187
N° reflexões únicas	108.746	65.086	74.565	73.934	64.989
Multiplicidade	3,5 (2,8)	3,4 (3,5)	2,4 (2,3)	5,7 (4,5)	2,2 (2,1)
Completeza (%)	99,8 (99,8)	95,0 (90,9)	96,7 (100)	98,8 (97,4)	85,3 (87,8)
R _{meas} (%)	9,0 (52,4)	9,2 (66,4)	6,4 (41,1)	7,5 (49,0)	6,0 (34,0)
$\langle I \rangle / \sigma(I)$	9,3 (2,3)	12,1 (2,1)	10,9 (2,1)	13,5 (2,1)	10,3 (2,3)
Mosaicidade média	0,40	0,28	0,20	0,47	0,53
<u>Refinamento</u>					
R _{work} ⁹² (%)	17,77	18,95	17,05	19,50	19,80
R _{free} ⁹² (%)	21,82	23,85	21,50	23,60	24,05

* Valores entre parênteses referem-se a última faixa de resolução

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 23 - Representação do modelo cristalográfico construído para enzima enolase de *P. falciparum*. Em destaque as cadeias A (vermelho) e B (verde) que compõe o homodímero cristalizado.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 24 – (A) Diagrama de Ramachandran para a estrutura cristalográfica apo da *Pfenolase*. (B) Resíduos Arg413 *outliers* localizados na interface de dimerização.

A

B

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.7 Análises Estruturais – Pfenolase

A estrutura tridimensional de enolase de *P. falciparum* determinada, apresentou-se um homodímero na unidade assimétrica (Figura 23), em conformidade com os resultados obtidos com a enzima em solução, revelado pelo perfil de eluição durante a etapa de cromatografia de exclusão molecular em coluna calibrada. A maioria das enolases estudadas, até o momento, apresentam-se também na forma diméricas, com poucas exceções na forma octamérica.^{29,93}

A enzima enolase está presente em vasto número de organismos e apresenta altíssima conservação estrutural entre as espécies, especialmente dos resíduos que compõe o sítio catalítico, resultando no compartilhamento de propriedades cinéticas bastante similares. Essencialmente, as diferenças são encontradas em resíduos de superfície e regiões de alça (Figura 26). A estrutura pode ser dividida em dois domínios, N-terminal e C-terminal, onde o N-terminal é composto por 3 fitas β e 3 hélices α (Figura 25 A), enquanto o C-terminal é formado por um barril α/β (também conhecido como barril TIM), que é caracterizado como um cilindro formado por oito fitas β paralelas circundadas por oito α hélices paralelas (Figura 25 B). Não diferente das demais enzimas que apresentam este tipo de enovelamento, o sítio ativo está localizado na parte superior do barril.

Figura 25 - Distribuição de domínios da enzima Pfenolase. (A) Domínio N-terminal. (B) Domínio C-terminal.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Organismos vertebrados possuem três isoformas, expressas por diferentes genes, da enzima enolase - Isoforma α , ubíqua; Isoforma β , músculo específica; Isoforma γ neurônio específica.⁸⁹ Comparações sequenciais indicam entre 83% e 87% de identidade sequencial entre as isoformas. Enolase γ é a proteína cerebral majoritária, podendo constituir de 0,4 – 2,2% das proteínas totais solúveis do cérebro, em alguns neurônios a concentração pode chegar a 4%. As razões para esta distribuição elevada não são completamente compreendidas, mesmo considerando a alta demanda energética das células neuronais, pois a maior parte dela é gerada pela oxidação completa da glucose.⁹⁴

A análise do alinhamento sequencial entre as três isoformas da enolase humana, juntamente com a enolase de *P. falciparum*, evidenciam o alto grau de conservação e identidade (> 60%). Na Figura 26, destacado em verde estão os resíduos atribuídos a função catalítica; em roxo os resíduos distantes em até 10 Å a partir da posição do substrato 2-PG. Os únicos resíduos que compõem o sítio, e suas vizinhanças, diferentes entre as sequências alinhadas são a Cys159 e Phe177. No entanto, o primeiro está enterrado no barril e o segundo está voltado para a superfície.

A semelhança estrutural pode ser considerada uma desvantagem para o desenvolvimento de fármacos, em virtude da dificuldade de obtenção de moléculas seletivas, porém esta alta semelhança é o reflexo da importância do papel dessa proteína nos organismos, não tolerando mutações ao longo da evolução. No entanto, deve-se ressaltar que embora para o parasita a via glicolítica seja essencial, para células humanas saudáveis sua importância é menor, pois a principal fonte de energia é proveniente do ciclo de Krebs.⁹⁵

Na Figura 26 pode-se evidenciar também a presença de inserção na sequência de *P. falciparum*, pentapeptídeo ¹⁰⁴EWGWS¹⁰⁹, ausente nas isoformas humanas. Este peptídeo, cuja essencialidade para função da enzima foi comprovada,⁹⁰ apresenta propriedades imunogênicas bastante expressivas, e está sendo explorado para avaliação de vacinas e diagnóstico.⁹⁶ Na Figura 27 pode-se observar o potencial imunogênico deste fragmento, devido sua exposição e diferença significativa para a superfície proteica quando comparada com a enzima humana.

Figura 26 - Alinhamento das sequências de aminoácidos para as enzimas enolase de *P. falciparum* e as três isoformas humanas. Em verde, resíduos catalíticos; em vermelho, pentapeptídeo inserido; e roxo, resíduos a uma distância de até 10Å do substrato.

	10	20	30	40	
<i>falciparum</i> /1-446	1 MAHVITRINAREIL	DSRGNPTVEVDLETNLGIFRAAV	PSGASTGIYE	47	
<i>humana-alpha</i> /1-434	1 MS - - ILKIHAREIF	DSRGNPTVEVDLFTSKGLFRAAV	PSGASTGIYE	45	
<i>humana-beta</i> /1-434	1 MA - - MQKIFAREIL	DSRGNPTVEVDLHTAKGRFRAAV	PSGASTGIYE	45	
<i>humana-gama</i> /1-434	1 MS - - IEKIWAREIL	DSRGNPTVEVDLYTAKGLFRAAV	PSGASTGIYE	45	
	50	60	70	80	90
<i>falciparum</i> /1-446	48 AL	ELRDNDKSRYL	LKGKVQKAIKNINEIIAPKLI	- - GMNCTEQKKIDN	92
<i>humana-alpha</i> /1-434	46 AL	ELRDNDKTRYMGKGVSKAVEHINKTIAPALVSKKLNVT	EQEKIDK	92	
<i>humana-beta</i> /1-434	46 AL	ELRDGDKGRYL	LKGKVLKAVENINNTLGPALLQKKLSVVDQEKVDK	92	
<i>humana-gama</i> /1-434	46 AL	ELRDGDKQRYL	LKGKVLKAVDHINSTIAPALISSGLSVVEQEKLDN	92	
	100	110	120	130	
<i>falciparum</i> /1-446	93 LMVEELDGSKN	EWGWSKSKLGANAIIAISMAVCRAGAAANKVSLYKY	139		
<i>humana-alpha</i> /1-434	93 LMI - EMDGTEN - - - -	KSKFGANAII LGVSLAVCKAGAVEKGVPLRYH	133		
<i>humana-beta</i> /1-434	93 FMI - ELDGTEN - - - -	KSKFGANAII LGVSLAVCKAGAAEKGVPLRYH	133		
<i>humana-gama</i> /1-434	93 LML - ELDGTEN - - - -	KSKFGANAII LGVSLAVCKAGAAERELPLRYH	133		
	150	160	170	180	
<i>falciparum</i> /1-446	140 LAQLAGKKSDQMVLVPV	CLNVI	NGGSHAGNKL	SFQEFMI	IVPVGAPSF 186
<i>humana-alpha</i> /1-434	134 IADLAGN - - SEVILPVP	AFNVI	NGGSHAGNKL	AMQEFMI	ILPVGAANF 178
<i>humana-beta</i> /1-434	134 IADLAGN - - PDLILPVP	AFNVI	NGGSHAGNKL	AMQEFMI	ILPVGASSF 178
<i>humana-gama</i> /1-434	134 IADLAGN - - SDLILPVP	AFNVI	NGGSHAGNKL	AMQEFMI	ILPVGAESF 178
	190	200	210	220	230
<i>falciparum</i> /1-446	187 KEALRYGAEVYHTLKSEI	KKKYGIDATNVG	DEGGFAPNII	LNANEALD	233
<i>humana-alpha</i> /1-434	179 REAMRIGADEVYHNLKNVI	KEKYGKDATNVG	DEGGFAPNII	LENKEGLE	225
<i>humana-beta</i> /1-434	179 KEAMRIGADEVYHHLKGV	IKAKYGKDATNVG	DEGGFAPNII	LENNEALE	225
<i>humana-gama</i> /1-434	179 RDAMRLGADEVYHTLKGV	IKDKYGKDATNVG	DEGGFAPNII	LENSEALE	225
	240	250	260	270	280
<i>falciparum</i> /1-446	234 LLVTAIKSAGYEGKVKIA	MDVAASE	EFYNS	ENKTYDLD	FKTPNNDKSL 280
<i>humana-alpha</i> /1-434	226 LLKTAIGKAGYTDKVVIG	MDVAASE	EFFRS - -	GKYDLDFKSPD -	DPSR 269
<i>humana-beta</i> /1-434	226 LLKTAIQAAGYPDKVVIG	MDVAASE	EFYRN - -	GKYDLDFKSPD -	DPAR 269
<i>humana-gama</i> /1-434	226 LVKEAIDKAGYTEKIVIG	MDVAASE	EFYRD - -	GKYDLDFKSPT -	DPSR 269
	290	300	310	320	
<i>falciparum</i> /1-446	281 VKTGAQLVDLYIDL	VKKYPVVSIEDPFD	QDDWENYAKLTAA	IGKDVQ	327
<i>humana-alpha</i> /1-434	270 YISPDQLADLYKSF	IKDYPVVSIEDPFD	QDDWGAWQKFTAS	AG - - IQ	314
<i>humana-beta</i> /1-434	270 HITGEKLGELYKSF	IKNYPVVSIEDPFD	QDDWATWTSF	LSGVN - - IQ	314
<i>humana-gama</i> /1-434	270 YITGDQLGALYQDF	VVRDYPVVSIEDPFD	QDDWAWSKFTAN	VG - - IQ	314
	330	340	350	360	370
<i>falciparum</i> /1-446	328 I	VGDDLVTNPTRITKALEKNACNA	LLLKVNQ	IGSITEAIEACLLSQ	374
<i>humana-alpha</i> /1-434	315 V	VGDDLVTNPKRIAKAVNEKSCNC	LLLKVNQ	IGSVTESLQACKLAQ	361
<i>humana-beta</i> /1-434	315 I	VGDDLVTNPKRIAQAVEKKACNC	LLLKVNQ	IGSVTESIQACKLAQ	361
<i>humana-gama</i> /1-434	315 I	VGDDLVTNPKRIERAVEEKACNC	LLLKVNQ	IGSVTEAIIQACKLAQ	361
	380	390	400	410	420
<i>falciparum</i> /1-446	375 KNNWGV	MVSHRSGETEDVF	IADLVVALRTGQ	IKTGAPCRSE	RNAKYN 421
<i>humana-alpha</i> /1-434	362 ANGWGV	MVSHRSGETEDTF	IADLVVGLCTGQ	IKTGAPCRSE	RLAKYN 408
<i>humana-beta</i> /1-434	362 SNGWGV	MVSHRSGETEDTF	IADLVVGLCTGQ	IKTGAPCRSE	RLAKYN 408
<i>humana-gama</i> /1-434	362 ENGWGV	MVSHRSGETEDTF	IADLVVGLCTGQ	IKTGAPCRSE	RLAKYN 408
	430	440			
<i>falciparum</i> /1-446	422 QLLRIEESLGNNAVFAGEK	FRL - QLN			446
<i>humana-alpha</i> /1-434	409 QLLRIEELGSKAKFAGRN	FNRNPLAK			434
<i>humana-beta</i> /1-434	409 QLMRIEEALGDKAIFAGR	KFRNPKAK			434
<i>humana-gama</i> /1-434	409 QLMRIEELGDEARFAGHN	FNRNPSVL			434

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 27 – Alinhamento estrutural da enzima *Pfenolase* e homóloga humana (PDB 3UCC). Em azul, o pentapeptídeo inserido presente na enzima de *P. falciparum*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na estrutura apo determinada, identificou-se um dos sítios de coordenação para Mg^{+2} (Sítio I) desta metaloproteína (Figura 28). Ressalta-se que em nenhum dos estágios de purificação ou cristalização houve a adição deste íon, assim, sua manutenção desde a expressão em *E. coli*, deveu-se a alta afinidade apresentada. Este dado foi considerado na etapa de preparo do sítio catalítico para os experimentos computacionais de triagem virtual.

Figura 28 – Sítio I de coordenação com íon Mg^{+2} na estrutura apo, ocupado mesmo sem haver a adição durante a purificação ou cristalização.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Complexos cristalográficos da enzima *P*fenolase foram obtidos: i. substrato da reação (2PG), ii. produto da reação (PEP) e iii. produto da reação PEP + Mg^{+2} Sítio II. Como pode-se evidenciar na Figura 29, os mapas de densidade eletrônica ($2Fo - Fc$) permitiram a modelagem destas moléculas de maneira indubitável. Nos complexos *P*fenolase-2PG e *P*fenolase-PEP, contento apenas o substrato e produto da reação, respectivamente, não houve ajuste estrutural significativo; no entanto, no complexo *P*fenolase-PEP+ Mg^{+2} , com a ocupação do sítio II do íon Mg^{+2} o mesmo não foi observado. A entrada do segundo íon Mg^{+2} estabiliza a alça formada pelos resíduos 39-46, levando a intenso rearranjo estrutural com fechamento total do sítio.

Figura 29 – Mapas de densidade eletrônica $2Fo - Fc$ (contornados a 1σ) dos complexos cristalográficos da enzima *P*fenolase, obtidos com o substrato (2PG) e produto (PEP).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A análise comparativa do complexo *P*fenolase-PEP+ Mg^{+2} com a estrutura apo, permitiu a identificação das 3 regiões que sofrem as maiores adaptações mediante a interação com o substrato/produto (Figura 30 e Figura 31). As alças formadas pelos resíduos 39-46, 160-175 e 255-282 ajustam-se após a interação com o ligante, resultando no fechamento total do sítio (Figura 31). Diferentemente dos relatos da literatura,⁸⁹ os complexos obtidos demonstram que as alterações estruturais dependem da presença do íon Mg^{+2} , além dos ligantes substrato/produto propriamente ditos. Os complexos obtidos servirão como material fundamental no estudo já em andamento, em colaboração com Dr. José Fernando Ruggiero Bachega, do mecanismo enzimático da enolase por métodos computacionais híbridos. Este estudo visa a elucidação do mecanismo e do par de resíduos catalíticos responsáveis pela reação, que até o momento não são completamente compreendidos.⁸⁹

Figura 30 – Distribuição dos RMSD por resíduo a partir do alinhamento das estruturas apo e complexo iii (PEP + Mg). Em destaque as três regiões (alças) que se adaptam em virtude da ligação com o substrato/produto.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 31 – Alinhamento estrutural das estruturas apo e complexo PEP + Mg. Em azul, a estrutura apo e em vermelho, o complexo onde evidencia-se as mudanças conformacionais de três alças próximas ao sítio catalítico mediada pela interação com o substrato/produto e estabilizada pela entrada do íon Mg^{+2} adicional.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Recentemente, em estudo de triagem conduzido com objetivo de identificar moléculas capazes de modular a sobrevivência de células cancerosas em ambiente de hipóxia, identificou um composto bastante potente.⁹⁷ A busca pela macromolécula envolvida neste fenômeno fenotípico observado, revelou a enzima enolase. A potência do inibidor identificado (Enoblock) foi determinada frente a enolase ($IC_{50} = 576 \text{ nM}$).⁹⁷

Com objetivo de identificar as bases moleculares responsáveis por esta inibição através de estudos cristalográficos, solicitou-se amostra do composto junto ao pesquisador responsável pelo estudo. Pela indisponibilidade de massa para número elevado de experimentos, apenas um experimento de inibição foi realizado contra a enzima enolase de *P. falciparum*, onde obteve-se 100 % de inibição na concentração de 50 μM . O restante do material foi empregado em experimentos de *soaking*. Durante a coleta do conjunto de dados do cristal tratado, houve queda de energia no campus impedindo a obtenção de um conjunto com completeza superior a 90%. No entanto, os dados obtidos foram processados e são suficientes para revelar que o inibidor Enoblock liga-se a enzima enolase, porém em um sítio de ligação que fica na interface de dimerização. O modo de ligação deste inibidor não foi completamente elucidado, mas a identificação deste novo sítio abre fronteiras para planejamento, especialmente considerando as diferenças existentes com o homólogo humana neste sítio.

Figura 32 – À esquerda, estrutura química 2D do Enoblock. À direita, Mapas de densidade eletrônica $F_o - F_c$ (contornados a 3 σ) obtidos para o complexo da enzima *P*fenolase com o inibidor Enoblock.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.8 Triagem virtual de candidatos a inibidores da enzima *P*fenolase

Fundamentalmente, existem duas estratégias para a triagem virtual de candidatos a ligantes/inibidores. A primeira estratégia utiliza informação estrutural do alvo receptor e a segunda utiliza informação sobre a estrutura química de ligantes conhecidos. Tipicamente, a principal desvantagem desta última modalidade é o tendenciamento em relação a descoberta de moléculas similares. Assim, quando o objetivo do estudo é a identificação de novos esqueletos moleculares, a primeira modalidade descrita é a mais adequada.

A triagem virtual consiste na recuperação do maior número de compostos potencialmente bioativos de uma coleção de compostos inicial. Brevemente, um elevado número de compostos iniciais é reduzido pela aplicação de algoritmo computacional e apenas um número reduzido de compostos é selecionado para a avaliação/confirmação experimental. Os resultados obtidos neste processo dependem, no entanto, das escolhas acerca do sítio empregado para o processo de docagem molecular, base de compostos inicial, algoritmos de posicionamento e pontuação, entre outros.

A identificação de estruturas químicas inovadoras como compostos líderes é o principal objetivo da fase inicial da descoberta e planejamento de fármacos e figura como um dos gargalos deste processo. No início da década de 1990, empregando técnicas de automatização de alta tecnologia, estabeleceu-se a triagem experimental em larga escala, chamada HTS (do inglês, *High-Throughput Screening*),⁶⁴⁻⁶⁵ cuja as promessas foram a identificação e fornecimento de compostos líderes para os grupos de química medicinal. Tais campanhas apresentaram-se como ferramentas úteis, no entanto, com elevado custo experimental associado.¹⁰⁰

A triagem virtual de compostos tem sido considerada um método cada vez mais importante nesta fase de identificação de compostos bioativos. Determinado pela disponibilidade de algoritmos cada vez mais precisos e pelo avanço da capacidade do processamento computacional. A triagem virtual permite a avaliação de um número considerável de compostos em tempos reduzidos, apresentando custos reduzidos quando comparados ao HTS.⁹⁸

O número de ensaios de triagem virtual vem crescendo e hoje pode ser comparado com o número de campanhas HTS,¹⁰¹ mesmo assim, pode-se dizer que o

método ainda não atingiu sua completa maturidade.⁹⁹ Torna-se, no entanto, comum o emprego desta ferramenta computacional aliada a métodos *in vitro*.¹⁰¹

Esta metodologia computacional foi empregada em paralelo com as estratégias experimentais, visando a obtenção de moléculas iniciais, candidatas a inibidoras da enzima *P*fenolase, que possam ser otimizadas através da aplicação de métodos de planejamento racional de fármacos. Adicionalmente, realizou-se um estudo sistemático para avaliar os resultados produzidos por diferentes estratégias disponíveis para o processo de triagem virtual.

4.8.1 Sítio de ligação

A escolha e a preparação do sítio molecular alvo para o processo de docagem é essencial para obtenção de resultados que podem ser validados experimentalmente em etapas posteriores.⁹⁹ Em linhas gerais, busca-se um modelo, frequentemente cristalográfico, com a melhor resolução disponível; com fatores de concordância estatística (*R*'s) não superiores a 30 % e distribuição dos resíduos modelados em posições favoráveis do diagrama de Ramachandran superior a 90 %.⁹⁸ Ressalta-se ainda que estes avaliadores globais não devem substituir a inspeção visual local da densidade eletrônica dos resíduos que compõe o sítio escolhido para os estudos.

Existem três considerações mínimas que devem ser feitas durante a análise do sítio empregado em um processo de docagem: **i.** flexibilidade da proteína alvo; **ii.** águas estruturais; e **iii.** Metais.⁹⁸ A flexibilidade dos resíduos, resultado de mudanças conformacionais que o sítio pode adotar mediante os efeitos indutivos da interação com um ligante, é essencial para a contabilização da afinidade real do ligante.^{98,99} Este tópico ainda é tratado de modo simplificado pelos programas de docagem molecular, por exemplo, o programa Glide aplica um escalonamento dos raios de van der Waals buscando mimetizar o processo de acomodamento das cadeias laterais do receptor.

A interação entre ligantes e macromoléculas é intermediada muitas vezes por moléculas de água, sendo assim, a remoção completa de todas as moléculas de água presentes no sítio de ligação, sem análise detalhada, indutiva ao erro sistemático durante o processo de docagem. Os dois métodos clássicos para verificação de águas: **i.** identificação de moléculas recorrentes em estruturas homólogas; e **ii.** estudo

de redocagem de ligante cocrystalizado; foram aplicados durante a fase de avaliação do sítio da enolase de *P. falciparum*.

De igual importância é a avaliação dos metais presentes, considerando que aproximadamente 30% dos sítios ativos de proteínas contém algum tipo de íon metálico.⁹⁸ A enzima enolase possui dois sítios de ligação para Mg^{+2} , denominados sítios I e II, sendo que o último é somente preenchido após a interação da macromolécula com seu substrato natural. Considerando que o sítio I manteve-se ocupado durante todo o processo de purificação e cristalização, mesmo sem a devida suplementação, seria improvável encontrar a enzima desprovida deste íon.

O sítio empregado nos estudos de docagem molecular foi derivado da estrutura cristalográfica determinada em sua forma apo durante a condução deste projeto de doutoramento. O emprego da estrutura apo baseia-se no rearranjo das alças que compõem o sítio catalítico mediante a ligação do substrato/produto (estrutura holo), levando a uma conformação fechada não acessível, conforme descrito na seção 4.7.

Brevemente, foram removidas todas as moléculas de água da cadeia A do homodímero, devido à ausência de conservação implícita. Manteve-se, no entanto, o íon Mg^{+2} localizado no Sítio I da enolase, pois sua presença e manutenção ao longo de toda as etapas de purificação e cristalização, mesmo sem qualquer adição durante o processo, ressalta sua alta afinidade pelo sítio de ligação. Assim, espera-se que o íon Mg^{+2} esteja ligado neste sítio durante o processo catalítico. Portanto, uma caixa 3D centrada no substrato sobreposto nas coordenadas da estrutura apo, com arestas de 10 Å, foi empregada como *grid* para a docagem molecular (Figura 33).

O emprego de um sítio, aparentemente grande, é realizado para garantir que as moléculas tenham liberdade para explorar o alvo molecular, assim, as poses serão selecionadas apenas por suas interações favoráveis não tendenciadas por limitação espacial. O sítio empregado foi validado pelo processo de redocagem do substrato natural, onde obteve-se RMSD de 1,46 Å, inferior ao valor preconizado de 2 Å (Figura 34), especialmente considerando que há rearranjo do sítio mediante interação com o ligante e a estrutura adotada para os estudos de docagem estava na sua forma apo.

Figura 33 – Sítio ativo empregado nos processos de docagem molecular. Em destaque, o *grid*, formado por uma caixa 3D com arestas de 10 Å centrada nas coordenadas do substrato; e em azul, a cavidade explorada.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 34 – Validação do sítio de ligação por redocagem do substrato natural, empregado durante os estudos de docagem molecular. Em verde, o ligante cocristalizado; em ciano a pose docada com RMSD calculado em 1.46 Å.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.8.2 Base de dados de compostos - ZINC

A disponibilidade crescente de coleções de compostos, públicas e privadas, especialmente em bases disponíveis online, tornaram-se fontes eficientes e indispensáveis para triagens virtuais.⁹⁸ Pioneiros, como o servidor Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), iniciaram em 2004 como uma plataforma científica para gerenciar resultados de HTS (do inglês, “High-throughput screening”) e hoje contam com mais de 190 milhões de substâncias e mais de 68 milhões de compostos únicos depositados.

Empresas farmacêuticas têm desenvolvido suas próprias coleções, frequentemente derivada de química combinatória, garantindo a inovação em seus projetos,⁹⁸ assim como, Maybridge e Chembridge, empresas privadas, oferecem bancos de dados de compostos curados prontamente disponíveis comercialmente.

O banco de compostos ZINC foi selecionado para a obtenção dos arquivos de coordenadas tridimensionais das moléculas a serem avaliadas. A escolha desta base baseou-se nas seguintes características: **i.** ser livre de custos, **ii.** tamanho da coleção, **iii.** diversidade química e **iv.** disponibilidade para compra.

Esta base também oferece subconjuntos baseados em características pré-determinadas. Entre eles cita-se o subconjunto denominado “leads now”, o qual foi selecionado para a triagem virtual. Os compostos pertencentes ao “leads now” apresentam características de compostos líderes,⁶⁵ ou seja, seguem a “regra dos 3,5” (compostos massa molecular entre 250 e 350 Da, cLogP inferior a 3,5, número de ligações rotacionáveis menor que 7).⁶⁴ A preferência por compostos que apresentam estas características, levou em consideração o tamanho do sítio do alvo molecular, bem como, a possibilidade de otimização dos candidatos identificados (i.e., compostos menores são mais atrativos para modificações estruturais e estudos de relação estrutura atividade⁹⁹). Já a classificação “now”, para as bases da ZINC, deve-se a disponibilidade imediata dos compostos para aquisição.

A base “leads now” era composta de 2.419.472 moléculas em Maio/2014. Diante disso, uma etapa de redução inicial através da aplicação de filtro molecular teve como objetivo eliminar moléculas muito similares, priorizando a diversidade química. Nesse sentido, a base ZINC disponibiliza uma ferramenta para análise de *clusters* que permite a seleção de subgrupos com características específicas

determinadas pelo usuário. Especificamente, um subconjunto de moléculas com similaridade inferior a 60 % do índice de Tanimoto ⁶⁴ foi considerada nesta etapa de adequação da base de compostos. Esse processo reduziu o tamanho da base de compostos para 26.697 moléculas. É importante mencionar que tivemos grande dificuldade na obtenção dos referidos arquivos de coordenadas atômicas (i.e., formato mol2) para o subconjunto selecionado, pois, em diversas tentativas observou-se que o subconjunto era transferido de maneira incompleta. Nosso grupo de pesquisa entrou em contato com o curador da base e obtivemos a informação de que está é, atualmente, uma das limitações atuais deste servidor. Para prosseguir com o trabalho, rotinas em linguagem python foram escritas para realizar a transferência de cada um dos compostos de maneira individualizada, assegurando a integridade da base selecionada.

Em seguida, aplicou-se um filtro molecular adicional para remoção de compostos que apresentavam em sua estrutura química grupos conhecidamente reativos ou tóxicos. Para este fim, empregou-se a rotina *Ligand Filtering* (interface Maestro - Schrödinger) e as regras de exclusão aplicadas ao subconjunto *Clean* da coleção ZINC.⁶⁴ A inclusão desse filtro adicional fez-se necessária para a exclusão de compostos potencialmente tóxicos ainda nas etapas iniciais do processo de planejamento de fármacos.⁶⁸⁻⁶⁹ No total, 14.783 compostos passaram pelo filtro de toxicidade e seguiram para preparação no programa Ligprep ⁶⁸ (Schrödinger), onde são checadas e corrigidas as estruturas tridimensionais, além da geração de tautômeros, esteroisômeros e estados de ionização alternativos. Ao final do processo, após 6 h de trabalho computacional, a base de dados final continha 43.910 moléculas que foram submetidas ao processo de docagem molecular.

4.8.3 Processo de docagem molecular

Dentre as etapas mais críticas do processo de triagem virtual, destaca-se o procedimento de docagem molecular, especificamente, a ferramenta computacional e a estratégia empregada.⁹⁹ Desde a descrição seminal, em 1982, do desenvolvimento da estratégia de modelagem molecular empregando o programa DOCK,¹⁰² vários métodos de docagem molecular foram desenvolvidos e aperfeiçoados (e.g. GOLD¹⁰³,

FlexX,¹⁰⁴ Glide,¹⁰⁵ Autodock¹⁰⁶). De maneira geral, estes programas empregam conceitos ligeiramente diferentes, apresentando particularidades e vantagens que podem ser exploradas dependendo do estudo em questão.⁹⁹

Para este estudo de triagem virtual elegeu-se o programa Glide (Schrödinger),¹⁰⁵ devido ao seu desempenho em relação a seus concorrentes em estudos de avaliação de performance (i.e., estudos de recuperação de pose do ligante em complexo cristalográfico e avaliação de parâmetros de enriquecimento em triagens virtuais) ao longo da última década.^{72,73,107–111}

Glide (“Grid-based Ligand Docking with Energetics”) emprega um algoritmo de docagem molecular por busca sistemática de conformações, orientações e posicionamento do ligante no sítio ativo do receptor.¹⁰⁵ Pelo emprego de filtros hierárquicos torna-se possível explorar a flexibilidade conformacional dos ligantes sem haver comprometimento da performance computacional. As poses dos ligantes que avançam na avaliação inicial, são submetidas ao processo de refinamento e minimização de energia baseados em campo de força pré-calculado para a grade reticulada do receptor.¹⁰⁵

O processo de docagem no programa Glide é realizado através de dois módulos consecutivos, i. precisão padrão (SP – do inglês, “Standard Precision”); e ii. precisão extra (XP – do inglês “Extra Precision”). Este último, é uma ferramenta mais refinada e com maior custo computacional, empregada para eliminar os falsos positivos e obter uma correlação entre poses e escores mais coerente.¹¹² O módulo SP, para as 43.910 moléculas preparadas, levou 24 h para completa execução, enquanto, o módulo XP, levou 36 h para execução com apenas 2.345 poses (i.e., 1.000 compostos). Devido ao custo computacional, apenas as 1.000 moléculas melhores posicionadas após a rotina SP foram submetidas a rotina XP, assim, evitou-se erros por flutuações entre as metodologias e reduziu-se o tempo total necessário para execução dos cálculos.

Independente da estratégia de triagem virtual empregada, ao final do ensaio computacional espera-se obter a lista dos prováveis ligantes, ordenada por suas respectivas predições de afinidade.⁶⁴ Desta maneira, a performance da estratégia dependerá, conjuntamente, do algoritmo de docagem molecular e da função empregada para pontuar o modo de ligação do ligante no receptor proteico.⁶⁴

A etapa de pontuação busca prever a afinidade dos ligantes pelo receptor, permitindo a discriminação dos ligantes mais promissores. Esta avaliação pode ser

realizada por métodos *ab initio*, com elevada precisão e custo computacional; ou métodos empíricos, compostos por aproximações menos precisas porém de elevada performance.^{98,99} Estes últimos são os empregados e adequados para os ensaios de triagem, pelo elevado número de compostos que será avaliado durante o experimento.

Os métodos empíricos buscam associar termos que reflitam propriedades físico-químicas relevantes durante o processo de interação entre ligante e receptor (e.g., número de ligações de hidrogênio, número de ligações rotacionáveis, superfície polar, etc), através de estudos de regressão, com a energia livre de ligação.^{98,99} As limitações desses métodos derivam inicialmente da necessidade de um conjunto de dados para calibrar as funções de pontuação, implicando no emparelhamento da precisão do método à precisão experimental; e do entendimento apenas parcial e simplificado do processo de interação entre o ligante e a macromolécula.⁹⁹

No entanto, as limitações das funções de pontuação têm sido alvos de processos de otimização ao longo da última década, especialmente no que tange a identificação de verdades ligantes dispersos em bancos de moléculas com elevada diversidade química.¹¹³

A função *Docking Score*, empregada neste trabalho, é uma função derivada do *GlideScore* (derivado do *ChemScore*⁷¹), com aplicação de algumas penalidades (e.g., contatos estéricos desfavoráveis), que vem apresentando resultados satisfatórios. Por fim, após o processo de modelagem molecular, foi incluída uma etapa de inspeção visual apenas para a identificação de erros por inconsistência e consequente eliminação de compostos, pois, no decorrer da campanha de triagem virtual buscou-se ao máximo evitar a inclusão de critérios subjetivos na seleção das moléculas para aquisição.

A distribuição da pontuação obtida pela função *Docking Score* para as moléculas modeladas, independentemente da rotina aplicada (i.e., SP ou XP), apresentou características típicas que podem ser divididas em três regiões (Figura 35). A primeira, onde há grande distinção entre os compostos pela pontuação obtida; a segunda, com o maior número de compostos e na qual não é possível diferenciá-los por suas pontuações e; a terceira, onde as interações são tão desfavoráveis que suas pontuações chegam a valores positivos.

Figura 35 – Distribuição da pontuação obtida pela função Docking Score para as moléculas docadas durante a rotina SP. Em verde, região com compostos promissores e pontuações distintas; em amarelo, região com o maior número de compostos e com baixa distinção entre eles; em vermelho, compostos cujas interações são bastante desfavoráveis, chegando a apresentar pontuação positiva.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Recentemente, demonstrou-se a importância do emprego de cargas parciais acuradas para os ligantes, ao invés das cargas parciais fixas tipicamente obtidas através de parametrização por campos de força (e.g., OPLS¹¹⁴), durante o processo de docagem molecular.¹¹⁵ A Schrödinger disponibiliza, sob a concessão de licença, um módulo para o programa Glide denominado “QM- Polarized Ligand Docking – QM-PLD”, no qual pode-se explorar os efeitos de polarização do ambiente proteico. O cálculo de cargas por métodos híbridos de mecânica molecular e quântica (QM/MM) permite a obtenção de cargas parciais realísticas e resultados de docagem mais acurados.¹¹⁵

Para avaliar os efeitos desse cálculo de carga mais acurado nos resultados de triagem virtual (i.e., na decisão de quais moléculas serão adquiridas), duas estratégias adicionais foram realizadas: **i.** cálculo das cargas parciais levando em consideração efeitos de polarização após a rotina XP e resubmissão à rotina XP; e **ii.** cálculo de cargas parciais por método *ab initio* anterior a submissão à rotina XP e posterior tratamento igual item **i.** Para tanto, empregou-se o programa Orca, disponível gratuitamente, para todos os cálculos de carga parcial, intermediado por *scripts* em linguagem Python para execução de todas as intermediações e execução do código. Em geral o cálculo por molécula empregando a base 321G levou 1 min (i.e., ~ 730 h

para os 43.910 iniciais), enquanto o cálculo com a base 621G** levou 5 min por molécula (i.e., ~ 195 h para os 1.000 compostos selecionados).

As 20 moléculas melhores classificadas em cada uma das três estratégias foram selecionadas para aquisição e posterior avaliação experimental. No entanto, a análise criteriosa das moléculas selecionadas como candidatas a inibidores da *Pfenolase* indicou significativa redundância. Portanto, a lista final de moléculas para aquisição totalizou 31 moléculas (Tabela 4). A Figura 36 indica que a estratégia clássica de docagem do programa Glide (i.e., rotinas SP e XP) compartilha 80 % de identidade na recuperação de compostos com a estratégia que mimetiza o módulo QM-PLD da Schrödinger. Na comparação com a estratégia que inicia com cargas parciais recalculadas pelo método *ab initio*, a identidade entre os compostos recuperados cai para 60 %.

Figura 36 – Redundância na recuperação de compostos pelas estratégias empregadas na triagem virtual, comparadas com a estratégia que mimetiza a abordagem QM-PLD da Schrödinger. Onde Precalc 321G, representa a estratégia com cálculo de cargas parciais anteriores à submissão da rotina SP; e XP, representa a estratégia típica SP-XP do programa Glide.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 4 – Compostos selecionados para aquisição e avaliação experimental oriundos das três estratégias de triagem virtual adotadas.

ZINC04934094	ZINC00343379	ZINC17027528

ZINC35047116	ZINC16953253	ZINC72321643

ZINC28536442	ZINC16941046	ZINC19329112

ZINC01663005	ZINC02572932	ZINC34522850

ZINC06548808	ZINC72145573	ZINC05674936

ZINC05085274	ZINC03869395	ZINC01582533

(continua)

(continuação)

ZINC86864279 **ZINC95079181** **ZINC16952743** **ZINC16958372** **ZINC05847806** **ZINC13492899** **ZINC04404234** **ZINC62723384** **ZINC83301222** **ZINC16958520** **ZINC16382964** **ZINC83325202** **ZINC16939881**

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na comparação da classificação e pontuação para os 31 compostos recuperados nas diferentes estratégias (Tabela 5), evidenciou-se que em muitos casos a diferença está apenas na pontuação obtida (e.g., os três melhores classificados), fato esperado pelas diferenças de precisão entre as metodologias adotadas, mantendo sua classificação independente da metodologia adotada. Em alguns casos, no entanto, especialmente para a molécula **ZINC13492899**, houve

significativa diferença na sua classificação, sendo a primeira colocada na estratégia III e a vigésima nona na estratégia I (Tabela 5). Neste caso, em especial, houve alteração drástica do modo de ligação identificado, entre as diferenças estratégias (Figura 37).

Figura 37 – Composto **ZINC13492899**, maior divergência apresentada entre as metodologias de docagem empregadas. À esquerda, estrutura química 2D. À direita, poses obtidas pelo processo de docagem molecular, destaca-se em azul a pose obtida pela estratégia I com pontuação divergente das demais estratégias.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 5 – Pontuação e classificação obtida para a melhor pose dos compostos selecionados para aquisição nas três estratégias de triagem virtual empregadas.

Compostos	Estratégia I OPLS_2005		Estratégia II Cargas 631G**		Estratégia III Cargas 321G	
	Docking Score	Posição	Docking Score	Posição	Docking Score	Posição
ZINC04934094	-12.871	1	-12.811	4	-12.688	5
ZINC00343379	-12.422	2	-13.004	3	-13.189	3
ZINC17027528	-12.238	3	-13.238	1	-13.056	4
ZINC35047116	-11.479	4	-12.042	6	-11.007	18
ZINC16953253	-11.42	5	-11.045	10	-10.731	25
ZINC72321643	-11.283	6	-13.092	2	-12.142	6
ZINC28536442	-11.191	7	-11.52	7	-11.198	13
ZINC16941046	-10.648	8	-11.468	8	-9.402	71
ZINC19329112	-10.532	9	-12.247	5	-11.313	12
ZINC01663005	-10.467	10	-10.932	14	-9.965	44
ZINC02572932	-10.452	11	-11.001	13	-11.158	14
ZINC34522850	-10.416	12	-10.811	16	-11.621	7
ZINC06548808	-10.304	13	-10.766	17	-9.862	45
ZINC72145573	-10.251	14	-10.416	21	-10.8	23
ZINC05674936	-10.227	15	-10.552	20	-11.529	10

(continua)

(continuação)

ZINC05085274	-10.061	16	-10.814	15	-11.081	16
ZINC03869395	-10.054	17	-10.247	27	-10.837	22
ZINC01582533	-10.053	18	-10.15	32	-9.78	50
ZINC86864279	-9.962	19	-10.699	18	-11.548	8
ZINC95079181	-9.853	20	-10.12	34	-10.077	41
ZINC16952743	-9.72	24	-10.342	25	-14.031	2
ZINC16958372	-9.618	27	-9.394	58	-11.327	11
ZINC05847806	-9.598	28	-9.773	44	-11.05	17
ZINC13492899	-9.578	29	-11.401	9	-14.517	1
ZINC04404234	-9.529	30	-11.014	12	-7.112	414
ZINC62723384	-9.527	31	-11.042	11	-8.356	163
ZINC83301222	-9.463	32	-9.182	74	-10.966	19
ZINC16958520	-9.305	38	-10.11	35	-11.143	15
ZINC16382964	-9.177	42	-9.656	49	-11.547	9
ZINC83325202	-8.439	80	-10.635	19	-10.108	40
ZINC16939881	-6.859	296	-8.615	116	-10.894	20

Fonte: Elaborada pelo autor.

A análise das moléculas selecionadas para aquisição revelou que o processo de curagem da base ZINC não estava sendo realizado eficazmente. Por exemplo, dois dos compostos recuperados (ZINC01663005 e ZINC02572932) são bastante similares com índice de similaridade de Tanimoto igual a 80%, sendo assim, não deveriam ter sido incluídos no subconjunto transferido (o critério de eliminação inicial preconizou moléculas com similaridade < 60%). Adicionalmente, embora as moléculas deveriam ser prontamente disponíveis para aquisição, pela classificação NOW do subconjunto, algumas apresentam prazo de envio muito superior ao idealizado pela classificação. Assim, embora gratuita, a base ZINC pode ser considerada uma alternativa menos vantajosa às bases comerciais existentes, pois o controle das moléculas é feito pela própria empresa que disponibiliza as coleções de compostos.

Somente após a aquisição e avaliação experimental poderemos concluir qual metodologia foi capaz de recuperar o maior número de inibidores da enzima *Pfenolase*. No entanto, vale ressaltar que se o intuito da triagem virtual for a aquisição de um número de moléculas igual ou superior a 10, com redundância de 80% não haveria motivos suficientes para seguir com a estratégia QM-PLD, considerando os custos computacionais.

CAPÍTULO 5

**Resultados e Discussão:
Gliceraldeído-3-fosfato
desidrogenase de *T. cruzi***

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *T. cruzi* (TcGAPDH)

5.1 Clonagem, expressão e purificação de TcGAPDH

A TcGAPDH era produzida rotineiramente em nosso laboratório utilizando-se uma construção gênica em sistema de expressão pET3a,⁷⁵ vetor precursor da família de vetores modernos do sistema pET. A utilização desse sistema implicava em algumas desvantagens durante o processo de purificação, podendo citar o número elevado de etapas, o custo com reagentes e o tempo empregado. Tendo em vista o aprimoramento do sistema de produção proteica para TcGAPDH, num primeiro momento foi estabelecida uma nova construção em pET28a, cuja principal vantagem está na produção da proteína de interesse fusionada a cauda de hexahistidina (6xHis), permitindo assim a purificação da proteína alvo através do método simplificado de cromatografia de afinidade.

A determinação do parâmetro cinético K_M foi utilizada para validar esta nova construção. O valor obtido para o K_M do cofator NAD^+ foi $716 \pm 15 \mu\text{M}$ (Figura 38 A) o qual diverge dos valores determinados anteriormente ($K_M \text{ NAD}^+ = 232 \pm 32 \mu\text{M}$),¹¹⁶ indicando perda de afinidade da TcGAPDH pelo cofator quando a cauda 6xHis está presente. Desta maneira, a remoção da cauda através de uma etapa de digestão com trombina (protease com sítio de reconhecimento presente na construção em pET28a) foi avaliada.

Figura 38 – Determinação do parâmetro cinético K_M , por regressão não-linear, para o cofator NAD^+ . (A) Enzima TcGAPDH com cauda hexahistidina (B) Enzima TcGAPDH após remoção da cauda de hexahistina por digestão com trombina. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após a remoção da cauda de hexahistidina, os parâmetros cinéticos foram reavaliados e novos valores obtidos foram comparáveis ($K_M \text{ NAD}^+ = 180 \pm 25 \mu\text{M}$ - Figura 38 B) aos relatados na literatura para a forma não fusionada. Os resultados obtidos divergem daqueles recentemente publicados,¹¹⁷ no qual os autores atestam que não há alteração dos parâmetros cinéticos para forma fusionada.

Apesar de mais moderno, o emprego da nova construção no vetor pET28a aumentou os custos de produção pela necessidade do emprego da enzima trombina para a clivagem e remoção da cauda 6xHis. Adicionalmente, as experiências favoráveis coletadas em nosso grupo de pesquisa, com a família de vetores LIC, nos levou à etapa de clonagem novamente. Assim, estabeleceu-se nova construção gênica empregando o vetor pETTrx-1a, o qual apresenta entre outras vantagens um sítio de reconhecimento para clivagem com TEV protease, enzima produzida rotineiramente em nosso laboratório.

Para a construção do novo sistema de expressão utilizou-se a estratégia de LIC.⁴⁸ A amplificação do fragmento codificante para *TcGAPDH*, utilizando como molde a construção em pET3a, e a inserção do fragmento no vetor pETTrx-1a foram realizadas com sucesso (Figura 39).

Figura 39 - (Esquerda) Eletroforese em gel de agarose (1%), amplificação inicial da *TcGAPDH* a partir do molde de *TcGAPDH*-pET28a. (Direita) Eletroforese em gel de agarose (1%), reação de PCR de colônia dos clones recombinantes obtidos, onde a presença das bandas demonstra a incorporação do plasmídeo *TcGAPDH*pETTrx-1a.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A expressão de *TcGAPDH* no vetor pETTrx-1a foi conduzida em meio autoindutor⁵⁰ e temperatura de 18 °C para assegurar o máximo rendimento de proteínas na fração solúvel. A purificação baseou-se em etapas cromatográficas sucessivas, sendo os objetivos para cada etapa: **i.** isolar a 6xHisTrx*TcGAPDH* do lisado proteico pela afinidade com a resina empregada (Figura 40 A); **ii.** substituir o tampão para permitir a digestão com a protease TEV (Figura 40 B); **iii.** isolar a *TcGAPDH* das remanescentes 6xHisTrx*TcGAPDH*, 6xHisTrx e TEV (Figura 40 C); **iv.** garantir a homogeneidade do estado oligomérico e conformacional (Figura 40 D). O elevado grau de pureza obtido foi constatado pela presença de uma banda única no gel de eletroforese desnaturante (Figura 41) e pela produção de cristais de *TcGAPDH* com capacidade de difração de raios X a alta resolução.

Figura 40 - Etapas cromatográficas empregadas na purificação de *TcGAPDH*, onde G indica a fração em que a proteína de interesse foi eluída. **(A)** Cromatografia de afinidade em HisTrap HP. **(B)** Cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-25. **(C)** Cromatografia de afinidade em HisTrap HP **(D)** Cromatografia de exclusão molecular em Superdex 200 16/60.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 41 - Gel de eletroforese SDS-PAGE 15% referente as etapas finais de purificação de *TcGAPDH*, onde MK, C, D são marcador de massa molecular, fração após a segunda cromatografia de afinidade e fração após cromatografia de exclusão por tamanho, respectivamente.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O estabelecimento de protocolo de obtenção do alvo molecular eficiente e validado, com custo e tempo reduzidos, pode ser considerado essencial para o desenvolvimento pleno de projetos de planejamento de fármacos envolvendo triagens biológicas e ensaios cristalográficos.

5.2 Triagem de candidatos a inibidores de *TcGAPDH*

Ensaio de triagem de inibidores foram conduzidos ao longo de todo o período de Doutorado, visando à identificação de novas moléculas com atividade inibitória contra a enzima *TcGAPDH*. A metodologia empregada faz a avaliação experimental do potencial inibitório de moléculas com origem diversa (i.e., natural à sintética), selecionando as mais promissoras para determinação de potência e estudo do mecanismo de inibição. Assim, buscando maximizar as chances de resultados positivos, avaliou-se moléculas com três origens distintas: **i.** produtos naturais; **ii.** compostos selecionados por triagem virtual e; **iii.** coleção de 400 compostos publicamente disponível.

5.2.1 Produtos naturais

Os produtos naturais e seus derivados são, historicamente, fonte de agentes terapêuticos.¹¹⁸ As coleções de compostos químicos provenientes de produtos naturais possuem como principal característica a diversidade e complexidade de seus componentes,¹¹⁹ ademais, são consideradas privilegiadas pela capacidade de interagirem com diversos sistemas biológicos, resultado direto da pressão evolutiva.¹¹⁸ Seu emprego pode ser evidenciado pelo número de produtos em desenvolvimento clínico, derivados de produtos naturais, particularmente para agentes anticâncer e antibióticos.¹²⁰

O processo de triagem de produtos naturais envolveu a avaliação de misturas complexas, como extratos brutos ou semi purificados. Nesse contexto, algumas adaptações foram necessárias para a avaliação criteriosa da propriedade biológica das amostras em estudo. Por exemplo, o espectro de absorção (220-750 nm) de alguns extratos de produtos naturais avaliados evidenciou elevada absorvidade na região UV do espectro (Figura 42), impedindo a realização dos ensaios utilizando a metodologia 1 (descrita na sessão 3.2.4) com leituras de absorbância em 340 nm. No entanto, a utilização da metodologia 2, com leituras em 400 nm, demonstrou-se efetiva para avaliação de tais extratos.

Figura 42 - Varredura espectral (220-750 nm) para um extrato de produto natural, obtida em Nanodrop (Thermo Scientific). Destaca-se a alta e baixa absorção nos comprimentos de onda 340 e 400 nm, respectivamente. O perfil de absorção elevado na região UV para os produtos naturais testados impede a utilização da metodologia 1

Fonte: Elaborada pelo autor.

Visando-se identificar compostos bioativos de origem natural como candidatos a inibidores da *TcGAPDH* foi estabelecida colaboração científica com o Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). A estratégia empregada nessa colaboração baseia-se no fracionamento das amostras e purificação de compostos guiados pelos ensaios biológicos (do inglês, *bioassay-guided fractionation*).

Os ensaios de triagem foram conduzidos para extratos produzidos de diferentes partes das plantas do cerrado paulista, entre outras: *Zanthoxylum fagara*, *Esenbeckia febrifuga*, *Galipea jasminiflora*, *Esenbeckia grandiflora*, *Metrodorea stipularis*, *Spiranthera odoratissima*. Nos ensaios de triagem biológica frente à *TcGAPDH* diversas frações promissoras foram identificadas (% de inibição > 70% na concentração de 200 µg/mL) - Figura 43.

Figura 43 - Exemplo ilustrativo das análises dos candidatos a inibidores da *TcGAPDH*. A comparação com os controles positivo e negativo, bem como, a reprodutibilidade observada indica a estabilidade do método e consistência dos resultados.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O composto isolado mais promissor desta estratégia, denominado tilirosídeo (Figura 44), foi obtido através da intensa colaboração com a Dr. Vivian Estevam Cornélio (UFSCar). Resumidamente, galhos da espécie *Spiranthera odoratissima* (popularmente conhecida como Manacá) foram coletados, secos, triturados e serviram

de base para obtenção de extrato bruto pela técnica de maceração em solvente orgânico etanol.

Este material foi submetido a extrações líquida-líquida sequenciais com diferentes solventes (i.e., hexano, diclorometano, acetato de etila, solução hidrometanólica). A fração obtida da extração com acetato de etila apresentou o melhor perfil de inibição frente ao ensaio cinético e, portanto, foi selecionada para refracionamento por cromatografia de exclusão (Sephadex® LH 20). O fracionamento foi acompanhado por análises de cromatografia em camada delgada e, as frações semelhantes agrupadas. O composto isolado de uma das frações mencionadas, teve sua estrutura química elucidada por experimentos de Ressonância Magnética Nuclear 1D e 2 D. Os procedimentos e resultados detalhados do isolamento do tilirosídeo encontram-se em manuscrito em preparação.

Figura 44 – Estrutura química do composto isolado, tilirosídeo (kaempferol-3-(*p*-cumaril)-glucosídeo), nos ensaios de bioprospecção guiada.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O composto isolado é um derivado flavonoide e para assegurar que a atividade inibitória medida não foi resultado de artefato de inibição não-específica, ensaios adicionais foram conduzidos na presença do detergente Triton X-100.¹²¹ A potência inibitória do tilirosídeo foi determinada em $IC_{50} = 25 \pm 1 \mu M$ (Figura 45). Entre as desvantagens da utilização de extratos/compostos derivados de produtos naturais, ressalta-se a dificuldade na padronização em sua obtenção. Durante o desenvolvimento deste trabalho, lotes isolados de forma similar apresentaram propriedades bastante divergentes (e.g., 1 ordem de grandeza nos valores determinados para potência, $IC_{50} = 170 \pm 16 \mu M$), evidenciando a necessidade de condução experimental bastante criteriosa.

Figura 45 – Curva dose-resposta obtida para o composto tilirosídeo. Determinação da potência inibitória IC_{50} por regressão não-linear. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A determinação do mecanismo de inibição de um composto bioativo é um dos componentes fundamentais para os trabalhos de descoberta de novos candidatos a fármacos. O estudo do mecanismo de inibição indica informações relevantes para a compreensão dos mecanismos moleculares responsáveis pelo efeito biológico bem como para a determinação do sítio de ligação.¹²² Esses dados são de extrema importância para guiar o planejamento de novos derivados sintéticos com propriedades otimizadas. Nesse sentido, a análise detalhada do gráfico duplo-recíproco indica que os valores de K_M^{app} e V_{max} para o substrato (G3P) e o cofator (T-NAD⁺) são alterados em função do aumento da concentração do inibidor (Figura 46 A e B). Esse comportamento é característico de inibidor não-competitivo (Figura 46 C e D).¹²³ Portanto, o tilirosídeo é capaz de se ligar tanto na forma livre da enzima (E) como no complexo enzima-substrato (ES), com afinidade ligeiramente maior pela forma livre da enzima (E) (i.e., $K_i^{G3P} = 9 \mu\text{M}$; $K_i'^{G3P} = 11 \mu\text{M}$; $K_i^{TNAD} = 14 \mu\text{M}$; $K_i'^{TNAD} = 15 \mu\text{M}$).

Figura 46 - (A) Perfil de inibição não-competitiva para o inibidor tilirosideo na presença do substrato G3P. (B) Perfil de inibição não-competitiva para o inibidor tilirosideo na presença do cofator TNAD⁺. Ensaios cinéticos foram realizados na presença de concentrações crescente de inibidor (•) ausência de inibidor (○) 5 μM (▼) 10 μM. (C) Esquema de Michaelis-Menten para inibidores não-competitivo. (D) Esquema representativo de inibição não-competitiva

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2.2 Compostos selecionados por ensaio de triagem virtual

Estratégias de SBDD aplicadas em GAPDHs de tripanossomatídeos foram empregadas com sucesso no desenvolvimento de inibidores análogos do cofator, com a identificação de inibidores potentes e seletivos.^{124–127} Nesses trabalhos, as diferenças estruturais nas vizinhanças do sítio de ligação do cofator foram exploradas entre as enzimas dos parasitas e a humana. Durante o processo de doutoramento do pesquisador Dr. Rafael V. C. Guido, uma estratégia foi planejada com intuito de explorar o sítio de ligação ao substrato.

Com o objetivo de identificar novas classes químicas como inibidores da enzima *TcGAPDH*, empregou-se o método de triagem virtual em uma grande coleção

de compostos (i.e., aproximadamente, 2.000.000). A estratégia de triagem consistiu na aplicação de filtros moleculares consecutivos, incluindo buscas 2D e 3D (i.e., grupos âncoras e modelo farmacofórico, respectivamente). Os compostos selecionados foram adquiridos e avaliados *in vitro* frente a enzima *TcGAPDH*. Os resultados foram organizados em manuscrito intitulado “*A pharmacophore-based virtual screening approach for the discovery of Trypanosoma cruzi GAPDH inhibitors*” e publicado no periódico científico *Future Medicinal Chemistry*, 5(17), p.1-17, 2013.

Primeiramente, avaliou-se o percentual de inibição na concentração única de 400 μM . Os dados obtidos indicaram que 10 compostos (**1**, **3**, **4**, **9**, **15**, **17**, **18**, **21**, **24** e **25**) dos 31 selecionados apresentaram atividade inibitória > 10%. Os compostos **1**, **3** e **9** apresentaram atividade inibitória promissora (> 50%). Os compostos **15**, **24** e **25** foram inibidores modestos (% inibição 20-50%), enquanto os compostos **4**, **17**, **18** e **21** foram inibidores fracos (% inibição < 20%). As atividades inibitórias decorrentes de inibição promíscua, promovida por agregados não específicos, foram descartadas pela realização do ensaio cinético na presença do detergente Triton X-100.

Os compostos que apresentaram atividade inibitória superior a 50% tiveram sua potência determinada. Os resultados indicam três novas classes de inibidores de *TcGAPDH*, derivados de: i. 4-amino-tiofeno (composto **1**); ii. 1,3-dioxoisindolinas (composto **3**) e iii. 1-pirazol-etanona (composto **9**). Os compostos **1** e **3** apresentaram valor de IC_{50} de 614 e 692 μM , respectivamente, enquanto o composto **9** apresentou atividade inibitória duas vezes maior ($\text{IC}_{50} = 300 \mu\text{M}$). Estes resultados são bastante promissores pois estes derivados não haviam sido descritos na literatura como inibidores de *TcGAPDH*, especialmente considerando o número reduzidos de inibidores descritos para este alvo molecular.

Tabela 6 – Valores de IC_{50} determinados para as moléculas selecionadas pela triagem virtual.

Composto	Estrutura	CÓDIGO ZINC	IC_{50} (μM)
1		ZINC02105634	614 $\pm$ 93
3		ZINC01066912	692 $\pm$ 86
4		ZINC02279303	> 700

(continua)

(continuação)

9		ZINC04278776	300 ± 25
15		ZINC13081001	> 700
17		ZINC02471987	> 700
18		ZINC00360239	> 700
21		ZINC00308330	> 700
24		ZINC00611293	> 700
25		ZINC02858425	> 700
IAA**		ZINC03860524	181 ± 12

Fonte: Elaborada pelo autor.

O modo de ligação predito para o inibidor mais potente, composto **9**, sugere o papel essencial das interações polares e não polares na orientação do inibidor no sítio ativo (Figura 47 A). Especificamente, o composto **9** orienta o substituinte dimetoxifenil próximo ao sítio de ligação do fosfato do substrato (Figura 47 B). Nesta orientação, os átomos de oxigênios do substituinte estão orientados favoravelmente para estabelecer interações com as cadeias laterais dos resíduos Arg249 e Ser247 (Figura 47 A). Ainda, o átomo de nitrogênio do grupo heterocíclico pirazol doa ligação de hidrogênio para a cadeia lateral do resíduo Asp210 enquanto a carbonila do substituinte etanona está em posição favorável para aceitar interação de hidrogênio do NH da cadeia principal da Lys209 (Figura 47 A). Essas interações de hidrogênio eram esperadas pelas restrições impostas do modelo farmacofórico durante o processo de docagem molecular. Simultaneamente, contatos não polares auxiliam a estabilização do

complexo, especificamente: **i.** entre o substituinte etilfenila e o C β e C γ do resíduo Thr199; **ii.** entre o C5 do grupo pirazol e o C α do resíduo Gly213; e **iii.** entre os átomos de carbono do substituinte etanona e o C β do resíduo Lys209 (Figura 47 C).

Figura 47 - Modo de ligação predito para o composto **9** no sitio de ligação da enzima *Tc*GAPDH. (A) Resíduos da proteína (bastão) envolvidos na ligação com o composto **9** (bastão e esferas) com as ligações de hidrogênio representadas em amarelo. (B) Modo de ligação predito sobreposto no modelo farmacofórico. (C) Estrutura representada como superfície Connolly.

Fonte: MALUF et al ⁴⁷

Nenhum dos compostos identificados viola as regras de Lipinski,¹²⁸ enquanto, há violações para os inibidores de *Tc*GAPDH relatados na literatura. Adicionalmente, as moléculas identificadas apresentam eficiência de ligação comparável aos inibidores conhecidos e servirão como ponto de partida para o desenvolvimento de candidatos a antiparasitários para doença de Chagas.

5.2.3 Ensaio cinético fluorimétrico

As duas metodologias empregadas para avaliação cinética e triagem de inibidores que vinham sendo empregadas em nosso grupo de pesquisa, são baseadas na detecção direta da formação dos produtos NADH ou T-NADH por espectrofotometria em 340 e 400 nm, respectivamente. Entre as principais limitações apresentadas por estes ensaios estão a baixa sensibilidade, que limita sua miniaturização, e impossibilidade da realização de ensaios com compostos que apresentam forte absorção na região espectral do ensaio. Buscando superar as limitações destas metodologias, adaptou-se um ensaio fluorimétrico empregando o sistema acoplado resazurina-diaforase.¹²⁹

Para obtenção de ensaio cinético robusto e reprodutivo, todos os componentes da mistura reacional foram avaliados, assegurando a melhor adaptação possível do ensaio descrito na literatura. Após esta etapa, procedeu-se com a determinação dos parâmetros cinéticos K_M , para substrato (G3P) e cofator (NAD^+) - Figura 48. Os valores de K_M determinados para o cofator e substrato diferem dos valores reportados pela literatura (Tabela 7). A análise detalhada dos dados publicados sugere que as divergências entre os valores de K_M estariam relacionadas às concentrações de enzima empregadas, ou seja, no ensaio fluorimétrico concentrações substancialmente menores de enzima foram utilizadas (i.e. 500 pM) em comparação àquelas usadas no ensaio publicado (20 nM). A utilização de concentrações catalíticas de ordem pico molar assegura que o ensaio seja conduzido em condições de estado estacionário ao longo de todo o período de análise.⁵³

Tabela 7 – Comparação dos parâmetros cinéticos K_M para enzima *TcGAPDH* obtidos por métodos espectrofotométricos e fluorimétricos.

Metodologia	K_M (μM)	
	NAD^+	G3P
Espectrofotometria ¹³⁰	232 ± 32	300 ± 45
Fluorimétrica	38 ± 4	209 ± 10

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 48 - Determinação dos parâmetros cinéticos K_M para substrato (A) e cofator (B) da enzima *TcGAPDH*, pela metodologia cinética fluorimétrica com sistema acoplado a diaforase. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para garantir que as diferenças observadas na determinação dos valores de K_M não eram devidas às limitações do sistema combinado (i.e., o sistema combinado figurando como a etapa limitante da reação monitorada), realizou-se ensaios cinéticos na presença de concentrações elevadas do substrato e cofator (i.e., $10 \times [K_M]$) e concentrações variáveis de TcGAPDH (i.e., concentrações múltiplas de 500 pmol). Na Figura 49 evidencia-se a linearidade da resposta obtida neste ensaio, sugerindo fortemente que a etapa limitante da reação observada é a catalisada pela enzima alvo. Portanto, os novos valores determinados de K_M , juntamente com a nova metodologia, foram empregados no planejamento de novo ensaio de triagem de inibidores para TcGAPDH.

Figura 49 - Linearidade do ensaio acoplado frente a acréscimos da enzima TcGAPDH, evidenciando a etapa limitante do ensaio proposto. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

Fonte: Elaborada pelo autor.

As concentrações do substrato e cofator, empregados no novo ensaio de triagem de inibidores, foram aproximadamente iguais aos valores determinados para K_M de ambos, conforme o preconizado em literatura especializada.⁵³ O emprego de concentrações superiores ao valor de K_M dificulta a identificação de inibidores do tipo competitivo, enquanto favorece a identificação de inibidores do tipo não-competitivo, estes dados são compatíveis com a vasta maioria de inibidores identificados até o momento para a enzima TcGAPDH.¹³¹

Atualmente, ensaios cinéticos utilizados na identificação de moléculas bioativas, especialmente, os empregados em escalas elevadas (i.e., HTS) e com misturas reacionais miniaturizadas, precisam demonstrar seu potencial discriminatório entre controles positivos e negativos. Recentemente, tornou-se padrão a

determinação do coeficiente da janela de triagem, conhecido como fator Z, que indica a faixa dinâmica do sinal do ensaio, bem como, variações provenientes da medida. Na Figura 50, observa-se a distribuição dos valores para os controles positivo e negativo obtidos com o novo ensaio fluorimétrico.

Figura 50 - Distribuição dos valores obtidos para os controles positivo (substrato, G3P) e negativo (ausência de substrato) do ensaio cinético acoplado de *TcGAPDH*. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Ensaios cinéticos que apresentam valores de fator Z inferiores a 0 são considerados sem separação de banda, ou seja, há sobreposição das bandas (distribuição) da variação da amostra e do controle. Valores de Z entre 0 e 0,5, indicam que a separação entre as bandas é pequena, enquanto, valores entre 0,5 – 1,0 são os considerados ideais para ensaio de triagem. O valor calculado de Z para o novo ensaio foi de 0,7, sugerindo que o ensaio fluorimétrico adotado é ideal para ensaios de triagem e também apropriado para emprego em ensaios de larga escala (HTS).

5.2.4 Malaria Box

Ao final deste Doutorado, empregando a metodologia fluorimétrica descrita acima, estabeleceu-se a triagem dos compostos da coleção *Malaria Box*,⁸² disponível em nosso laboratório conforme descrito na seção 4.5.1. Ressalta-se que embora o nome faça alusão a uma doença específica, esta coleção foi criada e disponibilizada com o intuito de catalisar o processo de descoberta de fármacos para doenças

negligenciadas em geral.⁸² Neste processo, identificou-se 4 inibidores da enzima TcGAPDH (Figura 51), com estruturas químicas não relatadas previamente e com atividade inibitória na faixa do baixo micromolar.

Figura 51 - Moléculas bioativas identificadas na triagem da coleção *Malaria Box*.

MMV665941
Inibição 83% @ 50 μ M

MMV306025
Inibição 82% @ 50 μ M

MMV084940
Inibição 64% @ 50 μ M

MMV666689
Inibição 43% @ 50 μ M

Fonte: Elaborada pelo autor.

Todos os compostos que compõem a coleção *Malaria Box* são disponíveis comercialmente e, portanto, os quatro compostos identificados (**MMV665941**, **MMV306025**, **MMV084940**, **MMV666689**) serão adquiridos para determinação da potência e mecanismo de inibição, paralelamente, aos estudos estruturais visando-se a obtenção de complexos cristalográficos.

5.3 Estudos cristalográficos com TcGAPDH

Para identificar o sítio de ligação dos inibidores na enzima TcGAPDH, assim como, compreender os mecanismos responsáveis pelo reconhecimento molecular desta molécula, estudos cristalográficos foram realizados.

A alta pureza obtida pelos processos de purificação empregados na obtenção de *TcGAPDH*, permitiram que cristais adequados para os experimentos de difração de raios-X fossem obtidos prontamente. Com o foco voltado para a obtenção de complexos cristalográficos, em especial, o complexo da *TcGAPDH* com o inibidor caracterizado (i.e., tilirosideo), experimentos de cocrystalização e *soaking* foram conduzidos.

Durante a condução dos experimentos de *soaking* evidenciou-se a fragilização dos cristais (Figura 52), mesmo com tempos de incubação reduzidos. Assim, para que um conjunto completo de dados de difração fosse coletado, anterior a completa destruição do cristal, o tempo de incubação máximo foi de 2 min. Nenhum cocrystal foi obtido empregando as condições de cristalização previamente descritas.⁷⁹

Figura 52 – Padrões de difração obtidos a partir de cristais de *TcGAPDH*. (A) Cristal da proteína na sua forma apo (B) Cristal após *soaking* com 1 mM tilirosideo por 2 min.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Com intuito de identificar novas condições de cristalização, especialmente condições para obtenção de cocrystal, nova triagem de condições foi realizada com a proteína em sua forma apo e na presença de 1 mM do inibidor tilirosideo. Nesta etapa foram identificadas novas condições promissoras (Tabela 8).

Os cristais obtidos (Figura 53) foram submetidos a experimentos de difração de raios X e 5 conjuntos de dados completos a alta resolução ($> 1,8 \text{ \AA}$) foram coletados ao longo deste doutoramento. Os dados processados, com estatísticas favoráveis, foram empregados na obtenção de modelos iniciais empregando a estratégia de substituição molecular. Após a reconstrução e refinamento dos elementos proteicos,

inspecionou-se os mapas de densidade eletrônica buscando encontrar sinais da presença do inibidor. Em seguida, para melhorar a qualidade dos mapas, moléculas de água foram adicionadas automaticamente ao modelo com o auxílio do programa BUSTER, e nova rodada de inspeção foi realizada. Em nenhum dos modelos refinados até o momento, evidenciou-se a presença do tilirosídeo.

Tabela 8 – Novas condições de cristalização identificadas para TcGAPDH.

Kit (Suíte)	Cód.	Ligante	Condição
Index	H02	Tiliosídeo 1 mM	0.2 M Tartrato de sódio e potássio 20% PEG 3.350
PEGs	H08	Tiliosídeo 1 mM	0,2 M Hidrogenofosfato de diamônio 20% PEG 3.350
JCSG IV	E07	Tiliosídeo 1 mM	0,2 M Cloreto de sódio 0,1 M Tris pH 7,0 20% PEG 3.000
JCSG III	G09	Tiliosídeo 1 mM	0,04 M Di-Hidrogenofosfato de potássio 16% PEG 8.000 20% Glicerol
Index	F06	-	0,2 M Sulfato de Amônio 0,1 M Bis-Tris pH 5,5 25% PEG 3.350
Index	F08	-	0,2 M Sulfato de Amônio 0,1 M Hepes pH 7,5 25% PEG 3.350
Index	H03	-	0.2 M Malonato de sódio pH 7,0 20% PEG 3.350
Index	H04	-	0.2 M Citrato de amônio tribásico pH 7,0 20% PEG 3.350
JCSG I	A09	-	0.2 M Citrato de Lítio 20% PEG 3.350
JCSG I	D12	-	0,2 M Acetato de Magnésio 0,1 M Cacodilato de sódio pH 6.5 20% PEG 8.000
JCSG IV	E08	-	0,2 M Sulfato de Lítio 0,1 M Tris pH 7,0 1,0 M Tartrato de sódio e potássio
PEGs	H09	-	0.05 M Acetato de Magnésio 0.1 M Acetato de sódio 10% PEG 8.000
PEGs	H10	-	0.2 M Acetato de Magnésio 10% PEG 8.000
PEGs	H11	-	0.1 M Hepes 7,5 10% PEG 8.000
PEGs	H12	-	10% PEG 1.000 10% PEG 8.000

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 53 – Cristais obtidos na etapa de triagem de condições de cristalização de *TcGAPDH*. (A) JCSG I Suite – A09. (B) JCSG I Suite – D12. (C) JCSG IV Suite – E07. (D) JCSG IV Suite – E08. (E) Index Suite – H02. (F) Index Suite – H04

Fonte: Elaborada pelo autor.

A avaliação de todos os modelos cristalográficos construídos e refinados, revelou também a presença sistemática do cofator NAD⁺ em pelo menos uma das quatro cadeias que compõe a unidade assimétrica, com interpretação da densidade eletrônica indubitável (Figura 54). Este fenômeno ressalta a alta afinidade apresentada pelo cofator, considerando que ele é proveniente das etapas de purificação e não de suplementação durante os ensaios de cristalização. Pode-se ainda, relacionar este fenômeno à seleção oligomérica ocorrida durante o processo de cristalização, pois a interação com o cofator resulta em mudanças conformacionais e oligoméricas.¹³²

As novas condições de cristalização serão exploradas futuramente, assim como, os inibidores identificados da triagem da coleção de compostos *Malaria Box*, para obtenção de complexos cristalográficos. A obtenção desses complexos permitirá o entendimento do modo de ligação dos inibidores a *TcGAPDH*, revelando as

características fundamentais para o reconhecimento e interação molecular, e assim, permitir o emprego de estratégias de planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor.

Figura 54 – Sítio catalítico da enzima *TcGAPDH* para o modelo construído com dados de difração de raios-X de cristal obtido na condição H08 da suíte PEGs. Em destaque, os mapas de densidade eletrônica 2Fo-Fc, contornados a 1 σ , para o cofator e íons fosfato complexados.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.4 Kinecteasy – Uma ferramenta para análise de dados cinéticos

O estabelecimento de bioensaios miniaturizados e automatizados permitiu que o número de ensaios realizados (escala) para um mesmo alvo (i.e., celular ou proteico) seja cada vez maior, assim campanhas de média-alta escala são frequentemente empregadas no processo de descoberta de fármacos.^{133–135} Nesse cenário, o processamento, armazenamento e análise dos dados de maneira efetiva tornou-se essencial, consequentemente, uma série de programas computacionais, tratamentos estatísticos e plataformas integradas foram lançadas no mercado.

O número de ensaios de triagem realizados para determinado alvo molecular ou celular depende, entre outros aspectos, do acesso às coleções de compostos. Portanto, em um ambiente acadêmico, tipicamente, realizam-se ensaios de pequena e média escala. Mesmo em uma escala reduzida, o tratamento manual não assistido dos dados coletados pode prejudicar ou impedir a interpretação acurada dos

resultados. Tendo em vista a necessidade de automatizar e padronizar o processamento de dados cinéticos foi iniciado o desenvolvimento de uma ferramenta computacional robusta que facilita a interpretação dos ensaios de atividade biológica.

A escolha da linguagem de programação de alto nível Python, baseou-se na simplicidade, clareza de sintaxe, possibilidade de orientação de objetos, abundante documentação e número de bibliotecas disponíveis. A interface gráfica foi criada utilizando GTK+, adaptado a Python (PyGTK), buscando-se uma interface gráfica simples, clara e amigável para o usuário.

Até o momento, a estruturação das janelas principais e o fluxo para o tratamento dos dados foram definidas. A visão geral das janelas pode ser visualizada na seção Apêndice A. O emprego de um fluxo unidirecional visa padronizar o tratamento dos dados, uma vez que o usuário só pode passar de uma etapa para a outra após avaliação da consistência dos dados fornecidos. A padronização e isolamento das etapas permite a expansão das funcionalidades disponíveis de maneira incremental, como também a adequação para o tratamento de resultados obtidos em diversos equipamentos.

Resumidamente, nas 3.000 linhas de código, o programa é capaz de compreender o arquivo de saída do equipamento empregado nos ensaios cinéticos, gerar um novo arquivo em formato padrão onde todas as informações sobre o ensaio são inseridas, analisar e exportar os gráficos de evolução cinética e calcular, com base em controles, os percentuais de inibição e os erros experimentais para os compostos avaliados. As próximas versões do programa deverão ser capazes de realizar análises de regressão não-linear, permitindo a determinação de parâmetros cinéticos e potência de inibidores (i.e. IC₅₀).

CAPÍTULO 6

Conclusão e Considerações Finais

6 CONCLUSÃO

Nesta tese de doutorado foram apresentados os resultados obtidos ao longo de cinco anos de trabalho. Técnicas e estratégias complementares foram empregadas para se avançar no processo, longo e custoso, de planejamento racional de fármacos para as doenças tropicais.

As doenças parasitárias malária e doença de Chagas investigadas nesta tese são enfermidades que apresentam alta taxa de mortalidade e morbidade, contudo, tem pouco interesse econômico. As opções terapêuticas disponíveis não são adequadas e a crescente identificação de cepas resistentes aos tratamentos disponíveis agravam a situação atual. Assim, identificação de alvos moleculares e moléculas promissoras estão intimamente ligadas a remediação deste quadro.

A via glicolítica é especialmente atrativa para o desenvolvimento de fármacos antiparasitários, pois é essencial para a produção energética do parasita. Ademais, as enzimas selecionadas, enolase e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, possuem funções regulatórias (pouco compreendidas, mas com fortes indícios de sua importância) adicionais ao seu papel na cadeia glicolítica.

A enzima enolase de *P. falciparum* foi obtida com sucesso por processo de expressão heteróloga. O emprego de protocolos de purificação otimizados, permitiram a obtenção de proteína com elevada pureza, favorecendo a obtenção de cristais proteicos, e, por sua vez, a determinação da estrutura tridimensional inédita deste alvo. Apesar da elevada conservação estrutural entre os homólogos, a estrutura tridimensional determinada indicou as razões pelas quais a inserção de pentapeptídeo na proteína do *P. falciparum* levam a intensa resposta imunogênica, pois ela compõe alça bastante exposta e protuberante. Os complexos cristalográficos obtidos com o substrato e produto de reação, evidenciaram a mobilidade encontrada neste sítio, favorecendo a aplicação de uma estratégia computacional diferenciada para a identificação de novos inibidores da *Pf*enolase. Pode-se ressaltar ainda as evidências da dependência do íon magnésio para a estabilização das mudanças conformacionais induzidas pela ligação do substrato.

As dificuldades no estabelecimento de ensaio bioquímico para emprego nas triagens por inibidores foram superadas com a adaptação de sistema acoplado bioluminescente. O ensaio foi empregado com sucesso na triagem da coleção Malaria

Box, com a identificação de 50 compostos com atividade inibitória promissora. O número elevado de compostos identificados pode estar associado à importância desta proteína para o parasita, considerando que os compostos desta coleção são provenientes de ensaios fenotípicos contra cepas de *P. falciparum*.

A determinação da estrutura tridimensional permitiu também o emprego de estratégia computacional de triagem virtual, onde três estratégias distintas em relação as cargas parciais dos compostos foram avaliadas. A redundância entre as estratégias, em geral, foi superior a 60 % e apenas após a aquisição e avaliação experimental das 31 moléculas selecionadas poder-se-á identificar as vantagens individuais de cada estratégia.

Grandes avanços foram obtidos na condução dos experimentos com a enzima TcGAPDH, a contar com a adaptação do sistema de expressão e purificação proteico, permitindo a obtenção de proteína pura em tempo e quantidade compatível com as necessidades do processo de planejamento de fármacos ligado a cristalografia de proteínas.

A bioprospecção de produtos naturais orientada pelos ensaios bioquímicos demonstrou ser factível e com resultados interessantes. Ao longo deste doutoramento, identificou-se um composto isolado, tilirosídeo, com potência no baixo micromolar e mecanismo de inibição não competitivo. Embora existam dificuldades e desvantagens no emprego desta estratégia, ela pode ser considerada como alternativa para explorar a biodiversidade natural.

As dificuldades na triagem de inibidores associadas aos ensaios empregados para TcGAPDH levaram a adaptação de ensaio fluorimétrico, mais sensível. Este ensaio foi validado e está pronto para futuras miniaturização e emprego em campanhas de triagem em maior escala. Durante a etapa de validação, identificou-se divergência entre o parâmetro cinético K_M desta metodologia comparada a reportada anteriormente. Após análise criteriosa concluímos que os resultados anteriores poderiam estar imprecisos, pois não havia manutenção do estado estacionário. Assim, o planejamento experimental das triagens anteriores, pode ter induzido a identificação de inibidores não-competitivos de maneira sistemática. Empregando o novo ensaio, a triagem da coleção de composto Malaria Box, permitiu a identificação de 4 compostos promissores na faixa baixo micromolar.

Finalmente, a ferramenta computacional Kinecteasy, foi criada com intuito de automatizar o tratamento dos dados de triagem biológicas, reduzindo erros oriundos

da interferência manual, além de permitir o fácil gerenciamento de ensaios já realizados.

PERSPECTIVAS

Todos os compostos identificados pela triagem da coleção Malaria Box serão adquiridos e terão potência e mecanismo de inibição determinados. Eles são considerados potenciais pontos de partida para a continuidade destes projetos em nosso grupo de pesquisa. Adicionalmente, todos os compostos identificados durante a etapa de triagem virtual serão avaliados experimentalmente, permitindo a confirmação das moléculas promissoras identificadas, bem como, a melhor estratégia de triagem virtual empregada.

REFERÊNCIAS**

- 1 MEYER, J. A. **Assessing the impact of pharmaceutical innovation: a comprehensive framework**. Washington: National Pharmaceutical Council, 2002.
- 2 SCHNITTKER, J.; KARANDINOS, G. Methuselah's medicine: pharmaceutical innovation and mortality in the United States, 1960-2000. **Social Science & Medicine**, v. 70, n. 7, p. 961–968, 2010.
- 3 DIMASI, J. A.; HANSEN, R. W.; GRABOWSKI, H. G. The price of innovation: new estimates of drug development costs. **Journal of Health Economics**, v. 22, n. 2, p. 151–185, 2003.
- 4 MUNOS, B. Lessons from 60 years of pharmaceutical innovation. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 8, n. 12, p. 959–68, 2009.
- 5 MULLARD, A. New drugs cost US\$2.6 billion to develop. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 13, n. 12, p. 877, 2014.
- 6 KAITIN, K. Deconstructing the drug development process: the new face of innovation. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 87, n. 3, p. 356–361, 2010.
- 7 FDA Amendments Act. Pub. L. No. 110-85, 121 Stat. 823
- 8 BENNANI, Y. L. Drug discovery in the next decade: innovation needed ASAP. **Drug Discovery Today**, v. 16, n. 17-18, p. 779–92, 2011.
- 9 BREIMER, D. D. Future training needs in the pharmaceutical sciences: academia - industry. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 4, p. 347–352, 2001.
- 10 COLES, L. D.; CLOYD, J. C. The role of academic institutions in the development of drugs for rare and neglected diseases. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 92, n. 2, p. 193–202, 2012.
- 11 MUELLER-LANGER, F. Neglected infectious diseases: are push and pull incentive mechanisms suitable for promoting drug development research? **Health Economics, Policy, and Law**, v. 8, n. 2, p. 185–208, 2013.
- 12 HOTEZ, P. J.; MOLYNEUX, D. H.; FENWICK, A.; KUMARESAN, J.; SACHS, S. E.; SACHS, J. D.; SAVIOLI, L. Control of neglected tropical diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 10, p. 1018–1027, 2007.

** De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 6023.

- 13 TROUILLER, P.; OLLIARO, P.; TORREELE, E.; ORBINSKI, J.; LAING, R.; FORD, N. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. **Lancet**, v. 359, n. 9324, p. 2188–2194, 2002.
- 14 NWAKA, S.; HUDSON, A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 5, n. 11, p. 941–55, 2006.
- 15 NWAKA, S.; RIDLEY, R. G. Virtual drug discovery and development for neglected diseases through public-private partnerships. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 11, p. 919–928, 2003.
- 16 MRAZEK, M. F.; MOSSIALOS, E. Stimulating pharmaceutical research and development for neglected diseases. **Health Policy**, v. 64, n. 1, p. 75–88, 2003.
- 17 SNOW, R. W.; GUERRA, C. A.; NOOR, A. M.; MYINT, H. Y.; HAY, S. I. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. **Nature**, v. 434, n. 7030, p. 214–217, 2005.
- 18 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Malaria**. fact sheet n. 94 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>>. Acesso em: 20 mar. 2015
- 19 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World malaria report 2014**. Disponível em: <http://www.who.int/malaria/media/world_malaria_report_2014/en/>. Acesso em: 20 mar. 2015
- 20 WELLEMS, T. E.; PLOWE, C. V. Chloroquine-resistant malaria. **Journal of Infectious Diseases**, v. 184, n. 6, p. 770–776, 2001.
- 21 FIDOCK, D. A.; EASTMAN, R. T.; WARD, S. A.; MESHNICK, S. R. Recent highlights in antimalarial drug resistance and chemotherapy research. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 12, p. 537–44, 2008.
- 22 DONDORP, A. M. et al. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 5, p. 455–67, 2009.
- 23 YEUNG, S.; SOCHEAT, D.; MOORTHY, V.S.; MILLS, A. J. Artemisinin resistance on the Thai-Cambodian border. **Lancet**, v. 374, n. 9699, p. 1418–1419, 2009.
- 24 WHITE, N. J. Artemisinin resistance--the clock is ticking. **Lancet**, v. 376, n. 9758, p. 2051–2052, 2010.
- 25 OLSZEWSKI, K. L.; LLINÁS, M. Central carbon metabolism of *Plasmodium* parasites. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 175, n. 2, p. 95–103, 2011.
- 26 MEHTA, M.; SONAWAT, H. M.; SHARMA, S. Malaria parasite-infected erythrocytes inhibit glucose utilization in uninfected red cells. **FEBS Letters**, v. 579, n. 27, p. 6151–6158, 2005.

- 27 ROTH, E. F.; CALVIN, M. C.; MAX-AUDIT, I.; ROSA, J.; ROSA, R. The enzymes of the glycolytic pathway in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum* malaria parasites. **Blood**, v. 72, n. 6, p. 1922–1925, 1988.
- 28 BARNES, L. D.; STELLWAGEN, E. Enolase from the thermophile *Thermus X-1*. **Biochemistry**, v. 12, n. 8, p. 1559–1565, 1973.
- 29 BROWN, C. K.; KUHLMAN, P. L.; MATTINGLY, S.; SLATES, K.; CALIE, P. J.; FARRAR, W. W. A model of the quaternary structure of enolases, based on structural and evolutionary analysis of the octameric enolase from *Bacillus subtilis*. **Journal of Protein Chemistry**, v. 17, n. 8, p. 855–66, 1998.
- 30 VORA, H. K.; SHAIK, F. R.; PAL-BHOWMICK, I.; MOUT, R.; JARORI, G. K. Effect of deletion of a plant like pentapeptide insert on kinetic, structural and immunological properties of enolase from *Plasmodium falciparum*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 485, n. 2, p. 128–138, 2009.
- 31 PAL-BHOWMICK, I.; SADAGOPAN, K.; VORA, H. K.; SEHGAL, A.; SHARMA, S.; JARORI, G. K. Cloning, over-expression, purification and characterization of *Plasmodium falciparum* enolase. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, n. 23-24, p. 4845–4854, 2004.
- 32 QUIÑONES, W.; PEÑA, P.; DOMINGO-SANANES, M.; CÁCERES, A.; MICHELS, P. A. M.; AVILAN, L.; CONCEPCIÓN, J. L. *Leishmania mexicana*: molecular cloning and characterization of enolase. **Experimental Parasitology**, v. 116, n. 3, p. 241–251, 2007.
- 33 HANNAERT, V.; ALBERT, M.-A.; RIGDEN, D. J.; GIOTTO, M. T. S.; THIEMANN, O.; GARRATT, R. C.; ROY, J. Van; OPPERDOES, F. R.; MICHELS, P. A. M. Kinetic characterization, structure modelling studies and crystallization of *Trypanosoma brucei* enolase. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 15, p. 3205–3213, 2003.
- 34 SCHULZ, E. C.; TIETZEL, M.; TOVY, A.; ANKRI, S.; FICNER, R. Structure analysis of *Entamoeba histolytica* enolase. **Acta Crystallographica D: biological crystallography**, v. 67, pt 7, p. 619–627, 2011.
- 35 PAL-BHOWMICK, I.; VORA, H. K.; ROY, J.; SHARMA, S.; JARORI, G. K. Generation and characterisation of monoclonal antibodies specific to *Plasmodium falciparum* enolase. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 43, n. 2, p. 43–52, 2006.
- 36 BARBU, C.; DUMONTEIL, E.; GOURBIÈRE, S. Optimization of control strategies for non-domiciliated *Triatoma dimidiata*, Chagas disease vector in the Yucatán Peninsula, Mexico. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 4, p. e416, 2009.
- 37 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. fact sheet n. 340 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em: 20 mar. 2015
- 38 EL-SAYED, N. M. et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 409–415, 2005.

- 39 FAN, E. et al. Structural genomics of pathogenic protozoa: an overview. **Methods in Molecular Biology**, v. 426, p. 497–513, 2008.
- 40 MICHELS, P.A. Compartmentation of glycolysis in trypanosomes: a potential target for new trypanocidal drugs. **Biology of the Cell Under the Auspices of the European Cell Biology Organization**, v. 64, n. 2, p. 157–64, 1988.
- 41 VERLINDE, C. L.; HANNAERT, V.; BLONSKI, C.; WILLSON, M.; PÉRIÉ, J. J.; FOTHERGILL-GILMORE, L. A.; OPPERDOES, F. R.; GELB, M. H.; HOL, W. G.; MICHELS, P.A. Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs. **Drug Resistance Updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy**, v. 4, n. 1, p. 50–65, 2001.
- 42 LAKHDAR-GHAZAL, F.; BLONSKI, C.; WILLSON, M.; MICHELS, P.; PERIE, J. Glycolysis and proteases as targets for the design of new anti-trypanosome drugs. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 2, n. 5, p. 439–56, 2002.
- 43 GUERRA-GIRALDEZ, C.; QUIJADA, L.; CLAYTON, C. E. Compartmentation of enzymes in a microbody, the glycosome, is essential in *Trypanosoma brucei*. **Journal of Cell Science**, v. 115, n. pt 13, p. 2651–2658, 2002.
- 44 BAKKER, B. M.; MICHELS, P. A.; OPPERDOES, F. R.; WESTERHOFF, H. V What controls glycolysis in bloodstream form *Trypanosoma brucei*? **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 21, p. 14551–14559, 1999.
- 45 BAKKER, B. M.; WESTERHOFF, H. V; OPPERDOES, F. R.; MICHELS, P. A. Metabolic control analysis of glycolysis in trypanosomes as an approach to improve selectivity and effectiveness of drugs. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 106, n. 1, p. 1–10, 2000.
- 46 CÁCERES, A. J.; MICHELS, P. A M.; HANNAERT, V. Genetic validation of aldolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as drug targets in *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 169, n. 1, p. 50–54, 2010.
- 47 MALUF, F. V; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G.; GUIDO, R. V. A pharmacophore-based virtual screening approach for the discovery of *Trypanosoma cruzi* GAPDH inhibitors. **Future Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 17, p. 2019–35, 2013.
- 48 ASLANIDIS, C.; JONG, P. J. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 20, p. 6069–6074, 1990.
- 49 INOUE, H.; NOJIMA, H.; OKAYAMA, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene**, v. 96, n. 1, p. 23–28, 1990.
- 50 STUDIER, F. W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. **Protein Expression and Purification**, v. 41, n. 1, p. 207–234, 2005.
- 51 PAL-BHOWMICK, I.; SADAGOPAN, K.; VORA, H. K.; SEHGAL, A.; SHARMA, S.; JARORI, G.K. Cloning, over-expression, purification and characterization of

Plasmodium falciparum enolase. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, n. 23-24, p. 4845–4854, 2004.

52 MOHAMMADI, S.; NIKKHAH, M.; NAZARI, M.; HOSSEINKHANI, S. Design of a coupled bioluminescent assay for a recombinant pyruvate kinase from a thermophilic *Geobacillus*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, n. 6, p. 1338–45, 2011.

53 BROOKS, H. B.; GEEGANAGE, S.; KAHL, S. D.; MONTROSE, C.; SITTAMPALAM, S.; SMITH, M. C.; WEIDNER, J. R. (2012). **Basics of enzymatic assays for HTS**. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53196/>>. Acesso em: 20 mar. 2015.

54 BATTYE, T. G. G.; KONTOGIANNIS, L.; JOHNSON, O.; POWELL, H. R.; LESLIE, A. G. W. iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. **Acta Crystallographica D: biological crystallography**, v. 67, pt 4, p. 271–281, 2011.

55 KABSCH, W. Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. **Acta Crystallographica D: biological crystallography**, v. 66, pt 2, p. 133–144, 2010.

56 EVANS, P. R. An introduction to data reduction: space-group determination, scaling and intensity statistics. **Acta Crystallographica D: biological crystallography**, v. 67, pt 4, p. 282–292, 2011.

57 WINN, M. D. et al. Overview of the CCP4 suite and current developments. **Acta Crystallographica D: biological crystallography**, v. 67, pt 4, p. 235–242, 2011.

58 ADAMS, P. D. et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. **Acta Crystallographica D: biological crystallography**, v. 66, pt 2, p. 213–21, 2010.

59 KANTARDJIEFF, K. A.; RUPP, B. Matthews coefficient probabilities: improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA, and protein-nucleic acid complex crystals. **Protein science**: a publication of the protein society, v. 12, n. 9, p. 1865–1871, 2003.

60 MCCOY, A. J.; GROSSE-KUNSTLEVE, R. W.; ADAMS, P. D.; WINN, M. D.; STORONI, L. C.; READ, R. J. Phaser crystallographic software. **Journal of Applied Crystallography**, v. 40, pt 4, p. 658–674, 2007.

61 NAVARRO, A. S.; M. V DE; GOMES DIAS, S.M.; MELLO, L. V; SILVA GIOTTO, M.T. DA; GAVALDA, S.; BLONSKI, C.; GARRATT, R.C.; RIGDEN, D.J. Structural flexibility in *Trypanosoma brucei* enolase revealed by X-ray crystallography and molecular dynamics. **FEBS Journal**, v. 274, n. 19, p. 5077–5089, 2007.

62 EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallographica D: biological crystallography**, v. 60, pt 12, p. 2126–2132, 2004.

63 CHEN, V. B.; ARENDALL, W. B.; HEADD, J. J.; KEEDY, D. A.; IMMORMINO, R. M.; KAPRAL, G. J.; MURRAY, L. W.; RICHARDSON, J. S.; RICHARDSON, D. C.

MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica D: biological crystallography**, v. 66, pt 1, p. 12–21, 2010.

64 IRWIN, J. J.; STERLING, T.; MYSINGER, M. M.; BOLSTAD, E. S.; COLEMAN, R. G. ZINC: a free tool to discover chemistry for biology. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, n. 7, p. 1757–1768, 2012.

65 TEAGUE, S. J.; DAVIS, A. M.; LEESON, P. D.; OPREA, T. The design of leadlike combinatorial libraries. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 38, n. 24, p. 3743–3748, 1999.

66 CHARIFSON, P. S.; WALTERS, W. P. Filtering databases and chemical libraries. **Molecular Diversity**, v. 5, n. 4, p. 185–197, 2000.

67 RISHTON, G. M. Nonleadlikeness and leadlikeness in biochemical screening. **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 2, p. 86–96, 2003.

68 SCHRÖDINGER Release 2014-1: LigPrep, version 2.9. New York, LLC, 2014.

69 BANKS, J. L. et al. Integrated modeling program, applied chemical theory (IMPACT). **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1752–1780, 2005.

70 NEESE, F. The ORCA program system. **Wiley Interdisciplinary Reviews: computational molecular science**, v. 2, n. 1, p. 73–78, 2012.

71 SOTRIFTER, C. A.; SANSCHAGRIN, P.; MATTER, H.; KLEBE, G. SFCscore: scoring functions for affinity prediction of protein-ligand complexes. **Proteins**, v. 73, n. 2, p. 395–419, 2008.

72 ZHOU, Z.; FELTS, A. K.; FRIESNER, R. A.; LEVY, R. M. Comparative performance of several flexible docking programs and scoring functions: enrichment studies for a diverse set of pharmaceutically relevant targets. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 47, n. 4, p. 1599–1608, 2007.

73 CROSS, J. B.; THOMPSON, D. C.; RAI, B. K.; BABER, J. C.; FAN, K. Y.; HU, Y.; HUMBLET, C. Comparison of several molecular docking programs: pose prediction and virtual screening accuracy. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, n. 6, p. 1455–1474, 2009.

74 HANNAERT, V.; OPPERDOES, F. R.; MICHELS, P. A. Glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*: expression in *Escherichia coli*, purification, and characterization of the enzymes. **Protein Expression and Purification**, v. 6, n. 3, p. 244–250, 1995.

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

- 76 PEREIRA, J. M.; SEVERINO, R. P.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; ZOTTIS, A.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G.; CORRÊA, A. G. Anacardic acid derivatives as inhibitors of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 19, p. 8889–8895, 2008.
- 77 FREITAS, R. F.; PROKOPCZYK, I. M.; ZOTTIS, A.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D.; TREVISAN, M. T. S.; VILEGAS, W.; SILVA, M. G. V.; MONTANARI, C. A. Discovery of novel *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 6, p. 2476–82, 2009.
- 78 PREUSS, J. et al. Discovery of a *Plasmodium falciparum* glucose-6-phosphate dehydrogenase 6-phosphogluconolactonase inhibitor (R,Z)-N-((1-ethylpyrrolidin-2-yl)methyl)-2-(2-fluorobenzylidene)-3-oxo-3,4-dihydro-2H-benzo[b][1,4]thiazine-6-carboxamide (ML276) that reduces paras. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 16, p. 7262–7272, 2012.
- 79 GUIDO, R. V. C.; BALLIANO, T. L.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Kinetic and Crystallographic Studies on Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi* in Complex with Iodoacetate. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 6, n. 3, p. 5, 2009.
- 80 MCGOVERN, S. L.; HELFAND, B. T.; FENG, B.; SHOICHET, B. K. A specific mechanism of nonspecific inhibition. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 20, p. 4265–4272, 2003.
- 81 ZHANG, J.-H. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 4, n. 2, p. 67–73, 1999.
- 82 SPANGENBERG, T.; BURROWS, J. N.; KOWALCZYK, P.; MCDONALD, S.; WELLS, T. N. C.; WILLIS, P. The open access malaria box: a drug discovery catalyst for neglected diseases. **PloS One**, v. 8, n. 6, p. e62906, 2013.
- 83 MALUF, F.V.; MUNIZ, J.R.C.; OLIVA, G.; GUIDO, R.V.C. Cristalografia de Proteínas In: Verli, H. **Bioinformática: da Biologia à Flexibilidade Molecular**. 1. Ed. São Paulo: SBBq, 2014. c.13, p. 252-282.
- 84 OWENS, R.; VINCENTELLI, R.; CIMINO, A.; GEERLOF, A.; KUBO, A.; SATOU, Y.; CAMBILLAU, C. High-throughput protein expression screening and purification in *Escherichia coli*. **Methods**, v. 55, n. 1, p. 65–72, 2011.
- 85 BIRD, L. E. High throughput construction and small scale expression screening of multi-tag vectors in *Escherichia coli*. **Methods** v. 55, n. 1, p. 29–37, 2011.
- 86 SCHEIN, C. H.; NOTEBORN, M. H. M. Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia Coli* is favored by lower growth temperature. **Bio/Technology**, v. 6, n. 3, p. 291–294, 1988.

- 87 FAN, F.; WOOD, K. V Bioluminescent assays for high-throughput screening. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 5, n. 1, p. 127–136, 2007.
- 88 POSNER, B. A.; XI, H.; MILLS, J.E.J. Enhanced HTS hit selection via a local hit rate analysis. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, n. 10, p. 2202–2210, 2009.
- 89 QIN, J.; CHAI, G.; BREWER, J.M.; LOVELACE, L.L.; LEBIODA, L. Structures of asymmetric complexes of human neuron specific enolase with resolved substrate and product and an analogous complex with two inhibitors indicate subunit interaction and inhibitor cooperativity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 111, p. 187–194, 2012.
- 90 VORA, H. K.; SHAIK, F. R.; PAL-BHOWMICK, I.; MOUT, R.; JARORI, G. K. Effect of deletion of a plant like pentapeptide insert on kinetic, structural and immunological properties of enolase from *Plasmodium falciparum*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 485, n. 2, p. 128–138, 2009.
- 91 DAUTER, Z.; WLODAWER, A.; MINOR, W.; JASKOLSKI, M.; RUPP, B. Avoidable errors in deposited macromolecular structures: an impediment to efficient data mining. **IUCr Journal**, v. 1, pt 3, p. 179–193, 2014.
- 92 BRÜNGER, A. T. Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. **Nature**, v. 355, n. 6359, p. 472–475, 1992.
- 93 SCHURIG, H.; RUTKAT, K.; RACHEL, R.; JAENICKE, R. Octameric enolase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: purification, characterization, and image processing. **Protein Science** : a publication of the protein society, v. 4, n. 2, p. 228–236, 1995.
- 94 HARRIS, J. J.; JOLIVET, R.; ATTWELL, D. Synaptic energy use and supply. **Neuron**, v. 75, n. 5, p. 762–777, 2012.
- 95 PELICANO, H.; MARTIN, D.S.; XU, R.-H.; HUANG, P. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. **Oncogene**, v. 25, n. 34, p. 4633–4646, 2006.
- 96 PAL-BHOWMICK, I.; VORA, H. K.; ROY, J.; SHARMA, S.; JARORI, G. K. Generation and characterisation of monoclonal antibodies specific to *Plasmodium falciparum* enolase. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 43, n. 2, p. 43–52, 2006.
- 97 JUNG, D.-W.; KIM, W.-H.; PARK, S.-H.; LEE, J.; KIM, J.; SU, D.; HA, H.-H.; CHANG, Y.-T.; WILLIAMS, D.R. A unique small molecule inhibitor of enolase clarifies its role in fundamental biological processes. **ACS Chemical Biology**, v. 8, n. 6, p. 1271–82, 2013.
- 98 DANISHUDDIN, M.; KHAN, A. U. Structure based virtual screening to discover putative drug candidates: necessary considerations and successful case studies. **Methods**, v. 71, p. 135–145, 2015. doi:10.1016/j.ymeth.2014.10.019.
- 99 KLEBE, G. Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations. **Drug Discovery Today**, v. 11, n. 13-14, p. 580–594, 2006.

- 100 MACARRON, R.; BANKS, M.N.; BOJANIC, D.; BURNS, D.J.; CIROVIC, D.A.; GARYANTES, T.; GREEN, D.V.S.; HERTZBERG, R.P.; JANZEN, W.P.; PASLAY, J.W.; SCHOPFER, U.; SITTAMPALAM, G.S. Impact of high-throughput screening in biomedical research. **Nature Reviews. Drug discovery**, v. 10, n. 3, p. 188–95, 2011.
- 101 TANRIKULU, Y.; KRÜGER, B.; PROSCHAK, E. The holistic integration of virtual screening in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 7-8, p. 358–364, 2013.
- 102 KUNTZ, I. D.; BLANEY, J. M.; OATLEY, S. J.; LANGRIDGE, R.; FERRIN, T. E. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. **Journal of Molecular Biology**, v. 161, n. 2, p. 269–288, 1982.
- 103 JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R. C.; LEACH, A. R.; TAYLOR, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of Molecular Biology**, v. 267, n. 3, p. 727–748, 1997.
- 104 RAREY, M.; KRAMER, B.; LENGAUER, T.; KLEBE, G. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. **Journal of Molecular Biology**, v. 261, n. 3, p. 470–489, 1996.
- 105 FRIESNER, R. A.; BANKS, J. L.; MURPHY, R. B.; HALGREN, T. A.; KLICIC, J. J.; MAINZ, D. T.; REPASKY, M. P.; KNOLL, E. H.; SHELLEY, M.; PERRY, J. K.; SHAW, D. E.; FRANCIS, P.; SHENKIN, P. S. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. method and assessment of docking accuracy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 7, p. 1739–49, 2004.
- 106 MORRIS, G. M.; HUEY, R.; LINDSTROM, W.; SANNER, M. F.; BELEW, R. K.; GOODSSELL, D. S.; OLSON, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, 2009.
- 107 CHEN, H.; LYNE, P. D.; GIORDANETTO, F.; LOVELL, T.; LI, J. On evaluating molecular-docking methods for pose prediction and enrichment factors. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 46, n. 1, p. 401–415, 2006.
- 108 CUMMINGS, M. D.; DESJARLAIS, R. L.; GIBBS, A. C.; MOHAN, V.; JAEGER, E. P. Comparison of automated docking programs as virtual screening tools. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 4, p. 962–976, 2005.
- 109 KELLENBERGER, E.; RODRIGO, J.; MULLER, P.; ROGNAN, D. Comparative evaluation of eight docking tools for docking and virtual screening accuracy. **Proteins: structure, function, and bioinformatics**, v. 57, n. 2, p. 225–242, 2004.
- 110 PEROLA, E.; WALTERS, W. P.; CHARIFSON, P. S. A detailed comparison of current docking and scoring methods on systems of pharmaceutical relevance. **Proteins**, v. 56, n. 2, p. 235–49, 2004.
- 111 LI, X.; LI, Y.; CHENG, T.; LIU, Z.; WANG, R. Evaluation of the performance of four molecular docking programs on a diverse set of protein-ligand complexes. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 11, p. 2109–2125, 2010.

- 112 FRIESNER, R. A.; MURPHY, R. B.; REPASKY, M. P.; FRYE, L. L.; GREENWOOD, J. R.; HALGREN, T. A.; SANSCHAGRIN, P. C.; MAINZ, D. T. Extra precision glide: docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 21, p. 6177–6196, 2006.
- 113 XU, W.; LUCKE, A. J.; FAIRLIE, D. P. Comparing sixteen scoring functions for predicting biological activities of ligands for protein targets. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 57, n. 1, p. 76–88, 2015.
- 114 JORGENSEN, W. L.; TIRADO-RIVES, J. The OPLS optimized potentials for liquid simulations potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 110, n. 6, p. 1657–1666, 1988.
- 115 CHO, A. E.; GUALLAR, V.; BERNE, B. J.; FRIESNER, R. Importance of accurate charges in molecular docking: quantum mechanical/molecular mechanical (QM/MM) approach. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, n. 9, p. 915–931, 2005.
- 116 GUIDO, R. V.C. **Planejamento de inibidores da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi***: biologia estrutural e química medicinal . Tese de Doutorado. Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.
- 117 CHELESKI, J.; FREITAS, R. F.; WIGGERS, H. J.; ROCHA, J. R.; ARAÚJO, A. P. U.; MONTANARI, C. A. Expression, purification and kinetic characterization of his-tagged glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. **Protein Expression and Purification**, v. 76, n. 2, p. 190–196, 2011.
- 118 KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews: drug discovery**, v. 4, n. 3, p. 206–220, 2005.
- 119 MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: an evolving role in future drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4769–4807, 2011.
- 120 HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19-20, p. 894–901, 2008.
- 121 MCGOVERN, S. L.; HELFAND, B. T.; FENG, B.; SHOICHET, B. K. A specific mechanism of nonspecific inhibition. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 20, p. 4265–4272, 2003.
- 122 POSTIGO, M. P.; GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G.; CASTILHO, M. S.; R PITTA, I.; ALBUQUERQUE, J. F. C.; ANDRICOPULO, A. D. Discovery of new inhibitors of *Schistosoma mansoni* PNP by pharmacophore-based virtual screening. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 50, n. 9, p. 1693–1705, 2010.
- 123 Copeland, R. A. **Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery**. New Jersey: Wiley, 2005.

- 124 BRESSI, J. C.; VERLINDE, C. L.; ARONOV, A. M.; SHAW, M. L.; SHIN, S. S.; NGUYEN, L. N.; SURESH, S.; BUCKNER, F. S.; VOORHIS, W. C. VAN; KUNTZ, I. D.; HOL, W. G.; GELB, M. H. Adenosine analogues as selective inhibitors of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of Trypanosomatidae via structure-based drug design. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 13, p. 2080–2093, 2001.
- 125 ARONOV, A. M.; SURESH, S.; BUCKNER, F. S.; VOORHIS, W. C. VAN; VERLINDE, C. L.; OPPERDOES, F. R.; HOL, W. G.; GELB, M. H. Structure-based design of submicromolar, biologically active inhibitors of trypanosomatid glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 8, p. 4273–4278, 1999.
- 126 ARONOV, A. M.; VERLINDE, C. L.; HOL, W. G.; GELB, M. H. Selective tight binding inhibitors of trypanosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase via structure-based drug design. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, n. 24, p. 4790–4799, 1998.
- 127 KENNEDY, K. J.; BRESSI, J. C.; GELB, M. H. A disubstituted NAD⁺ analogue is a nanomolar inhibitor of trypanosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, n. 2, p. 95–98, 2001.
- 128 LIPINSKI, C.A. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 44, n. 1, p. 235–249, 2000.
- 129 PREUSS, J.; RICHARDSON, A. D.; PINKERTON, A.; HEDRICK, M.; SERGIENKO, E.; RAHLFS, S.; BECKER, K.; BODE, L. Identification and characterization of novel human glucose-6-phosphate dehydrogenase inhibitors. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 18, n. 3, p. 286–97, 2013.
- 130 HANNAERT, V.; OPPERDOES, F. R.; MICHELS, P. A. Glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*: expression in *Escherichia coli*, purification, and characterization of the enzymes. **Protein Expression and Purification**, v. 6, n. 3, p. 244–250, 1995.
- 131 FREITAS, R. F.; PROKOPCZYK, I. M.; ZOTTIS, A.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D.; TREVISAN, M. T. S.; VILEGAS, W.; SILVA, M. G. V.; MONTANARI, C. A. Discovery of novel *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 6, p. 2476–2482, 2009.
- 132 SEIDLER, N. W. **GAPDH**: biological properties and diversity. New York: Springer, 2013. doi: 10.1007/978-94-007-4716-6.
- 133 BLEICHER, K. H.; BÖHM, H.-J.; MÜLLER, K.; ALANINE, A. I. Hit and lead generation: beyond high-throughput screening. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 5, p. 369–378, 2003.

134 MAYR, L. M.; FUERST, P. The future of high-throughput screening. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 13, n. 6, p. 443–8, 2008.

135 ENTZEROTH, M.; FLOTOW, H.; CONDRON, P. Overview of high-throughput screening. **Current protocols in pharmacology**. 2009. doi: 10.1002/0471141755.ph0904s44.

APÊNDICE

Kinecteasy
Produção científica

APÊNDICE A – Visão geral do programa Kinecteasy

Assay

Compounds library

Graphical analysis

$$\frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$
Data analysis

Data export

Provided by

Prof. Paulo Cezar (UFSCar)

Series

EGCE

Name

EGCE_15

Concentration

400

Unit

μM

Position

(1)

(2)

(3)

Generate intermediate file

Top

Up

Add

Remove

Down

Bottom

Compounds library

Name	Replicate	Position	Concentration	Series	Provided by
EGFE_1010	1	A1	400 μM	EGFE	Prof. Paulo Cezar
EGFE_1010	2	A2	400 μM	EGFE	Prof. Paulo Cezar
EGFE_1010	3	A3	400 μM	EGFE	Prof. Paulo Cezar
EGFE_1015	1	A4	400 μM	EGFE	Prof. Paulo Cezar
EGFE_1015	2	A5	400 μM	EGFE	Prof. Paulo Cezar
EGFE_1015	3	A6	400 μM	EGFE	Prof. Paulo Cezar
EGCE_12	1	B1	400 μM	EGCE	Prof. Paulo Cezar
EGCE_12	2	B2	400 μM	EGCE	Prof. Paulo Cezar
EGCE_12	3	B3	400 μM	EGCE	Prof. Paulo Cezar

Filter

Selected workfolder: /home/fernandomaluf/Documents

Assay

Compounds library

Graphical analysis

$$\frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$
Data analysis

Data export

button

Name	Replicate	Plate position	Concentration	Graph
EGFE_1010	1	A1	400 μM	☒
EGFE_1010	2	A2	400 μM	☐
EGFE_1010	3	A3	400 μM	☐
EGFE_1015	1	A4	400 μM	☐
EGFE_1015	2	A5	400 μM	☐
EGFE_1015	3	A6	400 μM	☐
EGCE_12	1	B1	400 μM	☐
EGCE_12	2	B2	400 μM	☐
EGCE_12	3	B3	400 μM	☐
EGCE_13	1	D1	400 μM	☒

Graphical analysis

Absorbance nm- UA

Cycles

Selected workfolder: /home/fernandomaluf/Documents

KinectEASY
File Help

Analysis

Assay analysis

Name	Replicate	Astart	Aend	Slope	% inhibition	SD	Sign for use
EGCE_12	Average	-	-	-	100.133333333	0.167796172649	☐
EGCE_13	Average	-	-	-	-2.37	-	☐
EGFE_1010	Average	-	-	-	100.436666667	0.0464279609239	☐
EGFE_1010	1	0.0506	0.0487	-0.0019	100.50	-	☒
EGFE_1010	2	0.0580	0.0564	-0.0016	100.42	-	☒
EGFE_1010	3	0.0516	0.0501	-0.0015	100.39	-	☒
EGFE_1015	Average	-	-	-	47.8533333333	0.621092227898	☐
EGFE_1015	1	0.0534	0.2510	0.1976	48.00	-	☒
EGFE_1015	2	0.0547	0.2560	0.2013	47.03	-	☒
EGFE_1015	3	0.0544	0.2500	0.1956	48.53	-	☒

Assay

Compounds library

Graphical analysis

$\frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$
Data analysis

Data export

Selected workfolder: /home/fernandomaluf/Documents

APÊNDICE B – Produção científica

Artigos completos publicados em periódicos

EADSFORTH, T.C.; MALUF, F. V.; HUNTER, W.N. *Acinetobacter baumannii* Fold ligand complexes - Potent inhibitors of folate metabolism and a re-evaluation of the structure of LY374571. **FEBS Journal**, v. 279, n. 23, p. 4350–4360, 2012.

EADSFORTH, T.C.; GARDINER, M.; MALUF, F. V.; MCELROY, S.; JAMES, D.; FREARSON, J.; GRAY, D.; HUNTER, W.N. Assessment of *Pseudomonas aeruginosa* N5,N10-Methylenetetrahydrofolate Dehydrogenase - Cyclohydrolase as a Potential Antibacterial Drug Target. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e35973, 2012.

MALUF, F. V; ANDRICOPULO, A.D.; OLIVA, G.; GUIDO, R.V. A pharmacophore-based virtual screening approach for the discovery of *Trypanosoma cruzi* GAPDH inhibitors. **Future Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 17, p. 2019–35, 2013.

ALVES, E.; IGLESIAS, B.A.; DEDA, D.K.; BUDU, A.; MATIAS, T.A.; BUENO, V.B.; MALUF, F. V; GUIDO, R.V.C.; OLIVA, G.; CATALANI, L.H.; ARAKI, K.; GARCIA, C.R.S. Encapsulation of metalloporphyrins improves their capacity to block the viability of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine**, v. 11, n. 2, p. 351–8, 2015.

RUGGIERO BACHEGA, J.F.; VASCONCELOS MALUF, F.; ANDI, B.; D’MUNIZ PEREIRA, H.; FALSARELLA CARAZZOLLEA, M.; ORVILLE, A.M.; TABAK, M.; BRANDÃO-NETO, J.; GARRATT, R.C.; HORJALES REBOREDO, E. The structure of the giant haemoglobin from *Glossoscolex paulistus*. **Acta Crystallographica D: Biological Crystallography**, v. 71, n. 6, p. 1257–1271, 2015.

Capítulo de Livro

MALUF, F.V.; MUNIZ, J.R.C.; OLIVA, G.; GUIDO, R.V.C. Cristalografia de Proteínas In: Verli, H. **Bioinformática: da Biologia à Flexibilidade Molecular**. 1. Ed. São Paulo: SBBq, 2014. c.13, p. 252-282.