UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

MARIANE LEITE

Triagem e seleção de inibidores da enzima cruzaina do parasita
Trypanosoma cruzi

São Carlos
2013

MARIANE LEITE

Triagem e seleção de inibidores da enzima cruzaina do parasita
Trypanosoma cruzi

Dissertação 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
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada

Opção: Física Biomolecular

Orientador: Prof. Dr. Adriano Defini
Andricopulo

Versão Corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHO, POR 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)

Leite, Mariane

Triagem e seleção de inibidores da enzima cruzaina
do parasita Trypanosoma cruzi / Mariane Leite;
orientador Adriano Defini Andricopulo - versão
corrigida -- São Carlos, 2013.

61 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em
Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física
de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2013.

1. Trypanosoma cruzi. 2. Cruzaina. 3. Química
medicinal. 4. Planejamento de fármacos. I.
Andricopulo, Adriano Defini, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

É com muito carinho e satisfação que faço agora meus agradecimentos a todas as pessoas que estiveram, ao longo do período de desenvolvimento deste trabalho, junto comigo na busca da realização de mais este sonho, compartilhando minhas angústias, alegrias e realizações.

A Deus pelo dom da vida e divina misericórdia.

Ao meu esposo e companheiro Leandro por todos esses anos de dedicação, paciência e carinho, sempre me apoiando e incentivando em todas as minhas mudanças.

Aos meus pais, Jose Carlos (o mais generoso de todos os pais) e Carmen (pelo exemplo de vida), por possibilitarem a realização de meus estudos e por contribuírem na formação do meu caráter, além de todo carinho e amor.

A minha querida irmã Cristiane, que nos momentos de desânimo esteve comigo me incentivando a continuar o caminho para o meu crescimento.

Aos meus cunhados, tios, primos, sogros e sobrinhas, pela força e carinho demonstrado.

Ao Prof. Dr. Adriano D. Andricopulo pela sua disponibilidade e pelo acompanhamento exercido durante a execução do trabalho e por toda orientação e esclarecimentos necessários para o meu desempenho durante o transcorrer desse projeto.

Com carinho, agradeço aos amigos e colegas de pesquisa que, juntamente comigo, puderam dialogar e construir o presente trabalho. Em especial, ao Dr. Leonardo L. G. Ferreira, e as doutorandas Wanessa F. Altei e Mariana L. de Souza.

Aos professores Elizabeth Igne Ferreira e Gustavo H. G. Trossini, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, e a professora Daniela Gonçalves Rando, da Universidade Federal de São Paulo, pela fundamental colaboração neste trabalho.

A todos os professores, funcionários e colegas do Instituto de Física de São Carlos. Em especial aos colegas do Laboratório de Química Medicinal e Computacional.

A CAPES, a FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

RESUMO

LEITE, M. **Triagem e seleção de inibidores da enzima cruzaina do parasita *Trypanosoma cruzi***. 2013. 61p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

A doença de Chagas, uma infecção parasitária amplamente distribuída na América Latina, é um problema grave de saúde pública com consequências devastadoras em termos de morbidade e mortalidade humana. As alternativas terapêuticas existentes são limitadas e insuficientes devido principalmente à baixa eficácia e elevada toxicidade. Visando o planejamento de novos candidatos a agentes antichagásicos, diversas vias bioquímicas e proteínas do parasita são alvos de estudos. A enzima cruzaina, uma cisteíno-protease envolvida em todos os estágios de desenvolvimento e diferenciação do *Trypanosoma cruzi*, foi selecionada como alvo molecular em nosso grupo para o presente trabalho de dissertação de mestrado. Duas séries de compostos foram avaliadas através de ensaios bioquímicos com a enzima alvo. A primeira série consiste de 14 derivados de chalconas e hidrazonas, sendo que 8 compostos apresentaram atividade inibitória frente a cruzaina, com valores superiores a 70%. Destes, destaca-se a hidrazona **19**, que apresentou significativa potência *in vitro*, com valor de IC₅₀ de 220 nM. A segunda série investigada, formada por 11 compostos selecionados previamente através de triagens virtuais, apresentou interessante perfil inibitório. Nove compostos apresentaram elevada potência, sendo que 7 exibiram valores de IC₅₀ na faixa nanomolar, entre 646 nM (composto **32**) e 11,3 nM (composto **24**). Os resultados extremamente positivos alcançados neste trabalho demonstram a importância da avaliação experimental através de ensaios bioquímicos padronizados, que foi fundamental para a caracterização e a validação destas séries de inibidores. A diversidade química estudada é significativa e os melhores compostos serão muito úteis em etapas futuras de pesquisa de nosso grupo envolvendo os processos de descoberta e otimização de compostos líderes. Neste contexto, atenção especial será dada aos compostos **19**, **28** e **34** que representam modelos extremamente atrativos em química medicinal e planejamento de fármacos.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. Cruzaina. Química medicinal. Planejamento de fármacos.

ABSTRACT

LEITE, M. **Screening and selection of inhibitors of the cruzain enzyme from the parasite *Trypanosoma cruzi***. 2013. 61p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

Chagas' disease, a parasitic infection widely distributed in Latin America, is a serious public health problem with devastating consequences in terms of human morbidity and mortality. The existing therapeutic alternatives are limited and insufficient, mainly due to low efficacy and high toxicity. Aiming at the design of new antichagasic agents, a variety of biochemical pathways and parasite proteins are currently being investigated as drug targets. The enzyme cruzain, a cysteine protease involved in all stages of development and differentiation of *Trypanosoma cruzi*, has been selected as molecular target in this dissertation work. Two series of compounds have been evaluated through biochemical assays with the target enzyme. The first series consists of 14 hydrazone and chalcone derivatives, where 8 compounds showed inhibitory activity against cruzain, with values greater than 70%. Of these, the hydrazone **19** showed significant *in vitro* potency with a value of 220 nM. The second series investigated, comprising 11 compounds previously selected by a virtual screening approach, showed interesting inhibitory profile. Nine compounds showed high potency, and 7 exhibited IC₅₀ values in the nanomolar range from 646 nM (compound **32**) to 11.3 nM (compound **24**). The promising results achieved in this study demonstrate the importance of the experimental evaluation using standard biochemical assays, which was essential for the characterization and validation of these series of inhibitors. The chemical diversity explored is significant and the most potent compounds will be useful in future steps of our research group involving the processes of lead discovery and optimization. In this context, special attention will be given to compounds **19**, **28** and **34** which represent extremely attractive models in medicinal chemistry and drug design.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Cruzain. Medicinal chemistry. Drug design.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Rotas de migração a partir da América Latina e estimativa do número de indivíduos infectados em países onde a doença não é endêmica ⁵	21
Figura 2	Esquema geral do ciclo de vida do T. cruzi. Fonte: Adaptado de TRYPANOSOMA ⁸	23
Figura 3	Fármacos desenvolvidos há cerca de quatro décadas para o tratamento da doença de Chagas	24
Figura 4	Representação da estrutura da cruzaina demonstrando os dois domínios, onde um deles é predominantemente formado por hélices- α (vermelho) e o outro por folhas- β (verde). Em destaque o sítio catalítico da enzima ocupado pelo inibidor benzimidazol (PDB ID 3KKU)	25
Figura 5	Representação da estrutura da enzima cruzaina de T. cruzi, com destaque para os seus principais subsítios: S1, S2, S3 e S1	26
Figura 6	Exemplos de inibidores da enzima cruzaina pertencentes a diferentes classes químicas: (3) vinilsulfonas, (4) fluorometilcetonas, (5) triazóis, (6) pirimidinas, (7) tiosemicarbazonas, (8) chalconas e (9) benzimidazóis	27
Figura 7	Estrutura cristalográfica da cruzaina em complexo com o inibidor K777 (PDB ID: 2OZ2). A figura mostra as interações polares entre o inibidor e a enzima.	28
Figura 8	Gel SDS-PAGE mostrando a ativação da cruzaina. M: Marcador de peso molecular; 1:cruzaina pura (32 KDa), 2: Cruzaina em processo de clivagem, 3: cruzaina clivada (22,5 kDa)	38
Figura 9	Esquema da clivagem do substrato Z-Phe-Arg-AMC	43
Figura 10	Estrutura molecular do nitrofural.	44
Figura 11	Esqueleto fundamental das chalconas	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Avaliação bioquímica in vitro da série de chalconas e hidrazonas contra a cruzaina.	45
Tabela 2	Efeito inibitório da enzima cruzaina para uma série de compostos selecionados através de triagem virtual	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>	21
EC	<i>Enzyme comission</i>	24
Cys	Cisteína	24
His	Histidina	24
Asn	Asparagina	24
S	Subsítio	25
PDB	<i>Protein Data Bank</i>	27
HTS	<i>High throughput screening</i>	28
SBDD	<i>Structure-based drug design</i>	29
LBDD	<i>Ligand-based drug design</i>	29
IC ₅₀	Concentração de inibidor necessária para a obtenção de 50% de inibição da atividade enzimática	33
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	37
LB	Luria-Bertani	37
DO	Densidade óptica	37
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo	37
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano	37
Ni-NTA	Níquel ácido nitriloacético	37
DTT	Ditiotreitol	37
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético	37
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil-sulfato de sódio	37
Z-Phe-Arg-AMC	Benzoil-fenilalanina-arginina-aminometilcumarina	38
K _M	Constante de Michaelis-Menten	38
SAR	<i>Structure-activity relationships</i>	45
clogP	Coeficiente de partição octanol-água calculado	48

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Doença de Chagas	21
1.2	Enzima cruzaina	24
1.3	Descoberta de Fármacos	28
2	OBJETIVOS	31
3	MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1	Expressão e purificação da enzima cruzaina de <i>T. cruzi</i>	37
3.2	Ensaio enzimático e avaliação bioquímica dos compostos	38
3.3	Compostos selecionados para avaliação <i>in vitro</i>	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	Avaliação bioquímica dos compostos	43
4.2	Derivados de hidrazonas e chalconas	44
4.3	Série de compostos selecionados por busca virtual	48
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	53
	REFERÊNCIAS	57

CAPÍTULO 1

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas é uma doença infecciosa, causada pelo protozoário parasita *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) e recebeu esse nome em homenagem ao seu descobridor, o médico brasileiro Carlos Chagas, em 1909. Estima-se que cerca de 10 milhões de indivíduos estão infectados em todo o mundo, sendo que em muitos países da América Latina, incluindo Brasil, Argentina e México, essa doença é considerada endêmica¹. Porém, com a crescente urbanização e mobilidade populacional, o número de infectados se espalhou, aumentando assim o risco de transmissão². Devido aos altos índices de migração, a doença de Chagas, que anteriormente era considerada um problema somente na América Latina, hoje se encontra em países desenvolvidos da Europa e da América do Norte, bem como da Ásia e Oceania, tornando-se um problema mundial de saúde pública³⁻⁵. Na Figura 1 podem-se observar as principais rotas de migração da doença de Chagas e o número total estimado de indivíduos infectados em países onde a doença não é considerada endêmica⁴.

Figura 1 - Rotas de migração a partir da América Latina e estimativa do número de indivíduos infectados em países onde a doença não é endêmica⁵.

A transmissão do parasita ocorre, principalmente, através das fezes de insetos hematófagos, popularmente chamados “barbeiros”. Outras formas de contaminação menos frequentes também são descritas, tais como transfusões de sangue, transplante de órgãos, ingestão de alimentos infectados, além da transmissão congênita⁵.

O *T. cruzi* pertence à família Trypanosomatidae da ordem Kinetoplastida, apresentando um núcleo oval, um flagelo e um quinetoplasto. O ciclo de vida do parasita envolve três formas distintas (epimastigota, tripomastigota e amastigota), um hospedeiro invertebrado e outro vertebrado⁶⁻⁷.

O ciclo de transmissão (Figura 2) se inicia quando um inseto infectado, ao se alimentar do sangue do hospedeiro vertebrado, defeca próximo ao local da picada, liberando tripomastigotas metacíclicos, forma infectante, **(1)** que penetram nas células próximas ao local da picada **(2)**. Essa forma infectante se diferencia em amastigotas, forma de replicação celular, **(3)** que se multiplicam nas células próximas aos tecidos infectados. As amastigotas intracelulares **(4)** se diferenciam novamente em tripomastigotas que lisam a célula e atingem a corrente sanguínea.

As tripomastigotas podem infectar outras células e se diferenciar em distintos locais de infecção. Nesse estágio (denominado fase clínica aguda) é possível o diagnóstico pelo surgimento de manifestações clínicas, principalmente a febre prolongada (na maioria dos casos ocorrem também prostração, diarreia, vômitos, inapetência, cefaleia e mialgias, entre outros).

O ciclo de transmissão se perpetua **(5)** quando um inseto se alimenta de sangue infectado contendo a forma tripomastigota. Essa forma se transforma em **(6)** epimastigota no intestino do vetor, se multiplica **(7)** no intestino delgado e se transforma **(8)** em tripomastigota metacíclico infectante no intestino grosso, dando continuidade ao ciclo de transmissão do parasita.

Figura 2 – Esquema geral do ciclo de vida do *T. cruzi*. Fonte: Adaptado de TRYPANOSOMA⁸

A doença de Chagas apresenta duas fases clínicas: aguda (inicial) e crônica⁹. A fase aguda pode ser sintomática ou assintomática. Inicia-se, normalmente, após a infecção com o parasita e os sintomas geralmente desaparecem espontaneamente, evoluindo para a fase crônica, ou progredindo para formas agudas graves que podem levar ao óbito em alguns casos, devido à insuficiência cardíaca e graves processos inflamatórios em tecidos cerebrais. Para a maioria dos indivíduos infectados, o quadro evolui para um equilíbrio entre o parasita e o hospedeiro, sem manifestações clínicas, relatado como fase crônica assintomática¹⁰. Alguns pacientes podem apresentar danos em órgãos do sistema cardiovascular ou digestivo, levando a modificações anatômicas do miocárdio, que causam insuficiência cardíaca, bem como dilatações do esôfago, cólon e duodeno, denominadas megaesôfago, megacólon e megaduodeno, respectivamente.

Desde o início da década de 1970, dois fármacos são utilizados no tratamento da doença. O nifurtimox (1, Lampit[®], da Bayer) e o benzonidazol (2, Rochagan[®], da Roche) (Figura 3). A terapia atual é extremamente limitada, apresentando diversos problemas, como baixa eficácia e graves efeitos colaterais⁹⁻¹¹. Portanto, os estudos referentes ao

desenvolvimento de candidatos a novos fármacos para o tratamento eficaz e seguro da doença são da mais alta relevância em termos científicos, tecnológicos, sociais e econômicos.

Figura 3 - Fármacos desenvolvidos há cerca de quatro décadas para o tratamento da doença de Chagas.

O sequenciamento do genoma do *T. cruzi* contribuiu para a identificação de diversos alvos biológicos – predominantemente enzimas – que têm sido estudados na descoberta de novos agentes antichagásicos⁹⁻¹². Uma delas, a enzima cruzaina, de interesse em nosso grupo de pesquisa, foi selecionada para o presente trabalho de dissertação de mestrado.

1.2 Enzima cruzaina

A cruzaina (EC 3.4.22.51), principal cisteíno-protease do *T. cruzi*, é considerada um importante alvo macromolecular para a descoberta de novos agentes para o tratamento da doença de Chagas¹³. Essencial em várias etapas do desenvolvimento e diferenciação do parasita, a enzima é expressa durante todo o ciclo de vida do *T. cruzi*¹⁴. Devido à sua relevância e validação biológica, a cruzaina está entre os alvos mais estudados para o desenvolvimento de novos agentes antichagásicos com elevado potencial de desenvolvimento clínico¹⁵.

A cruzaina, pertencente à família da papaína, tem a sua estrutura tridimensional constituída por dois domínios, sendo um deles predominantemente composto por hélices- α , e o outro, formado por extensas folhas- β antiparalelas (Figura 4). Na interface destes domínios se encontra o sítio catalítico da enzima, com destaque para os aminoácidos que formam a conhecida tríade catalítica: Cys25, His159 e Asn175¹⁶.

Figura 4 – Representação da estrutura da cruzaina demonstrando os dois domínios, onde um deles é predominantemente formado por hélices- α (vermelho) e o outro por folhas- β (verde). Em destaque o sítio catalítico da enzima ocupado pelo inibidor benzimidazol (PDB ID 3KKU).

O sítio catalítico da cruzaina, como observado em outras proteases, é subdividido em subsítios que são numerados de S1 a Sn, seguindo a direção N-terminal do substrato, e de S1' a Sn', seguindo a direção C-terminal do substrato^{17,18}. A enzima cruzaina possui em sua estrutura quatro subsítios de ligação denominados S1, S2, S3 e S1' (Figura 5). Cada subsítio possui características moleculares próprias, sendo o S2 o principal responsável pela especificidade da enzima. Estruturalmente, dentre todos os subsítios, este é o menos exposto ao solvente. Os subsítios S1', S1 e S3 são menos definidos e se encontram mais expostos ao solvente.

Figura 5 – Representação da estrutura da enzima cruzaina de *T. cruzi*, com destaque para os seus principais subsítios: S1, S2, S3 e S1'.

Diversos grupos de pesquisa descreveram com sucesso a descoberta de inibidores da enzima cruzaina. Entre os principais inibidores conhecidos, destacam-se os derivados peptídicos, como as vinilsulfonas (**3**)^{19,20} e as fluorometilcetonas (**4**)^{21,22}, e os derivados não-peptídicos, como os triazóis (**5**)²³, as pirimidinas (**6**)²⁴, as tiossemicarbazonas (**7**)²⁵, as chalconas (**8**)²⁶ e os benzimidazóis (**9**)²⁷ (Figura 6).

Figura 6 – Exemplos de inibidores da enzima cruzaina pertencentes a diferentes classes químicas: (3) vinilsulfonas, (4) fluorometilcetonas, (5) triazóis, (6) pirimidinas, (7) tiossemicarbazonas, (8) chalconas e (9) benzimidazóis.

A primeira estrutura cristalográfica da cruzaina foi determinada em complexo com um inibidor irreversível do tipo fluorometilcetona²¹ e foi usada para uma variedade de estudos da enzima. Atualmente, outras estruturas de inibidores peptídicos em complexo com a cruzaina estão depositadas no PDB (da sigla inglesa para *Protein Data Bank*). Entre os inibidores da cruzaina, a vinilsulfona K777 (3, Figura 6) se sobressai pela potente atividade apresentada em ensaios *in vitro* e *in vivo* contra o parasita¹⁹. Este inibidor, que se encontra em testes pré-clínicos, apresentou elevada afinidade e seletividade pela enzima alvo, bem como eficácia em modelos experimentais da doença alvo em animais²⁸. A estrutura cristalográfica do K777 em complexo com a cruzaina (PDB ID: 2OZ2) foi determinada com alta resolução de 1,95 Å (Figura 7), contribuindo notavelmente para a demonstração da importância da cruzaina como alvo terapêutico e para a consolidação de seu papel crucial no desenvolvimento de inibidores enzimáticos candidatos a novos fármacos¹⁹.

Figura 7 – Estrutura cristalográfica da cruzaina em complexo com o inibidor K777 (PDB ID: 2OZ2). A figura mostra as interações polares entre o inibidor e a enzima.

1.3 Descoberta de Fármacos

O processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos evoluiu ao longo dos anos, passando de abordagens tradicionais de tentativa e erro, até processos mais avançados de triagens experimentais e computacionais com proteínas alvo ou ensaios celulares, que geralmente empregam coleções de compostos sintéticos e de origem natural. Nas últimas décadas, este processo foi bastante beneficiado pelos avanços científicos e tecnológicos nas interfaces entre a Química, a Física e a Biologia, especialmente no que diz respeito ao conhecimento das bases moleculares e bioquímicas envolvidas na ação dos fármacos²⁹.

O desenvolvimento de métodos automatizados em larga escala para a geração de compostos (e.g., química combinatória) e avaliação biológica (HTS, da sigla inglesa para *high throughput screening*) tem contribuído de forma significativa para avanços notáveis da química medicinal. Em particular, as triagens bioquímicas ou biológicas têm levado a identificação de centenas de novos compostos bioativos para uma variedade de alvos moleculares associados a doenças humanas, se consolidando como estratégia indispensável em laboratórios acadêmicos de todo o mundo^{30,31}.

Rica fonte de diversidade química, os processos de triagens, experimentais ou computacionais, fornecem informações essenciais para o planejamento de candidatos a novos fármacos, permitindo a incorporação de outras ferramentas modernas, tais como as empregadas no planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor (SBDD, da sigla inglesa para *structure-based drug design*) e do ligante (LBDD, da sigla inglesa para *ligand-based drug design*)^{32,33}.

Em um interessante trabalho foi descrita a aplicação de métodos de triagens (bioquímica e computacional) e de SBDD que levaram a identificação de novas classes de inibidores da cruzaina²⁷, demonstrando o valor e a complementaridade destas estratégias no processo de identificação, priorização e desenvolvimento de agentes promissores para o tratamento de doenças negligenciadas tropicais, como a doença de Chagas.

CAPÍTULO 2

Objetivos

2 OBJETIVOS

O objetivo geral desta dissertação de mestrado é a identificação e caracterização cinética de novos inibidores da enzima cruzaina de *T. cruzi*, candidatos a fármacos para o tratamento da doença de Chagas, empregando triagens experimentais (avaliação bioquímica *in vitro*). Os objetivos específicos deste trabalho incluem:

- Realização de triagens experimentais para a identificação de novos inibidores da enzima alvo;
- Validação experimental de um conjunto de compostos selecionado através de estudos de triagem virtual baseados na estrutura do receptor, executados em parceria;
- Expressão e purificação da enzima cruzaina de *T. cruzi*;
- Realização de ensaios bioquímicos para a determinação da potência (IC₅₀) dos compostos selecionados;

CAPÍTULO 3

Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Expressão e purificação da enzima cruzaina de *T. cruzi*

Para expressão da cruzaina algumas alterações foram aplicadas a um protocolo de expressão e purificação previamente descrito³⁴. Assim, células de *E. coli* (M15) contendo o vetor (pQE30) foram cultivadas a 37 °C em meio LB suplementado com 25 µg.mL⁻¹ kanamicina e 100 µg.mL⁻¹ ampicilina, até atingir uma DO_{600nm} de 0,6. Então foi adicionado IPTG (concentração final de 1 mM) e cultivada a cultura a 30 °C por 4 h. As células foram então centrifugadas, ressuspensas em tampão de lise (100 mM fosfato de sódio, 10 mM Tris/HCl, 1,6 µg/mL lisozima, pH 8) e lisadas no sonicador (pulsar ON 30s; pulsar OFF 45s; total de 12 pulsos = 6min; duty cycle=30, output=4 e timer =4). As células lisadas foram, então, centrifugadas novamente e o pellet foi ressuspendido com tampão de lise (100 mM fosfato de sódio, 10 mM Tris/HCl, pH 8) adicionando 8M uréia. Após incubação, sob agitação leve por 16 h à 4 °C, a amostra foi novamente centrifugada e o sobrenadante foi aplicado em coluna de Ni-NTA. A coluna foi lavada utilizando-se tampão de lise adicionado 8M uréia e 10 mM imidazol. A eluição foi feita com tampão de eluição (100 mM fosfato de sódio, 10 mM Tris/HCl, 8 M uréia, pH 6,3, 200 mM imidazol). A proteína foi então incubada com 10 mM de DTT a 37 °C por 45 min. Em seguida foi diluída 1:100 para re-enovelamento em tampão 100 mM Tris/HCl pH 8, contendo 1 mM EDTA, 250 mM L-arginina, 20% glicerol. Após 20 h a 4 °C a proteína foi concentrada até atingir a concentração de 0,5 mg/mL e ativada a 37 °C em tampão de ativação (100 mM acetato de sódio pH 5,5, 10 mM EDTA, 5 mM DTT e 1 M NaCl, pH 5,3). Durante a ativação a atividade da enzima foi monitorada a cada 30 min, até que não houvesse aumento do nível de atividade. A ativação completa da enzima foi confirmada em gel SDS-PAGE. A última etapa da purificação foi realizada em coluna de resina Tiopropil sefarose 6B previamente equilibrada com tampão de ligação (20 mM fosfato de sódio, 150 mM NaCl, pH 7,2). Após uma noite de incubação da preparação a 4 °C, sob agitação lenta, a coluna foi montada, a resina foi lavada com excesso de tampão de ligação e a enzima foi eluída com tampão de ligação suplementado com 20 mM de DTT. A enzima pura foi lavada em sistema de ultra filtração Amicon para a troca de tampão, sendo

armazenada em alíquotas de 30 μ L a 80° C, com tampão de 0,1 M acetato de sódio e 0,000005% Triton X-100.

Figura 8 – Gel SDS-PAGE mostrando a ativação da cruzaína. M: Marcador de peso molecular; 1: cruzaína pura (32 KDa), 2: Cruzaína em processo de clivagem, 3: cruzaína clivada (22,5 kDa).

3.2 Ensaios enzimáticos e avaliação bioquímica dos compostos

Ensaios de fluorescência foram padronizados e validados para a avaliação bioquímica dos compostos selecionados neste trabalho de dissertação²⁴. A atividade catalítica da cruzaína foi medida baseada na clivagem do substrato Z-Phe-Arg-AMC (benzoil-fenilalanina-arginina-aminometilcumarina), que gera o grupo repórter 7-amino-4-metilcumarina. Para monitoramento da fluorescência em fluorímetro de placa VICTOR3™ (PerkinElmer), utilizando-se placas pretas de 96 poços. Foram utilizados os comprimentos de onda de 355 nm para excitação e de 460 nm para emissão³⁵. Os ensaios enzimáticos foram realizados em meio aquoso, com uma mistura reacional contendo 0,5-1,5 nM de cruzaína, 5,0 μ M de substrato Z-Phe-Arg-AMC ($K_M = 1,6 \mu$ M), em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,5, na presença de 5 mM de DTT e 0,01% de Triton X-100.

Os compostos foram testados inicialmente na concentração de 100 μ M, sendo que apenas os que apresentaram inibição enzimática $\geq 50\%$ foram selecionados para a

determinação da potência biológica. Os valores de IC₅₀ (que se referem à concentração necessária de inibidor para reduzir em 50% a atividade da enzima cruzaína) foram determinados com pelo menos seis concentrações diferentes de inibidor. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados reportados representam a média e o respectivo erro padrão. Os dados cinéticos foram analisados com o auxílio do programa de regressão não-linear SigmaPlot 10.0.

3.3 Compostos selecionados para avaliação *in vitro*

Os compostos avaliados neste trabalho de dissertação (hidrazonas **11-17** e chalconas **18-24**, Tabela 1) foram sintetizados e disponibilizados através de colaborações estabelecidas com os grupos coordenados pelo professor Gustavo H. G. Trossini, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, e pela professora Daniela Gonçalves Rando, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Campus Diadema. Os compostos avaliados provenientes dos estudos de triagem virtual (**25-35**, Tabela 2) foram adquiridos comercialmente da empresa ChemDiv de San Diego dos EUA e cedidos gentilmente pelo professor Gustavo H. G. Trossini, e pela professora Elizabeth Igne Ferreira, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

CAPÍTULO 4

Resultados e Discussão

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação bioquímica dos compostos

A atividade catalítica da enzima cruzaína foi monitorada por fluorescência através da clivagem do substrato Z-Phe-Arg-AMC (baixa fluorescência), que gera na unidade de tempo o grupo repórter 7-amino-4-metilcumarina (alta fluorescência). Nas medidas cinéticas, a clivagem do substrato na ausência de inibidor é considerada como o branco nas reações catalisadas pela enzima. Por outro lado, o efeito da presença do inibidor na velocidade de reação é monitorado de forma contínua e direta considerando-se a fluorescência observada em relação ao padrão (branco). O esquema da hidrólise do substrato pode ser observado na Figura 9.

Figura 9 – Esquema da clivagem do substrato Z-Phe-Arg-AMC.

Os ensaios para determinação da atividade dos inibidores foram feitos em duas etapas. Na primeira, foi avaliado o efeito de inibição dos compostos em concentração única de 50 ou 100 μM . Na etapa seguinte, foram realizados experimentos para a determinação da potência dos inibidores (IC_{50}). Os ensaios de inibição da cruzaina foram conduzidos para duas séries de compostos sintéticos derivados de chalconas e hidrazonas. Uma série de compostos provenientes de estudos de triagem virtual também foi avaliada e caracterizada no presente trabalho.

4.2 Derivados de hidrazonas e chalconas

Em 1969, observou-se que o nitrofural (**10**, Figura 10), um conhecido agente antimicrobiano, destruía as formas intracelulares do *T. cruzi* em culturas de tecido. Após isso, constatou-se que diversas naftoquinonas e nitrofuranos, incluindo o nitrofural, inibiram a tripanotiona redutase, enzima responsável pelo sistema de detoxificação do parasita^{36,37}. Na década de 1990 foi demonstrado que o derivado hidroximetilado (hidroximetilnitrofural) era mais potente contra formas amastigotas e tripomastigotas do *T. cruzi* e menos tóxico do que seu precursor, o nitrofural³⁸.

10

Figura 10 - Estrutura molecular do nitrofural.

Mais recentemente foi revelada a atividade inibitória do nitrofural e do hidroximetilnitrofural (compostos que contêm a porção hidrazona em sua estrutura) frente a cruzaina de *T. cruzi*, os quais apresentaram valores de IC_{50} de 22,8 e 10,5 μM , respectivamente. Estudos de modelagem molecular indicaram que o mecanismo de inibição envolve possivelmente a interação com a Cys25, resíduo catalítico da enzima³⁹. Estes resultados despertaram o interesse para o estudo das relações entre a estrutura e atividade

(SAR, da sigla inglesa para *structure-activity relationships*) desta classe de compostos, visando o planejamento de novos agentes antichagásicos. Por outro lado, os derivados de chalconas e hidrazonas vêm também ganhando importância como inibidores da cruzaina. Alguns trabalhos desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa revelaram uma vasta família de cerca de 40 compostos, apresentando valores de IC₅₀ entre 20 e 60 µM. Compostos N-acil-hidrazônicos também exibiram moderada inibição da cruzaina^{40,41}.

Com base nestas observações, planejou-se a avaliação bioquímica de uma nova série de chalconas e hidrazonas. O presente trabalho foi possível através de colaborações estabelecidas com o professor Gustavo H. G. Trossini da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e com a professora Daniela G. Rando da Universidade Federal de São Paulo, que gentilmente disponibilizaram 14 compostos sintéticos para avaliação *in vitro* frente a cruzaina de *T. cruzi*. Inicialmente avaliou-se o poder inibitório de 7 chalconas e 7 hidrazonas em concentração única de 100 µM. Os resultados da triagem bioquímica são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Avaliação bioquímica *in vitro* da série de chalconas e hidrazonas contra a cruzaina.

Código	Estrutura	% Inibição (100 µM)	IC ₅₀ (µM)
11		75	9,4 ± 0,9
12		65	57 ± 1,7
13		50	ND

continua

continuação

14		80	ND
15		70	29 ± 2
16		70	12 ± 1
17		30	ND
18		55	44 ± 2
19		80	$0,22 \pm 0,07$
20		80	ND

continua

conclusão

21		95	3,38 ±1,6
22		55	26,8 ±1,6
23		70	≥ 100
24		25	ND

Dos compostos testados, as chalconas **11**, **14**, **15** e **16**, e as hidrazonas **19**, **20**, **21** e **23** apresentaram % de inibição igual ou maior do que 70. Quatro compostos apresentaram entre 50 e 65% de inibição (as chalconas **12** e **13**, e as hidrazonas **18** e **22**), ao passo que os dois restantes da série (a chalcona **17** e a hidrazona **24**) apresentaram inibição enzimática modesta ($\leq 30\%$). Para os 8 compostos mais promissores foi possível a determinação de valores de IC_{50} . Entre estes, grande destaque é dado a hidrazona **19**, que apresentou significativa potência *in vitro*, com valor de IC_{50} de 0,22 μM .

Como observado na Tabela 1 foram realizadas substituições moleculares no núcleo fundamental da chalcona **13** (Figura 11). A substituição do anel benzílico **B** por um furano e a inserção de uma hidroxila no anel **A**, resultando na chalcona **11**, levou a um aumento significativo da atividade. Também podemos observar que a inserção de uma ligação dupla entre a carbonila e o anel benzílico **A**, além da inserção de grupos metoxil na posição *meta* e de hidroxilas na posição *para* dos anéis **A** e **B**, como apresentado na chalcona **16**, contribuíram positivamente para a atividade desta série de inibidores.

Figura 11 - Esqueleto fundamental das chalconas.

Em relação a série de hidrazonas, sintetizadas a partir da estrutura do nitrofural (**10**, Figura 10), observamos que a substituição do anel benzílico na posição *para*, reduziu significativamente a atividade desta série (hidrazonas **20**, **23** e **24**). Considerando ainda a mesma série de moléculas, observamos que a substituição bioisostérica do oxigênio do anel nitrofurano dos compostos **18**, **20**, **23** e **24**, por enxofre levou a um aumento expressivo da atividade (hidrazonas **19**, **21** e **22**). Em relação ao padrão de substituição do anel benzílico, podemos verificar que para os derivados contendo o anel nitrotiofeno (compostos **19**, **21** e **22**), a inserção de substituintes na posição *para* resultou na diminuição da atividade.

4.3 Série de compostos selecionados por busca virtual

Os compostos desta série foram selecionados previamente durante o trabalho realizado pelo pós-doutorando Gustavo H. G. Trossini, hoje professor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Brevemente, os estudos computacionais envolveram a geração de um modelo farmacofórico da cruzaina para a busca de novos ligantes seletivos, utilizando características estruturais específicas da enzima alvo⁴². O modelo foi empregado em um processo de triagem virtual usando filtros moleculares, tais como massa molecular entre 300 e 700; *clogP* entre -2 a 5; tipos de átomos H, C, N, O, F, Cl, Br, I, P e S; doadores e aceptores de ligação de hidrogênio de 2-10; e grupos aromáticos 0-6. Um conjunto de 3.105 compostos foi selecionado para a etapa de docagem molecular, utilizando-se o programa GOLD 4.0 (função GOLDScore) e a estrutura cristalográfica da cruzaina (PDB ID: 1ME4, resolução de 1,2 Å). Os estudos computacionais foram realizados na *University of New Mexico* nos EUA, sob a supervisão do Prof. Tudor I. Oprea. Várias inspeções visuais das 100 melhores

moléculas ranqueadas levaram a seleção e aquisição final de 11 compostos, que foram testados, primeiramente, em concentração única de 50 μM (compostos **25-35**, Tabela 2). Nas inspeções visuais foram utilizados os seguintes critérios: presença de interações intermoleculares envolvendo aminoácidos-chave para a catálise enzimática; conformação dos compostos docados e ocupação do sítio ativo pelos ligantes.

De maneira surpreendente, todos os compostos testados apresentaram inibição da atividade catalítica da cruzaína com valores superiores a 50%. A única exceção foi o composto **31**, que apresentou um valor mais modesto de inibição de 30%. Porém, fazia-se necessário, ainda, a determinação da potência (IC_{50}) dos melhores compostos.

Para a avaliação da potência, foram selecionados todos os 10 compostos que apresentam % de inibição superior a 50. Destes, 9 apresentaram considerável potência, com valores de IC_{50} na faixa micromolar e nanomolar. A determinação de IC_{50} não foi possível apenas para o composto **35**, que apresentou problemas de solubilidade nos ensaios de cinética enzimática, não sendo possível o uso de concentrações maiores do mesmo. Para os 9 inibidores para os quais se determinou a potência, 7 apresentaram valores de IC_{50} na faixa nanomolar: **25** ($\text{IC}_{50} = 322 \text{ nM}$), **26** ($\text{IC}_{50} = 196 \text{ nM}$), **27** ($\text{IC}_{50} = 161 \text{ nM}$), **28** ($\text{IC}_{50} = 24 \text{ nM}$), **29** ($\text{IC}_{50} = 189 \text{ nM}$), **32** ($\text{IC}_{50} = 646 \text{ nM}$), **34** ($\text{IC}_{50} = 11,3 \text{ nM}$), e dois compostos apresentaram valores de IC_{50} na faixa micromolar: **30** ($1,310 \mu\text{M}$) e **33** ($1,303 \mu\text{M}$).

Tabela 2 - Efeito inibitório da enzima cruzaína para uma série de compostos selecionados através de triagem virtual.

Código	Estrutura	% inibição (50 μM)	IC_{50} (μM)
25		90	$0,322 \pm 0,03$

continua

continuação

26		55	0,196 ± 0,02
27		55	0,161 ± 0,02
28		80	0,024 ± 0,003
29		70	0,189 ± 0,03
30		55	1,310 ± 0,22

continua

continuação

31		30	--
32		65	$0,646 \pm 0,07$
33		60	$1,303 \pm 0,32$
34		90	$0,011 \pm 0,004$

continua

Dos 11 compostos testados, a maioria apresenta o núcleo sulfonamida, um importante grupo funcional mediador de interações polares. Isso indica que a sulfonamida é importante para esta série de inibidores, podendo participar de interações de hidrogênio com resíduos de glicina e de aspartato, presentes no sítio ativo da enzima. Também é importante destacar a presença de grupos volumosos nas extremidades de todos os compostos, como, por exemplo, o anel benzênico e o grupo *p*-cresol no inibidor **34** – o mais potente da série de inibidores identificados na triagem virtual. Estes grupos volumosos podem ocupar as cavidades formadas pelos subsítios S1', S2 e S3 existentes no sítio ativo da enzima (Figura 5). A estrutura dos compostos da Tabela 2 evidencia que inibidores da cruzaína geralmente apresentam um grande número de ligações rotacionáveis, e, portanto, um elevado grau de flexibilidade, o que é consistente com o fato da enzima ser uma protease.

Estes resultados demonstram o sucesso da estratégia de triagem virtual aplicada para inibidores da cruzaína, bem como a importância da avaliação experimental através de ensaios bioquímicos padronizados. O emprego de ensaios *in vitro* foi fundamental para a validação desta nova série de inibidores. A diversidade química exibida pelos compostos é bastante significativa e interessante para a enzima alvo, sendo de grande utilidade para o nosso grupo de pesquisa, em etapas posteriores de pesquisa, principalmente na descoberta e otimização de compostos líderes. Neste contexto, atenção especial será dada para os compostos **28** e **34**, que apresentaram valores de IC₅₀ de 24 e 11,3 nM, respectivamente. Estes inibidores representam modelos extremamente atrativos para trabalhos futuros em química medicinal e planejamento de fármacos.

CAPÍTULO 5

Conclusões e Perspectivas

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Nessa dissertação de mestrado foram apresentados os resultados obtidos durante o desenvolvimento do trabalho na identificação e caracterização de inibidores da enzima cruzafina, alvo terapêutico para a doença de Chagas.

A obtenção da proteína pura durante o trabalho foi fundamental para que ensaios enzimáticos fossem realizados com os compostos selecionados, permitindo a determinação de parâmetros importantes, como a IC_{50} .

Duas séries de compostos foram avaliadas. Na primeira, com 14 derivados de chalconas e hidrazonas, destacou-se a hidrazona **19**, que apresentou significativa potência *in vitro*, com valor de IC_{50} de 220 nM. Já na segunda série estudada, formada por 11 compostos selecionados previamente através de triagens virtuais, 7 exibiram valores de IC_{50} na faixa nanomolar, com destaque especial para o composto **24** ($IC_{50} = 11,3$ nM), o inibidor mais potente caracterizado neste trabalho.

Os resultados promissores descritos neste trabalho demonstram a importância da avaliação experimental através de ensaios bioquímicos padronizados, que foi fundamental para a caracterização e a validação destas séries de inibidores.

A interessante diversidade química, representada pelos melhores compostos selecionados neste trabalho, será uma importante fonte de inspiração em etapas futuras de pesquisa. Os compostos **19**, **28** e **34** representam modelos atrativos em química medicinal e planejamento de fármacos e serão explorados em nosso grupo em processos de descoberta e otimização de compostos líderes.

REFERÊNCIAS

- 1 WHO, W.H.O.- (2010). **Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases**. Geneva, 2010 184 p. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090_eng.pdf>. Acesso em: 24 set. 2012.
- 2 JANNIN, J. The globalization of Chagas disease: a new challenge for elimination. **Enfermedades Emergentes**, v. 10, p. 32, 2008.
- 3 SCHMUNIS, G.A. The globalization of Chagas disease. **ISBT Science Series**, v.2, n. 1, p. 6–11, 2007.
- 4 COURA, J.R.; VINAS, P.A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 465, n. 301, p. S6–S7, 2010.
- 5 COURA, J.R.; CASTRO, S.L. de. A critical review on chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n.1, p. 3–24, 2002.
- 6 HOARE, C.A.; WALLACE, F.G. Developmental stages of trypanosomatid flagellates - a new terminology. **Nature**, v. 212, n. 5068, p. 1385, 1966.
- 7 TYLER, K.M.; ENGMAN, D.M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal of Parasitology**, v. 31, n. 5-6, p. 472–481, 2001.
- 8 LABORATORY identification of parasites of public health concern: Trypanosomiasis, American. Disponível em: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/TrypanosomiasisAmerican_il.htm> Acesso em: 01 out 2013.
- 9 DIAS, L.C. et al. Chemotherapy of chagas' disease: state of the art and perspectives for the development of new drugs. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2444–2457, 2009.

- 10 ANDRADE, Z.A. A patologia da doença de Chagas no homem. **Annales Societe Belge Medecine Tropicale**, v.55, suppl.1, p.15-30, 1985.
- 11 COURA, J.R.; CANÇADO, J.R. **A história da terapêutica da doença de Chagas.** Disponível em:< <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=62>>. Acesso em:30 set. 2013.
- 12 SOEIRO, M.N.C.; CASTRO, S.L. DE Trypanosoma cruzi targets for new chemotherapeutic approaches. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 13, n.1, p. 105–121, 2008.
- 13 CAZZULO, J.et al. The major cysteine proteinase of Trypanosoma cruzi: a valid target for chemotherapy of Chagas disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 7, n. 12, p. 1143–56, 2001.
- 14 MCKERROW, J.H. et al. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 4, p. 639–44, 1999.
- 15 SOUZA, M.L. **Identificação de novos inibidores da enzima cruzaina de Trypanosoma cruzi candidatos a fármacos contra a doença de Chagas.** 2012. 85p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.
- 16 SAJID, M. et al. Cruzain : the path from target validation to the clinic. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 712, p. 100–15, 2011. doi: 10.1007/978-1-4419-8414-2_7.
- 17 SCHECHTER, I.; BERGER, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 27, n. 2, p. 157–62, 1967.
- 18 TURK, B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 5, n. 9, p. 785–99, 2006.

- 19 KERR, I.D. et al. Vinyl sulfones as antiparasitic agents and a structural basis for drug design. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 38, p. 25697–703, 2009.
- 20 BRYANT, C. et al. Novel non-peptidic vinylsulfones targeting the S2 and S3 subsites of parasite cysteine proteases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 21, p. 6218–21, 2009.
- 21 GILLMOR, S.A. et al. Structural determinants of specificity in the cysteine protease cruzain. **Protein Science**, v. 6, n. 8, p. 1603–11, 1997.
- 22 BRAK, K., et al. Nonpeptidic tetrafluorophenoxymethyl ketone cruzain inhibitors as promising new leads for Chagas disease chemotherapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 1763–73, 2010.
- 23 BRAK, K. et al. Identification of a new class of nonpeptidic inhibitors of cruzain. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 20, p. 6404–10, 2008.
- 24 ZANATTA, N. et al. Convergent synthesis and cruzain inhibitory activity of novel 2-(N³-benzylidenehydrazino)-4-trifluoromethyl-pyrimidines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 24, p. 10236–10243, 2008.
- 25 FUJII, N. et al. Discovery of potent thiosemicarbazone inhibitors of rhodesain and cruzain. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, n. 1, p. 121–3, 2005.
- 26 BORCHHARDT, D.M. et al. Biochemical evaluation of a series of synthetic chalcone and hydrazide derivatives as novel inhibitors of cruzain from *Trypanosoma cruzi*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 1, p. 142–150, 2010.
- 27 FERREIRA, R.S. et al. Complementarity between a docking and a high-throughput screen in discovering new cruzain inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 13, p. 4891–905, 2010.

- 28 MCKERROW, J.H. et al. Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, Suppl 1, p. 263–9, 2009.
- 29 SANTOS, R.N.; ANDRICOPULO, A.D. Physics and its interfaces with medicinal chemistry and drug design. **Brazilian Journal of Physics**, v. 43, n. 4, p. 268–280, 2013.
- 30 CAMP, D. **Discovery and development of natural compounds into medicinal products**. Disponível em <
http://journals.prous.com/journals/servlet/xmlxsl/pk_journals.xml_summary_pr?p_JournalId=2&p_RefId=1940442&p_IsPs=N>. Acesso em: 01 set. 2013.
- 31 FERREIRA, R.S. et al. Integração das técnicas de triagem virtual e triagem biológica automatizada em alta escala: oportunidades e desafios em P&D de fármacos. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1770–1778, 2011.
- 32 LOMBARDINO, J.G.; LOWE, J.A. The role of the medicinal chemist in drug discovery--then and now. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 3, n. 10, p. 853–62, 2004.
- 33 DIMITRI, N. An assessment of R&D productivity in the pharmaceutical industry. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, n. 12, p. 683–5, 2011.
- 34 EAKIN, A.E. et al. The sequence, organization, and expression of the major cysteine protease (cruzain) from *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 11, p. 7411–20, 1992.
- 35 CHEN, Y.T. et al. In vitro and in vivo studies of the trypanocidal properties of WRR-483 against *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 9, 2010.
doi: 10.1371/journal.pntd.0000825
- 36 ANDRADE, Z.A.; BRENER, Z. [Action of nitrofurazone (5-nitro-2-furaldehyde-semicarbazone) on the intracellular forms of *Trypanosoma* intracellular forms of *Trypanosoma cruzi* in experimental Chagas' disease]. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 11, n. 3, p. 222–8, 1969.

- 37 HENDERSON, G.B. et al. "Subversive" substrates for the enzyme trypanothione disulfide reductase: alternative approach to chemotherapy of Chagas disease. **Proceedings of the National Academy of Science U S A**, v. 85, n. 15, p. 5374–5378, 1988.
- 38 CHUNG, M.-C. et al. Synthesis and in vitro evaluation of potential antichagasic hydroxymethylnitrofurazone (NFOH-121): a new nitrofurazone prodrug. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 22, p. 4779–83, 2003.
- 39 TROSSINI, G.H.G. et al. Cruzain inhibition by hydroxymethylnitrofurazone and nitrofurazone: investigation of a new target in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 1, p. 62–7, 2010.
- 40 CARVALHO, S.A. et al. Design and synthesis of new (E)-cinnamic N-acylhydrazones as potent antitrypanosomal agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 512–21, Aug.2012. doi: 10.1016/j.ejmech.2012.05.041.
- 41 BORCHHARDT, D.M. et al. Biochemical evaluation of a series of synthetic chalcone and hydrazide derivatives as novel inhibitors of cruzain from *Trypanosoma cruzi*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 1, p. 142–150, 2010.
42. LEACH, A.R.; GILLET, V.J.; LEWIS, R.A.; TAYLOR, R. Three-dimensional pharmacophore methods in drug discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 2, p. 539-558, 2010.