UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

MARIANA LAUREANO DE SOUZA

**Planejamento de inibidores da enzima cruzaina de *Trypanosoma cruzi*
candidatos a fármacos contra a doença de Chagas**

São Carlos
2017

MARIANA LAUREANO DE SOUZA

**Planejamento de inibidores da enzima cruzaina de *Trypanosoma cruzi*
candidatos a fármacos contra a doença de Chagas**

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(a) 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
2017

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 revisada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Souza, Mariana Laureano de
Planejamento de inibidores da enzima cruzafina de
Trypanosoma cruzi candidatos a fármacos contra a
doença de Chagas / Mariana Laureano de Souza;
orientador Adriano Defini Andricopulo - versão
corrigida -- São Carlos, 2017.
103 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São
Carlos, Universidade de São Paulo, 2017.

1. Doença de Chagas. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3.
Cruzafina. 4. Química medicinal. 5. Planejamento de
fármacos. I. Andricopulo, Adriano Defini, orient.
II. Título.

Aos meus pais. Com o mais profundo amor, admiração e gratidão. Pela
incansável dedicação. Por terem me inspirado a estar aqui hoje.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por todas as oportunidades. Ao Universo que sempre nos traz o que buscamos.

Aos meus pais Cidinha e Sérgio, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando em todas as minhas decisões. Aos meus irmãos Natália e Junior, por terem me ajudado a aprender a compartilhar.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Adriano Andricopulo, pela confiança no meu trabalho, pelo apoio e dedicação para que esta etapa de minha formação acadêmica fosse concluída com êxito.

À Profa. Dra. Rafaela Salgado Ferreira, da UFMG, por todos os ensinamentos compartilhados, discussões sobre o projeto, por toda a ajuda e principalmente pela amizade.

Ao Prof. Dr. Fábio Cruz, da UNIFESP, um grande amigo que tornou possível uma grande parte deste trabalho.

Às professoras Dra. Fernanda Anibal e Dra. Sigrid de Sousa, da UFSCar, pela amizade e atenção.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Dias, da UNICAMP, e sua competente equipe: Dr. Brian Slafer, Dr. Celso Rezende, Dr. Marco Dessoay e a aluna Rocio Chavez pela síntese dos compostos, etapa essencial para a realização deste trabalho.

Às queridas amigas do laboratório: Karina Matos, Wanessa Altei, Ivani Pauli, Renata Krogh e Simone Michelin Duarte, por tornarem os dias sempre agitados e divertidos. Às amigas que já fizeram parte da querida sala 9, Bela e Rafa, sempre exemplos a se seguir.

Aos colegas do LQMC, Leonardo, Ricardo e Davi, pela ajuda durante todos meus anos aqui no IFSC.

Às minhas queridas amigas, que sempre estiveram dispostas a escutar minhas loucas teorias, Si, Mari, Naná, Fer, Vi, Gi, Dri e Aninha.

À Dra. Renata Nobrega, uma amiga física teórica que aprendeu a gostar tanto quanto eu das “biocoisas”.

À Dra. Régia, minha querida amiga que sempre esteve presente nas minhas realizações acadêmicas.

A todos os professores, funcionários e colegas do Grupo de Cristalografia do Instituto de Física de São Carlos.

Aos queridos funcionários do Instituto de Física sempre tão solícitos, em especial a Neusa que me ajudou muito na formatação da tese.

À Universidade de São Paulo, Instituto de Física de São Carlos e Laboratório de Química Medicinal e Computacional.

À Coordenadoria de Apoio ao Ensino Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

À FAPESP, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

A todos que, mesmo não citados nominalmente, tornaram possível a realização desse trabalho.

“Nenhum dever é mais importante do que a gratidão”

Marco Túlio Cícero

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima.”

Louis Pasteur

RESUMO

SOUZA, M. L. **Planejamento de inibidores da enzima cruzaina de *Trypanosoma cruzi* candidatos a fármacos contra a doença de Chagas.** 2017. 103 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

A doença de Chagas, uma infecção causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é um grave problema de saúde pública. Atualmente, cerca de dez milhões de pessoas em todo o mundo estão infectadas, sendo que a situação é mais crítica na América Latina, onde a doença é endêmica. A necessidade de novas alternativas terapêuticas é grande, pois os fármacos disponíveis apresentam sérias limitações, como baixa eficácia e alta toxicidade. A enzima cruzaina, uma cisteíno-protease essencial à sobrevivência do parasita, é considerada um importante alvo para o desenvolvimento de novos agentes antichagásicos. Neste trabalho, o objetivo foi o desenvolvimento de novos inibidores da enzima cruzaina empregando como modelo um composto *hit* (**1**) com propriedades anti-*T. cruzi*. Este inibidor competitivo (um derivado imidazólico), que apresenta elevada potência e afinidade contra a enzima alvo ($IC_{50} = 1 \mu M$ e $K_i = 120 \text{ nM}$, respectivamente), foi identificado em trabalhos anteriores de nosso grupo por meio da integração de técnicas computacionais (triagem virtual) e experimentais (avaliação bioquímica *in vitro*). A presente proposta de planejamento molecular, empregando métodos de química medicinal, levou a investigação de padrões estruturais explorando a complementaridade entre as moléculas pequenas e os resíduos de aminoácidos dos subsítios da cruzaina. Um conjunto promissor de 38 compostos foi planejado, sintetizado e avaliado em ensaios *in vitro* frente à enzima cruzaina e posteriormente, contra o parasita. Entre os derivados do composto *hit* (**1**), que apresentaram valores de IC_{50} contra a enzima alvo na faixa nano- e micromolar, destaca-se o composto **14** ($IC_{50} = 120 \text{ nM}$ e $K_i = 20 \text{ nM}$), um inibidor competitivo, potente e de alta afinidade contra a enzima alvo, que também apresentou atividade *in vitro* e *in vivo* contra o parasita. A integração de métodos experimentais e computacionais foi útil no processo de otimização de inibidores inéditos da cruzaina. As relações entre a estrutura e atividade obtidas são de grande relevância para o desenvolvimento de candidatos a novos fármacos para a terapia da doença de Chagas.

Palavras-chave: Doença de Chagas. *Trypanosoma cruzi*. Cruzaina. Química Medicinal. Planejamento de Fármacos.

ABSTRACT

SOUZA, M. L. **Design of cruzain inhibitors from *Trypanosoma cruzi* as drug candidates for the treatment of Chagas' disease.** 2017. 103 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

Chagas' disease, an infection caused by *Trypanosoma cruzi*, is a serious public health problem. Currently, about ten million people are infected worldwide, and the situation is more critical in Latin America, where the disease is endemic. The need for new therapies is urgent, since the drugs available have serious limitations, such as low efficiency and high toxicity. The cruzain enzyme, an essential cysteine protease for the parasite survival is considered an important target for the development of new antichagasic agents. In this work, the goal was the development of new cruzain inhibitors based on modifications of a hit compound (**1**) with properties anti-*T. cruzi*. This competitive inhibitor (an imidazole derivative), shows high affinity and potency ($IC_{50} = 1 \mu M$ and $K_i = 120 \text{ nM}$, respectively), and was identified in a previous work in our group by integrating computational techniques (virtual screening) and experimental (*in vitro* biochemical evaluation). The proposed molecular design, employing methods of medicinal chemistry, aimed to investigate structural patterns exploiting the complementarity between small molecules and amino acid residues of the subsites of cruzain. A promising set of 38 compounds was designed, synthesized and evaluated in *in vitro* assays against the cruzain enzyme and subsequently against the parasite. Among the derivatives of the hit compound (**1**), which had IC_{50} values against the target enzyme in the nano- and micromolar range, the compound **14** ($IC_{50} = 120 \text{ nM}$ and $K_i = 20 \text{ nM}$), a potent and high affinity competitive inhibitor against cruzain showed activity *in vitro* and *in vivo* against the parasite. This work illustrates the importance of the integration of experimental and computational methods in the optimization process of novel cruzain inhibitors. The structure-activity relationship studies revealed in this work are useful for the development of new drug candidates for the treatment of Chagas' disease.

Keywords: Chagas' disease. *Trypanosoma cruzi*. Cruzain. Medicinal chemistry. Drug design.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Panorama geral do processo de descoberta e planejamento de fármacos até a aprovação.	26
Figura 2 - Esquema do planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor (SBDD).	28
Figura 3 - Esquema de docagem molecular de uma pequena molécula na cavidade do sítio ativo da cruzaina.	29
Figura 4 - Distribuição mundial de casos de infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> , com base em estimativas oficiais no período de 2010 a 2013.	31
Figura 5 - Esquema geral do ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	33
Figura 6 - Estruturas dos fármacos benzonidazol (Rochagan, Roche) e nifurtimox (Lampit, Bayer).....	35
Figura 7 - Modelo de interação para proteases. Nesse modelo enzima-substrato, os subsítios da enzima são representados pela letra “S”, e os peptídeos que interagem com a enzima são representados pela letra “P”. O sítio de clivagem do substrato está representado por uma seta.	36
Figura 8 - Representação da estrutura da cruzaina. Em vermelho, o domínio predominantemente formado por hélices- α ; e em verde, o domínio formado predominantemente por folhas- β . Na interface, encontra-se o sítio catalítico da enzima.	37
Figura 9 - Sítio de ligação da cruzaina e os seus principais subsítios: S1, S2, S3 e S1'.	38
Figura 10 - A) Tríade catalítica da cruzaina formada por Cys25, His162 e Asn182. B) Resíduos de aminoácidos que compõem o subsítio S2.....	38
Figura 11 - Inibidor irreversível da cruzaina, K777.	39
Figura 12 - Modo de ligação do composto líder (em amarelo) e do derivado otimizado (em verde). Potência dada pelos valores de IC ₅₀ contra a enzima cruzaina.....	40
Figura 13 - Estratégia de planejamento de novos inibidores da cruzaina utilizada neste trabalho de doutorado.	48
Figura 14 - Composto <i>hit</i> 1. Estrutura, valores de potência e afinidade contra a cruzaina e atividade contra o parasita. Modo de ligação intermolecular no sítio ativo da enzima predito pelo programa de docagem molecular GOLD.	49
Figura 15 - Gel SDS PAGE 12% das amostras da primeira etapa da purificação da cruzaina em resina de afinidade. (1) Marcador (58 – 7 kDa); (2) Expressão induzida; (3) Eluição 50 mM I; (4) Eluição 50 mM II; (5) Eluição 75 mM I; (6) Eluição 75 mM	

II; (7) Eluição 100 mM I; (8) Eluição 100 mM II; (9) Eluição 250 mM I; (10) Eluição 250 mM II.....	52
Figura 16 - Gel SDS PAGE 12% após a última etapa de purificação, mostrando a diminuição do peso molecular da cruzaína após o processo de ativação. (1) Marcador (58 – 7 kDa); (2) Cruzaína ativa.	53
Figura 17 - Esquema da clivagem do substrato Z-Phe-Arg-AMC utilizado neste trabalho para determinação dos parâmetros cinéticos.	54
Figura 18 - Estratégia utilizada para a obtenção do composto <i>hit</i> (1).....	64
Figura 19 - Diversidade química testada frente a enzima cruzaína e porcentagem de inibição frente a enzima utilizando a concentração de 100 µM. Em destaque o composto que inibiu totalmente a atividade enzimática, um derivado imidazólico que foi usado como modelo em nosso trabalho de doutorado.	65
Figura 20 - Composto <i>hit</i> 1.	66
Figura 21 - Gráfico duplo-recíproco para o composto 1. Concentrações de inibidor: controle - zero (●); 0,3 µM (○); 0,6 µM (▼); 1,25 µM (△) e 2,50 µM (■).	66
Figura 22 - Interação do composto <i>hit</i> 1 e o sítio ativo da cruzaína, predito pelo programa GOLD. Ligações de hidrogênio são mostradas como linhas pontilhadas coloridas de laranja e as interações dipolo-dipolo como linhas pontilhadas em ciano. Os resíduos envolvidos nestas interações foram destacados e representados como <i>sticks</i> . Figura preparada com Pymol.	67
Figura 23 - Interação da carbonila do composto 17 com o resíduo Gly66, formando uma ligação de hidrogênio em destaque. Ligações de hidrogênio são mostradas como linhas pontilhadas coloridas de laranja e as interações dipolo-dipolo como linhas pontilhadas em ciano.....	71
Figura 24 - Interação da carbonila de 18 com o resíduo Gly66, com a ligação de hidrogênio em destaque. Ligações de hidrogênio são mostradas como linhas pontilhadas coloridas em laranja e as interações dipolo-dipolo como linhas pontilhadas em ciano.	72
Figura 25 - Propostas para a inclusão de substituição dos átomos de oxigênio do grupo fenóxi dos inibidores 1 e 17 por um grupo amina (A) e amida (B).	74
Figura 26 - Esquema de SAR para os derivados de 1 contra a enzima cruzaína.	78
Figura 27 - Gráficos de Lineweaver-Burk para os compostos: 7, 14, 18 e 37. Concentrações de inibidor: controle – zero (●); 0,2 µM (○); 0,4 µM (▼); 0,8 µM (□) e 1,6 µM (■).	80
Figura 28 - Avaliação da citotoxicidade de compostos representativos da série de derivados imidazólicos. Controles: positivo (doxorubicina) e negativo (benzonidazol) em células da linhagem HFF1 de fibroblastos humanos saudáveis.	85

Figura 29 - Parasitemia de animais infectados com <i>T. cruzi</i> durante o tratamento com os compostos 1 e 14 . Para controle positivo foi utilizado BZ e para controle negativo foi utilizada uma solução salina (0,9% NaCl + 10% DMSO).	87
Figura 30 - Parasitemia, no dia de pico (5º dia de tratamento), dos animais tratados com solução salina (vermelho), com o composto 1 (azul) e com o composto 14 (verde). Para os animais tratados com BZ não foi detectado parasitas.....	88
Figura 31 - Porcentagem de redução da parasitemia, dos compostos BZ , 1 e 14 , no dia de pico da parasitemia (5º dia de tratamento).....	89
Figura 32 - Curva de sobrevida de animais controles (tratados com salina) ou tratados com 100 mg/kg dos compostos 1 ou 14 . A porcentagem de sobrevivência dos grupos foi observada até o 15º dia após a infecção dos animais. Foi utilizado como controle positivo o fármaco de referência, BZ . Como controle negativo, a solução veículo de 0,9% NaCl + 10% DMSO. Os dados representam a porcentagem de animais vivos em cada ponto analisado.	90
Figura 33 - Representação do sítio ativo da cruzaina interagindo com os inibidores 1 e 14 , conformações preditas pelo programa GOLD. Representação das estruturas dos inibidores. Valores de potência contra o alvo ($IC_{50}^{cruzaina}$) e o parasita ($IC_{50}^{T. cruzi}$), e citotoxicidade em células de fibroblastos, humanos saudáveis (IC_{50}^{FH}). Porcentagens de redução da parasitemia <i>in vivo</i> por via i.p..	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estruturas e atividade inibitória dos compostos 1-16 contra a enzima cruzaina.....	68
Tabela 2 - Estruturas e atividade inibitória dos compostos 17-23 contra a enzima cruzaina...	73
Tabela 3 - Estruturas e atividade inibitória dos compostos 24 e 25 contra a enzima cruzaina.	75
Tabela 4 - Estruturas e atividade inibitória dos compostos 26-33 contra a enzima cruzaina...	76
Tabela 5 - Derivados com modificações no anel aromático e no grupo espaçador.....	77
Tabela 6 - Derivados com modificações no espaçador e no imidazol.....	78
Tabela 7 - Avaliação biológica de derivados imidazólicos contra o <i>T. cruzi</i> (forma amastigota) e culturas celulares de HFF1.	81
Tabela 8 - Resultados do teste de toxicidade aguda em camundongos dos compostos selecionados.	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BZ	Benzonidazol
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GOLD	<i>Genetic Optimization for Ligand Docking</i>
HTS	<i>High-Throughput Screening</i>
IC ₅₀	Concentração de composto necessária para inibir 50% da atividade enzimática
IND	<i>Investigational New Drug</i>
K _i	Constante de equilíbrio para a dissociação do complexo E•I
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio
NCE	<i>New Chemical Entities</i>
NDA	<i>New Drug Application</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PhRMA	<i>Pharmaceutical Research and Manufactures of America</i>
SAR	<i>Structure-Activity Relationships</i>
SBDD	<i>Structure-Based Drug Design</i>
SBVS	<i>Structure-Based Virtual Screening</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
VS	<i>Virtual Screening</i>
Z-Phe-Arg-AMC	Benzoiloxicarbonil-fenilalanina-arginina-aminometilcumarina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	25
1.2 Planejamento de Fármacos	25
1.2.1 Planejamento de Fármacos Baseado na Estrutura do Receptor.....	27
1.2.2 Docagem Molecular	28
1.3 Doença de Chagas	30
1.4 Proteases	35
1.5 Cruzaína.....	36
1.6 Planejamento de Inibidores da Cruzaína	39
2 OBJETIVOS.....	43
2.1 Objetivo geral	43
2.2 Objetivos específicos.....	43
3 MATERIAIS E MÉTODOS	47
3.1 Planejamento de Inibidores da Cruzaína	48
3.2 Docagem Molecular	49
3.3 Síntese dos Derivados do Composto 1	50
3.4 Expressão da Cruzaína.....	50
3.5 Purificação da Cruzaína.....	51
3.6 Ensaios Enzimáticos	53
3.7 Parasitas e Cultura Celular	55
3.8 Ensaios <i>in vitro</i> contra a Forma Intracelular Amastigosta de <i>T. cruzi</i>	55
3.9 Ensaios de Citotoxicidade em Fibroblastos Humanos HFF1	56
3.10 Ensaios <i>in vivo</i>	56
3.10.1 Animais.....	56
3.10.2 Parasitas	57
3.10.3 Fármacos.....	57
3.10.4 Avaliação da Toxicidade dos Compostos: Teste da Máxima Dose Tolerada	57
3.10.5 Ensaios <i>in vivo</i> contra a Forma Circulante Tripomastigota de <i>T. cruzi</i> : Método de Pizzi-Brener.....	58
3.10.6 Análise Estatística	59
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.1 Breve Histórico.....	63
4.2 Modelagem Molecular e Atividade Biológica dos Derivados do Composto <i>hit</i> (1)	65

4.3 Avaliação <i>in vitro</i> da Atividade dos Derivados Imidazólicos Contra a Forma Amastigota do <i>T. cruzi</i>	80
4.4 Ensaio de Citotoxicidade em Células HFF1 e Determinação do Índice de Seletividade ..	84
4.5 Avaliação <i>in vivo</i> da Toxicidade dos Derivados Imidazólicos	85
4.6 Avaliação <i>in vivo</i> da Atividade dos Derivados Imidazólicos Contra a Forma Tripomastigota do <i>T. cruzi</i>	86
5 CONCLUSÕES	93
REFERÊNCIAS.....	97
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	103

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.2 Planejamento de Fármacos

O processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos vem passando por grandes transformações nas últimas décadas. Tradicionalmente, os compostos eram sintetizados baseados em moléculas com atividade biológica conhecida, principalmente, a partir de modelos experimentais em animais.¹ Posteriormente, surgiram as triagens biológicas em larga escala (HTS, do inglês *High-Troughput Screening*), que exploravam alvos específicos² e as triagens virtuais (VS, do inglês *Virtual Screening*) que utilizavam grandes coleções virtuais de compostos.³ Atualmente, esse processo vem se beneficiando cada vez mais através da aplicação de métodos modernos de química medicinal que integram estratégias computacionais e experimentais.⁴

Um dos grandes desafios nos projetos de planejamento de novos fármacos é a identificação de moléculas bioativas, que possam ter suas propriedades farmacodinâmicas, e farmacocinéticas otimizadas através de modificações estruturais. Assim, a Química Medicinal desempenha um papel fundamental, proporcionando o entendimento entre a Química e a Biologia, e envolvendo também o conhecimento das Ciências Médicas e Farmacêuticas, se preocupando com a descoberta, planejamento e preparo dos compostos bioativos, além dos estudos de metabolismo, caracterização do modo de ação e os estudos das relações entre a estrutura química e a atividade (SAR, do inglês *Structure-Activity Relationships*).¹

O processo clássico de descoberta e desenvolvimento de fármacos é dividido em duas grandes etapas: (i) pré-clínica e (ii) clínica (Figura 1). A etapa pré-clínica engloba a pesquisa de descoberta de compostos e ensaios pré-clínicos, e leva de três a seis anos para ser concluída. Inicialmente, ocorre a identificação de moléculas que possuem atividade biológica *in vitro*. Esses compostos são denominados *hits*, um termo em inglês que se refere a novas moléculas bioativas. Durante esta primeira etapa, estes *hits* são otimizados em relação às suas propriedades farmacodinâmicas, farmacocinéticas e toxicidade para a geração de compostos líderes.⁵ Esses compostos líderes podem ser otimizados para o desenvolvimento de novas entidades químicas (NCE, do inglês *New Chemical Entities*), que por sua vez, são submetidos às agências reguladoras para uma extensa e rigorosa avaliação de eficácia e segurança para a realização de estudos em seres humanos. No Brasil, a agência responsável pela regulação de novos fármacos é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Nos Estados

Unidos, a equivalente é o *Food and Drug Administration* (FDA) e na Europa, é a *European Medicines Agency* (EMA).

Após a análise da agência responsável, o candidato a fármaco recebe aval para o processo de investigação clínica (IND, do inglês *Investigational New Drug*) e o princípio ativo pode ser testado em humanos, na etapa seguinte de desenvolvimento.⁶

Descoberta e Planejamento de Fármacos: um caminho longo e arriscado

Figura 1 - Panorama geral do processo de descoberta e planejamento de fármacos até a aprovação.
Fonte: Adaptada de PhRMA.⁷

Na segunda etapa (ii) são realizados os ensaios clínicos em humanos, que são divididos em quatro fases. Na fase I, a NCE é testada em um pequeno grupo de indivíduos saudáveis, geralmente entre 20 a 80 (voluntários), para avaliação preliminar da toxicidade. A fase II tem o propósito de investigar se a NCE é capaz de produzir os efeitos terapêuticos desejados. Essa fase conta com um grupo maior de indivíduos, geralmente entre 100 e 300, que possui a doença alvo, e são avaliadas a eficácia e a segurança da NCE. A fase III conta com um número expressivo de pacientes, entre 1.000 a 3.000, e tem por objetivo gerar dados estatisticamente relevantes, com considerável distribuição geográfica. Nessa fase, se avalia o impacto do candidato a fármaco no tratamento da doença e, quando completada com sucesso, uma nova solicitação é enviada à agência reguladora para aprovação do novo fármaco (NDA, do inglês *New Drug Application*).^{1,8}

Quando o novo medicamento chega ao mercado farmacêutico, tem início a fase IV (farmacovigilância), na qual ocorre o monitoramento da segurança e eficácia a longo prazo, além do acompanhamento de quaisquer efeitos adversos inesperados.⁹

O processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos é extremamente caro e longo. Dados da PhRMA (do inglês *Pharmaceutical Research and Manufacturers of America*) indicam investimentos da ordem de US\$ 2,6 bilhões e um tempo médio de 15 anos.^{7, 10}

1.2.1 Planejamento de Fármacos Baseado na Estrutura do Receptor

O planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor (SBDD, do inglês *Structure-Based Drug Design*) é um dos métodos mais importantes utilizados em laboratórios de pesquisa na academia e na indústria farmacêutica.¹¹ Em sua aplicação, engloba diversas estratégias computacionais que fazem uso de informações tridimensionais de estruturas de proteínas alvo para a identificação e otimização de novos ligantes. Aspectos fundamentais, como mecanismo e modo de ligação, são explorados para a caracterização das interações intermoleculares predominantes na formação de complexos entre o receptor alvo e os compostos bioativos.¹² Neste amplo contexto, o entendimento dos estudos de SAR é de grande importância. Séries de compostos podem ser planejadas, sintetizadas e avaliadas experimentalmente com o objetivo final de se descobrir NCEs com propriedades otimizadas. Simultaneamente, são exploradas várias técnicas experimentais para a caracterização e determinação de propriedades moleculares do alvo biológico.

A Figura 2 apresenta um fluxograma do processo de SBDD, destacando a integração de métodos computacionais e experimentais. A partir da escolha da doença ocorre a seleção de um alvo molecular apropriado. O alvo eleito deve ter a sua estrutura tridimensional determinada, por meio da cristalografia, ressonância magnética nuclear (RMN) ou através de métodos computacionais. Na sequência, grandes coleções de compostos são utilizadas em processos de triagem virtual e docagem molecular para a identificação de ligantes, que por sua vez, são empregados como modelos para o planejamento de novos compostos e o desenvolvimento de estudos de SAR, concomitantemente com a realização de uma variedade de ensaios bioquímicos e/ou biológicos. Após a otimização pré-clínica de propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas dos ligantes, que envolve a geração de líderes e a

descoberta de NCEs, são realizadas as etapas de ensaios clínicos para o desenvolvimento do candidato a novo fármaco.

Figura 2 - Esquema do planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor (SBDD).
Fonte: Elaborada pela autora.

1.2.2 Docagem Molecular

A docagem molecular é uma das principais estratégias computacionais de SBDD para a identificação e planejamento de novas moléculas bioativas. A docagem envolve a predição de conformações dos ligantes no sítio de ligação da proteína alvo,¹³ seguida da avaliação (pontuação) dos modos de ligação (Figura 3). Nesse processo, ocorre inicialmente o acoplamento (do inglês *pose*) dos ligantes (das coleções virtuais) na cavidade selecionada da proteína alvo. Diversas conformações e orientações de cada molécula são avaliadas de acordo com as suas interações intermoleculares com os resíduos de aminoácido do sítio de ligação, sendo classificadas com base em uma função de pontuação (do inglês *scoring*). Ao final

dessas etapas tem-se uma classificação dos ligantes, sendo possível priorizar os candidatos mais promissores para posterior avaliação experimental.⁴

Figura 3 - Esquema de docagem molecular de uma pequena molécula na cavidade do sítio ativo da cruzafina.
Fonte: Elaborada pela autora.

De acordo com o programa de docagem molecular utilizado, as funções de busca e pontuação podem ser físico-químicas, experimentais ou baseadas no conhecimento. Existem atualmente mais de 30 programas de docagem molecular,¹⁴ entre os quais, o GOLD 4.0.1 (do inglês *Genetic Optimization for Ligand Docking*),¹⁵ que foi utilizado neste trabalho de doutorado. O programa GOLD utiliza um algoritmo genético que se baseia em biologia evolutiva, como hereditariedade, mutação, seleção e recombinação. A função *Goldscore*, uma das mais utilizadas, emprega métodos de mecânica molecular baseados em campos de força. Esta função quantifica a energia das interações entre receptor e ligante, bem como a energia interna do ligante.

As interações intermoleculares mais comumente envolvidas no processo de reconhecimento molecular são as ligações de hidrogênio, de van der Waals, iônicas, hidrofóbicas, do tipo cátions- π (envolvendo grupamentos positivamente carregados e anéis aromáticos) e π - π .¹⁶⁻¹⁹ Após concluído o trabalho de docagem, as moléculas selecionadas

devem ser investigadas (inspecionadas visualmente) em relação à sua complementaridade a estrutura da cavidade de ligação da proteína alvo.

1.3 Doença de Chagas

A doença de Chagas, ou tripanossomíase americana, é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Em 1909, o médico sanitarista brasileiro Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, observou pela primeira vez o protozoário no sangue de um ser humano: uma menina de três anos, que tinha a doença na fase aguda. Carlos Chagas denominou o parasita de *Trypanosoma cruzi* em homenagem ao seu mentor Oswaldo Cruz.²⁰

A doença de Chagas ainda causa, mesmo após mais de um século de sua descoberta, grande preocupação. Estima-se que 10 milhões de pessoas em todo o mundo estejam infectadas pelo *T. cruzi*, sendo que a situação é mais crítica na América Latina, onde a doença é endêmica em 21 países. O maior número de casos ocorre no Brasil, Argentina e México. Mais de 100 milhões de pessoas estão em área de risco de contaminação pelo vetor.²¹ Algumas iniciativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) para combater o vetor transmissor tentam atingir 110 milhões de pessoas por ano, até 2030.²² Atualmente, como resultado da grande mobilidade populacional, vários casos têm sido descritos em outras regiões importantes do planeta, como a América do Norte, Europa, Ásia e Oceania, tornando-se, portanto, um grande desafio de saúde mundial.²³⁻²⁵ Um estudo de 2011 estimou entre 68.000 e 123.000 casos da doença de Chagas em diversos países da Europa, entre eles, Portugal, Espanha, Suíça, França, Dinamarca, Holanda, Alemanha, Bélgica e Reino Unido.²⁶ Esses casos em países não-endêmicos levou a OMS a lançar diversas iniciativas de vigilância para o controle da doença.²² A Figura 4 apresenta um panorama global da distribuição geográfica da doença e o número estimado de indivíduos infectados com o *T. cruzi*, de acordo com dados da OMS, entre os anos de 2010-2013.

Figura 4 - Distribuição mundial de casos de infecção por *Trypanosoma cruzi*, com base em estimativas oficiais no período de 2010 a 2013.

Fonte: WORLD...²²

O *T. cruzi* é transmitido aos seres humanos, predominantemente, por excreções de insetos triatomíneos hematófagos infectados pelo protozoário. Esses insetos são encontrados em quase toda a América Latina e são conhecidos popularmente por “barbeiros” no Brasil, e por *winchuka* na Argentina, Bolívia e Chile. Estes insetos foram também encontrados no sul dos Estados Unidos, onde são chamados de *kissing bugs*, o que liga o sinal de alerta para a ocorrência da transmissão vetorial.²⁷

Embora a transmissão vetorial pelo *Triatoma infestans* tenha sido oficialmente eliminada nas áreas urbanas, no Brasil em 2006,^{28, 29} foi registrada a presença de *T. infestans* em áreas de mata fechada que posteriormente foram devastadas pela agricultura e desenvolvimento urbano.³⁰ A ingestão de alimentos infectados com o parasita, como o açaí e o caldo de cana, apresenta-se como uma nova forma grave de transmissão oral no Brasil.³¹ A infecção também pode ocorrer por meio de transfusão de sangue, por transmissão congênita,³²⁻³³ transplante de órgãos ou acidentes laboratoriais.³⁴

O *T. cruzi* apresenta um ciclo de vida complexo caracterizado por três estágios de desenvolvimento: (i) forma epimastigota, que se reproduz no intestino do inseto vetor (triatomíneos) e que não é infectante para os vertebrados; (ii) forma tripomastigota, infectante para os vertebrados e presente no inseto, chamada de tripomastigota metacíclico, e no humano, tripomastigota sanguíneo, que é a forma extracelular que circula no sangue; e (iii)

forma amastigota, estágio intracelular responsável pela reprodução do parasita no hospedeiro vertebrado.³⁵⁻³⁶

A Figura 5 apresenta o ciclo que se inicia quando inseto se alimenta de sangue de um humano e libera em suas excreções parasitas na forma tripomastigotas metacíclicos (1). Os parasitas penetram no organismo do hospedeiro vertebrado por meio da ferida causada pela picada do inseto contaminado ou através do contato com as mucosas, como por exemplo, a conjuntiva. No hospedeiro vertebrado, os tripomastigostas invadem as células próximas ao local da inoculação, onde se diferenciam (2). Em sua fase intracelular, o parasita assume uma forma ovoide e sem flagelo, chamada amastigota intracelular. As amastigotas se multiplicam rapidamente, e se diferenciam em tripomastigostas causando o rompimento celular e a infestação do parasita na corrente sanguínea. Nesse estágio, o protozoário reassume a forma flagelada e se espalha pelo organismo, infectando mais células e causando novas lesões, principalmente, em tecidos musculares cardíacos. As tripomastigostas sanguíneas se transformam em amastigotas intracelulares em locais de novas infecções (3). Manifestações clínicas podem ser originadas a partir deste ciclo infeccioso. O ciclo é retomado quando os parasitas penetram em outras células ou são ingeridos por outro inseto vetor (4). A perpetuação do ciclo se dá quando um inseto se alimenta de sangue humano (ou outro vetor vertebrado) que apresenta uma grande quantidade de tripomastigotas (5), que se transformam em epimastigostas no intestino do vetor (6). As epimastigostas se multiplicam no intestino delgado do inseto (7) e se diferenciam em tripomastigostas metacíclicas infectantes no intestino grosso (8), forma que é eliminada juntamente com as excreções do inseto quando este se alimenta, renovando assim, o ciclo de transmissão.

Figura 5 - Esquema geral do ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.

Fonte: Adaptada de CENTERS...⁷⁶

As fases clínicas de manifestação da doença se dividem em: (i) fase aguda, caracterizada pela visualização do parasita no exame direto de sangue ao microscópio, logo nos primeiros três meses após a infecção. Esta fase geralmente é assintomática ou oligossintomática e, portanto, não é valorizada pelo paciente ou agente de saúde. Esta fase é caracterizada por sintomas como febre, fadiga, dores no corpo e edema facial. Estes sintomas são muitas vezes confundidos com de outras patologias e podem permanecer por até dois meses.³⁷ Entretanto, em alguns casos, a fase aguda pode ser sintomática, especialmente em crianças ou indivíduos que consumiram alimentos contaminados, podendo levar à morte devido a complicações decorrentes de insuficiência cardíaca e processos inflamatórios.

Como a doença de Chagas não é geralmente diagnosticada em seu período inicial, a fase aguda evolui para a (ii) fase crônica, caracterizada pela presença de anticorpos específicos (e.g., IgG anti-*T. cruzi*), e que se prolonga por toda a vida do indivíduo infectado, pois não tem cura e tampouco tratamento eficaz.

A doença é comumente descoberta somente na fase crônica sintomática, caracterizada pelo crescimento anormal e pelos graves danos das funções de órgãos do sistema circulatório. Afeta principalmente o coração, causando insuficiência cardíaca, arritmias e outros transtornos; e o sistema digestório, causando dilatação do esôfago (dificuldades de deglutir os

alimentos) e do cólon.³⁸ Essas manifestações clínicas muitas vezes levam o paciente a morte.³⁹

Em função das graves manifestações clínicas da fase crônica da doença, muitos pacientes vão a óbito. Além disso, uma parcela significativa de indivíduos infectados perde a sua capacidade produtiva, causando fortes impactos sociais e econômicos. As perdas em salário e produtividade no Brasil superam 1,3 bilhões de dólares anuais.⁴⁰ Um indicativo quantitativo importante é o DALY (do inglês *Disability-Adjusted Life-Years*; em português, *anos de vida perdidos ajustados por incapacidade*). Somente na América Latina em 2015, o foram estimados 528 mil DALYs,²² o que corresponde diretamente aos anos perdidos pelos indivíduos afetados na fase crônica da doença. Apesar de ser considerada uma doença tropical, a sua distribuição mundial tem crescido de maneira expressiva. Estima-se que os gastos globais com o tratamento da doença de Chagas excedam os 7 bilhões de dólares por ano, incluindo mais de 10% desses valores em regiões como a América do Norte.⁴⁰

No Brasil, estima-se que existam hoje mais de 2 milhões de pessoas infectadas, das quais 60% vivem em áreas urbanas, suscitando desequilíbrios socioeconômicos consideráveis. Reconhecidamente, uma parcela significativa de infectados nem tem ao menos um diagnóstico da doença, vivendo na ausência de conhecimento e sem qualquer acesso a tratamentos. Anualmente, são mais de 6 mil mortes devido às complicações crônicas da doença.

O arsenal terapêutico para o tratamento da doença, que foi caracterizada há mais 100 anos, é extremamente limitado em todos os aspectos clínicos.⁴¹ Os dois medicamentos disponíveis, o benzonidazol (Rochagan[®], da Roche) e o nifurtimox (Lampit[®], da Bayer), desenvolvidos na década de 1970, apresentam sérios problemas, como baixa eficácia e elevada toxicidade (Figura 6).³⁷ No Brasil, o nifurtimox não é mais comercializado, tornando o benzonidazol a única alternativa terapêutica disponível. Em 2003, a Roche cedeu para o governo brasileiro os direitos e a tecnologia de fabricação do Rochagan[®], permitindo que o governo fabricasse o medicamento através do LAFEPE (Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco). Mesmo com a produção nacional do medicamento, muitas regiões não recebem adequadamente o tratamento. Alguns pacientes têm que esperar mais de 30 dias para ter acesso ao medicamento, considerado essencial pela OMS.²² Uma dificuldade adicional associada ao uso do benzonidazol é que muitos pacientes abandonam o tratamento devido aos sérios efeitos adversos, que incluem, dermatites, edema generalizado, febre, infarto ganglionar, dores musculares e articulares. Em casos mais graves, ocorrem manifestações neuropáticas periféricas e até supressão da medula óssea.⁴¹

Diante deste panorama complexo, existe uma enorme urgência para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento seguro e eficaz da doença.

Figura 6 - Estruturas dos fármacos benzonidazol (Rochagan, Roche) e nifurtimox (Lampit, Bayer).
Fonte: Elaborada pela autora.

1.4 Proteases

Uma estratégia muito utilizada de planejamento de fármacos antiparasitários envolve o estudo de alvos biológicos. Particularmente, diversos alvos moleculares do *T. cruzi* têm sido explorados para o desenvolvimento de novas gerações de agentes antichagásicos, com destaque para as proteases.⁴¹⁻⁴²

As proteases (peptidases ou enzimas proteolíticas) possuem a função de hidrolisar as ligações peptídicas. Em protozoários como o *T. cruzi*, possuem funções múltiplas que compreendem desde a invasão celular até a evasão do parasita do sistema imune do hospedeiro.⁴³ As proteases podem ser divididas de acordo com o tipo de reação que promovem. As exopeptidases atuam somente em resíduos de aminoácidos das extremidades *N*-terminal (aminopeptidases) ou *C*-terminal (carboxipeptidases), ao passo que as endopeptidases, catalisam a hidrólise de ligações peptídicas internas. Outro critério de classificação é o mecanismo catalítico de clivagem, agrupado em seis classes principais: serino-proteases, cisteíno-proteases, aspartil-proteases, metaloproteases, treonino-proteases e glutamato-proteases.⁴⁴

As proteases possuem cavidades estruturais denominadas subsítios. Um modelo usado para caracterizar os diferentes subsítios da enzima (representados pela letra “S”), possui locais em que se ligam os resíduos de aminoácido do substrato, representados pela letra “P”. Esses subsítios são numerados de S1 a Sn seguindo a direção *N*-terminal do substrato e, de S1’ a Sn’

seguindo a direção C-terminal. Os resíduos do substrato alocados nesses subsítios são numerados de P1 a Pn, quando direcionados ao N-terminal e, de P1' a Pn', se direcionados ao C-terminal da ligação peptídica do substrato que funciona como sítio de clivagem (Figura 7).⁴⁵⁻⁴⁶

Figura 7 - Modelo de interação para proteases. Nesse modelo enzima-substrato, os subsítios da enzima são representados pela letra “S”, e os peptídeos que interagem com a enzima são representados pela letra “P”. O sítio de clivagem do substrato está representado por uma seta.

Fonte: Adaptada de TURK.⁴⁶

1.5 Cruzaína

A enzima cruzaína (EC 3.4.22.51), principal cisteíno-protease do parasita *T. cruzi*, está entre os alvos mais importantes para o desenvolvimento de candidatos a novos fármacos para a doença de Chagas.⁴⁷⁻⁴⁸ Expressa durante todo ciclo de vida do parasita, a cruzaína é importante para o desenvolvimento, sobrevivência e diferenciação do protozoário, sendo responsável por sua nutrição, evasão do sistema imune e invasão de novos tecidos.⁴⁸⁻⁴⁹ A cruzaína pertence à família da papaína e é formada por dois domínios. Um deles é constituído predominantemente por hélices- α , ao passo que o outro é formado por extensas interações de folhas- β antiparalelas (Figura 8). O sítio catalítico da enzima se encontra na interface entre os dois domínios.

Figura 8 - Representação da estrutura da cruzaina. Em vermelho, o domínio predominantemente formado por hélices- α ; e em verde, o domínio formado predominantemente por folhas- β . Na interface, encontra-se o sítio catalítico da enzima.

Fonte: Elaborada pela autora.

O sítio catalítico é dividido em quatro subsítios principais, denominados S1, S2, S3 e S1' (Figura 9). No sítio ativo da enzima está presente a chamada tríade catalítica, formada pelos resíduos Cys25, His162 e Asn182 (Figura 10A). O subsítio S2 (Figura 10B) é o menos exposto ao solvente, sendo o principal responsável pela especificidade da enzima pelo substrato. Este subsítio exibe especificidade por grupos hidrofóbicos, sendo delimitado pelos resíduos Met68, Ala138, Leu160 e Gly163. Por outro lado, a presença do resíduo Glu208 – localizado na extremidade de S2 – confere carga negativa a esta região, o que favorece a interação com grupos carregados positivamente. Os subsítios S1', S1 e S3 são menos definidos e mais expostos ao solvente.⁵⁰

Figura 9 - Sítio de ligação da cruzaina e os seus principais subsítios: S1, S2, S3 e S1'.
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 10 - A) Tríade catalítica da cruzaina formada por Cys25, His162 e Asn182. B) Resíduos de aminoácidos que compõem o subsítio S2.

Fonte: Elaborada pela autora.

Estudos bioquímicos e farmacológicos com inibidores da cruzaina foram úteis para a validação desta enzima como um alvo molecular para planejamento de fármacos.^{47,51} As estruturas tridimensionais de complexos entre a cruzaina e uma variedade de ligantes, serviram de guia para o processo de planejamento de novos inibidores.⁵²⁻⁵⁹

As primeiras classes de inibidores da cruzaina foram descobertas a partir de coleções de peptídeos, as quais se ligam de forma covalente (irreversível), como as vinilsulfonas e as fluorometilcetonas. A vinilsulfona K777 (Figura 11) apresentou elevada afinidade pela enzima, além de atividade *in vitro* e *in vivo*⁶⁰ contra o parasita. Esse composto avançou em fases clínicas de desenvolvimento, contribuindo para a consolidação do papel da cruzaina no desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos. Mas teve seus ensaios descontinuados, principalmente por efeitos *off-target* do inibidor.⁶¹

Figura 11 - Inibidor irreversível da cruzaina, K777.
Fonte: Elaborada pela autora.

1.6 Planejamento de Inibidores da Cruzaina

Existem depositadas no PDB (*Protein Data Bank*) 25 estruturas cristalográficas da enzima cruzaina em complexo com ligantes, as quais permitem a aplicação de diversas técnicas de SBDD. Vários inibidores da cruzaina vêm sendo estudados, podendo-se destacar a série de derivados benzimidazóis, estudada em nosso grupo de pesquisa. A origem dessa série deu-se a partir da identificação de um composto líder, que teve sua estrutura elucidada em complexo com a cruzaina (código PDB: 3KKU) por meio da cristalografia de raios X.⁵⁶ O uso da Química Medicinal levou a otimização de derivados mais potentes, com propriedades anti-*T. cruzi in vitro*.⁶² A Figura 12 apresenta o modo de ligação do composto líder (cristalográfico) e do derivado otimizado (obtido por docagem molecular).

Figura 12 - Modo de ligação do composto líder (em amarelo) e do derivado otimizado (em verde). Potência dada pelos valores de IC_{50} contra a enzima cruzaina.

Fonte: Adaptada de FERREIRA.⁶²

Capítulo 2

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral desta tese de doutorado é o planejamento e a otimização de novos inibidores da enzima cruzaina de *T. cruzi*, empregando de forma integrada, métodos computacionais e experimentais de química medicinal e planejamento de fármacos.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos incluem:

- ✓ Planejar e otimizar novos inibidores da cruzaina com base em um composto *hit* previamente identificado, empregando métodos de SBDD;
- ✓ Propor a síntese de compostos planejados;
- ✓ Avaliar candidatos a inibidores da cruzaina através de ensaios bioquímicos;
- ✓ Investigar e determinar a potência e a afinidade de novos inibidores;
- ✓ Determinar o mecanismo de inibição e estudar o modo de ligação dos inibidores mais potentes;
- ✓ Discutir as relações entre a estrutura e atividade;
- ✓ Avaliar *in vitro* os inibidores mais promissores contra o *T. cruzi*;
- ✓ Avaliar a citotoxicidade dos compostos mais importantes;
- ✓ Avaliar a eficácia e a toxicidade *in vivo* dos compostos mais promissores.

Capítulo 3**MATERIAIS E MÉTODOS**

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A integração de estratégias experimentais e computacionais de planejamento de fármacos empregada neste trabalho possibilitou o desenvolvimento e identificação de novos inibidores da enzima cruzafina. Essa série de compostos foi avaliada quanto a sua atividade tripanocida em ensaios *in vitro*, utilizando fibroblastos humanos infectados com o parasita. Fibroblastos não infectados foram utilizados para avaliação de citotoxicidade em células saudáveis. Testes *in vivo* foram conduzidos para os inibidores mais promissores. A otimização desses inibidores ocorreu através da utilização de métodos de SBDD de acordo com o esquema da Figura 13.

Figura 13 - Estratégia de planejamento de novos inibidores da cruzaina utilizada neste trabalho de doutorado.
Fonte: Elaborada pela autora.

3.1 Planejamento de Inibidores da Cruzaína

As estratégias de planejamento e otimização dos inibidores da cruzaina foram estabelecidas a partir da estrutura do composto *hit* (**1**) (Figura 14). Este composto foi identificado através de triagens virtuais de bibliotecas de compostos incorporadas na base de dados ZINC.⁶³ Esse composto apresenta alta potência e afinidade frente à cruzaina ($IC_{50} = 1 \mu M$; $K_i = 120 \text{ nM}$) e significativa atividade anti-*T. cruzi* ($IC_{50} = 1,1 \mu M$).

Figura 14 - Composto *hit* **1**. Estrutura, valores de potência e afinidade contra a cruzaina e atividade contra o parasita. Modo de ligação intermolecular no sítio ativo da enzima predito pelo programa de docagem molecular GOLD.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.2 Docagem Molecular

O processo de otimização molecular do composto **1** se deu primeiramente através da realização de estudos de docagem molecular. Nesta etapa foi utilizado o programa GOLD (do inglês *Genetic Optimization for Ligand Docking*).¹⁵ Este programa utiliza um algoritmo genético de busca conformacional para explorar os possíveis modos de interação de um ligante com o sítio de ligação da proteína alvo. Este método, quando comparado a outros programas de docagem molecular, apresentou melhor desempenho.^{15,77}

A estrutura cristalográfica utilizada está depositada no PDB sob o código 3KKU.⁵⁶ Esta estrutura foi escolhida dentre as 25 estruturas da cruzaina disponíveis, devido a sua alta resolução (1,28 Å).

Com o auxílio do programa Sybyl-X 2.0, a estrutura da proteína foi preparada para as simulações de docagem. As moléculas de água, o ligante e as duplas conformações dos resíduos foram removidos. Átomos de hidrogênio foram adicionados e a protonação dos resíduos catalíticos, His162 (forma protonada) e Cys25 (forma desprotonada), foi estabelecida de acordo com o estado de ionização encontrado em solução.⁶⁴

O sítio ativo foi definido incorporando todos os resíduos de aminoácidos circunscritos em uma esfera de 10 Å, centralizada no átomo de enxofre do resíduo de aminoácido Cys25.

As simulações foram realizadas utilizando-se os parâmetros padrão do programa GOLD. A função de pontuação *GoldScore* foi empregada para selecionar as conformações representativas para cada composto. Essa função é baseada em campos de força e considera as contribuições energéticas que resultam de interações de van der Waals e de ligações de hidrogênio tanto intramoleculares quanto intermoleculares. As soluções de docagem encontradas pelo programa foram inspecionadas visualmente para a verificação da complementaridade entre as superfícies moleculares do ligante e da cruzaina, padrão de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas.

A partir dos padrões de reconhecimento molecular revelados pelos estudos de docagem, novos derivados do composto **1** foram planejados, sintetizados e avaliados experimentalmente.

3.3 Síntese dos Derivados do Composto 1

Todas as moléculas planejadas e avaliadas nesse trabalho foram sintetizadas no Laboratório de Química Orgânica Sintética, da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, sob supervisão do Prof. Dr. Luiz Carlos Dias. As moléculas derivadas do composto **1** foram sintetizadas pelo Dr. Celso Oliveira Rezende Junior e Dr. Brian Slafer e pela aluna de pós-graduação Rocio Marisol Espinoza Chavez.

3.4 Expressão da Cruzaina

Para a realização dos experimentos de cinética enzimática foram obtidas amostras da cruzaina em sua forma pura e ativa. O vetor pETM11 (Agilent Technologies), contendo a construção gênica que codifica a cruzaina, foi transformado em células de *Escherichia coli* linhagem *Artic Express* (Agilent Technologies). Essa construção contém as regiões que codificam o pró-domínio e a região central da enzima, sendo truncada na extensão C-terminal. Esta região possui resíduos que não são essenciais para a atividade enzimática. Além disso, o plasmídeo permite a expressão da proteína em fusão com uma cauda de histidina (6xHis), possibilitando sua purificação pelo uso de uma resina de afinidade.

Para a expressão da cruzaina, células de *E. Coli* contendo o vetor pETM11 e a sequência codificante da cruzaina foram pré-inoculadas em 150 mL de meio de cultivo LB (Luria Bertani) contendo 20 µg/mL de gentamicina e 50 µg/mL de canamicina. A cultura foi mantida *overnight* a 37°C sob agitação (200 rpm). No dia seguinte, o pré-inóculo foi

adicionado à 1 L de meio de autoindução, constituído de 10% de triptona, 5% extrato de levedura, 25 mM NaHPO₄, 25 mM KH₂PO₄, 50 mM NH₂Cl, 5 mM Na₂SO₄, 0,5% de glicerol, 0,5% de glicose, 0,2% de lactose e 2 mM MgSO₄. Esse meio foi mantido sob agitação a 37 °C até atingir a densidade óptica (OD₆₀₀) de 0,16, sendo posteriormente levado ao *shaker* por 72 horas a 18 °C. Após esse tempo de expressão, as células foram centrifugadas a 5000 rpm durante 30 minutos na temperatura de 4 °C e o *pellet* foi separado para a etapa de purificação.

3.5 Purificação da Cruzaína

A purificação deu-se a partir da expressão da cruzaína em 1 L de meio de cultura. Após a expressão, conforme descrito no item 3.4, o *pellet* foi ressuspendido em tampão de lise (300 mM NaCl; 50 mM Tris Base; 10 mM Imidazol; 1 mM CaCl₂; 1 mM MgSO₄; pH = 10), em uma proporção de 200 mL para 1 L de expressão. Após duas horas neste tampão, as células foram sonicadas em 12 ciclos de pulsos de 30 segundos intercalados, com 45 segundos de descanso. Após completada a lise, a mistura foi centrifugada a 9000 rpm por 30 min a 4 °C.

O sobrenadante filtrado do centrifugado foi incubado com 5 mL de resina de níquel (Ni-NTA superflow – Qiagen), previamente lavada e equilibrada com tampão de lise, para purificação em cromatografia de afinidade por metal imobilizado (IMAC). Afim de otimizar a interação da enzima com a resina, a mistura ficou sob rotação leve por 3 h a 4 °C. Em seguida, a amostra foi eluída em uma coluna e o *void* coletado. A resina foi inicialmente lavada com tampão de lavagem (300 mM NaCl; 50 mM Tris Base; 10 mM Imidazol; pH = 10). A eluição da cruzaína ocorreu pela utilização deste tampão de lavagem acrescido de um gradiente crescente de imidazol (25, 50, 75, 100 e 250 mM). Alíquotas de 8 mL para cada concentração de imidazol (divididas em 2 amostras de 4 mL cada), foram coletadas e uma amostra de cada uma destas eluições foi utilizada para verificação da presença da enzima em gel de SDS PAGE 12% (Figura 15). As eluições de 75 mM I a 250 mM II, continham a proteína e foram misturadas. A fração total foi dialisada em tampão acetato 0,1 M e pH 5,5 para retirada do imidazol. Após a diálise, a amostra foi diluída para 0,5 mg/mL no tampão de ativação.

Figura 15 - Gel SDS PAGE 12% das amostras da primeira etapa da purificação da cruzafina em resina de afinidade. (1) Marcador (58 – 7 kDa); (2) Expressão induzida; (3) Eluição 50 mM I; (4) Eluição 50 mM II; (5) Eluição 75 mM I; (6) Eluição 75 mM II; (7) Eluição 100 mM I; (8) Eluição 100 mM II; (9) Eluição 250 mM I; (10) Eluição 250 mM II.

Fonte: Elaborada pela autora.

A etapa seguinte consistiu na clivagem da porção N-terminal da enzima e foi necessária para promover a sua ativação, uma vez que a enzima é expressa como um zimogênio e esta porção “bloqueia” seu sítio ativo. Este é um processo de auto ativação pelo qual a cruzafina é capaz de promover a auto proteólise deste fragmento em meio ácido. Para isto, usa-se o tampão de ativação (100 mM NaAc; 300 mM NaCl; 5 mM EDTA; 10 mM DTT; pH 5,5). O aumento da atividade catalítica da proteína foi monitorado por fluorimetria pela detecção da clivagem do substrato Z-Phe-Arg-AMC (Benzoil-fenilalanina-arginina-aminometilcumarina) desde o tempo zero, em intervalos de 1 h ou de 30 min após alguma atividade ter sido detectada (ensaio fluorimétrico para detecção da atividade enzimática descrito detalhadamente no item 3.6 desta tese). A ativação também foi verificada com gel de SDS PAGE 12%, pela verificação da diminuição do peso molecular da enzima devido a perda da porção N-terminal.

A última etapa consistiu da purificação da cruzafina deste fragmento clivado. Para isso, foi utilizada a resina tiopropil sefarose 6B (Thiopropyl Sepharose 6B – GE Healthcare Life Sciences), previamente equilibrada com tampão de ligação (20 mM NaAc; 150 mM NaCl; pH 7,2). A amostra contendo a cruzafina foi dialisada nesse tampão de ligação para retirada do DTT e misturada com a resina e incubada *overnight* a 4 °C, sob agitação lenta.

Posteriormente, a resina com a proteína ligada a ela, foi separada da mistura com o tampão de ligação pela utilização de uma coluna de bancada. A eluição da proteína ocorreu pela lavagem da resina com tampão de ligação suplementado com 20 mM de DTT. A enzima pura foi então lavada em sistema de ultra filtração Amicon para a troca de tampão e retirada

do DTT, sendo armazenada em alíquotas de 30 μL a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, em tampão contendo 0,1 M NaAc e 0,000005% Triton X-100, pH 5,5. Como indicado pelo gel de SDS (Figura 16), há uma perda significativa de enzima ao longo do processo de purificação. A quantificação da concentração de enzima ativa resultante do processo de purificação foi realizada por titulação utilizando-se o inibidor E-64 foi de 15 μM .

Figura 16 - Gel SDS PAGE 12% após a última etapa de purificação, mostrando a diminuição do peso molecular da cruzaína após o processo de ativação. (1) Marcador (58 – 7 kDa); (2) Cruzaína ativa.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.6 Ensaios Enzimáticos

Ensaios bioquímicos para a cruzaína são bem estabelecidos na literatura e realizados com alta padronização e validação em nosso laboratório.⁶² A atividade catalítica da cruzaína é medida com base na clivagem do substrato Z-Phe-Arg-AMC (benzoiloxicarbonil-fenilalanina-arginina-aminometilcumarina), que ao ser clivado gera o grupo repórter 7-amino-4-metilcumarina (Figura 17). Para monitoramento da fluorescência utilizamos os comprimentos de onda de 355 nm para excitação e 460 nm para emissão. Esta técnica se baseia na transferência intramolecular de energia de fluorescência (IFETS, sigla em inglês para *Intramolecular Fluorescence Energy Transfer*).⁶⁵

Figura 17 - Esquema da clivagem do substrato Z-Phe-Arg-AMC utilizado neste trabalho para determinação dos parâmetros cinéticos.

Fonte: Elaborada pela autora.

Nesse trabalho, foi estabelecida a concentração padrão de 100 μM para a triagem inicial dos compostos contra a cruzaina. Os compostos que inibiram a atividade da cruzaina, numa faixa superior a 50% nessa concentração foram selecionados para determinação de valores de IC_{50} . Aqueles com melhores valores de IC_{50} foram selecionados para estudos do mecanismo de inibição. Todos os ensaios foram realizados em triplicata em pelo menos dois experimentos independentes.

O ensaio foi realizado com 1,0 nM de cruzaina e 5,0 μM de substrato ($K_m = 1 \mu\text{M}$), em tampão de 0,1 M NaAc, pH 5,5, na presença de 5 mM de DTT e 0,01% de Triton X-100.⁶⁶ As leituras foram realizadas durante 300 s, em temperatura constante de 30 °C, em placas pretas de 96 poços, utilizando um espectrofluorímetro PerkinElmer modelo Victor™. Os resultados destas leituras foram analisados e interpretados com auxílio dos *softwares* GraphPad Prism (versão 6.04 para Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com) e SigmaPlot (versão 13, Systat Software, Inc., San Jose California USA, www.sigmaplot.com). Estes programas também foram utilizados para geração dos gráficos para determinação dos valores de IC_{50} e K_i .

3.7 Parasitas e Cultura Celular

Para os ensaios *in vitro* contra o *T. cruzi* foram utilizadas as cepas Tulahuen lacZ. Esses parasitas foram geneticamente modificados para expressar o gene β -galactosidase de *Escherichia coli* lacZ,³⁶ que catalisa uma reação colorimétrica com vermelho de clorofenol β -D-galactopiranosídeo (CPRG, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) como substrato. Esta cepa nos foi fornecida pelo pesquisador Frederick S. Buckner da University of Washington em Seattle, WA, USA.

A forma epimastigota de *T. cruzi* foi cultivada em laboratório, em meio de cultura LIT (do inglês *Liver Infusion Tryptose*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina e estreptomicina. As formas tripomastigotas foram coletadas do supernadante de culturas celulares infectadas.⁶⁷

Culturas de fibroblastos humanos infectados pelo parasita, analisadas para atividade β -galactosidase foram cultivadas em meio RPMI 1640 (do inglês *Roswell Park Memorial Institute*) sem vermelho de fenol, suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina e estreptomicina.

3.8 Ensaios *in vitro* contra a Forma Intracelular Amastigosta de *T. cruzi*

Os ensaios foram realizados em placas de cultura de tecidos de 96 poços (Becton Dickinson). Fibroblastos humanos foram semeados a 2×10^3 células por poço em 80 μ L de meio de cultura RPMI 1640 sem vermelho de fenol e incubados *overnight*. No dia seguinte, tripomastigotas expressando β -galactosidase (cepa Tulahuen lacZ) foram adicionados a $1,0 \times 10^4$ por poço em 20 μ L de meio RPMI 1640 sem vermelho de fenol. Após 24 h, os compostos sintéticos, inibidores da cruzaina, foram adicionados em diluições seriadas de 50 μ L, cobrindo uma faixa de 100 a 0,1 μ M. Cada concentração de composto foi avaliada em duplicata. As soluções estoque foram preparadas em DMSO e diluídas em RPMI 1640 sem vermelho de fenol. Após 72 h de incubação, as placas foram inspecionadas em um microscópio invertido para assegurar o crescimento dos controles e esterilidade das culturas. Em seguida, 50 μ L do substrato, contendo CPRG e Nonidet P-40 (concentração final de 0,1%), foram adicionados a cada um dos poços. Parasitas viáveis apresentam atividade β -galactosidase e são capazes de metabolizar o substrato adicionado, tornando o meio de amarelo para vermelho.

Afim de quantificar essa atividade remanescente após a incubação com os compostos teste, as culturas foram submetidas a leitura em espectrofotômetro com leitor de placas

automático utilizando-se um comprimento de onda de 570 nm. Os dados obtidos foram transferidos para o *software* SigmaPlot para determinação dos valores de IC₅₀. O fármaco benzonidazol (**BZ**) foi utilizado como controle positivo neste ensaio e culturas de parasitas não submetidas à incubação com os compostos teste foram utilizadas como controle negativo.

3.9 Ensaios de Citotoxicidade em Fibroblastos Humanos HFF1

A citotoxicidade dos compostos contra a linhagem celular humana utilizada como célula hospedeira para a determinação da potência dos compostos teste contra o *T. cruzi* foi avaliada pelo método MTS.⁶⁸ A linhagem celular de fibroblastos HFF1 foi plaqueada numa concentração de 2×10^3 células por poço, numa placa de cultura de 96 poços (TPPTM) e incubadas *overnight*. Em seguida, sete concentrações (100 – 0,1 µM) de cada composto teste foram adicionadas em triplicata aos poços e as placas foram incubadas por 72 h a 37 °C em uma atmosfera umidificada contendo 5% CO₂. Foram adicionados 20 µL do reagente MTS (CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega) aos poços e a placa foi incubada por mais 4 h a 37 °C.

A absorbância em 490 nm foi medida em espectrofotômetro para acessar a redução do reagente MTS pelas células viáveis. A porcentagem de células inviáveis foi determinada com relação aos poços contendo o controle negativo (DMSO 0,5%). Pelo menos dois experimentos independentes foram realizados para cada composto teste.

3.10 Ensaios *in vivo*

3.10.1 Animais

Para os ensaios *in vivo* foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss, fêmeas com idade entre 28 a 30 dias, pesando entre 25 a 30 g e livres de patógenos, provenientes do Biotério Central da USP - Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (23 ± 2 °C) e de luz (ciclo 12/12 horas) com livre acesso a alimento e água. Todos os experimentos e protocolos experimentais foram conduzidos de acordo com as diretrizes para o uso de animais em pesquisa e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEUA nº 5301080816).

3.10.2 Parasitas

Para estes estudos foram utilizados parasitas na forma tripomastigota das cepas Y de *Trypanosoma cruzi*, coletados de sangue de animais da linhagem *Swiss* infectados em sucessivas passagens e utilizados para a infecção dos modelos experimentais *in vivo*. Essa cepa originalmente foi isolada de um paciente na fase aguda da doença de Chagas por Pereira de Freitas, em 1950 em Marília – São Paulo e posteriormente estudada e descrita por Silva e Nussenzweig em 1953.⁶⁹ Esta cepa é considerada parcialmente resistente ao tratamento por benzonidazol e produz alto nível de parasitemia, com pico entre o 7º e 8º dia de infecção. Essa linhagem causa a mortalidade de cerca de 100 % dos animais infectados entre o 12º e 20º dia após a infecção.⁷⁰

3.10.3 Fármacos

Para estes estudos foram utilizadas as seguintes soluções:

- i) Veículo: solução de NaCl 0,9 % diluída em água destilada com 10% de DMSO;
- ii) Benzonidazol (**BZ**): 2-nitroimidazol (N-Benzil-2-Nitroimidazol-Acetamido), produzido pela Sigma® e solubilizado em solução salina com 10% DMSO;
- iii) Compostos sintéticos foram solubilizados em solução salina com 10% de DMSO.

3.10.4 Avaliação da Toxicidade dos Compostos: Teste da Máxima Dose Tolerada

O ensaio de toxicidade escolhido para este trabalho foi o da máxima dose tolerada ou MTD (do inglês *Maximum Tolerated Dose*). Este é um teste preconizado para seleção das doses a serem utilizadas nos estudos de eficácia *in vivo*. Trata-se de um ensaio exploratório e apresenta a vantagem de exigir um número reduzido de animais. Com esse protocolo pode-se identificar qual a dose máxima que não produz sinais de toxicidade (NC3Rs LASA, 2009). A toxicidade é avaliada através de parâmetros que incluem alteração de peso corporal, morbidade e mortalidade.

Para esse teste utilizamos a via intraperitoneal (i.p.) que foi uma das vias utilizadas na avaliação da eficácia dos compostos. Esta via promove maior biodisponibilidade dos compostos em relação a administração oral. Grupos distintos (n = 2 fêmeas por grupo) de camundongos (*Mus musculus*) *Swiss* foram tratados com administração única de quatro diferentes doses dos derivados imidazólicos: **1** e **14** (300 mg/kg, 150 mg/kg, 100 mg/kg, 75

mg/kg). Os sinais clínicos, peso e mortalidade foram avaliados nos tempos de 30 minutos, 1h, 2h, 4h, 8h, 24h e diariamente até 7º dia após a administração dos compostos. Durante este período, os camundongos foram avaliados quanto: alteração de pelos, alteração de pele, alteração de mucosas, tremores, convulsões, resposta ao toque, coma, irritabilidade, lacrimação, letargia, piloereção, diarreia, defecação, salivação, micção, os animais que apresentarem respostas agressivas ao toque por um tempo após administração foram considerados como irritados. Esses efeitos foram comparados aos dos animais controle, nos quais foram administradas uma dose de solução salina (0,9 % de NaCl, diluído em água destilada com 10 % de DMSO).

3.10.5 Ensaios *in vivo* contra a Forma Circulante Tripomastigota de *T. cruzi*: Método de Pizzi-Brener

Os camundongos foram inoculados com uma suspensão de 5×10^3 parasitas, na forma tripomastigota sanguínea, da cepa Y do *T. cruzi*. Os animais foram alocados em grupos de 6 camundongos por caixa. Foi utilizado um grupo para cada dose de cada composto testado e dois controles. Um grupo controle foi tratado com **BZ** (controle positivo) e o outro foi tratado com veículo (solução salina, de 0,9% NaCl + 10% - controle negativo).

Os camundongos infectados foram colocados em caixa de retenção, com a cauda para fora, e em seguida a cauda foi massageada no sentido da base para a ponta. Com o auxílio de uma tesoura, cerca de 1 mm da ponta da cauda do animal foi cortada. Então, gotas de sangue da cauda do animal foram coletadas em uma lâmina de esfregão. Em seguida, a cauda foi cauterizada com auxílio de um palito de fósforo. Com uma micropipeta, 5 μ L de sangue da gota foram coletados e transferidos para uma lâmina que foi coberta por uma lamínula (22 x 22 mm), permitindo que o sangue se espalhe por toda a extensão da lamínula, obtendo uma camada homogênea de hemácias. As lâminas foram levadas ao microscópio óptico e foram contados 50 campos microscópicos aleatórios em objetiva de 40x. Em seguida, o número de parasitas por 5 μ L de sangue foi calculado. Os parasitas foram quantificados em número de parasitas por campo observado (parasitas/campo) por toda a área da lamínula.^{67, 71}

A investigação da presença do parasita foi realizada diariamente, pelo exame de sangue a fresco, como descrito acima. A detecção do parasita nos animais infectados com a cepa Y ocorreu no 4º dia após a inoculação. O tratamento começou logo após a identificação do parasita no sangue (5º dia). Para tanto, os grupos distintos foram tratados pela via i.p. com doses de 100 mg/kg de benzonidazol, 100 mg/kg de cada um dos compostos ou igual volume

de solução salina, para o grupo controle, durante 7 dias. A parasitemia dos animais foi verificada diariamente até o 10º dia após o início do tratamento por exame de sangue a fresco. Para a verificação da parasitemia o sangue dos animais foi coletado da veia da cauda e o número de parasitos foi determinado pelo método de Pizzi-Brener, como descrito acima. A taxa de mortalidade foi expressa pela porcentagem cumulativa de mortes no período de 10 dias após o início do tratamento. A eficácia das moléculas foi determinada utilizando os parâmetros: (i) supressão do pico da parasitemia; (ii) nível de parasitemia após o tratamento, (iii) taxa de sobrevida dos animais.⁶⁷

3.10.6 Análise Estatística

Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Os dados foram analisados por ANOVA Bifatorial de medidas repetidas considerando os fatores tratamento e tempo(curva de parasitemia). Ou monofatorial considerando o fator tratamento (dia do pico). Quando os valores de ANOVA mostraram-se significativos ($p < 0,05$), a análise foi seguida pelo teste F para contraste entre os pares de média. A curva de sobrevida foi analisada pelo teste Qui-quadrado.

Capítulo 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Breve Histórico

Em 2012, uma nova diversidade química para inibidores da enzima cruzaína foi identificada em nosso laboratório. Trata-se de uma classe de derivados imidazólicos, sendo que um dos compostos foi utilizado como ponto de partida para este trabalho de doutorado. Esse composto *hit* foi identificado através de um processo de triagem virtual,⁶³ onde foram utilizadas duas bases da ZINC.⁷²⁻⁷³ A primeira base com 3.409.091 milhões de compostos, apresentando características líder-similar (*lead-like*): $\text{clog } P < 3,5$; massa molar < 350 g/mol; e ligações rotacionáveis ≤ 7 .⁷⁴ A segunda, com cerca de 450.000 compostos, apresentando características fragmento-similar (*fragment-like*): $\text{clog } P < 2,5$; massa molar < 250 g/mol; e ligações rotacionáveis ≤ 5 .⁷⁵ No processo de triagem virtual foram utilizados 3 diferentes algoritmos de docagem (Figura 18). No fim desse trabalho, 18 compostos selecionados dessas duas bases foram adquiridos e avaliados experimentalmente contra a cruzaína, levando a caracterização do composto utilizado como modelo nessa tese de doutorado (Figura 19).

Figura 18 - Estratégia utilizada para a obtenção do composto *hit* (1).
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 19 - Diversidade química testada frente a enzima cruzafina e porcentagem de inibição frente a enzima utilizando a concentração de 100 μM . Em destaque o composto que inibiu totalmente a atividade enzimática, um derivado imidazólico que foi usado como modelo em nosso trabalho de doutorado.

Fonte: Adaptada de SOUZA.⁶³

4.2 Modelagem Molecular e Atividade Biológica dos Derivados do Composto *hit* (1)

O composto *hit* 1, um potente derivado imidazólico (Figura 20) com $\text{IC}_{50} = 1,00 \mu\text{M}$ e $K_i = 120 \text{ nM}$, foi investigado detalhadamente apresentando um mecanismo de inibição reversível do tipo competitivo (Figura 21).

1 $IC_{50} = 1 \mu M$ $K_i = 120 \text{ nM}$ Figura 20 - Composto *hit* **1**.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 21 - Gráfico duplo-recíproco para o composto **1**. Concentrações de inibidor: controle - zero (●); 0,3 μM (○); 0,6 μM (▼); 1,25 μM (△) e 2,50 μM (■).

Fonte: Elaborada pela autora.

Além de possuir elevada potência e afinidade, o composto **1** apresentou significativa ação contra o *T. cruzi* ($IC_{50} = 1,1 \mu M$), sendo mais potente que o benzonidazol (**BZ** - $IC_{50} = 3,4 \mu M$), utilizado como controle positivo. O composto **1** também apresentou atividade *in vivo*, resultado que será discutido no item **4.6** deste capítulo.

Neste trabalho de tese, o objetivo foi o de explorar novos inibidores que atuassem pelo mecanismo de inibição do composto **1**. O trabalho de modificação molecular em diferentes regiões do composto levou a novos compostos e ao estabelecimento de relações entre a estrutura e atividade (SAR).

Os resultados dos estudos de docagem molecular com o programa GOLD mostram a conformação adotada pelo composto na cavidade de ligação do substrato. As interações

observadas entre o composto **1** e os resíduos Gln19, Asp161, His162 e Trp184 da cruzaina (Figura 22) são normalmente observadas em estruturas cristalográficas da cruzaina em complexo com diversos ligantes.

Figura 22 - Interação do composto *hit 1* e o sítio ativo da cruzaina, predito pelo programa GOLD. Ligações de hidrogênio são mostradas como linhas pontilhadas coloridas de laranja e as interações dipolo-dipolo como linhas pontilhadas em ciano. Os resíduos envolvidos nestas interações foram destacados e representados como *sticks*. Figura preparada com Pymol.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os 25 complexos cruzaina-ligante, atualmente disponíveis no PDB forneceram informações estruturais e serviram de guia para os estudos de docagem molecular. Diversas estratégias de modificação molecular foram exploradas com o objetivo de gerar uma série de derivados do composto **1** com propriedades otimizadas. A síntese dos compostos permitiu explorar o impacto das modificações no anel fenila, no espaçador (cadeia alifática entre os dois sistemas de anéis) e no imidazol.

As investigações incluíram substituições do anel aromático e do grupo metila. Os resultados indicam que modificações no anel aromático, que ocupa o bolsão S2 da cruzaina foram favoráveis (Tabela 1).

Tabela 1 - Estruturas e atividade inibitória dos compostos **1-16** contra a enzima cruzafina.

Composto	Estrutura 2D	% Inibição (100 μ M) ^a	IC ₅₀ (μ M) ^b
1		100	1,0 $\pm$ 0,1
2		100	1,7 $\pm$ 0,2
3		100	0,57 $\pm$ 0,03
4		100	0,41 $\pm$ 0,02
5		100	2,8 $\pm$ 0,6
6		100	3,1 $\pm$ 0,9
7		100	0,36 $\pm$ 0,07
8		100	2,5 $\pm$ 0,5
9		100	0,5 $\pm$ 0,1
10		100	0,50 $\pm$ 0,08
11		100	0,60 $\pm$ 0,06

(continua)

(continuação)

Tabela 1 - Estruturas e atividade inibitória dos compostos 1-16 contra a enzima cruzafina.

Composto	Estrutura 2D	% Inibição (100 μ M) ^a	IC ₅₀ (μ M) ^b
12		100	1,8 $\pm$ 0,3
13		100	1,80 $\pm$ 0,01
14		100	0,12 $\pm$ 0,02
15		100	0,66 $\pm$ 0,01
16		100	3,0 $\pm$ 0,2

^aOs valores de % de inibição da tabela são referentes a média de 3 medidas experimentais. ^bOs valores de IC₅₀ foram determinados independentemente pelas medidas em triplicada de pelo menos 6 concentrações diferentes de inibidor. Foram realizados 2-3 experimentos independentes.

Fonte: Elaborada pela autora.

A substituição da metila por cloro e bromo, na posição *meta*, resultou em compostos mais potentes, **3** (IC₅₀ 0,57 $\pm$ 0,03 μ M) e **4** (IC₅₀ 0,41 $\pm$ 0,02 μ M, para o bromo), respectivamente. O composto **7** (IC₅₀ 0,36 $\pm$ 0,07 μ M), que possui um iodo no lugar da metila, foi cerca de três vezes mais potente que o composto *hit*. Entre os halogênios, substituídos em *meta*, a exceção foi o composto **2** (IC₅₀ 1,7 $\pm$ 0,2 μ M), que possui um flúor e exibiu modesta diminuição da potência quando comparado ao composto *hit* **1** (IC₅₀ = 1,0 $\pm$ 0,1 μ M). Estes resultados sugerem que o iodo na posição *meta* do anel possui um volume ideal para a ocupação do subsítio S2.

Quando o bromo está presente nas posições *orto* e *para* da fenila, observou-se uma diminuição de aproximadamente 3 vezes da potência, **5** (IC₅₀ = 2,8 $\pm$ 0,6 μ M) e **6** (IC₅₀ = 3,1 $\pm$ 0,9 μ M). Assim, a posição *meta* foi a mais favorável para o bromo. A substituição com flúor em *meta* e *para*, resultou em um composto com modesta diminuição da potência (**12**,

$IC_{50} = 1,8 \pm 0,3 \mu M$). Modificações adicionais por grupos retiradores de elétrons, como o NO_2 (**9**, $IC_{50} = 0,5 \pm 0,1 \mu M$), CF_3 em *meta* (**10**, $IC_{50} = 0,50 \pm 0,08 \mu M$) e CF_3 em *para* (**11**, $IC_{50} = 0,60 \pm 0,06 \mu M$), resultaram em inibidores mais potentes que o composto **1**. Por outro lado, a presença de uma nitrila (CN) levou a uma modesta diminuição da potência (**13**, $IC_{50} = 1,80 \pm 0,01 \mu M$), e a presença do grupo metoxi a uma diminuição de 2,5 vezes (**8**, $IC_{50} = 2,5 \pm 0,5 \mu M$).

Substituições por grupos mais volumosos levaram geralmente a derivados mais potentes. Uma exceção foi a 2-bromopiridina (**16**, $IC_{50} = 3,0 \pm 0,2 \mu M$), 3 vezes menos potente que o composto *hit*. O derivado mais potente da série, 1-Br-2-naftila (**14**, $IC_{50} = 0,12 \pm 0,02 \mu M$), apresentou potência 8 vezes superior à do composto **1**. O derivado **15** ($IC_{50} = 0,66 \pm 0,01 \mu M$) foi aproximadamente 2 vezes mais potente que **1**. Estes grupos mais volumosos tendem a ocupar melhor o subsítio S2, contribuindo diretamente nos valores de potência destes compostos.

As investigações subsequentes se concentraram na avaliação do impacto de modificações no espaçador entre a fenila (ou naftila) e o imidazol. Os resultados são apresentados na Tabela 2. Inicialmente, a análise do modo de interação do composto *hit* na cavidade de ligação da cruzaina (Figura 22), mostrou que seria possível uma interação entre a carbonila e o resíduo Gly66. Essa interação é normalmente observada nos complexos cristalográficos descritos. Assim, foram planejados compostos possuindo uma carbonila no espaçador com o objetivo de explorar interações moleculares com o resíduo Gly66 (localizado no subsítio S3 da cruzaina).

Os resultados da docagem molecular dos compostos planejados mostraram uma possível ligação de hidrogênio entre o átomo de nitrogênio da cadeia principal da Gly66 e a carbonila das moléculas propostas. Além desta interação, o oxigênio do espaçador pode fazer uma interação dipolo-dipolo com o átomo de nitrogênio da cadeia principal da Gly163.

As novas moléculas planejadas foram sintetizadas e testadas contra a cruzaina. O composto **17** ($IC_{50} = 2,0 \pm 0,1 \mu M$), que possui um éster no espaçador, exibiu uma diminuição da potência em relação ao composto **1** (Figura 23). O composto **18** ($IC_{50} = 0,59 \pm 0,10 \mu M$), contendo um metileno entre o anel aromático e éster, e tendo suprimida a metila em *meta* (composto **1**), apresentou um aumento da potência em relação ao composto **1** (Figura 24).

Figura 23 - Interação da carbonila do composto **17** com o resíduo Gly66, formando uma ligação de hidrogênio em destaque. Ligações de hidrogênio são mostradas como linhas pontilhadas coloridas de laranja e as interações dipolo-dipolo como linhas pontilhadas em ciano.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 24 - Interação da carbonila de **18** com o resíduo Gly66, com a ligação de hidrogênio em destaque. Ligações de hidrogênio são mostradas como linhas pontilhadas coloridas em laranja e as interações dipolo-dipolo como linhas pontilhadas em ciano.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados obtidos indicam que a presença de uma carbonila leva a diminuição da potência (**17**, $IC_{50} = 2,0 \pm 0,1 \mu M$), o que pode estar relacionado com efeitos eletrônicos, o que em parte é atenuado com um metileno no espaçador (entre o benzeno e o éster), no caso do composto **18** ($IC_{50} = 0,6 \pm 0,1 \mu M$), quase 2 vezes mais potente que **1**.

Tabela 2 - Estruturas e atividade inibitória dos compostos **17-23** contra a enzima cruzaína.

Composto	Estrutura 2D	% Inibição (100 μ M) ^a	IC ₅₀ (μ M) ^b
17		100	2,0 $\pm$ 0,1
18		100	0,6 $\pm$ 0,1
19		100	0,525 $\pm$ 0,005
20		100	6,2 $\pm$ 0,9
21		100	5,10 $\pm$ 0,06
22		9	-
23		5	-

^aOs valores de % de inibição da tabela são referentes a média de 3 medidas experimentais. ^bOs valores de IC₅₀ foram determinados independentemente pelas medidas em triplicada de pelo menos 6 concentrações diferentes de inibidor. Foram realizados 2-3 experimentos independentes.

Fonte: Elaborada pela autora.

Outra estratégia importante de modificação molecular se concentrou na substituição do átomo de oxigênio (fenóxi) dos compostos **1** e **17** por um nitrogênio, buscando obter derivados com grupos amina e amida, representados na Figura 25. No entanto, a síntese destes derivados (**A** e **B**) não foi concluída com sucesso. Os produtos destas reações são apresentados na Tabela 3. O composto **24** apresentou baixa inibição da enzima e, portanto,

não foi possível determinar o seu valor de IC_{50} . O composto **25** ($IC_{50} = 1,8 \pm 0,2 \mu M$) apresentou uma modesta diminuição na potência em relação ao composto *hit*, provavelmente, devido ao seu menor padrão de reconhecimento molecular. No entanto, o composto **25**, um fragmento molecular de 174,2 Da, mostrou-se muito interessante para futuros trabalhos de otimização molecular.

Figura 25 - Propostas para a inclusão de substituição dos átomos de oxigênio do grupo fenóxi dos inibidores **1** e **17** por um grupo amina (A) e amida (B).

Fonte: Elaborada pela autora.

Uma alternativa para esses compostos (Figura 25) foi alcançada com a síntese de aminas e amidas terciárias (Tabela 2). Verificou-se um aumento da potência para a amina **19** ($IC_{50} = 0,52 \pm 0,01 \mu M$) e uma diminuição de mais de 6 vezes para a amida **20** ($IC_{50} = 6,24 \pm 0,90 \mu M$). Para o composto **22**, observou-se grande perda na atividade inibitória, que pode estar relacionada diretamente com a diminuição do tamanho do espaçador e a impossibilidade de uma ligação de hidrogênio com o resíduo Asp161. De maneira similar, o resultado observado para o composto **23**, no qual o N foi metilado, pode estar relacionado com a perda dessa ligação de hidrogênio. Portanto, a presença de um doador de ligação de hidrogênio nessa porção da molécula é essencial para a inibição da cruzaina.

O composto **21** ($IC_{50} = 5,10 \pm 0,06 \mu M$) apresenta boa atividade inibitória, mesmo que relativamente menor do que **1**, sugerindo a importância do fragmento carboxamida-imidazol e de seu papel como doador de ligação de hidrogênio.

Tabela 3 - Estruturas e atividade inibitória dos compostos **24** e **25** contra a enzima cruzaina.

Composto	Estrutura 2D	% Inibição (100 μ M) ^a	IC ₅₀ (μ M) ^b
24		17	-
25		100	1,8 $\pm$ 0,2

^aOs valores de % de inibição da tabela são referentes a média de 3 medidas experimentais. ^bOs valores de IC₅₀ foram determinados independentemente pelas medidas em triplicada de pelo menos 6 concentrações diferentes de inibidor. Foram realizados 2-3 experimentos independentes.

Fonte: Elaborada pela autora.

A avaliação da importância do grupo imidazol também foi realizada. Novos derivados foram planejados para explorar interações com o subsítio S1' da cruzaina. Dos compostos sintetizados e avaliados, somente o composto **26** apresentou inibição > 50 % em concentração única. O valor da potência foi determinado para esse inibidor (IC₅₀ = 77 $\pm$ 8 μ M) (Tabela 4). Os compostos **27-33**, não apresentaram atividade inibitória, mesmo em concentrações de até 250 μ M. Portanto, o imidazol parece essencial para a inibição da cruzaina nesta série de derivados.

Tabela 4 - Estruturas e atividade inibitória dos compostos **26-33** contra a enzima cruzafina.

Composto	Estrutura 2D	% Inibição (100 μ M) ^a	IC ₅₀ (μ M) ^b
26		51	77 $\pm$ 8
27		2	-
28		2	-
29		4	-
30		8	-
31		17	-
32		7	-
33		9	-

^aOs valores de % de inibição da tabela são referentes a média de 3 medidas experimentais. ^bOs valores de IC₅₀ foram determinados independentemente pelas medidas em triplicada de pelo menos 6 concentrações diferentes de inibidor. Foram realizados 2-3 experimentos independentes.

Fonte: Elaborada pela autora.

O planejamento molecular foi também realizado por meio de modificações no espaçador em conjunto com a substituição do anel aromático. Observa-se que a carbonila do

éster está presente, ligado diretamente, ao anel aromático no espaçador dos compostos **34-37** (Tabela 5).

Tabela 5 - Derivados com modificações no anel aromático e no grupo espaçador.

Composto	Estrutura 2D	% Inibição (100 μ M) ^a	IC ₅₀ (μ M) ^b
34		100	0,70 $\pm$ 0,07
35		100	4,8 $\pm$ 0,3
36		100	3,23 $\pm$ 0,66
37		100	0,75 $\pm$ 0,04

^aOs valores de % de inibição da tabela são referentes a média de 3 medidas experimentais. ^bOs valores de IC₅₀ foram determinados independentemente pelas medidas em triplicada de pelo menos 6 concentrações diferentes de inibidor. Foram realizados 2-3 experimentos independentes.

Fonte: Elaborada pela autora.

O composto **34** (IC₅₀ = 0,70 $\pm$ 0,07 μ M), que além da modificação do espaçador, possui um clorobenzeno, apresentou uma potência maior do que **1**. Por outro lado, uma sensível diminuição da potência foi observada na presença dos heterociclos *N*-metilpirazol (**35**, IC₅₀ = 4,8 $\pm$ 0,3 μ M), e 3-metilfurano (**36**, IC₅₀ = 3,23 $\pm$ 0,66 μ M). O composto **37** (IC₅₀ = 0,75 $\pm$ 0,04 μ M), com a presença de 1-bromonaftaleno, embora mais potente do que o composto *hit*, foi menos potente quando comparado ao composto **14**, que possui o mesmo núcleo naftaleno na ocupação do S2 da cruzaina. Por fim, foi ainda explorada a substituição do imidazol por um núcleo piridínico (**38**) e benzimidazólico (**39**), com a presença de uma ureia no espaçador. Essas modificações resultaram em compostos inativos.

Tabela 6 - Derivados com modificações no espaçador e no imidazol.

Composto	Estrutura 2D	% Inibição (100 μ M) ^a	IC ₅₀ (μ M) ^b
38		9	-
39		33	-

^aOs valores de % de inibição da tabela são referentes a média de 3 medidas experimentais. ^bOs valores de IC₅₀ foram determinados independentemente pelas medidas em triplicada de pelo menos 6 concentrações diferentes de inibidor. Foram realizados 2-3 experimentos independentes.

Fonte: Elaborada pela autora.

Levando em conta os resultados obtidos, um esquema de SAR foi criado para a série de derivados do composto *hit* (Figura 26).

Figura 26 - Esquema de SAR para os derivados de **1** contra a enzima cruzafina.

Fonte: Elaborada pela autora.

As modificações no anel aromático são favoráveis quando grupos mais volumosos estão presentes. Destaque para o composto **14**, inibidor mais potente desta série. A substituição da metila por halogênios resulta em compostos com maior potência, com exceção do flúor (que apresentou potência similar ao composto *hit*). As modificações no espaçador são

favoráveis quando temos a presença de uma amina no lugar do oxigênio (do fenóxi). A presença de uma carbonila (originando um éster) somente foi favorável na presença de um metileno no espaçador. Finalmente, o grupo imidazol foi essencial para a potência dos inibidores nessa série estudada.

Os resultados promissores obtidos levaram à realização de experimentos para a determinação do mecanismo de inibição dos compostos que apresentaram maior potência contra a cruzaina. A estratégia de SBDD empregada neste trabalho tinha como objetivo a identificação de inibidores do tipo competitivo. O perfil característico de inibidores competitivos é observado através de um gráfico denominado *Lineweaver-Burk*, ou duplo-recíproco, que é obtido por meio de medidas de v_0 (velocidade inicial) para diferentes concentrações de substrato ($[S]$), variando-se as concentrações de inibidor ($[I]$). Neste caso, as intersecções com o eixo y (valores recíprocos de v_0) fornecem valores de velocidade máxima ($1/V_{\max}$), que não se alteram na presença de inibidores competitivos. Os interceptos com o eixo x (valores recíprocos de $[S]$) fornecem os valores de K_M^{app} (K_M aparente, $-1/K_M$), que aumentam quando a concentração de inibidores do tipo competitivo é acrescida.

Com base no mecanismo de inibição competitivo do composto *hit*, seria esperado que os derivados otimizados atuassem pelo mesmo mecanismo. O resultado da avaliação dos compostos **7**, **14**, **18** e **37** é mostrado na Figura 27, indicando um mecanismo do tipo competitivo. A curva de menor inclinação refere-se à ausência de inibidor, sendo possível determinar o valor de K_M no intercepto em x. Com o aumento de $[I]$, as inclinações se tornam mais acentuadas, obtendo-se valores de K_M^{app} cada vez maiores, como pode ser observado no eixo x. Neste caso (inibidores competitivos), os valores de $V_{\max}$ não se alteram com diferentes $[I]$.

Esses resultados confirmam o sucesso da estratégia de SBDD empregada neste trabalho. Os inibidores mais potentes desta série se ligam de maneira mútua e exclusiva em relação ao substrato da enzima. Os valores das constantes de afinidade dos inibidores (K_i , constante de equilíbrio para a dissociação do complexo $E \cdot I$) foram determinados com base nos valores de K_M^{app} para a variação de $[I]$.

Figura 27 - Gráficos de Lineweaver-Burk para os compostos: **7**, **14**, **18** e **37**. Concentrações de inibidor: controle – zero (●); 0,2 μ M (○); 0,4 μ M (▼); 0,8 μ M (□) e 1,6 μ M (■).

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3 Avaliação *in vitro* da Atividade dos Derivados Imidazólicos Contra a Forma Amastigota do *T. cruzi*

A potente atividade inibitória contra a cruzaina apresentada por alguns compostos incentivou a avaliação da atividade *in vitro* contra o parasita (Tabela 7). Além do **BZ**, fármaco padrão de referência (controle positivo), foram testados os inibidores mais potentes da cruzaina desta série. O composto *hit* (**1**), foi novamente testado, comprovando sua atividade frente ao parasita.

Tabela 7 - Avaliação biológica de derivados imidazólicos contra o *T. cruzi* (forma amastigota) e culturas celulares de HFF1.

Composto	Estrutura 2D	IC ₅₀ (μM) <i>T. cruzi</i> ^a	IC ₅₀ (μM) HFF1 ^b	IS ^c
1		1,1 ± 0,3	> 100	> 86
2		31 ± 3	> 100	> 3
3		2,3 ± 0,8	> 100	> 42
4		29 ± 1	> 100	> 3
5		2,9 ± 0,4	> 100	> 33
6		2,0 ± 0,3	> 100	> 50
7		17 ± 4	> 100	> 5,8
8		> 100	> 100	ND
9		44 ± 4	> 100	> 2
10		3,4 ± 0,4	> 100	> 29

(continua)

(continuação)

Tabela 7 - Avaliação biológica de derivados imidazólicos contra o *T. cruzi* (forma amastigota) e culturas celulares de HFF1.

Composto	Estrutura 2D	IC ₅₀ (μM) <i>T. cruzi</i> ^a	IC ₅₀ (μM) HFF1 ^b	IS ^c
11		26,5 ± 0,5	> 100	> 3
12		> 100	> 100	ND
13		39 ± 4	>100	> 2
14		7,5 ± 1,2	> 50	> 6
15		26 ± 1	> 100	> 3
16		17,7 ± 0,7	> 100	> 5
17		1,7 ± 0,5	> 100	> 58
18		13 ± 3	> 100	> 7,7
19		> 100	>100	ND
20		6 ± 1	> 30	> 4

(continua)

(continuação)

Tabela 7 - Avaliação biológica de derivados imidazólicos contra o *T. cruzi* (forma amastigota) e culturas celulares de HFF1.

Composto	Estrutura 2D	IC ₅₀ (μM) <i>T. cruzi</i> ^a	IC ₅₀ (μM) HFF1 ^b	IS ^c
21		1,2 ± 0,2	>100	>77
34		9 ± 1	>100	>10
35		15 ± 2	>100	>6
36		22 ± 3	>100	>4
37		20 ± 3	>100	>5
BZ		3,3 ± 0,6	>100	>30

^aEnsaio de viabilidade de *T. cruzi* (amastigota). Os dados representam as médias ± DP (desvio padrão) de três medidas. ^bEnsaio de citotoxicidade. Os dados representam as médias ± DP de dois experimentos independentes em triplicata. ^cÍndice de seletividade = $IC_{50}^{HFF1} / IC_{50}^{T. cruzi}$.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados obtidos mostram que diversos inibidores da cruzaina possuem atividade tripanocida similar ou mesmo superior em comparação ao **BZ**. Foram testados, inicialmente, 25 compostos em ensaios *in vitro*. Destes, seis apresentaram valores de IC₅₀ menores que o fármaco **BZ**, usado como controle positivo. Os compostos **1** (IC₅₀ = 1,1 ± 0,3 μM), **17** (IC₅₀ = 1,7 ± 0,5 μM) e **21** (IC₅₀ = 1,2 ± 0,2 μM), são até 3 vezes mais potentes que o **BZ** (IC₅₀ = 3,3 ± 0,6 μM) nesse ensaio contra o parasita em sua forma amastigota. Os compostos **3** (IC₅₀ =

$2,3 \pm 0,8 \mu\text{M}$), **5** ($\text{IC}_{50} = 2,9 \pm 0,4 \mu\text{M}$), **6** ($\text{IC}_{50} = 2,0 \pm 0,3 \mu\text{M}$) e **10** ($\text{IC}_{50} = 3,4 \pm 0,4 \mu\text{M}$) apresentam quase a mesma capacidade do **BZ** de inviabilizar a sobrevivência do parasita. Além disso, os compostos **14** ($\text{IC}_{50} = 7,5 \pm 1,2 \mu\text{M}$), **20** ($\text{IC}_{50} = 6 \pm 1 \mu\text{M}$) e **36** ($\text{IC}_{50} = 9 \pm 1 \mu\text{M}$) apresentam valores de IC_{50} inferiores a $10 \mu\text{M}$, considerados compostos potentes frente ao parasita.

Apesar de as modificações no fragmento aromático que interage com o bolsão S2 não afetarem significativamente a potência inibitória contra a enzima cruzaina, algumas modificações foram desfavoráveis em relação à ação tripanocida. Por exemplo, quando o bromo está presente em *meta* (**4**), ocorre uma diminuição na potência frente ao parasita. Com a cruzaina, essa era a posição mais favorável, mas nos ensaios *in vitro* quando o bromo está em *orto* (**5**) ou *para* (**6**), os compostos foram tão potentes quanto o **BZ** (fármaco referência). O composto (**12**) com flúor em *orto* e *para* não exibiu atividade contra o parasita. A presença de um forte retirador de elétrons, como o NO_2 , não resultou em atividade tripanocida. O composto **19**, um dos inibidores mais potentes da cruzaina, também não apresentou atividade anti-*T. cruzi*. Estudos adicionais são requeridos para um melhor entendimento das razões moleculares envolvidas nesses resultados.

4.4 Ensaio de Citotoxicidade em Células HFF1 e Determinação do Índice de Seletividade

O índice de seletividade (IS) foi expresso pela razão entre os valores de IC_{50} do composto para uma linhagem celular humana saudável e para o parasita. Os fibroblastos humanos de mucosa HFF1 foram empregados como linhagem de células humanas saudáveis. Os resultados são mostrados na Tabela 7.

Os derivados imidazólicos desta série apresentaram valores de seletividade considerados bastante satisfatórios. Dentre os compostos mais potentes contra o parasita, cinco apresentaram IS superior ao **BZ**: **1** ($\text{IS} > 86$), **3** ($\text{IS} > 42$), **6** ($\text{IS} > 50$), **17** ($\text{IS} > 58$) e **21** ($\text{IS} > 77$). O composto **5** ($\text{IS} > 33$) apresentou IS semelhante ao **BN** ($\text{IS} > 30$).

Na Figura 28 é possível observar a porcentagem de células vivas para diferentes concentrações dos compostos. As concentrações são aumentadas gradualmente de 11 para $100 \mu\text{M}$. Pode-se observar que mesmo em concentrações altas de composto ($100 \mu\text{M}$), a quantidade de células vivas se manteve praticamente constante. Destacam-se os compostos **1**, **5**, **6**, **17** e **21** que mantiveram uma porcentagem superior de células vivas quando comparados

ao **BZ**. Esse resultado foi muito interessante no que diz respeito a otimização de novos derivados candidatos a fármacos.

Figura 28 - Avaliação da citotoxicidade de compostos representativos da série de derivados imidazólicos. Controles: positivo (doxorrubicina) e negativo (benzonidazol) em células da linhagem HFF1 de fibroblastos humanos saudáveis.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.5 Avaliação *in vivo* da Toxicidade dos Derivados Imidazólicos

Os resultados positivos para esta série de compostos contra a enzima e o parasita conduziram a investigação do perfil da toxicidade *in vivo*. Para isso, alguns compostos representativos da série, que demonstraram atividade contra o *T. cruzi*, foram submetidos a ensaios de toxicidade aguda em camundongos. Cada composto foi avaliado contra dois camundongos *Swiss* fêmeas por via intraperitoneal (i.p.), seguindo protocolo validado pela OMS, como descrito no item 3.10.4. Os compostos **1** e **14** foram aplicados em camundongos saudáveis em diferentes doses (300 mg/kg, 150 mg/kg, 100 mg/kg, 75 mg/kg, via i.p.). Os sinais clínicos, peso e mortalidade foram avaliados nos tempos de 30 min, 1h, 2h, 4h, 8h, 24h e diariamente até o 7º dia após a administração dos compostos. Os resultados de toxicidade aguda são observados na Tabela 8.

Tabela 8 - Resultados do teste de toxicidade aguda em camundongos dos compostos selecionados.

Dose (mg/kg)	Composto/Tempo (dia)	1	2	3	4	5	6	7
300	1	P	P	P	P	P	-	-
	14	P	P	P	P	P	-	-
150	1	P	P	-	-	-	-	-
	14	P	P	P	-	-	-	-
100	1	-	-	-	-	-	-	-
	14	-	-	-	-	-	-	-
75	1	-	-	-	-	-	-	-
	14	-	-	-	-	-	-	-
Controle		-	-	-	-	-	-	-

Ensaio *in vivo* com camundongos *Swiss*. (-) Sem sinais de toxicidade aguda; (P) piloereção; (I) irritabilidade.
 Fonte: Elaborada pela autora.

Durante as primeiras 24 h foi observado piloereção (P) nos animais que receberam as doses mais altas dos compostos (150 e 300 mg/kg). Na sequência, os animais foram observados uma vez ao dia, pelos sete dias consecutivos após a administração dos compostos. No primeiro dia os animais que receberam as doses de 300 e 150 mg/kg dos compostos apresentaram piloereção. Os animais que receberam doses de 300 mg/kg dos três compostos apresentaram piloereção até o 5º dia após a administração do composto. Para a dose de 150 mg/kg, com exceção do composto **14**, os animais apresentaram piloereção até o 2º dia após sua administração. Como observado na Tabela 10, os animais apresentaram apenas irritabilidade e piloereção durante o ensaio de toxicidade, mostrando o baixo nível de toxicidade (via i.p.) destes compostos.

4.6 Avaliação *in vivo* da Atividade dos Derivados Imidazólicos Contra a Forma Tripomastigota do *T. cruzi*

Para os experimentos de avaliação *in vivo* contra o *T. cruzi*, camundongos infectados com a cepa Y foram tratados com uma dose de 100 mg/kg de peso corporal de benzonidazol (**BZ**) e uma dose de 100 mg/kg dos compostos **1** e **14**, por 7 dias pela via intraperitoneal (i.p.). Neste experimento foram avaliadas: (i) supressão do pico da parasitemia; (ii) nível de parasitemia após o tratamento, (iii) taxa de sobrevivência dos animais. A parasitemia é expressa

em número total de parasitas em 5 μ L de sangue, calculo realizado segundo método de Brenner.

Para a curva de parasitemia (Figura 29) a análise de ANOVA indicou interação significativa entre os fatores [$F(3,16) = 5,6$; $p < 0,05$]. A análise pós-ANOVA indicou redução da parasitemia nos grupos **BZ**, **1** e **14** comparados com o grupo veículo nos dias 3, 4 e 5 após o tratamento ($p < 0,05$).

Figura 29 - Parasitemia de animais infectados com *T. cruzi* durante o tratamento com os compostos **1** e **14**. Para controle positivo foi utilizado **BZ** e para controle negativo foi utilizada uma solução salina (0,9% NaCl + 10% DMSO).

Fonte: Elaborada pela autora.

Observando-se apenas o dia do pico (5º dia de tratamento), ANOVA indicou diferença significativa entre os grupos [$F(3,17) = 8,75$; $p < 0,05$], verificamos uma redução da parasitemia nos grupos tratados com BZ, 1 e 14 quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$). O **BZ** foi capaz de reduzir o número de parasitas, no sangue dos animais, próximo a zero. Nesse dia, segundo o método de Brenner, foram contados, em média, 2330 parasitas em 5 μ L de sangue coletado dos animais tratados com salina (veículo), 363/5 μ L parasitas nos animais tratados com o composto **1** e 382/5 μ L parasitas nos animais tratados com o composto **14** (Figura 30).

Figura 30 - Parasitemia, no dia de pico (5º dia de tratamento), dos animais tratados com solução salina (vermelho), com o composto **1** (azul) e com o composto **14** (verde). Para os animais tratados com **BZ** não foi detectado parasitas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Quando esses valores foram expressos em porcentagem, observou-se no 5º dia de tratamento que o **BZ** reduziu aproximadamente 100% a parasitemia dos animais. Os compostos **1** e **14** também reduziram significativamente o nível de parasitemia. O composto **1** reduziu em 85 % a parasitemia e o composto **14** em 84 %, quando comparados aos animais tratados com salina (Figura 31).

Figura 31 - Porcentagem de redução da parasitemia, dos compostos **BZ**, **1** e **14**, no dia de pico da parasitemia (5º dia de tratamento).

Fonte: Elaborada pela autora

Em relação à mortalidade, a análise de Qui-quadrado indicou diferenças nas taxas de sobrevivência entre os grupos ($p < 0,05$). Os animais tratados com os compostos **1** e **14** apresentaram aumento significativo de sobrevivência dos camundongos quando comparados ao grupo controle negativo. A mortalidade dos animais do grupo controle iniciou a partir do 8º dia após a infecção (4º dia de tratamento), sendo que no 11º dia pós-infecção este grupo apresentou 100% de mortalidade. Entre os animais tratados com o composto **1**, o primeiro óbito foi observado no 11º dia pós-infecção. O tratamento com o composto **1** prolongou a sobrevivência dos animais até o 15º dia pós-infecção. Entre os animais tratados com o composto **14**, o primeiro óbito foi observado apenas no 10º dia pós-infecção. O tratamento com o composto **14** prolongou a sobrevivência dos animais até o 15º dia pós-infecção. Os animais tratados com **BZ** apresentaram taxa de sobrevivência de 100% (Figura 32).

Figura 32 - Curva de sobrevivência de animais controles (tratados com salina) ou tratados com 100 mg/kg dos compostos **1** ou **14**. A porcentagem de sobrevivência dos grupos foi observada até o 15º dia após a infecção dos animais. Foi utilizado como controle positivo o fármaco de referência, **BZ**. Como controle negativo, a solução veículo de 0,9% NaCl + 10% DMSO. Os dados representam a porcentagem de animais vivos em cada ponto analisado.

Fonte: Elaborada pela autora.

Assim, pode-se observar que os animais tratados com **BZ** tiveram uma taxa de redução do pico da parasitemia de aproximadamente 100% e preveniu morte nos animais infectados. Para os animais tratados com os compostos **1** e **14** foi observada supressão do pico de parasitemia, redução do nível da parasitemia e diminuição da mortalidade dos camundongos em comparação com o controle negativo (animais tratados com salina).

Capítulo 5

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesta tese de doutorado destacam o sucesso da aplicação de estratégias de SBDD de novos inibidores da enzima cruzaina. A partir de um composto *hit* e do estabelecimento criterioso de seu potencial de otimização, vários derivados foram sintetizados e avaliados. A integração de métodos experimentais e computacionais em química medicinal demonstrou ser uma estratégia útil no processo de otimização de inibidores potentes, com importante ação tripanocida. Vale salientar que as modificações estruturais realizadas no composto *hit* (**1**) promoveram uma maior complementaridade multifuncional com os diferentes subsítios da cruzaina, resultando em uma série inédita de derivados imidazólicos. Entre estes, destaca-se o composto **7**, que apresentou significativa potência e afinidade frente a cruzaina ($IC_{50} = 0,36 \mu M$ e $K_i = 0,06 \mu M$), e que será testado em ensaios *in vivo* na sequência. Além desse, o composto **14**, inibidor da cruzaina mais potente desta série, apresentou atividade *in vitro* e também excelentes resultados nos ensaios *in vivo*, tornando-se o composto líder na continuação dos estudos.

A investigação do subsítio S2 e os estudos de SAR foram de grande interesse no processo de otimização incremental do composto **14**, o inibidor mais potente desta série. A Figura 33 apresenta uma comparação das estruturas dos compostos **1** (*hit*) e **14** (*lead*) no sítio ativo da cruzaina. Pode ser observado que uma melhor ocupação do subsítio S2 levou a uma maior potência inibitória dentro do padrão estrutural estabelecido. Os dois inibidores apresentam significativa atividade anti-*T. cruzi* e alta seletividade (baixa toxicidade *in vivo*). Além disso, ambos reduziram substancialmente a parasitemia *in vivo*. Desta maneira, esta série de inibidores imidazólicos se caracteriza promissora para futura otimização molecular visando o desenvolvimento de candidatos a novos fármacos para a terapia da doença de Chagas.

Figura 33 - Representação do sítio ativo da cruzaina interagindo com os inibidores **1** e **14**, conformações previstas pelo programa GOLD. Representação das estruturas dos inibidores. Valores de potência contra o alvo ($IC_{50}^{cruzaína}$) e o parasita ($IC_{50}^{T. cruzi}$), e citotoxicidade em células de fibroblastos, humanos saudáveis (IC_{50}^{FH}). Porcentagens de redução da parasitemia *in vivo* por via i.p..

Fonte: Elaborada pela autora.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- 1 LOMBARDINO, J. G.; LOWE, J. A. The role of the medicinal chemist in drug discovery--then and now. **Nature Review Drug Discovery**, v. 3, n. 10, p. 853-862, 2004.
- 2 MAYR, L. M.; BOJANIC, D. Novel trends in high-throughput screening. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 9, n. 5, 580-588, 2009.
- 3 LAVECCHIA, A.; DI GIOVANNI, C. Virtual screening strategies in drug discovery: a critical review. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 20, n. 23, p. 2839-60, 2013.
- 4 FERREIRA, R. S.; GLAUCIUS, O.; ANDRICOPULO, A. D. 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.
- 5 DIMITRI, N. An assessment of R&D productivity in the pharmaceutical industry. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, n. 12, p. 683-685, 2011.
- 6 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. 151-85, 2003.
- 7 PROFILE BIOPHARMACEUTICAL RESEARCH INDUSTRY. PhRMA. **Pharmaceutical research and manufacturers of America** 2016. Disponível em: <<http://phrmacdn.connectionsmedia.com/sites/default/files/pdf/biopharmaceuticalindustry-profile.pdf>> Acesso em: 10 jan. 2017.
- 8 LAMATTINA, J. L. The impact of mergers on pharmaceutical R&D. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, p. 559-560, 2011. doi:10.1038/nrd3514.
- 9 COMANOR, W. S.; SCHERER, F. M. Mergers and innovation in the pharmaceutical industry. **Journal of Health Economics**, v. 32, n. 1, p. 106-13, 2013.
- 10 PROFILE BIOPHARMACEUTICAL RESEARCH INDUSTRY. PhRMA. **Pharmaceutical research and manufacturers of America** 2015. Disponível em: <http://phrmacdn.connectionsmedia.com/sites/default/files/pdf/2015_phrma_profile.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2017.
- 11 ANDRICOPULO, A. D.; SALUM, L. B.; ABRAHAM, D. J. Structure-based drug design strategies in medicinal chemistry. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 9, p. 771-790, 2009.
- 12 FERREIRA, R. S. et al. In silico screening strategies for novel inhibitors of parasitic diseases. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 6, n. 5, p. 481-489, 2011.
- 13 KITCHEN, D. B. et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Review Drug Discovery**, v. 3, n. 11, p. 935-949, 2004.
- 14 LEACH, A. R.; SHOICHET, B. K.; PEISHOFF, C. E. Prediction of protein-ligand interactions. docking and scoring: successes and gaps. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 20, p. 5851-5855, 2006.
- 15 JONES, G. et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of Molecular Biology**, v. 267, n. 3, p. 727-748, 1997.

16 PANIGRAHI, S. K.; DESIRAJU, G. R. Strong and weak hydrogen bonds in the protein-ligand interface. **Proteins**, v. 67, n. 1, p. 128-141, 2007.

17 DAVIS, A.; TEAGUE, S. Hydrogen bonding, hydrophobic interactions, and failure of the rigid receptor hypothesis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 38, n. 6, p. 736-749, 1999.

18 BISSANTZ, C.; KUHN, B.; STAHL, M. A medicinal chemist's guide to molecular interactions. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 14, p. 5061-5084, 2010.

19 MINOUX, H.; CHIPOT, C. Cation- π interactions in proteins: can simple models provide an accurate description? **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, n. 44, p. 10366-10372, 1999.

20 CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.gen. n.sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.1, n. 2, p. 159-218, 1909.

21 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases**. 2013. Disponível em: <file:///C:/Users/emp/Downloads/9789241564540_eng.pdf>. Acesso em 23 jan. 2016.

22 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected tropical diseases**. 2015. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/152781/1/9789241564861_eng.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2016..

23 SCHMUNIS, G. The globalization of Chagas disease. **Isbt Science Series**, v. 2, n. 1, p. 6-11, 2007.

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

25 PÉREZ-AYALA, A. et al. Chagas disease in Latin American migrants: a Spanish challenge. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 7, p. 1108-1113, 2011.

26 BASILE, L. et al. Chagas disease in European countries: the challenge of a surveillance system, **Euro Surveill**, v. 16, n. 37, p. 18, 2011.

27 BERN, C. et al. Trypanosoma cruzi and Chagas' disease in the United States. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 655-681, 2011.

28 FERREIRA, I. L.; SILVA, T. P. Transmission elimination of Chagas' disease by *Triatoma infestans* in Brazil: an historical fact. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 5, p. 507-509, 2006.

29 MASSAD, E. The elimination of Chagas' disease from Brazil. **Epidemiology and Infection**, v. 136, n. 9, p. 1153-1164, 2008.

30 PETHERICK, A. Country by country. **Nature**, v. 465, n. 7301, p. S10-S11, 2010.

- 31 XAVIER, S. C. et al. Distantiae transmission of *Trypanosoma cruzi*: a new epidemiological feature of acute Chagas disease in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 8, n. 5, p. e2878, 2014.
- 32 MARTINS-MELO, F. R. et al. Prevalence of Chagas disease in pregnant women and congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Brazil: a systematic review and meta-analysis. **Tropical Medicine and International Health**, v. 19, n. 8, p. 943-957 2014.
- 33 IMAI, K. et al. Mother-to-child transmission of congenital Chagas disease, Japan. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v. 20, n. 1, p. 146-148, 2014.
- 34 KINOSHITA-YANAGA, A. T. et al. Accidental infection by *Trypanosoma cruzi* follow-up by the polymerase chain reaction: case report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 51, n. 5, p. 295-298, 2009.
- 35 HOARE, C. A.; WALLACE, F. G. Developmental stages of trypanosomatid flagellates - a new terminology. **Nature**, v. 212, p. 1385, 1966. doi:10.1038/2121385a0.
- 36 TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 5-6, p. 472-481, 2001.
- 37 DIAS, L. C. et al. Chemotherapy of chagas' disease: state of the art and perspectives for the development of new drugs. **Quimica Nova**, v. 32, n. 9, p. 2444-2457, 2009.
- 38 RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, p. 1388-1402, 2010. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60061-X.
- 39 NUNES, M. C. et al. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 9, p. 767-776, 2013.
- 40 LEE, B. Y. et al. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. **Lancet Infect Diseases**, v. 13, n. 4, p. 342-348, 2013.
- 41 COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3-24, 2002.
- 42 SOEIRO, M. N. C.; DE CASTRO, S. L. *Trypanosoma cruzi* targets for new chemotherapeutic approaches. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 13, n. 1, p. 105-121, 2008. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60061-X.
- 43 SAJID, M.; MCKERROW, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 120, n. 1, p. 1-21, 2002.
- 44 RAO, M. B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.
- 45 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. 157-162, 1967.
- 46 TURK, B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 9, p. 785-799, 2006.

- 47 CAZZULO, J.; STOKA, V.; TURK, V. The major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*: a valid target for chemotherapy of Chagas disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 7, n. 12, p. 1143-1156, 2001.
- 48 SAJID, M. et al. Cruzain : the path from target validation to the clinic. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 712, p. 100-115, 2011. doi: 10.1007/978-1-4419-8414-2_7.
- 49 DOYLE, P. S. et al. The *Trypanosoma cruzi* protease cruzain mediates immune evasion. **Plos Pathogens**, v. 7, n. 9, p. 11, 2011.
- 50 MCGRATH, M. E. et al. The crystal structure of cruzain: a therapeutic target for Chagas' disease. **Journal of Molecular Biology**, v. 247, n. 2, p. 251-259, Mar. 1995.
- 51 DOYLE, P. S. et al. A cysteine protease inhibitor cures Chagas' disease in an immunodeficient-mouse model of infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 11, p. 3932-3939, Nov. 2007.
- 52 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. 1763-1773, 2010.
- 53 MOTT, B. T. et al. Identification and optimization of inhibitors of Trypanosomal cysteine proteases: cruzain, rhodesain, and TbCatB. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 1, p. 52-60, 2010.
- 54 BRINEN, L. S. et al. A target within the target: probing cruzain's P1' site to define structural determinants for the Chagas' disease protease. **Structure**, v. 8, n. 8, p. 831-840, 2000.
- 55 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, e8252010.
- 56 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. 4891-4905, 2010.
- 57 GILLMOR, S. A.; CRAIK, C. S.; FLETTERICK, R. J. Structural determinants of specificity in the cysteine protease cruzain. **Protein Science**, v. 6, n. 8, p. 1603-11, 1997.
- 58 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. 25697-25703, 2009.
- 59 HUANG, L.; BRINEN, L. S.; ELLMAN, J. A. Crystal structures of reversible ketone-based inhibitors of the cysteine protease cruzain. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 1, p. 21-29, 2003.
- 60 BARR, S. C. et al. A cysteine protease inhibitor protects dogs from cardiac damage during infection by *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 12, p. 5160-5161, 2005.
- 61 CHOY, J. W. et al. Chemical-biological characterization of a cruzain inhibitor reveals a second target and a mammalian off-target. **Beilstein Journal Organic Chemistry**, v. 9, p. 15-25, 2013. doi: 10.3762/bjoc.9.3.

- 62 FERREIRA, R. S. et al. Synthesis, biological evaluation, and structure-activity relationships of potent noncovalent and nonpeptidic cruzain inhibitors as anti-*Trypanosoma cruzi* agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 6, p. 2380-2392, 2014.
- 63 SOUZA, M. L. **Identificação de novos inibidores da enzima cruzaina de *Trypanosoma cruzi* candidatos a fármacos contra a doença de Chagas**. 2012. 84 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.
- 64 MLADENOVIC, M. et al. On the origin of the stabilization of the zwitterionic resting state of cysteine proteases: a theoretical study. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 27, p. 8696-8705, 2008.
- 65 GERSHKOVICH, A. A.; KHOLODOVYCH, V. V. Fluorogenic substrates for proteases based on intramolecular fluorescence energy transfer (IFETS). **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 33, n. 3, p. 135-162, 1996.
- 66 FENG, B. Y.; SHOICHET, B. K. A detergent-based assay for the detection of promiscuous inhibitors. **Nature Protocols**, v. 1, n. 2, p. 550-553, 2006.
- 67 ROMANHA, A. J. et al. In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 233-238, 2010.
- 68 BARLTROP, J. A. et al. 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 1, n. 11, p. 611-614, 1991.
- 69 SILVA, L. ; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folia Clinica et Biologica**, v. 20, p. 191-208, 1953.
- 70 FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene**, v. 81, n. 5, p. 755-759, 1987.
- 71 BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 4, p. 389-396, 1962.
- 72 IRWIN, J.; SHOICHET, B. ZINC - A free database of commercially available compounds for virtual screening. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 45, n. 1, p. 177-182, 2005.
- 73 IRWIN, J. J. et al. ZINC: a free tool to discover chemistry for biology. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, n. 7, p. 1757-1768, 2012.
- 74 TEAGUE, S. J. et al. The design of leadlike combinatorial libraries. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 38, n. 24, p. 3743-3748, 1999.
- 75 CARR, R. A. E. et al. Fragment-based lead discovery: leads by design. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 14, p. 987-992, 2005.

76 CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **The protozoan parasite:** life cycle. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>>. Acesso em: 23 jan. 2016.

77 KELLENBERGER, E. et al. Comparative evaluation of eight docking tools for docking and virtual screening accuracy. **Proteins**, v. 57, n. 2, p. 225-242, 2004.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Planejamento de inibidores da enzima cruzaina de *Trypanosoma cruzi* candidatos a fármacos contra a doença de Chagas", protocolada sob o CEUA nº 5301080816, sob a responsabilidade de **Mariana Laureano de Souza e equipe; Prof. Dr. Fábio Cardoso Cruz** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA/UNIFESP) na reunião de 21/10/2016.

We certify that the proposal "", utilizing 136 Heterogenics mice (136 females), protocol number CEUA 5301080816, under the responsibility of **Mariana Laureano de Souza and team; Prof. Dr. Fábio Cardoso Cruz** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Paulo (CEUA/UNIFESP) in the meeting of 10/21/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **Novembr** a **agosto/**

Área: **Instituto de Física de São Carlos**

Origem: **CEDEME - Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **4 a 4 semanas**

N: **136**

Linhagem: **Suíços**

Peso: **20 a 20 g**

Resumo: 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. O arsenal terapêutico contra a doença é bastante limitado e insuficiente em todos os aspectos clínicos. Visando o desenvolvimento de novos agentes antichagásicos, diversas proteínas do parasita foram validadas como alvos terapêuticos. A enzima cruzaina, uma cisteína-protease envolvida em todos os estágios de desenvolvimento e diferenciação do *Trypanosoma cruzi*, foi selecionada para os nossos estudos. Um método bastante utilizado na identificação e otimização de inibidores enzimáticos é o planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor (Structure Based Drug Design - SBDD). Esta metodologia engloba diversas técnicas computacionais que utilizam estruturas cristalográficas de proteínas alvo, disponíveis no Protein Data Bank - PDB, para o planejamento racional de ligantes. Entre as técnicas modernas utilizadas, destacamos a triagem virtual, que possibilita identificar e selecionar novas moléculas candidatas a inibidores a partir de grandes bases de dados de compostos. As estruturas da cruzaina em complexo com ligantes que estão disponíveis no PDB permitiram a aplicação de métodos de SBDD na seleção de uma nova série de candidatos a inibidores da enzima alvo. Os compostos selecionados e otimizados serão avaliados em ensaios bioquímicos padrões para a determinação de potência, afinidade e do mecanismo de ação enzimático. Além de serem testados em ensaios *in vivo*. ANIMAIS Serão utilizados: 136 camundongos heterogênicos Suíços, fêmeas, 20 gramas, 4 semanas Procedência: Centro De Desenvolvimento De Modelos Experimentais Para Biologia E Medicina - CEDEME. Manutenção: Biotério de manutenção Leal Prado , EPM, UNIFESP Cronograma do estudo, início previsto para: Novembro/2016 com término previsto para: agosto/2018

Local do experimento:

São Paulo, 15 de dezembro de 2016

Prof. Dra. Monica Levy Andersen
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dra. Tatiana Helfenstein
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo