

Fabiana Rosini

**Determinação da Assinatura
Termodinâmica de Inibidores da
Cisteíno Protease Cruzaina**

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

Área de Concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientador: Professor Dr. Carlos Alberto Montanari

São Carlos, 2021

Autorizo a reprodução e divulgação total deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de pesquisa e estudo e pesquisa desde que a fonte seja citada.

Assinatura: 

Data: 04/02/2022

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

Rosini, Fabiana

Determinação da assinatura termodinâmica de inibidores da Cisteína
Protease Cruzaina / Fabiana Rosini. — São Carlos, 2021.
121 f.

Tese (Doutorado em Química Orgânica e Biológica) — Instituto de Química
de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2021.
Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari

1. Química medicinal. I. Título.

Sônia Alves - CRB: 4280/8



DEDICATÓRIA

Ao meu pai, Hélio Rosini (*In Memoriam*) que sempre me incentivou no estudo da Química e à minha mãe Evanilde Elvira Danesi Rosini (*In Memoriam*) que nos deixou no início do ano, e que sempre me motivou para que eu concluísse este trabalho e me tornasse doutora em Química.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela minha vida e pela oportunidade.

Ao meu irmão Fernando, minha cunhada Alessandra e meu sobrinho Filipe que sempre me incentivaram e apoiaram não só durante o desenvolvimento desse trabalho, mas em todos os momentos da minha vida.

Ao Professor Dr. Carlos Alberto Montanari, pela orientação, pela sugestão do trabalho e pela amizade não só durante o período de execução desse trabalho, mas durante meus 12 anos no grupo NEQUIMED.

Ao Professor Dr. Andrei Leitão pela amizade e por ajudar e incentivar sempre meu trabalho dentro do grupo.

À querida Malu, por todo apoio e amizade durante todos esses anos.

Ao Professor Dr. Julio César Borges e Professora Dra. Fernanda Canduri, que sempre tiraram minhas dúvidas e abriram seus laboratórios quando necessário, para que eu pudesse realizar parte do meu trabalho experimental.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida em 2006 (Processo: 142292/2006-0) quando iniciei o doutorado que não foi concluído.

À FAPESP, ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro concedido ao grupo NEQUIMED em todos os anos de trabalho.

À Professora Dra. Conceição Minetti da Universidade de Reutgers (USA), pelo tempo que permaneceu no grupo e por ter me ensinado a operar o calorímetro de titulação isotérmica com enorme dedicação.

A todos os alunos do grupo de Química Medicinal e Biológica do IQSC pelas discussões de trabalho, também pelos momentos de descontração e alegria.

Aos ex-alunos do grupo NEQUIMED que de alguma maneira me ajudaram. Em especial ao Dr. Helton José Wigers e Dra. Juliana Cheleski Wiggers que me ensinaram conceitos básicos de biologia molecular quando cheguei no laboratório e também à Dra. Daiane Tezuka por todo o apoio durante uma fase difícil que passei dentro do grupo.

Ao programa de pós-graduação do IQSC pela oportunidade e aos funcionários pelo apoio e auxílio.

A todos os professores e funcionários do IQSC por sempre me auxiliarem quando necessário.

A TODOS, MUITO OBRIGADA!!!

EPÍGRAFE

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”.

Leonardo Da Vinci

RESUMO

O reconhecimento bimolecular pode ocorrer por intermediação de diferentes interações não-covalentes: ligação hidrogênio, forças de van der Waals e hidrofóbicas, interações π - π , eletrostáticas. Através da ITC (calorimetria de titulação isotérmica), a mudança de calor quando um composto interage com uma proteína alvo permite a determinação precisa da afinidade, bem como as forças que dirigem o processo. A titulação na presença de ligantes fornece informações sobre as forças que controlam a interação e permite a identificação dos complexos intermoleculares que são relevantes para o planejamento baseado em estrutura. A ITC é a única técnica que mede diretamente a entalpia de interação (ΔH). Os sistemas bioquímicos exibem caracteristicamente compensação entalpia-entropia (EEC) em que o aumento da entalpia é compensado por uma penalidade entrópica, reduzindo a magnitude da mudança na afinidade. Ao caracterizar as relações estrutura-atividade (SAR), a maioria dos grupos envolvidos na interação pode ser observada como contribuindo para ΔH , mas não para a afinidade. Assim, os valores de ΔH podem destacar uma possível descontinuidade na SAR, de modo que os dados estruturais experimentais provavelmente serão particularmente valiosos no planejamento molecular. Neste trabalho, tivemos como objetivo usar a ITC para determinar a assinatura termodinâmica de inibidores da cisteína protease cruzaina com o principal objetivo de avaliar eventuais descontinuidades na SAR. Além disso, a calorimetria diferencial de varredura (DSC) foi empregada para avaliar as mudanças na temperatura de transição da proteína (T_m) que ocorre quando da interação do ligante. Enquanto a ITC permite avaliar a contribuição do ligante para o complexo, a DSC permite a correlação da termodinâmica que impulsiona a interação com as alterações conformacionais na macromolécula. As duas técnicas foram utilizadas para o estudo de moléculas biotivas contra o *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas, que ainda é uma doença negligenciada.

Palavras-Chave: *Cruzaína, cisteína-proteases, ITC, DSC, assinatura termodinâmica, compensação entálpica-entrópica.*

ABSTRACT

Bimolecular recognition can occur via distinct non-covalent interactions: hydrogen bonding, van der Waals and hydrophobic forces, π - π , electrostatic interactions. Through ITC (isothermal titration calorimetry), the heat change when a compound interacts with a target protein allows accurate determination of the affinity as well as the forces driving the process. Titration in the presence of ligands provides information about the forces that control the interaction and allows the identification of intermolecular complexes that are relevant for structure-based design. ITC is the only technique that directly measures the enthalpy of interaction (ΔH). Biochemical systems characteristically exhibit enthalpy-entropy compensation (EEC) in which the increase in enthalpy is offset by an entropic penalty, reducing the magnitude of the change in affinity. When characterizing the structure-activity relationships (SAR), most of the groups involved in the interaction can be observed as contributing to ΔH , but not to affinity. so the experimental structural data are likely to be particularly valuable in molecular design. In this work, we aimed to use the ITC to determine the thermodynamic signature of cysteine protease cruzi inhibitors with the main objective of evaluating eventual discontinuities in the SAR. In addition, differential scanning calorimetry (DSC) was employed to assess changes in protein transition temperature (T_m) that occur upon ligand interaction. While the ITC allows the assessment of the ligand's contribution to the complex, the DSC allows the correlation of the thermodynamics that drives the interaction with the conformational changes in the macromolecule. Both techniques were used to study bioactive molecules against *Trypanosoma cruzi*, which causes Chagas disease, which is still a neglected disease.

Keywords: Cruzain, cysteine proteases, ITC, DSC, thermodynamic signature, enthalpic-entropic compensation.

Artigos Publicados

Lista com artigos que já foram publicados usando parte dos resultados do presente trabalho:

- 1 CIANNI, L.; SARTORI, G.; ROSINI, F.; DE VITA, D.; PIRES, G.; LOPES, B. R.; LEITÃO, A.; BURTOLOSO, A.C.; MONTANARI, C.A. Leveraging cruzain, S3 subsite to increase affinity for reversible covalente inhibitors, **Bioorganic Chemistry**, USA (on-line)79, p. 285-292, 2018.
- 2 DOS SANTOS, A.M.; CIANNI, L.; DE VITA, D.; ROSINI, F.; LEITÃO, A.; LAUGHTON, C.A.; LAMEIRA, J.; MONTANARI, C.A. Experimental study and computational modelling of cruzain cysteine protease inhibitor by dipeptidyl nitriles. **Physical Chemistry Chemical Physics**, Cambridge, v.20, p.24317-24328, 2018.
- 3 SILVA, J.R.A.; CIANNI,L.; ARAUJO, D.; BATISTA, P.H.J.; DE VITA, D.; ROSINI, F.; LEITÃO, A.; LAMEIRA, J.; MONTANARI, C.A. Assesment of the Cruzain Cysteine Protease Reversible Covalent Inhibition Mechanism, **Journal of Chemical Information and Modeling**, Whashington, v.60, p. 1666-1667, 2020.
- 4 CIANNI, L.; ROCHO, F.R.; ROSINI, F.; BONATTO, V.; RIBEIRO, J.F.R.; LAMEIRA, J; LEITÃO, A.; SHAMIM, A.; MONTANARI, C.A. Optimization strategy of single-digit nanomolar cross-class inhibitors of mammalian and protozoa cysteine proteases, **Bioorganic Chemistry**, USA (on-line) v.101, p.104039, 2020.
- 5 CIANNI, L; LEMKE, GILBERG, G.; FIELDMANN, C; ROSINI, F.; ROCHO, FR.; RIBEIRO, J.F.R.; TEZUKA, D., LOPES,C.; ALBUQUERQUE, S.; BAJORATH, J.; LAUFERS, S.; LEITÃO, A.; GUSTCHOW,M.; MONTANARI, C.A. Mapping the S1 and S2 subsities of cysteine proteases with new dipeptidil nitrile inhibitors as trypanocidal agents, **PLos Neglected Tropical Diseases**, USA (on-line) v.14 (93), 2020.
- 6 LAMEIRO, R.F.; SHAMIM, A; ROSINI, F.; CENDRON, R.; BATISTA, P. J.; MONTANARI, C.A. Synthesis, Biochemical Evaluation of Nonpeptidical Nitrile-based Fluorinated Compounds, **Future Medicinal Chemistry**, London, vol. 13 (1), 2020.

O artigo seguinte não faz parte dessa tese, mas foi uma contribuição com outro trabalho que estava em andamento no grupo.

- 7 RIBEIRO, J.F.R.; CIANNI, L.; LI, C.; WARWICK, T.G.; DE VITA, D.; ROSINI, F.; ROCHO, F.R.; MARTINS, F.C.P.; KENNY, P. W.; LIMEIRA, J.; LEITÃO, EMSLEY, J. MONTANARI, CA. Crystal structure of *Leishmania mexicana* cysteine protease B in complex with a high-affinity azadipeptide nitrile inhibitor, **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, United Kingdom, v.28, p. 115743, 2020.

Um manuscrito de primeira autoria está sendo redigido e será publicado em breve.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.0: Países afetados pela Doença de Chagas	19
Figura 1.1: Mostra as estruturas Químicas do Nifurtimox e Benzonidazol.	20
Figura 1.2: Representação da estrutura cristalográfica tridimensional da enzima cruzaina.	212
Figura 1.3: Esqueleto molecular mostrando as posições de substituição dos grupos orgânicos e possíveis interações com o sítio da cruzaina.....	23
Figura 1.4: Funcionamento do calorímetro de titulação isotérmica.	25
Figura 1.5: a) Gráfico do sinal da interação obtido no biocalorímetro. b) Curva de integração dos picos.	26
Figura 1.6: Mostra exemplos de experimentos obtidos no ITC para diferentes valores da constante c.....	28
Figura 1.7: Ajuste do modelo sigmoidal e os parâmetros adquiridos por calorimetria de titulação isotérmica.	299
Figura 1.8: Assinaturas Termodinâmicas de três interações diferentes. (PANALYTICAL, 2021. Figura Adaptada).	30
Figura 1.9: Gráfico obtido por calorimetria diferencial de varredura mostrando a desnaturação térmica de uma proteína padrão e o ajuste feito pelo equipamento para fornecer os valores da temperatura de desnaturação e a variação da entalpia.	32
Figura 1.10: Parâmetros calculados a partir do gráfico obtido no ensaio.....	33
Figura 1.11: Celas de referência e amostra presentes no nano calorímetro diferencial de varredura (n-DSC). (TA Instruments 2021). Fonte TA Instruments 2021.	34
Figura 1.12: Estabilidade térmica da proteína livre e na presença de um ligante.....	355
Figura 1.13: Esquema de representação dos parâmetros de Kon e Koff.....	36
Figura 4.0: Aminoácidos codificados pelo gene para a produção da cruzaina.	466
Figura 5.0: Resultados obtidos no PEAQ-ITC X VP-ITC para a NEQ0409.	55
Figura 5.1: Comparação dos resultados obtidos com a NEQ0570 (molécula padrão) e a NEQ0820.	57
Figura 5.2: Substituição da posição da pirimidina de pára para meta resultou em contribuição detrimental.	59
Figura 5.3: a) Estrutura dos compostos K777 e NEQ0882 b) Comparação dos resultados de ITC obtidos pelo método direto e indireto para o composto K777 e o composto modificado NEQ0682 c) Comparação entre as assinaturas termodinâmicas.	62
Figura 5.4: Comparação entre as assinaturas termodinâmicas das trinta e seis moléculas em estudo.	65
Figura 5.5: Curva EEC. A linha azul representa o ajuste linear.....	67
Figura 5.6: Varredura da cruzaina C25A por n-DSC.....	69

Figura 5.7: Gráfico de varredura obtido para o zimogênio	70
Figura 5.8: Termograma da cruzaina inibida com MMTS.	71
Figura 5.9: Gráfico de varredura obtido com a cruzaina WT usando TCEP e 1,5 horas de diálise.	72
Figura 5.10: a) Gráfico mostrando os valores de ΔC_p e ΔH_{cal} obtidos para a cruzaina Apo. b) Gráfico de varredura usando β -mercaptoetanol e 30 minutos de diálise, mostrando o ajuste do equipamento e os parâmetros calculados (linha preta: experimento e linha vermelha:ajuste.	73
Figura 6.0: Mudança estrutural feita nas moléculas com seus respectivos valores de pK_i , pK_d e ΔT_m	78
Figura 6.1: Representação de SAR para os compostos NEQ0570, NEQ0409 e NEQ0410.....	79
Figura 6.3: SAR para os compostos NEQ0533.1, NEQ0940, NEQ0866.1 e NEQ0952 contendo os valores de pK_d e pK_i	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.0: Parâmetros utilizados no PEAQ-ITC e VP-ITC.....	422
Tabela 3.1: Parâmetros utilizados para o ensaio pelo método indireto (PEAQ-ITC).	44
Tabela 3.2: Parâmetros usados no n-DSC.	444
Tabela 4.0: Parâmetros utilizados no n-DSC.....	522
Tabela 5.0: Comparação dos parâmetros obtidos pelo VP-ITC e PEAQ-ITC.	566
Tabela 5.1: Comparação entre os valores de p_{kd} e p_{ki} para interações da cruzaína com a NEQ0570 e NEQ0820.	58
Tabela 5.2: Parâmetros termodinâmicos obtidos para as trinta e seis moléculas estudadas contra a enzima cruzaína.....	6161
Tabela 5.3 Estudo de otimização de velocidade de varredura para os ensaios de n-DSC.....	688
Tabela 5.4: Parâmetros obtidos por n-DSC com alguns ligantes sintetizados no grupo.	74
Tabela 6.0: Modificações feitas na estrutura química do composto em diferentes posições.	77

Índice de Abreviações e Siglas

ΔH – Variação da Entalpia

ΔH_{cal} = Variação de entalpia (calorimétrico)

ΔH_{vh} – Variação de entalpia (Van't Hoff)

ΔG – Variação da energia Livre de Gibbs

$-T\Delta S$ – Variação de entropia

ΔT_m – Variação de temperatura de desnaturação térmica

ΔC_p – Variação de capacidade calorífica

C25A – Cruzaína mutante onde o resíduo Cys 25 é substituído por Ala

DNDi – Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas

DTT – Dietiotreitol

EEC – Compensação entálpica-entrópica

IPTG – Isopropil β -D-1 tiogalactopiranosídeo

ITC – Calorimetria de Titulação Isotérmica

K777 – N-metil-piperazina-Phe-homoPhe-vinilsulfona-fenil

K_a – Constante de associação

K_d – Constante de dissociação

K_i – Constante de Inibição

NEQUIMED – Grupo de Química Medicinal

MMTS - Metil metanotiosulfonato

DSC – Calorimetria diferencial de varredura

DO – Densidade Óptica a 600 nm

PDB – Do inglês *Protein DataBank*

PMSF – Fluoreto de fenil-metano-sulfonil

R – Constante universal dos gases ($8,314 \text{ K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ou $1,987 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)

TCEP – Tris (2 carboxietil) fosfina

T_m - Temperatura de transição (do inglês: *melting temperature*)

SUMÁRIO

Capítulo 1.....	17
1. Introdução.....	18
1.2 A Doença de Chagas	18
1.3 A Cisteína - Protease Cruzaína.....	20
1.4 Cruzaína C25A.....	22
1.5 Inibidores da Cruzaína	22
1.6 Dipeptidil nitrilas como inibidores da cruzaína.....	23
1.7 Inibidores K777 e MMTS (Metanotiosulfonato de metila).....	24
1.7 Calorimetria de Titulação Isotérmica.....	24
1.8 Calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	31
1.9 A Calorimetria Diferencial de Varredura na presença de ligantes.....	34
1.9.1 Aplicações da Calorimetria em Química Medicinal	35
1.9.2 Relação estrutura-atividade (SAR).....	37
Capítulo 2.....	39
2.0 Objetivos	40
Capítulo 3.....	41
3. Materiais e Métodos.....	42
3.1 Inibidores.....	42
3.2 Experimentos ITC.....	42
3.3 Método Indireto	43
3.4 Ensaio por DSC.....	44
Capítulo 4.....	45
4. Procedimento Experimental	46
4.1 Expressão e Purificação da Enzima Cruzaína	46
- Transformação das células:.....	46
- Procedimento de transformação das células:	46
- Expressão	47
- Purificação:.....	48
4.2 Cruzaína C25A.....	50
4.3 Preparo da proteína para os estudos de afinidade por ITC.....	51
4.4 Preparo da proteína para ensaios por DSC	51

Capítulo 5.....	53
5. Resultados e Discussão:.....	54
5.1 Comparação entre os experimentos de VP-ITC e PEAQ-ITC	54
5.1 Estudo com o K777 e NEQ0682	61
5.2 Comparação entre as Assinaturas Termodinâmicas.....	65
5.3 Gráfico de EEC	67
5.5 Cruzaína mutante (C25A).....	69
5.6 Varredura usando o zimogênio (proteína com o prodomínio)	70
5.7 Varredura usando a enzima Wild type inibida com MMTS (S-Metil metanotiosulfonato).....	71
5.8 Cruzaina Wild Type com TCEP (Tris (2-carboxyethyl) phosphine)	71
5.9 Cruzaina com β - mercaptoetanol	72
5.9.1 Resultados obtidos na varredura da cruzaína com alguns ligantes	73
5.9.2 Perspectivas Futuras.....	75
Capítulo 6.....	76
6. Relação Estrutura-Atividade (SAR)	77
5.9.3 Conclusões Finais	81
Capítulo 7.....	83
7.0 Referências Bibliográficas	84
Anexo 1	91
Anexo 2:.....	116

Capítulo 1:

INTRODUÇÃO

1. Introdução

As doenças negligenciadas são causadas por agentes infecciosos ou parasitos e são consideradas endêmicas em populações de baixa renda. As doenças como leishmaniose visceral, doença de Chagas, doença do sono, esquistossomose e dengue continuam sendo algumas das principais causas de mortalidade em todo o mundo. As doenças negligenciadas são um problema global de saúde pública.¹ Embora apresentem alta incidência de enfermidades em todo o mundo, essas doenças são alvo de uma pequena fração de medicamentos que são desenvolvidos todos os anos. Entre janeiro de 2012 e setembro de 2018, 256 novos fármacos chegaram ao mercado, mas apenas oito deles tinham como alvo as doenças negligenciadas.²

1.2 A Doença de Chagas

A doença de Chagas passou a ser assim nomeada pelo médico sanitarista brasileiro Carlos Chagas que descobriu a doença em 1909.² É causada pelo parasito *Trypanosoma cruzi*, que é transmitido para seres humanos pelas fezes de insetos vetores. A doença também pode ser transmitida por transfusão de sangue, transplante de órgãos, de forma congênita (de mãe para filho) e também por alimentos contaminados com o parasito (suco de açaí, goiaba ou caldo de cana). Também é possível a contaminação em acidentes de laboratório. É encontrada principalmente nas Américas (geralmente em áreas rurais da América Latina, onde existem maiores níveis de pobreza).

Nas últimas décadas, a doença de Chagas tem sido encontrada principalmente na parte continental da América Latina e não apenas nas ilhas do Caribe. Devido, essencialmente, a fenômenos de migração, tem sido observada nos Estados Unidos, Canadá, e em muitos países europeus bem como em alguns países do Pacífico Ocidental.² Estima-se que cerca de 6 a 7 milhões de pessoas estejam infectadas no mundo pelo *Trypanosoma cruzi*, sendo 6 milhões apenas na América Latina. Calcula-se que no mundo, 70 milhões de pessoas estejam em risco de contrair a doença. Estimam-se ainda 14.000 mil mortes por ano, além de significativa morbidade.^{3,4}

A Figura 1.0 mostra os países afetados pela Doença no mundo:

Figura 1.0: Países afetados pela Doença de Chagas



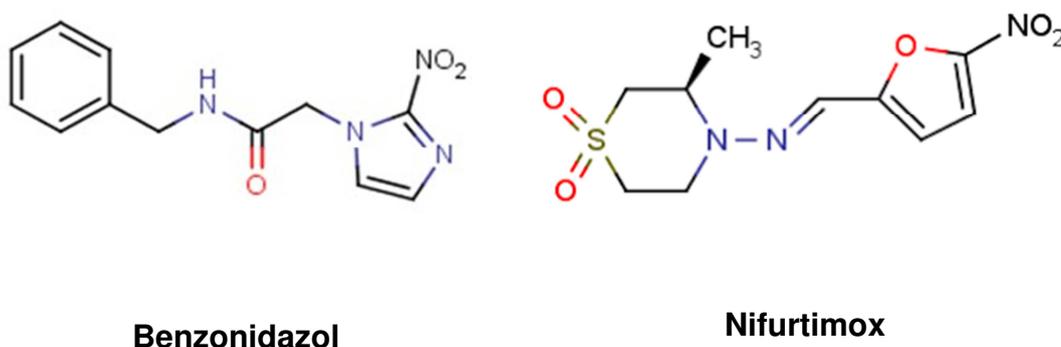
A doença de Chagas apresenta-se em duas fases. A primeira, a aguda, dura cerca de dois meses após a infecção. Durante essa fase, um grande número de parasitos circula no sangue, mas na maioria dos casos os sintomas estão ausentes, são leves e inespecíficos. Em menos de 50% das pessoas infectadas, os primeiros sinais visíveis pode ser uma lesão cutânea ou inchaço púrpura das pálpebras de um olho. Podem apresentar também febre, dor de cabeça, glândulas linfáticas aumentadas, palidez, dores musculares, dificuldade para respirar, inchaço e dor abdominal ou torácica.³

Durante a fase crônica (segunda fase), os parasitos estão escondidos principalmente no coração e nos músculos digestivos. Até 30% sofrem de distúrbios cardíacos e 10% de distúrbios digestivos. Nos últimos anos, a infecção pode levar a morte súbita devido a arritmias cardíacas ou insuficiência cardíaca progressiva causada pela destruição do músculo cardíaco e do sistema nervoso.

Nos dias de hoje, a doença de Chagas é tratada com dois medicamentos, descobertos há quase meio século: O Nifurtimox e o Benzonidazol. Ambos são eficazes se forem administrados na fase aguda da doença e perdem a eficácia quando a pessoa está infectada há mais tempo. Ambos possuem efeitos colaterais indesejáveis como dermatites alérgicas e anorexia com perda de peso para o Benzonidazol e sintomas como náusea e

vômito para o Nifurtimox.^{2,3} Somente o Benzonidazol é usado terapêuticamente no Brasil, o uso do Nifurtimox foi descontinuado pela sua toxicidade. A Figura 1.1 mostra as estruturas desses compostos.

Figura 1.1: Mostra as estruturas Químicas do Nifurtimox e Benzonidazol.



Fonte: Reyes, C.C.⁴

Menos de 10% das pessoas com doença de Chagas são diagnosticadas nas Américas e somente cerca de 1% das que têm a doença recebe o tratamento antiparasitário.⁵

1.3 A Cisteína - Protease Cruzaína

As cisteína - proteases estão envolvidas em uma série de processos, não apenas degradação de proteínas, mas também desempenham um papel biológico essencial em doenças infecciosas e sistêmicas como o câncer (no caso das cathepsinas).

São alvos terapêuticos fundamentais do desenvolvimento de novos fármacos para muitas doenças humanas. Das parasitárias até o câncer.⁶

A cisteína-protease do *Trypanosoma cruzi* é chamada de cruzipáina quando extraída do parasito natural e cruzáina na sua forma recombinante. A cruzipáina natural é um complexo de isoformas devido a expressão simultânea de vários genes e a presença de híbridos do tipo manose ou complexo do tipo biantenário em ASn255 da extensão C terminal.⁷

Grande parte dos inibidores da cruzáina são peptídeo-miméticos do tipo covalente irreversíveis cujo desenvolvimento tem sido evitado devido ao potencial efeito *off target* e também ao perfil farmacocinético indesejável.^{7,8}

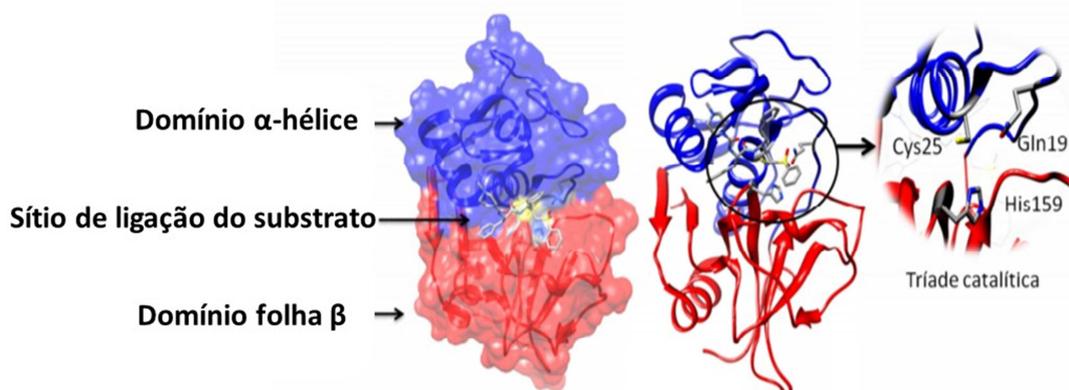
Esta enzima está envolvida no processo de infecção da célula do hospedeiro, diferenciação, replicação, metabolismo, evasão de mecanismos de defesa sendo essencial na regulação da interação entre hospedeiro e parasito.

É uma glicoproteína expressada como uma pré-proenzima com três domínios distintos: o pro-domínio N-terminal com 104 aminoácidos (aa), o domínio catalítico com 215 resíduos de aminoácidos e uma extensão carboxi- ou C-terminal com 130 aa.^{6,8} Foi desenvolvido um protocolo de cristalização da enzima onde a resolução da estrutura revelou dois domínios, um α -helicoidal e o outro possuía várias extensões de folhas β . Os resíduos da tríade catalítica foram identificados como His159, Cys25 e Gln19 (muito similar a papaína) e um extenso sítio de ligação foi encontrado entre os domínios. A Figura 1.2 mostra uma figura ilustrativa da estrutura cristalográfica da enzima de estudo complexada com um inibidor do tipo covalente.

A cruzaina recombinante é homogênea e desprovida da extensão C-terminal e glicosilação. A extensão C terminal não está envolvida na inibição do substrato nem é necessário no enovelamento da cruzipaína.⁷ Corresponde a enzima madura. Foi desenvolvido um protocolo de cristalização da enzima onde a resolução da estrutura revelou 215 resíduos de aminoácidos enovelados em dois domínios.^{9,10}

A Figura 1.2 mostra a estrutura tridimensional da cruzaina.

Figura 1.2: Representação da estrutura cristalográfica tridimensional da enzima cruzaina. Fonte: PDB (Código 2AIM)



Como outras proteases da família da papaína, a cruzaina é inicialmente expressada como um zimogênio inativo que é auto-ativado em um processo dependente do pH, da temperatura e da concentração, transformando-se na enzima ativa mediante quebra e digestão do pró-domínio em cadeias menores de peptídeos.^{6,8}

1.4 Cruzaina C25A

A cruzaina mutante C25A é uma enzima inativa (possui uma alanina substituindo a cisteína), mas mantém as características do sítio catalítico da cruzaina nativa.¹¹

1.5 Inibidores da Cruzaina

Os inibidores da cruzaina causam a morte do *Trypanosoma cruzi* devido a interrupção do processamento auto catalítico natural da enzima e posterior transporte para os lisossomos levando a um acúmulo de procruzaina não processada no complexo de Golgi.¹²

Uma tática comumente empregada no projeto de inibidores de cisteíno protease é incorporar uma entidade eletrofílica, comum referida como “*warhead*”, na estrutura do inibidor.¹³

A maioria dos inibidores mais conhecidos da cruzaina mimetiza substratos naturais peptídicos (peptídios miméticos), sendo divididos em reversíveis e irreversíveis.¹⁴

Dentre os inibidores covalentes irreversíveis destacam-se os que possuem reconhecimento químico (*warheads*) baseados em alil e vinil sulfonas, epóxidos peptídicos, diazometanos, etc.¹⁵

Dentre os inibidores covalentes reversíveis destacam-se os que possuem *warheads* do tipo alfa cetonas, aldeídos peptídicos, α -cetonas e as nitrilas que formam um complexo covalente reversível com a cisteína catalítica.¹³

1.6 Dipeptidil nitrilas como inibidores da cruzaina

Nos últimos anos, as dipeptidil nitrilas têm sido estudadas como inibidores de cisteíno proteases com atuação potente e seletiva.^{16,17}

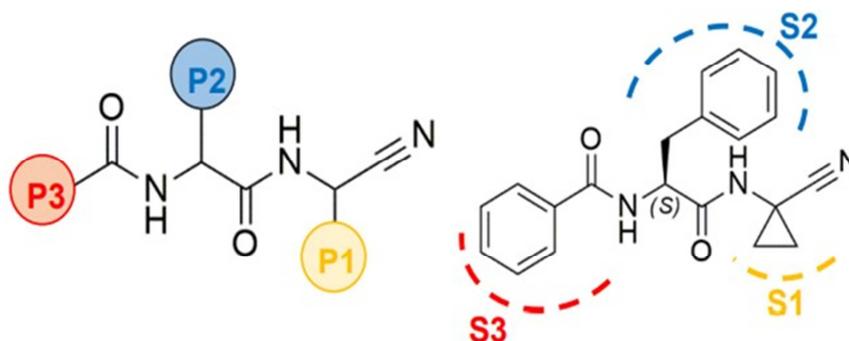
O grupo NEQUIMED/IQSC/USP têm estudado esses inibidores conhecidos como ponto de partida inicial para a síntese de novos inibidores da enzima cruzaina, onde os substituintes do esqueleto básico podem ser facilmente variados para a síntese de novos inibidores.

O primeiro composto estudado no grupo recebeu o código de NEQ0409 e foi desenvolvido pelo Pesquisador visitante Dr. Peter Kenny e a partir desse, muitos outros compostos foram projetados pelo grupo de bioinformática e sintetizados pelo grupo de síntese orgânica e posteriormente testados contra a cruzaina.

Silva et al, 2017¹⁸, por exemplo, identificaram vários desses compostos que foram testados contra a enzima, sendo que os mais potentes receberam os códigos de NEQ0689 e NEQ0690 que apresentaram valores de pK_i de 8.8.¹⁹

Os pesquisadores do grupo de Química Medicinal partem de um esqueleto molecular e vão fazendo modificações de forma a obter moléculas diferentes que possam inibir a cruzaina. As mesmas moléculas são posteriormente testadas contra o alvo (cruzaina recombinante). A Figura 1.3 mostra o esqueleto da molécula e as interações com os sítios da proteína.¹⁹

Figura 1.3: Esqueleto molecular mostrando as posições de substituição dos grupos orgânicos e possíveis interações com o sítio da cruzaina.¹⁹



1.7 Inibidores K777 e MMTS (Metanotiosulfonato de metila)

O MMTS é um pequeno composto que bloqueia reversivelmente cisteínas e outros grupos sulfidrilas permitindo o estudo da ativação enzimática e outras funções proteicas. O MMTS converte grupos sulfidrilas nas cadeias laterais de cisteínas em $-S-S-CH_3$.¹⁹ A reação é reversível com DTT, TCEP ou β - mercaptoetanol restaurando o sulfidril livre. Inicialmente, desde os primeiros protocolos de purificação da cruzaina, o uso de MMTS era recomendado logo após a etapa de ativação para evitar a degradação enzimática durante as etapas subsequentes de purificação da enzima.¹⁰

O K777 é um inibidor irreversível de cisteíno protease, que inibe a cruzaina. Possui um grupo vinil sulfona e foi originalmente caracterizado pelo Sandler Centro para pesquisa em Doenças Parasitárias Tropicais da UCSF. Apesar de sua importância, os inibidores irreversíveis são frequentemente evitados devido ao risco de efeitos adversos.^{21,22}

1.7 Calorimetria de Titulação Isotérmica

A Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC) mede o calor liberado ou absorvido em eventos bioquímicos de ligação, estequiometria (n), entalpia (ΔH) e entropia (ΔS) a partir dos quais se calcula a afinidade de ligação (K_d)²³.

De todas as técnicas que são geralmente usadas para medir interação, a calorimetria de titulação isotérmica (ITC) é capaz de medir não apenas a magnitude da afinidade da interação, mas também a magnitude de dois termos termodinâmicos que definem a afinidade da interação: a variação da entalpia (ΔH) e variação de entropia (ΔS)²⁴.

A maioria dos calorímetros mede os efeitos diferenciais do calor entre a cela de referência (preenchida com tampão ou água) e a cela de amostra (ou cela de reação) e trabalha com base no sistema de compensação de calor.

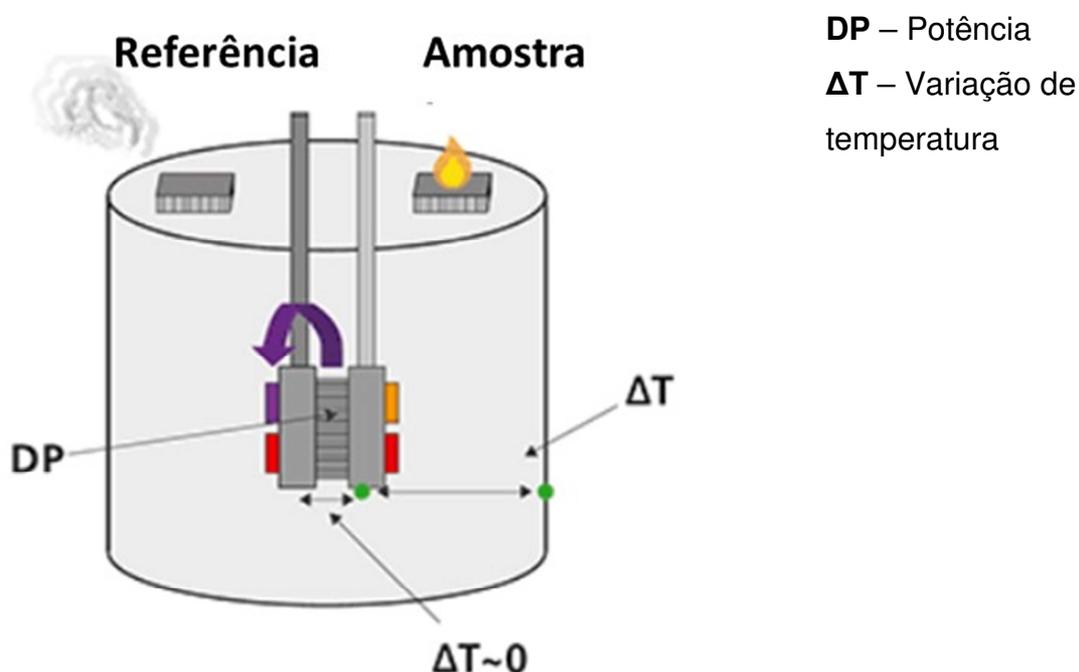
A diferença de temperatura entre as duas celas é constantemente monitorada e uma energia constante (definida pelo usuário) é aplicada na cela de referência, a qual ativa o circuito de retorno para aplicar uma quantidade de energia variável sobre a cela de amostra para manter uma diferença de temperatura entre as duas celas próxima de zero.

O sinal observado num experimento calorimétrico é a energia fornecida a esta cela.

Quando a interação ocorre, há uma alteração da temperatura na cela de amostra, o que leva a uma diferença de temperatura entre as duas celas. Isto é detectado pelo calorímetro e a energia aplicada na cela de amostra é ajustada¹⁵.

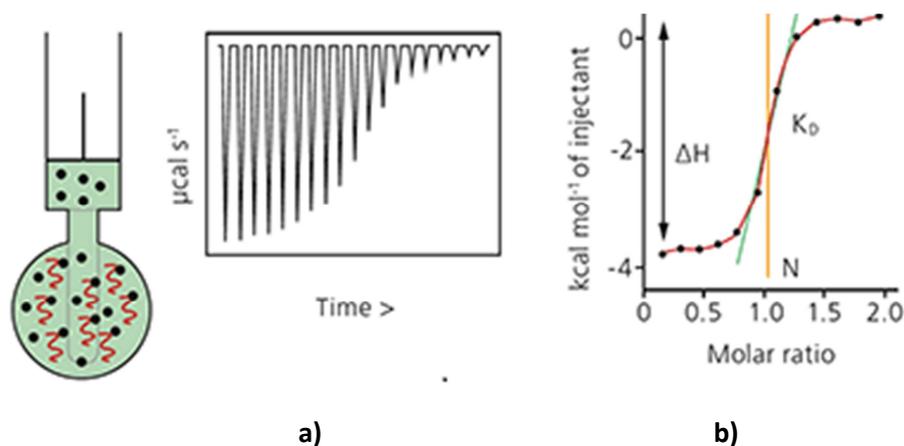
A Figura 1.4 mostra o funcionamento do calorímetro de titulação isotérmica.

Figura 1.4: Funcionamento do calorímetro de titulação isotérmica.



A Figura 1.5 mostra o gráfico com o sinal da interação obtido no calorímetro e também a curva com a integração dos picos, mostrando como são calculados alguns parâmetros de interação (Adaptado PANALYTICAL, 2021²⁵).

Figura 1.5: a) Gráfico do sinal da interação obtido no calorímetro. b) Curva de integração dos picos.



De acordo com BOUCHEMAL *et. al.*²⁶, do ponto de vista técnico, o experimento de ITC é relativamente simples. Consiste em titular poucos microlitros de um composto, geralmente em solução aquosa em uma solução contida na cela.

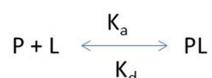
Essa cela é mantida a temperatura constante e o calor de diluição é monitorado a cada injeção e descrito em função do tempo.

Geralmente, o experimento de ITC é conduzido em solução aquosa (tampão), oferecendo a possibilidade de monitorar o efeito do pH nas interações.

Com o experimento de ITC, é possível determinar em um único experimento, todos os parâmetros termodinâmicos (ΔH , ΔG , ΔS) de um ligante frente ao seu alvo. Esses são parâmetros indispensáveis para o planejamento e otimização de novas entidades químicas.^{27, 28,29}

Onde:

Equação 1.1:



$$K_a = \frac{[PL]}{[P][L]}$$

Equação 1.2

Em condições de equilíbrio, K_a pode ser descrita em função da Energia Livre de Gibbs.

Equação 1.3

$$\Delta G = -RT \ln K_a$$

Quanto mais negativo o valor de ΔG , maior afinidade do ligante pela enzima. O valor de ΔG pode ser descrito em função da entalpia e entropia.

Equação 1.4

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Nesta técnica, o parâmetro c (equação 1.5)³⁰ é usado no ajuste sigmoidal da curva de afinidade e também no planejamento do experimento através do planejamento das curvas de interação onde n é a fração molar, M_t é a concentração total da proteína e $K_d = 1/K_a$.

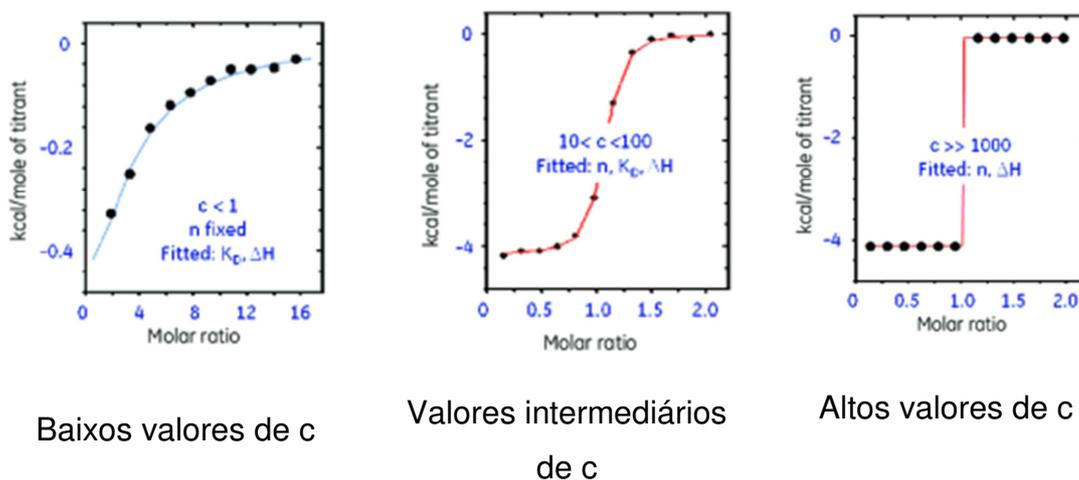
Equação 1.5

$$c = nM_tK_d$$

De acordo com o valor da constante c , é possível classificar o processo de interação como forte afinidade (tight-binding), onde $c > 100$, afinidade moderada ($10 < c < 100$) e afinidade baixa ($c < 10$). O parâmetro c pode acarretar problemas no resultado. Se $c > 100$, a curva de interação é muito inclinada, causando problemas na determinação do valor de K_a . Se $c < 10$, a curva apresentará pouca inclinação, causando problemas na determinação dos valores de n , K_a e ΔH ³¹. Quando o valor de c é muito elevado, pode-se utilizar o método indireto, descrito por Velasquez-Campo³², onde a proteína é previamente incubada com um ligante mais fraco, cujos parâmetros termodinâmicos são previamente conhecidos e titulada com um ligante forte, com uma estrutura semelhante a do ligante mais fraco. Usando o ajuste especial (modo de competição) no software do equipamento, todos os parâmetros termodinâmicos do ligante forte podem ser facilmente determinados.

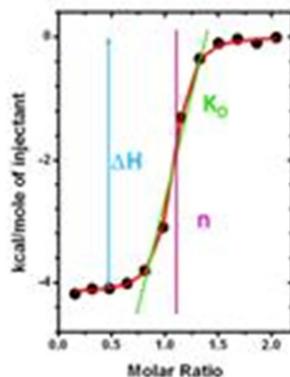
A Figura 1.6 mostra exemplos de experimentos obtidos com diferentes valores da constante c obtidos pelo método direto:

Figura 1.6: Mostra exemplos de experimentos obtidos no ITC para diferentes valores da constante c .²⁵



No experimento de ITC, o calor de injeção individual é calculado integrando os dados brutos de potência de cada injeção ao longo do tempo. A Figura 1.7 mostra o calor de injeção individual normalizado pela quantidade de calor injetado em função da razão molar do titulante/ material celular na cela. A curva ajustada de um modelo de ligação $n = 1$ é sobreposta em vermelho. Uma ilustração geral como parâmetro termodinâmicos, n , K_d e ΔH estão relacionados à titulação.

Figura 1.7: Ajuste do modelo sigmoidal e os parâmetros adquiridos por calorimetria de titulação isotérmica.²⁵

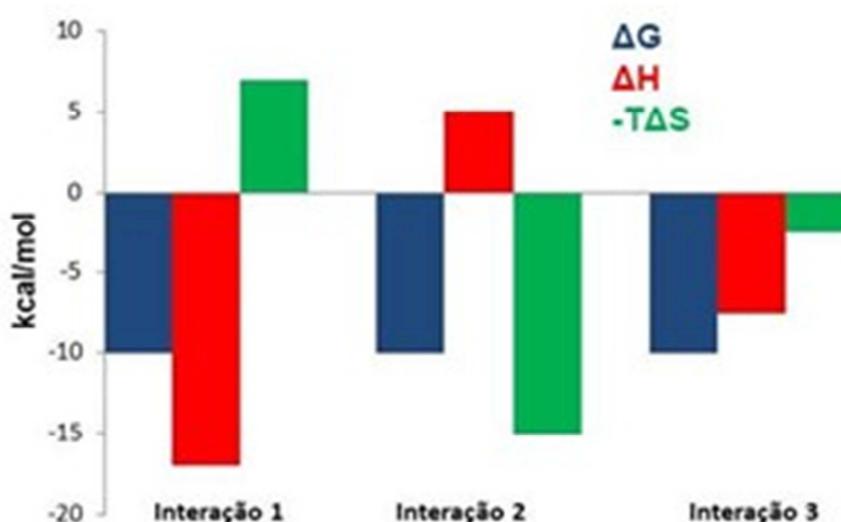


No caso de desse experimento simples de ligação 1:1, a entalpia é diretamente medida como o calor de 100% de ligação. A estequiometria é indicada pelo ponto médio da titulação.

A caracterização termodinâmica das interações proteína-ligante usando a técnica de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) tornou-se um método rotineiramente usado para entender as interações biomoleculares com ligantes que ocorrem naturalmente, bem como uma ferramenta poderosa no design de medicamentos.³³

Além dos parâmetros termodinâmicos é possível obter a assinatura termodinâmica de cada interação como mostra a Figura abaixo:

Figura 1.8: Assinaturas Termodinâmicas de três interações diferentes. (PANALYTICAL, 2021. Figura Adaptada).²⁵



A Figura 1.8 mostra exemplos de assinaturas termodinâmicas de três interações que apresentam a mesma energia de ligação (ΔG), que está relacionada com a afinidade.

A afinidade da interação é uma combinação de função da entalpia de interação (ΔH) e da entropia de interação (ΔS). A entalpia de interação reflete a força de interação devido a formação das ligações de hidrogênio e interação de Van der Waals.

Já a entropia de interação é uma combinação de mudança na entropia de dessolvatação e cargas conformacionais na formação do complexo proteína – ligante.⁶

Uma entropia favorável está associada com a dessolvatação de grupos não polares (efeito hidrofóbico). Por outro lado, uma entropia de ligação desfavorável está relacionada com enovelamento como observado na interação de ligantes com domínios intrinsecamente desordenados.²⁸

No exemplo da primeira interação, o composto apresenta uma grande contribuição entálpica enquanto a contribuição entrópica é detrimental. Na segunda interação, observa-se o contrário, já na terceira interação é observada uma contribuição mais equilibrada dos termos e cabe ao Químico Medicinal otimizar o composto de forma a se obter máxima contribuição entálpica e

entrópica sem nenhum parâmetro detrimental. Portanto, o grupo NEQUIMED têm planejado seus ligantes para obter interações como a do exemplo 3.

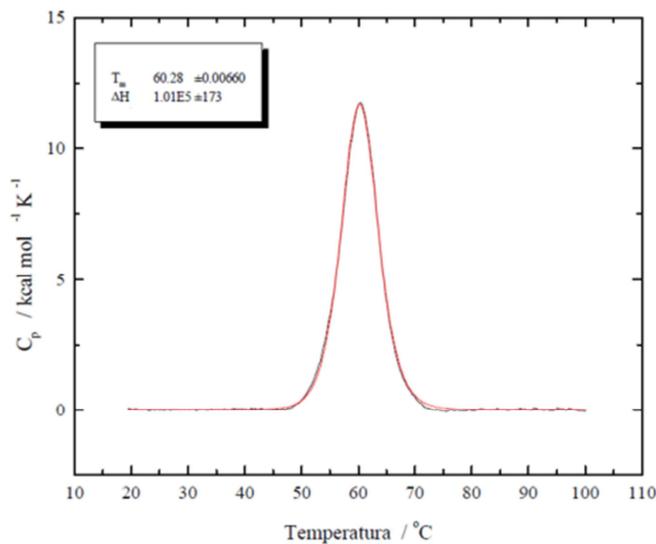
1.8 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

A calorimetria diferencial de varredura (DSC) é uma técnica termodinâmica, que mede a capacidade de calor, como função da temperatura.³⁰

A DSC é uma técnica de grande importância na caracterização termodinâmica de modelos de membranas e biomembranas. Além disso, representa um dos métodos mais empregados nos estudos de interações entre proteína-proteína ou proteína-pequenas moléculas. Baseado nos valores fornecidos por essa técnica, a análise termodinâmica de enovelamento de uma proteína permite a determinação das contribuições das interações do tipo pontes dissulfetos, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas que mantêm a estabilidade da estrutura nativa.³⁴ O equipamento de DSC consiste de duas células, uma contendo a amostra e a outra uma solução de referência inerte, que são aquecidas a uma velocidade pré-programada, o que se acompanha é a variação da temperatura na amostra (ΔT), em relação à referência.³⁵

A Figura 1.9 mostra um gráfico tipo obtido pela técnica de DSC:

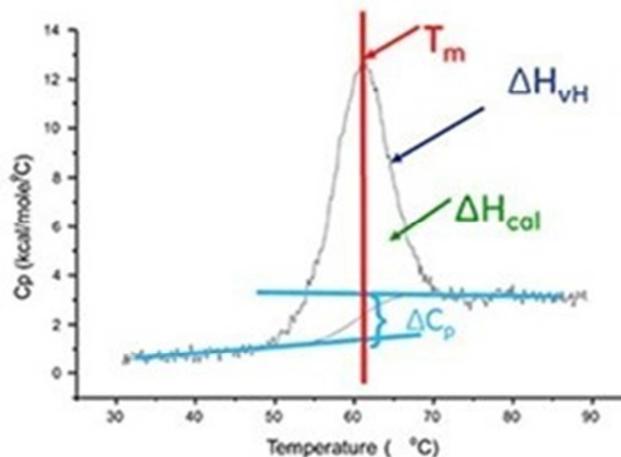
Figura 1.9: Gráfico obtido por calorimetria diferencial de varredura mostrando a desnaturação térmica de uma proteína padrão e o ajuste feito pelo equipamento para fornecer os valores da temperatura de desnaturação e a variação da entalpia.



No gráfico da Figura 1.9, mostra-se a curva em vermelho que representa o ajuste feito pelo aparelho e a curva em preto, referente aos dados experimentais. Os valores de T_m e ΔH são obtidos diretamente do aparelho, T_m é a temperatura correspondente ao máximo de capacidade calorífica (C_p).²⁵

A Figura 1.10 mostra como os parâmetros são calculados a partir do gráfico obtido no ensaio:

Figura 1.10: Parâmetros calculados a partir do gráfico obtido no ensaio. FONTE: Malvern Panalytical 2021²⁵.



A entalpia de desdobramento de proteínas é a área do pico normalizado por concentração e tem unidade de calorias ou joules por mol. Em certos casos, os modelos termodinâmicos podem ser ajustados aos dados para obter a entalpia calorimétrica (ΔH), entalpia de Van't Hoff (ΔH_{vH}) e a mudança da capacidade calorífica (ΔC_p). A análise de calorimetria de varredura é amplamente utilizada para descoberta e desenvolvimento de medicamentos. As principais aplicações incluem: Caracterização e seleção das proteínas mais estáveis ou candidatos potenciais no desenvolvimento bioterapêutico, ensaio de indicação de estabilidade rápida para proteínas a serem usadas para triagem.³⁷

A Figura 1.11 mostra a cela de referência (esquerda) e amostra (direita), presentes no equipamento.

Figura 1.11: Celas de referência e amostra presentes no nano calorímetro diferencial de varredura (n-DSC). Fonte TA Instruments 2021.

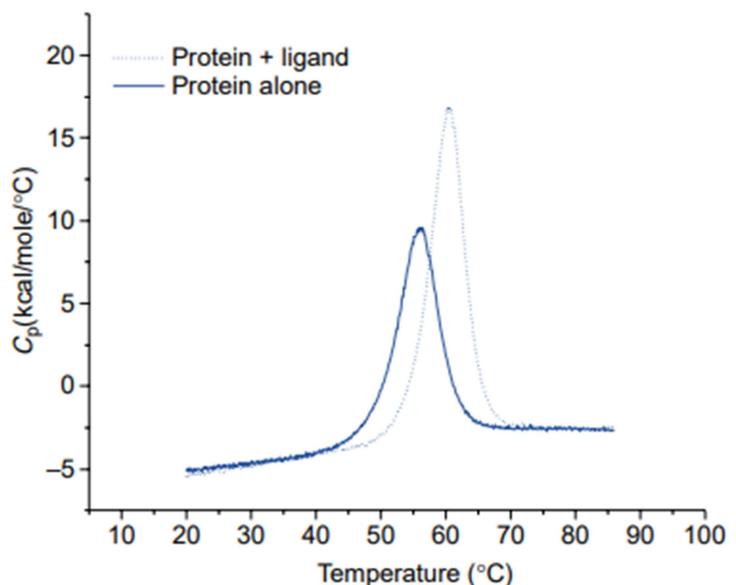


1.9 A Calorimetria Diferencial de Varredura na presença de ligantes

A interação da proteína com um ligante ocorre apenas se houver liberação de energia livre. Dessa forma, o complexo proteína - ligante geralmente é mais estável do que a proteína apo. A magnitude dessa estabilização depende da magnitude da energia de ligação. A comparação da estabilidade do complexo com a estabilidade da proteína livre permite a estimativa da energia de ligação. Essa abordagem permite a caracterização de ligações muito rígidas ou compostos de equilíbrio lento que não são facilmente analisados por ITC.

A Figura 1.12 mostra a estabilidade da proteína apo, comparada com a de um complexo proteína – ligante.

Figura 1.12: Estabilidade térmica da proteína livre e na presença de um ligante.



Com a técnica de DSC é possível calcular o valor de K_d na temperatura de desnaturação, usando a equação abaixo³⁷:

$$K_d^{T_m} = \frac{[L]}{\exp \left\{ \frac{-\Delta H_{D-N}}{R} \left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T_0} \right) + \frac{\Delta C_{pD-N}}{R} \left(\ln \left(\frac{T_m}{T_0} \right) + \frac{T_0}{T_m} - 1 \right) \right\}} - 1$$

[L] = Concentração do ligante

T_m = Temperatura de desnaturação na presença do ligante

T_0 = Temperatura de desnaturação na ausência do ligante.

ΔC_{pD-N} = Variação de capacidade calorífica na presença do ligante.

ΔH_{D-N} = Energia de ligação na presença do ligante.

$K_d^{T_m}$ = Constante de dissociação no T_m .

Entretanto, não é trivial o cálculo de K_d uma vez que o cálculo de ΔC_{pD-N} não é muito preciso. Portanto, raramente o DSC é usado para determinação da constante de binding.^{38,39}

1.9.1 Aplicações da Calorimetria em Química Medicinal

Os métodos biofísicos são a plataforma para avaliar o impacto de novas moléculas bioativas³⁷. Dessa forma, a triagem de moléculas baseada em

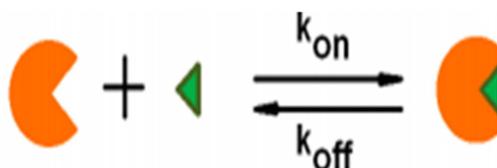
métodos biofísicos nos permite obter informações das ações de compostos em redes metabólicas.

A calorimetria de titulação isotérmica (ITC) é uma ferramenta excepcionalmente poderosa na caracterização da termodinâmica de compostos de teste de ligação ao alvo (proteínas). Auxilia na compreensão do reconhecimento biomolecular, ajudando na invenção de compostos melhorados.

A técnica de ITC não requer reagentes especializados e o mesmo método de detecção é usado para todas as proteínas alvo, sendo que o tempo necessário para o desenvolvimento do ensaio não é muito grande, o que é um atributo valioso na indústria farmacêutica. A ITC possui uma série de características úteis, sendo que as medidas são realizadas em solução, sem qualquer necessidade de imobilização nem modificação química de nenhum reagente.³⁸

A combinação de caracterização estrutural e simulações computacionais, termodinâmicas (ΔH , ΔG , $-\Delta S$) e as análises cinéticas K_{on} e K_{off} fornecem informações essenciais para compreender os mecanismos de ligação das biomoléculas. A Figura 1.13 ilustra as constantes de velocidade K_{on} e K_{off} .⁴⁰

Figura 1.13: Esquema de representação dos parâmetros de K_{on} e K_{off} .



Embora métodos não calorimétricos possam medir apenas uma parte dessas assinaturas termodinâmicas, a calorimetria de titulação isotérmica (ITC) é considerada como potencial para adquirir assinaturas completas em um único experimento. No entanto, parâmetros cinéticos são geralmente mais difíceis de extrair da curva de ITC, pois são inevitavelmente afetados pela função de resposta do instrumento e o calor do processo associado durante as titulações.

Um instrumento de DSC mede a capacidade calorífica de um sistema em função da temperatura. Isso pode ser usado para determinar a transição térmica ou temperatura de fusão (T_m), ΔH e ΔC_p de desenovelamento da amostra em estudo. Em química medicinal, essa técnica é utilizada como complementar a ITC, sendo utilizada para estudo de estabilidade térmica de proteínas, comparações entre proteínas nativas e mutantes e confirmação de interações moleculares incluindo determinação quantitativa.⁴¹

A técnica de DSC tem sido amplamente utilizada na indústria biofarmacêutica para estudos de estabilidade térmica, conformação geral e integridade do enovelamento das proteínas.

Recentemente tem havido um aumento nas solicitações das agências regulatórias para a qualificação de métodos de caracterização, incluindo a DSC. Compreender a precisão do método pode ajudar a determinar quais diferenças entre as amostras são significativas e também estabelecer os critérios de comparação com outros estudos de caracterização.⁴²

1.9.2 Relação estrutura-atividade (SAR)

A relação da estrutura química de uma molécula e sua atividade farmacológica representa um dos principais objetos de estudo da Química Medicinal englobando estudos dos efeitos que a estrutura e composição química de um determinado composto podem ter durante sua interação com o receptor biológico, favorecendo assim, os principais fatores que governam essa interação.⁴³

As forças intermoleculares determinam as interações de uma molécula com seu receptor biológico, tais como polaridade, biossolubilidade e atividade eletrostática. Dessa forma, as substâncias que apresentam propriedades terapêuticas, devem apresentar uma conformação tridimensional de forma que as disposições dos seus grupos funcionais favoreçam sua complementariedade bioquímica ao sítio de ligação quando as mesmas interagem com uma enzima, por exemplo.

Assim, a relação estrutura-atividade estuda as alterações nas estruturas moleculares, que geralmente são determinadas realizando-se pequenas

alterações na estrutura química de um protótipo, seguida de testes em que são observados os efeitos biológicos dessas modificações.⁴⁴

Capítulo 2

Objetivos

2.0 Objetivos

O objetivo do trabalho foi comparar as assinaturas termodinâmicas das diferentes classes de dipeptidil nitrilas complexadas com a enzima cruzaina em estudo no grupo NEQUIMED/IQSC/USP que estão em estudo contra o *Trypanosoma cruzi*, assim como suas desnaturações térmicas usando as técnicas de ITC e DSC. Um estudo de relação estrutura-atividade (SAR) também foi realizado.

Capítulo 3

Materiais e métodos

3. Materiais e Métodos

3.1 Inibidores

Todos os inibidores foram sintetizados no grupo NEQUIMED a partir do protótipo desenvolvido pelo Dr. Peter Kenny (pesquisador visitante) no grupo de Química Medicinal. Todas as moléculas sintetizadas pelo grupo recebem um código chamado de “Código Nequimed”. O primeiro composto sintetizado no grupo recebeu o código de NEQ0409, a partir dele, todos os outros compostos, receberam um número diferente.

3.2 Experimentos ITC

Para que os experimentos pudessem ser realizados, foi necessário realizar uma otimização do experimento no PEAQ-ITC. A Tabela 3.0 mostra a comparação entre os parâmetros utilizados para os dois equipamentos usados nos estudos.

Tabela 3.0: Parâmetros utilizados no PEAQ-ITC e VP-ITC.

Parâmetros VP-ITC		Parâmetros PEAQ-ITC	
Temperatura (°C)	25	Temperatura (°C)	19
Reference Power (µcal/s)	5	Reference Power (µcal/s)	5
Feed Back	High	Feed Back	High
Velocidade de rotação (seringa)	307	Velocidade de rotação (seringa)	120
Número de injeções	28	Número de injeções	19
Volume de injeção (µL)	10	Volume de injeção (µL)	2
Duração da	20	Duração da	4

injeção (s)		injeção (s)	
Espaço entre as injeções (s)	300	Espaço entre as injeções (s)	120
Volume total da cela (mL)	1,4	Volume total da cela (μL)	200
Volume total da seringa (mL)	292	Volume total da seringa (mL)	40
Delay (s)	120	Delay (s)	120

Os dois equipamentos se encontram no grupo NEQUIMED e foram usados para os ensaios. Os resultados obtidos pelos dois equipamentos são muito parecidos. Ambos utilizam praticamente as mesmas concentrações de proteína e ligantes, sendo que o PEAQ-ITC utiliza um volume muito menor de amostra, havendo uma grande economia no uso de proteína. O VP- ITC usa um volume maior de solução da proteína, mas é um equipamento mais estável com menores interferências externas.

Os parâmetros para o VP-ITC foram inicialmente otimizados por PROKOPZYCK⁴⁵ e adaptados nesse trabalho, para ensaios com o PEAQ-ITC.

3.3 Método Indireto

Quando a interação é muito forte (*tight-binding*), o valor de K_d é mais difícil de ser calculado com precisão, então o método indireto é utilizado para comparação e confirmação do resultado.

Conforme o método descrito por VELASQUEZ-CAMPOY *et al.*³² a solução da enzima cruzaina foi incubada com 200 μ M de NEQ0682 (cujos parâmetros termodinâmicos de interação já eram previamente conhecidos) e colocada na cela do equipamento. Logo após, esse complexo foi titulado com uma solução de 300 μ M de K777 que foi colocada na seringa. Ao final do experimento, os parâmetros termodinâmicos da interação com o composto K777 foram calculados também pelo Microcal PEAQ-ITC Analysis Software usando o método competitivo de análise. A enzima e o ligante foram preparados usando o tampão da diálise com a adição dos mesmos reagentes

que foram utilizados no método direto. Os parâmetros usados nesse experimento encontram-se na tabela 3.1:

Tabela 3.1: Parâmetros utilizados para o ensaio pelo método indireto (PEAQ-ITC).

Parâmetros:	Valores
Número de injeções	19
Reference Power ($\mu\text{cal/s}$)	5
Volume das injeções (μL)	2
Espaço entre as injeções (s)	120
Tempo de Delay (s)	120
Rotação da Seringa (rpm)	750 rpm
Temperatura do experimento ($^{\circ}\text{C}$)	25°C
Volume total da cela (μL)	200
Volume total da seringa (μL)	40

A enzima cruzaina WT foi expressada e purificada no grupo NEQUIMED segundo o protocolo descrito.

3.4 Ensaio por DSC

O instrumento usado para os experimentos foi o nano-DSC (TA Instruments) e os parâmetros otimizados previamente encontram-se na tabela abaixo:

Tabela 3.2: Parâmetros usados no n-DSC.

Parâmetros	Valores
Varredura	0 a 90°C
Velocidade de varredura	2 graus/min
Pressão constante	3 atm
Volume da cela	$300\ \mu\text{L}$
Tempo de equilíbrio	600 s
Concentração de equilíbrio	$0,7\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($30,8\ \mu\text{M}$)

Capítulo 4

Procedimiento Experimental

4. Procedimento Experimental

4.1 Expressão e Purificação da Enzima Cruzaína

- Transformação das células:

A Figura 4.0 mostra a sequência de aminoácidos que são codificadas pelo gene para a produção da enzima cruzaína. Os aminoácidos que estão sublinhados pertencem a cauda de histidina na região N-terminal, os que estão em cinza mais claro são do pró-domínio e os que estão em negrito pertencem a cruzaína madura. A massa molecular da enzima é de 22,703 KDa. O vetor utilizado foi o pET21a.

Figura 4.0: Aminoácidos codificados pelo gene para a produção da cruzaína. O domínio catalítico (1 a 215) está em negrito. Os resíduos da cauda de histidina e o prodomínio N-terminal estão numerados de -112 até -1.¹¹

His ₆ + Pro-Region		Cruzain	
-112			HH HHHHGS CLVP
-100	AATASLHAE	TLTSQFAE	FK QKHGRVYESA
			AEAAFRLSVF
-50	AAANPHATFG	VTPFSDLTRE	EFRSRYHNGA
			AHFAAAQERA
			RVPVKVEVVG
1	APAAVDNRAR	GAVTAVKDQG	QCGSCWAFSA
			IGNVECQWFL
			AGHPLTNLSE
51	QMLVSCDKTD	SGCSGGLMNN	AFEWIVQENN
			GAVYTEDSYP
			YASGEGISPP
101	CTTSGHTVGA	TITGHVELPQ	DEAQIAAWLA
			VNGPVAVAVD
			ASSWMTYTGG
151	VMTSCVSEQL	DHGVLVGYN	DSAAVPYWII
			KNSWTTQWGE
			EGYIRIAKGS
201	NQCLVKEEAS	SAVVG	

- Procedimento de transformação das células:

Retirou-se 100 µL de células de *e-coli* Artic Express DE3-RIL (Agilent) que estava congelada a -80°C (Sanyo Ultrafreezer), adicionando-se 3 µL do plasmídeo (80 ng/µL) previamente adquirido (Epoch Life Sciences). A solução foi colocada em banho de gelo por 30 minutos. Logo após, efetuou-se o choque térmico a 42°C em banho-maria por 30 segundos e colou-se novamente em banho de gelo por mais 3 minutos. Então, foram adicionados 250 µL de meio SOC (Sigma-Aldrich) e a solução foi colocada em uma incubadora shaker a 37°C a 250 rpm por 60 minutos.

Enquanto isso, uma placa com meio LB-Agar foi preparada contendo 20 µg/mL de Gentamicina e 100 µg/mL de Ampicilina. Após 1 hora de agitação, a solução da bactéria com o plasmídeo foi colocada na placa e deixada em uma estufa (Nova ética) a 37°C overnight. No dia seguinte surgem as colônias contendo o plasmídeo na placa.

- Expressão

Preparo do meio de alta indução: O meio de alta indução foi preparado usando os reagentes abaixo listados. Uma solução de lactose 0,2% foi usada para o processo de indução. O IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) não foi utilizado nesse procedimento.

Nesse caso, usou-se a *autoindução mínima*, que utiliza a maquinaria de regulação gênica contida no organismo na própria *Escherichia coli*. A lactose atua como agente indutor e tem como fontes de energia primária e secundária, a glicose e o glicerol respectivamente. Durante o crescimento da bactéria a glicose é totalmente consumida. Logo após o término do estágio de crescimento da bactéria, a lactose disponível passa a ser convertida em alolactose (que é um dissacarídeo análogo ao IPTG) que libera o repressor *lac* induzindo a produção da enzima. A principal vantagem da utilização desse método em relação ao uso do IPTG é a maior quantidade de enzima solúvel que é produzida.^{45,46,47,48}

- Para 1L de meio de cultura:

A seguinte mistura foi previamente autoclavada: 10 g de N-Zamina (Sigma-Aldrich), 5g de extrato de levedura (Sigma- Aldrich), 5 mL de Glicerol (Vetec) dissolvidos em 900 mL de água desionizada. As seguintes soluções de sais foram preparadas e autoclavadas: Fosfato de sódio dibásico (Sigma-Aldrich) 0,023M, Fosfato de potássio monobásico (Alfa-Aesar) 0,023M, Cloreto de amônio (Vetec) 0,045M, Sulfato de Sódio (Sigma-Aldrich) 0,0045M e Sulfato de magnésio (Sigma-Aldrich) 0,0018M.

As soluções dos seguintes antibióticos foram preparadas: Ampicilina (Sigma-Aldrich) 100 µg/mL e Gentamicina (Sigma-Aldrich) 20µg/mL.

Por último, as seguintes soluções de açúcares foram preparadas: D-glicose (Vetec) 0,045 w/v e α -Lactose monohidratada (Sigma-Aldrich) 0,18% w/v.

Pré - Inóculo: Foram autoclavados três frascos de 150 mL de meio de cultura (LB) (Sigma Aldrich), coloca-se Gentamicina ($20 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e Ampicilina ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Na capela de fluxo laminar, pegou-se uma colônia (a mais isolada) e adicionou-se em cada frasco contendo o meio de cultura. Os frascos foram colocados no shaker (Marconi, incubadora refrigerada) a 37°C overnight a 250 rpm.

No dia seguinte, mediu-se a D.O. que deveria estar em torno de 0,8 e preparou-se o meio de alta indução, adicionando-se à primeira mistura autoclavada (extrato de levedura, N-Z amina, etc.), os sais previamente autoclavados, os açúcares, os antibióticos e o volume de solução com a bactéria suficiente para iniciar a densidade óptica (D.O.) em 0,16. A D.O. no pré inóculo deverá atingir no máximo o valor 1,0 de absorbância a 600 nm (ideal que seja entre 0,8 e 1) para que não ocorra diminuição do rendimento final da proteína.

Essa preparação foi realizada em ambiente estéril usando uma capela de fluxo laminar para evitar contaminação.

A mistura foi colocada em um shaker (Lab Companion modelo SIF600R) a 18°C a 200 rpm por 72 horas.

Logos após, centrifugou-se essa solução a 9.000 rpm (Hitachi, modelo CR21GIII) a 4°C e o pellet foi congelado a -80°C .

- **Purificação:**

Os seguintes tampões foram necessários para a purificação:

Tampão A: Tris 50 mM (Sigma-Aldrich), 300 mM de NaCl (Synth), 10 mM de imidazol (Sigma Aldrich) pH=10.

Tampão B: Tris 50 mM (Sigma Aldrich), 300 mM de NaCl (Sigma-Aldrich), 500 mM de imidazol (Sigma Aldrich) pH=10.

Solução de lise: Para um pellet de 500 mL do meio de cultura: 60 mL de tampão A; 0,5 mM de CaCl₂ (Sigma-Aldrich); 0,5 mM de MgSO₄ (Sigma Aldrich), 20 µL de DNase (Promega), alguns miligramas de lisozima (Sigma-Aldrich) e 100µM de PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluoride, Sigma-Aldrich).

O pellet foi ressuspensado na solução de lise e foi deixada em repouso durante uma hora. Logo após, a mesma foi sonicada usando um desmembrador sônico (Fisher Scientific Sonic Dismembrator, model 500) com 30 s de pulso on e 30 s de pulso off.

Após o final da sonicação, a solução foi centrifugada usando uma centrífuga de chão a 19.000 rpm por 30 minutos (Hitachi centrifuge model CR21GIII). A solução do sobrenadante foi misturada a 5 mL de resina de níquel (Ni, Sepharose 6 fast flow, GE Healthcare) e deixada sob agitação por aproximadamente 3 horas em um agitador magnético a 4°C. Para esse procedimento, utilizou-se uma câmara fria existente no laboratório.

Ao final desse tempo, a solução foi colocada em uma coluna de bancada (coluna de afinidade pelo Níquel), em seguida a resina foi lavada com 50 mL de tampão A e logo após, a proteína foi eluída com 60 mL do tampão B.

Então, a solução contendo a proteína foi colocada em uma membrana de diálise de 10 KDa (Dialysis tubing cellulose/Sigma Aldrich) e deixada overnight em tampão de ativação a 4°C sob agitação.

O tampão de ativação tinha a seguinte composição: 100 mM de NaAC (Sigma Aldrich), 5mM de EDTA (Sigma Aldrich) e 300 mM de NaCl (Synth), pH=5,5.

No dia seguinte, a proteína foi retirada e novamente colocada em mais um litro de tampão de ativação por mais seis horas sob constante agitação a 4°C.

Ao final, mediu-se o pH (pHmetro Qualxtron model 8010), que foi ajustado a 5,2 ou 5,0 caso a proteína estivesse precipitada.

A solução da proteína foi diluída para uma concentração menor ou igual a 0,5 mg/ml para evitar a precipitação durante a etapa de ativação. Para a determinação da concentração da proteína total, usou-se o Denovix DS-11 + Spectrophotometer.

Etapa de ativação:

Nessa etapa, adicionou-se 1mM de β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) que foi usado com agente redutor da cisteína e deixou-se no Shaker (Marconi) a 37°C sob agitação lenta, por aproximadamente uma hora (a solução passou de turva para branca levemente leitosa e depois para incolor, durante esse processo). Essa etapa é importante, onde a enzima perde seu pró-domínio N-terminal (14KDa).

Ao final da ativação, a proteína foi concentrada usando amicon Ultra, Merck- Millipore (10 kDa) usando uma centrifuga de bancada (Eppendorf centrifuge model 5804R) a 4.500 RCF por 30 minutos, alíquotada, congelada em nitrogênio líquido e armazenada em freezer a - 80°C. (Ultra Low, Sanyo). Alíquotas de todas as etapas foram retiradas para eletroforese em gel.

Foi realizado um ensaio enzimático usando um leitor de placas de 96 poços (Biotek, Synergy HT) para monitorar a reação de hidrólise do substrato Z-FR-AMC (Z-Phe-Arg-7-amino-4-metilcoumarina) para verificar a atividade da enzima. Para a determinação da concentração total da enzima (MW: 22,703 KDa), foi usado o DENOVIIX Spectrophotometer.

Uma alíquota foi retirada de todas as etapas da purificação para o gel de eletroforese.

4.2 Cruzaína C25A

A transformação do plasmídeo, a expressão e a purificação da enzima mutante (C25A) foram desenvolvidas pelo grupo do Professor Brian Schoichet da UCFS. O protocolo foi trazido ao grupo e preparada por FERNANDES¹¹, que fez a adaptação do procedimento de expressão e purificação da enzima. A transformação do plasmídeo, a expressão e purificação da enzima foram feitos da mesma forma que a enzima nativa, tendo a principal diferença, a etapa de ativação uma vez que a enzima é inativa e não apresenta capacidade de se autoativar.

4.3 Preparo da proteína para os estudos de afinidade por ITC

Pegou-se uma alíquota da solução da proteína e fez-se uma nova diálise usando o último tampão empregado no processo de diálise durante sua purificação. Essa nova diálise e a concentração da proteína foram realizadas durante o período de 30 a 60 minutos em membranas Amicon ultra 10 KDa (Merck/Millipore) usando uma centrífuga de bancada a 4500 RCF (Eppendorf centrifuge model 5804R). Ao final, as soluções da cela e da seringa foram preparadas usando o tampão da diálise nas concentrações desejadas para o ensaio. Nesse caso, o inibidor foi colocado na seringa e a proteína na cela. Foram acrescentados 0,001% de Triton-X 100 (Sigma-Aldrich) na solução da seringa e da cela para evitar que a proteína sofresse agregação e ficasse aderida na parede da cela.

Todos os parâmetros termodinâmicos foram calculados pelo Software Microcal PEAQ ITC Analysis Software. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

4.4 Preparo da proteína para ensaios por DSC

Inicialmente, foram realizados vários ensaios de otimização dos parâmetros instrumentais e também de algumas variações da enzima cruzaína, esperando obter uma boa condição de trabalho para que os ligantes sintetizados no grupo fossem testados. Foram então estudados a velocidade de varredura, o comportamento da enzima mutante em relação a wild type e o tipo de agente redutor. A concentração da proteína total foi determinada pelo equipamento DENOVI Spectrophotometer D-11.

O preparo da enzima foi realizado da mesma maneira que foi feito para os ensaios de ITC.

Inicialmente, a cruzaína era purificada utilizando-se o reagente Dithiotreitol (DDT) como agente redutor, na etapa de ativação da enzima. Como o DTT não é indicado para estudos calorimétricos, por causar muitos ruídos na linha base, antes de cada experimento, era feito uma diálise de 1,5 h

para trocar o DTT pelo TCEP (tris (2-carboxyethyl) phosphine), mais indicado para estudos em calorimetria.

Foram feitos vários ensaios até que os parâmetros otimizados para a continuação dos estudos foram os seguintes:

O instrumento usado para os experimentos foi o nano-DSC (TA Instruments) e os parâmetros otimizados previamente encontram-se na tabela abaixo:

Tabela 4.0: Parâmetros utilizados no DSC.

Parâmetros	Varredura
Varredura	0 a 90°C
Velocidade de Varredura	2 graus/ min
Pressão Constante	3 atm
Volume da Cella	300 µL
Tempo de Equilíbrio	600 s
Concentração da proteína	0,7 mg.mL ⁻¹
Concentração do ligante	120 µM

Após os estudos de otimização, a enzima passou a ser purificada usando β-mercaptoetanol como agente redutor, uma vez que esse é mais indicado para os estudos de calorimetria por causar menores interferências na linha base. Por último, a diálise passou a ser apenas de 30 minutos.

Foram realizados experimentos com a proteína livre (*apo*) e também incubada com cada uma das moléculas selecionadas para o estudo com o objetivo de observar o efeito de cada ligante na estabilidade térmica da proteína.

Capítulo 5

Resultados e Discussão

Parte 1: Resultados ITC e DSC

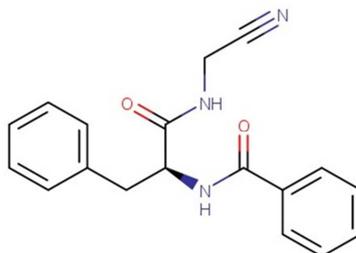
5. Resultados e Discussão:

5.1 Comparação entre os experimentos de VP-ITC e PEAQ-ITC

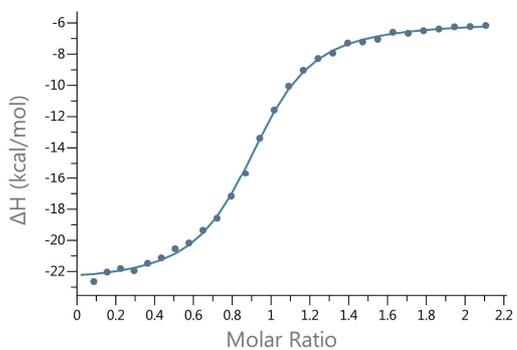
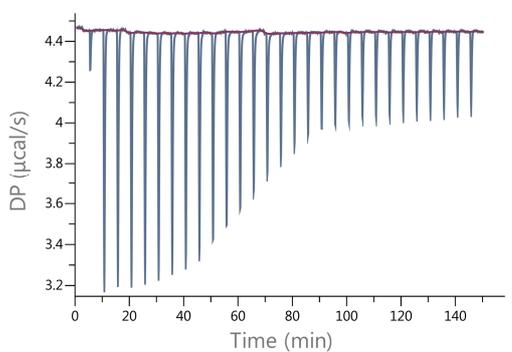
Para os experimentos, foram usados dois equipamentos, o PEAQ-ITC, mais moderno e que apresenta a cela de amostra com um volume menor (200 μL) e, portanto, é usado também um volume muito menor da solução da proteína, mas pode apresentar mais ruído na linha base e o VP-ITC que é um equipamento mais robusto e menos suscetível a interferências externas, mas que possui uma cela de amostra com volume muito maior (~1,4 mL). Observa-se pela figura abaixo que os resultados obtidos para um mesmo ligante são parecidos. Geralmente, o PEAQ-ITC é usado nos estudos, mas dependendo da dificuldade do experimento e disponibilidade da proteína, o VP-ITC é escolhido para o ensaio. Inicialmente, as análises de ITC eram feitas apenas no VP-ITC e foram otimizadas por PROKOPZYCK⁴⁵. Quando o PEAQ-ITC foi instalado tornou-se necessário, uma nova otimização, principalmente por causa da miniaturização da técnica. Para esse estudo, foi escolhido o composto NEQ0409 que foi um dos primeiros compostos sintetizados pelo grupo e inicialmente foi usado como padrão para os experimentos. A Figura 5.0 mostra o resultado do estudo:

Figura 5.0: Resultados obtidos no PEAQ-ITC X VP-ITC para a NEQ0409.

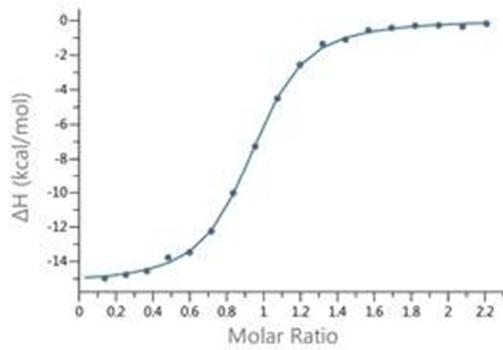
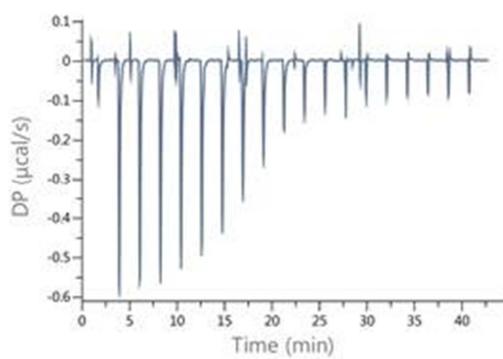
NEQ0409



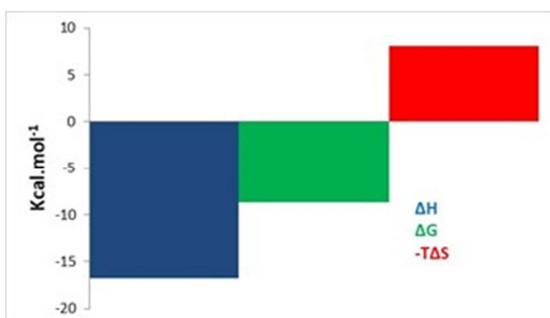
VP-ITC



PEAQ-ITC



Assinatura termodinâmica VP-ITC



Assinatura termodinâmica (PEAQ-ITC)



A Tabela 5.0 mostra a comparação entre os parâmetros obtidos nos dois equipamentos.

Tabela 5.0: Comparação dos parâmetros obtidos pelo VP-ITC e PEAQ-ITC.

Parâmetros	[P] (μM)	[L] (μM)	n	K_d (nM)	pK_d	ΔH (Kcal.mol ⁻¹)	ΔG (kcal.mol ⁻¹)	$-T\Delta S$ (kcal.mol ⁻¹)
PEAQ-ITC	15,5	150	0,9	422	6,37	-16,8	-8,70	8,06
VP-ITC	14,5	170	0,9	326	6,48	-15,4	-8,85	6,52

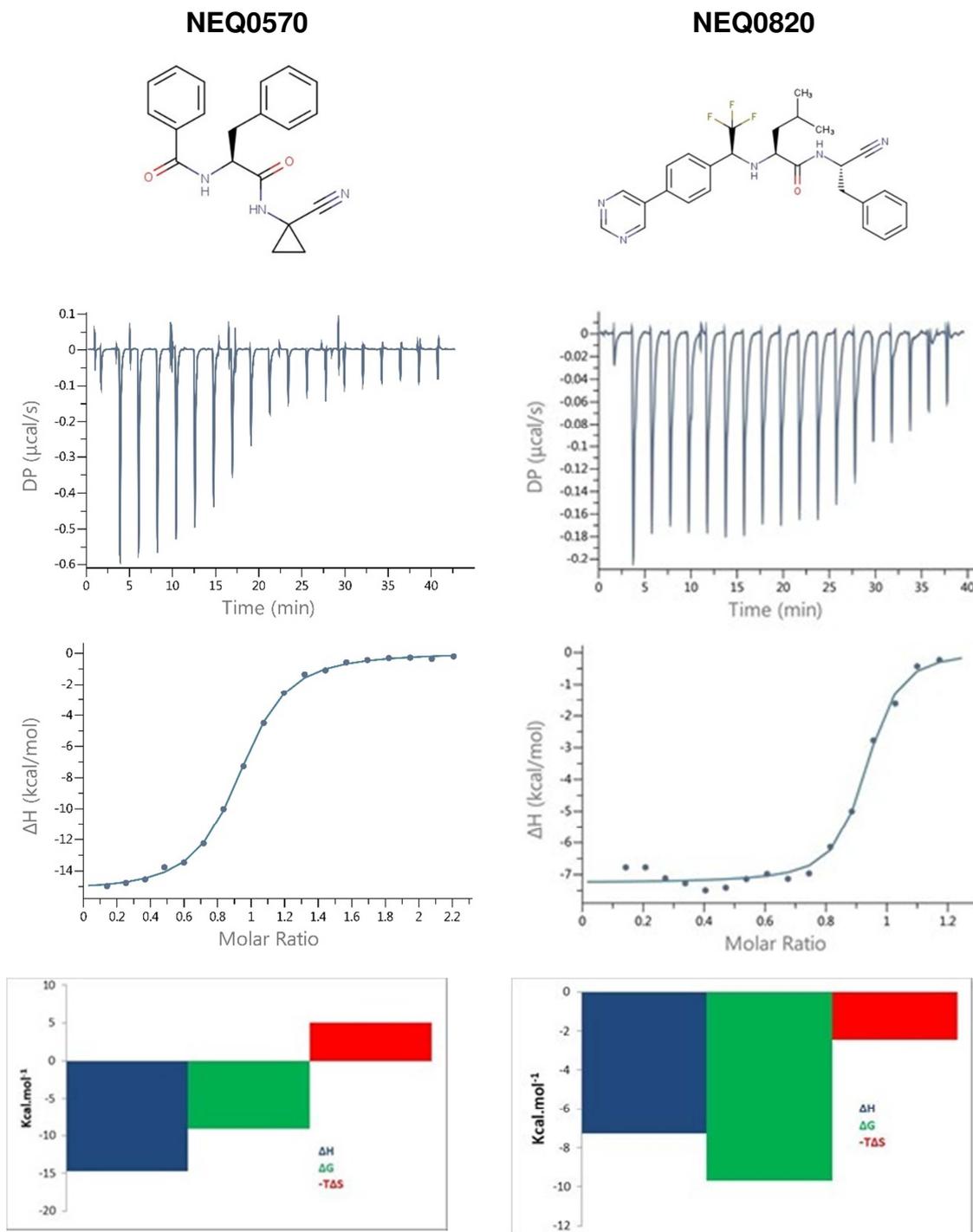
Pode-se observar que o experimento feito com o PEAQ-ITC apresenta alguns ruídos na linha base em alguns experimentos, mas apesar disso, não houve diferenças significativas nos resultados obtidos. Então, as análises seguintes foram feitas usando o PEAQ-ITC, uma vez que são mais rápidas e usam um volume menor de solução da proteína. Dependendo da estrutura da molécula em estudo no ITC, pode haver ruídos muito intensos, prejudicando o resultado. Nesses casos, as moléculas foram testada no VP-ITC.

O problema do ruído se deve também ao fato do software do PEAQ-ITC não disponibilizar a possibilidade de se fazer o equilíbrio manual da linha base, o que está disponível no software do VP-ITC e que promove um experimento mais estável e com menos ruídos.

O próximo estudo foi feito com a NEQ0570 que é usada agora como padrão para os experimentos bioquímicos, biofísicos e celulares e também a NEQ0820 que é um dos inibidores muito potentes estudados no grupo.

A Figura 5.1 mostra a comparação dos resultados obtidos para as duas moléculas.

Figura 5.1: Comparação dos resultados obtidos com a NEQ0570 (molécula padrão) e a NEQ0820.



Pode-se observar que os valores de pK_d e pK_i são praticamente iguais para a NEQ0570, apesar de uma constante ser cinética e a outra termodinâmica. Para o cálculo de pK_i é usado o substrato da enzima, já para o

cálculo de pK_d , apenas a enzima e o ligante. O trabalho com os resultados obtidos com a NEQ0570 foi publicados em DOS SANTOS *et al.*²²

Para a NEQ0820, o valor de pK_i é um pouco maior que o valor de pK_d , mesmo assim são comparáveis.

A Tabela 5.1 mostra a comparação dos valores de pK_d e pK_i para os dois compostos:

Tabela 5.1: Comparação entre os valores de pK_d e pK_i para interações da cruzaina com a NEQ0570 e NEQ0820.

Compostos	pK_d	pK_i
NEQ0570	6,90 (0,04)	6,70 (0,01)
NEQ0820	7,12 (0,03)	8,80 (0,01)

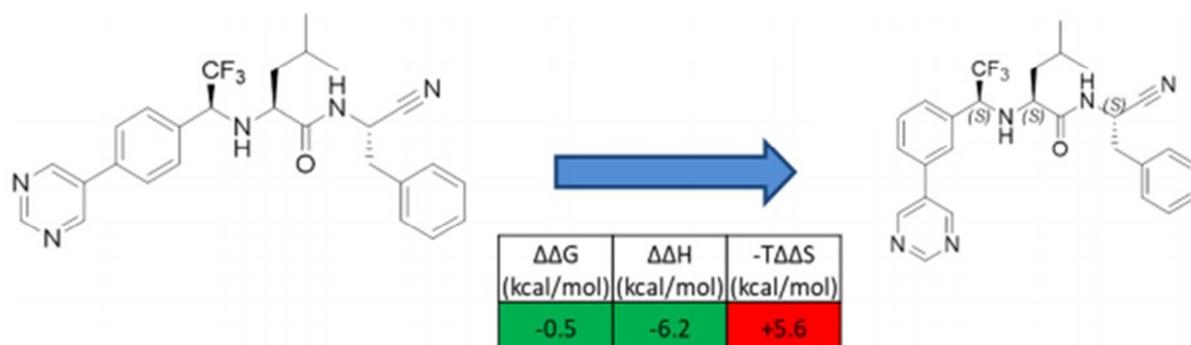
O composto NEQ0570 foi uma das primeiras nitrilas sintetizadas no grupo e é usado como padrão para os ensaios bioquímicos e biofísicos. Observa-se que a interação é entalpicamente controlada, mas a variação da entropia é detrimental, ou seja, não apresenta todos os parâmetros termodinâmicos favoráveis, o que seria mais apropriado para o desenvolvimento de novos fármacos. O grupo de síntese orgânica do grupo NEQUIMED fez várias alterações em algumas moléculas com o objetivo de tornar todos os parâmetros termodinâmicos obtidos, fossem favoráveis. Esse trabalho já foi publicado em DOS SANTOS *et al.*²²

O composto NEQ0820 apresentou todos os parâmetros termodinamicamente favoráveis como o considerado ideal no desenvolvimento de novos fármacos. Outros compostos foram modificados estruturalmente, sintetizados e tiveram suas assinaturas termodinâmicas comparadas. O NEQ0820 é análogo ao NEQ0659, que é um dos inibidores mais potentes estudados pelo grupo NEQUIMED. Esse último não foi estudado por ITC por ser insolúvel na concentração do ensaio. Esse trabalho foi publicado em CIANNI *et al.*⁴⁹

Como foi mostrado por CIANNI *et al.*,⁴⁹ a troca do grupo pirimidina da posição “para” para a posição “meta” resultou na contribuição detrimental da

entropia por causa da regioquímica da substituição como ilustrado na Figura 5.2. Pode-se dizer que a troca de posição da pirimidina gerou um aumento da entalpia, o que acabou proporcionando um pequeno aumento no valor da afinidade e também no valor de ΔG , como consequência, o valor de $-T\Delta S$ foi detrimental.

Figura 5.2: Substituição da posição da pirimidina de pára para meta resultou em contribuição detrimental.⁴⁸



Um outro estudo feito no grupo foram os experimentos de calorimetria de titulação isotérmica para o inibidor K777, que é um inibidor irreversível de cisteína protease já conhecido e o NEQ0682. Esse último, foi um composto modificado pelo grupo de síntese do NEQUIMED, onde o grupo vinil sulfona do K777 foi substituído por um grupo nitrila. Primeiro, titulou-se o NEQ0682, e em seguida o K777 que como era um ligante muito forte (tight-binding), o experimento foi realizado de forma direta e indireta.

O método indireto de interação foi usado para comprovar os valores obtidos pelo método direto. Esse método é usado quando a interação é muito forte (tight-binding) e a constante de dissociação é difícil de ser calculada com precisão como descrito por VELASQUEZ – CAMPOY³¹, onde a proteína foi previamente incubada com o ligante mais fraco (que tem seus parâmetros termodinâmicos previamente conhecidos) e posteriormente titulada com o ligante mais forte, cujos parâmetros termodinâmicos ainda eram desconhecidos.

O ajuste foi feito pelo software do equipamento, utilizando o método competitivo de análise. Pode-se dizer que a energia de ligação é exotérmica para as duas moléculas em estudo. Os dois ligantes apresentam ganhos de

entalpia que são compensados por uma perda de entropia. Observando a assinatura termodinâmica, podemos observar que o inibidor irreversível é termodinamicamente mais favorável (K777) do que o inibidor reversível (NEQ0682). Com a complexidade da molécula K777 reduzida, houve a perda de afinidade de 1,9 unidades em escala logarítmica que se deve ao efeito de compensação entalpia-entropia (EEC).

5.1 Estudo com o K777 e NEQ0682

A Tabela 5.2 abaixo mostra os parâmetros termodinâmicos obtidos para um estudo realizado com a substância K777 (um dos mais bem sucedidos agentes tripanocidas) que é uma vinil sulfona, inibidor irreversível da enzima cruzaina e o composto NEQ0682, que foi sintetizado no grupo NEQUIMED, onde houve uma substituição do grupo vinil sulfona pelo grupo nitrila, tornando o composto NEQ0682, um inibidor reversível. Esses dados já foram publicados em SILVA *et al*⁵⁰. Abaixo encontram-se os resultados de ITC para as interações cruzaina com o K777 (método direto e indireto) e com o NEQ0682. Os valores de desvio padrão calculados estão entre parênteses.

Tabela 5.2: Parâmetros termodinâmicos obtidos para as trinte e seis moléculas estudadas contra a enzima cruzaina.

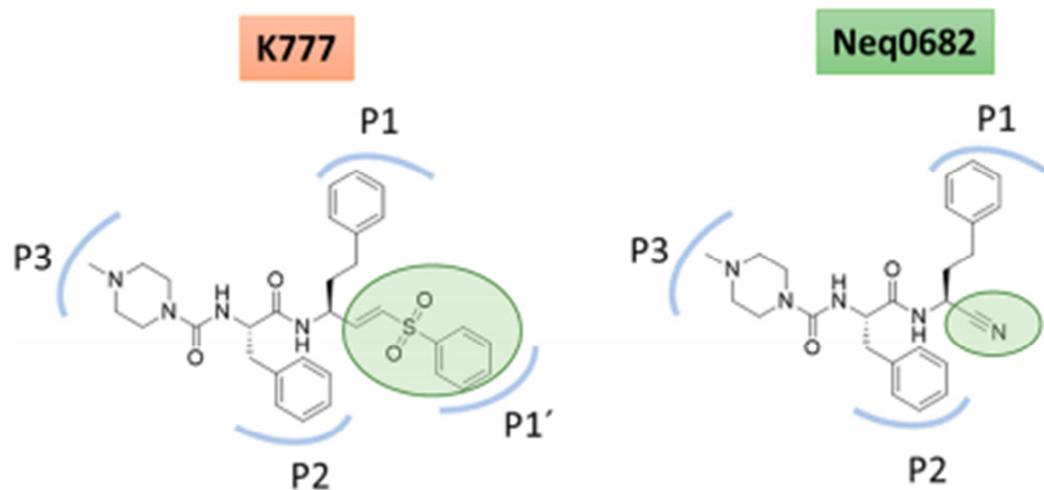
Molécula	[P] μM	[L] μM	Kd (nM)	PK _d	n	ΔH (kcal.mol ⁻¹)	ΔG (kcal.mol ⁻¹)	-T ΔS (kcal.mol ⁻¹)	Chi-sqr (kcal/mol) ²
NEQ0682	14,6 (1,70)	160	422 (9,19)	6.37 (0,007)	0.9	-14,9 (1,13)	-8,70 (0,014)	6.16 (1,12)	3.6.10 ⁻²
K777 direto	14,0 (1,68)	160	11,8 (7,31)	7,92 (0,64)	0.9	-19,8 (2,12)	-10,8 (0,92)	8,94 (2,98)	9,3.10 ⁻²
K777 indireto*	33,1 (0,80)	300	1,87 (0,85)	8,73 (0,56)	0.9	-21,9 (1,53)	-11,9 (0,42)	9.96 (1,95)	9.1.10 ⁻²

*Método indireto: Proteína incubada com Neq0682 200 μM

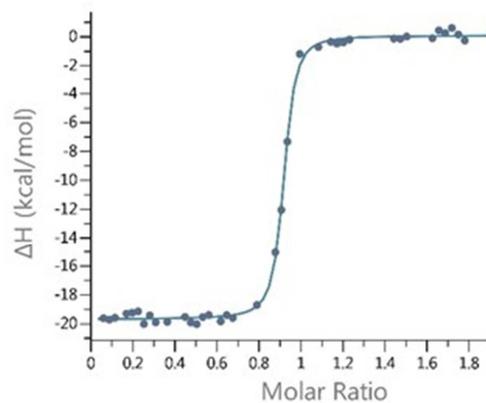
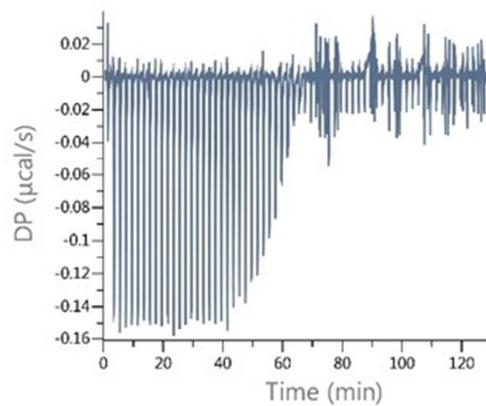
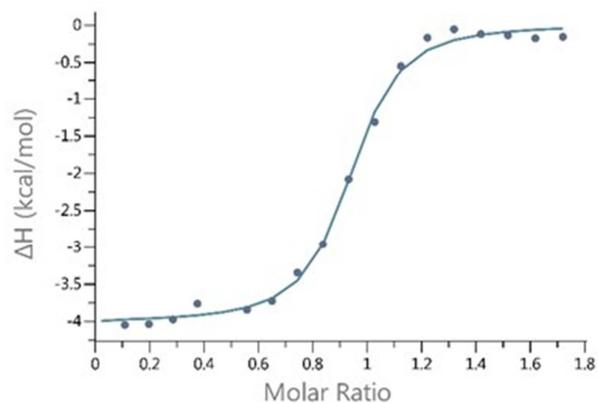
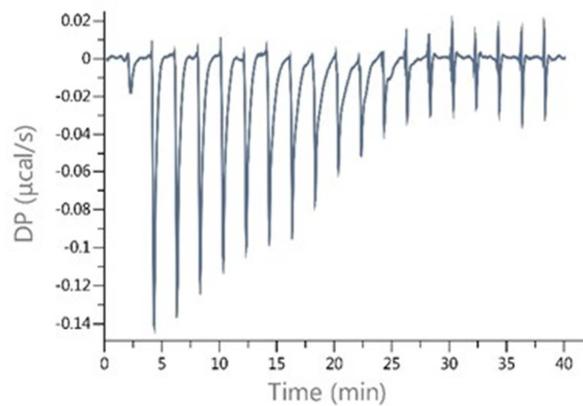
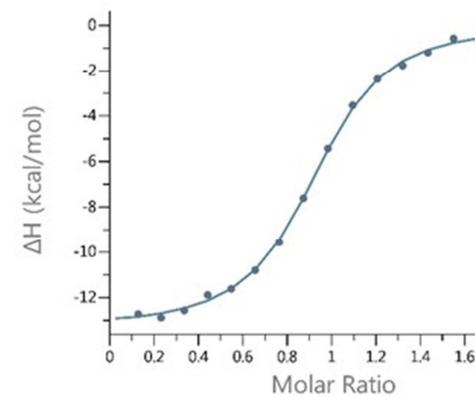
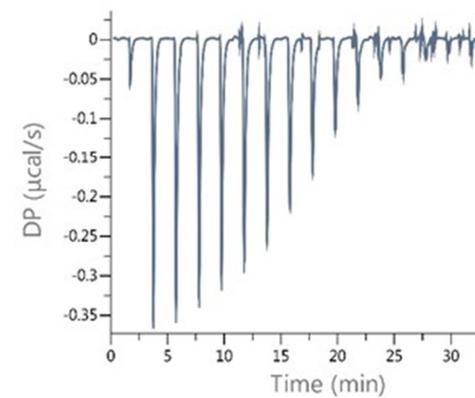
A Figura 5.3 mostra os dados obtidos no PEAQ-ITC para esse estudo:

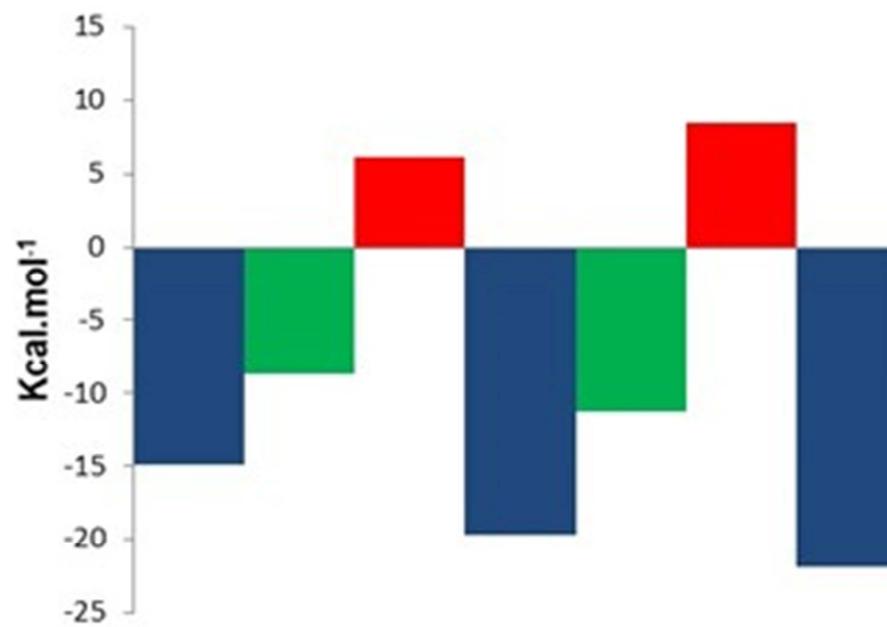
- Estudos K777 e NEQ0682

Figura 5.3 a) Estrutura dos compostos K777 e NEQ0882 b) Comparação dos resultados de ITC obtidos pelo método direto e indireto para o composto K777 e o composto modificado NEQ0682 c) Comparação entre as assinaturas termodinâmicas.



a)

**K777 direto****K777 indireto****NEQ0682****b)**

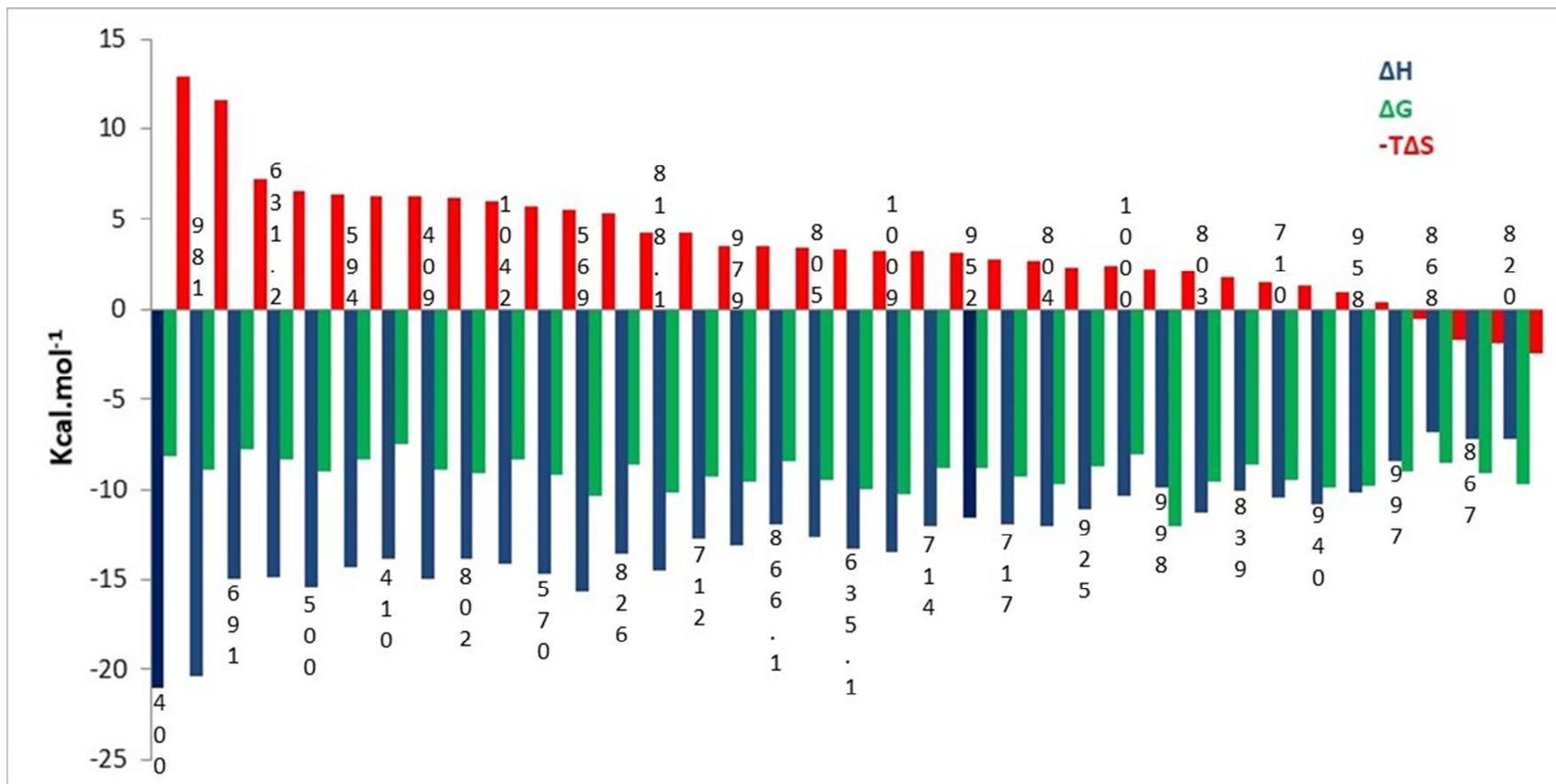


ΔH
 ΔG
 $-T\Delta S$

c)

5.2 Comparação entre as Assinaturas Termodinâmicas

Figura 5.4: Comparação entre as assinaturas termodinâmicas das trinta e seis moléculas em estudo.



A Figura 5.4 mostra a comparação das assinaturas termodinâmicas para 36 moléculas sintetizadas e estudadas no grupo NEQUIMED.

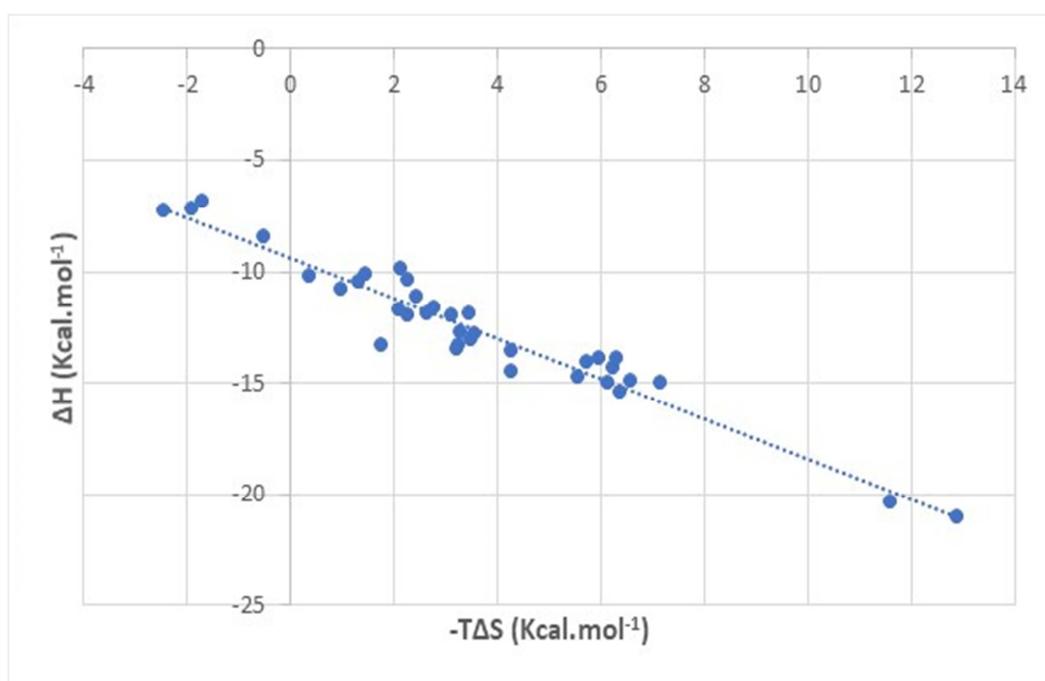
Para todos os experimentos, o valor de n foi fixado em 0,9 e a concentração da proteína ativa foi calculada pelo software do equipamento. O experimento foi realizado dessa forma, uma vez que a proteína sofre auto proteólise e uma parcela da proteína total pode não estar ativa. Os valores de pK_d foram calculados aplicando-se o operador p ($-\log_{-10}$) que é um valor escalonado da constante de dissociação. Muitas moléculas apresentam interações fortes (valores pequenos de K_d) com a cruzaina, como é o caso da NEQ0569 ($K_d = 23,5$ nM), NEQ0940 ($K_d = 33,20$ nM) e NEQ1009 ($K_d = 29,8$ nM). Para essas moléculas, é possível observar também, valores muito negativos para ΔG , uma vez que quanto mais forte a interação (valores baixos de K_d) mais negativos são esses valores.

Observa-se também que todas as moléculas apresentam interações entalpicamente dirigidas e praticamente todas apresentam contribuição entrópica detrimental que é decrescente de acordo com o gráfico (da esquerda para a direita). Até mesmo a molécula NEQ0570, (utilizada como padrão) apresenta contribuição entrópica detrimental. Observa-se também que o valor de ΔG é praticamente constante para os 36 compostos em estudo. O composto NEQ0958 ainda apresenta entropia detrimental, mas é a menor de todas. Já os compostos NEQ0867, NEQ0868 e NEQ0820 e NEQ0997 apresentam todas as condições favoráveis. Sabe-se que apesar da busca por compostos que apresentem todos os parâmetros termodinâmicos favoráveis, nem sempre é possível modificar a estrutura da molécula para conseguir todos os parâmetros favoráveis, uma vez que a moléculas pode perder solubilidade, por exemplo. As fórmulas estruturais de todos os compostos em estudo encontram-se no Anexo 1.

5.3 Gráfico de EEC

A análise dos parâmetros termodinâmicos nos permite contornar armadilhas potenciais tais como as contribuições entálpicas que são compensadas pelas penalidades entrópicas⁵¹. A curva de compensação entálpica-entrópica (EEC) facilita a pontuação de compostos na fatorização da energia de interação em função da entalpia e da entropia. Com a curva de EEC, é possível observar se existe um balanço entre os dois parâmetros.^{50,51,52} A Figura 5.5 mostra a relação entre ΔH e $-T\Delta S$ para as 36 dipeptidilnitrilas estudadas e pode-se observar um comportamento linear (com inclinação igual a $-0,9024$ e $R^2 = 0,9351$). Onde ($\Delta H = -0,9024(-T\Delta S) - 9,3694$ para $n = 36$).

Figura 5.5: Curva EEC. A linha azul representa o ajuste linear.



5.4 Resultados DSC

- Otimização dos estudos de calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Estudos preliminares foram feitos para a otimização dos estudos de DSC. Primeiramente, a estabilidade térmica da cruzaína em diferentes formas: a selvagem (Wild type), mutante (C25A), selvagem inibida com MMTS (methyl methanethiosulfonate) e também o zimogênio (proteína com o prodomínio). A enzima mutante, possui uma alanina substituindo a histidina.

Inicialmente, os experimentos estavam sendo feitos utilizando uma varredura de 1 grau/ min, mas como mostrado por ROCHO *et al.*¹⁹ O processo é irreversível, portanto, fez-se um estudo rápido de velocidade de varredura com o objetivo de verificar a dependência do valor de T_m em função da velocidade de varredura.

A tabela abaixo mostra os resultados:

Tabela 5.3: Estudo de otimização de velocidade de varredura para os ensaios de DSC.

Velocidade de varredura (°C/min)	T_{m1} (°C)	ΔH (kcal/mol)	T_{m2}	ΔH (kcal/mol)
0,5	-	-	61,56	96,38
1,0	55,00	53,70	65,78	114,81
1,5	57,99	44,60	67,53	130,40
2,0	57,99	56,17	68,33	121,20

Pode-se observar que com o aumento da velocidade de varredura, houve um aumento também nos valores de T_m , que passou a ser praticamente constante quando as velocidades foram de 1,5 e 2,0 °C/min. Como o equipamento não permite uma velocidade maior de varredura, a velocidade de 2,0 °C/min foi adotada para os próximos experimentos. Esse comportamento já era esperado, por ser um processo irreversível, como foi mostrado por

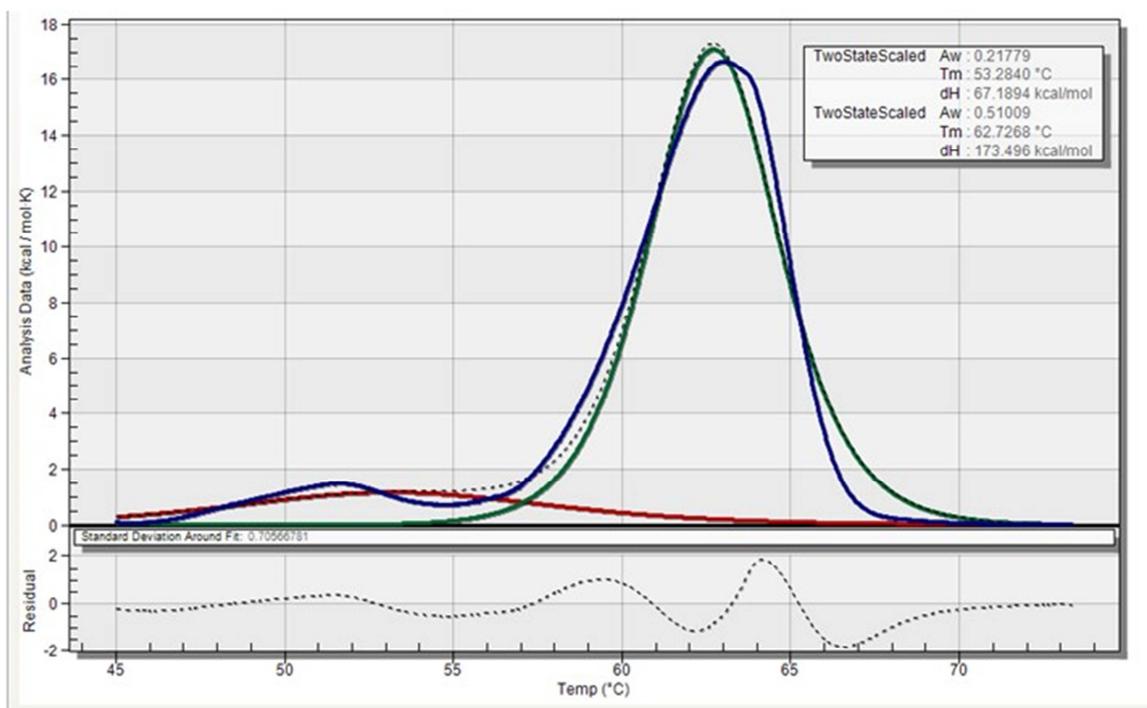
ROCHO.¹⁹ Por isso, os experimentos não foram repetidos e não houve a apresentação de desvios padrão nos resultados.

Escolheu-se então, para os experimentos, a condição de 2 graus/minuto e uma varredura de 0 a 90°C visto que a temperatura de desnaturação térmica da enzima era em torno de 65°C. Foram realizados também, alguns experimentos para verificar a estabilidade térmica da enzima cruzaina com o inibidor MMTS, da enzima com o prodomínio (zimogênio) e da mutante C25A.

5.5 Cruzaina mutante (C25A)

A figura abaixo mostra o termograma da enzima mutante (C25A).

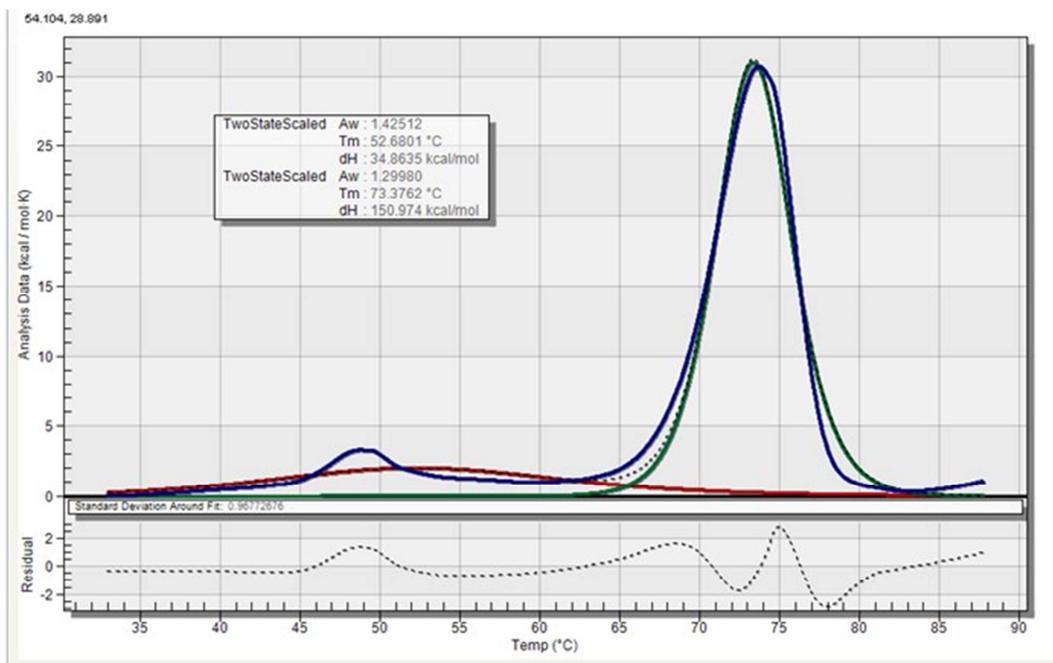
Figura 5.6: Varredura da cruzaina C25A obtida por DSC.



A enzima cruzaina mutante, que possui uma alanina substituindo a cisteína (foi produzida no grupo NEQUIMED). Ela foi testada, uma vez que não sofre auto proteólise como a Wild Type. Observando-se o gráfico, pode-se concluir que a C25A é estável, mas sua interação com os melhores ligantes sintetizados pelo grupo NEQUIMED não se mostrou eficiente no ITC, por isso não foi mais utilizada.

5.6 Varredura usando o zimogênio (proteína com o prodomínio)

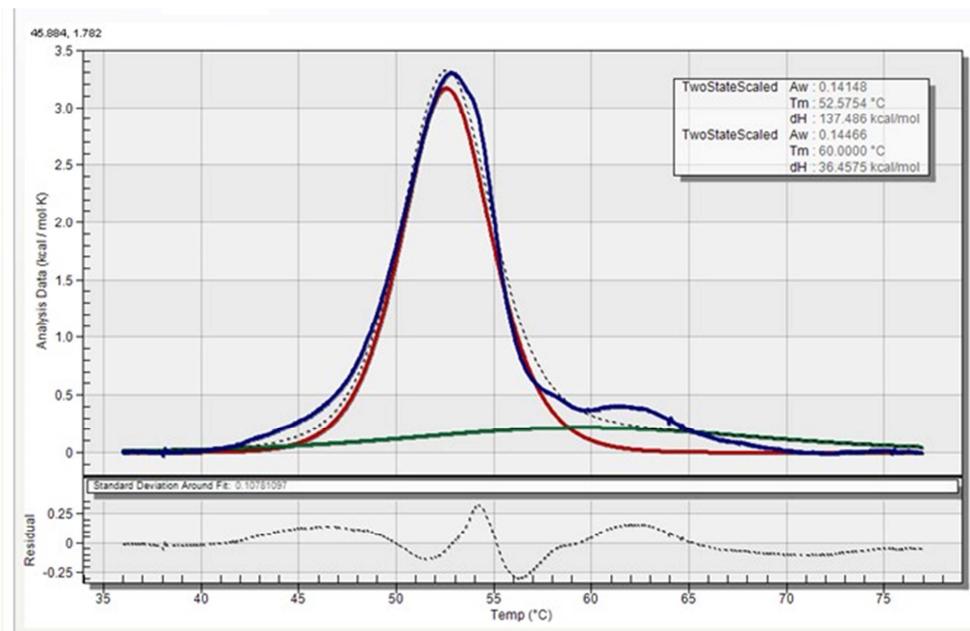
Figura 5.7: Gráfico de varredura obtido para o zimogênio



Esse experimento foi realizado apenas para mostrar o que ocorre com a enzima antes da etapa de ativação, é mais estável que a enzima Wild Type, mas não apresenta atividade, portanto não foi usado para os ensaios com os ligantes.

5.7 Varredura usando a enzima Wild type inibida com MMTS (S-Metil metanotiosulfonato).

Figura 5.8: Termograma da cruzaína inibida com MMTS.

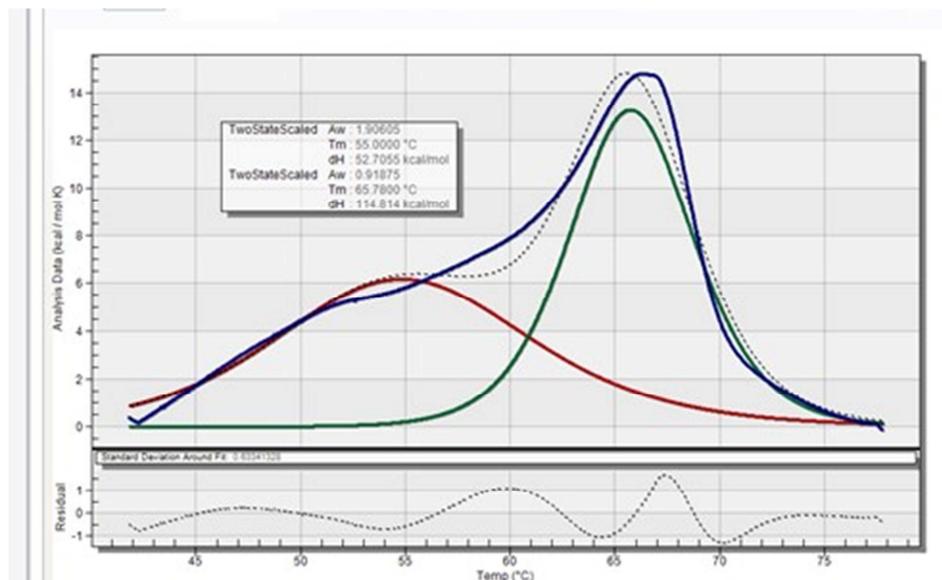


Pode-se observar que na presença do inibidor reversível MMTS, a cruzaína WT fica menos estável, ou seja, o valor de T_m fica com treze graus a menos do que na ausência do ligante. Em todos os experimentos, houve a formação de 2 picos. O pico menor pode ser explicado pelo tempo longo de diálise, uma vez que a enzima sofre auto proteólise.

5.8 Cruzaina Wild Type com TCEP (Tris (2-carboxyethyl) phosphine)

A Figura 5.9 mostra o estudo realizado com a proteína Wild Type (WT) usando TCEP como agente redutor.

Figura 5.9: Gráfico de varredura obtido com a cruzaina WT usando TCEP e 1,5 horas de diálise.

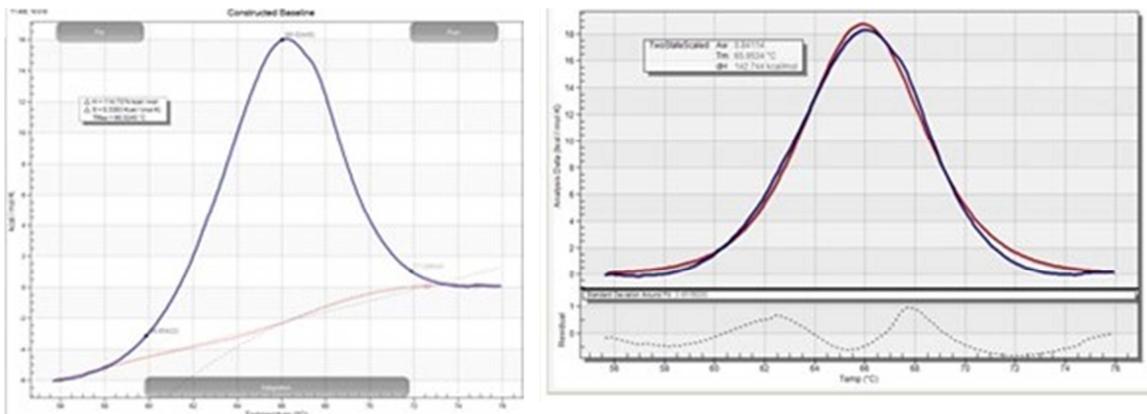


Inicialmente, a cruzaina WT era purificada e armazenada com 5 mM do agente redutor Diethiotreitol (DTT). Antes do experimento, era feita a diálise por aproximadamente 1,5 horas com uma membrana de 10 KDa, Amicon ultra (Merck – Millipore) com o tampão contendo TCEP, mais indicado para uso em calorimetria. Observou-se que houve o aparecimento de dois picos, um na região de 55 °C e outro na região de 65°C. Esse fato pode ser explicado pelo tempo de diálise muito longo, uma vez que a proteína sofre auto proteólise. Como é uma enzima monomérica, esperava-se encontrar apenas um pico de desnaturação, dessa forma, houve a tentativa de otimização do experimento. Assim, nos próximos experimentos, passou-se então a preparar a proteína e já guardá-la armazenada em β -mercaptoetanol, que também é recomendado para uso em calorimetria. Dessa forma, o tempo de diálise passou a ser apenas de 30 minutos.

5.9 Cruzaina com β - mercaptoetanol

Com a substituição do agente redutor e conseqüentemente, o tempo de diálise, foi obtido apenas um pico da proteína com o T_m aproximado de 65°C e esse método foi utilizado para os experimentos seguintes com os ligantes.

Figura 5.10: a) Gráfico mostrando os valores de ΔC_p e ΔH_{cal} obtidos para a cruzaina Apo. b) Gráfico de varredura usando β -mercaptoetanol e 30 minutos de diálise, mostrando o ajuste do equipamento e os parâmetros calculados (linha preta: experimento e linha vermelha: ajuste).



a)

b)

Observando as figuras, podemos concluir que usando o β -mercaptoetanol como agente redutor e um tempo menor de diálise, obteve-se um único pico de desnaturação da proteína com um ajuste dos parâmetros praticamente perfeitos. Observa-se uma temperatura de desnaturação (T_m) de 65,95 °C, um $\Delta C_p = 6,28$ kcal/mol, $\Delta H_{cal} = 114,74$ kcal/mol e $\Delta H_{vH} = 142,75$ kcal/mol.

Um ΔC_p positivo indica que o C_p do estado desnaturado é maior que o C_p do estado nativo. Isso se deve principalmente a exposição de aminoácidos hidrofóbicos da estrutura da proteína às moléculas do solvente.

5.9.1 Resultados obtidos na varredura da cruzaina com alguns ligantes

Utilizando as condições previamente otimizadas, alguns ligantes sintetizados no grupo foram testados contra a enzima cruzaina no DSC.

Tabela 5.4: Parâmetros obtidos por DSC com alguns ligantes sintetizados no grupo.

Molécula	T_m (°C)	ΔH_{vh} (Kcal.mol ⁻¹)	ΔH_{cal} (Kcal.mol ⁻¹)
Cruzaina Apo	65,95 (0,16)	142,7 (4,16)	114,7 (6,07)
NEQ0409	71,75 (0,43)	132,1 (27,19)	62,67 (50,03)
NEQ0543	76,52 (0,36)	174,5 (11,2)	160,2 (6,78)
NEQ0551	71,05 (0,08)	123,1 (0,023)	116,7 (1,60)
NEQ0568	78,18 (0,30)	210,1 (18,7)	113,8 (38,5)
NEQ0569	78,09 (0,94)	184,3 (0,32)	174,1 (3,93)
NEQ0570	72,62 (0,035)	135,0 (1,56)	125,4 (25,4)
NEQ0572	66,74 (0,03)	129,9 (25,4)	127,3 (0,275)
NEQ0710	73,35 (0,04)	141,87 (2,16)	139,84 (17,3)
NEQ0805	74,25 (0,43)	184,26 (24,5)	111,0 (28,1)
NEQ1040	76,11 (0,25)	168,6 (2,67)	143,1 (9,78)

Os altos valores de T_m na presença do ligante mostrados na Tabela 5.4, significa que o mesmo interagiu com a fração enovelada da proteína, estabilizando sua estrutura⁵⁴. Podemos observar que os ligantes NEQ0568 e NEQ0569 são os que mais estabilizam a cruzaina com um ΔT_m de 12,23°C e 12,14°C. O composto NEQ0572 apresenta uma interação mais fraca com a cruzaina, mantendo o valor de T_m muito próximo ao da cruzaina apo.

De forma geral, observa-se que quando a interação é muito forte no ITC, o deslocamento do valor de T_m também é grande, como é o caso da NEQ0569, que apresenta um $K_d = 23,5$ nM e ΔT_m de 13°C.

Houve a tentativa de se calcular os valores de K_d no T_m da proteína para se fazer posteriormente uma extrapolação e obter os valores a 25°C e dessa forma, conseguir uma comparação para os valores de K_d obtidos pelo ITC. Mas não foi possível, uma vez que o cálculo desse parâmetro para o n-DSC envolve o valor de ΔC_p na presença do ligante, que é um valor calculado com pouca precisão nos experimentos, podendo induzir a erros de cálculo.

5.9.2 Perspectivas Futuras

O grupo NEQUIMED continuará a busca por substituições nas estruturas químicas das moléculas para que se diminua as penalidades entrópicas e que não ocorra parâmetros termodinâmicos deletérios. Alguns parâmetros cinéticos importantes como K_{on} e K_{off} serão calculados para a próxima publicação. A razão K_{off} sobre K_{on} é igual ao valor de K_d . O cálculo desse parâmetro é importante para determinar o tempo de residência do ligante no sítio ativo da enzima e dessa forma poder avaliar a afinidade da enzima pelo inibidor.

Capítulo 6

Resultados e Discussão: Parte 2

Relação Estrutura Atividade (SAR)

6. Relação Estrutura-Atividade (SAR)

Em Química Medicinal, as análises de relação estrutura atividade (SAR) relacionam a estrutura química à atividade biológica de uma série de compostos análogos.

Foram escolhidas alguns grupos de moléculas estudadas por ITC para o estudo de SAR. As moléculas desse estudo são as mesmas usadas por CIANNI⁵⁵ que fez a determinação dos pK_is.

Por exemplo, a NEQ0570 (usada como padrão em todos os experimentos) teve sua estrutura modificada com diferentes substituintes (-OH), (-Cl), (-CH₃) nas posições orto, meta e para do anel aromático.

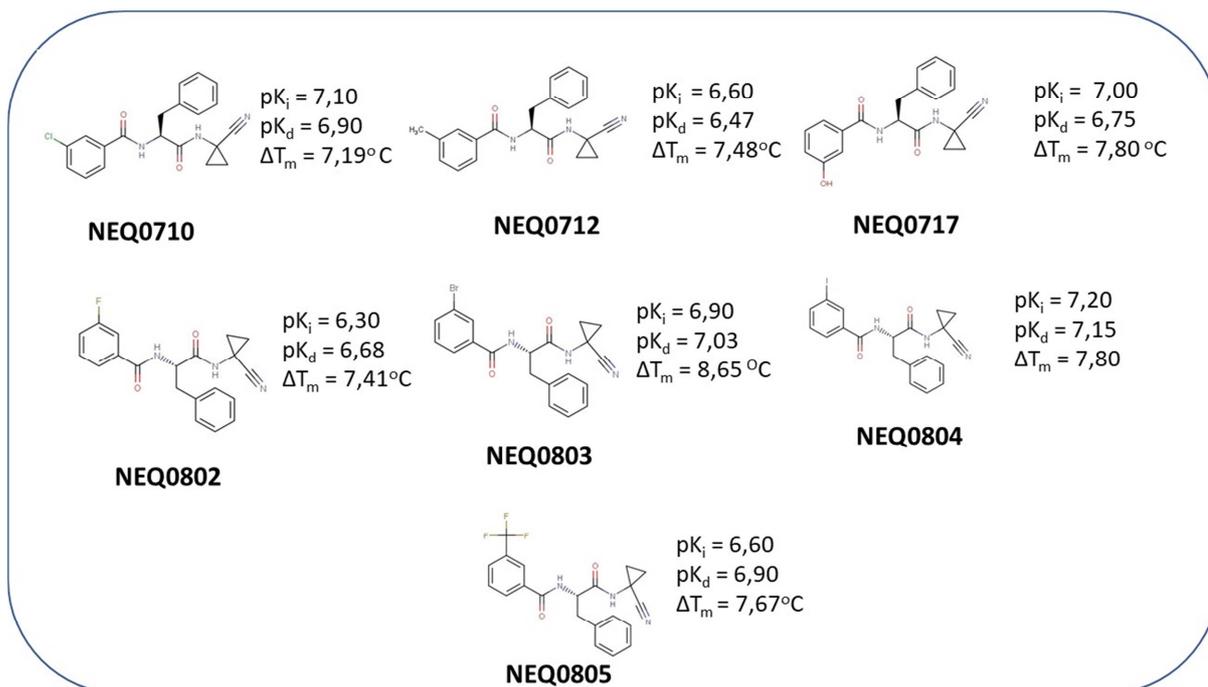
A tabela 6.0 mostra os compostos com as modificações nas diferentes posições:

Tabela 6.0: Modificações feitas na estrutura química do composto em diferentes posições.

Nº	R ₁	R ₂	R ₃
NEQ0710	-H	-Cl	-H
NEQ0712	-H	-CH ₃	-H
NEQ0717	-H	-OH	-H
NEQ0802	-H	-F	-H
NEQ0803	-H	-Br	-H
NEQ0804	-H	-I	-H
NEQ0805	-H	-CF ₃	-H

A figura abaixo mostra as estruturas modificadas com os respectivos valores de pK_i, pK_d e ΔT_m.

Figura 6.0: Mudança estrutural feita nas moléculas com seus respectivos valores de pK_i , pK_d e ΔT_m .

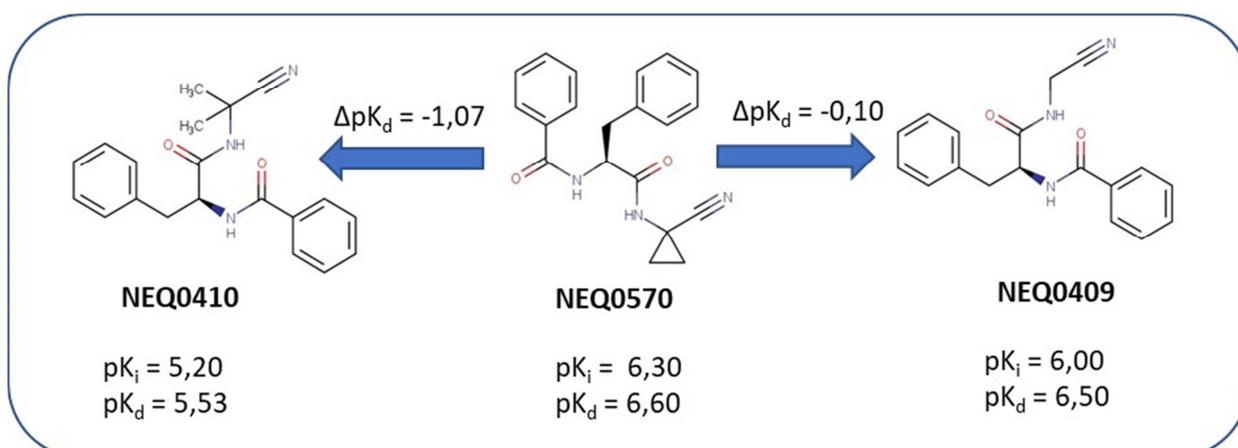


Comparando-se todas as estruturas, pode-se observar que na maioria dos casos, os valores de pK_d são um pouco menores que os valores de pK_i apesar de muito próximos⁵⁶, isso pode ser explicado pela maior afinidade da enzima pelo substrato do que pelo ligante, uma vez que o substrato da enzima é usado apenas no ensaio de pK_i . A maior afinidade do ligante pela proteína ocorre com a NEQ0804 que comparada a NEQ0712, tem uma perda de afinidade de 0,70 na escala log quando os valores de pK_d são comparados. Para todas as moléculas, o valor da entropia é detrimental.

Os valores de ΔT_m são muito próximos, com valores um pouco maiores do que 7° C para todas as moléculas, com exceção da NEQ0803 que apresenta um ΔT_m de 8,65° C, mostrando que todos os compostos se ligaram a fração enovelada da proteína, estabilizando-a.

O composto NEQ0570 também foi modificado na posição P1, onde temos outros dois compostos, O NEQ0409 e NEQ0410.

Figura 6.1: Representação de SAR para os compostos NEQ0570, NEQ0409 e NEQ0410.



As modificações feitas na NEQ0570 diminuíram a afinidade dos compostos NEQ0409 e NEQ0410 pela cruzaina. Para o NEQ0410, houve uma diminuição de 1,07 no valor de pK_d e para o NEQ0409, a diminuição foi menor, de 0,1.

A tabela abaixo mostra a comparação das assinaturas termodinâmicas para os três compostos:

Tabela 6.2: Comparação entre as assinaturas termodinâmicas dos três compostos em estudo.

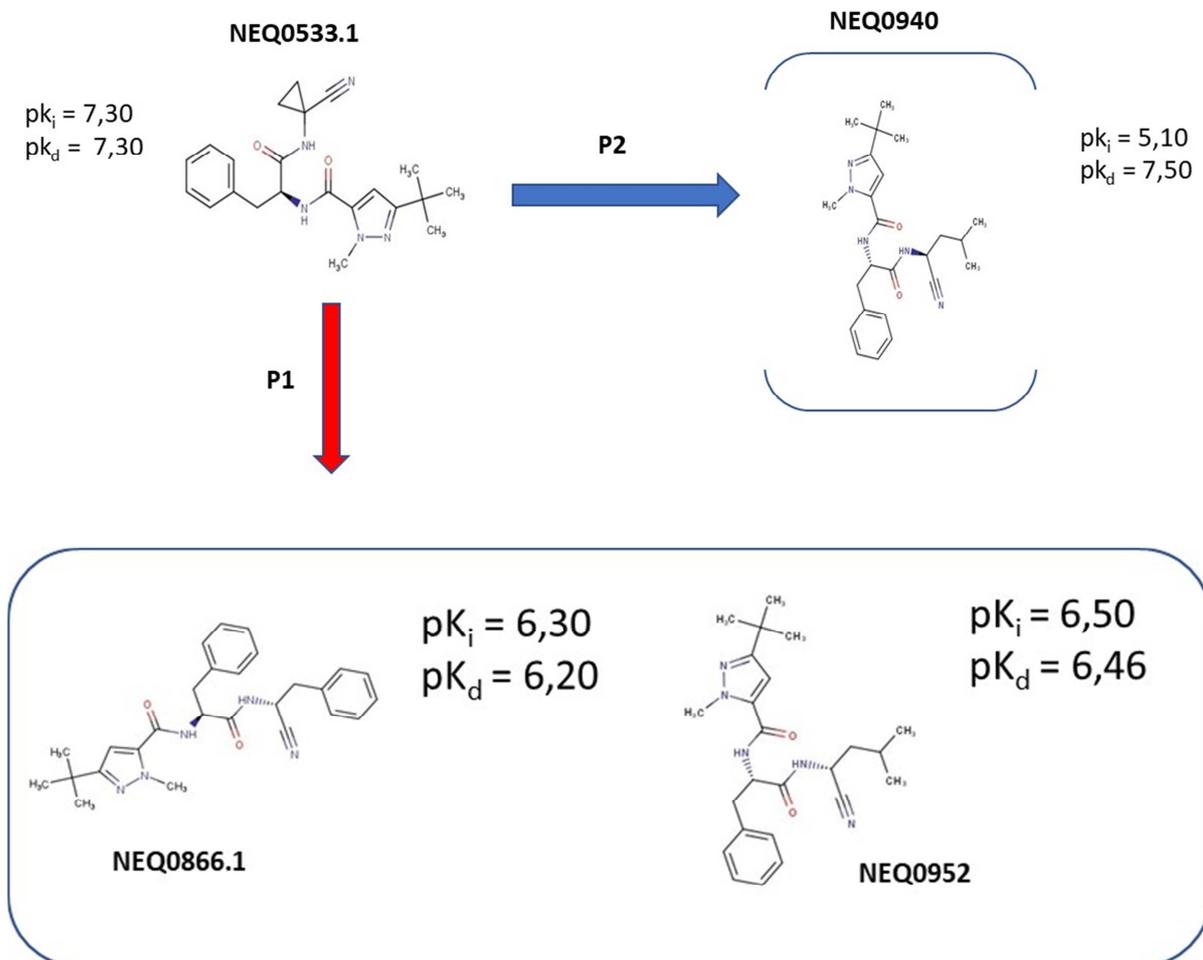
NEQ0410	NEQ0570	NEQ0409
ΔH ΔG $-TAS$		

Observando as assinaturas termodinâmicas, podemos concluir que mesmo com as modificações feitas na estrutura da NEQ0570, a entropia continuou detrimental para as novas moléculas.

Para a NEQ0409, o valor da entropia ficou ainda mais positivo quando comparado a NEQ0410.

No próximo estudo, as moléculas foram testadas contra a forma amastigota da cepa Tulahuen de *Trypanosoma cruzi*. O composto NEQ0940 teve o mesmo desempenho tripanocida que foi obtido com o composto Benzonidazol.

Figura 6.2: SAR para os compostos NEQ0533.1, NEQ0940, NEQ0866.1 e NEQ0952 contendo os valores de pK_d e pK_i .



O potencial citotóxico do composto NEQ0940 foi estudado usando ensaio celular e o composto foi avaliado durante três dias sendo que o Benzonidazol foi utilizado como controle. Foi observado que o composto NEQ0940 não apresenta toxicidade, assim como o Benzonidazol e pode ser

considerado como um novo candidato para testes *in vitro* contra a forma infectiva da cepa Tulahuen de *Trypanosoma cruzi*.

Quanto aos ensaios biofísicos e bioquímicos, os valores de pK_d e pK_i obtidos são muito próximos e para os ensaios de ITC, nenhum desses compostos apresentou os três parâmetros termodinâmicos favoráveis, ou seja, o valor de $-T\Delta S$ é detrimental.

5.9.3 Conclusões Finais

Apesar da doença de Chagas ter sido descoberta em 1909, não existe até hoje nenhum tratamento eficaz para a doença. Nos últimos anos, diversos grupos de pesquisa no Brasil e no mundo têm se dedicado a descoberta de compostos com propriedade tripanossomicida.

Inicialmente foram otimizadas condições experimentais para os estudos de interações usando o PEAQ-ITC que utiliza uma menor quantidade de solução da proteína para o ensaio. Apesar de estar sujeito a maiores interferências do meio externo, foi possível observar que os resultados são parecidos aos obtidos quando o mesmo estudo foi realizado usando o VP-ITC. Das 36 moléculas que tiveram suas estruturas modificadas, quatro delas apresentaram o perfil termodinâmico favorável como exigido no planejamento de novos candidatos a novos fármacos.

Estudos de interação no DSC também foram feitos para algumas moléculas. Como poucos ensaios tinham sido realizados com a cruzaina usando essa técnica, foi necessário que um estudo prévio de otimização dos parâmetros experimentais fosse realizado. Pode-se observar um valor elevado de ΔT_m em para algumas moléculas estudadas, mostrando a forte interação da cruzaina com esses compostos.

Para os ensaios de SAR, foram comparados os valores de pK_d e pK_i e verificou-se que são muitos próximos. O composto NEQ0940 não se mostrou tóxico, assim como o benzonidazol e pode ser selecionado para os ensaios *in vitro*. Os compostos que apresentaram todos os parâmetros termodinâmicos favoráveis ainda não foram testados contra o parasito e estão em fase de otimização. O trabalho experimental para a publicação do último artigo (de

primeira autoria) referente a esse trabalho está em fase de conclusão. O manuscrito já está sendo redigido e mostrará a comparação entre assinaturas termodinâmicas de diferentes moléculas sintetizadas pelo grupo NEQUIMED e também o cálculo dos parâmetros K_{on} e K_{off} para verificar por quanto tempo a enzima ficaria inibida por cada um dos ligantes em estudo.

Capítulo 7

Referências Bibliográficas

7.0 Referências Bibliográficas

- 1 VALVERDE, R. **Doenças negligenciadas**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, [20--]. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7as-negligenciadas>. Acesso em: 20 nov. 2021.
- 2 CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENT. **Whats is Chagas disease?** Atlanta: CDC, 2021. Disponível em: https://www.cdc.gov/parasites/chagas/gen_info/detailed.html. Acesso em: 02 out. 2021.
- 3 ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Chagas disease (also know as American trypanosomiasis)**. [S. l.]: OMS, 2021 Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Acesso em 12 set. 2021.
- 4 REYES, C.C. **Síntese de Dipeptidilnitrilas como Inibidores da Enzima Cruzaína**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2014.
- 5 DRUGS FOR NEGECTED DISEASE INITIATIVE. **Chagas disease**. Rio de Janeiro: DNDI, [20--]. Disponível em: <https://www.dndial.org/doencas/doenca-chagas/>. Acesso em 10 out. 2021.
- 6 JULIÃO, A. **Apesar de avanços, doenças negligencias ainda demandam atenção**. Agência FAPESP, São Paulo, 2019. Disponível em: <http://agencia.fapesp.br/apesar-de-avancos-doencas-negligenciadas-ainda-demandam-atencao/29753/>. Acesso em: 05 set. 2021.
- 7 JUDICE, W. A. S.; CEZARI, M. H. S.; LIMA, A.; LIMA, A. P. C. A.; SCHARFSTAIN, J.; CHAGAS, J. R.; TERSARIOL, I. L. S.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L. Comparison of the specifity, stability and individual rate constants with respective activation parameters for the peptidase activity of cruzipain and its recombinat form, crusain, from *Trypanosoma cruzi*. **European Journal of Biochemistry**, Chichester, v. 268, p. 6578 – 6586, 2001.
- 8 LEAVITT, S.; FREIRE, E. Direct measurement of protein binding energetics by isothermal trititation calorimetry. **Biophysical Methods**, Amsterdam, p. 560-566, 2001.
- 9 WIGGERS, H. **Integração de métodos *in silico* e *in vitro* para o planejamento de inibidores da enzima cruzaína**. 2011. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.
- 10 MCGRATH, M. E.; EAKIN, A. E.; ENGEL, J. C.; MCKERROW, J. H.; CRAIK, C. S.; FLETTERICK, R. J. The crystal structure of cruzain: a therapeutic target for Chagas' disease. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 247 ,n. 2, p. 251-259, 1995.

11 FERNANDES, W. B. **Determinação do modo de ligação de inibidores reversíveis da cruzaina de *Trypanosoma cruzi* via cristalografia de raios X**. 2015. Tese (Doutorado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

12 GRÜNER, S.; NEEB, M.; BARANDUN, L. J.; SIELAFF, F.; HONH, C.; KOJIMA, S.; STEINMETZER, T.; DIEDERICH, F.; KLEBE, G. Impact of protein and ligand impurities on ITC-derived protein-ligands thermodynamics. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1840, p. 2843-2850, 2014.

13 GOMES, J. CIANNI, L.; RIBEIRO, J.; ROCHO, F. R.; SILVA, S. C. M.; BATISTA, P. H. J.; MORAES, C. B.; FRANCO, C. H.; FREITAS-JUNIOR, L. H. G.; KENNY, B. H.; LEITAO, H. BURTOLOSO A. C. B.; DE VITA, D.; MONTANARI, C. A. Synthesis and structure activity relationship of nitrile-based cruzain inhibitors incorporating trifluoromethylamine-based P2 amide replacement. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 27, p. 115083, 2019.

14 CAZZULO, J. J.; STOKA, V.; TURK, V. The major cysteine proteinase of *T. cruzi*: a valid target for chemotherapy of Chagas disease. **Current Pharmaceutical Design**, Sharjah, v. 7, n. 1, p. 1143 -1156, 2001.

15 DOYLE, P. S.; ZHOU, Y. M.; ENGEL, J. C.; MCKERROW, J. H. A Cysteine protease inhibitor cures Chagas disease in an immunodeficient-mouse model of infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 51, n. 11, p. 3932–3939, 2007.

16 ENGEL, J. C.; DOYLE, P. S.; HISIEH, I.; MCKERROW, J. H. Protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 188, n 1, p. 725-734, 1998.

17 GUAY, D. BEALEU, C.; REDDY, T. J.; ZAMBONI, R.; METHOT, N.; RUBIN, J.; ETHIER, D.; PERCIVAL, M. D. Design and synthesis of dipeptidyl nitriles as potent, selective and reversible inhibitors of cathepsin C. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v.19, n. 18, p.5 392-5396, 2009.

18 SILVA, D. G.; RIBEIRO, J. F. R.; DE VITA, D.; CIANNI, L.; FRANCO, C. H.; BURTOLOSO, A. C. B.; KENNY, P. W.; LEITÃO, A.; MONTANARI, C. A. A comparative study of warheads for design of cysteine protease inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 27, n. 22, p. 5031-5035, 2017.

19 ROCHO, F. R. **Structure-activity relationships of cysteine protease inhibitors**. 2019. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

20 THERMOFISCHER. [S. l.: s. n.], [20--]. Disponível em: www.thermofischer.com. Acesso em 15 set. 2021.

21 DRUGS FOR NEGLECTED DISEASE INITIATIVE. **Best science for the most neglected**. Geneva: DNDI, [20--]. Disponível em: www.dndi.org. Acesso em: 15 set. 2021.

22 DOS SANTOS, A. M.; CIANNI, L.; DE VITA, D.; ROSINI, F.; LEITÃO, A.; LAUGHTON, C. A.; LAMEIRA, J.; MONTANARI, C. A. Experimental study and computational modeling of cruzain cysteine protease inhibitor by dipeptidyl nitriles. **Physical Chemistry Chemical Physics**, Cambridge, v.20, p. 24317-24328, 2018.

23 GRÜNER, S.; NEEB, M.; BARANDUN, L. J.; SIELAFF, F.; HONH, C.; KOJIMA, S.; STEINMETZER, T.; DIEDERICH, F.; KLEBE, G.; Impact of protein and ligand impurities on ITC-derived protein-ligands thermodynamics. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, p. 2843-2850, 2014.

24 CAZZULO, J. J.; STOKA, V.; TURK, V. The major cysteine proteinase of *t. cruzi*: a valid target for chemotherapy of Chagas disease. **Current Pharmaceutical Design**, Sharjah, v. 7, n. 1, p. 1143 - 1156, 2001.

25 MALVERN panalytical. Malvern, 2021. Disponível em: www.malvernpanalytical.com. Acesso em: 15 out. 2021.

26 BOUCHEMAL, K.; MAZAFERRO, S. How to conduct and interpret ITC experiments accurately for cyclodextrin-guest interactions. **Drug Discovery Today**, Oxford, v. 17, n 11 e 12 p. 623-629, 2012.

27 GESCHWINDNER, S.; ULANDER, J.; JOHANSSON, P. Ligand binding thermodynamics in drug discovery: still a hot tip? **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, p. 6321- 6335, 2015.

28 SCHON, A.; FREIRE, E. Enthalpy screen of drugs candidates. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 513, p. 1-6, 2016.

29 OLSSON, T. S. G. LEADBYURY, J. E.; PITT, W. R.; WILLIAMS, M. A. Extent of entalpy-entropy compensation in protein-ligand interaction. **Protein Science**, Hoboken, v. 20, p.1607-1618. 2011.

30 TURNBULL, W. B.; DARANAS, A. H. On the value of c: can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry? **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 125, p. 14859-14866, 2003.

31 GRÜNER, S.; NEEB, M.; BARANDUN, L. J.; SIELAFF, F.; HONH, C.; KOJIMA, S.; STEINMETZER, T.; DIEDERICH, F.; KLEBE, G. Impact of protein and ligand impurities on ITC-derived protein-ligands thermodynamics. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, p. 2843-2850, 2014.

- 32 VELASQUEZ-CAMPOY, A.; FREIRE, E. Isothermal titration calorimetry to determine association constants for high-affinity ligands. **Nature Protocols**, Berlin, v. 1, p.186-191, 2006.
- 33 WEN, J.; ARTHUR, K.; CHEMALIL, L.; MUZAMMIL, S.; GABRIELSON, J.; JIANG, Y Applications of differential scanning calorimetry for thermal stability analysis of proteins: qualification of DSC. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Hoboken, v. 101, n. 3, p. 955 – 964, 2012.
- 34 BRUYLANTS, G., WOUTERS, J.; MICHAUS, C. Differential scanning calorimetry in life sciences: thermodynamics, stability, molecular recognition and applications in drug design. **Current Medicinal Chemistry**, Sharjah, p. 12, p. 2011-2020, 2005.
- 35 JONNISON, C. M.; Differential scanning calorimetry as tool for protein folding and stability. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York v. 531, p. 100 -109, 2013.
- 36 TA Instruments. New Castle, 2021. Disponível em: www.tainstruments.com/nDSC/. Acesso em: 12 Set. 2021.
- 37 CHOMA, C.T. **Characterizing protein/ligand binding by DSC**. New Castle: TA Instruments, 2001.
- 38 HOLDGATE, G. A.; WARD, W. H. J. Measurements of bindings thermodynamics in drug discovery. **Drug Discovery Today**, Oxford, vol. 10, 22, p. 1543 – 1550, 2005.
- 39 SEDOV, I.; NIKIFOROVA, A.; KHAIBRAKMANOVA, D. Evaluation of the binding properties of drugs to albumin from DSC. **Thermograms, International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, p. 119362, 2020.
- 40 LI, D.; CHEN, L.; WANG, R.; LIU, R.; GE, G. Synergic determination of thermodynamic and kinetic signatures using isothermal titration calorimetry: a full-curve-fitting approach. **Analytical Chemistry**, Washington, v.89, p. 7130- 7, 2017.
- 41 RIESEN.; R.; WIDMANN., G. Protein characterization by DSC. **Thermochimica Acta**, Amsterdam, v. 226, p. 275 -279, 1993.
- 42 ESKEW, M.; BENIGHT, A. Ligand binding constants for human serum albumin evaluated by ratiometric analysis of DSC thermograms. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 628, p. 114293, 2021.
- 43 BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. São Paulo: Mc Graw Hill, 2006. p. 1821.

- 44 BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal, as bases moleculares da ação dos fármacos**. Porto Alegre: Ed. Artemed, 2001. P.78.
- 45 PROKOPZYCK, I. M. **Determinação da afinidade e assinatura termodinâmica de inibidores da cruzaina por calorimetria de titulação isotérmica**. 2016. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.
- 46 GRABSKI, A.; MEHLER, M.; DROTT, D. The overnight express autoinduction system high-density cell growth expression. **Nature Methods**, Berlin, v.2, p.233-235, 2005.
- 47 VILLAVERDE, A.; CARRIÓ, M. M. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion body. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 25, p.1385, 2003.
- 48 VOET, D.; VOET J. **Bioquímica**. 4. ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2013.
- 49 CIANNI, L. ROCHO, F.R.; ROSINI, F.; BONATTO, V.; RIBEIRO, J. F. R.; LAMEIRA, J.; LEITÃO, A.; SHAMIM, A. Optimization strategy of single-digit nanomolar cross-class inhibitors of mammalian and protozoa cysteine proteases. **Bioorganic Chemistry**, San Diego, v.101, p. 104039, 2020.
- 50 SILVA, J. R. A.; CIANNI, L. ARAÚJO, D.; JATAÍ, P. H. B.; DE VITA, D.; ROSINI, F.; LEITÃO, A.; LAMEIRA, J.; MONTANARI, C. A.; Assessment of the Cruzain Cysteine protease reversible and irreversible covalent inhibitor mechanism. **Journal of Chemical Information and Modeling**, Washington, v. 60, p.1666-1667, 2020.
- 51 LISETTE, M. J.; SPRAKEL, B. S. Molecular design and engineering for affinity separation processes using isothermal titration calorimetry (ITC) and molecular modeling (MM). **Journal of Molecular Liquids**, Amsterdam, v.283, p. 312-324, 2019.
- 52 BARON, R.; MCCAMMON, J. A. Molecular recognition and ligand association. **Annual Review of Physical Chemistry**, Palo Alto, v. 64, n. 1, p. 151-175, 2013.
- 53 KLEBE, G. Applying thermodynamic profiling in lead finding and optimization. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 14, n. 2, p. 95-110, 2015.
- 54 SEDOV, I.; NIKIFOROVA, A.; KHAIBRAKMAKHMANOVA, D.; Evaluation of the binding properties of drugs albumin from DSC thermograms.

International Journal of Pharmaceutics, Amsterdam, v. 583, p. 119362, 2020.

55 CIANNI, L. **Design, synthesis and evaluation of the trypanocidal activity of cruzain reversible-covalent inhibitors**. 2019. Tese (Doutorado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

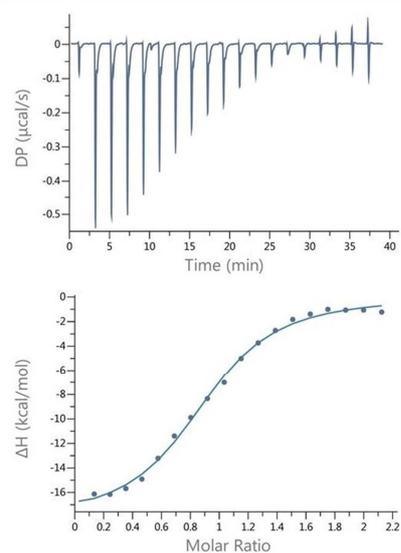
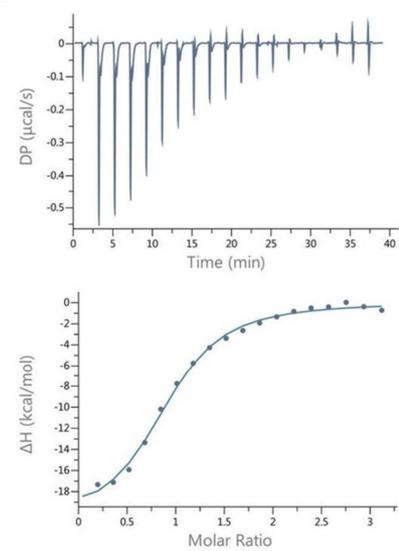
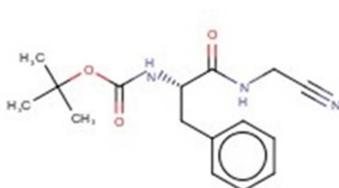
56 AVELAR, L. A. A.; CAMILO, C. D.; DE ALBUQUERQUE, S.; FERNANDES, W. B.; GONÇALES, C.; KENNY, P. W.; LEITÃO, A.; MCKERROW, J. H.; MONTANARI, C. A.; OROZCO, E. V. M.; RIBEIRO, J. F. R.; ROCHA, J. R.; ROSINI, F.; SAIDEL, M. E.; Molecular design, synthesis and trypanocidal activity of dipeptidyl nitriles as cruzain inhibitors. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 9; n. 7, p. 1-24, 2015.

Anexos

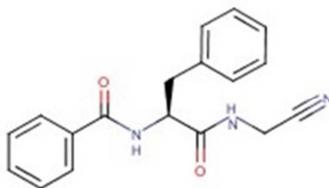
Anexo 1

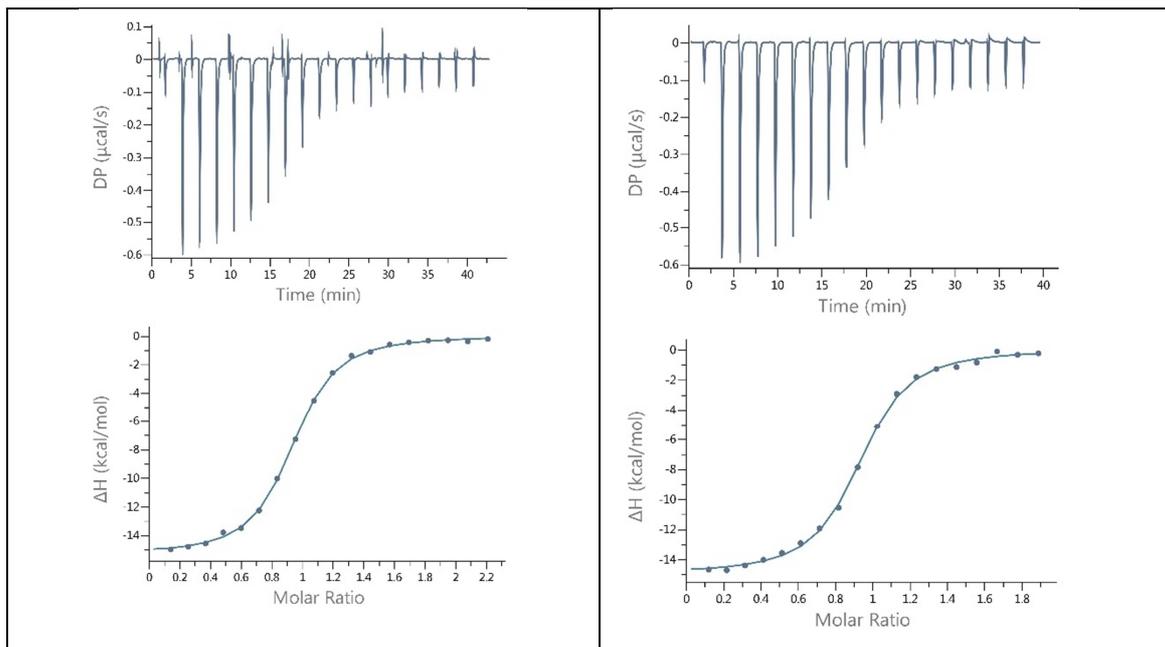
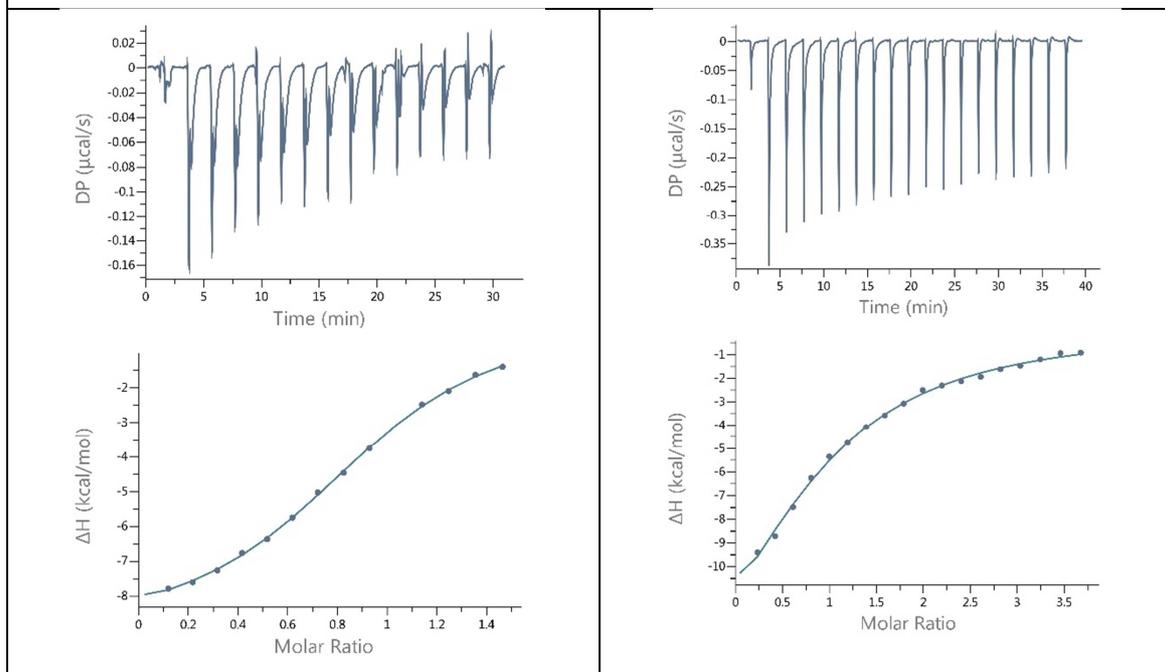
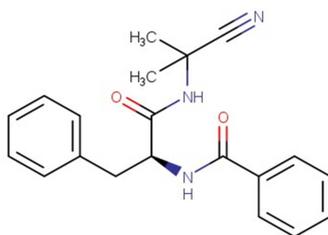
Termogramas obtidos no ITC para as moléculas em estudo.

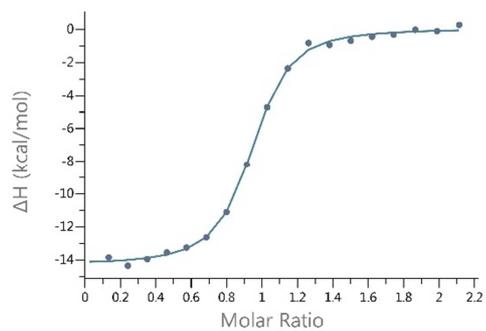
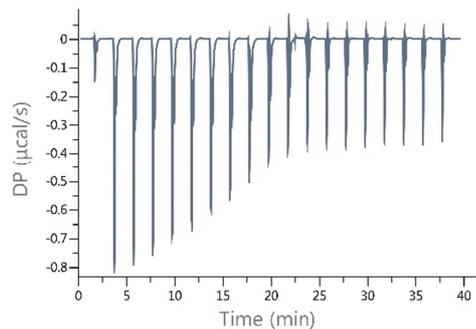
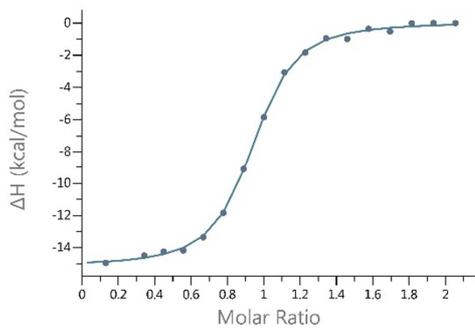
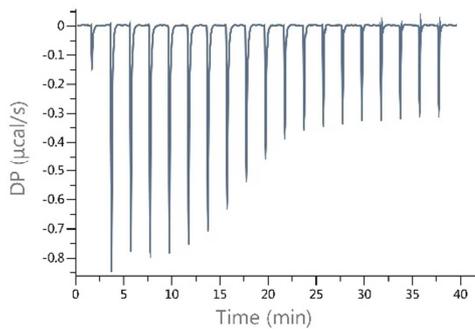
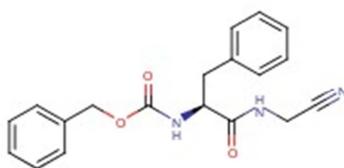
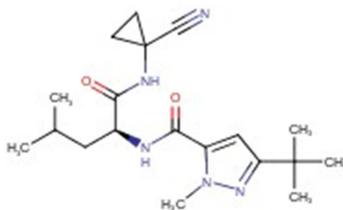
NEQ0400

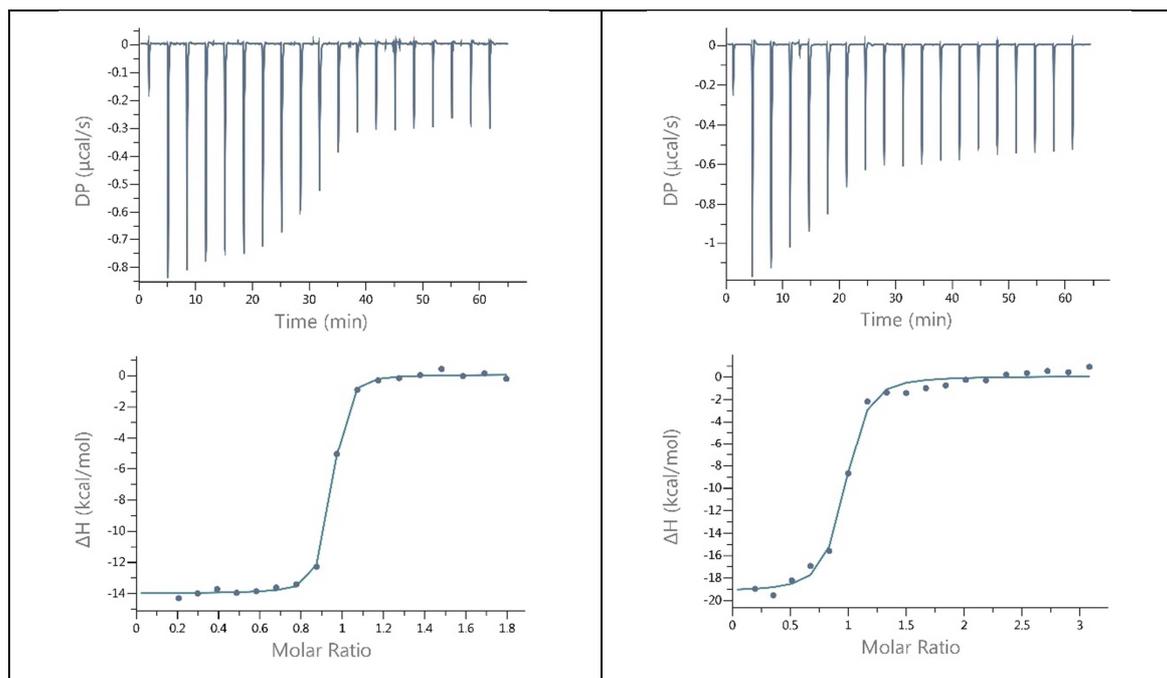
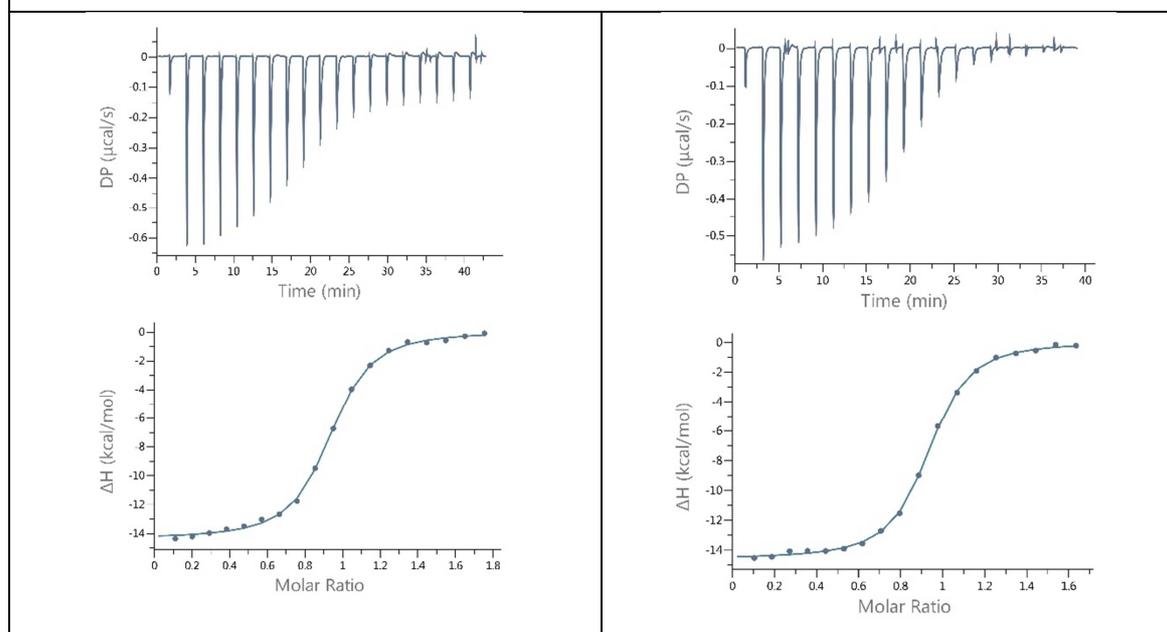
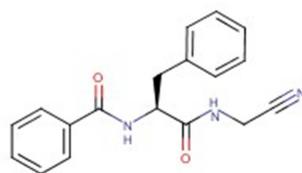


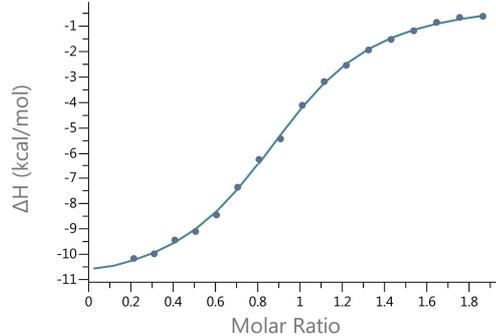
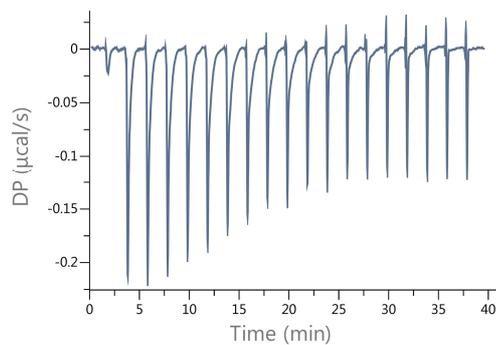
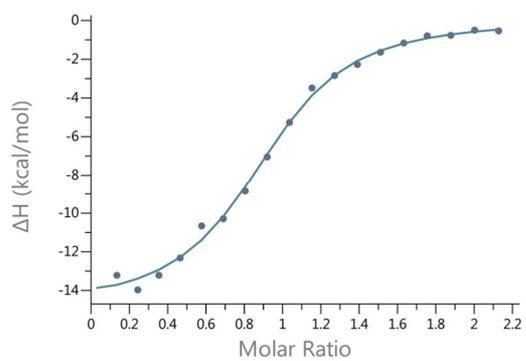
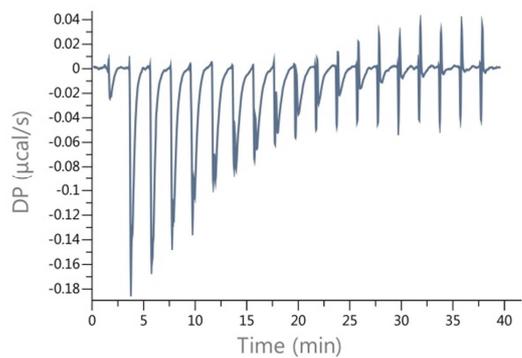
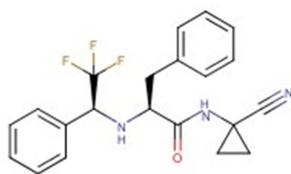
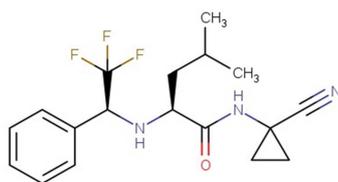
NEQ0409

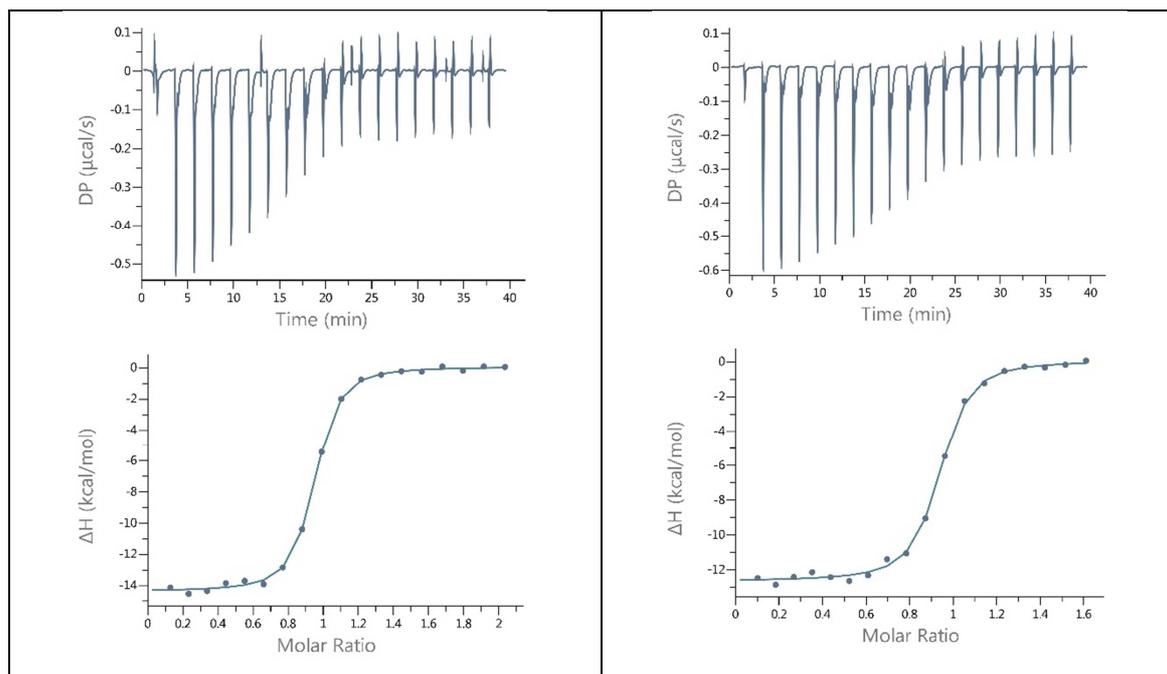
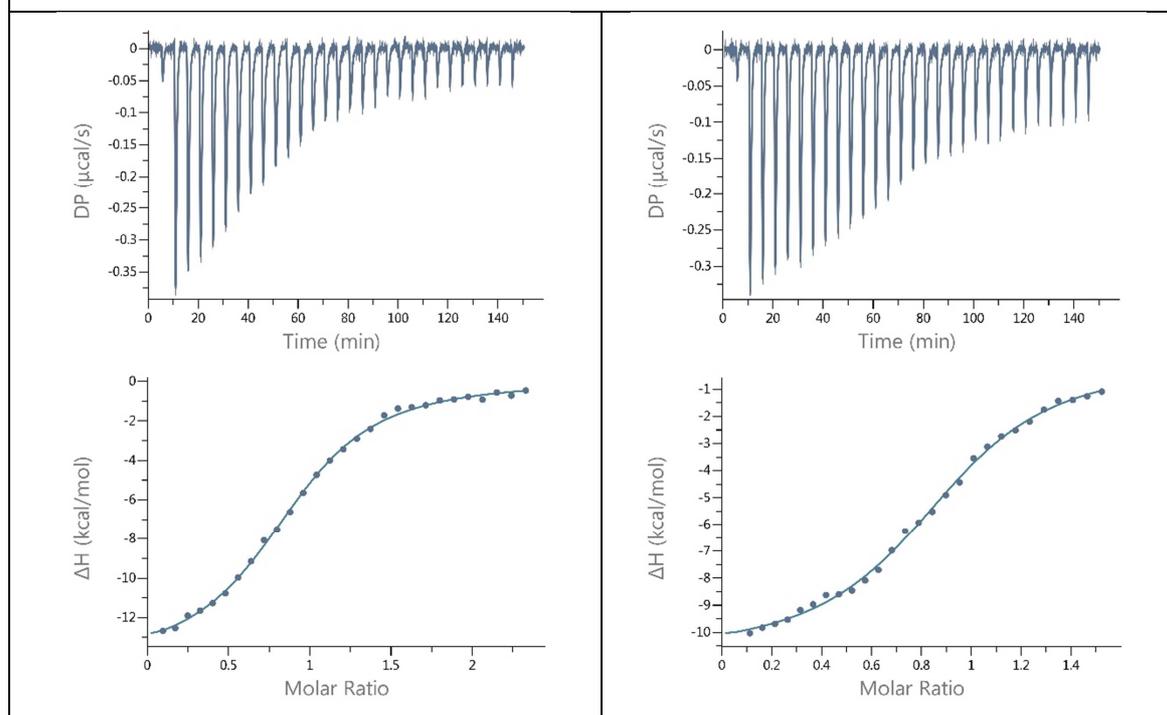
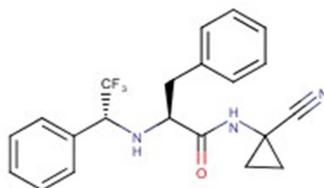


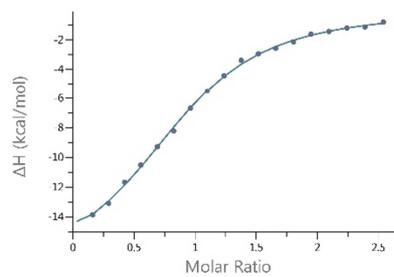
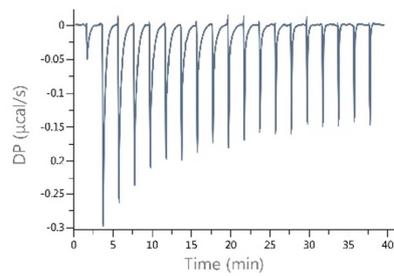
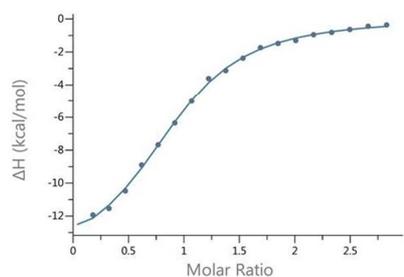
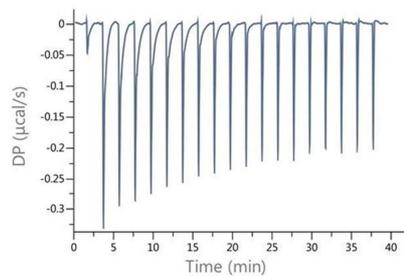
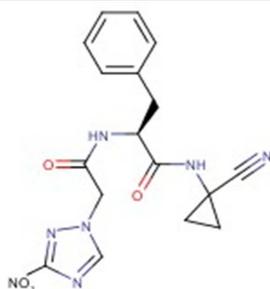
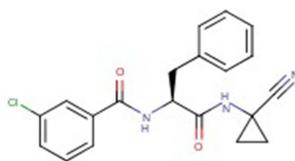
**NEQ0410****NEQ0500**

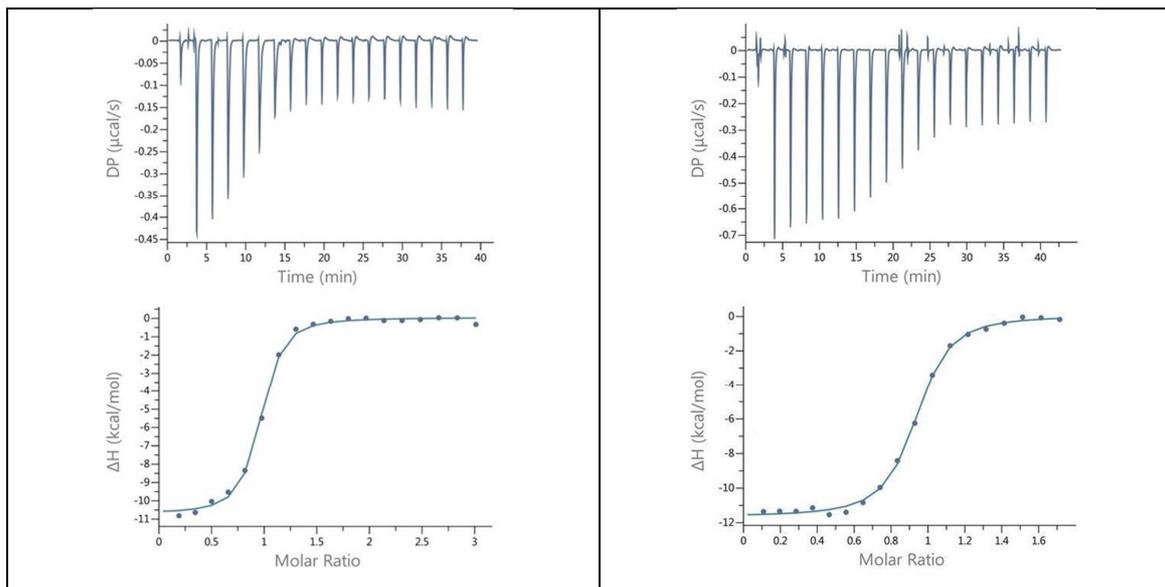
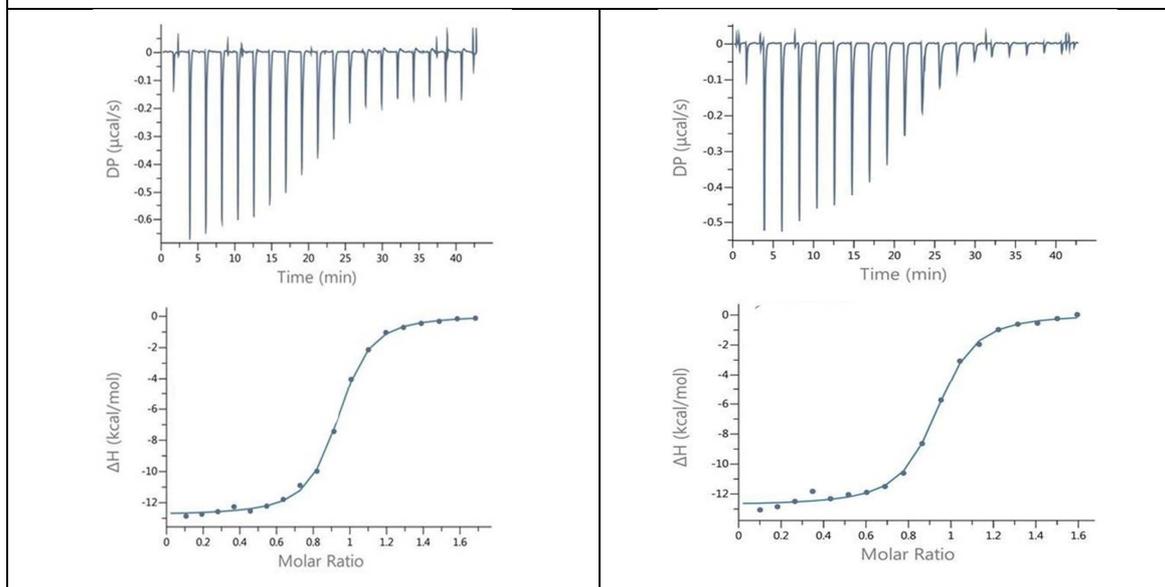
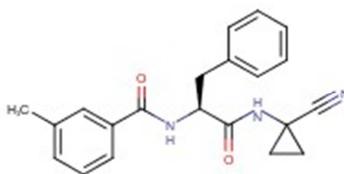
**NEQ0569**

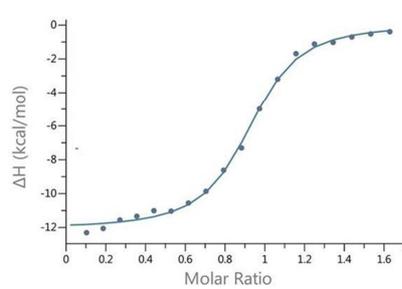
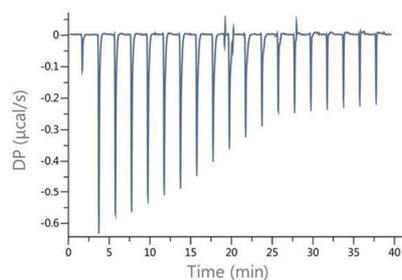
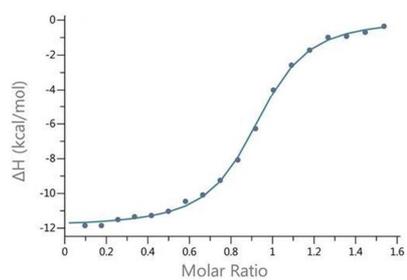
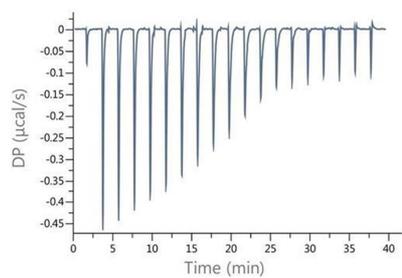
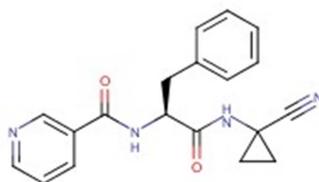
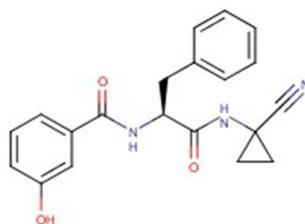
**NEQ0570****NEQ0631.2**

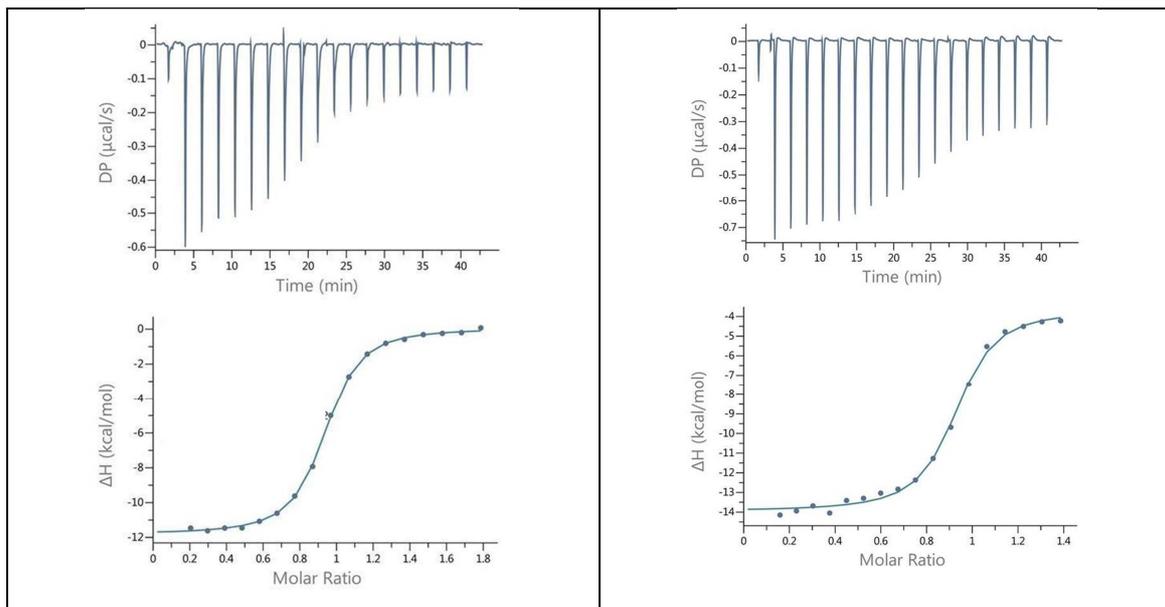
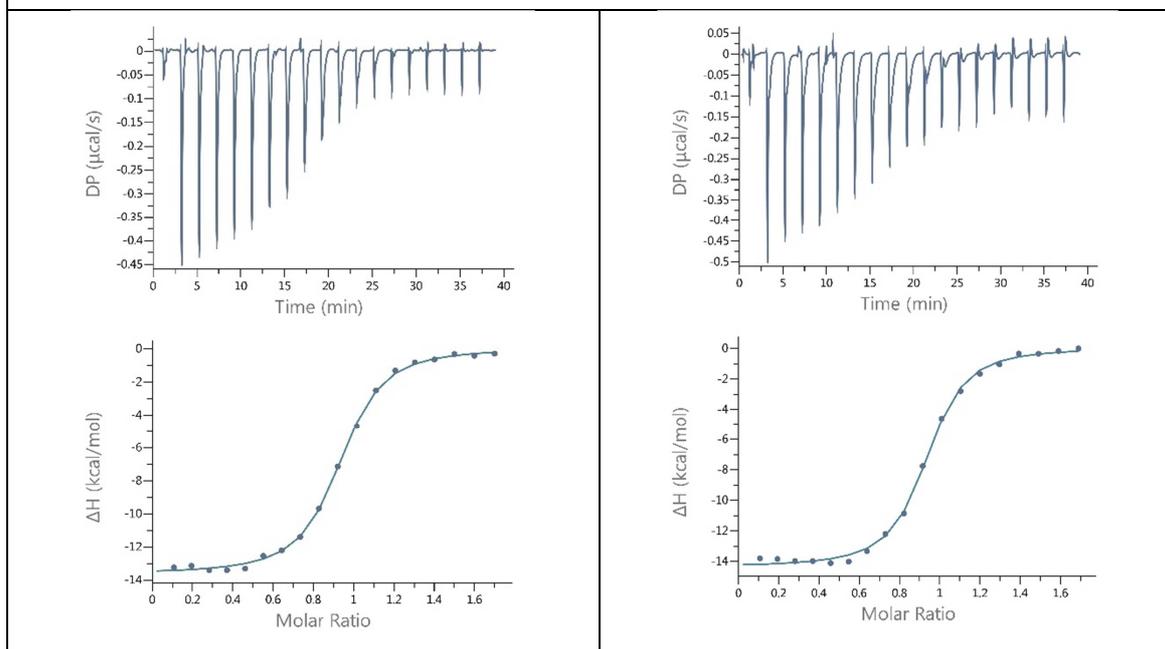
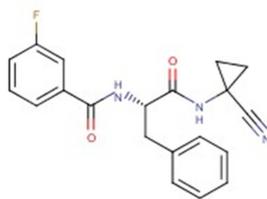
**NEQ0635.1**

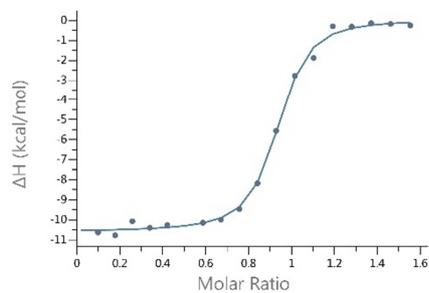
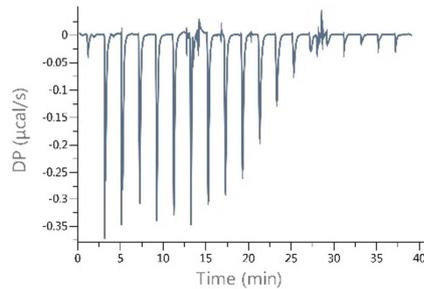
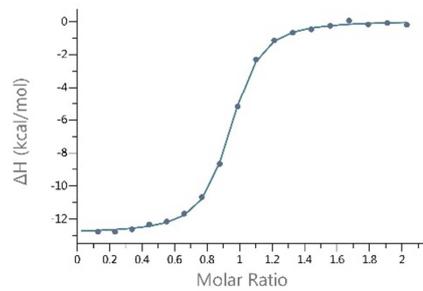
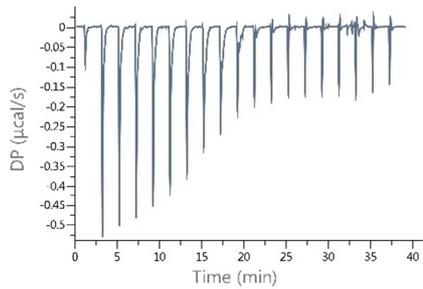
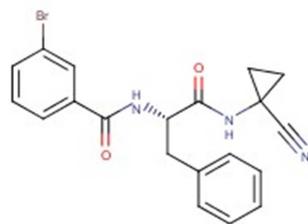
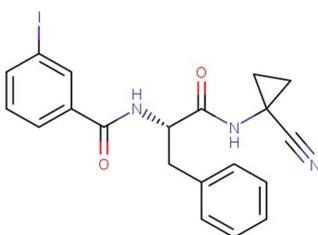
**NEQ0594****NEQ0691**

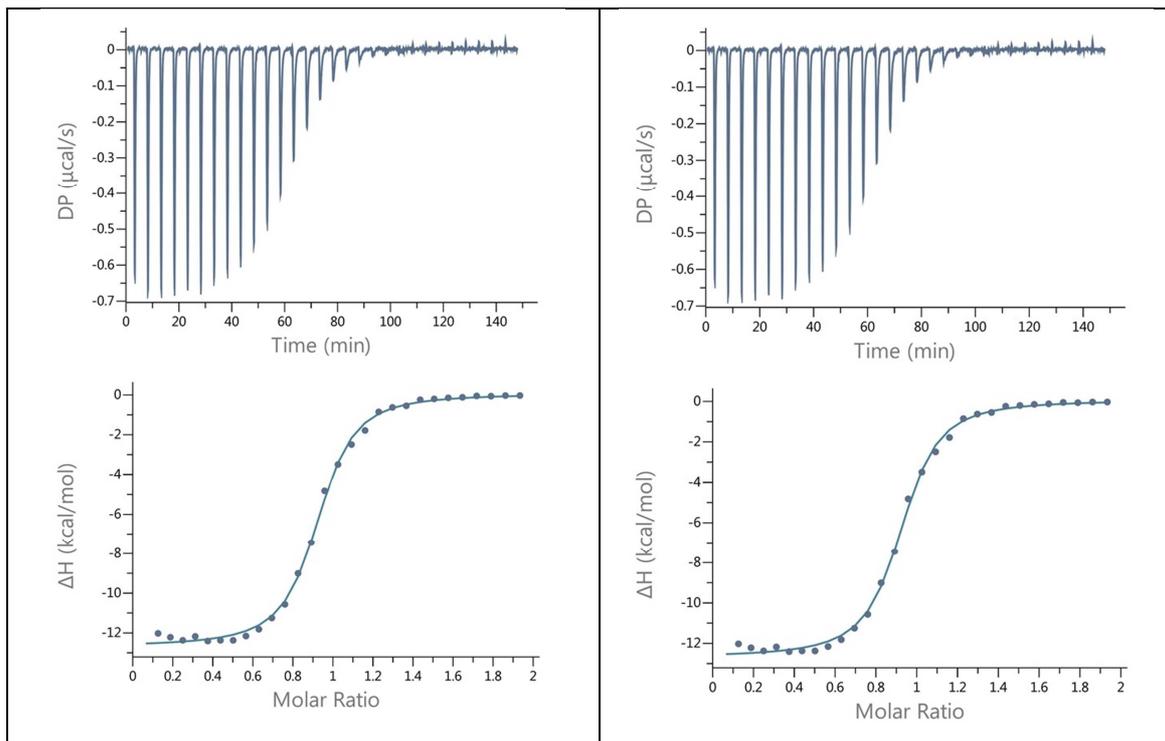
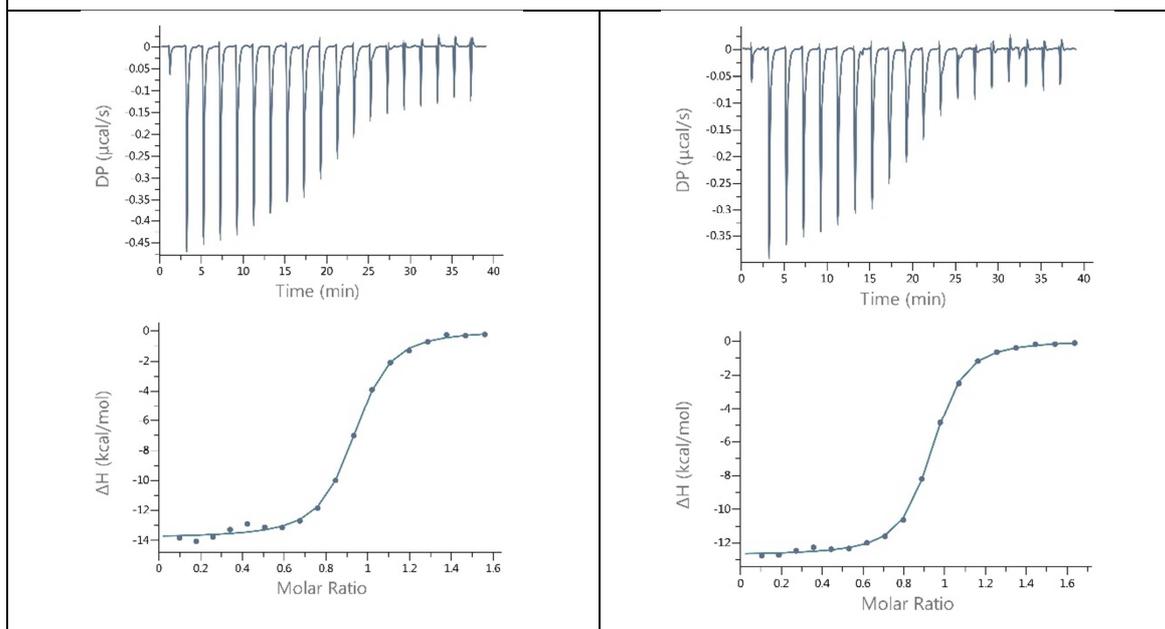
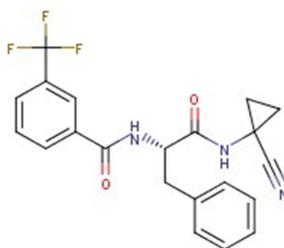
**NEQ0710**

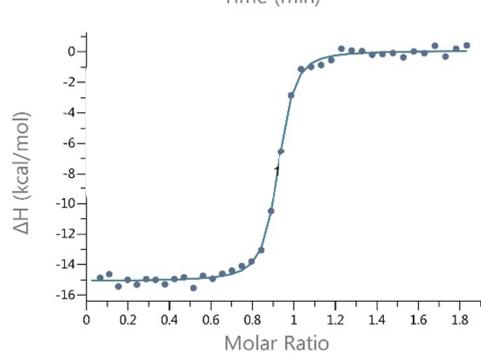
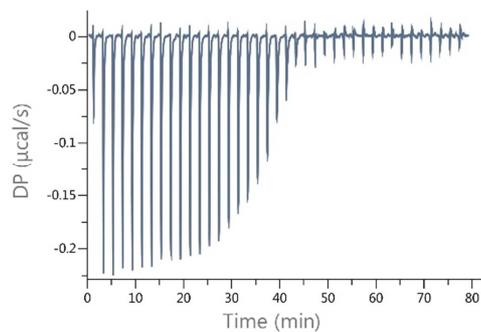
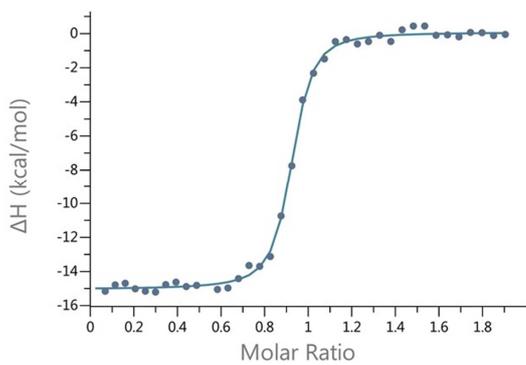
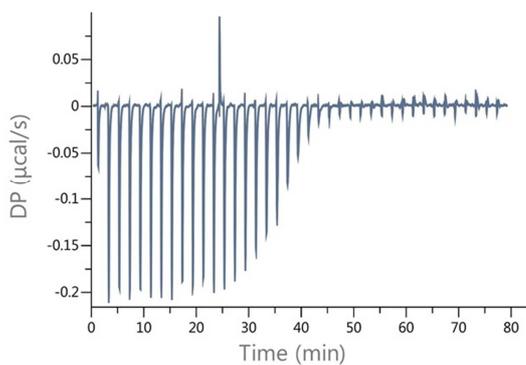
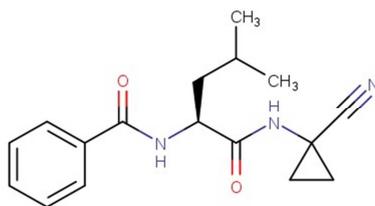
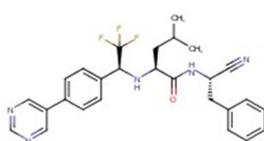
**NEQ0712****NEQ0714**

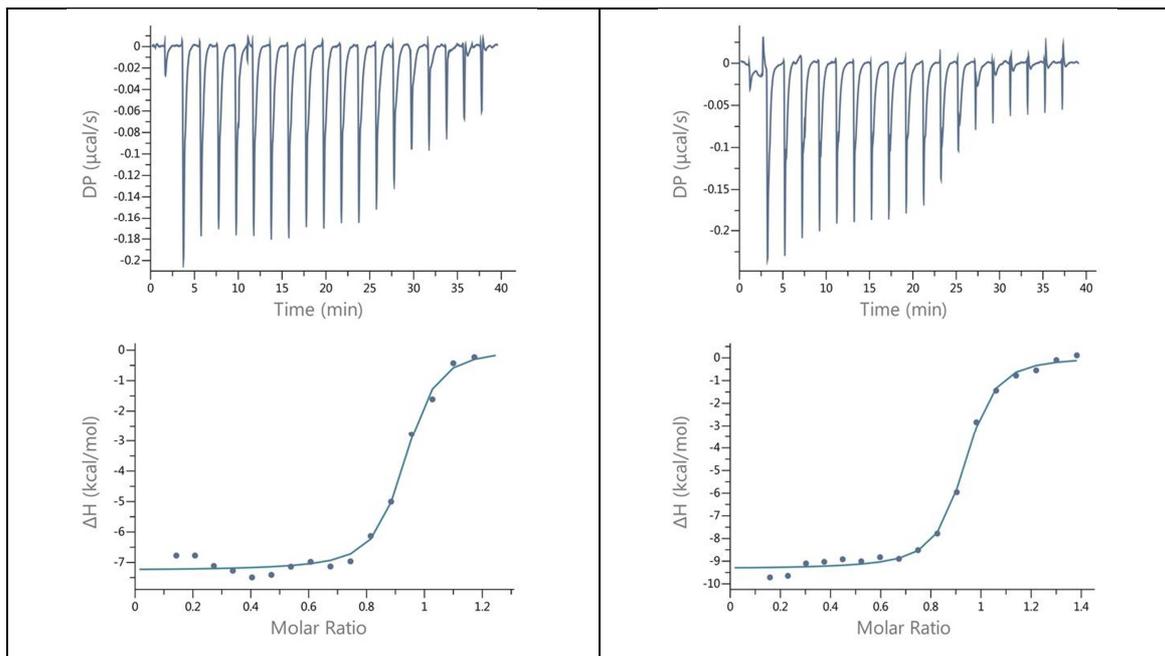
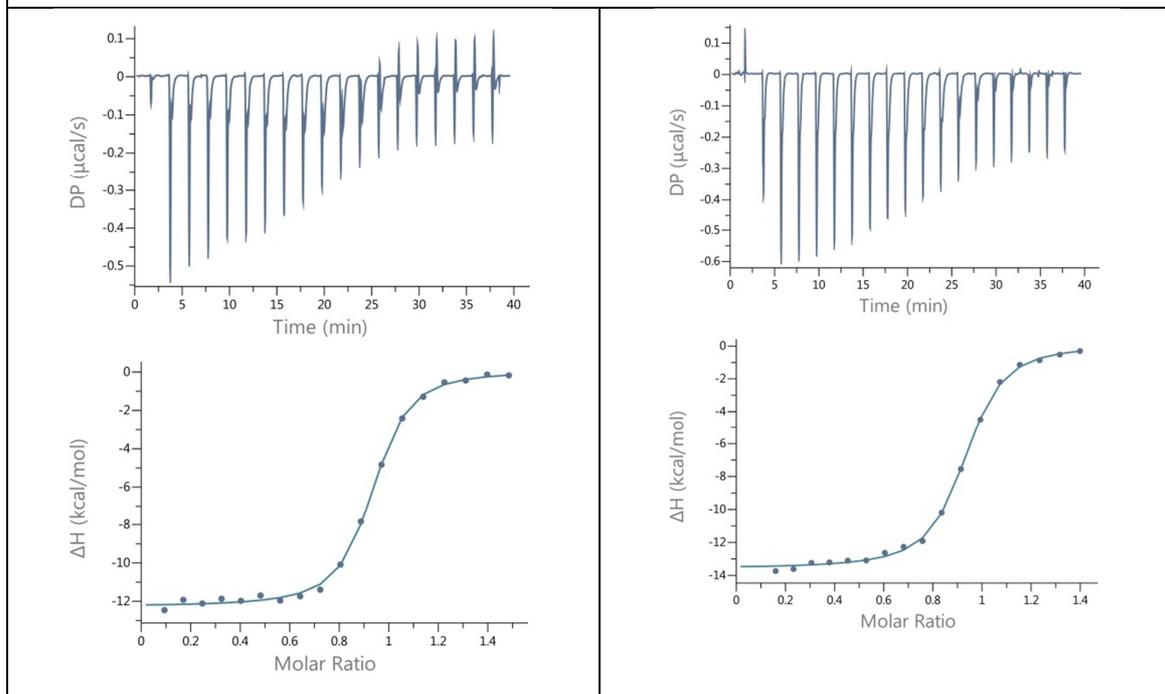
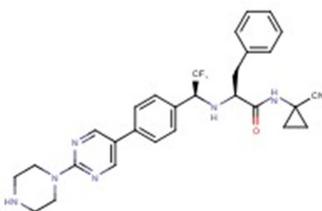
**NEQ0717**

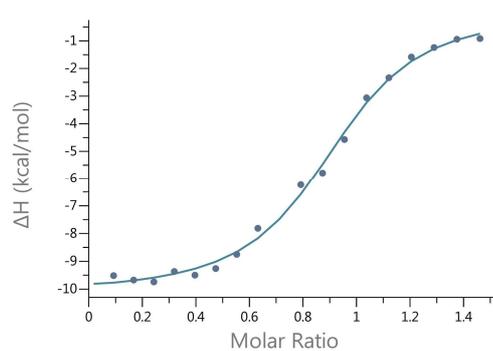
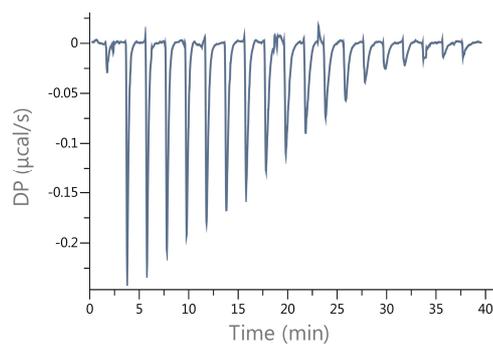
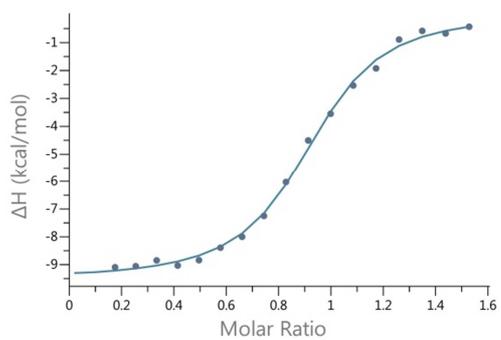
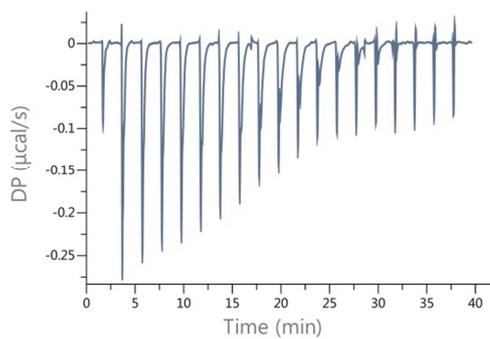
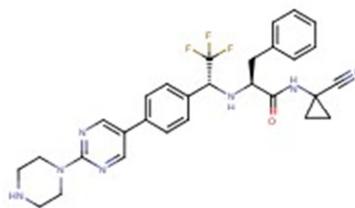
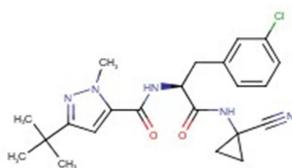
**NEQ0802****NEQ0803**

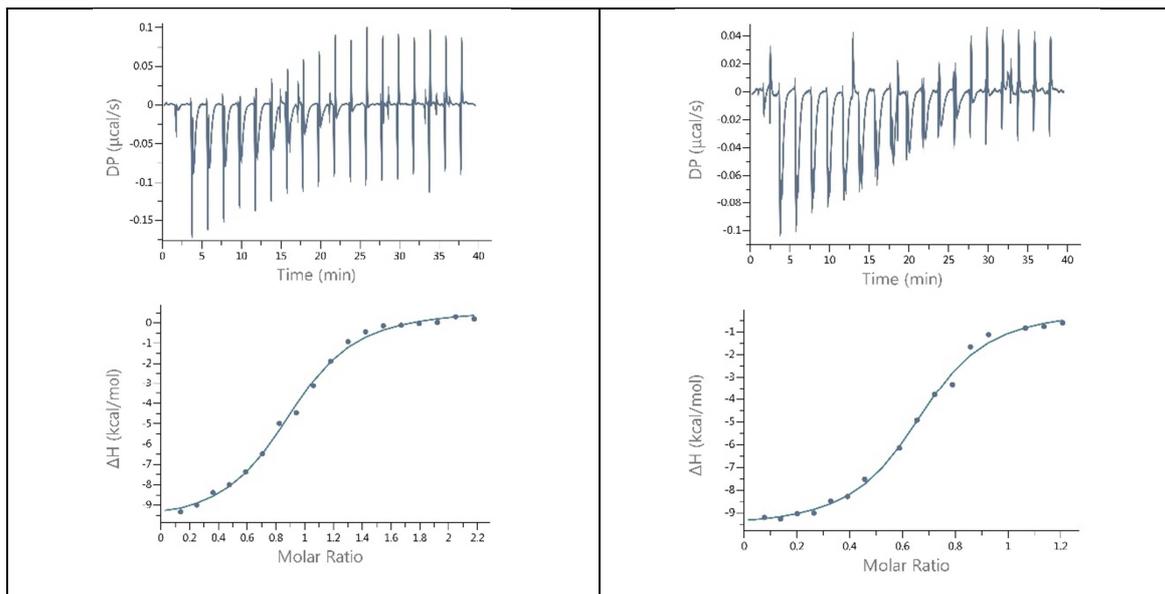
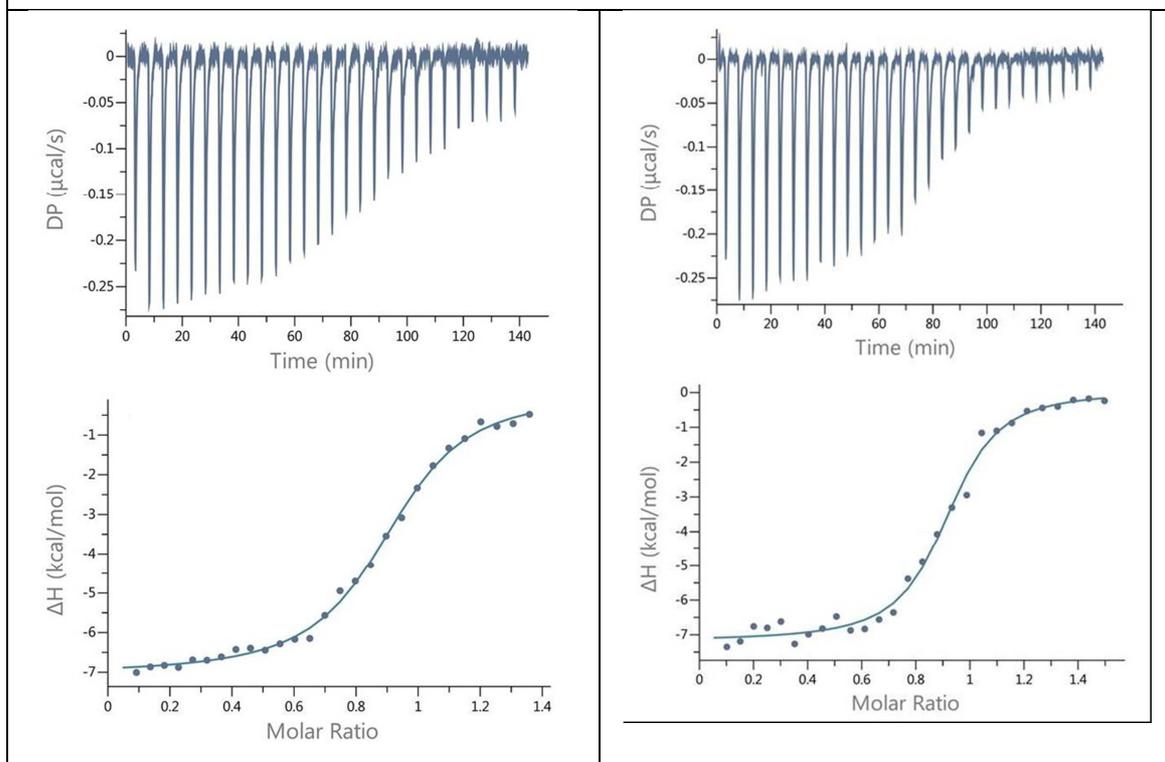
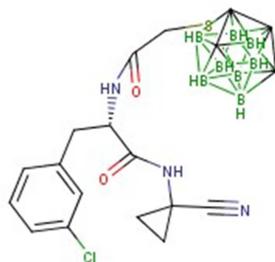
**NEQ0804**

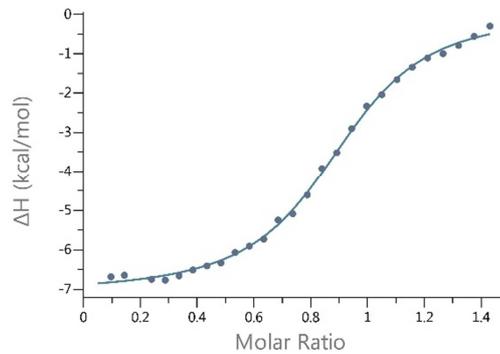
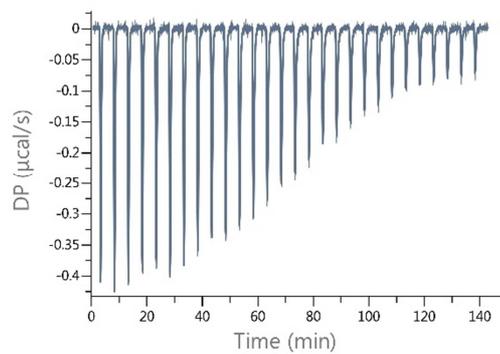
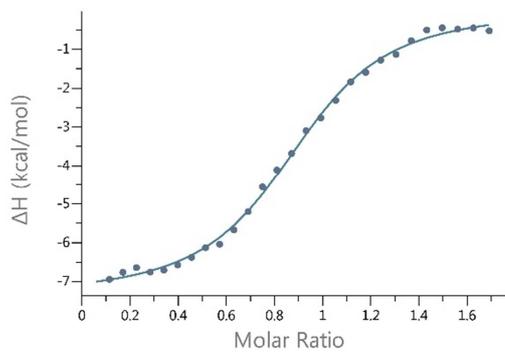
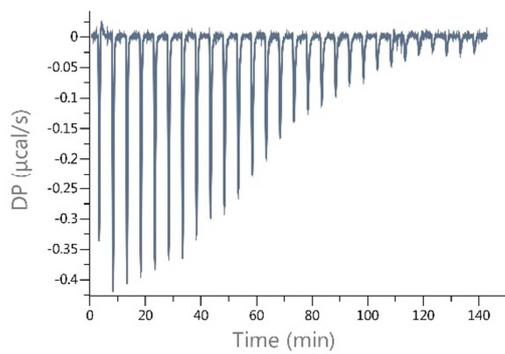
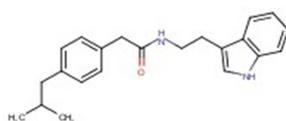
**NEQ0805****NEQ0818.1**

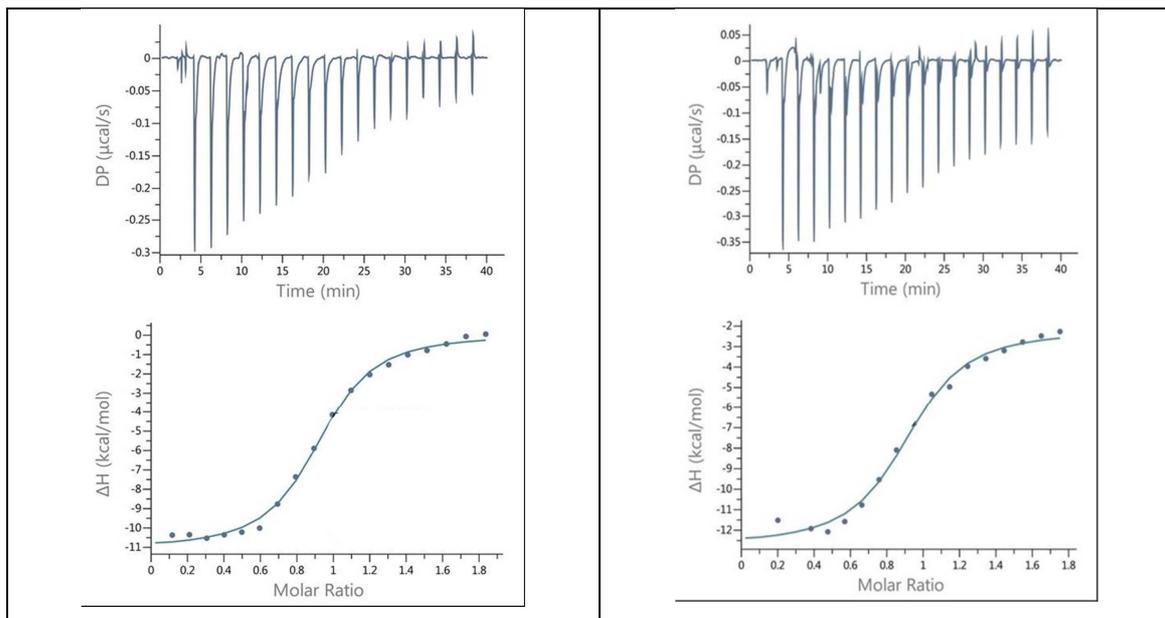
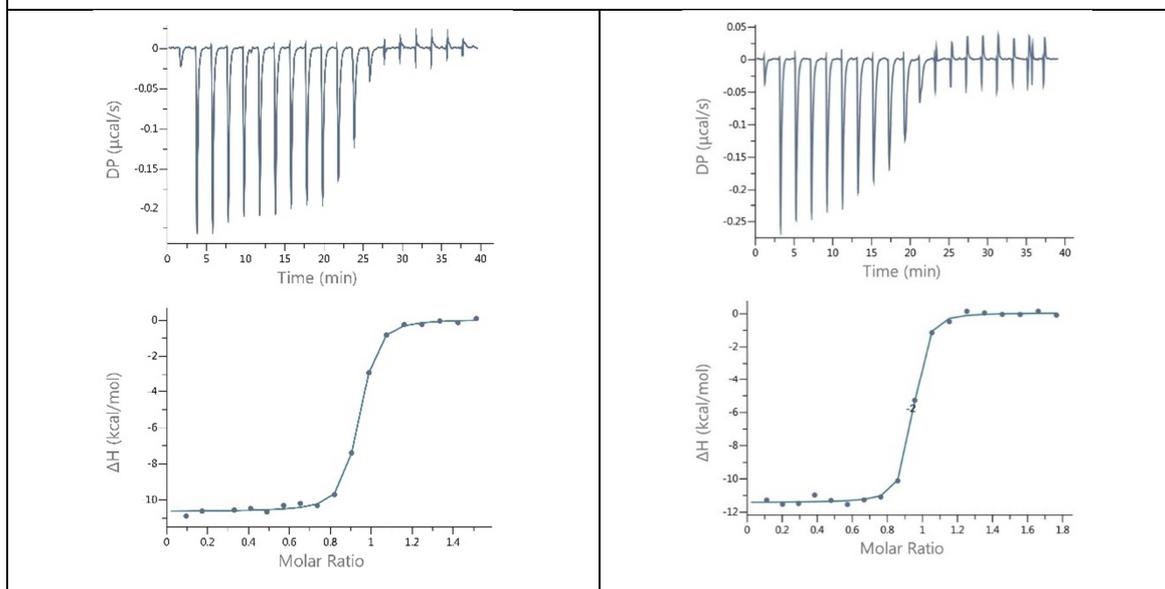
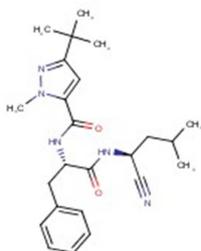
**NEQ0820**

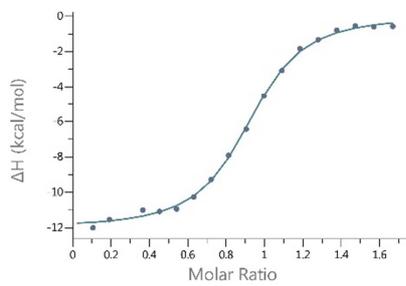
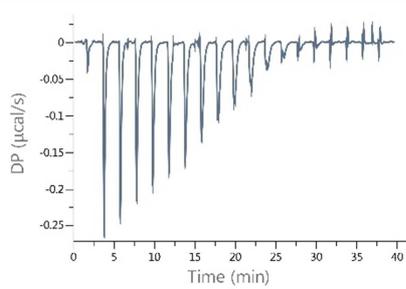
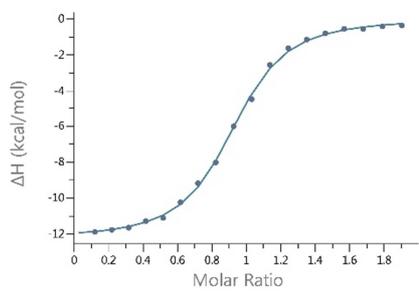
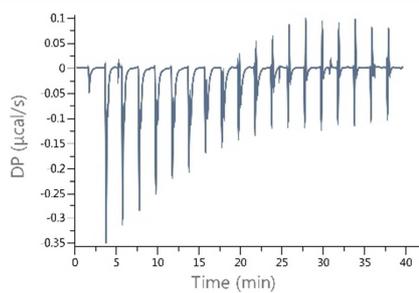
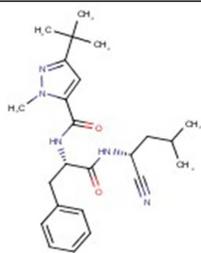
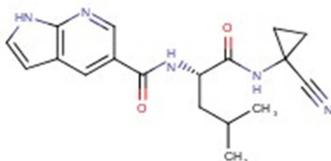
**NEQ0826****NEQ0839**

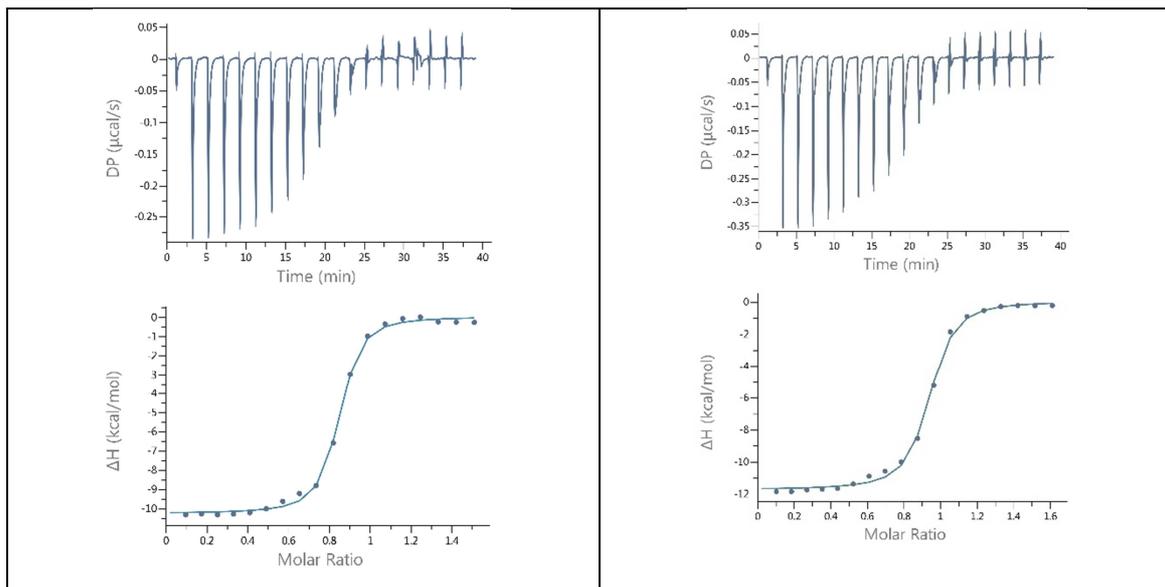
**NEQ0866.1**

**NEQ0867****NEQ0868**

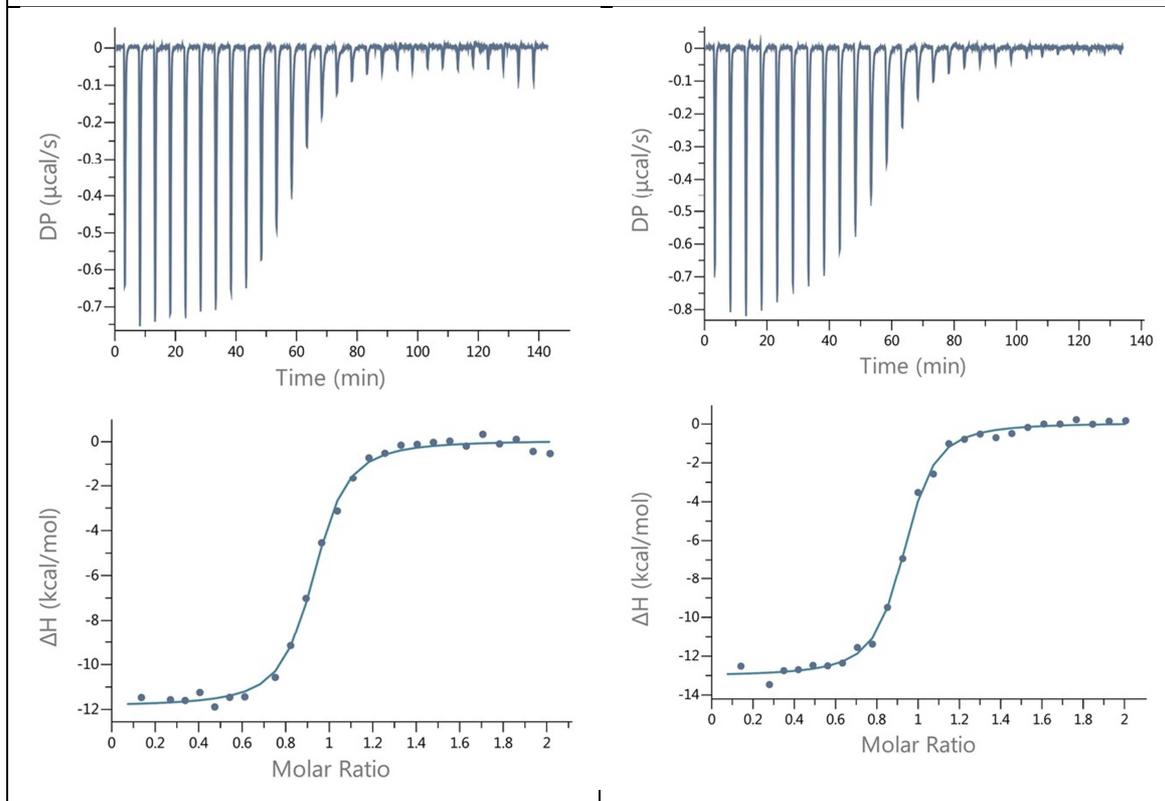
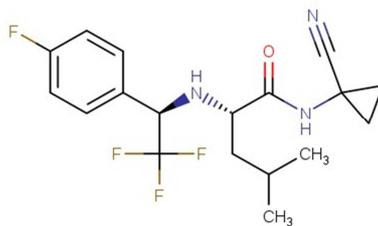
**NEQ0925**

**NEQ0940.1****NEQ0952**

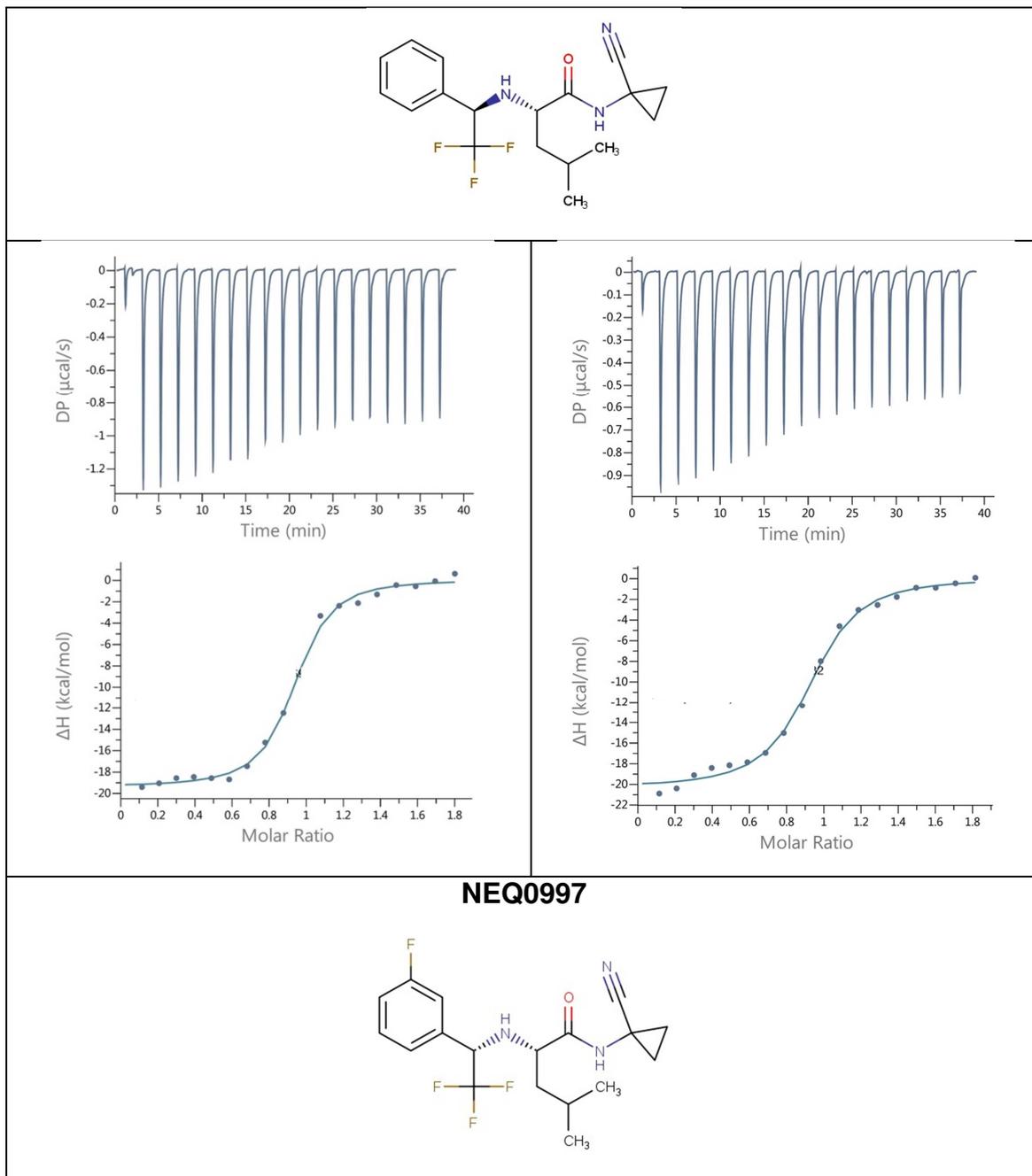
**NEQ0958.1**

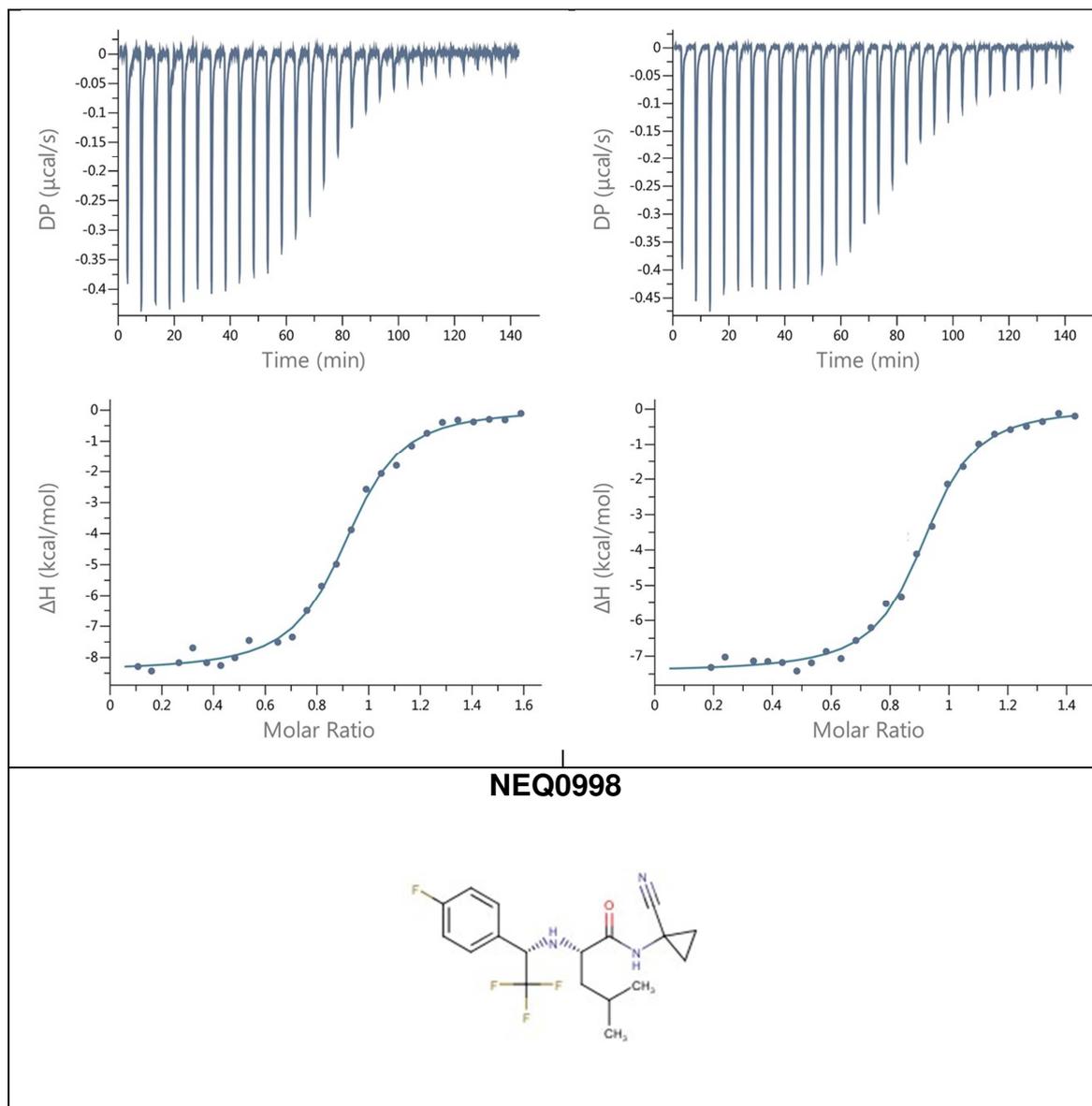


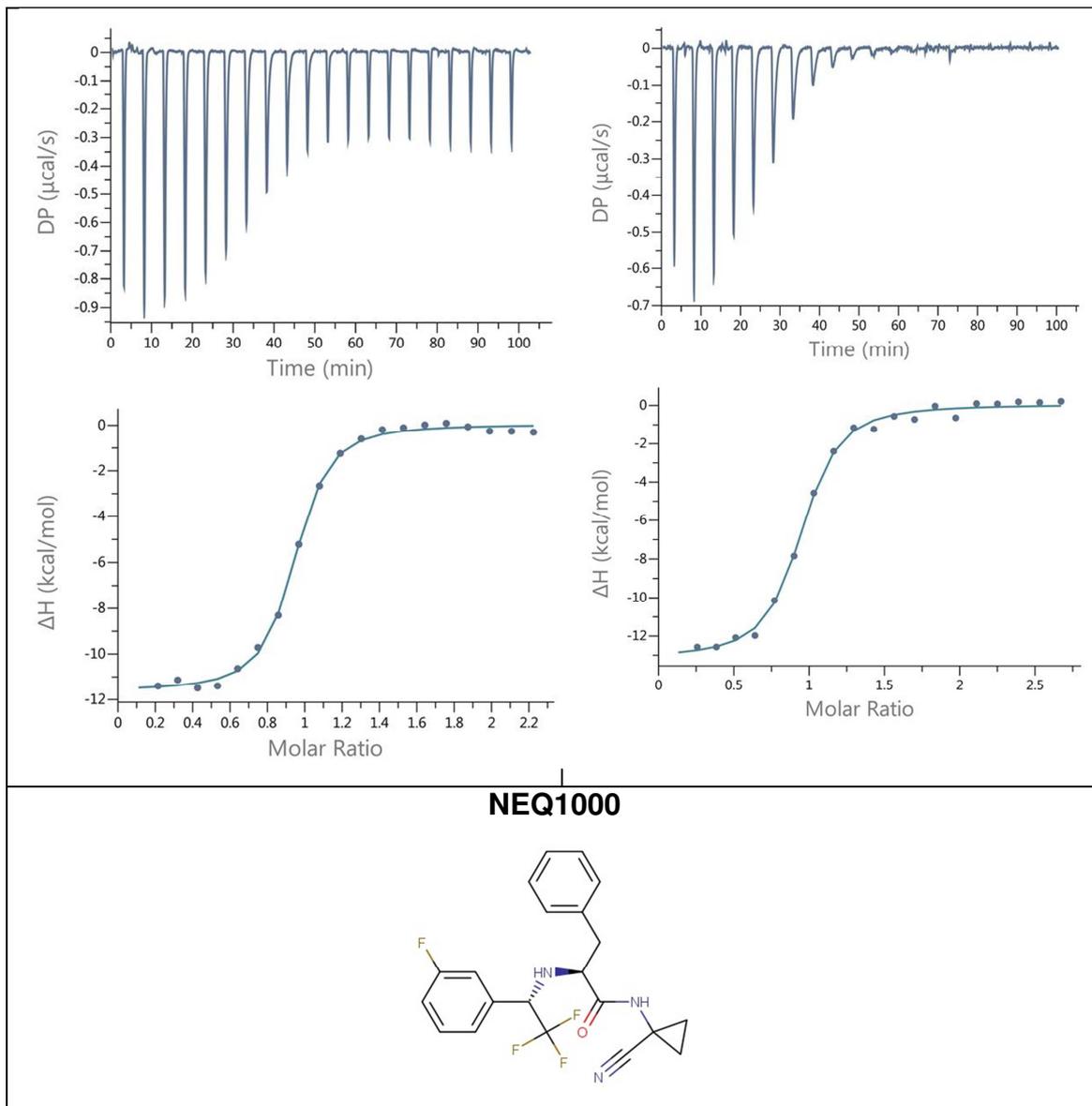
NEQ0979

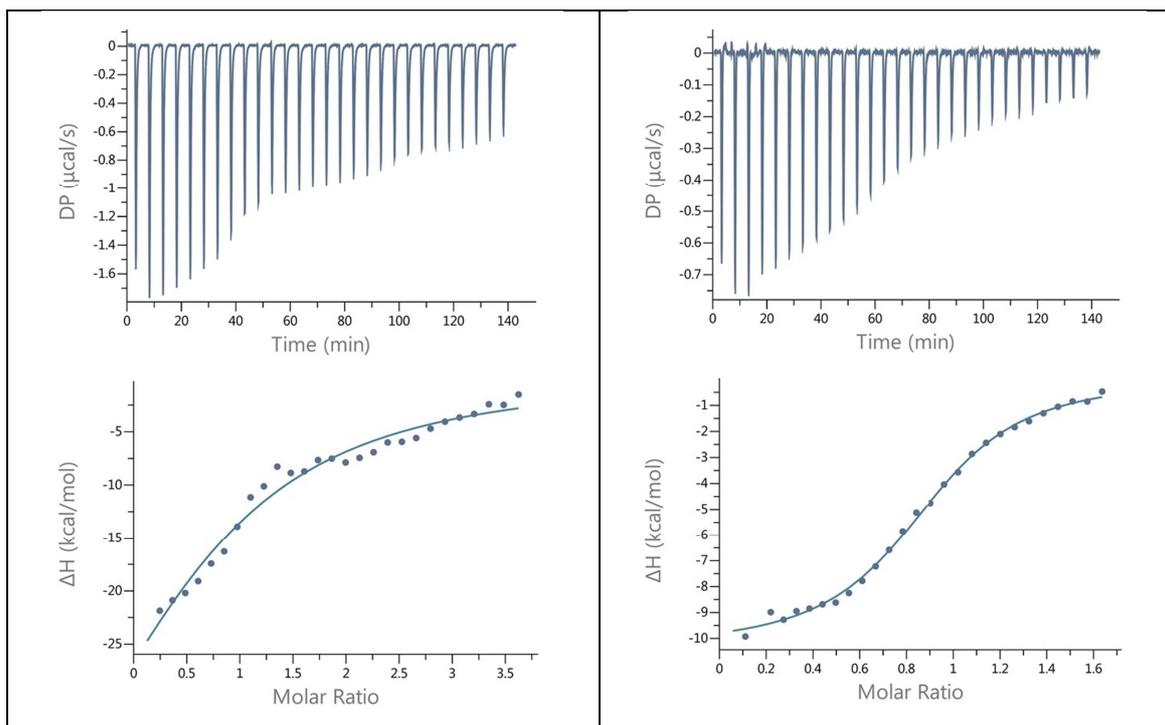
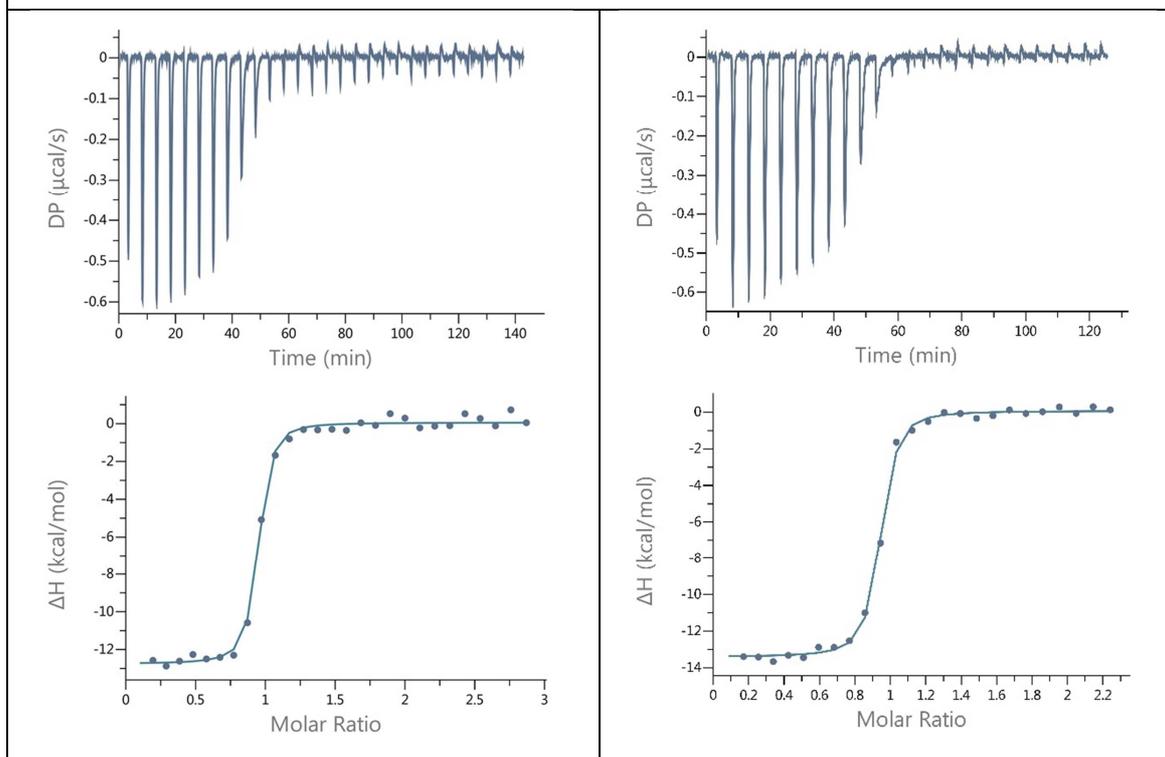


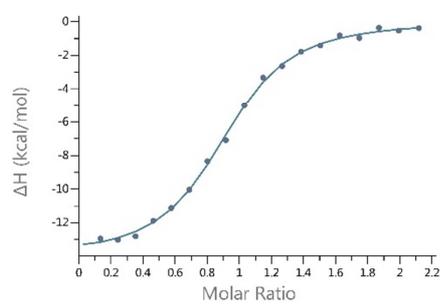
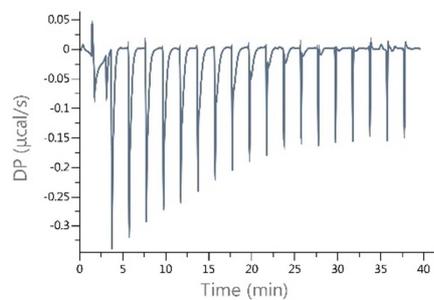
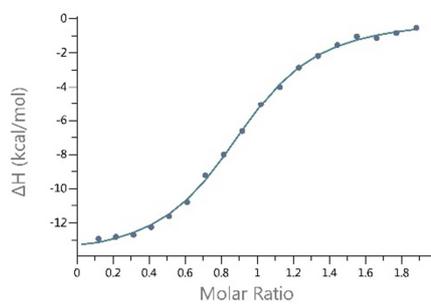
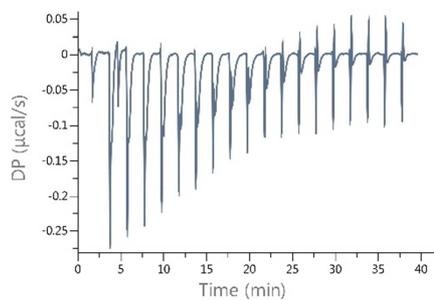
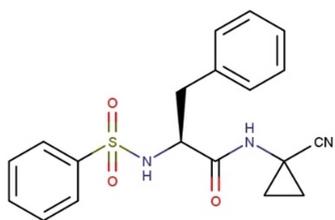
NEQ0981





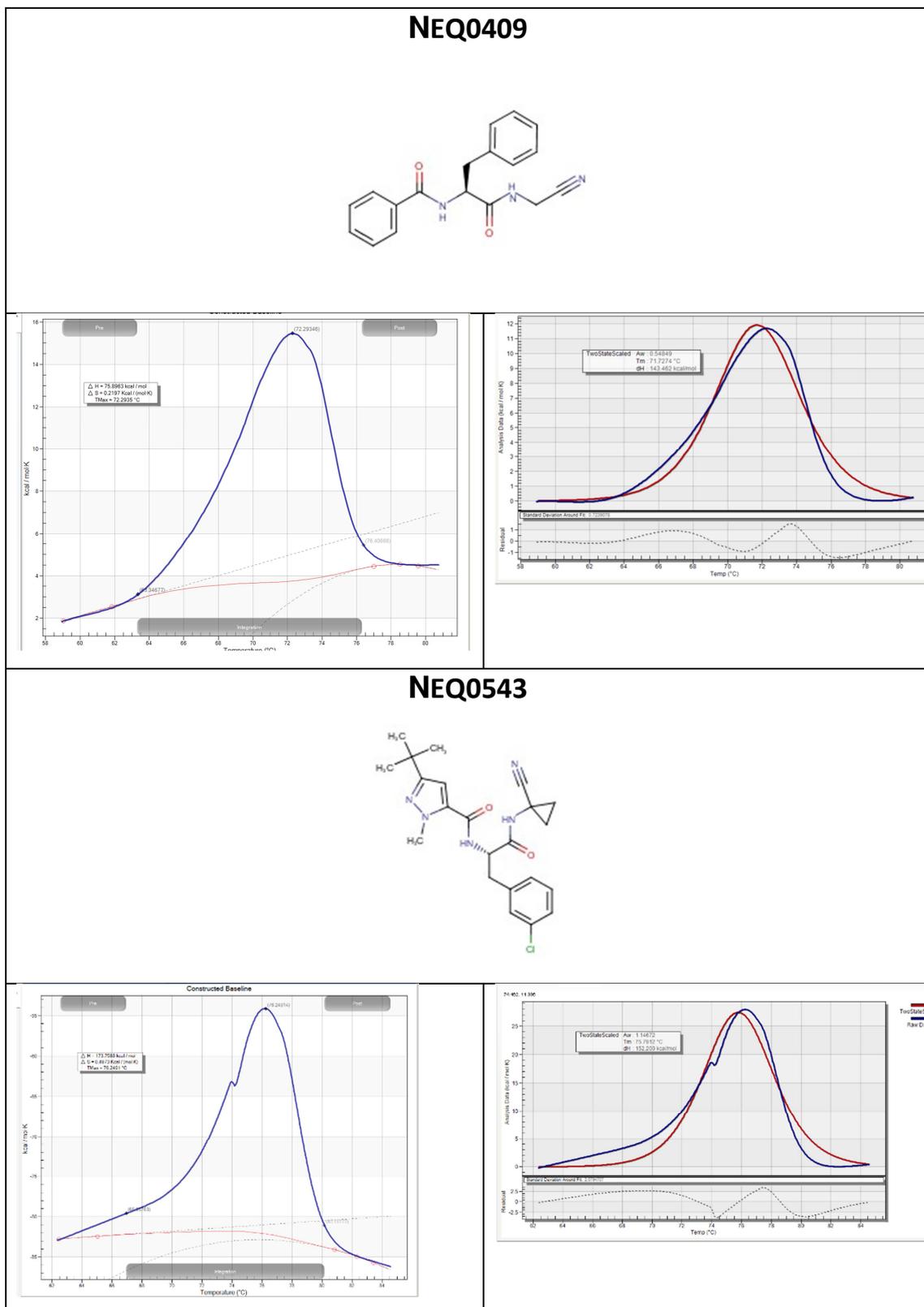


**NEQ1009****NEQ01042**

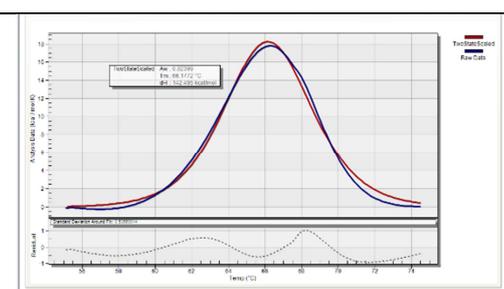
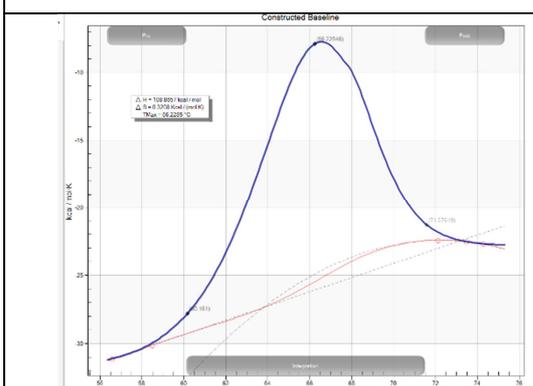
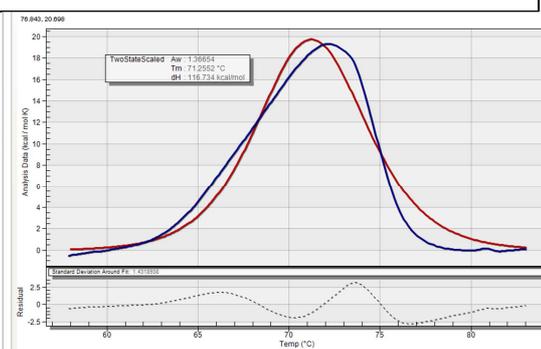
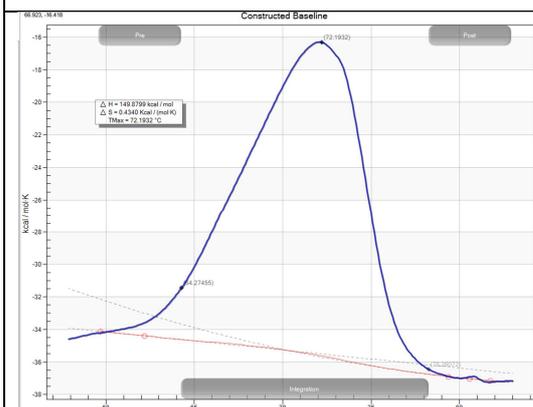
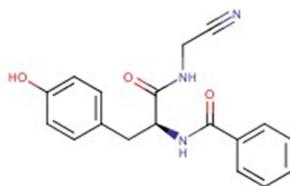


Anexo 2:

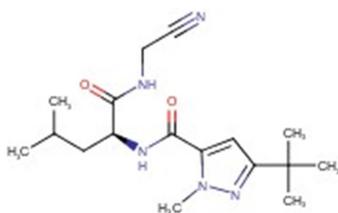
Termogramas obtidas no DSC para as moléculas em estudo.

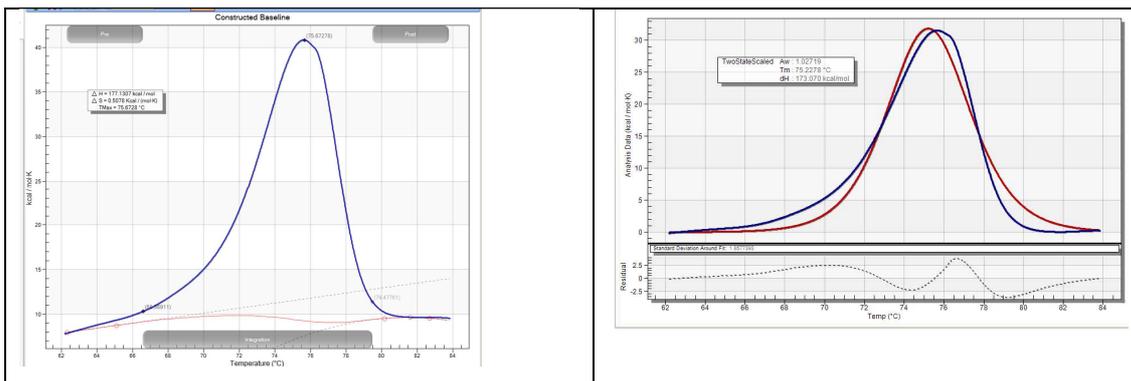


NEQ0551

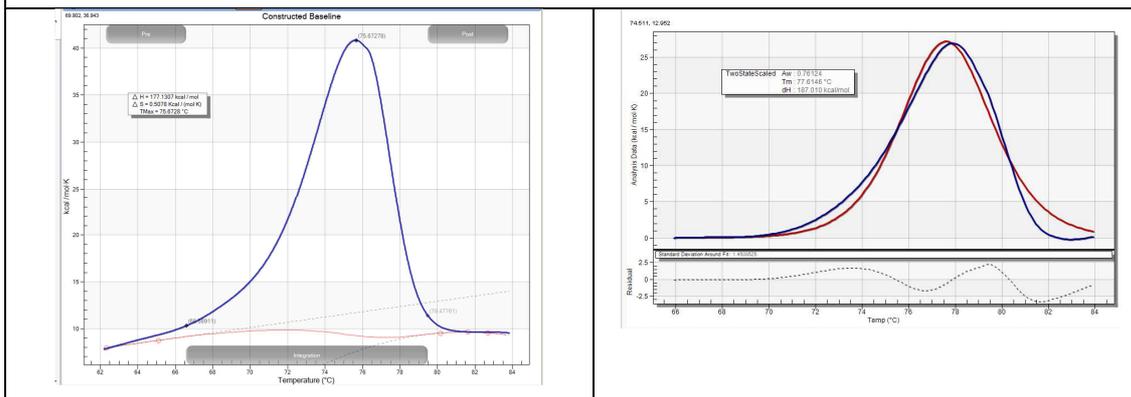
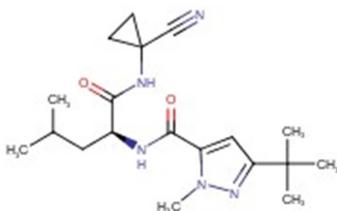


NEQ0568

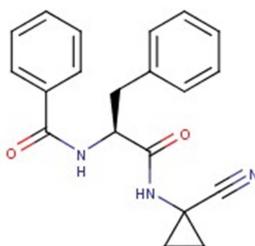


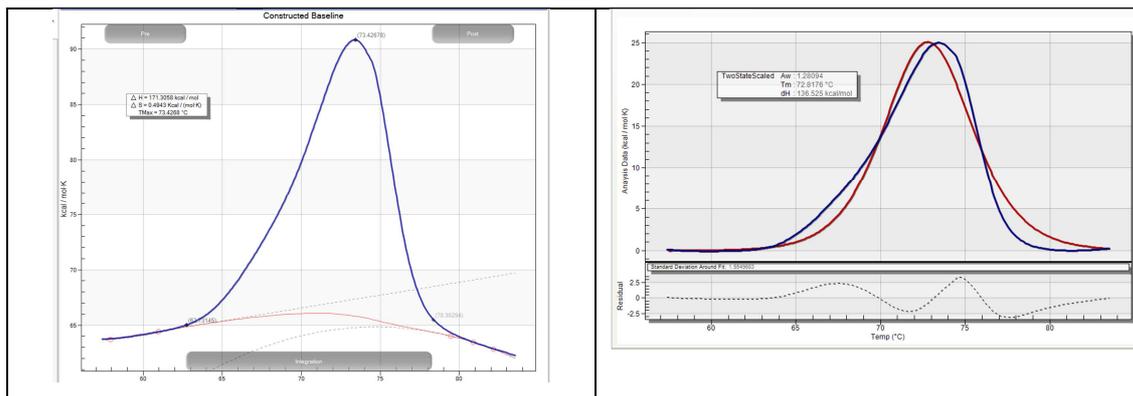


NEQ0569

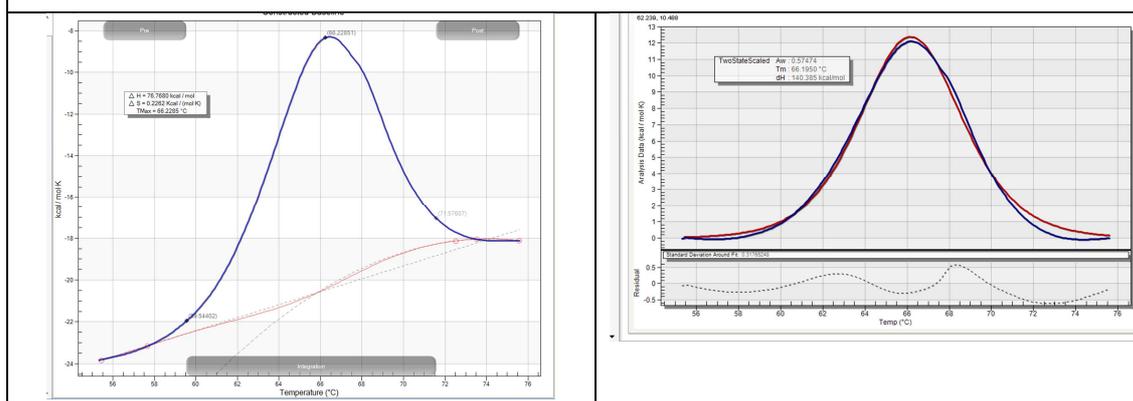
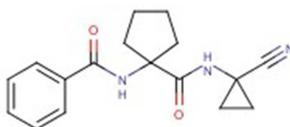


NEQ0570

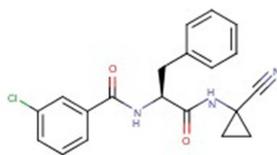


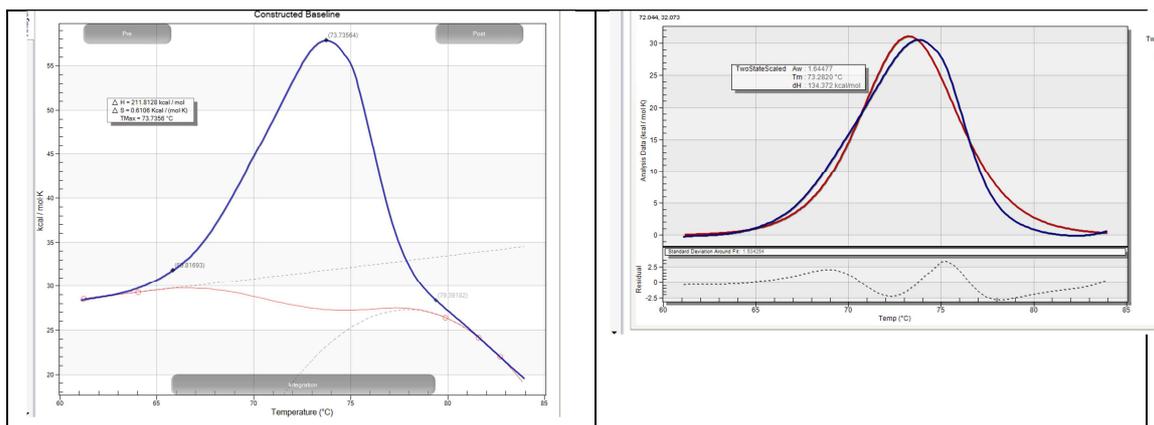


NEQ0572

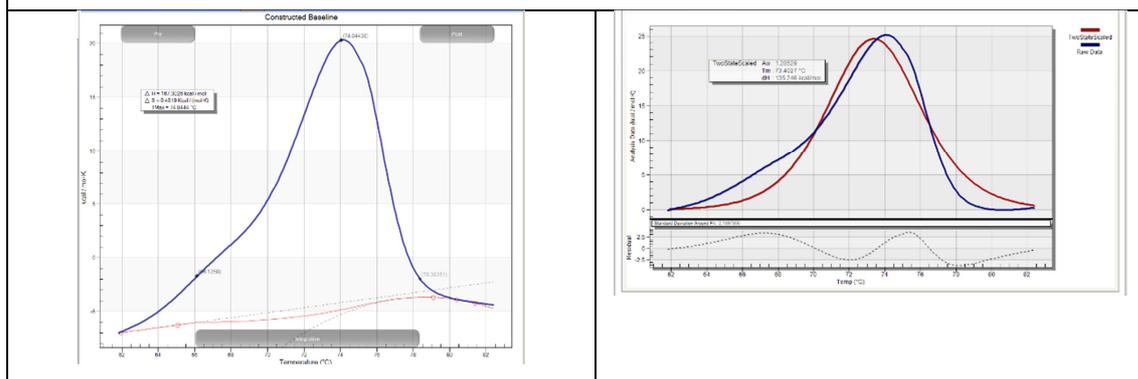
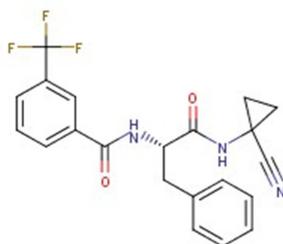


NEQ0710





NEQ0805



NEQ1040

