UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento de uma plataforma modelo para a busca de ligantes com potencial leishmanicida baseado na inibição seletiva da enzima diidroorotato desidrogenase

Eder Lorenzato Junior

Ribeirão Preto
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento de uma plataforma modelo para a busca de ligantes com potencial leishmanicida baseado na inibição seletiva da enzima diidroorotato desidrogenase

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Química e Física Biológica,

Orientado(a): Eder Lorenzato Junior

Orientador(a): Prof. Dra. Maria Cristina Nonato Costa

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 08/04/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2016

LOMBADA

LORENZATO
E.

Desenvolvimento de uma plataforma modelo para a busca de ligantes com potencial leishmanicida baseado na inibição seletiva da enzima diidroorotato desidrogenase

MESTRADO

FCFRPUSP

2016

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

Lorenzato, Eder.
Desenvolvimento de uma plataforma modelo para a busca de ligantes com potencial leishmanicida baseado na inibição seletiva da enzima diidroorotato desidrogenase. Ribeirão Preto, 2016.154 p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química e Física Biológica
Orientador: Nonato, Maria Cristina

1. Diidroorotato Desidrogenase 2. Leishmania. 3. Leishmaniose cutânea 4. Busca de ligantes

FOLHA DE APROVAÇÃO

Eder Lorenzato Junior
Desenvolvimento de uma plataforma modelo para a busca de ligantes com potencial leishmanicida baseado na inibição seletiva da enzima diidroorotato desidrogenase

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Química e Física Biológica
Orientador(a): Maria Cristina Nonato

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição:_____Assinatura:_____

Aos meus pais,
Eder e Marta,
pela dedicação e
confiança.

Agradecimentos

Aos meus irmãos Mariane e Gabriel, os quais foram grandes incentivadores.

A minha namorada Luana, pela sua paciência e carinho me apoiando nas horas em que eu mais precisei.

À minha orientadora Cris, a qual me deu todo o suporte e apoio para o desenvolvimento deste projeto.

Ao time do Laboratório de Cristalografia de Proteínas de Ribeirão Preto (LCP-RP), tanto aos antigos membros que tive a oportunidade de conhecer (Ricardo, Paty e Valeria e Ricardo "Cabelo"), aos que permanecem desde o início do meu mestrado (Cris, Iara, Joane e Renata) e aos que ao longo do tempo foram integrando o grupo (Mariana, Val, Felipe, Vinicius, e Vitor). Obrigado a todos por fazerem parte desta minha jornada.

Aos membros do grupo de Química Heterocíclica e Medicinal (QHETEM), os quais me acolheram em seu laboratório e contribuíram para o meu projeto. Especialmente ao professor Flavio pela sua dedicação.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP).

Ao CNPq e a FAPESP, pela bolsa de mestrado concedida e pelo financiamento de projetos do LCP-RP.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste projeto.

RESUMO

Lorenzato, E. **Desenvolvimento de uma plataforma modelo para a busca de ligantes com potencial leishmanicida baseado na inibição seletiva da enzima diidroorotato desidrogenase**. 2016. 153f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) causam um imenso sofrimento para a pessoa acometida e em muitos casos podem levar o indivíduo a morte. Elas representam um obstáculo devastador para a saúde e continuam a ser um sério impedimento para a redução da pobreza e desenvolvimento socioeconômico. Das 17 doenças desse grupo, a leishmaniose, incluindo a leishmaniose cutânea, tem grande destaque devido sua alta incidência, os gastos para o tratamento e as complicações geradas em processos de coinfecção. Ainda mais agravante, os investimentos direcionados ao controle, combate e principalmente a inovação em novos produtos é ainda muito limitado. Atualmente, a academia tem um importante papel na luta contra essas doenças através da busca de novos alvos terapêuticos e também de novas moléculas com potencial terapêutico. É nesse contexto que esse projeto teve como meta a implantação de uma plataforma para a identificação de moléculas com atividade leishmanicida. Como alvo terapêutico, optamos pela utilização da enzima diidroorotato desidrogenase de *Leishmania Viannia braziliensis* (LbDHODH), enzima de extrema importância na síntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidina, cuja principal função é converter o diidroorotato em orotato. Esta enzima foi clonada, expressa e purificada com sucesso em nosso laboratório. Os estudos permitiram que a enzima fosse caracterizada cineticamente e estruturalmente via cristalografia de raios-X. Os primeiros ensaios inibitórios foram realizados com o orotato, produto da catálise e inibidor natural da enzima. O potencial inibitório do orotato foi mensurado através da estimativa do IC_{50} e a interação proteína-ligante foi caracterizada através de estudos cristalográficos. Estratégias *in silico* e *in vitro* foram utilizadas na busca de ligantes, através das quais foram identificados inibidores para a enzima LbDHODH. Ensaios de validação cruzada, utilizando a enzima homóloga humana, permitiram identificar os ligantes com maior índice de seletividade que tiveram seu potencial leishmanicida avaliado *in vitro* contra as formas promastigota e amastigota de *Leishmania braziliensis*. A realização do presente projeto permitiu a identificação de uma classe de ligantes que apresentam atividade seletiva contra LbDHODH e que será utilizada no planejamento de futuras gerações de moléculas com atividade terapêutica para o tratamento da leishmaniose. Além disso, a plataforma de ensaios otimizada permitirá a avaliação de novos grupos de moléculas como uma importante estratégia na busca por novos tratamentos contra a leishmaniose.

Palavras-chave: Diidroorotato Desidrogenase; Leishmania; Leishmaniose cutânea; Busca de ligantes.

ABSTRACT

Lorenzato, E. **Development of a model plataform for the search of leishmanicidal compounds based on the selective inhibition of dihydroorotate dehydrogenase**. 2016. 153f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Neglected tropical diseases (NTDs) pose a devastating obstacle to health and remain a serious impediment to poverty reduction and socioeconomic development. Of 17 diseases listed among NTDs, the leishmaniasis, including cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis, are characterized by high number of cases and high costs for the treatment, usually of low efficacy and highly toxic. Even more problematic, the investment devoted to combat to control and to develop new therapies remains limited. Nowadays, the Academy has had an important role in the fight against NTDs, contributing in the search of new therapeutic targets and in the development of lead compounds. Within this context, the present project aimed the development of a pipeline for identification of leishmanicidal compounds based on the selective inhibition of the enzyme dihydroorotate dehydrogenase from *Leishmania Viannia braziliensis* (LbDHODH). LbDHODH acts in the *de novo* biosynthetic pathway of pyrimidine nucleotides, by catalysing the conversion of dihydroorotate to orotate and has been considered an important macromolecular target against proliferative and parasitic diseases. LbDHODH was successfully cloned, expressed and purified. The target enzyme was characterized by kinetic studies and its structure was solved by X-ray crystallography techniques. Inhibition assays were performed in presence of orotate, product of catalysis and natural inhibitor of DHODH. Its inhibitory potential was evaluated by the estimative of IC_{50} and the protein-ligand interaction was characterized by crystallographic studies. I*n silico* and *in vitro* strategies were used in the search for LbDHODH inhibitors. Cross-validation studies were performed against the human homologue enzyme. Inhibitors displaying higher selectivity index were evaluated against both promastigote and amastigote forms of *Leishmania braziliensis*. Our work allowed the identification of a new class of compounds that display selective inhibition of LbDHODH and show leishmanicidal activity. They will be used as prototypes for the development of new generations of LbDHODH inhibitors. Moreover, our pipeline can be used to screen large number of chemical libraries as tool for the identification of different chemical entities that can contribute to the development of new therapeutic strategies for the treatment of leishmaniasis.

Keywords: Dihydroorotate Dehydrogenase; Leishmania; Cutaneous leishmaniasis, Search inhibitors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. **Plataforma de ensaios na busca de ligantes baseado na inibição seletiva da enzima diidroorotato desidrogenase.** A construção da plataforma de identificação de ligantes iniciou-se com a produção heteróloga da enzima alvo. Como primeira etapa foi realizada a completa caracterização cinética, a qual permitiu otimizar os ensaios de avaliação do potencial inibitório utilizando o orotato como modelo. A cristalização da LbDHODH foi utilizada não somente a caracterização da estrutura livre de ligantes, mas também a caracterização dos complexos proteína-ligante. Utilizamos três estratégias para enriquecer nossa biblioteca de ligantes: a síntese de moléculas comercias que apresentaram atividade leishmanicida, busca de ligantes *in silico* e por fragmentos baseados no núcleo 2-amino benzotiazol. Além disso, ensaios de validação cruzada frente à enzima diidroorotato desidrogenase humana (HsDHODH) foram realizados a fim de selecionar os compostos seletivos para a enzima do parasita. Em complemento aos ensaios enzimáticos, os testes celulares serão realizados afim de verificar a eficácias dos compostos em nível celular. Desenvolvida nossa plataforma, procedimentos de formulação poderão ser iniciados para que os testes pré-clínicos sejam realizado.....4

Figura 2. **Ciclo de vida do parasito causador da leishmaniose.** Agente causador do gênero *Leishmania ssp* dos diferentes tipos de Leishmaniose. Imagem retirada e adaptada do CDC(http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/).....8

Figura 3. **Incidência de Leishmaniose cutânea no mundo**. Número e distribuição de casos de **LC** no mundo entre 2005-2009. Imagem adaptada da OMS.....9

Figura 4. **Casos reportados de Leishmaniose Cutânea no Novo Mundo**. (**A**) Distribuição da doença na América, onde as áreas verdes são consideradas livres da doença e as áreas mais roxas são consideras endêmicas, os pontos em azul são considerados centros de ocorrência. (**B**) Risco previsto para novos casos, em verde baixa probabilidade e em roxo alta probabilidade de ocorrência. Imagem retirada e adaptada de Pigott *et al.*, 2014.....10

Figura 5. **Manifestações leishmaniose leishmaniose cutânea e mucosa**. As feridas em **A** representa a forma mais comum da leishmaniose a qual é a manifestação cutânea. Em **B** este representado a forma muco-cutânea da leismaniose, a qual é uma evolução da manifestação cutânea, sendo considerada mais grave. Imagens adaptadas de David e Craft, 2009.....11

Figura 6. **Estrutura dos princípios ativos dos medicamentos utilizados para o tratamento da leishmaniose cutânea e muco-cutânea.** No Brasil esses quais são disponibilizados gratuitamente pelo governo.....12

Figura 7. **Representação estrutural das enzimas TcDHODH (PDB 3C3N) em A e HsDHODH (PDB 1D3G) em B**. Apesar de ambas enovelarem em um motivo de barril α/β folha formando um sítio catalítico altamente conservado, elas apresentam diferenças estruturais como o resíduo catalítico e em especial na HsDHODH um

domínio de membrana formado por duas α hélices. Imagem retirada de Pinheiro, 2012.....17

Figura 8. **Mecanismo proposto para a catalise das enzimas DHODH de classe 1 A**. O mecanismo catalítico consiste em converter L-diidroorotato em orortato, na primeira etapa e posteriormente converter fumarato em malato na segunda etapa. Imagem retirada de Inaoka *et al.*, 2008.....18

Figura 9. **Proposta sugerida para obter um composto líder a partir de fragmentos**. Em **A** temos uma região de uma proteína ontem esta representado três bolsões. Através do *screening* de fragmentos foi identificado um ligante para um dos bolsões em **B**. O conhecimento da estrutura da enzima, aliado ao processo de crescimento do fragmento identificado como ligante permite chegar a um composto líder representado em **C**. Imagem retirada e adaptada de *Boston University* http://www.bu.edu/bmerc/.....35

Figura 10. **Estrutura do núcleo 2-amino benzotiazol**. Núcleos de fragmentos majoritariamente ensaiados contra LbDHODH.....35

Figura 11. **Fragmentos derivados do núcleo 2-amino benzotiazol**. Estes fragmentos foram avaliados quanto ao seu potencial inibitório frente à enzima LbDHODH.....36

Figura 12. **Gel de SDS Page**. M corresponde ao marcador de peso molecular; a coluna 1 refere-se à fração de células lisada enquanto que a coluna 2 refere-se à fração solúvel; na coluna 3 temos a fração não ligada; nas frações 4 e 5 temos as eluições de 25 mM e 50 mM de imidazol, respectivamente. Por último, na coluna 5 e 6 temos a fração de 100 mM, onde se observa a presença da LbDHODH com alto grau de pureza.....43

Figura 13. **Espectro de absorção UV/visível**. As linhas contínuas representam o espectro da LbDHODH e as linhas pontilhadas o espectro do FMN livre. O pico máximo encontrado para a LbDHODH foi de 459nm, onde $\varepsilon_{LbDHODHFMN}$ = 11,352 M^{-1} cm^{-1}.....44

Figura 14. **Determinação do pH ótimo da LbDHODH**. A máxima velocidade de formação de orotato foi detectada na presença do pH 8, o qual possui TRIS como agente tamponante.....45

Figura 15. **Representação geral do mecanismo cinético do tipo ping-pong**. Mecanismo executado pelas enzimas DHODH 1 A, como a LbDHODH.....45

Figura 16. **Determinação dos parâmetros cinéticos da LbDHODH**.(A) Velocidade de formação de orotado fixando valores de DHO e variando FUM (valores de DHO em µM, 10 (●), 12,5 (○), 15 (▼) , 17,5 (△), 20 (■), 25(□), 30 (◆), 35 (◇), 40 (▲) 45 (▽), 50 (⬢) .(B) Velocidade de formação de orotato fixando valores de FUM e variando DHO (valores de FUM em µM 15,125 (●),32,5 (⋆), 62,5 (▲) , 125 (◇), 250 (■), 300(○), 375 (★), 500 (×) e 600 (□).....46

Figura 17. **Gráficos de fluorescência em função da temperatura**. A diferença de temperatura de desenovelamento da LbDHODH realizada por dois métodos diferentes, utilizando orotato como molécula modelo.....50

Figura 18. **Gráficos de fluorescência em função da temperatura**. A diferença de temperatura de desenovelamento da LbDHODH realizada por dois métodos diferentes, utilizando diferentes inibidores da LbDHODH.....51

Figura 19. **Gráfico de % de atividade em função do log [orotato]**. Gráfico utilizado para estimar do IC_{50}.....52

Figura 20 Primeiros cristais de LbDHODH, condição 32 do kit Crystal Screen da empresa Hampton Research.....52

Figura 21. Cristal de LbDHODH na condição otimizada (100 mM de Hepes pH 7,5 e 1,6M de Sulfato de Amônio).....53

Figura 22. Cristal do complexo LbDHODH-Orotato.....54

Figura 23. **Representação do monômero e dímero da LbDHODH** (a) Representação do monômero da LbDHODH composto por um barril central de oito folhas β paralelas (β_1- β_8) ilustrados em rosa cercados e de oito α hélices em azul. Duas fitas β antiparalelas (β_a- β_b) N-terminal foram encontradas no fundo do barril e no topo. Elementos de estrutura secundária e loops podem ser observados em verde, azul claro e salmão. O grupo prostético FMN é representado em amarelo. (b) Estrutura dimérica funcional da LbDHODH.....55

Figura 24. **Superposição entre a HsDHODH (PDB ID 2FPV) e a LbDHODH (PDB ID 4WZH)**. A principal diferença entres as enzimas é a presença de um domino N-terminal (Azul) da HsDHODH, um sitio de interação de membrana presente nas 2 DHODH, além disso os elementos de estrutura secundaria (verde) presente na LbDHDODH confere a interface dimérica da enzima de classe 1A.....57

Figura 25. **Representação da interação orotato e o sitio ativo da LbDHODH.** Neste caso é possível observar, através da determinação da estrutura cristalográfica, as interações de hidrogênio entre a molécula de orotato e os resíduos do sítio catalítico além da interação orotato FMN.....57

Figura 26. **Sobreposição das estrutura de LbDHODH com e sem orotato**. Em **A** temos a sobreposição dos dímeros da LbDHODH, na presença e na ausência de orotato, mostrando que não há alterações conformacionais da estrutura enzimática na presença de orotato. Já em **B** é mostrado o sitio ativo das LbDHODH sobreposta e a seta preta mostra um pedaço do loop catalico pode ser vizualizado no complexo LbDHODH-ORO. Em azul é a enzima na ausência do ligante (PDB ID 4WZH) e em verde a enzima complexada ao substrato (estrutura ainda não depositada no PDB).....58

Figura 27. Representação do modo de interação do composto LCPVL898 e o sitio ativo da LbDHODH predito por docagem.....59

Figura 28. **Compostos que foram docados para o sitio ativo da LbDHODH**. Estes são análogos ao composto LCPVL 898, o qual apresenta ótima taxa de

inibição nos ensaios *in vitro* frente a enzima em estudo.....60

Figura 29. Representação do modo de interação do composto LCPVL105 e o sitio ativo da LbDHODH.....61

Figura 30. Representação do modo de interação do composto LCPVL198 e o sitio ativo da LbDHODH.....61

Figura 31. Representação do modo de interação do composto LCPVL201 e o sitio ativo da LbDHODH.....62

Figura 32. Representação do modo de interação do composto LCPVL246 e o sitio ativo da LbDHODH.....62

Figura 33. Representação do modo de interação do composto LCPVL697 e o sitio ativo da LbDHODH.....63

Figura 34. Representação do modo de interação do composto LCPVL750 e o sitio ativo da LbDHODH.....63

Figura 35. Representação do modo de interação do composto LCPVL780 e o sitio ativo da LbDHODH.....64

Figura 36. Representação do modo de interação do composto LCPVL930 e o sitio ativo da LbDHODH.....64

Figura 37. Gráficos da porcentagem de atividade da enzima LbDHODH em função do logaritmo da concentração do composto LCPVL 697.....66

Figura 38. Ésteres e amidas sintetizados.....75

Figura 39. Equilíbrio tautomérico observado no composto **12**. Em **A** a forma cetónica e em **B** a forma enólica.....77

Figura 40. **Gráficos da porcentagem de atividade da enzima LbDHODH em função do logaritmo da concentração de inibidor**. Estes gráficos representam o IC_{50} das moléculas LCPSP 3027 e LCPVL 898, respectivamente.....79

Figura 41. Gráficos da porcentagem de atividade da enzima LbDHODH em função do logaritmo da concentração do composto Tia16.....82

Figura 42. Gráficos da porcentagem de atividade da enzima LbDHODH em função do logaritmo da concentração do composto Tia18.....82

Figura 43. Gráficos da porcentagem de atividade da enzima LbDHODH em função do logaritmo da concentração do composto Tia26.....82

Figura 44. Gráficos da porcentagem de atividade da enzima LbDHODH em função do logaritmo da concentração do composto Tia29.....83

Figura 45. Gráficos da porcentagem de atividade da enzima LbDHODH em função do logaritmo da concentração do composto Tia30.....83

Figura 46. Gráficos da porcentagem de atividade da enzima LbDHODH em função do logaritmo da concentração do composto Tia34.....83

Figura 47. Gráficos da porcentagem de atividade da enzima LbDHODH em função do logaritmo da concentração do composto Tia35.....84

Figura 48. Gráficos da porcentagem de atividade da enzima LbDHODH em função do logaritmo da concentração do composto Tia36.....84

Figura 49. Compostos de origem sintética e natural avaliados contra a LbDHODH.....88

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. **Etapas da biossíntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidina em procariotos**. (i) carbomil fosfatase sintetase; (ii) aspartato transcarba-milase; (iii) diidroorotase; (iv) diidroorotato desidrogenase; (v) orotato fosforibosil transferase; (vi) orodilato descarboxilase. Esquema adaptado de Munier-Lehmann *et al.*, 2013.....15

Esquema 2. Rotas sintéticas abordadas para a obtenção do composto LCPSP 3027.....32

Esquema 3. Rota de síntese para a obtenção dos derivados ésteres e amidas do composto LCPSP 3027.....33

Esquema 4. Estratégia abordada para obtenção da molécula LCPVL 898.....34

Esquema 5. **Representação da atuação do DCIP como segundo substrato da reação**. Na primeira etapa o L-diidroorotato é oxidado pelo FMN, o qual reduz formando o $FMN_{REDUZIDO}$. Posteriormente o DCIP reoxida o FMN, reduzindo-o para $DCIPH_2$. Nesta reação, o DCIP que inicialmente é azul e absorve no comprimento de onda de 610 nm passa para incolor, de modo a não absorver mais no comprimento de onde de 610 nm. Deste modo, é possível monitorar a formação de orotato indiretamente.....38

Esquema 6. Estratégia A para obtenção do LCPSP 3027.....68

Esquema 7. Mecanismo sugerido para a obtenção do composto metilcumalinato (**2**).....68

Esquema 8. Mecanismo sugerido para o processo de lactamização.....69

Esquema 9. (A) Tentativa de obtenção do tioester. (B) Equilíbrio tautomérico existente no composto **3**.....70

Esquema 10. Via alternativa abordada para obtenção do LCPSP 3027, evitando o efeito tautomérico.....71

Esquema 11. Estratégia B visando à obtenção do LCPSP 3027.....72

Esquema 12. Métodos abordados para a obtenção do tioéster **6** utilizando diferentes reagentes e mecanismos.....73

Esquema 13. Formação do dímero da 2-mercaptopiridina.....73

Esquema 14. Síntese de ésteres.....74

Esquema 15. Metodologia de síntese dos derivados de amida.....75

Esquema 16. Abordagem sintética para obtenção do composto LCPVL 898.....76

Esquema 17. Proposta do mecanismo de halogenação do composto **12**.....77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores do coeficiente de Hill para cada concentração de fumarato.....47

Tabela 2. Valores de K_{cat}, K_m^{FUM}, $K_{0.5}^{DHO}$ e coeficiente de Hill (h) para as enzimas LbDHODH e LmDHODH.....48

Tabela 3. Valores em porcentagem de inibição dos compostos buscados pela estratégia II.....65

Tabela 4. Valores em porcentagem de inibição dos compostos buscados pela estratégia II.....78

Tabela 5. Valores em porcentagem de inibição dos compostos buscados pela estratégia II por screening de fragmentos.....80

Tabela 6. Valores em porcentagem de inibição dos compostos avaliado contra a HsDHODH.....86

Tabela 7. **Resultado dos ensaios anti-promastigota e anti-amastigota**. O perfil inibitório foi estimado pela determinação do IC_{50}.....87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
d	Dupleto
dd	duplo-dupleto
DCIP	2,6 - Dicloroindofenol
DHO	Diidroorotato
DHODH	Diidroorotato desidrogenase
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMF	Dimetilformamida
DNA	Ácido desoxirribonucléico
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FMN	Flavina mononucleotídeo
HEPES	Ácido etanosulfônico 4-2 hidroxietil piperazina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HsDHODH	Diidroorotato desidrogenase de Homo sapiens
IC50	Concentração da substância que inibe 50% da atividade
IPTG	Isopropiltio-β-D-galactosídeo
Km	Constante de Michaelis
LC	Leishmaniose cutânea
LMC	Leishmaniose muco-cutânea
LdDHODH	Diidroorotato desidrogenase de Leishmania donovani
LmDHODH	Diidroorotato desidrogenase de Leishmania major
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
m	multipleto
MeOH	Metanol
m/z	Relação massa/carga
Ni-NTA	Àcido nitrilotriacético
ORO	Orotato
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDB	Protein Data Bank
PMSF	Fluoreto fenilmetilsulfonil
PfDHODH	Diidroorotato desidrogenase de Plasmodium falciparum
ppm	Partes por milhão
pI	Ponto isoelétrico
RMN	Ressoância Magnética Nuclear
s	Simpleto
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
t	Tripleto
TbDHODH	Diidroorotato desidrogenase de Trypanosoma brucei
TcDHODH	Diidroorotato desidrogenase de Trypanosoma cruzi
Tm	Temperatura de desnaturação
Tris	Tris-(hidroximetil)aminoetano
USP	Universidade de São Paulo

δ	Deslocamento Químico

SUMÁRIO

RESUMO i
ABSTRACT ii
LISTA DE FIGURAS iii
LISTA DE ESQUEMAS viii
LISTA DE TABELAS x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS xi

1.0 INTRODUÇÃO 1

1.1 *CONSIDERAÇÕES INICIAIS* 2
1.2 *DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS* 5
1.3 *LEISHMANIOSE CUTÂNEA* 6
1.3.1 Histórico e ciclo de vida 6
1.3.2 Incidência 8
1.3.3 Diagnóstico e Manifestação Clínica 10
1.3.4 Prevenção e tratamento 11
1.3.5 Impacto socioeconômico 13
1.4 *DIIDROOROTATO DESIDROGENASE* 14
1.4.1 Função 14
1.4.2 Classificação das DHODHs 16
1.4.3 Mecanismo catalítico da DHODH de classe 1A 17
1.4.4 Diidroorotato desidrogenase como alvo terapêutico 18

2. OBJETIVOS 21

3. MATERIAIS E METODOS 23

3.1 *PRODUÇÃO HETEROLOGA.* 24

3.1.1 Clonagem, Expressão e Purificação 24
3.1.2 Purificação 25
3.1.3. Predição de características bioquímicas teoricas 25
3.1.4 Determinação da concentração da LbDHODH 25
3.2 *CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA* 26
3.2.1 Determinação do pH ótimo 26
3.2.2 Elucidação do perfil cinético 26
3.2.3 Estudos de termoestabilidade 28
3.3 *CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL* 29
3.3.1 Cristalização 29
3.4 *BUSCA POR LIGANTES* 29
3.4.1 Estratégia I: *In silico* 30
3.4.2 Estratégia II: *in vitro* 30
3.4.2.1 Síntese dos compostos LCPVL 898 e LCPSP 3027. 30
3.4.2.1.1 Metodologias abordadas para a síntese do LCPSP 3027 32
3.4.2.1.2 Metodologia abordada para a síntese do LCPVL 898 33
3.4.2.2 *Screening* de fragmentos baseados no núcleo 2-aminotiazol 34
3.4.2.3 Composto doado por diferentes colaboradores 37
3.4.3 Avaliação do potencial inibitório em relação à LbDHODH 37
3.4.4 Avaliação do potencial inibitório e toxicidade em nível celular. 40
3.4.4.1 Avaliação da Citotoxicidade 40
3.4.4.2 Atividade anti-promastigotas 41
3.4.4.3 Atividade anti-amastigotas 41

4. RESULTADOS E DICUSSÕES 42

4.1 *PRODUÇÃO DA LbDHODH, DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO E PARAMETROS BIOQUÍMICOS TEÓRICOS.* 43
4.1.1 Expressão e purificação da LbDHODH 43
4.1.2 Determinação da concentração da LbDHODH e de parâmetros bioquímicos teóricos. ... 43
4.2 *CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA* 44
4.2.1 Determinação do pH ótimo 44
4.2.2 Caracterização do perfil cinético da LbDHODH 45
4.2.3 Estudos de termoestabilidade 48
4.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INIBITÓRIO DO OROTATO 51
4.4 *DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL* 52
4.4.1 Ensaios de cristalização 52
4.4.2 Elucidação estrutural da LbDHODH 54

4.4.3 Elucidação estrutural do complexo LbDHODH-ORO 57

4.5 *ESTRATÉGIAS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE LIGANTES* 59

4.5.1 Estratégia I: *In Silico* 59

4.5.1.1 Avaliação do potencial inibitório enzimático de inibidores encontrados pela estratégia I. 65

4.5.1.2 Avalição da citotoxicidade e potencial anti-promastiga e anti-amastigotas de compostos da encontrados na estratégia I. 67

4.5.2 Estratégia II: *in vitro.* 67

4.5.2.1 Síntese do composto LCPSP 3027 e análogos 67

4.5.2.2 Síntese do composto LCPVL 898 75

4.5.2.3 Avaliação do potencial inibitório enzimatico dos composto sintetizados 77

4.5.2.4 Avaliação do potencial inibitório enzimático baseado nos fragmentos do núcleo 2-amino benzotiazol 80

4.5.2.5 Avaliação da citotoxicidade e do potencial anti-promastigo e anti-amastigota dos fragmentos derivados do núcleo 2-amino benzotiazol. 86

4.5.3 Compostos cedidos por colaboradores 87

5. CONCLUSÃO 89

6. APÊNDICES 95

7. REFERÊNCIAS 124

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 *CONSIDERAÇÕES INICIAIS*

Ao longo de vários anos nosso laboratório tem trabalhado na caracterização de e avaliação de proteínas alvo para o desenvolvimento de moléculas candidatas a fármacos, focando principalmente compostos direcionados ao tratamento das enfermidades conhecidas como Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs). Esse grupo de doenças causam um imenso impacto no aspecto socioeconômico, leva sofrimento para as pessoas acometidas, independente da DNTs, as quais em alguns casos pode levar o individuo a morte. Como exemplo de DNTs podemos citar os diferentes tipos de leishmaniose, a doença de chagas e a esquistossomose.

O presente projeto tem como foco o desenvolvimento de uma plataforma de busca de moléculas bioativas contra *Leishmania braziliensis*, espécie responsável pela Leishmaniose muco-cutânea. As leishmanioses correspondem a um grupo de enfermidades espalhadas de maneira endêmica em 88 países, pertencentes a quatro continentes (África, Ásia, Europa, América do Sul e América do Norte), e em quase sua totalidade são países subdesenvolvidos. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que aproximadamente 14 milhões de pessoas estão contaminadas com as diferentes formas da doença e cerca de 350 milhões de pessoas correm o risco de contraírem a mesma.

Existem basicamente dois tipos de leishmaniose, a leishmaniose visceral e a cutânea. A leishmaniose visceral (**LV**), conhecida como calazar, e que causa hipertrofia do baço e fígado, febre, anemia e perda de peso é sem dúvidas a forma mais grave da doença sendo fatal em alguns casos (Aguir *et al.*, 2013). A leishmaniose cutânea (**LC**) é forma mais comum da doença provocando ulcerações e cicatrizes na pele (Daftarian *et al.*, 2013). A leishmaniose muco-cutânea ou mucosa (**LMC**), é normalmente uma evolução do quadro clinico da leishmaniose cutânea quando não tratada adequadamente e tem como característica a presença de úlceras que levam a destruição das mucosas, principalmente do nariz, boca e garganta (De Paulo *et al.*, 2013). Espécies diferentes de *Leishmania* são responsáveis pelas diferentes formas clínicas da doença. Infecções por *L. major* ou *L. tropica* causam **LC**, as espécies da América do Sul, como *L. (V) braziliensis* causa

além da **LC** a **LMC** e espécies como a *L. donovani* ou *L. infantum* causam **LV** (Pace, 2014).

De todas as formas de manifestação da leishmaniose, a cutânea é a forma mais comum, a qual é considerada endêmica em 84 países e mais de 90% dos casos concentra-se em somente 7 países, incluindo o Brasil. Além disso, a leishmaniose cutânea é considerada uma das seis mais importantes doenças infecciosas devido a sua alta incidência em diversos países (Nascimento *et al.*, 2013). A manifestação muco-cutânea é dependente da espécie que parasita o hospedeiro e é mais prevalente na América do Sul (De Paulo *et al.*, 2013). Os medicamentos para ambas manifestações são praticamente os mesmos e a falta de investimento na busca de novas terapias é uma das principais causas da persistência da leishmaniose mucosa ao redor do mundo (Mansueto *et al.*, 2014)

O limitado investimento dos governos e das indústrias farmacêuticas no controle e desenvolvimento de novas formas de tratamento para a leishmaniose contribui para o surgimento de novos casos e o agravamento dos já existentes. Em contrapartida, as pesquisas realizadas em nível acadêmico tem fornecido um grande arsenal de pequenas moléculas exploradas para o tratamento da leishmaniose, além de diversos alvos que podem auxiliar na busca de um tratamento eficaz contra a mesma. Neste sentido, nosso grupo, a fim de identificar possíveis moléculas candidatas a fármacos contra a leishmaniose, tem utilizado de sua expertise em biologia estrutural, somada à grande experiência de nossos colaboradores na área de síntese orgânica, tecnologia farmacêutica e parasitologia, para desenvolver plataformas de ensaios de identificação de ligantes que apresentem atividade leishmanicida baseado em alvo proteíco.

Nesse estudo em particular, nosso alvo é a enzima diidroorotato desidrogenase de *Leishmania Viannia braziliensis* (LbDHODH). O fluxograma da **Figura** 1 esquematiza os passos utilizados na construção e avaliação da nossa plataforma de ensaios. Inicialmente, como um protótipo para validação de nossa plataforma utilizamos o orotato inibidor natural da enzima. A plataforma de ensaios foi então utilizada para avaliar diferentes bibliotecas de compostos e fragmentos de origem sintética e natural, e posteriormente quantificar e caracterizar cinética e estruturalmente o mecanismo de inibição de compostos identificados. Os compostos

selecionados e identificados como seletivos através da realização de estudos de validação cruzada, utilizando a enzima homóloga humana HsDHODH, foram avaliados em ensaios celulares contra as formas promastigota e amastigota de *Leishmania braziliensis*. Foram também realizados ensaios *in vitro* da citotoxicidade sobre fibroblastos L969. Os compostos identificados como ativos serão utilizados para o planejamento de novas gerações de inibidores que serão avaliados em nossa plataforma.

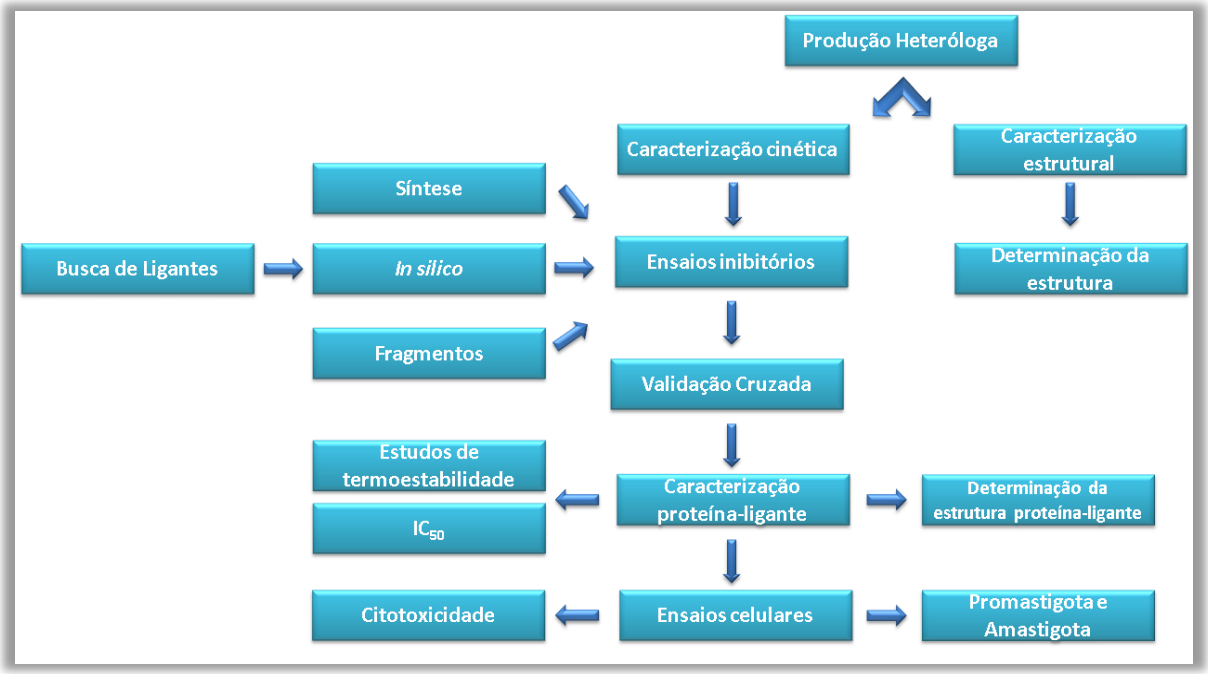


Figura 1. **Plataforma de ensaios na busca de ligantes baseado na inibição seletiva da enzima diidroorotato desidrogenase.** A construção da plataforma de identificação de ligantes iniciou-se com a produção heteróloga da enzima alvo. Como primeira etapa foi realizada a completa caracterização cinética, a qual permitiu otimizar os ensaios de avaliação do potencial inibitório utilizando o orotato como modelo. A cristalização da LbDHODH foi utilizada não somente a caracterização da estrutura livre de ligantes, mas também a caracterização dos complexos proteína-ligante. Utilizamos três estratégias para enriquecer nossa biblioteca de ligantes: a síntese de moléculas comercias que apresentaram atividade leishmanicida, busca de ligantes *in silico* e por fragmentos baseados no núcleo 2-amino benzotiazol. Além disso, ensaios de validação cruzada frente à enzima diidroorotato desidrogenase humana (HsDHODH) foram realizados a fim de selecionar os compostos seletivos para a enzima do parasita. Em complemento aos ensaios enzimáticos, os testes celulares serão realizados afim de verificar a eficácias dos compostos em nível celular. Desenvolvida nossa plataforma, procedimentos de formulação poderão ser iniciados para que os testes pré-clínicos sejam realizados.

Vale a pena ressaltar, que devido à alta similaridade sequencial compartilhada entre as DHODHs de tripanossomatídeos, os resultados obtidos

através do uso da plataforma poderão ser também explorados para o combate de outras formas clínicas de leishmaniose causada por outras espécies de Leishmania, assim como a doença de Chagas e a doença do sono, causada pelo *Trypanossoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*, respectivamente.

1.2 *DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS*

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) as doenças tropicais negligenciadas (DTN) pertencem a um grupo de doenças de características bastante distintas que atinge principalmente as populações mais pobres. As DTNs são endêmicas em 149 países e atingem mais de 1,4 bilhões de pessoas ao redor do mundo, custando bilhões de dólares para os governos. Atualmente 17 doenças são consideradas DTN pela OMS, dentre elas destaca-se a Tripanossomíase Africana, Leishmaniose, Doença de Chagas, Cisticercose, Esquistossomose e a Dengue. As doenças tropicais negligenciadas são causadas por agentes infecciosos e parasitários como os vírus, bactéria, protozoários e helmintos.

Os fármacos disponíveis no mercado para os tratamentos de algumas DNTs como a leishmaniose são escassos, apresentam baixa eficiência e sérios problemas colaterais, além da alta toxicidade e em muitos casos, há relatos do surgimento de resistência a essas drogas (Maltezou, 2010). Apesar do grande número de pessoas que são acometidas por essas doenças, os investimentos direcionados ao combate e a pesquisa por novos compostos bioativos e alvos terapêuticos são mínimos.

Em 30 de janeiro de 2012 a Organização Mundial da Saúde aprovou a Declaração de Londres que tem como objetivo erradicar, eliminar e intensificar o controle das principais DNTs até o final desta década. Para que esse objetivo seja alcançado a OMS contará com apoio dos governos dos Estados Unidos, Reino Unido e Emirados Árabes, de várias companhias farmacêuticas, da Fundação Bill & Melinda Gates e do Banco Mundial. As principais medidas para a execução do tratado incluem o aumento de doação de medicamentos pelas gigantes farmacêuticas, o fornecimento de 800 milhões de dólares para apoiar programas de eliminações de doenças, a expansão de programas de distribuição de medicamentos e por último o incentivo na busca por novos medicamentos (Dias *et al.*, 2013).

As medidas propostas pela declaração de Londres de 2012 já começam a surtir efeitos com o aumento do acesso aos medicamentos pelas populações mais pobres, além da intensificação dos programas de eliminação e prevenção dessas doenças (Molyneux, 2014). Porém os investimentos em P&D para a busca não só de novos compostos bioativos, mas de novos alvos terapêuticos ainda é muito escasso. Apesar da Declaração de Londres ser uma excelente proposta no combate das DTNs, ela peca pelo não investimento em inovação, seja na validação de um novo alvo terapêutico ou na descoberta de novos princípios ativos.

1.3 *LEISHMANIOSE CUTÂNEA*

1.3.1 Histórico e ciclo de vida

O militar William Boog Leishman identificou em 1903 o protozoário causador do calazar ou febre dum-dum e em sua homenagem foi dado o nome do gênero deste protozoário de *Leishmania* (Stockdale e Newton, 2013). Com o avanço da microscopia, biologia molecular, bioquímica e imunologia foi possível identificar as diversas espécies causadoras das leishmanioses e correlacionar com suas correspondentes manifestações clínicas.

Em se tratando de leishmaniose cutânea e muco-cutânea no Brasil, o manuscrito de Eduardo Rabelo de título "Contribuições ao estudo da leishmaniose tegumentar no Brasil” descreve que a existência da leishmaniose do Brasil já era observada no século XIX, podendo ser dividida em três períodos históricos. No primeiro, de origem incerta que vai até 1895, começou-se a observar feridas causadas pelo protozoário as quais foram denominadas de botão da Bahia. O segundo período que vai até 1909, quando foi identificado o agente etiológico da ulcera de Bauru. O último período inicia-se em 1910 até o ano de publicação do manuscrito, onde foram observadas as lesões mucosas, as quais foram associadas ao agente etiológico da leishmaniose (Vale e Furtado, 2005).

Tripanossomatideos são protozoários caracterizados por possuir um único flagelo. Todos os membros desse grupo são exclusivamente parasitas e primariamente encontrados em insetos. Alguns genêros do grupo também utilizam-se de um segundo hospedeiro, como o homem, e são responsáveis por uma diversidade de doenças. Três doenças humanas importantes são causadas por

tripanossomatídeos como a Doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, a doença do sono causada pelo *Trypanosoma cruzi*, e as Leishmanioses, um grupo de doenças causada por diferentes espécies do parasita *Leishmania* (Wheeler, Gluenz e Gull, 2013).

Atualmente vinte e uma espécies do gênero *Leishmania* são descritas, as quais são responsáveis pelas diversas formas de leishmaniose. No Brasil, a L. *chagasis* é a cepa responsável pela manifestação visceral. Por outro lado, as cepas L. *braziliensis*, *amazonensis* e *guayanensis* são responsáveis pela manifestação cutânea. Enquanto as cepas *amazonensis* e *guayanensis* estão restritas a região amazônica, a cepa L. *braziliensis*, também responsável pela manifestação muco-cutânea, está distribuída por todo território brasileiro e em alguns países da América do Sul, (Pace, 2014).Independentemente da manifestação clínica da doença o ciclo de vida da *Leishmania* é conservado (**Figura** 2).

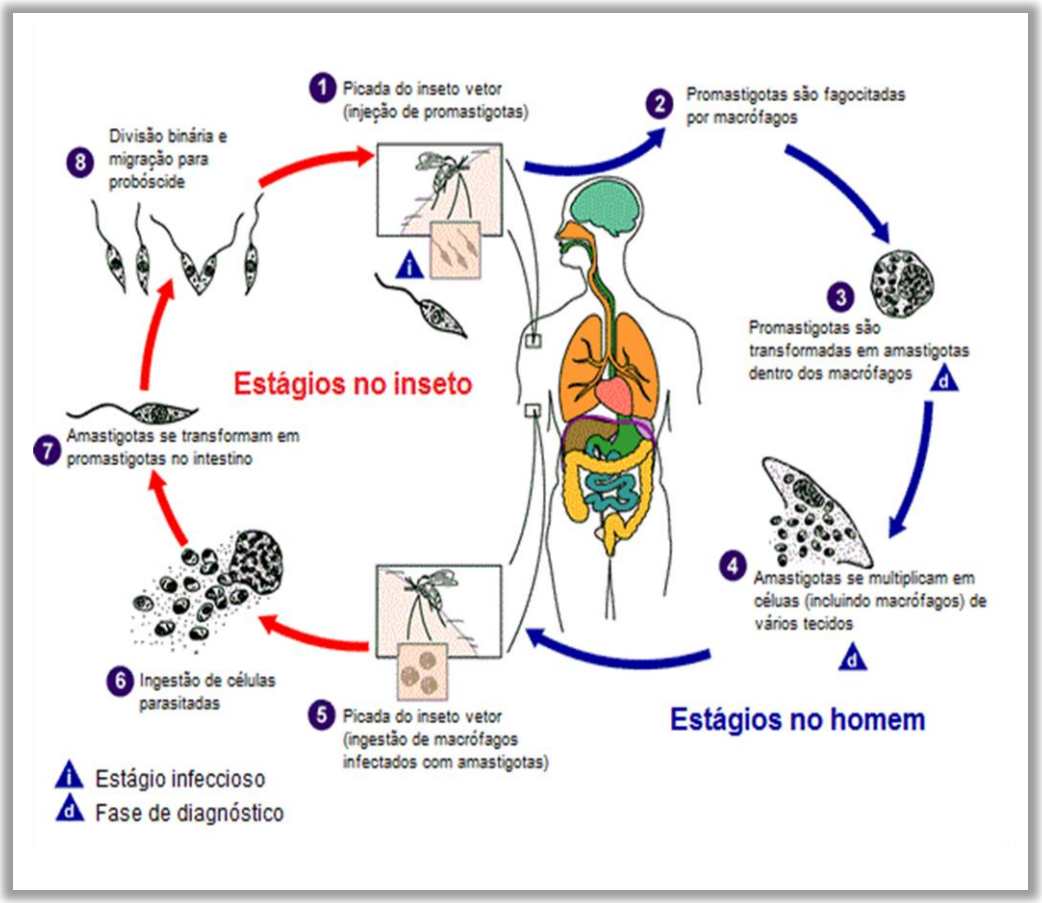


Figura 2. **Ciclo de vida do parasito causador da leishmaniose.** Agente causador do gênero *Leishmania ssp* dos diferentes tipos de Leishmaniose. Imagem retirada e adaptada do CDC (http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/).

Durante o ciclo de vida a Leishmania possui dois hospedeiros, o hospedeiro intermediário, que pode ser o homem, cachorro e roedores, e um hospedeiro definitivo, insetos flebotomíneos fêmeas do gênero *Lutzomyia*. A infecção de um hospedeiro vertebrado ocorre quando a fêmea do inseto flebotomíneo, conhecido popularmente como mosquito-palha, pica o mamífero para se alimentar. Nessa etapa, a forma promastigota metacíclica penetra na pele do hospedeiro e invade diferentes células, principalmente os macrófagos. Os macrófagos fagocitam as promastigotas, que em seu interior, transformam-se em amastigotas e assim multiplicam-se por divisão binarias sucessivas. Posteriormente as amastigotas rompem a membrana do macrófago, caem na circulação sanguínea onde podem ser novamente fagocitadas pelos macrófagos difundindo-se na corrente sanguínea. O inseto fêmea do gênero *Lutzomyia* ao picar o hospedeiro intermediário suga os macrófagos contendo as amastigotas. Após a ingestão as amastigotas são liberadas dos macrófagos e no trato gastrointestinal diferenciam-se em formas promastigotas procíclicos, as quais se multiplicam por divisão binária. Após esses eventos, as promastigotas procíclicos migram para a válvula estomodeal do mosquito, na qual se diferencia em promastigotas metacíclicos, as quais são extremamente moveis. Por fim as promastigostas metacíclicos rompem a válvula estomodeal e migram para o probóscide, na qual transmite as promastigotas metacíclicos ao hospedeiro intermediario, através da picada do mosquito fêmea (Leifso *et al.*, 2007).

1.3.2 Incidência

A principal e mais importante espécie de *leishmania* causadora da manifestação cutânea nas Américas é a *Leishmania Viannia brasilienses* (Mansueto et al., 2014). Enquanto a espécie *Leishmania V. braziliensis* tem sua maior incidência principalmente na América do Sul, espécies como a *L. major* tem sua maior incidência em países do velho mundo (Pace, 2014). Na **Figura** 3 é possível observar a distribuição dos casos de leishmaniose cutânea ao redor do mundo, no período de 2005 a 2009. Dentre os territórios, podemos descatar os que compõe a

América do Sul e a Ásia, mais especificamente o sudoeste asiático e a Ásia ocidental.

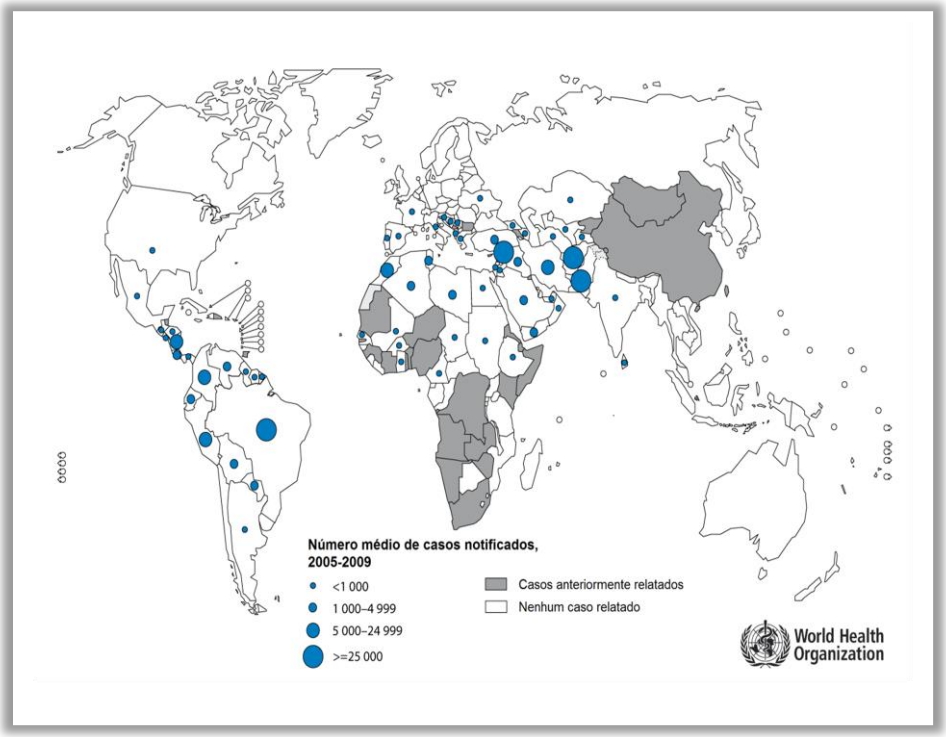


Figura 3: **Incidência de Leishmaniose cutânea no mundo**. Número e distribuição de casos de **LC** no mundo entre 2005-2009. Imagem adaptada da OMS.

Na **Figura** 4 é possível notar áreas de maior incidência da leishmaniose cutânea no Novo Mundo. Em destaque, a América do Sul é a que apresenta maior número de casos de leishmaniose cutânea, incluindo o Brasil onde a doença está espalhada por quase todo território. Também é possível observar na **Figura** 4 previsão do surgimento de novos casos, com destaque paras as regiões litorâneas e norte do Brasil, onde a probabilidade para o aparecimento de novos casos é alta.

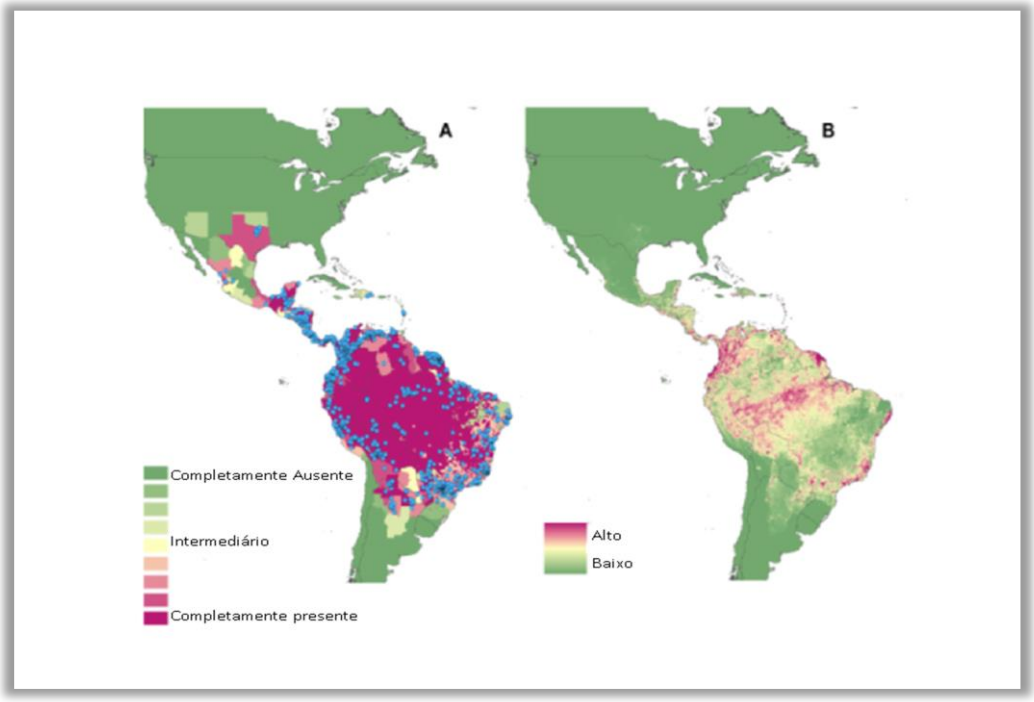


Figura 4. **Casos reportados de Leishmaniose Cutânea no Novo Mundo**. (**A**) Distribuição da doença na América, onde as áreas verdes são consideradas livres da doença e as áreas mais roxas são consideras endêmicas, os pontos em azul são considerados centros de ocorrência. (**B**) Risco previsto para novos casos, em verde baixa probabilidade e em roxo alta probabilidade de ocorrência. Imagem retirada e adaptada de Pigott *et al.*, 2014.

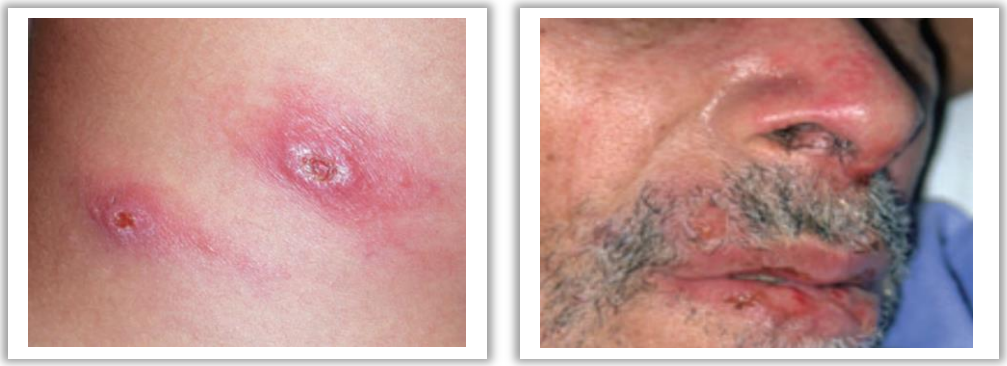
De acordo com a OMS, a média de casos reportados de leishmaniose cutânea no Brasil entre os anos 2005 e 2013 são de 22 mil casos por ano, sendo o Brasil o país de maior índice de leishmaniose cutânea no mundo. Embora a taxa de incidência da leishmaniose cutânea no Brasil tem diminuído graças à implementação de melhorias nas áreas de risco e controle de pequenos surtos, o Brasil ainda é um pais de alta prevalência de leishmaniose cutânea, a qual é responsável por diversos fatores negativos na economia e na sociedade brasileira (De Oliveira Guerra *et al.*, 2015).

1.3.3 Diagnóstico e Manifestação Clínica

Segundo o Ministério da Saúde o diagnóstico da leishmaniose cutânea se dá pela caracterização da lesão observando aspectos como forma bem definida da lesão e consistência. Já a manifestação muco-cutânea é caracterizada pela presença de ulceras sem forma definida presentes nas mucosas do indivíduo, principalmente na boca e nariz, as quais são tão graves que acabam por desfigurar o local da manifestação. O exame laboratorial envolve técnicas como escarificação, biópsia com impressão por aposição e punção aspirativa, histopatologia além de técnicas mais sofisticadas como a reação em cadeia de polimerase (PCR) (Gontijo e Carvalho, 2003).

A leishmaniose cutânea geralmente ocorre em áreas expostas como o rosto, pescoço e membros nos quais aparecem ulcerações indicando a fase crônica da doença. Os tipos de lesões, a magnitude e o tempo de recuperação do paciente dependerá da espécie de *Leishmania* que infectará o indivíduo (David e Craft, 2009). No entanto, elas compartilham de algumas características em comum, como o surgimento de úlceras, a deformação do local atingido, o tempo elevado para a cura, além de afetar o paciente psicologicamente tornando-o desmotivado, resistente ao tratamento e com dificuldades de sociabilização (Pace, 2014). Vale lembrar que a manifestação muco-cutânea, por ser uma evolução da cutânea, intensifica

drasticamente os sintomas e feridas, bem como afeta o tempo de cura e recuperação do paciente. Na **Figura** 5 está representada as manifestações da leishmaniose mucosa.



(A) **(B)**

Figura 5. **Manifestações leishmaniose leishmaniose cutânea e mucosa**. As feridas em **A** representa a forma mais comum da leishmaniose a qual é a manifestação cutânea. Em **B** este representado a forma muco-cutânea da leismaniose, a qual é uma evolução da manifestação cutânea, sendo considerada mais grave. Imagens adaptadas de David e Craft, 2009.

Enquanto a manifestação cutânea da doença não leva a morte, na ausência de complicações, o progresso da lesão pode evoluir para a manifestação muco-cutânea, o que gera complicações no tratamento (Lewnard *et al.*, 2014). Outro problema ligado à leishmaniose cutânea está relacionado à coinfecção com outras doenças infecciosas, como a tuberculose e a AIDS (Navarrete-Dechent *et al.*, 2015). Nesses casos, a presença da leishmaniose cutânea em pacientes já debilitados dificulta o tratamento, fazendo com que as chances de cura diminuam, podendo levar o paciente a óbito. A associação das formas cutâneas e muco-cutâneas fortemente caracterizados por problemas fisiológicos e psicológicos, além do agravamento de doenças como AIDS e tuberculose em processos de coinfecção são fatores suficientes para que as autoridades juntamente com o setor público e privado busquem alternativas tanto para o tratamento quanto para a prevenção.

1.3.4 Prevenção e tratamento

A prevenção da leishmaniose corresponde a métodos educativos, eliminação do mosquito transmissor, além do sacrifício de animais como cachorro e gatos que servem de reservatórios para a propagação da doença. Embora sejam métodos

simples e eficazes, na prática, esses métodos são muito pouco utilizados o que aumenta os casos incidência de leishmaniose em geral (Kappagoda e Ioannidis, 2014).

Para o tratamento da leishmaniose cutânea e muco-cutânea são utilizados diversos medicamentos, como os derivados de antimônios pentavalentes, o estibogluconato de sódio e o antimoniato de N-metilglucamina, além da anfotericina B e a pentamidina. Esses medicamentos de escolha são considerados tóxicos, de baixa eficácia e de longa duração para o tratamento. Alguns outros medicamentos como a paramomicina e azitromicina, utilizados como antibacterianos, estão em estudo quanto a sua eficácia leishmanicida (Sundar e Chakravarty, 2013). No Brasil os medicamentos utilizados e que são distribuídos gratuitamente são o antimoniato de N-metilglucamina, à anfotericina B e a pentamidina (**Figura** 6).

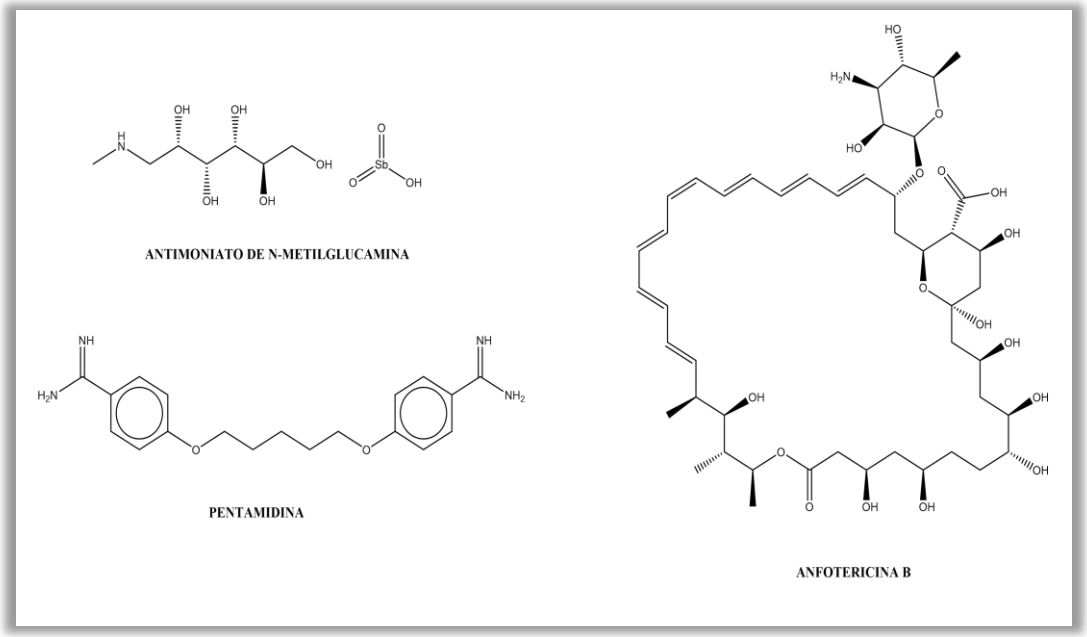


Figura 6. **Estrutura dos princípios ativos dos medicamentos utilizados para o tratamento da leishmaniose cutânea e muco-cutânea.** No Brasil esses medicamentos são disponibilizados gratuitamente pelo governo.

O mecanismo de ação dos antimônios pentavalentes permanece incerto, ao que indica os estudos, eles induzem danos ao DNA. A necessidade da administração parenteral, associado à alta toxicidade, principalmente para idosos, cardiopatas e neufropatas são os pontos negativos de sua administração (Lima *et al.*, 2010). A pentamidina possui como mecanismo a interferência na biossíntese de DNA e consequentemente a inibição da divisão das células do parasita, este

composto é somente utilizando quando a indícios de resistência de cepas de leishmanioses aos derivados de antimônio pentavalentes, pois a sua baixa biodisponibilidade associada a sua alta toxicidade limitam a administração desse medicamento (Nguewa *et al.*, 2005).

Por outro lado a anfotericina B é o medicamento mais eficaz para o tratamento da leishmaniose interagindo tanto com a forma amastigota como promastigota. Neste caso seu mecanismo de ação está relacionado à interação com o ergosterol, um tipo de esterol presente na membrana do parasita (Paila, Saha e Chattopadhyay, 2010). A sua alta toxicidade é o ponto negativo para sua administração, no entanto a utilização do deoxicolato anfotericina B, indicado para o tratamento de leishmaniose cutânea em pacientes HIV positivo, diminui o efeito tóxico, porém encarece o valor do medicamento (Moreno-Rodriguez *et al.*, 2015).

Embora os medicamentos citados, em muitos casos, são eficazes contra a leishmaniose cutânea e mucosa, existem vários problemas relacionados à sua administração como toxicidade, biodisponibilidade e em casos de cepas resistentes são ineficazes (Croft, Sundar e Fairlamb, 2006). A falta de pesquisa e desenvolvimento de medicamentos acaba por negligenciar ainda a leishmaniose, doença tão devastadora e que acomete milhões de pessoas pelo mundo. É nesse contexto que nós da academia podemos contribuir, na busca por novos alvos e compostos eficientes contra os diversos tipos de leishmaniose.

1.3.5 Impacto socioeconômico

A situação atual da leishmaniose e de outras doenças tropicais negligenciadas tem tido um grande impacto na saúde pública, na questão social e no âmbito financeiro. Apesar disso, os investimentos e parcerias entre setor público e privado ainda são insuficientes para o combate dessas parasitoses.

O impacto financeiro gerado com o tratamento da leishmaniose mucosa é enorme, o que causa rombo de milhões de dólares aos cofres públicos. Em particular, no Brasil os gastos somente com os medicamentos derivados de antimônios pentavalentes chegam à ordem de R$ 5.500.000 ao ano, ou seja, são gasto milhões de reais com uma única droga para o tratamento, sem considerar os gastos hospitalares e pós-hospitalares (Neves *et al.*, 2011)

Outro fator que preocupa está relacionado ao impacto social da leishmaniose cutânea. A dor do paciente acometido por esse tipo de infecção não fica restrita somente as disfunções fisiológicas causadas pelo parasita, ela vai muito além, causando sérios problemas relacionados à que questões de sociabilização e depressão. Estudos sobre o impacto psicológico da leishmaniose cutânea mostraram que há uma alta prevalência de pacientes com sintomas de depressão e ansiedade, em alguns casos há relatos de insatisfação corporal, baixa autoestima e em casos mais graves há indícios de suicídio (Yanik *et al.*, 2004).

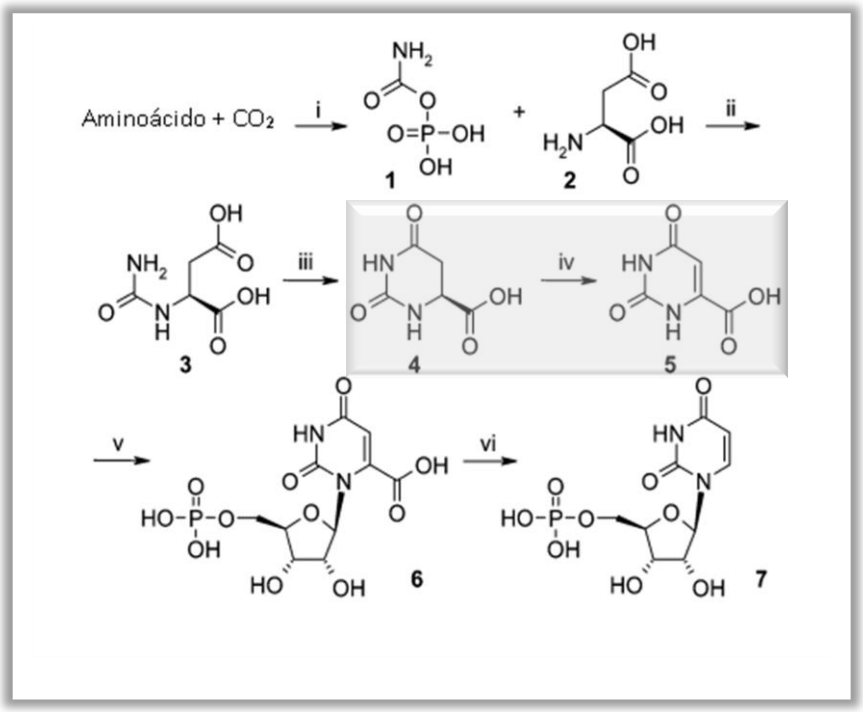
A leishmaniose cutânea e a mucosa não são letais, porém os impactos sociais e econômicos fazem como que diminua qualidade de vida dos pacientes. Deste modo, a busca por novas terapias para o tratamento da leishmaniose mucosa tem o objetivo não só de eliminar o parasita causador da doença, mas sim de oferecer uma qualidade de vida melhor ao paciente.

1.4 *DIIDROOROTATO DESIDROGENASE*

1.4.1 Função

Os nucleotídeos são componentes de extrema importância metabólica, apresentando diversas funções vitais ao organismo. São ativadores e inibidores de várias vias do metabolismo intermediário da célula; atuam como transportadores de energia; são os elos químicos essenciais na resposta celular na presença de hormônios e a outros estímulos extracelulares; atuam como componentes de coenzimas, além de formar as unidades fundamentais que constituem os ácidos desoxirribonucléicos (DNA) e ribonucléicos (RNA) (Nelson, Lehninger e Cox, 2008).

Muitos organismos conseguem obter nucleotídeos de pirimidina através da via de salvação, onde é possível reciclar os nucleosídeos e as bases nitrogenadas geradas pelo metabolismo celular e assim reutilizá-los para a formação de novos derivados de pirimidina. Porém, em condições especiais como a proliferação celular ou em organismos onde a via de salvação não é presente, há a necessidade de a própria célula sintetizar os nucleotídeos de pirimidina através da *via de novo* (Wilson *et al.*, 2012). A via *de novo* de biossíntese de nucleotídeos de pirimidina, representada no **Esquema** 1, é composta por seis enzimas, as quais são responsáveis pela formação dos nucleotídeos de pirimidina citosina, uracila e timina.



Esquema 1. **Etapas da biossíntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidina em procariotos**. (i) carbomil fosfatase sintetase; (ii) aspartato transcarba-milase; (iii) diidroorotase; (iv) diidroorotato desidrogenase; (v) orotato fosforibosil transferase; (vi) orodilato descarboxilase. Esquema adaptado de Munier-Lehmann *et al.*, 2013.

Em particular, no quarto passo da *via de novo* atua a enzima diidroorotato desidrogenase (DHODH), destacado no **Esquema** 1, a qual é o alvo de estudo deste projeto. Essa enzima tem a capacidade de converter o L-diidroorotato (DHO) em orotato.

A interrupção da síntese de nucleotídeos de pirimidina pode levar a diminuição da taxa de replicação do organismo, visto que os nucleotídeos de pirimidina obtidos pela via de salvação são insuficientes para a formação do DNA (Garavito, Narvaez-Ortiz e Zimmermann, 2015). Assim a HsDHODH pode ser explorada para doenças como o câncer, por exemplo, diminuindo a replicação das células cancerígenas (Batt, 1999). Além disso, diversos trabalhos mostram moléculas capazes de inibir uma diversidade de enzimas DHODH de diversos organismos como a DHODH de bactérias (Marcinkeviciene *et al.*, 2000), de fungos (Gustafson *et al.*, 1996), de vírus (Wang *et al.*, 2011), de tripanossomatideos (Pinheiro, Emery e Nonato, 2013), dentre muitos outros organismo onde a enzima diidroorotato desidrogenase pode ser explorada como um alvo terapêutico. Provavelmente a inibição da diidroorotato desidrogenase dos parasitas implica na diminuição da replicação do DNA e consequentemente, na diminuição da

reprodução do parasita. Deste modo, compostos que agem inibindo a DHODH possuem um efeito farmacológico estático, ou seja, um efeito que atenua a replicação celular, facilitando a ação de outros medicamentos ou do próprio sistema imunológico. Isso torna a enzima DHODH um importante alvo a ser explorado para diversas doenças ocasionadas por diferentes organismos.

1.4.2 Classificação das DHODHs

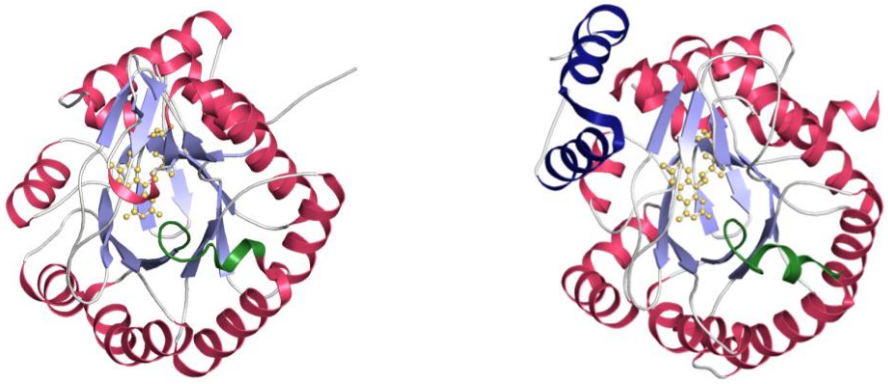
A DHODH é dividida em classe 1 e classe 2, de acordo com suas características estruturais, localização intracelular, tipo de segundo substrato e origem biológica (Norager *et al.*, 2002). A classe 1 ainda é subdividida em 1A e 1B, as quais são encontradas no citosol das células, estão presentes em bactérias Gram-positivas, fungos aeróbicos e eucariotos inferiores como os tripanossomatídeos. Enzimas pertencentes à classe 1A utilizam o fumarato como agente oxidante enquanto que as de classe 1B utilizam NAD^+.

As enzimas de classe 2 são encontradas associadas a membranas, seja ela citosólica ou mitocondrial e por isso apresenta um domínio de interação com a membrana em sua estrutura N-terminal (Liu *et al.*, 2000). As DHODHs de classe 2 podem ser encontradas em eucariotos, como os humanos e em algumas bactérias Gram-negativas e utilizam como agente oxidante a ubiquinona (Rowland *et al.*, 2000).

Outra diferença importante em relação às estruturas das classes de DHODHs está relacionada à sua estrutura quaternária. Enzimas de classe 1A são homodímeros, enquanto que as classe 1B são heterodimeros e as de classe 2 comportam-se como um monômero. Tanto a classe 1 A e a 2 compartilham de um mononucleotideo de flavina (FMN) como cofator e a classe 1B, além do FMN, apresenta uma flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e um cluster [2Fe-2S] (Nielsen, Andersen e Jensen, 1996).

Embora as diferenças de estruturas quaternárias, segundo substrato, localização celular entre outras, as DHODHs de classe 1 A e 2 apresentam o sítio catalítico extremamente conservado. Esse sítio é composto de um barril α/β folha, onde oito folhas β são rodeadas de oito α-helices e é nessa região que encontramos o cofator FMN. A **Figura** 7 mostras duas enzimas DHODHs, em **A** temos uma

enzima de classe 1 A, a de *trypanossoma cruzi* (TcDHODH) e em **B** a enzima humana (HsDHODH), enzima de classe 2. A diferença mais notável nestas estruturas é a dupla hélice presente na estrutura da enzima humana (azul escuro), a qual é responsável pelo ancoramento na membrana.



(A) **(B)**

Figura 7. **Representação estrutural das enzimas TcDHODH (PDB 3C3N) em A e HsDHODH (PDB 1D3G) em B**. Apesar de ambas enovelarem em um motivo de barril α/β folha formando um sítio catalítico altamente conservado, elas apresentam diferenças estruturais como o resíduo catalítico e em especial na HsDHODH um domínio de membrana formado por duas α hélices. Imagem retirada de Pinheiro, 2012.

A diferença mais notável em relação ao sitio catalítico está relacionado ao resíduo catalítico, enquanto na classe 1 A o resíduo é de uma cisteína na de classe 2 observamos uma serina (Mcdonald e Palfey, 2011). Baseado nas diferenças estruturais, na sua localização celular e na característica do segundo substrato é possível planejar de maneira racional candidatos a fármacos que possam ser inibidores seletivos para as DHODHs de parasitas. É através dessas características particulares de cada enzima que trabalhamos no planejamento de compostos que sejam seletivos para as enzimas de classe 1 A, especialmente as DHODHs de Leishmania *v. brasiliensis,* principal causadora da leishmaniose cutânea.

1.4.3 Mecanismo catalítico da DHODH de classe 1A

A LbDHODH é uma enzima pertencente à classe 1 A, de acordo com a divisão atual das enzimas DHODHs. O mecanismo catalítico das DHODHs 1 A esta apresentado na **Figura** 8, onde é possível dividir o mecanismo em duas etapas,

sendo a primeira uma etapa oxidativa e a segunda a etapa redutiva. Segundo (Inaoka *et al.*, 2008), na primeira etapa o enxofre da cisteína catalítica atua como um nucleófilo e abstrai um próton da molécula de diidroorotato (H5a). Em seguida o hidrogênio H_6 é transferido para o FMN, reduzindo-o e oxidando a molécula de diidroorotato a orotato. Com o FMN reduzido inicia-se a segunda etapa, onde o fumarato atua como substrato. Mais uma vez ocorre um mecanismo baseado na transferência de hidreto, onde o hidrogênio ligado ao nitrogênio 5 do anel do FMN é transferido para a dupla ligação do fumarato, a qual é paz de abstrair um próton da cisteína catalítica. Deste modo o fumarato é reduzido e o FMN oxidado, fazendo com que a enzima esteja apta novamente a mais um ciclo catalítico.

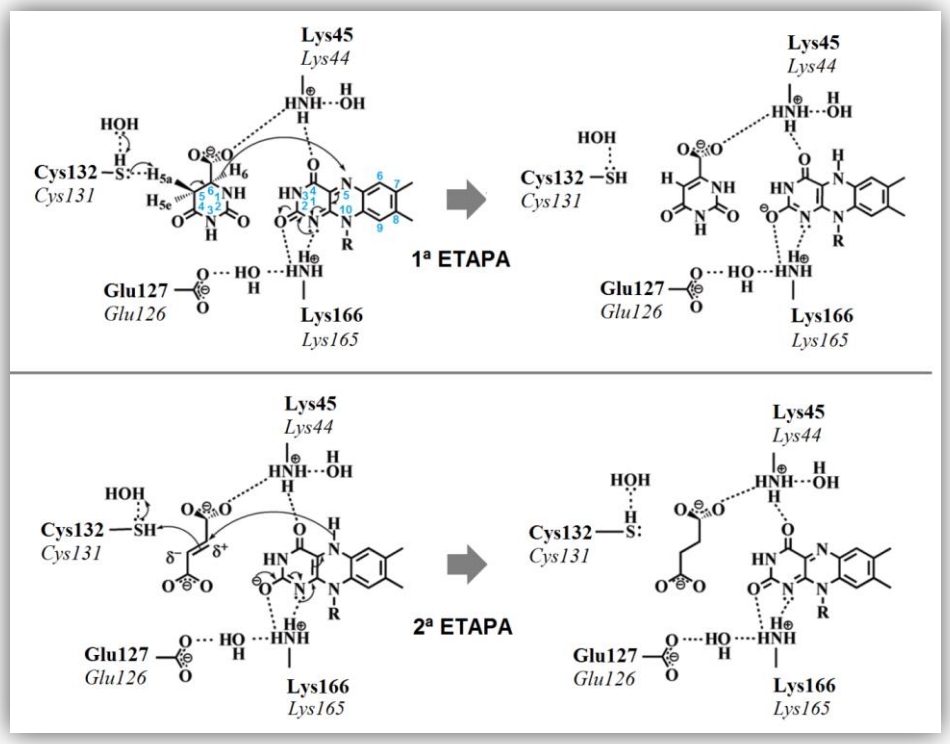


Figura 8. **Mecanismo proposto para a catalise das enzimas DHODH de classe 1 A**. O mecanismo catalítico consiste em converter L-diidroorotato em orortato, na primeira etapa e posteriormente converter fumarato em malato na segunda etapa. Imagem retirada de Inaoka *et al.*, 2008.

1.4.4 Diidroorotato desidrogenase como alvo terapêutico

Alvos terapêuticos são regiões dentro de um organismo para o qual é dirigido um ligante, seja ele um composto endógeno ou um fármaco. Medicamentos podem ter ação sobre diversos alvos, como o DNA, membrana celular, como é comum alguns antibacterianos e antifúngicos, receptores, canais, enzimas, entre outros.

Dentre os alvos, as enzimas destacam-se, sendo essas componentes essenciais para a sobrevivência de qualquer ser vivo por estarem envolvidas na maioria dos eventos celulares. Alvos enzimáticos para o planejamento de fármacos já são hoje uma realidade (Robertson, 2005). Modular e/ou interromper vias metabólicas importantes por estarem diretamente relacionadas com a sobrevivência ou proliferação celular é atualmente uma estratégia racional no combate de doenças proliferativas, autoimune e principalmente àquelas relacionados à presença de patógenos: bactérias, fungos e parasitas.

No caso particular da enzima DHODH, as enzimas de classe 2 como a DHODH humana e a DHODH de *Plasmodium falciparum* são alvos validados. O pró-fármaco leflunomida, utilizada para o tratamento da artrite reumatoide, após ser metabolizado dá origem ao composto teriflunomide (A77 1256) o qual inibe a HsDHODH, sendo a leflunomida o primeiro fármaco utilizado para inibir a enzima DHODH humana (Greene *et al.*, 1995). Além disso, diversos outros compostos foram identificados como inibidores, como é o caso do Brequinar, que apesar de ser um excelente composto, nos ensaios clínicos de fase II demonstrou modestos efeitos anticâncer. No entanto diversos trabalhos mostram análogos do brequinar, como possíveis antitumorais (Hurt, Sutton e Clardy, 2006). Com relação à DHODH de *Plasmodium falciparum*, a atovacona é o principio ativo do medicamento MEPRON® e atua na inibição da enzima DHODH do parasita, sendo uma alternativa ao uso de medicamentos derivados da cloroquina, os quais são ineficazes a cepas resistentes do parasita (Munier-Lehmann *et al.*, 2013).

A relevância da via *de novo* de nucleotídeos de pirimidina tem sido avaliada para outros organismos. Por exemplo, estudos mostraram que a via metabólica de síntese de nucleotídeos de pirimidinas é essencial para a sobrevivência da forma tripomastigota do parasita *T. cruzi*, como validado através de experimentos de "*Knock out*" do gene que codifica a enzima TcDHODH (Annoura *et al.*, 2005). Além disso, experimentos em *T. brucei* realizado por (Arakaki *et al.*, 2008) demonstraram que em condições onde a expressão da DHODH é minimizada e o meio é pobre em nucleotídeos de pirimidina, o crescimento do parasita é profundamente reduzido, dificultando a sobrevivência do mesmo. Esses resultados demonstram a relevância da rota de biossíntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidina, em particular da enzima DHODH para o metabolismo em tripanossomatídeos e sugerem que a

enzima DHODH deve ser explorada como um alvo terapêutico como uma alternativa para a busca de compostos candidatos a fármacos para o tratamento das enfermidades relacionados a esses parasitas.

Nesse sentido nosso laboratório tem trabalhado na busca de inibidores seletivos para as enzimas DHODH da classe 1A. Em um de nossos trabalhos mais recentes foram identificados dois compostos de origem comercial promissores com atividade leishmanicida, eles foram denominados de LCPSP 3027 e LCPVL 898. Estas duas moléculas foram capazes de inibir seletivamente a enzima de *Leishmania* major, apresentaram IC_{50} 1,66µM e 2,82 µM, respectivamente, demonstraram atividade leishmanicida em culturas *in vitro* de *Leishmania V. braziliensis* na forma promastigota (DL_{50} de 2.1 µM para LCPSP3027 e DL_{50} de 2.8 µM para LCPVL898), se mostraram não citotóxicas para macrófagos e os estudos da forma amastigota mostraram uma redução significativa nos índices de infectividade (Pinheiro, 2012).

A identificação desses compostos com potencial atividade leishmanicida nos motivou a buscar a validação da DHODH como alvo terapêutico assim como a identificação de inibidores seletivos para a DHODH de *Leishmania braziliensis*. Dentro desse contexto, esse projeto teve como meta a estruturação de uma plataforma de ensaios para a identificação compostos com atividade leishmanicida *in vitro* através da inibição seletiva da enzima DHODH de *Leishmania braziliensis*. Através da combinação de ferramentas bioquímicas, biofísicas e computacionais foi possível desenvolver uma plataforma de ensaios que permitirá a identificação de inibidores seletivos à enzima DHODH de *L. braziliensis* e que apresente atividade leishmanicida *in vitro*. Nossos estudos foram capazes de identificar novas classes de ligantes que serão utilizados para o desenvolvimento de novas gerações de ligantes com potencial leishmanicida.

2. OBJETIVOS

O projeto tem como objetivo geral estabelecer uma plataforma modelo para a identificação de compostos seletivos em relação à enzima diidroorotato desidrogenase de *Leishmania viannia braziliensis*. Os objetivos específicos podem ser sumarizados como:

° Produção heteróloga e purificação da enzima LbDHODH.

° Caracterização cinética, biofísica e estrutural da enzima LbDHODH.

° Busca de inibidores através do uso de ferramentas bioquímicas e computacionais utilizando uma diversidade de banco de dados.

° Avaliação do potencial inibitório de ligantes contra a enzima LbDHODH e caracterização do mecanismo através do uso de ferramentas bioquímicas e estruturais.

° Avaliação do potencial leishmanicida e citotóxico das moléculas identificadas.

.

3. MATERIAIS E METODOS

Para facilitar à compreensão, a seção de Materiais e Métodos foi dividida em quatro subseções: Produção Heteróloga, Caracterização Bioquímica, Caracterização Estrutural e Busca por Ligantes. A primeira subseção abordará os procedimentos de clonagem, transformação, expressão e purificação da enzima, além de predições de características bioquímicas e do método utilizado para a quantificação da enzima. A segunda subseção abordará a caracterização cinética da enzima, o que inclui a determinação do pH ótimo e do mecanismo cinético de catálise e também abordará ensaios de termoestabilidade. Já a terceira irá abordar os procedimentos de caracterização estrutural, utilizando a técnica de difração de raios-X. Por último, a quarta subsecção abordará as estratégias para a busca de ligantes e a metodologia para a determinação do potencial inibitório desses compostos frente à LbDHODH, além da validação cruzada utilizando a diidroorotato desidrogenase humana (HsDHODH).

3.1 *PRODUÇÃO HETERÓLOGA.*

Os procedimentos de produção heteróloga da LbDHODH foram executados semelhantes aos utilizados para a produção da enzima diidroorotato desidrogenase de *Leishmania major*, já padronizados em nosso laboratório (Feliciano *et al.*, 2006)

3.1.1 Clonagem, Expressão e Purificação

A clonagem do gene codificador da LbDHODH foi realizado pela Drª Valeria Cristina da. Silva, utilizando o DNA genômico da forma promastigota de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, o qual foi gentilmente cedido pela professora Angela Kaysel Cruz da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. O DNA genômico foi utilizado como modelo para a reação em cadeia de polimerase (PCR). A sequência codificadora para a enzima LbDHODH foi amplificada e clonada em pET-28a, utilizando *BamH I* e *Xho I* como enzimas de restrição, dando origem à construção denominada pET-28a(+)-LbDHODH.

Células competentes de *E. coli* BL21(DE3) foram transformadas utilizando o pET-28a(+)-LbDHODH, empregando como técnica o choque térmico. As bactérias transformadas foram semeadas em meio sólido *lysogenic-broth* (meio LB),

suplementado com 30 µg (mL) $^{-1}$ de canamicina a 37°C *overnight*. Uma única colônia foi selecionada e utilizada para inocular 10 mL de meio liquido LB acrescido com 30 µg (mL) $^{-1}$ de canmamicina. A mistura foi deixada sob agitação a 180 rpm, 37°C overnight (no máximo 16 horas). 10 mL do pré-inoculo foi utilizado para inocular 1L de meio liquido LB acrescido com canamicina (30 µg (mL) $^{-1}$ concentração final) e incubado em um shaker a 37°C, 180 rpm por 150 minutos. Ao atingir a densidade ótica (D.O) de 0.6 no comprimento de onda de 600 nm a expressão foi induzida utilizando isopropil β-D-tiogalactopiranosideo (IPTG) a um concentração final de 0,5 mM durante 5 horas. As células foram isoladas por centrifugação a 8000g a 4°C por 10 minutos, e armazenadas a -20°C.

3.1.2 Purificação

O processo de purificação foi iniciado com suspensão das células em um tampão contendo 50 mmolL^{-1} de fosfato de sódio, 300 mmolL^{-1} de cloreto de sódio, pH 8 e acrescentado de 1 mmolL^{-1} de fluoreto fenilmetilsulfonil (PMSF), um inibidor de serino proteases. Em seguida as células foram lisadas por sonicação na potência de 10 W em intervalos de 30 segundos durante 15 minutos. Após isso, a fração solúvel foi separada da insolúvel por centrifugação a 16,000g por 30 minutos a 4°C. O método de cromatografia de afinidade baseado em coluna de níquel (Ni-NTA) foi utilizado como método de purificação através da aplicação de um gradiente crescente de imidazol (0, 25 , 50, 100 e 500 mM). A proteína elui na presença de 100 mM de imidazol, e em seguida é concentrada e dialisada utilizando um tampão contendo 50 mM de HEPES, pH 7,2 e 150 mM de NaCl. A pureza da amostra foi avaliada através de eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE).

3.1.3. Predição de características bioquímicas teoricas

Os parâmetros como o ponto isoelétrico (pI) teórico, massa molecular e coeficiente de extinção teórico (ε280) foram preditos a partir da sequência de aminoácidos pelo ferramenta online ProtParam, hospedada no servidor ExPASy (http://web.expasy.org/protparam/).

3.1.4 Determinação da concentração da LbDHODH

A concentração da LbDHODH foi determinada baseada no coeficiente de extinção molar da enzima, como padronizado em nosso laboratório para outras

DHODHs, considerando concentrações equimolares de enzima livre e ligada ao FMN (Padua *et al.*, 2014). A monitorização foi realizada em espectrofotômetro através de uma varredura de comprimento de onda de 800 nm a 200 nm. A varredura foi realizada utilizando a proteína íntegra e posteriormente com a proteína desnaturada, obtendo os espectros de absorção. Deste modo, os picos máximos foram comparados antes e após a desnaturação. Após a desnaturação o FMN livre isolado da proteínas tem um pico máximo característico em 450 nm, onde seu coeficiente de extinção é de 12,500 M^{-1} cm^{-1}. Assim é possível estimar o coeficiente de extinção da enzima através do uso da equação 1, e como consequência a sua concentração.

$$\varepsilon_{enz\ (459\ nm)} = \frac{Abs_{max\ enz\ (459\ nm)} * E_{FMN\ (450\ nm)}}{Abs_{FMN(450\ nm)}} \qquad \text{(Eq.1)}$$

onde $E_{enz\ (459\ nm)}$ é o coeficiente de extinção da LbDHODH em 459 nm; $Abs_{max\ enz\ (459\ nm)}$é a absorção máxima da enzima; $E_{FMN\ (450\ nm)}$ é o coeficiente de extinção do FMN em 450 nm e $Abs_{FMN(450\ nm)}$ é a absorção máxima do FMN livre.

3.2 *CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA*

3.2.1 Determinação do pH ótimo

Para a realização dos experimentos de cinética enzimática, foi inicialmente realizado uma varredura para identificação do pH ótimo para a reação, isto é, o valor de pH onde a reação da enzima apresenta maior velocidade. Para tanto, foram realizados ensaios de atividade na presença de 40 µM de diidroorotato (DHO), 500 µM de fumatato (FUM), 150 mM de NaCl e 50 mM de cada agente tamponante variando o pH de 4 a 12 (para pHs de 4 e 5 foram utilizados citrado de sódio, para pHs de 5 e 6 foram utilizado MES, para os pH de 7 foi utilizados HEPES, já para os pHs 8 , 9 e 10 foram utilizados o agente tamponante tris, para os pHs de 11 a 12 foram utilizados como agente tamponante bicarbonato de sódio e hidróxido de sódio). Para todos os pH a atividade da enzima foi monitorada durante 60 segundos através da conversão do DHO em orotato (ORO) no comprimento de onda de 300 nm (ORO ε_{280} = 2,65 mM^{-1} cm^{-1}).

3.2.2 Elucidação do perfil cinético

Selecionado o pH ótimo, os parâmetros cinéticos foram determinados variando a concentração de DHO (5; 10; 12,5; 15; 17,5; 20; 25; 30; 35; 40; 45 e 50 µM) e de FUM (15, 125; 32,25; 62,5; 125; 250; 300; 375; 500 e 600 µM), monitorando a formação de orotato no comprimento de onda de 300 nm (ORO ε_{280} = 2,65 mM^{-1} cm^{-1}). Os valores aparentes para as taxas da reação, em diferentes concentrações de diidroorotate e fumarato foram determinadas através do ajuste dos dados na equação de Hill (Eq.2) ou na equação de Michaelis-Menten (Eq.3), respectivamente:

$$\frac{v}{[E]} = \frac{{}^{app}k_{cat}[DHO]^{h}}{({}^{app}K_{0.5}^{DHO})^{h} + [DHO]^{h}} \qquad \text{(Eq.2)}$$

$$\frac{v}{[E]} = \frac{{}^{app}k_{cat}[FUM]}{{}^{app}K_{m}^{FUM} + [FUM]} \qquad \text{(Eq.3)}$$

onde, [*E*] representa a concentração da enzima, ${}^{app}k_{cat}$ o *turnover* aparente, [*DHO*] and [*FUM*] correspondem às concentrações dos substratos, diidroorotato and fumarato, respectivamente, K_m^{FUM} é a constante aparente de Michaelis-Menten para o fumarato, $K_{0.5}^{DHO}$ é a concentração de diidroorotato onde a velocidade da reação equivale à metade da velocidade máxima e é obtida no ajuste da equação de Hill e h é o coeficiente de Hill.

Os parâmetros cinéticos globais foram estimados através do ajuste dos dados na equação de ping-pong onde a primeira meia-reação de redução obedece à cinética sigmoidal de Hill e a segunda meia-reação oxidativa obedece à cinética de Michaelis-Menten (Eq. 4) (A equação abaixo foi deduzida em nosso laboratório cujo se encontra "*in press*" DOI: 10.1042/BJ20150921).

$$\frac{v}{[E]} = \frac{k_{cat}[DHO]^{h}[FUM]}{(K_{0.5}^{DHO})^{h}[FUM] + K_{m}^{FUM}[DHO]^{h} + [DHO]^{h}[FUM]} \qquad \text{(Eq.4)}$$

onde, [*E*] representa a concentração da enzima, k_{cat} corresponde ao valor máximo de turnover, [*DHO*] and [*FUM*] correspondem as concentrações dos substratos,

diidroorotato and fumarato, respectivamente, K_m é a constante de Michaelis-Menten para o fumarato, $K_{0.5}^{DHO}$ é a concentração de diidroorotato no qual a velocidade atinge 50% da velocidade máxima e *h* corresponde ao coeficiente de Hill. Os dados foram ajustados usando o programa Sigmaplot.

3.2.3 Estudos de termoestabilidade

O principio da técnica do termofluor consiste na determinação da temperatura de destaturação da proteína, na qual é utilizado um corante especifico que em contato com regiões hidrofóbicas da proteína emite sinais de fluorescência (Pantoliano *et al.*, 2001). Para os experimentos realizados utilizou-se um termociclador em tempo real (Mx3005P™ Real-Time PCR system) equipado com filtros específicos para medir sinais de fluorescência. O experimento foi montado em uma placa de PCR contendo 96 poços. Em cada poço foi adicionado 40 µL de uma solução de enzima a 10 µM em tampão 50 mM HEPES pH 7,2 e 150 mM NaCl e uma concentração final de 1mM de cada compostos dissolvido em DMSO.

A metodologia utilizando o corante especifico SYPRO® orange foi executada acrescentando 0,1 % do corante na solução com 10 µM de proteína. A variação na intensidade de fluorescência foi monitorada utilizando os filtros FAM (492 nm) e ROX (610 nm), para excitação e emissão, respectivamente. A temperatura foi varrida de 25 a 95 ºC (1 ºC/min) e as medidas de fluorescência realizadas (Cummings, Farnum e Nelen, 2006).

Uma segunda técnica, denominada de TermoFMN, a qual foi desenvolvida em nosso laboratório, foi utilizada para o ensaio de termofluor. Neste caso monitoramos a excitação e emissão da fluorescência do FMN utilizando o filtro FAM SBRY green (492 nm e 512 nm, respectivamente). Neste caso, com o aumento da temperatura o FMN é liberado da proteína devido ao desenovelamento da mesma e deste modo, é medida a fluorescência emitida pelo FMN. A temperatura foi varrida de 25 a 95 ºC (1 ºC/min) e as medidas de fluorescência realizadas. (Padua *et al.*, 2014).

Para a determinação da temperatura de desnaturação utilizando o orotato como ligante, foram utilizados os dois métodos. No entanto, somente para o orotato,

foi realizado uma titulação de sua concentração final no ensaio que corresponde a 5, 2,5 , 0,75 , 0,5 , 0,125, 0,0625, 0,0195 e 0,00975 mM.

Os resultados obtidos foram plotados em função da temperatura, gerando uma curva sigmoidal, onde o ponto de inflexão da curva corresponde à temperatura de desnaturação da proteína (Tm).

3.3 *CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL*

3.3.1 Cristalização

Para os procedimentos iniciais de cristalização foram utilizados os kits comercias da empresa Hampton Research. Utilizando o método de gota sentada, volumes iguais (2µL) de proteína (1,65 mg/mL) e solução do reservatório foram misturados e equilibrados com 500 µL da solução do reservatório a 21°C. Os cristais de LbDHODH foram otimizados na seguinte condição: 1,6 M de sulfato de amônio; 0,1 M de HEPES pH 7,2. A solução crioprotetora utilizada para a coleta dos dados foi composta de 1,8 M de sulfato de amônio e, HEPES pH 7,2 e 20% (v/v) de glicerol.

Em relação à obtenção de estruturas com ligantes duas técnicas foram executadas, a co-cristalização e o *soaking*. Na primeira os compostos foram incubados previamente com a proteína por 2 horas em concentrações de 250µM, 500 µM, 1 mM, 2 mM e 4 mM. Deste modo, o complexo enzima-ligante procedeu aos ensaios de cristalização na condição otimizada da enzima nativa. Para a técnica de *soaking* foram utilizados cristais da proteína, previamente preparados, e em seguida incubados por 2 horas com os compostos em concentrações de 250µM, 500 µM, 1 mM, 2 mM e 4 mM na gota. A solução crioprotetora utilizada para os complexos proteína-ligante foi acrescentada de 10 mM de cada ligante.

Os dados de difração foram coletados no Laboratório Nacional de Luz Sincrontron (LNLS), linha MX2, processados e refinados pela aluna de doutorado Renata Almeida Garcia Reis.

3.4 *BUSCA POR LIGANTES*

A busca de ligantes eficientes e seletivos para a LbDHODH neste projeto envolve 2 estratégias. A primeira estratégia foi baseada na busca virtual de ligantes, graças a elucidação estrutural da LbDHODH.

A segunda estratégia é baseada na síntese dos compostos LCPSP3027 e LCPVL 898, os quais haviam sido adquiridos comercialmente e validados para a LmDHODH (Pinheiro, 2012), além de avaliar diversos fragmentos do tipo 2-amino benzotiazol e por ultimo avaliar compostos doados pelos nossos parceiros. Os nossos colaboradores, são Dr. Stuart L.Schreiber do Broad Institute (Boston, Estados Unidos); Farmanguinhos (compostos cedidos pela Dr.ª Nubia Boechat); compostos cedidos pelos professores Dr.º Norberto Peporine Lopes e pelo professor Dr. Giuliano Cesar Clososki do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS), compostos cedidos pelo professor Dr. Flávio da Silva Emery do laboratório de Química Heterocíclica e Medicinal (QHETEM), Dra. Vanessa Leiria Campos (jovem pesquisadora da FCFRP), Thomas J. Schmidt da Universidade de Munster, Alemanha e do grupo do professor Dr. Mauro Almeida da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

3.4.1 Estratégia I: *In silico*

Para a busca de ligantes *in silico* foi utilizado o software AutodockVina, usa um sofisticado gradiente de otimização, o qual dá ao algoritmo um “senso de direção” durante o processo de docagem, otimizando a análise (Trott e Olson, 2010). Deste modo, compostos da empresa VitasmLab, análogos a molécula LCPVL 898, foram selecionados e avaliados frente ao sítio ativo da estrutura da enzima LbDHODH previamente determinada (PDB ID 4WZH). Para isso essas moléculas tiveram sua energia minimizada utilizando o software Chem3D 15.0 e o sitio ativo foi centralizado utilizando as coordenadas x = 15,108, y = 18,507 e z = 24,86 com tamanho da caixa nas dimensões x = 48, y = 54 e z = 52. Os compostos que apresentaram um perfil de interação semelhante ao composto LCPVL 898 foram adquiridos e testados *in vitro.*

3.4.2 Estratégia II: *in vitro*

3.4.2.1 Síntese dos compostos LCPVL 898 e LCPSP 3027.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^{1}H) e os de Carbono-13 (RMN de ^{13}C) foram registrados utilizando os seguintes equipamentos e especificações, espectrômetro BRUKER(R) - Modelo DRX500 - Ultra Shield (R), com magneto de 11,74 T e sonda multinuclear de detecção inversa (1H: 500,13 MHz e 13C: 125,77 MHz) para tubos de 5 mm de diâmetro, com sistema de "lock" de deutério e bobina geradora de gradiente de campo em z (campo máximo de 53,5 Gauss.cm^{-1}). Espectrômetro BRUKER(R) - Modelo DRX400 - Ultra Shield (R), com magneto de 9,4T e sonda multinuclear de detecção inversa (1H: 400 MHz e 13C: 101 MHz) para tubos de 5 mm de diâmetro, com sistema de "lock" de deutério e bobina geradora de gradiente de campo em z (campo máximo de 53,5 Gauss.cm^{-1}). Os deslocamentos químicos (δ) estão relatados em parte por milhão (ppm) em relação ao tetrametilsilano (TMS), utilizado como padrão interno, colocando-se entre parênteses a multiplicidade (s= simpleto, sl= simpleto largo, d=dupleto, t= tripleto, q= quadrupleto, quin= quintupleto, dd= duplo dupleto, ddd= duplo duplo dupleto, dt= duplo tripleto, m= multipleto), a constante de acoplamento (*J*) em Hertz (Hz) e o número de hidrogênios deduzidos da integral relativa.

Os espectros de massas foram obtidos em aparelho de alta resolução, necessitando de calibração interna, antes de realizar as análises. Usa-se para calibração interna uma solução de NA-TFA a 10 mg/ml(TOF). O modelo utilizado foi um ultrOTOFQ - ESI-TOF Mass Spectrometer, de Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA, sob essas condições: Bomba de Infusão, Fluxo 300 µl/h. O modo de detecção foi positivo e negativo para as amostras.

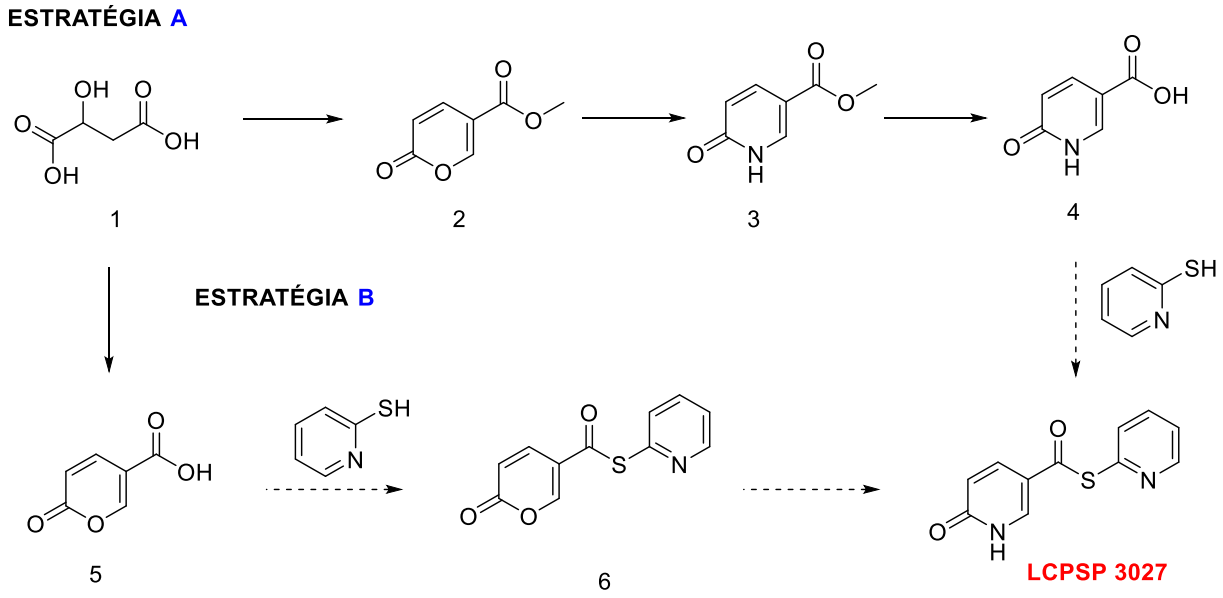
As análises cromatográficas em camada delgada (C.C.D.) foram realizadas utilizando-se cromatofolhas de alumínio de sílica gel 60 F254-MERCK. Para a visualização dos componentes nas análises em C.C.D., foi utilizada uma lâmpada ultravioleta (254nm). Equipamentos como agitador magnético (Corning PC-320), balanças (Mettler PE 400/ Sartorius BP 121S), bomba de alto vácuo (Precision Mode lD150), evaporador rotatório (Büchi R-210), luz ultravioleta (Spectroline CM-10) e ponto de fusão (Marconi MA 381) foram utilizados durante os procedimentos de síntese e caraterização

Os solventes utilizados nos processos de síntese, extração e purificação foram devidamente separados e encaminhados para o centro de tratamento de

resíduos. Solventes e reagentes comerciais foram convenientemente purificados. Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich Brazil LTDA.

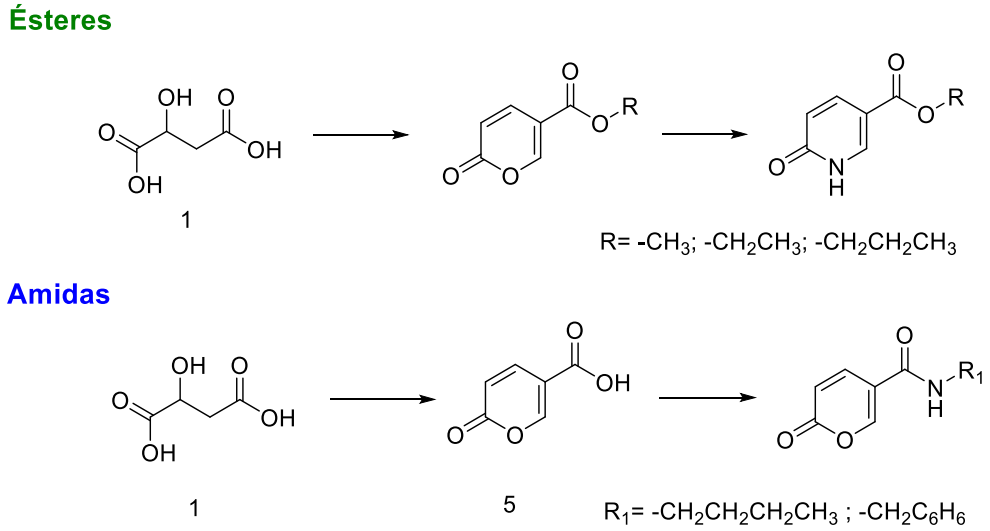
3.4.2.1.1 Metodologias abordadas para a síntese do LCPSP 3027

Inicialmente, para a o obtenção do composto LCPSP 3027 foram abordadas duas estratégias resumidas no **Esquema** 2. Em relação à estratégia A, a formação do composto **2** foi realizada em uma única etapa, através da condensação do ácido málico **1** na presença de acido sulfúrico concentrado, seguido de esterificação do ácido formado utilizando metanol como reagente (Ashworth *et al.*, 2003). A lactâma **3** foi obtida a partir do metil-cumalinato **2** e que após a hidrólise, na presença de uma solução de hidróxido de sódio a 25%, fornece a 5-carboxi-2-piridinona **4,** (Kaminski e Kirsch, 2008). Apesar dos diversos esforços, não conseguimos realizar a tioesterificação e consequentemente obter o composto LCPSP 3027. Em relação à estratégia B, a obtenção do composto **5** foi realizada semelhante ao método de obtenção do composto **2** (Ashworth *et al.*, 2003), no entanto a reação procedeu-se em uma única etapa, sem a utilização de metanol como reagente. Novamente, não conseguimos obter o composto LCPSP 3027 por meio da tioesterificação com a mercaptopiridina. As diversas tentativas de obtenção do tioester foram testadas e estão discutidas na secção de Resultados e Discussões 4.5.1.1.



Esquema 2. Rotas sintéticas abordadas para a obtenção do composto LCPSP 3027.

Para a obtenção de alguns derivados ésteres e amidas da molécula LCPSP 3027 a metodologia empregada esta no **Esquema** 3. A estratégia utilizada para a obtenção dos ésteres é a mesma utilizada na estratégia A do **Esquema** 2, porém os álcoois utilizados para a esterificação são diferentes, originando ésteres com cadeias distintas. A obtenção dos derivados de amidas segue a condensação do composto **1** para o ácido cumálico **5**, assim como é realizada na estratégia B do **Esquema** 2, posteriormente a butilamina e a fenilmetilamina foram submetidas à reação com o composto **5**, através do uso da diciclocarbodimida (DCC) (Bekhit e Fahmy, 2003).

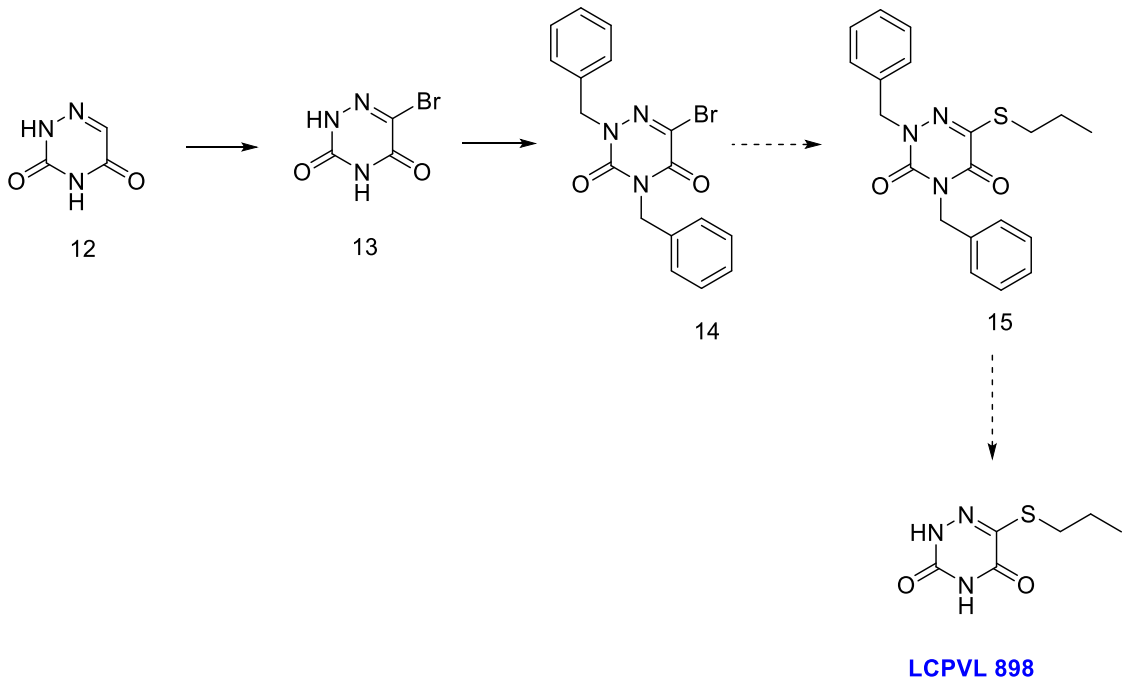


Esquema 3. Rota de síntese para a obtenção dos derivados ésteres e amidas do composto LCPSP 3027.

3.4.2.1.2 Metodologia abordada para a síntese do LCPVL 898

A estratégia planejada para a obtenção do tioéster baseava-se em reações de bromação, benzilação, substituição e por último desbenzilação. Deste modo, para a obtenção da molécula LCPVL 898 de interesse, a Azauracil **12** foi submetida a uma reação de bromação (Morisawa, Kataoka e Kitano, 1977), obtendo o composto bromado (**13**) com excelente rendimento. Em seguida o composto **13** foi submetido a uma reação de benzilação, utilizando brometo de benzila, originando o composto **14**, método adaptado de (Maes, Rauws e Maes, 2013). No entanto, ao tentar substituir o bromo pelo propano tiol não obtivemos sucesso, consequentemente não

conseguimos obter o composto LCPVL 898. O **Esquema** 4 resume a rota de síntese planejada.



Esquema 4. Estratégia abordada para obtenção da molécula LCPVL 898.

3.4.2.2 *Screening* de fragmentos baseados no núcleo 2-amino benzotiazol

A estratégia de utilizar fragmentos para desenvolvimento de novos fármacos é uma metodologia atualmente muito utilizada, principalmente pela indústria farmacêutica. O princípio desta técnica consiste na identificação de pequenas moléculas, denominadas de fragmento, as quais conseguem interagir com um alvo macromolecular (Scott *et al.*, 2012). Através de técnicas como cristalografia de raios-X e ressonância magnética nuclear é possível identificar quais as regiões de interações desses fragmentos com o alvo e direcionar o crescimento estrutural da pequena molécula até chegar a um composto líder (Wyss *et al.*, 2012). A **Figura** 9 mostra de maneira simplificada a obtenção de um composto líder utilizando à técnica baseada em fragmentos em associação à cristalografia de raios-X de proteínas.

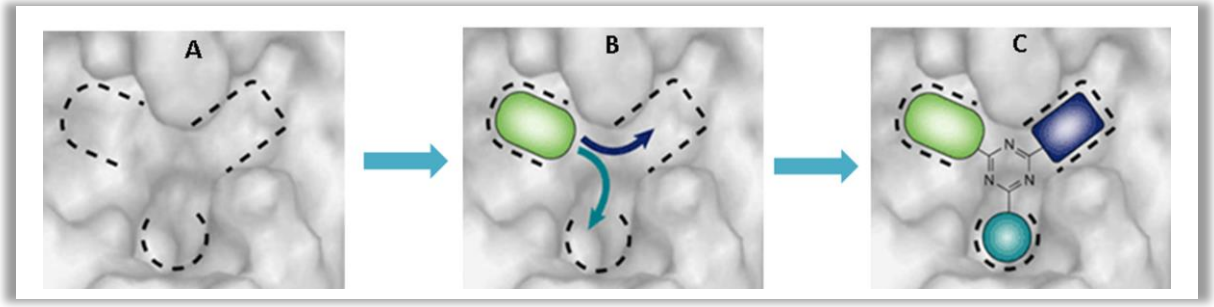


Figura 9. **Proposta sugerida para obter um composto líder a partir de fragmentos**. Em **A** temos uma região de uma proteína onde esta representado três bolsões. Através do *screening* de fragmentos foi identificado um ligante para um dos bolsões em **B**. O conhecimento da estrutura da enzima, aliado ao processo de crescimento do fragmento identificado como ligante permite chegar a um composto líder representado em **C**. Imagem retirada e adaptada de *Boston University* http://www.bu.edu/bmerc/.

Partindo deste principio, decidimos introduzir essa técnica como uma estratégia na busca de fragmentos, uma vez que pequenas moléculas contendo o núcleo 2-amino benzotiazol foram identificados como ligantes a LbDHODH.

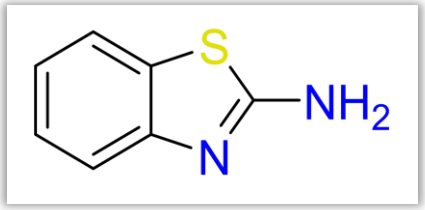
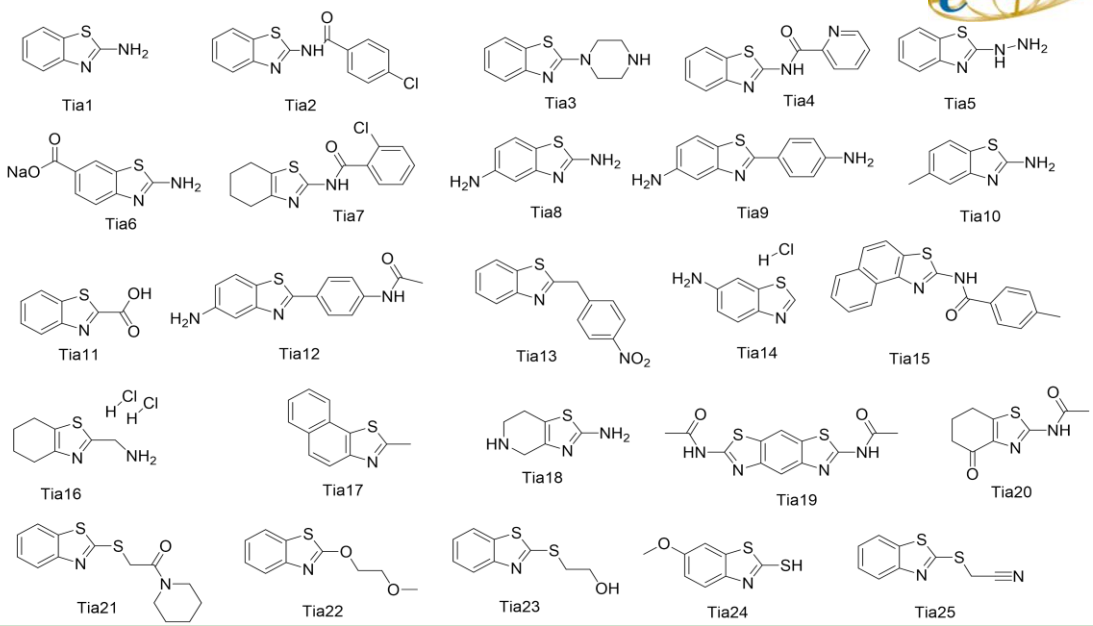


Figura 10. **Estrutura do núcleo 2-amino benzotiazol**. Núcleos de fragmentos majoritariamente ensaiados contra LbDHODH.

O *screening* de fragmentos foi baseado em duas bibliotecas distintas, a CamBridge Corporation e a segunda foi a do Laboratório de Química Heterocíclica (QHETEM), coordenado pelo professor Dr. Flavio da Silva Emery.

Os compostos de Chembridge são mais diversificados estruturalmente, variando tanto o núcleo 2-amino benzotiazol quanto à função amino, a qual em muitas moléculas esta acilada ou trocada por um enxofre. Já a biblioteca do QHetem opta por preservar o núcleo 2-amino benzotiazol e uma hidroxila presente no anel de seis membros do fragmento. As estruturas ensaiadas contra a LbDHODH estão na **Figura** 11.

Biblioteca de ChemBridge



Biblioteca do Laboratório de Química Heterocíclica e Medicinal

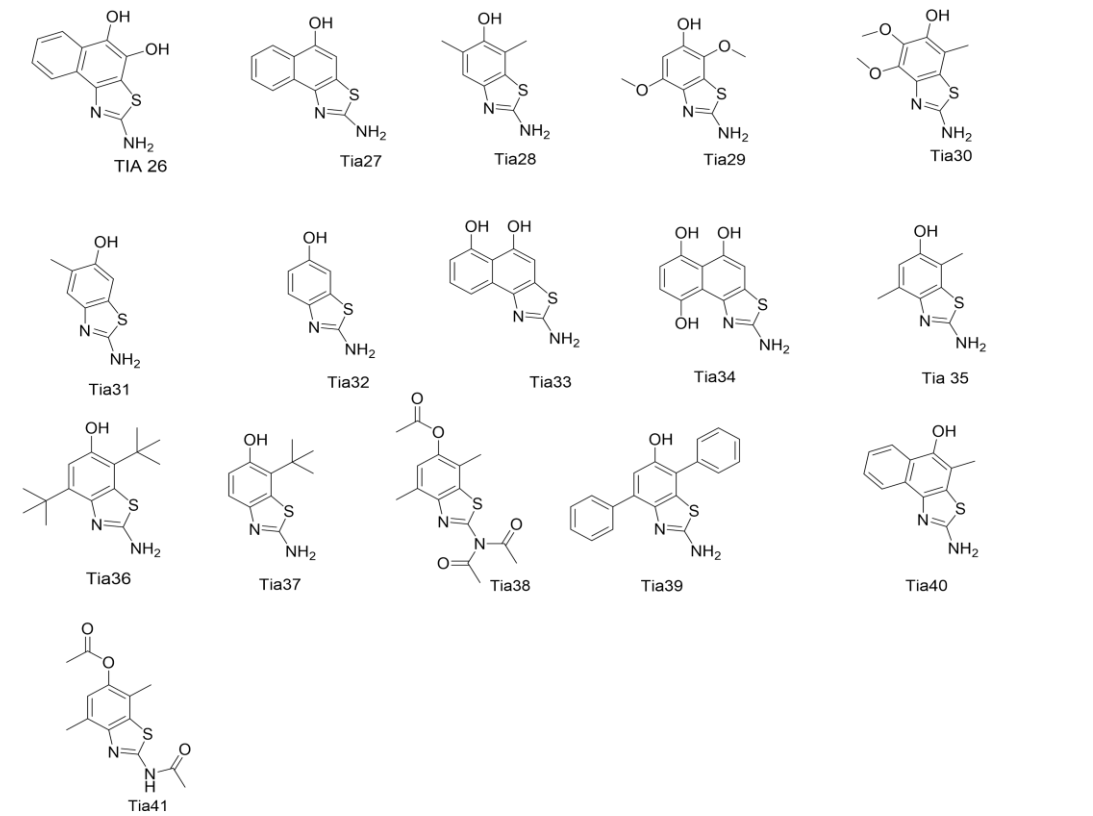


Figura 11. **Fragmentos derivados do núcleo 2-amino benzotiazol**. Estes fragmentos foram avaliados quanto ao seu potencial inibitório frente à enzima LbDHODH.

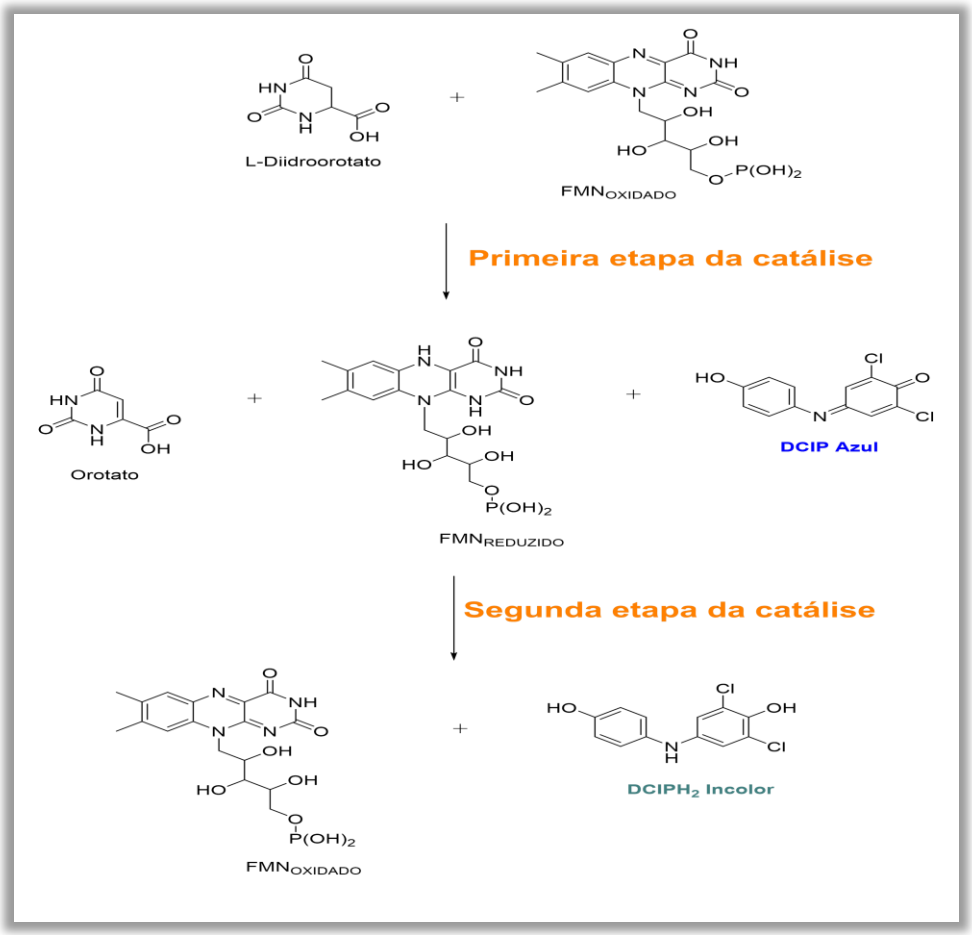
Para um composto ser considerado um fragmento ele deve obedecer à regra dos três, de acordo com (Erlanson, 2012). Essa regra consistem em peso molecular menor que 300, LogP menor do que 3 e o número de doador e receptor de hidrogênio deve ser menor do que 3, para cada caso. O único fragmento dos 41 testados que infringe a regra é o composto **Tia39**, que tem um peso molecular de 318.

3.4.2.3 Composto doado por diferentes colaboradores

Os compostos ensaiados frente à enzima LbDHODH foram avaliados segunda a metodologia do item 3.4.3. Os compostos compreendem diversas classes e grupo químicos, sendo estas moléculas de origem sintética e natural.

3.4.3 Avaliação do potencial inibitório em relação à LbDHODH

A determinação do potencial inibitório dos compostos avaliados foi realizada medindo a atividade enzimática frente aos compostos previamente solubilizados em DMSO. Utilizando um espectrofotômetro acoplado com leitor de microplaca as leituras foram feitas durante 60 segundos, em intervalos de 3 segundos no comprimento de onda de 610 nm. Este método quantifica a atividade da enzima indiretamente, através do monitoramento da redução do DCIP (2,6-dicloroindofenol). O DCIP é o agente colorimétrico, absorvendo na região de 610 nm (ε=215000 $M^{-1}cm^{-1}$) e atua como segundo substrato da reação enzimática da DHODH 1A, em substituição ao fumarato. A redução do DCIP é monitorada pela perda da coloração azul que deixa de absorver na região de 610 nm ao longo do tempo, de acordo com a atividade enzimática. Deste modo, como a redução do DCIP é estequiometricamente proporcional à formação de orotato, conseguimos quantificar indiretamente o orotato formado. O **Esquema** 5 mostra as etapas reacionais envolvidas no ensaio de inibição utilizado para a identificação de ligantes.



Esquema 5. **Representação da atuação do DCIP como segundo substrato da reação**. Na primeira etapa o L-diidroorotato é oxidado pelo FMN, o qual reduz formando o $FMN_{REDUZIDO}$. Posteriormente o DCIP reoxida o FMN, reduzindo-o para $DCIPH_2$. Nesta reação, o DCIP que inicialmente é azul e absorve no comprimento de onda de 610 nm se torna incolor, de modo a não absorver mais no comprimento de onde de 610 nm. Deste modo, é possível monitorar a formação de orotato indiretamente.

. O meio reacional utilizado para o ensaios, e que foi otimizado pelas características cinéticas da LbDHODH, é composto por 50µM de diidroorotato, 60µM de DCIP, 0,1% de Triton X-100, 150 mM de KCl e 50 mM de Tris pH 8,15, a concentração de enzima utilizada nos experimentos foi de 165 nM. Para os ensaios iniciais na busca de inibidores, os compostos foram avaliados a 100µM na concentração final.

As taxas do potencial inibitório foram avaliadas através da comparação da velocidade da enzima com e sem o inibidor. Para isso monitoramos a redução de DCIP em função do tempo. Como a reação é uma molécula de DHO convertida em

uma molécula de ORO e uma molécula de DCIP oxidada para uma reduzida podemos medir indiretamente a quantidade de orotato formado. Assim podemos obter a concentração de orotato formado através da equação 5.

$$[oro]_f = A/(\varepsilon b) \qquad \text{(Eq.5)}$$

onde [oro]f é a concentração formada de orotato; A é absorbância medida; ε é o coeficiente de extinção do DCIP no comprimento de onda de 610 nm (ε=215000 $M^{-1}cm^{-1}$) e b é o caminho óptico.

Através da conversão de absorbância em concentração utilizando a equação 5 podemos determinar a velocidade da reação. Assim os valores de concentração foram plotados em função do tempo e a equação da reta foi obtida, onde o coeficiente angular da reta é a velocidade da enzima. Deste modo, consideramos que na ausência do inibidor a enzima desempenha sua atividade catalítica máxima, e comparando as velocidades da enzima sem e com inibidor, de acordo com equação 6, podemos encontrar a porcentagem de inibição.

$$\% \text{ Inibição} = 100 - (100V_1/V_2) \qquad \text{(Eq.6)}$$

Onde, % Inibição é a porcentagem de inibição; V_1 é a velocidade da enzima na ausência de ligantes e V_2 é a velocidade na presença de ligantes.

Os compostos que apresentaram taxa de inibição relevantes frente à LbDHODH foram submetidos a avaliação contra a enzima humana. Neste caso, o método utilizado foi o mesmo que para a LbDHODH. No entanto, o meio reacional para a enzima humana é composto de composto por 1 mM de diidroorotato, 60 µM de DCIP, 0,1% de Triton X-100, 150 mM de KCl e 50mM de Tris pH 8,15, e 100 µM de Q_0 (2,3-dimetoxi-5-metil-*p*-benzoquinona). A concentração de enzima utilizada nos experimentos foi de 20 nM.

As moléculas que foram seletivas para a enzima LbDHODH no ensaio de validação cruzada, apresentando atividade inibitória abaixo de 10% a uma concentração de 100 µM, foram submetidos a ensaios para determinação de IC_{50} (concentração mínima inibitória que inativa 50% das proteínas). As concentrações utilizadas para a determinação dos IC_{50} foram otimizadas para cada composto ensaiado. De acordo com a equação 7 conseguimos obter o valor de IC_{50}.

$$y = A1 + \frac{(A2-A1)}{1+10^{(\log IC50-x)Hillslope}} \quad \text{(Eq.7)}$$

onde, A1 corresponde ao valor máximo de atividade da enzima, A2 corresponde o valor mínimo de atividade enzimática, X é a dose aplicada e Log IC_{50} é a concentração do composto em escala logarítmica que corresponde a 50 % da atividade enzimática.

Para os cálculos de determinação da concentração, velocidade e IC_{50} foram utilizados os programas OrignLab e Microsoft Excel. Para a confecção dos gráficos de IC_{50} foi utilizado o software sigmaplot.

3.4.4 Avaliação do potencial inibitório e toxicidade em nível celular**.**

3.4.4.1 Avaliação da Citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade procederam-se de acordo com Naujorks *et al.*, 2015, desta forma, foram utilizados fibroblastos L929 de camundongos BALB/C, os quais foram cultivados a 37 ° C numa atmosfera de 5% de CO_2, utilizando Meio Eagle Modificado por Duldecco (DMEM) suplementado com 3,5 g de glicose, penicilina 1% e estreptomicina 10%. As células foram plaqueadas a uma concentração de 105 células / mL em placas de 96 poços. Deste modo, as células foram incubadas durante 24 horas. Após o tempo de incubação as células não aderentes foram retiradas com lavagem utilizando PBS. Posteriormente os compostos foram diluídos nos poços em concentrações de 128, 32,8, 4,2 e 0,5 µM a partir de solução estoque de 50 mM de cada composto em DMSO. O controle utilizado durante o ensaio foi DMSO nas mesmas concentrações dos compostos avaliados. A viabilidade celular foi avaliada após 48 horas utilizando o reagente 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio bromido (MTT) à uma concentração de 5 mg/ml, com um tempo de incubação de 4 h. Neste caso, o MTT é capaz de interagir com as mitocôndrias das células vivas, formando os cristais de formazan, no entanto o MTT não é capaz de interagir com as mitocôndrias de células mortas, não formando os cristais de formazan, demostrando que a célula não está viva. Após isso os cristais de formazan foram dissolvidos utilizando uma solução composta por dimetilsulfoxido (DMSO), ácido acético glacial e extran, os quais ficaram em contato por 2 horas. A leitura foi obtida utilizando um espectrofotômetro com leitor de

microplacas no comprimento de onda de 570 nm. Assim a taxa de citotoxicidade foi calculada comparando os valores do controle com os dados obtidos dos compostos. O experimento foi realizado em triplicata.

3.4.4.2 Atividade anti-promastigotas

Promastigotas de *Leishmania (V) braziliensis* H3227 foram cultivadas em meio M199 suplementado com L-glutamina (2 mM), $NaHCO_3$ (10 mM), penicilina (100 UI / mL), estreptomicina (100 ug / mL). Após 6 dias de inoculação, formas promastigotas (1×10^6 parasitas / ml) foram incubadas em microplacas de 96 poços que continha às amostras a serem testadas em concentrações de 0,5, 2,0, 8,0 e 32,0 e 128 µM e utilizando anfotericina B como controle positivo nas mesmas concentrações e (DMSO) como controle negativo. As placas foram incubadas durante 24 horas a 37 ° C, com uma atmosfera úmida e 5% de CO_2. Deste modo, o teste procedeu-se utilizando o MTT, como no ensaio de citotoxicidade. O experimento foi realizado em triplicata (Peixoto *et al.*, 2011).

3.4.4.3 Atividade anti-amastigotas

Fibroblastos L929 foram cultivados semelhantes aos ensaios de citotoxicidade. As células foram plaqueadas a uma concentração de 105 células / mL em placas de 96 poços contendo uma lamínula de 13 mm. Deste modo, as células foram incubadas durante 24 horas. Após isso, efetuou-se a retirada das células que não aderiram através da lavagem com PBS, e inoculou as promastigotas, cultivadas em meio M199 suplementado com L-glutamina (2 mM), $NaHCO_3$ (10 mM), penicilina (100 UI / mL), estreptomicina (100 ug / mL), na razão de 3:1 fibroblasto. Após 24 horas, o meio foi lavado com PBS para a retirada das promastigotas que não infectaram os fibroblastos. Deste modo, os compostos foram incubados com os fibroblastos em concentrações de 0,5, 2,0, 8,0 e 32,0 e 128 µM a 37 ° C em uma atmosfera de 5% de CO_2 por 72 horas. A anfotericina B foi utilizada como controle positivo nas mesmas concentrações que os compostos ensaiados e o DMSO foi utilizado como controle negativo. Posteriormente a lamínula foi removida e corada com Hematoxicilina-eosina e fixada em uma lamina. Atividade anti-amastigota foi analisado por microscopia contando 100 fibroblastos por amostra, tanto infectados como não infectados. O experimento foi realizado em triplicata (Naujorks *et al.*, 2015).

4. RESULTADOS E DICUSSÕES

4.1 *PRODUÇÃO DA LbDHODH, DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO E PARAMETROS BIOQUÍMICOS TEÓRICOS.*

4.1.1 Expressão e purificação da LbDHODH

Seguindo a metodologia proposta, conseguimos expressar a proteína na fração solúvel e purificar com alto grau de pureza (**Figura** 12). O rendimento de proteína pura foi de aproximadamente de 4 mg de proteína por litro de cultura.

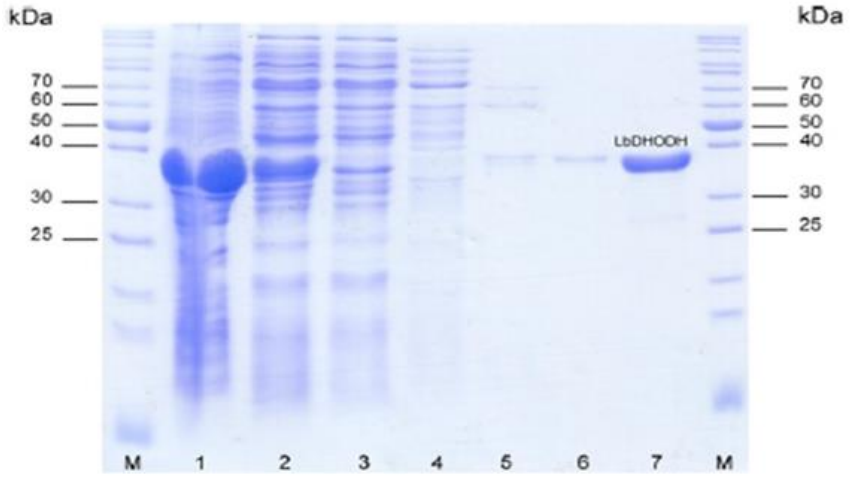


Figura 12. **Gel de SDS Page**. M corresponde ao marcador de peso molecular; a coluna 1 refere-se à fração de células lisada enquanto que a coluna 2 refere-se à fração solúvel; na coluna 3 temos a fração não ligada; nas frações 4 e 5 temos as eluições de 25 mM e 50 mM de imidazol, respectivamente. Por último, na coluna 6 e 7 temos a fração de 100 mM, onde se observa a presença da LbDHODH com alto grau de pureza.

4.1.2 Determinação da concentração da LbDHODH e de parâmetros bioquímicos teóricos.

A determinação da concentração da enzima foi estimada utilizando o coeficiente de extinção molar baseado no cofator FMN da proteína, considerando concentrações equimolares de FMN ligado à proteína e livre. O valor calculado para o coeficiente de extinção LbDHODH foi de $\varepsilon_{LbDHODHFMN}$ = 11,352 M^{-1} cm^{-1}, usando como referência o coeficiente de extinção do FMN livre (ε_{FMN} = 12,500 M^{-1} cm^{-1}). A partir do valor do coeficiente de extinção determinado para a LbDHODH, podemos estimar a concentração da proteína (**Figura** 13).

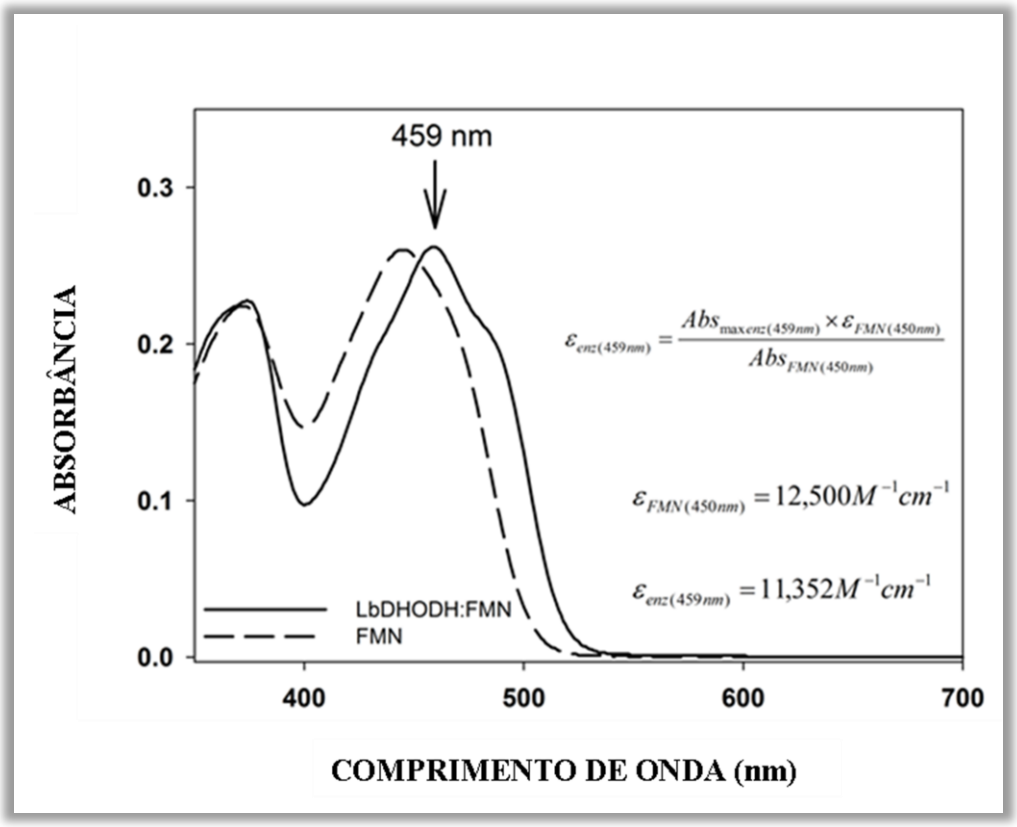


Figura 13. **Espectro de absorção UV/visível**. As linhas contínuas representam o espectro da LbDHODH e as linhas pontilhadas o espectro do FMN livre. O pico máximo encontrado para a LbDHODH foi de 459nm, onde $\varepsilon_{LbDHODHFMN}$ = 11,352 M^{-1} cm^{-1}

Características como o ponto isoelétrico (pI), massa molecular (MM) e coeficiente de extinção molar ε_{280nm} foram estimadas através da ferramenta online ProtParam, hospedada no servidor ExPASy. O valor de pI teórico calculado é de 6,89, a massa molecular aproximada é de 37358.8 g/mol e o coeficiente de extinção estimado no comprimento de 280 nm é de 19370 M^{-1} cm^{-1}. Esses cálculos foram baseados nos aminoácidos que constituem a enzima juntamente com a cauda de histidina.

4.2 *CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA*

4.2.1 Determinação do pH ótimo

Para otimizar os experimentos de caracterização cinética e dos ensaios inibitórios decidimos determinar o pH ótimo da LbDHODH visando obter o maior potencial da enzima. O gráfico da **Figura** 14 mostra que a maior atividade da enzima em converter diidroorotato em orotato se encontra na faixa do pH 8. Assim ao longo

dos experimentos de cinética e de avaliação do potencial inibitório o pH 8 foi mantido.

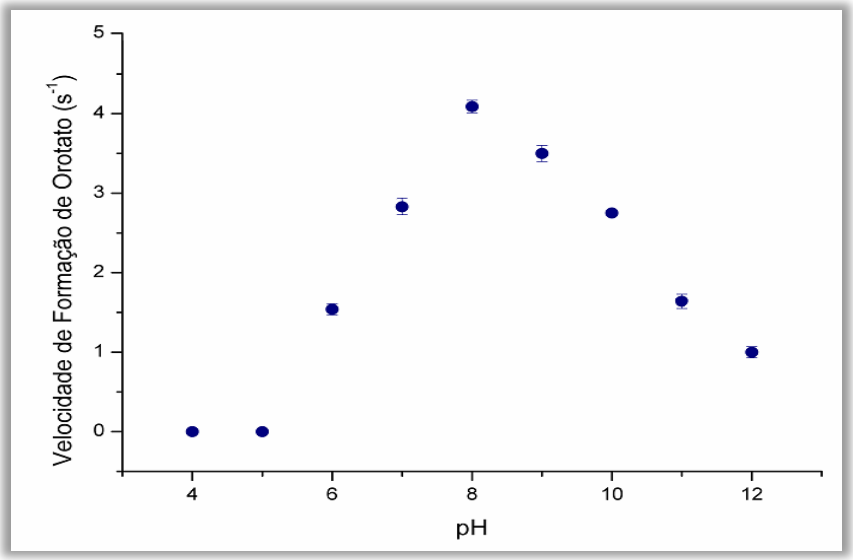


Figura 14. **Determinação do pH ótimo da LbDHODH**. A máxima velocidade de formação de orotato foi detectada na presença do pH 8, o qual possui TRIS como agente tamponante.

4.2.2 Caracterização do perfil cinético da LbDHODH

A cinética enzimática da LbDHODH é caracterizada por um mecanismo conhecido como ping-pong. Neste tipo de mecanismo cinético a enzima é capaz de catalisar dois tipos de substratos. Na primeira etapa, o complexo enzima-substrato é formado (ES_1), dando inicio ao ciclo catalítico, onde primeiro substrato (S_1) é convertido no primeiro produto (P_1) originando o complexo enzima-produto ($E'P_1$) e fazendo com que a enzima fique modificada. Com a saída do primeiro produto a enzima modificada (E') interage com o segundo substrato (S_2), formando o complexo ($E'S_2$). Deste modo, ao catalisar o segundo substrato, o segundo produto (P_2) é formando e liberado e com isso a enzima é renovada e esta apta a mais um ciclo catalítico (**Figura** 15).

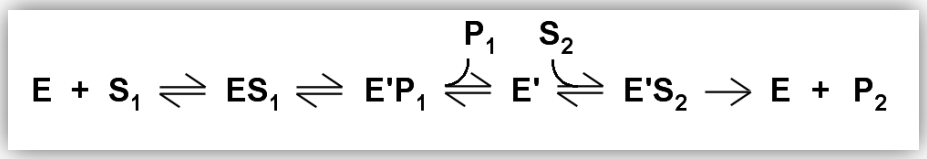


Figura 15. **Representação geral do mecanismo cinético do tipo ping-pong**. Mecanismo executado pelas enzimas DHODH 1 A, como a LbDHODH

Para a LbDHODH a primeira etapa do mecanismo ping-pong corresponde a conversão do DHO (S_1) em ORO (P_1) resultando na redução do FMN. Já a segunda etapa, a enzima modificada (E', corresponde a DHODH complexada com o FMN na forma reduzida) é reoxidado pelo fumarato (S_2), o qual é convertido em succinato (P_2).

Inicialmente as etapas de redução e oxidação foram avaliadas de forma independente. Os gráficos da **Figura** 16 relaciona o perfil cinético da LbDHODH, no qual em **A** esta representado os valores das taxas reacionais em função das concentrações de fumarato, onde foi possível ajustar à equação de Michaelis-Menten. Já em **B** temos a velocidade em função das concentrações de diidroorotato, onde os dados foram ajustados na equação de Hill.

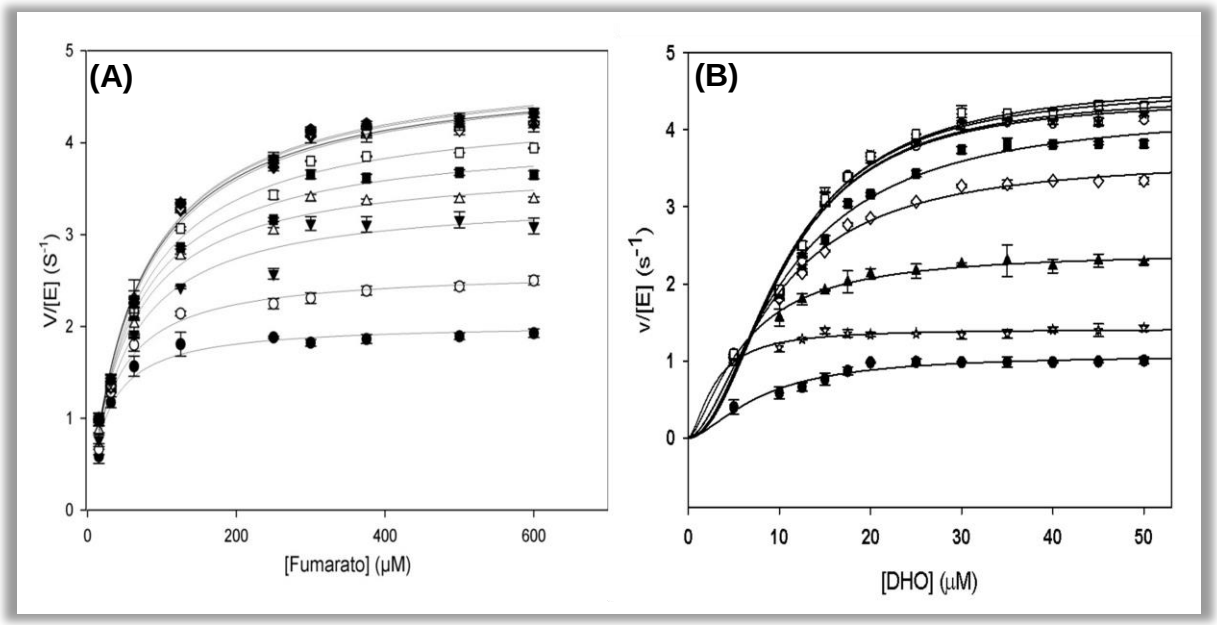


Figura 16. Determinação dos parâmetros cinéticos da LbDHODH.(A) Velocidade de formação de orotado fixando valores de DHO e variando FUM (valores de DHO em μM, 10 (●), 12,5 (○), 15 (▼) , 17,5 (△), 20 (■), 25(□), 30 (◆), 35 (◇), 40 (▲) 45 (▽), 50 (⬢) .(B) Velocidade de formação de orotato fixando valores de FUM e variando DHO (valores de FUM em μM 15,125 (●),32,5 (✳), 62,5 (▲) , 125 (◇), 250 (■), 300(○), 375 (★), 500 (×) e 600 (□).

Através da análise dos gráficos é possível observar que concentrações acima 30 μM de DHO ou mais já são saturantes, em relação ao fumarato concentrações acima 250 μM já são saturantes. Na **Tabela** 1 estão relacionados os valores de coeficiente de Hill (*h*) obtido para cada concentração de fumarato, onde é possível

observar que na medida em que a concentração de fumarato aumenta há um aumento no valor de *h*, o que demonstra o efeito cooperativo. A partir de 300 µM de fumarato o coeficiente de Hill permanece constante em um valor de 2, sugerindo que essa cooperatividade, além de positiva, pode estar relacionada com o processo de dimerização.

Tabela 1. Valores do coeficiente de Hill para cada concentração de fumarato.

Fumarato (µM)	Coeficiente de Hill (h)
15,125	1,6 ± 0,3
32,25	1,6 ± 0,3
62,5	1,5 ± 0,1
125	1,7 ± 0,1
250	1,7 ± 0,2
300	2 ± 0,2
375	2 ± 0,2
500	2 ± 0,2
600	2 ± 0,2

Os valores de K_{cat}, K_m^{FUM}, $K_{0.5}^{DHO}$ e o coeficiente de Hill (**Tabela** 2) foram determinados através do ajuste global dos valores obtidos das curvas da **Figura** 16 utilizando a equação do mecanismo ping pong. Para efeitos comparativos, os dados experimentais da LmDHODH obtidos no trabalho da doutoranda Renata Almeida dos Reis Garcia estão presentes também na **Tabela** 2 . Observando os valores de $K_{cat,}$ a LmDHODH se mostra muito mais rápida na conversão de DHO em ORO do que a LbDHODH. Os valores de K_m^{FUM} são semelhantes, mostrando que ambas as enzimas possuem praticamente a mesma afinidade pelo fumarato, já em relação ao $K_{0.5}^{DHO}$ os valores obtidos para a LmDHODH são cerca de três vezes maior, demonstrando uma menor afinidade pelo DHO em comparação a LbDHODH. Por último, o coeficiente de Hill para as duas enzimas são parecidos, apresentando um valor próximo de 2, o que caracteriza um grau de cooperatividade positiva para o diidroorotato, no entanto modulada pela presença de fumarato. Essa correlação

entre diidroorotato e fumarato é esperada, uma vez que ambos compartilham do mesmo sítio ativo.

As diferenças entre a LmDHODH e a LbDHODH com relação ao Km para o DHO podem estar relacionadas com a variação do pH, uma vez que a cinética para a LmDHODH foi realizada em pH de 7,2 e para a LbDHODH em pH 8. E essa diferença de pH pode alterar o estado de protonação dos resíduos envolvidos na catálise e assim aumentando ou diminuindo a afinidade pelo substrato.

Tabela 2. Valores de K_{cat}, K_m^{FUM}, $K_{0.5}^{DHO}$ e coeficiente de Hill (h) para as enzimas LbDHODH e LmDHODH.

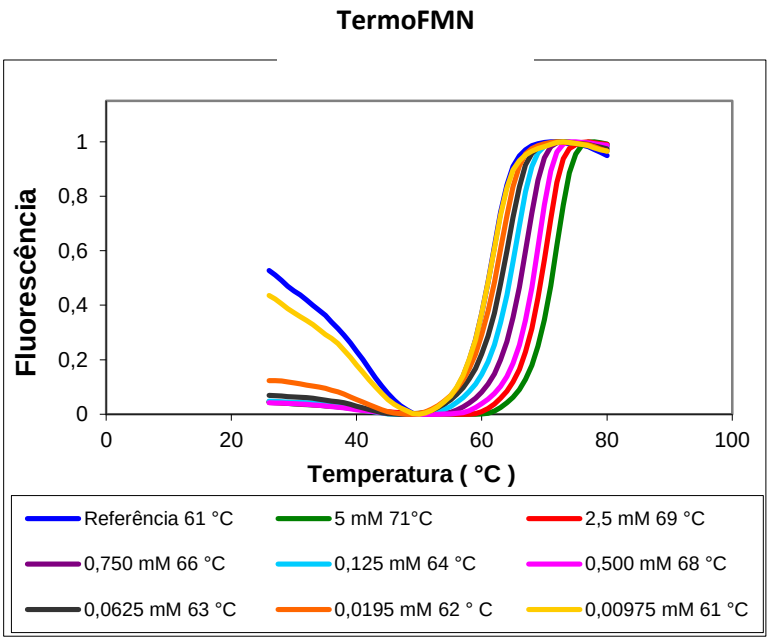
	LbDHODH	**LmDHODH**
K_{cat} (s^{-1})	5,4 ± 0,1	12 ± 1
K_m^{FUM} (µM)	74 ± 3	79 ± 9
$K_{0.5}^{DHO}$ (µM)	11,7 ± 0,3	36 ± 4
h	1,8 ± 0,1	1,9 ± 0,2

Essas diferenças encontradas entre LbDHODH e LmDHODH, que compartilham alta identidade sequencial, e em particular, um sítio ativo conservado, sugere que o mecanismo de catálise adotado pelas DHODHs da classe 1A depende não somente das interações diretas entre substrato e proteína, mas também de um processo, provavelmente dinâmico e de transferência de informação entre um monômero e o outro.

4.2.3 Estudos de termoestabilidade

A termoestabilidade da LbDHODH foi medida através da técnica do termofluor. Como molécula modelo para o desenvolvimento de uma plataforma o orotato inicialmente foi utilizado para a realização dos ensaios. Os dois gráficos da **Figura** 17 mostram a diferença que existem entre as duas metodologias utilizadas. É possível verificar que há uma melhor resolução dos ensaios utilizando a metodologia do TermoFMN, onde é possível observar uma estabilização significante da proteína em concentrações altas de orotato, através do aumento da temperatura de desenovelamento em comparação com a amostra de referência. Já na metodologia

utilizando o SYPRO® Orange notamos que não há uma variação considerável na temperatura de desenovelamento na presença do orotato, Os métodos, embora usam princípios similares, fornecem resultados distintos, uma vez que o ThermoFMN monitora diretamente a exposição do FMN ao solvente, e é mais dirigido para a avaliação da integridade do sítio ativo, equanto que o SYPRO, por se ligar nas regiões internas da proteína, monitora o desenovelamento da proteína como um todo.



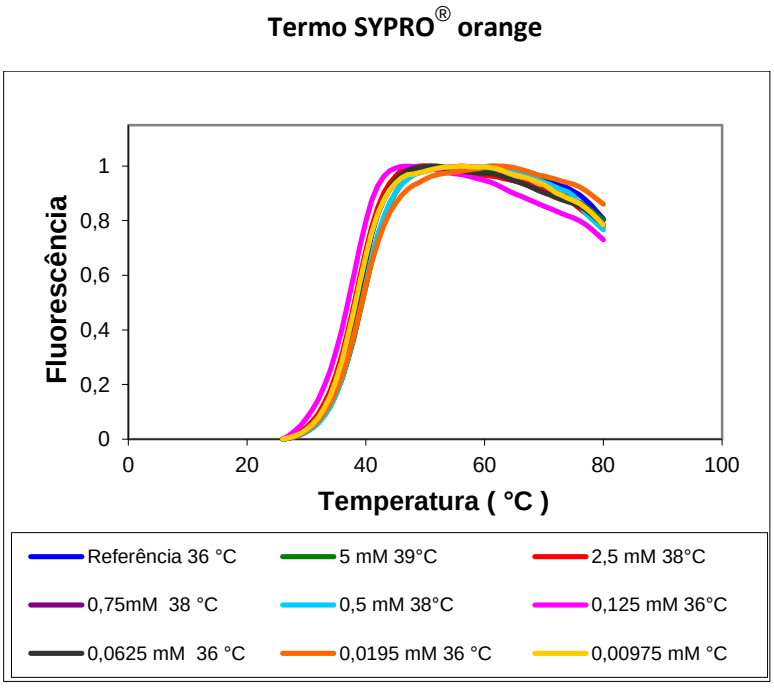
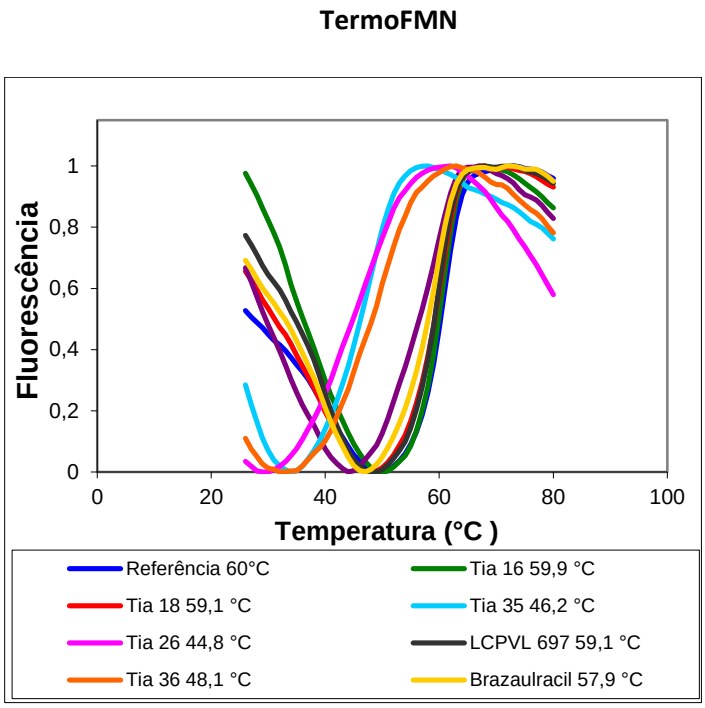


Figura 17. **Gráficos de fluorescência em função da temperatura**. A diferença de temperatura de desenovelamento da LbDHODH realizada por dois métodos diferentes, utilizando orotato como molécula modelo.

A sensibilidade dos métodos ainda pode ser analisada comparando os valores de temperatura de desenovelamento na presença de alguns inibidores da LbDHODH. Neste caso há uma desestabilização da enzima na presença de inibidores, como é possível ver no termoFMN da **Figura** 18, onde a temperatura de desenovelamento da proteína diminuiu na presença de ligante. Quando comparada a metodologia utilizando SYPRO® orange observamos que essa mudança é bem mais sutil em comparação a análise do termoFMN, a qual se mostra mais sensível para esta analise.



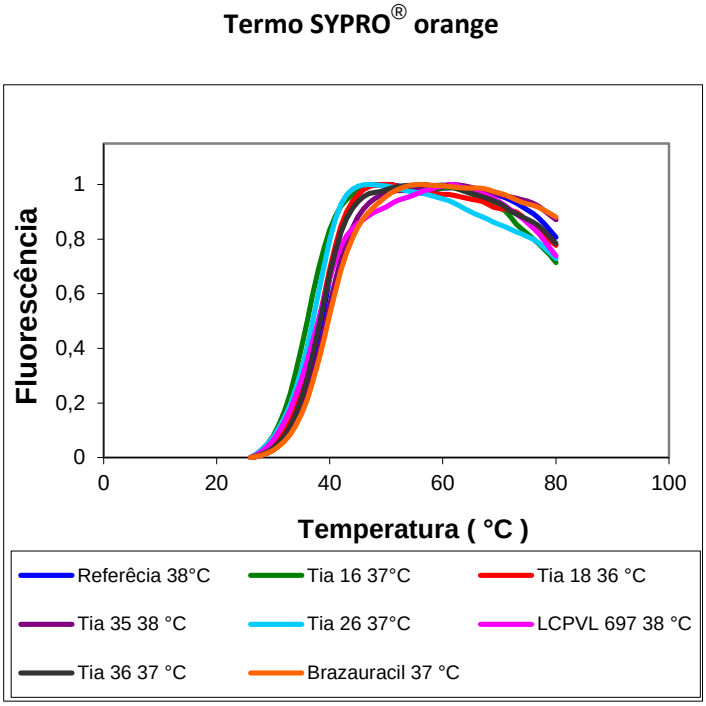


Figura 18. **Gráficos de fluorescência em função da temperatura**. A diferença de temperatura de desenovelamento da LbDHODH realizada por dois métodos diferentes, utilizando diferentes inibidores da LbDHODH

Através desses resultados podemos concluir que a técnica do termofluor, a qual foi desenvolvida originalmente para a busca de ligantes (Lo *et al.*, 2004), associada à metodologia desenvolvia em nosso laboratório (TermoFMN) (Padua *et al.*, 2014) pode ser utilizada para a busca de ligantes frente a LbDHODH, visto que para os ligantes ensaiados esta apresenta uma maior resolução.

4.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INIBITÓRIO DO OROTATO

A produção heteróloga da LbDHODH e sua caracterização cinética permitiram realizar os ensaios inibitório. Como protótipo utilizamos o orotato, o produto da catalise da LbDHODH e também considerado um inibidor natural da enzima. Em concentrações de 1 mM o orotato é capaz de inibir 100% da atividade enzimática. Deste modo, o IC_{50} para ele foi calculado e seu valor encontra-se na ordem de 81 ± 2 µM (**Figura** 19).

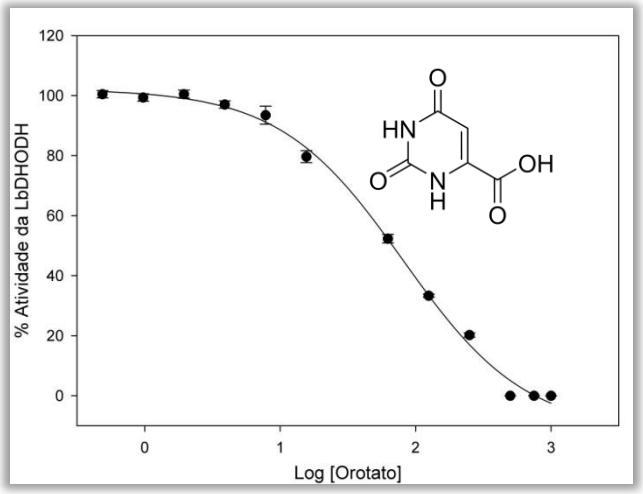


Figura 19. **Gráfico de % de atividade em função do log [orotato]**. Gráfico utilizado para estimar o IC_{50}.

Com a produção da enzima, sua caracterização cinética e a padronização do método de busca de ligantes conseguiram validar uma parte da central de identificação de ligantes planejada. Assim a busca de ligantes iniciou-se, bem como a caracterização estrutural LbDHODH-ligante

4.4 *DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL*

4.4.1 Ensaios de cristalização

Os primeiros ensaios de cristalização da LbDHODH foram realizados utilizando o método de matriz esparsa utilizando os kits da empresa Hampton Research, o Crystal Screen I e II e PEG/ION I e II, e utilizando uma concentração de 10 mg/L de proteína. Os primeiros cristais foram obtidos na condição 32 do Crystal Screen II que consiste de 100 mM de Hepes pH 7,5, 100 mM de NaCl e 1,6 M de sulfato de amônio (**Figura** 20).

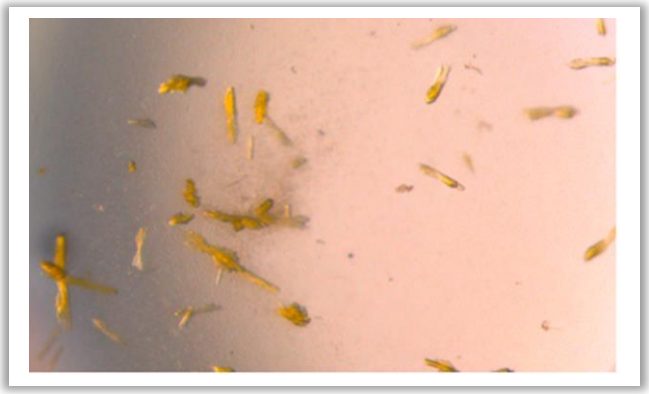


Figura 20. Primeiros cristais de LbDHODH, condição 32 do kit Crystal Screen da empresa Hampton Research.

Diversos esforços foram feitos para otimizar a condição de cristalização com objetivo de melhorar a forma dos cristais. Para isso parâmetros como pH, concentração de proteína, de sal, de precipitante, volume da gota e em alguns casos a adição de aditivos, foram variados. Deste modo, cristais amarelos e de forma retangular foram obtidos (**Figura** 21) na presença de 100 mM de HEPES, pH 7,5 em um intervalo de 1,5 a 1,7 M de sulfato de amônio, sendo que os melhores cristais formam-se a 1,6 M de sulfato de amônio. Os cristais na condição otimizada surgem após 4 dias atingindo seu tamanho máximo após 10 dias. A concentração final da proteína utilizada foi de 1,65 mg/ml.

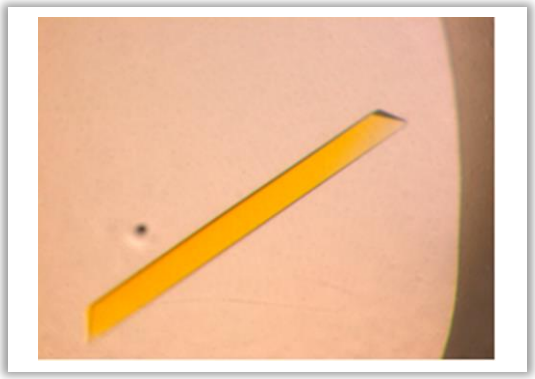


Figura 21. Cristal de LbDHODH na condição otimizada (100 mM de Hepes pH 7,5 e 1,6M de Sulfato de Amônio).

Para a coleta de dados cristais de tamanho aproximado de 0,1 x 0,1 x 0,7 mm, foi banhado na solução crioprotetora composta de 1,8 M Sulfato de Amônio, 100 mM de HEPES pH 7,5 e 20% (v/v) de glicerol e congelados em fluxo de nitrogênio gasoso.

Ensaios de co-cristalização com orotato foram realizados. Os cristais com o complexo foram obtidos incubando a enzima com a uma concentração de 4 mM de orotato, durante 2 horas utilizando à mesma condição da proteína sem ligante. Os primeiros cristais apareceram após 3 dias e atingiram o tamanho máximo após 10 dias (**Figura** 22).

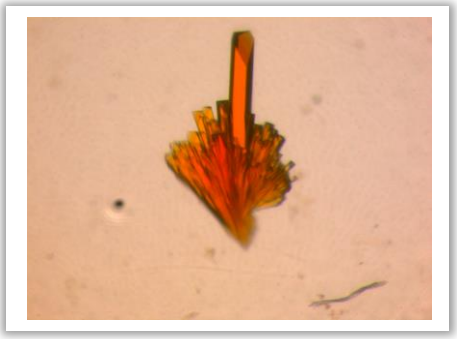


Figura 22. Cristal do complexo LbDHODH-Orotato.

Em relação aos cristais com outros ligantes identificados, nos experimentos de co-cristalização, não conseguimos obter cristais de qualidade para que os dados pudessem ser processados e refinados. Para alguns ligantes até obtivemos cristais, no entanto não conseguimos obter um conjunto de dados para que pudesse ser processado. Alguns cristais de BrAzauracil apresentaram um bom conjunto de dados, porem ao resolver a estrutura não foi possível identificar uma densidade eletrônica que correspondesse a molécula de BrAzauracil. Procedimentos de *soaking* também foram realizados, porém sem sucesso.

4.4.2 Elucidação estrutural da LbDHODH

A estrutura cristalográfica da LbDHODH foi refinada a uma resolução de 2.12 Å, utilizando o método de substituição molecular baseado no modelo da LmDHODH. A unidade assimétrica revela a presença de um dímero, como é esperado para as enzimas 1A DHODHs (**Figura** 23b). Cada monômero da LbDHODH consiste em um barril α/β folha, com um barril central composto de oito folhas β (β_1-β_8), cercado de oito α-helices (α_1-α_8). Além disso, elementos conservados de estrutura secundária e loops protegem o topo e o fundo do barril (**Figura** 23a).

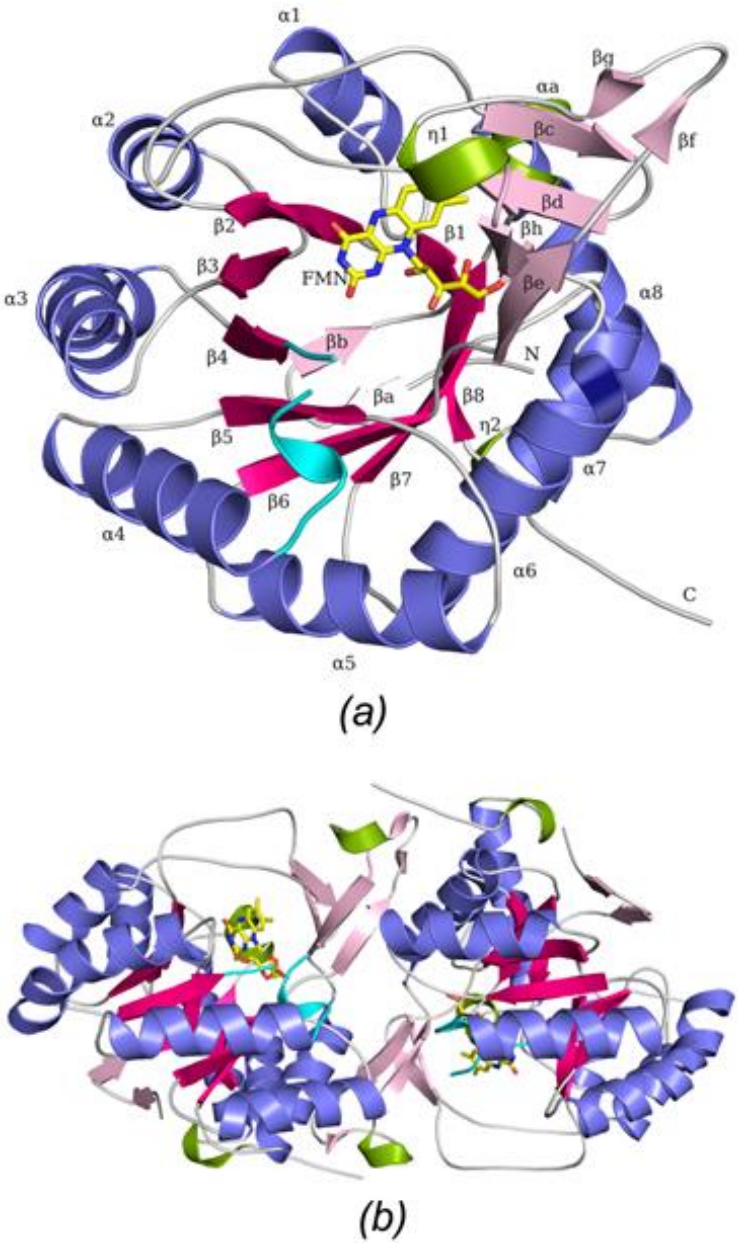


Figura 23. **Representação do monômero e dímero da LbDHODH** (a) Representação do monômero da LbDHODH composto por um barril central de oito folhas β paralelas (β_1- β_8) ilustrados em rosa cercados e de oito α hélices em azul. Duas fitas β antiparalelas (β_a- β_b) N-terminal foram encontradas no fundo do barril e no topo. Elementos de estrutura secundária e loops podem ser observados em verde, azul claro e salmão. O grupo prostético FMN é representado em amarelo. (b) Estrutura dimérica funcional da LbDHODH.

A superposição dos átomos de carbono α entre átomos estruturalmente equivalentes da cadeia A e B mostra um rmsd de 0.187 Å distribuídos uniformemente ao longo da cadeia. A flexibilidade estrutural entre as unidades assimétricas foram comparadas em relação aos valores de B-factor das cadeias individualmente. A cadeia A demonstrou valores de 45 $Å^2$ e a cadeia B de 32 $Å^{2.}$ A

análise da distribuição do B-factor para cada resíduo ao longo da sequência da proteína mostrou grandes diferenças encontradas no loop entre β2-βc (compreendendo os resíduos de Thr^{47} a Arg^{58}) e entre βd-α2 (Met^{70} e Asp^{78}) (**Figura** 23). A cadeia A encontra-se desordenada nessa região, em comparação com a cadeia B. Tal distorção é causada pelos contatos do cristal envolvendo a cadeia B que estão ausentes na cadeia A. A estrutura cristalográfica da LbDHODH foi recentemente publicada na Acta Crystallographfica F, em uma edição especial dedicada às doenças negligenciadas.

A superposição dos carbonos α entre as estruturas diméricas de LbDHODH e DHODH de tripanossomatídeos (TrypDHODH) mostraram um rmsd médio de 0,544 Å para LmDHODH (Cordeiro *et al.*, 2012) , 0.625 Å para diidroototato desidrogenase de *Leishmania donovani* (LdDHODH) (PDB ID3C61, dados não publicado), 0,439 Å para diidroorotato desidrogenase de *Trypanosoma brucei* (TbDHODH) (Arakaki *et al.*, 2008), e 0,922 Å para diidroorotato desidrogenase de *Trypanossoma cruzi* cepa Y (TcDHODH_Y) (Pinheiro, Iulek e Nonato, 2008). A mudança entre o núcleo e o barril α/β é mínima, a posição dos resíduos dos sitio ativo são essencialmente os mesmos para todas as estruturas. A alta similaridade encontrada entre as DHDOHs de tripanossomatideos destaca a importância da distribuição química e estérica para a localização e integridade catalítica da enzima dentro desse genêro de parasitas.

A DHODH humana e a DHODH de *Leishmania V. brazilienseis* compartilham cerca de 25% de identidade sequencial e a comparação entre as estruturas mostra um rsmd médio de 1.276 Å considerando a posição do carbono α. Apesar do barril α/β ser bem conservado em ambas, diferentes regiões são notadas. Primeiro, a presença de uma região N-terminal responsável pela associação com a membrana está presente somente na enzima humana (Baumgartner *et al.*, 2006); (Liu *et al.*, 2011) (**Figura** 24). Outra diferença notável é a presença de elementos secundários (βe, βf, βg and η1) localizados no topo do barril e envolvidos na dimerização da LbDHODH, característica das DHODHs 1A. Diferenças relevantes entres as TrypDHODH e HsDHODH foram anteriormente atribuídos aos sítios S1 a S5, os quais são totalmente conservados em todos as DHODHs de tripanossomatideos, inclusive na LbDHODH e são considerados diferentes sítios a serem explorados para planejamento de ligantes (Pinheiro, Emery e Nonato, 2013).

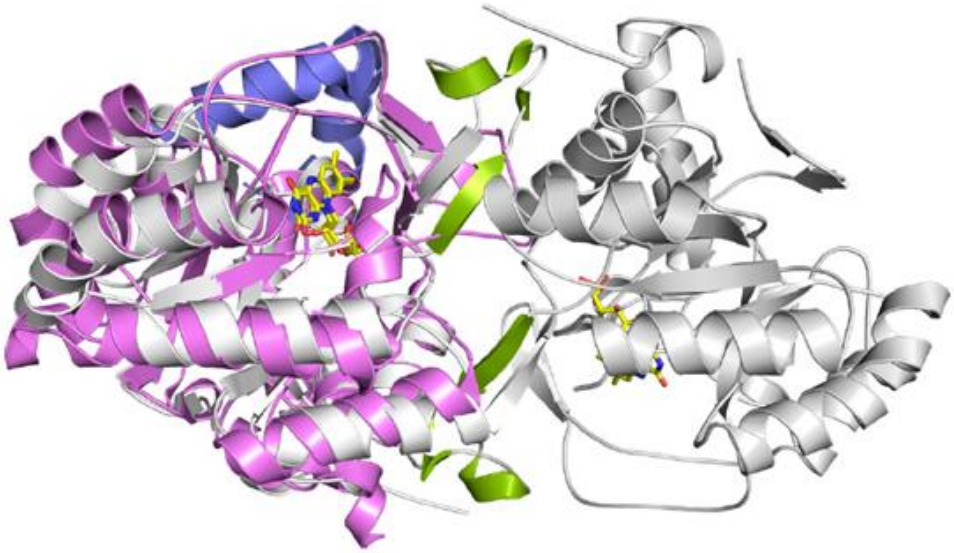


Figura 24. **Superposição entre a HsDHODH (PDB ID 2FPV) e a LbDHODH (PDB ID 4WZH)**. A principal diferença entres as enzimas é a presença de um domino N-terminal (Azul) da HsDHODH, um sitio de interação de membrana presente nas 2 DHODH, além disso os elementos de estrutura secundaria (verde) presente na LbDHDODH confere a interface dimérica da enzima de classe 1A.

4.4.3 Elucidação estrutural do complexo LbDHODH-ORO

A elucidação do complexo LbDHODH-ORO foi resolvida a uma resolução de 1.74 Å. A **Figura** 25 mostra as ligações de hidrogênio entre a molécula de orotato com os resíduos do sítio catalítico da LbDHODH, além disso a disposição do orotato paralelo ao FMN esta relacionada a interação do tipo pi stacking, orotato-FMN.

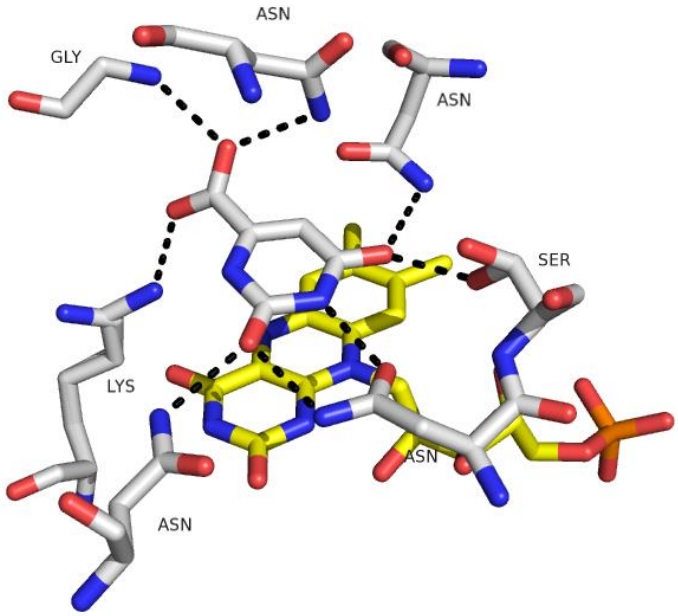


Figura 25. **Representação da interação orotato e o sitio ativo da LbDHODH.** Neste caso é possível observar, através da determinação da estrutura cristalográfica, as interações de hidrogênio entre a molécula de orotato e os resíduos do sítio catalítico além da interação orotato FMN.

A sobreposição das estruturas na ausência de orotato e na sua presença pode ser observada na **Figura** 26. Nas imagens é possível notar que as estruturas com orotato e sem orotato não possuem variações conformacionais significantes, no entanto na estrutura contendo o orotato, o loop catalítico aparece um pouco mais na estrutura com ligante. Isso pode estar correlacionado ao fato do orotato estabilizar a enzima, fazendo com que o loop diminua sua flexibilidade. Assim o orotato não é capaz de modificar estruturalmente a enzima e que o acesso ao stitio ativo é consequência de variações locais.

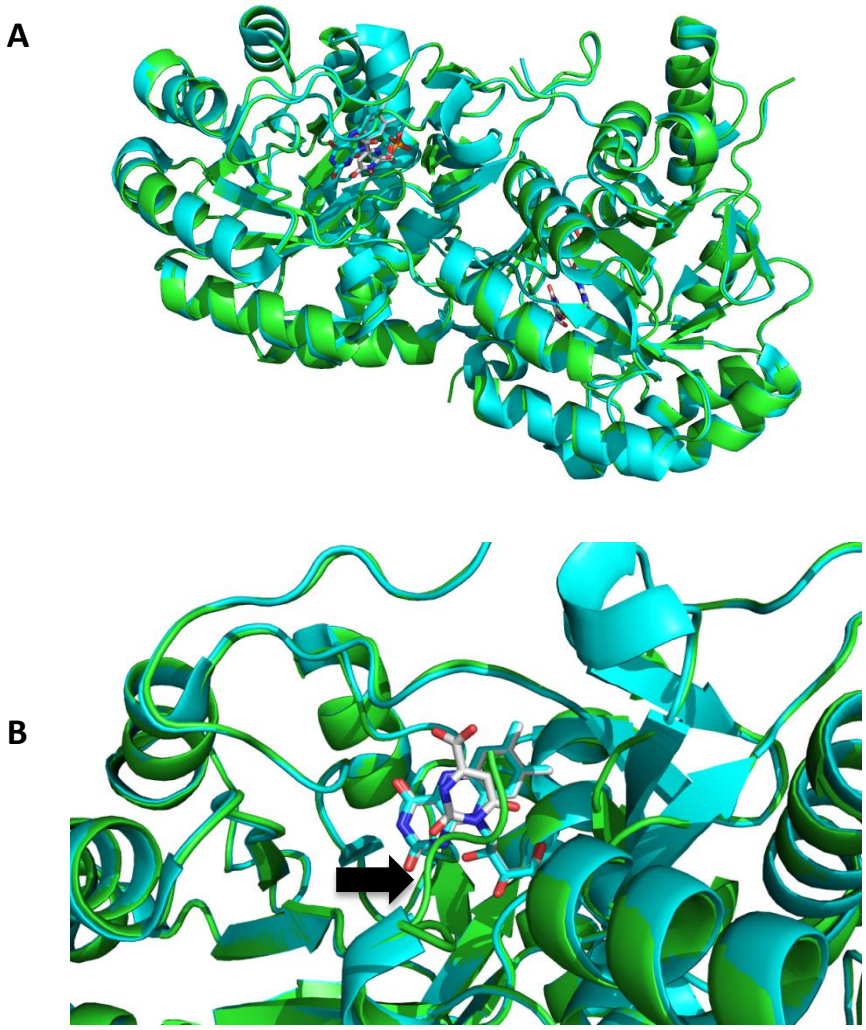


Figura 26. **Sobreposição das estrutura de LbDHODH com e sem orotato**. Em **A** temos a sobreposição dos dímeros da LbDHODH, na presença e na ausência de

orotato, mostrando que não há alterações conformacionais da estrutura enzimática na presença de orotato. Já em **B** é mostrado o sitio ativo das LbDHODH sobreposta e a seta preta mostra um pedaço do loop catalico pode ser vizualizado no complexo LbDHODH-ORO. Em azul é a enzima na ausência do ligante (PDB ID 4WZH) e em verde a enzima complexada ao substrato (estrutura ainda não depositada no PDB).

4.5 *ESTRATÉGIAS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE LIGANTES*

4.5.1 Estratégia I: *In Silico*

Baseado nos resultados de inibição obtidos para o composto LCPVL898 contra a enzima LbDHODH, decidimos por utilizar estratégias *in silico* para a busca de potenciais inibidores análogos ao composto LCPVL898 Para a busca *in silico* optamos por manter o anel triazínico do composto LCPVL 898 variando a sua cadeia alifática introduzindo grupos mais apolares e polares, além de modificações na função tioéter para amina. Na **Figura** 27 está representada a docagem do composto LCPVL898 para o sítio ativo da LbDHODH, onde é possível observar uma interação do tipo *pi stacking* entre o anel triazínico do composto LCPVL 898 com o cofator da LbDHODH, o FMN. Além disso, é possível predizer algumas interações de hidrogênio entre átomos do anel e os resíduos de aminoácidos.

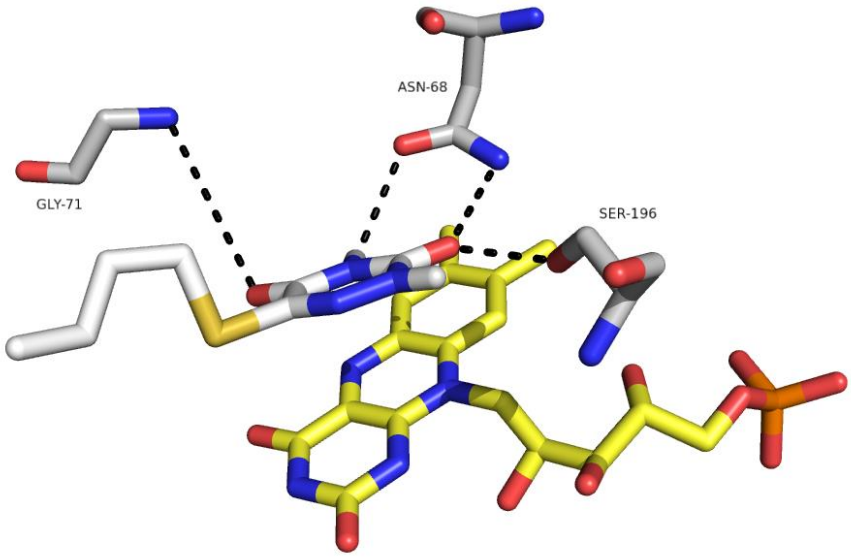


Figura 27. Representação do modo de interação do composto LCPVL898 e o sitio ativo da LbDHODH predito por docagem.

De modo a preservar o tipo de interação da molécula LCPVL 898 com o sitio ativo da LbDHODH, oito moléculas foram docadas variando a cadeia alifática do compostos LCPVL 898 (**Figura** 28).

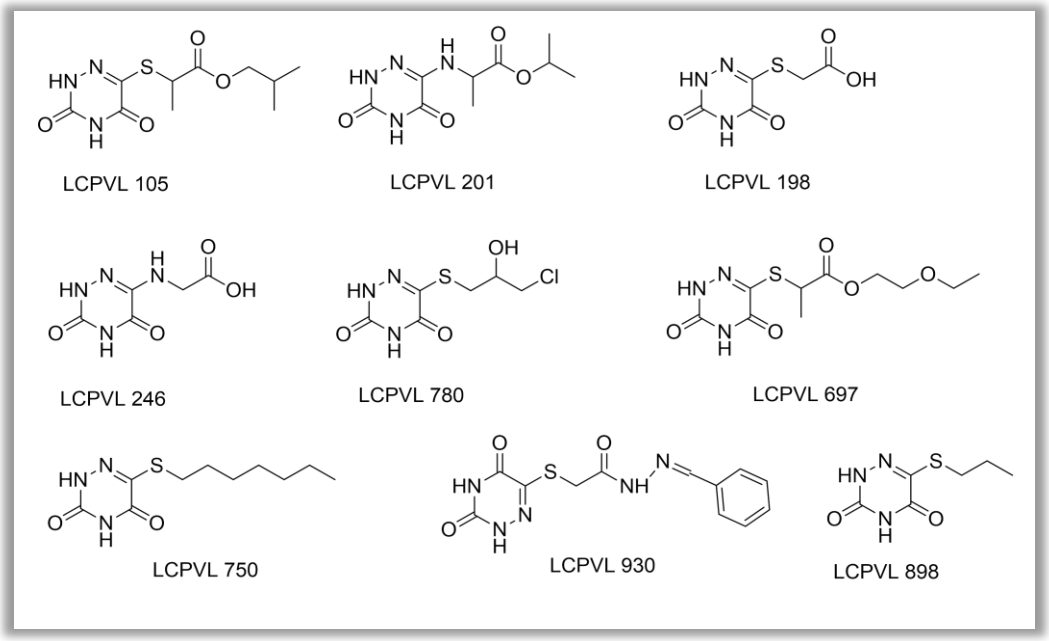


Figura 28. **Compostos que foram docados para o sitio ativo da LbDHODH**. Estes são análogos ao composto LCPVL 898, o qual apresenta ótima taxa de inibição nos ensaios *in vitro* frente a enzima em estudo.

A interação entre o anel triazínico dos compostos docados e o FMN se assemelham muito ao que observamos no composto LCPVL 898, porém algumas interações com outros resíduos de aminoácidos são diferentes, o que pode estar relacionado às diferentes propriedades das cadeias alifática dos derivados triazínicos docados. As figuras a seguir representam o modo de interação dos compostos ensaiados virtualmente. Neste caso, provavelmente, o anel triazínico dos compostos docado faz interações do tipo pi stacking com o FMN da LbDHODH e os resíduos do sitio ativo interagem com a molécula, principalmente por ligações de hidrogênio como é possível observar nas **Figuras** 29 a 36.

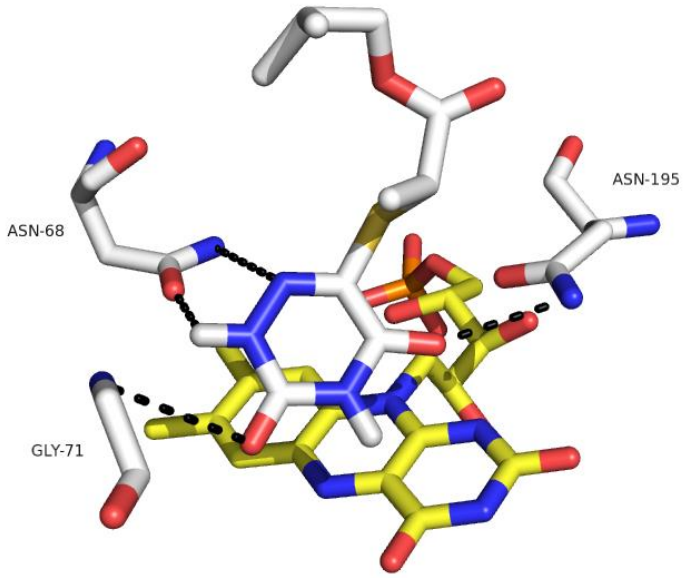


Figura 29. Representação do modo de interação do composto LCPVL105 e o sitio ativo da LbDHODH.

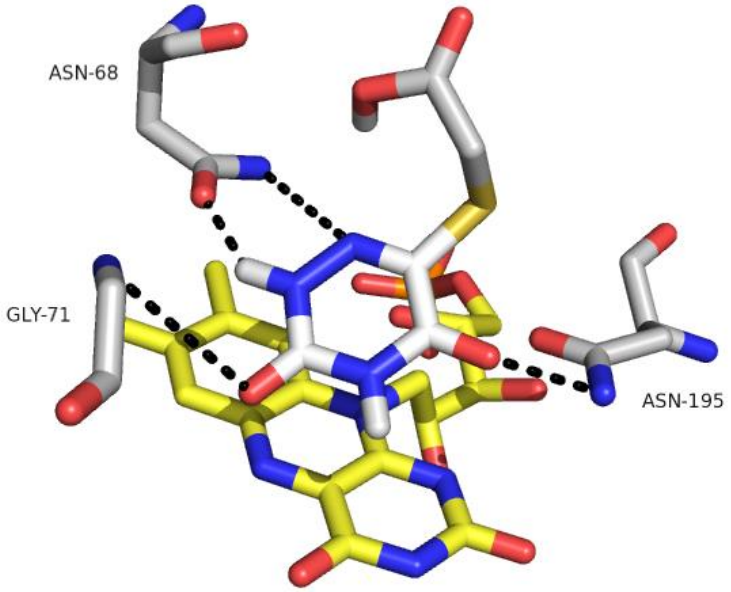


Figura 30. Representação do modo de interação do composto LCPVL198 e o sitio ativo da LbDHODH.

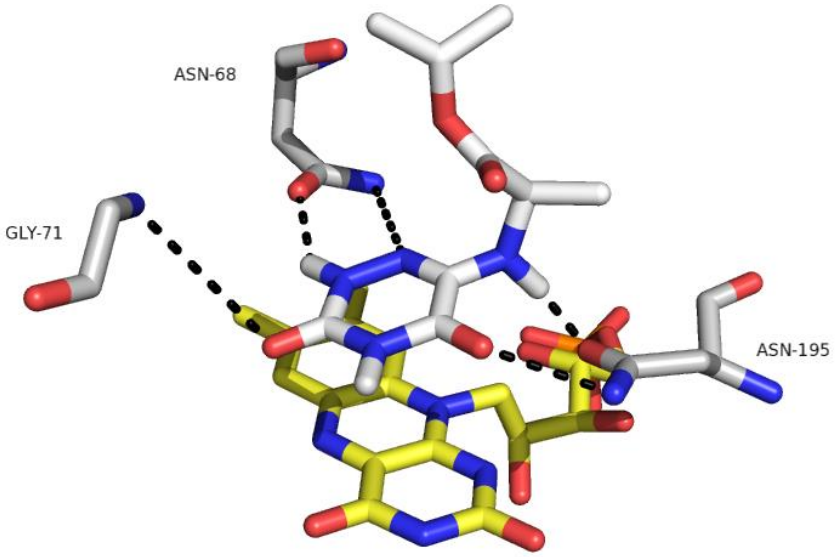


Figura 31. Representação do modo de interação do composto LCPVL201 e o sitio ativo da LbDHODH.

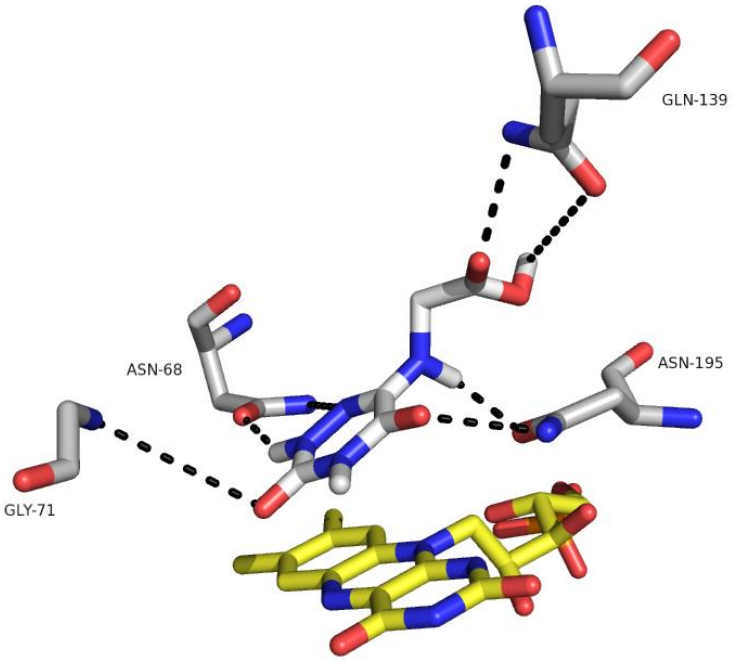


Figura 32. Representação do modo de interação do composto LCPVL246 e o sitio ativo da LbDHODH.

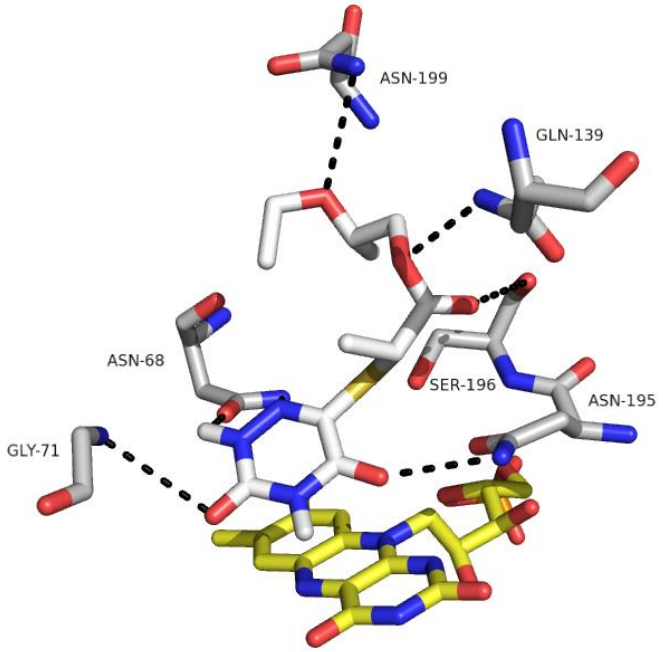


Figura 33. Representação do modo de interação do composto LCPVL697 e o sitio ativo da LbDHODH.

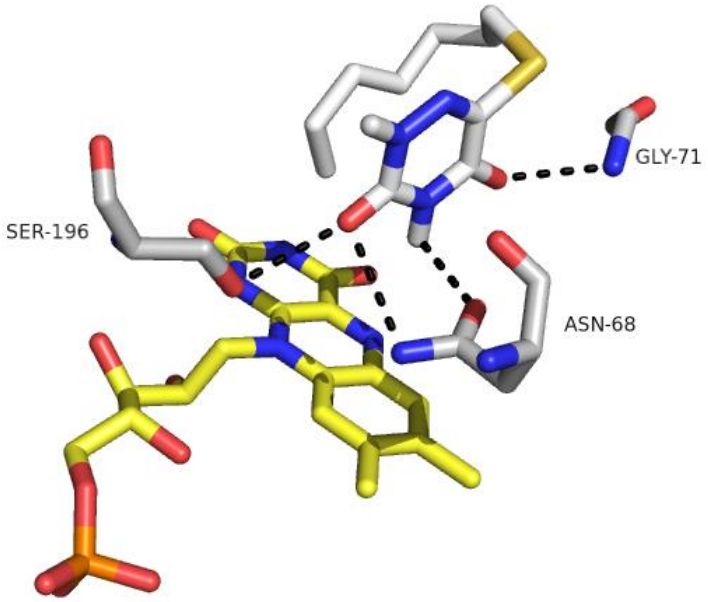


Figura 34. Representação do modo de interação do composto LCPVL750 e o sitio ativo da LbDHODH.

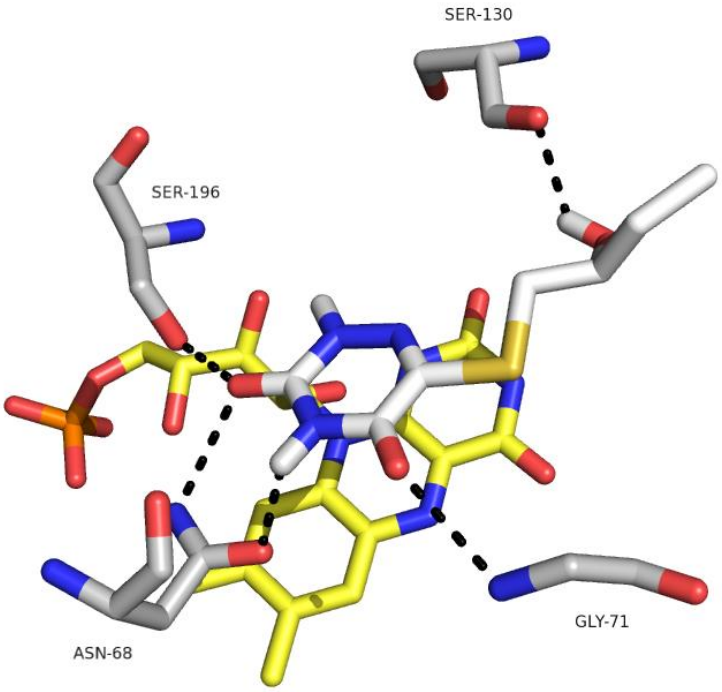


Figura 35. Representação do modo de interação do composto LCPVL780 e o sitio ativo da LbDHODH.

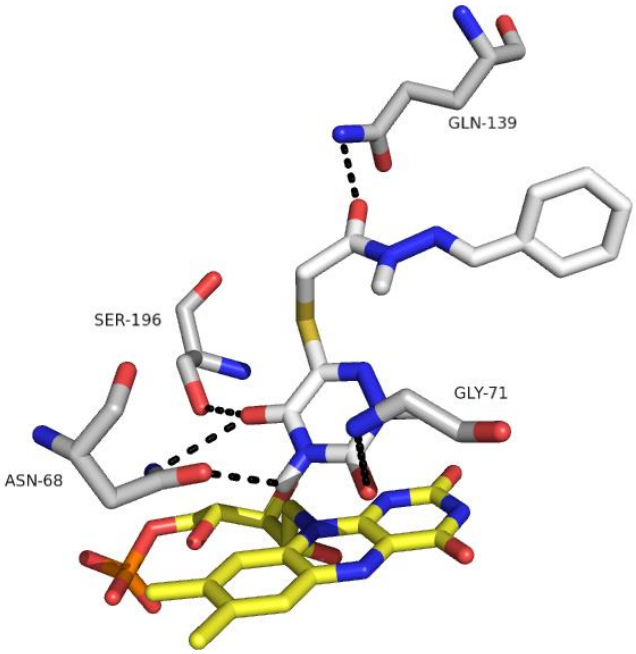
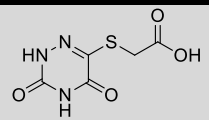
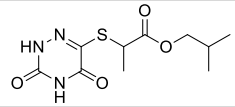
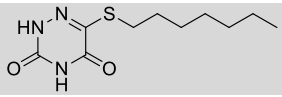
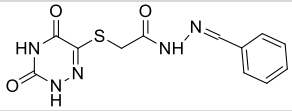
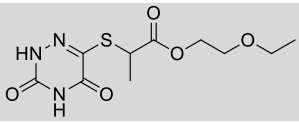
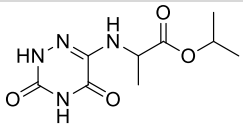
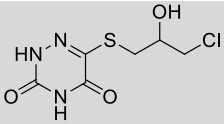
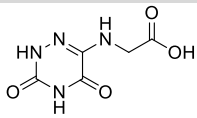


Figura 36. Representação do modo de interação do composto LCPVL930 e o sitio ativo da LbDHODH

4.5.1.1 Avaliação do potencial inibitório enzimático de inibidores encontrados pela estratégia I.

Com relação aos compostos docados os valores de inibição estão resumidos na **Tabela** 3, na qual podemos destacar o composto LCPVL 697, o qual na concentração de 100 µM é capaz de inibir 100% da atividade enzimática da LbDHODH.

Tabela 3. Valores em porcentagem de inibição dos compostos buscados pela estratégia I.

Compostos	Estrutura	Inibição (%)
LCPVL 198		22
LCPVL 105		16
LCPVL 750		8
LCPVL 930		24
LCPVL 697		100
LCPVL 201		4
LCPVL 780		23
LCPVL 246		21

Analisando as taxas de inibição observa-se que a presença de grupos polares como ácidos carboxílicos e álcoois (compostos LCPVL 198, 246 e 780), mesmo com uma cadeia alifática pequena como a do LCPVL 898 diminui a atividade inibitória, além disso, compostos como o LCPVL 105 e 201 que apresentam como cadeia alifática ésteres isobutilíco e isopropilíco, respectivamente, diminuem ainda mais a inibição da enzima LbDHODH.

Com relação aos compostos que possuem a cadeia mais longa há destaque para o composto LCPVL 697, o qual foi capaz de inibir 100% da enzima na concentração testada. Já em relação ao composto LCPVL 750 o aumento da cadeia alifática em quatro carbonos é suficiente para diminuir drasticamente o potencial inibitório, visto que o composto LCPVL 898 apresenta uma cadeia de três carbonos. Por fim a molécula LCPVL 930 apresenta taxas de inibição semelhantes aos compostos LCPVL 198, 780 e 246, o que sugere que a presença de uma cadeia heteroalifática pode estar relacionada com o potencial de atividade, isso fica mais evidente quando comparamos o composto LCPVL 697 e LCPVL 750.

Somente o LCPVL 697 conseguiu apresentar boa taxa de inibição frente a LbDHODH. O IC_{50} calculado para o LCPVL 697 foi de 50 ± 2 µM (**Figura** 37), ficando muito abaixo quando comparado aos compostos LCPSP 3027 e LCPVL 898. Os mesmos compostos foram avaliados para a LmDHODH apresentando valores de inibição semelhantes aos encontrados para a LbDHODH. O LCPVL 697 também foi avaliado frente à HsDHODH, apresentando taxas de inibição na ordem de 7%.

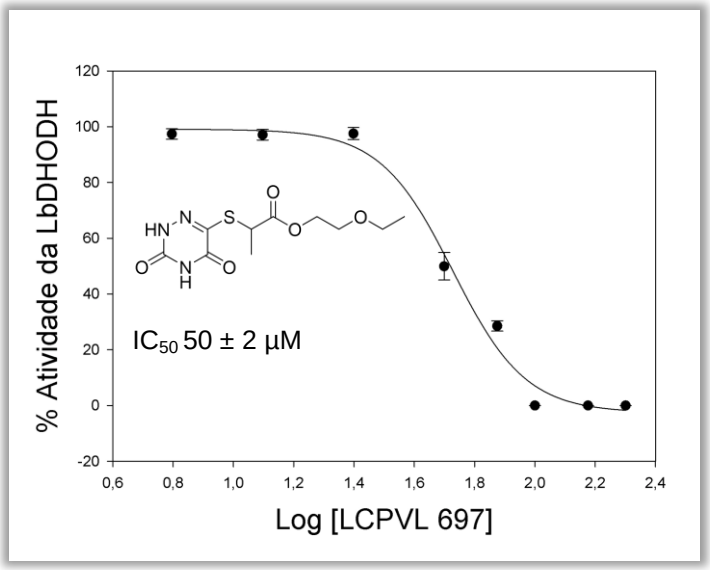


Figura 37. Gráficos da porcentagem de atividade da enzima LbDHODH em função do logaritmo da concentração do composto LCPVL 697.

Apesar do insucesso dos compostos buscados pela estratégia I, estes foram de grande importância para o planejamento de análogos do LCPVL 898, uma vez que esse experimento mostra que o crescimento da cadeia alifática diminui a atividade inibitória. Consideramos a hipótese de que a melhor opção para a criação

dos análogos não seja a alteração da cadeia alifática, mas sim a exploração dos nitrogênios do anel triazinico ou até mesmo a mudança do tipo de anel para pirimidínico, por exemplo.

4.5.1.2 Avalição da citotoxicidade e potencial anti-promastiga e anti-amastigotas de compostos da encontrados na estratégia I.

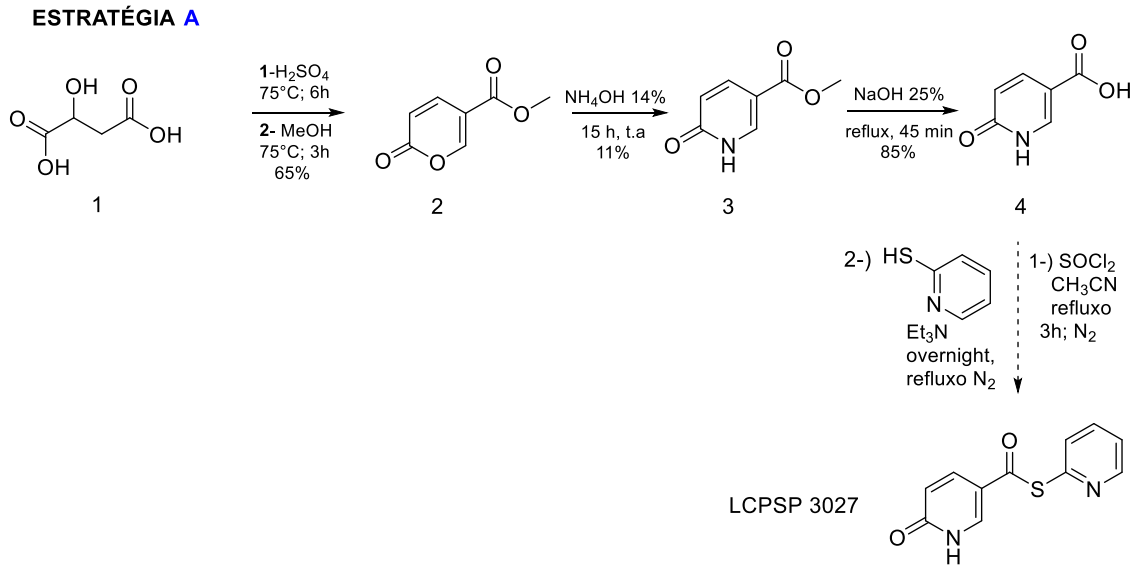
Em relação aos ensaios celulares, o composto LCPVL 697 não apresentou toxicidade frente aos fibroblastos. Nos ensaios em amastigotas apresentou valor de IC_{50} de 65 µM, um valor bem próximo ao IC_{50} determinado para a LbDHODH, o qual foi de 50 µM. Em comparação com a anfotericina B, droga controle do ensaio, o IC_{50} LCPVL 697 é muito elevada, sendo que a anfotericina B apresenta um IC_{50} de 2 µM. Já os ensaios em promastigotas não foi observado taxa de inibição significante para os compostos LCPVL 697. Apesar de apresentar um valor de IC_{50} elevado nos ensaios de amastigotas em comparação a anfotericina b e não apresentar valores significantes de inibição em promastigostas, o LCPVL 697 ainda é um composto interessante visto que o composto foi seletivo para a enzima do parasita e não apresentou citotoxicidade celular. Deste modo, modificações químicas na molécula podem otimizar seu perfil inibitório.

4.5.2 Estratégia II: *in vitro.*

Nas subseções abaixo apresentaremos os resultados obtidos a partir dos métodos de síntese propostos. O protocolo de síntese, como as condições reacionais e estratégias de purificação, além dos dados espectroscópicos de RMN e espectrométricos de Massas de Alta Resolução, que são encontrados na seção **Apêndices** B e C, respectivamente.

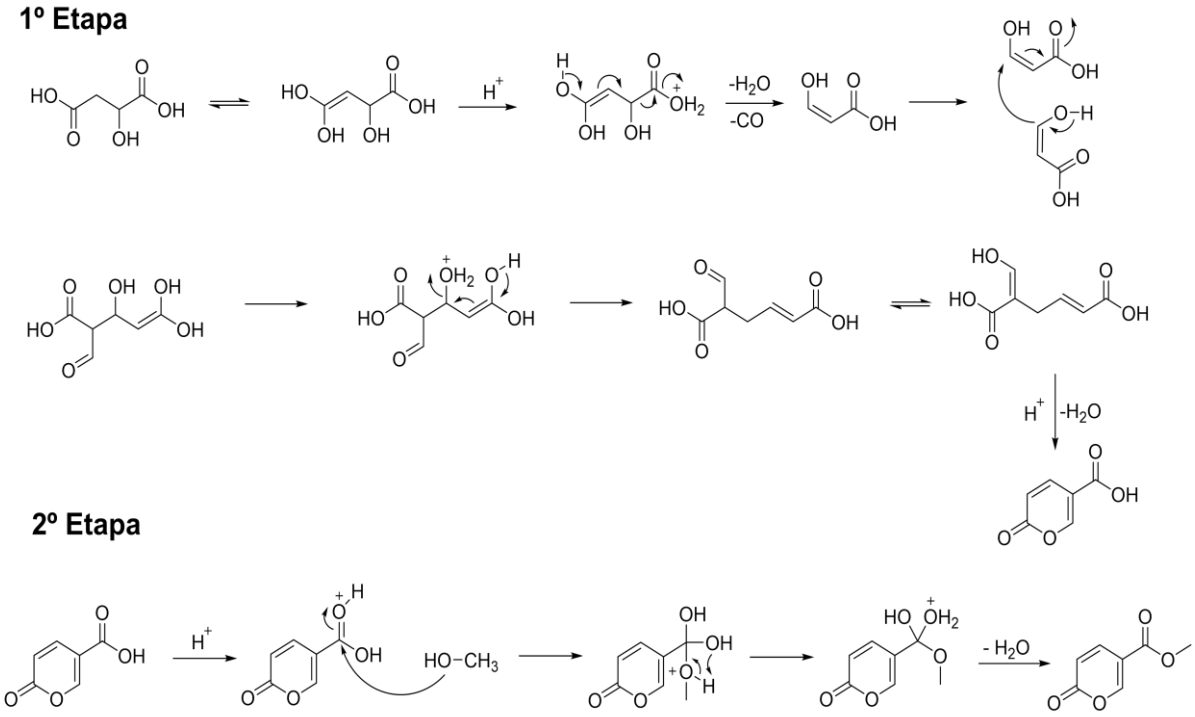
4.5.2.1 Síntese do composto LCPSP 3027 e análogos

Iniciamos a síntese do composto LCPSP 3027 seguindo a estratégia A da metodologia proposta (**Esquema** 6).



Esquema 6. Estratégia A para obtenção do LCPSP 3027.

A obtenção do composto **2** seguiu um processo de heterociclização e esterificação consecutivas. Na primeira etapa, na presença de ácido sulfúrico e aquecimento, o ácido málico sofre autocondenação originando o ácido cumálico. Esse tipo de reação é conhecido como condensação de Pechmann (Daru e Stirling, 2011). Na segunda etapa, o ácido formado na presença de metanol e ácido sulfúrico origina o composto metil-cumalinato (**2**). O **Esquema** 7 mostra o mecanismo proposto para a obtenção de **2**.

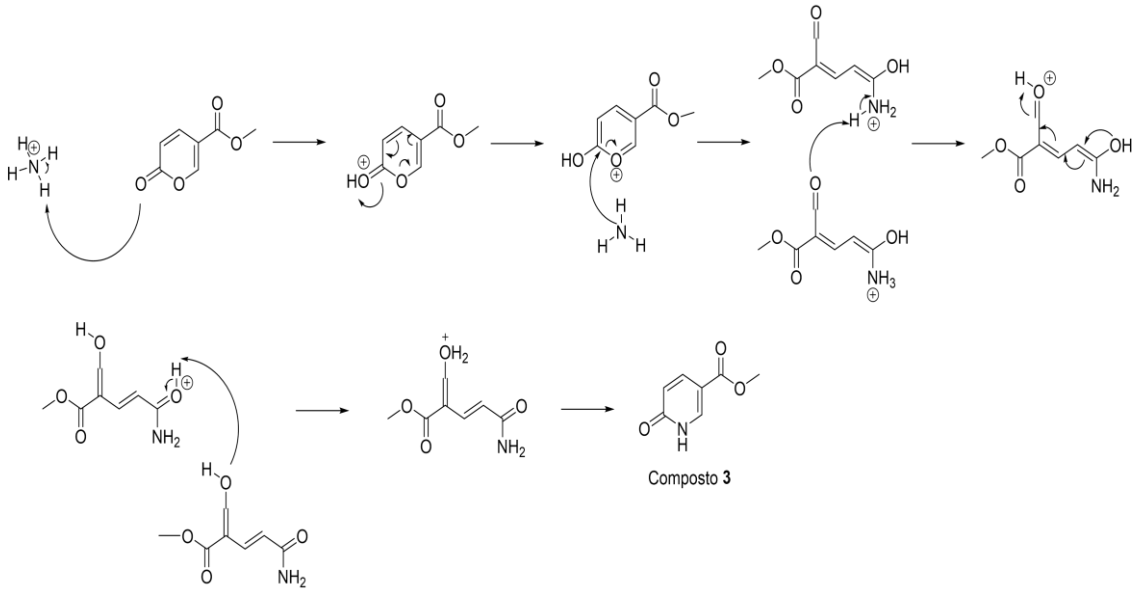


Esquema 7. Mecanismo sugerido para a obtenção do composto metilcumalinato (**2**).

O espectro de RMN de ^{1}H comprova a obtenção do composto **2**, nele é possível observar os deslocamentos dos hidrogênios do anel lactônico em δ 8,29 (s, 1H), δ 7,77 (dd, 1H) δ 6,33 (dd, 1H), além do simpleto em δ 3,86 que corresponde aos três hidrogênios da metila da função éster do composto **2**.

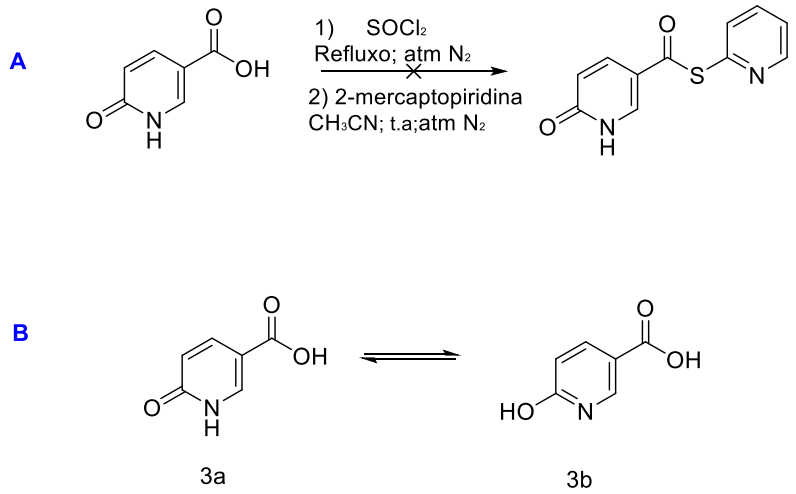
A lactama **3** foi obtida por meio da adição de uma solução 14% de hidróxido de amônio aquoso, porém o rendimento desta etapa foi insatisfatório. Inicialmente, foi sugerido que o baixo rendimento para a obtenção de **3** poderia estar ligado à utilização de hidróxido de amônio, visto que sua dissociação em amônio e hidróxido levasse à hidrólise da lactona em **2**. A fim de comprovar essa hipótese e melhorar o rendimento para a obtenção do composto **3,** à amônia foi gerada *in situ* para formação da lactama No entanto, o rendimento foi de apenas 4%, ainda menor do que o utilizado no método original.

Uma das explicações plausíveis para o baixo rendimento baseia-se no mecanismo proposto para a obtenção da lactâma **3** (**Esquema** 8). Especialmente na etapa de ciclização, que corresponde à formação do anel lactâmico, o nitrogênio da amida não é nucleófílico suficiente para realizar o ataque ao carbono, dificultando a eliminação da água e consequentemente impedindo a ciclização. O composto **3** foi comprovado por métodos de RMN de ^{1}H e ^{13}C além de espectrometria de massas de alta resolução.



Esquema 8. Mecanismo sugerido para o processo de lactamização.

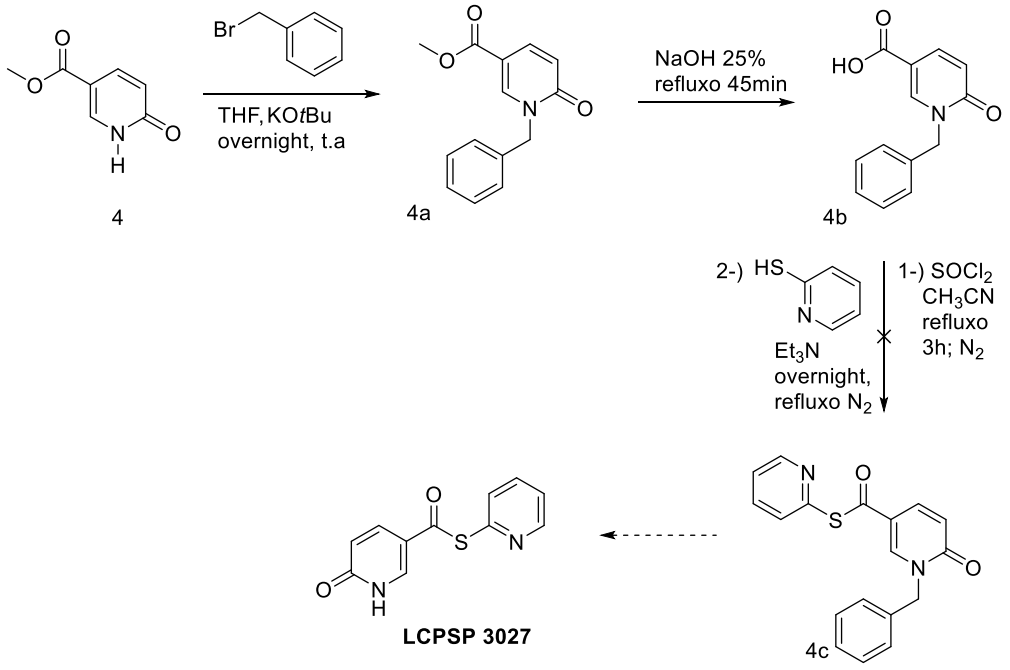
Mesmo com rendimento baixo na etapa anterior, a obtenção do composto **4** (**Esquema** 6) ocorreu por meio da hidrólise do composto **3,** com rendimento de 85%. A condição testada para a formação da molécula LCPSP 3027 envolveu a obtenção de um cloreto de ácido, a partir do composto **4** (Ashworth *et al.*, 2003), para posterior substituição seguida de eliminação utilizando a 2-mercaptopiridina (**Esquema** 9A). O resultado da reação foi uma mistura complexa de produtos, inviabilizando a obtenção do LCPSP 3027. Uma característica peculiar do composto **3** é a presença do efeito tautomérico (**Esquema** 9 B), nesse caso as formas tautoméricas coexistem em um equilíbrio entres as estruturas **3a** e **3b**. Especialmente na forma **3b** a hidroxila fenólica também pode ser substituída pelo cloro, na reação com cloreto de tionila, dificultando assim a síntese do composto de interesse.



Esquema 9. (A) Tentativa de obtenção do tioester. (B) Equilíbrio tautomérico existente no composto **3.**

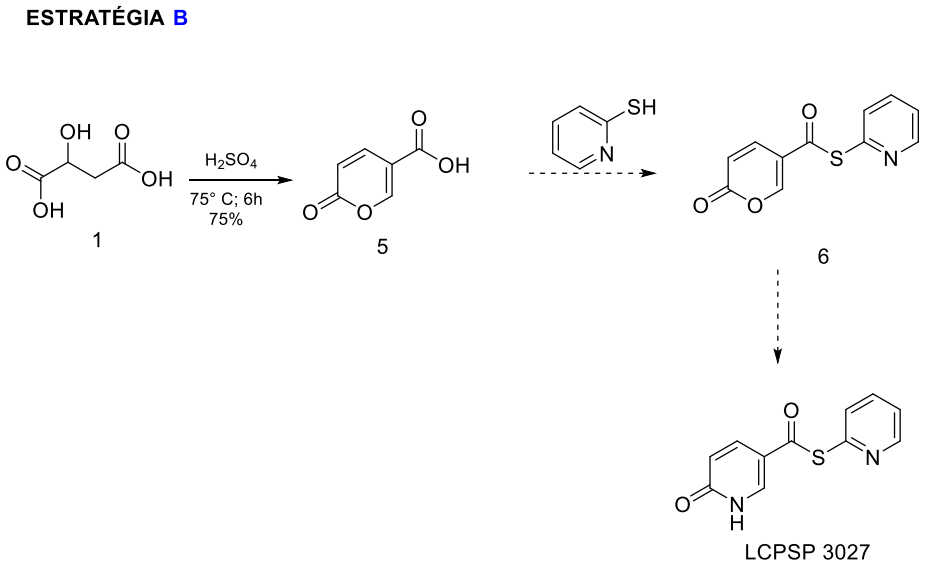
Para evitar o efeito tautomérico indesejável foi proposta uma proteção do nitrogênio do anel lactâmico, conforme esquema abaixo (**Esquema** 10). A proteção ocorreu na presença de brometo de benzila terc-butóxido de potássio, em THF (Tipparaju *et al.*, 2008). A formação do produto **4a** pode ser comprovada por RMN de ^{1}H, onde, além dos hidrogênios do anel lactâmico com deslocamentos de δ 8,18 (d, 1H), δ 7,83 (dd, 1H), δ 6,58 (d, 1H) e δ 3,82 (s, 3H), é possível observar um

multipleto em δ 7,33, que corresponde aos hidrogênios do anel benzênico e um deslocamento em δ 5,16, correspondente a dois hidrogênios do metileno do grupo benzílico. Após a benzilação, o éster foi hidrolisado (Kaminski e Kirsch, 2008), entretanto no passo seguinte, devido à alta insolubilidade do ácido carboxílico frente aos solventes empregados, como acetonitrila e DMF, provavelmente não foi possível obter o cloreto de ácido e consequentemente, não houve a substituição do cloro pela 2-mercaptopirdina.



Esquema 10. Via alternativa abordada para obtenção do LCPSP 3027, evitando o efeito tautomérico.

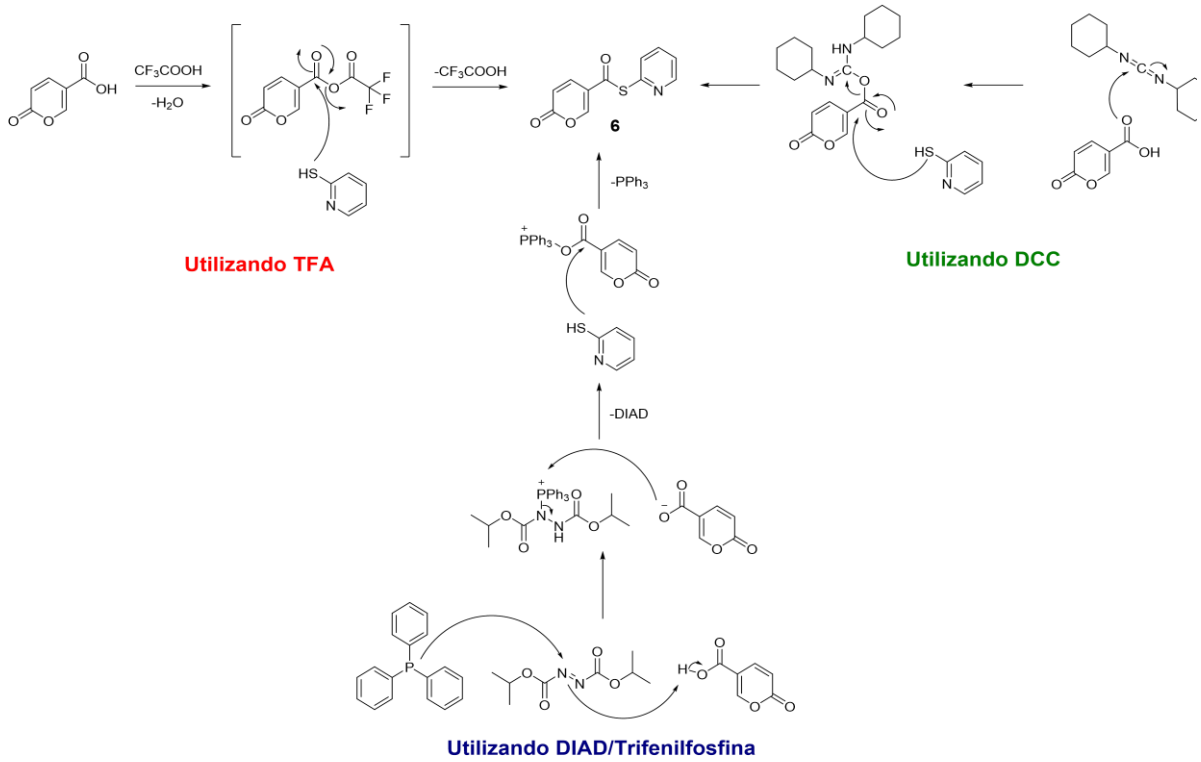
Devido à pequena quantidade obtida do produto **3** para que novas tentativas de tioesterificação pudessem ser realizadas, e também para evitar à formação dos tautomeros, a estratégia B foi proposta (**Esquema** 11). Dessa maneira, foi utilizada uma quantidade maior de produto de partida, além de minimizar o efeito tautomérico que o composto **3** apresenta (**Esquema** 9B).



Esquema 11. Estratégia B visando à obtenção do LCPSP 3027

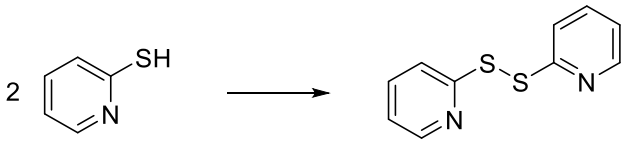
A formação do composto **5** foi realizada com sucesso e com ótimo rendimento, utilizando a mesma metodologia da estratégia A, na qual o ácido málico, na presença de ácido sulfúrico concentrado e aquecimento, sofre autocondensação. A análise de RMN de ^{1}H mostra deslocamentos em δ 8,53 (s, 1H), 7,81 (d, 1H), 6,42 (d, 1H), característicos do anel lactônico, além disso, um deslocamento em δ 13,38 (s, 1H), mostra o simpleto do hidrogênio do ácido carboxílico. Deste modo, o composto **5,** foi submetido ao mesmo método utilizado no **Esquema** 9, utilizando cloreto de tionila para a formação do cloreto de ácido, seguida de substituição com 2-mercaptopiridina. Porém a substituição não é eficaz, visto que há formação de mistura reacional complexa.

Outros métodos empregados para síntese do composto **6** envolveram diciclocarbodimida (DCC) (Royer *et al.*, 2010), ácido trifluoracético (TFA) (El-Azab e Abdel-Aziz, 2012) e diisopropil azodicarboxilato (DIAD) em combinação com trifenilfosfina (Iranpoor *et al.*, 2008), porém em nenhum desses métodos foi observado a formação do produto. Mecanisticamente, os três métodos utilizados consistem em ativar o ácido carboxílico do composto **5** e deste modo, facilitar a tioesterificação. As propostas dos métodos utilizados estão no **Esquema** 12.



Esquema 12. Métodos abordados para a obtenção do tioéster **6** utilizando diferentes reagentes e mecanismos.

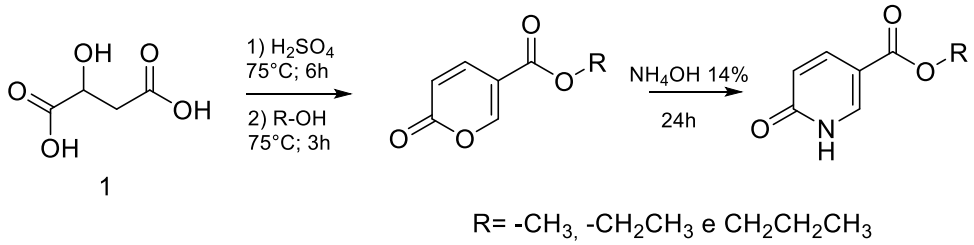
Em todas as metodologias aplicadas, as análises de espectrometria de massas identificava um sinal de massa de 221 g/mol, o que correspondente ao dímero da 2-mercaptopiridina (**Esquema** 13). Apesar de todas as reações na presença de 2-mercaptopiridina terem sido realizadas sob atmosfera inerte, visando evitar a reconhecida formação do dímero, não conseguimos reduzir sua, o qual poder estar relacionado ao nosso insucesso de obter o composto LCPSP 3027.



Esquema 13. Formação do dímero da 2-mercaptopiridina.

Com o intuito de ampliar a abibioteca de compostos disponível para a plataforma planejada, utilizamos os reagentes supracitados para o planejamento de compostos com funções éster e amida, a fim de estudar a influência do grupo

tioéster na inibição enzimática. Para a síntese dos ésteres, o composto **1**, sob condições ácidas e em aquecimento sofre auto condensação, formando o intermediário **5**, o qual através da adição de um álcool, na presença do ácido sulfúrico, sob aquecimento, fornece diversos ésteres dependendo do álcool utilizado. Posteriormente, com a utilização de uma solução de NH_4OH 14% é possível obter o derivado lactâmico dos derivados de ésteres (**Esquema** 14).

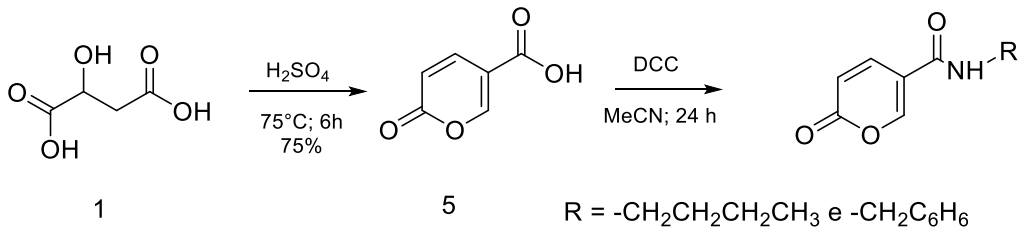


R= $-CH_3$, $-CH_2CH_3$ e $CH_2CH_2CH_3$

Esquema 14. Síntese de ésteres.

A formação dos ésteres foi comprovada por análise de ^1H e ^{13}C RMN e espectrometria de massas de alta resolução. Em relação os derivados lactônicos, no RMN de ^1H é possível observar deslocamentos comuns nas regiões de δ 8,29 (s, 1H), 7,77 (dd,1H) 6,33 (dd, 1H), característicos do anel presente. Além disso, um simpleto em 3.86 (3H) comprova a obtenção do éster metílico. Deslocamentos em δ 4,33 (q, 2H) e 1,35 (t, 3H) comprovam a obtenção do derivado etílico e por último, os deslocamentos δ 4,24 (t, 2H), 1.76 (sex, 2H) e 1,02 (t, 3H) compravam o sucesso na obtenção do derivado propílico. Para os derivados lactâmicos foram sintetizados os ésteres metílicos e etílicos, os quais também foram elucidados pelas técnicas citadas.

Em relação às amidas, o composto **5** é obtido através da autocondensação do composto **1** em condições ácidas. Em seguida para a obtenção das amidas foi utilizando DCC (diciclocarbodimida), um ativador que interagem com a com a carbonila do acido carboxílico do composto **5**, deixando-a mais reativa e susceptível ao ataque nucleófílico pelas aminas (butilamina e benzilamina), formando então as amidas (**Esquema** 15).



Esquema 15. Metodologia de síntese dos derivados de amida.

A comprovação das amidas pode ser feita por ^{1}H RMN, onde os deslocamentos δ 7,89 (s, 1H), 7,44 (*d*,1H), 5,53 (d,1H) são do anel lactônico, já os deslocamentos de δ 3,48 (t, 2H), 1,65 (qt, 2H), 1.40 (st, 2H), 0,97 (t, 3H) correspondem aos deslocamentos da cadeia alifática da amida. Para a amida benzílica, além dos deslocamentos do anel lactônico, observa-se um simpleto em δ 4,67, correspondente aos dois hidrogênios do metileno e um multipleto em 7,36 ppm, referente aos cinco hidrogênios do benzeno. Os ésteres e amidas sintetizados estão representados na **Figura** 38.

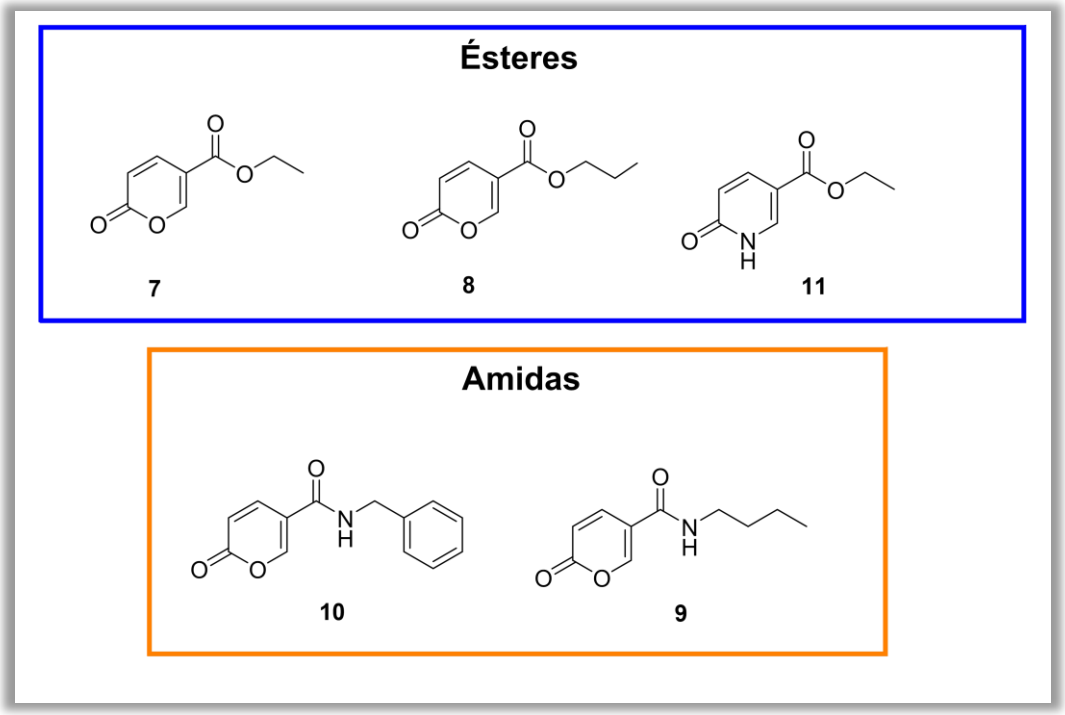
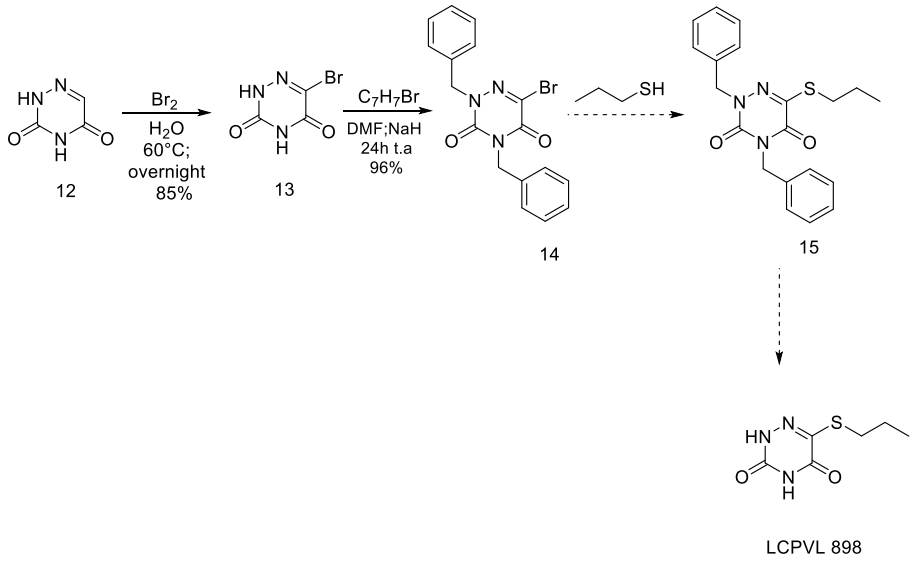


Figura 38. Ésteres e amidas sintetizados.

4.5.2.2 Síntese do composto LCPVL 898

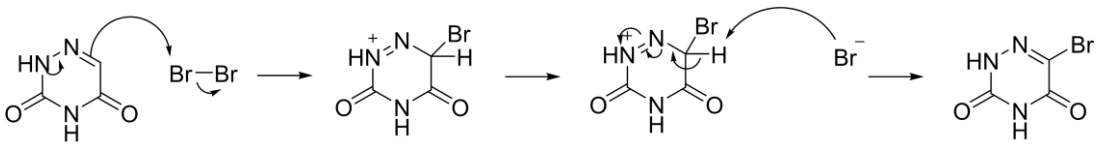
O método abordado para a obtenção do composto LCPVL 898 está resumido no **Esquema** 16. Esta estratégia tem como passos a bromação, seguido de

benzilação, e substituição pelo propanotiol. A obtenção do produto final final envolve uma última etapa de desbenzilação.



Esquema 16. Abordagem sintética para obtenção do composto LCPVL 898

O composto bromado (**13**) foi obtido com sucesso e com excelente rendimento. A proposta mecanística, sugerida para a halogenação do composto **12,** está representada no esquema abaixo.



Esquema 17. Proposta do mecanismo de halogenação do composto **12**

A benzilação dos nitrogênios do composto **13** se faz necessário por dois motivos. O primeiro está relacionado à acidez dos hidrogênios, que na presença de compostos como hidreto de sódio, que age desprotonando o propanotiol, por exemplo, poderiam ser facilmente desprotonados, dificultando a reação de substituição na posição bromada. Além disso, o segundo motivo implica no efeito tautomérico da molécula **13** (**Figura** 39), que em sua forma enólica é mais polar e insolúvel nos solventes empregados para a reação de substituição.

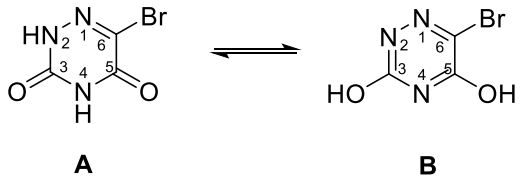


Figura 39. Equilíbrio tautomérico observado no composto **12**. Em **A** a forma cetónica e em **B** a forma enólica.

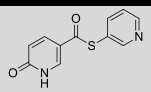
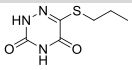
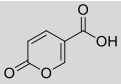
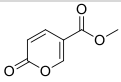
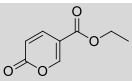
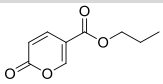
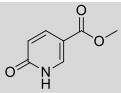
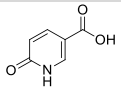
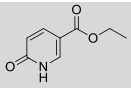
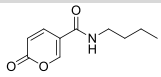
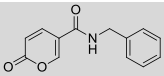
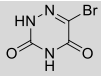
Desta maneira, a proteção dos nitrogênios foi realizada com sucesso e com um excelente rendimento de 96%. A análise de ^{1}H RMN mostra deslocamentos em δ 7,30 (m, 10H), 5,09 (s, 2H) e 4,98 (s, 2H), sendo esses dois últimos os simpletos correspondentes aos hidrogênios dos metilenos. Além disso, o DEPT-135 do ^{13}C RMN mostra dois deslocamentos com sinais negativos em δ 54,80 e 45,41, comprovando a dibenzilação do composto **13**.

Os métodos de substituição utilizando bases fortes, como NaH e NaOH, com o objetivo de desprotonar o propanotiol e assim facilitar a substituição não foram eficazes. Analisando os espectros de ^{13}C-RMN do composto **12** (Apêndice C. XL) e o ^{13}C-RMN do composto **13** (Apêndice C. XXVI), verificamos que o espectro de **12** do carbono 6 do anel triazínico possui um deslocamento de aproximadamente 136ppm, enquanto o carbono 6 do composto **13** apresenta um deslocamento de 129ppm. A diferença dos deslocamentos dos compostos **12** e **13** é referente à introdução do bromo no composto **12** originando a molécula **13** e isso faz com que o carbono 6, que tem um deslocamento mais desblindado, passe a ficar mais blindado e consequentemente mais rico em elétrons o que dificulta a substituição pelos métodos testados. Talvez, a introdução de halogênios mais eletronegativos como cloro e flúor possa reverter este empecilho e facilitar a reação de substituição.

4.5.2.3 Avaliação do potencial inibitório enzimático dos composto sintetizados

A **Tabela** 4 resume os valores de inibição dos compostos analisados pela estratégia sintética. Em uma análise inicial podemos notar quem ambos compostos LCPSP3027 e LCPVL898 comerciais, possuem uma taxa de inibição elevada contra a LbDHODH e semelhante a LmDHODH, validando estes compostos em relação a LbDHODH. Todos os compostos sintetizados estão no **Apêndice** A.

Tabela 4. Valores em porcentagem de inibição dos compostos buscados pela estratégia II.

Compostos	Estrutura	Inibição (%)
LCPSP3027		100
LCPVL 898		100
5		19
2		30
7		42
8		14
3		24
4		18
11		17
9		20
10		17
12		11
13		52

Analisando os compostos sintetizados **5**, **2**, **7** e **8**, estes apresentam em comum o anel lactônico. O crescimento da cadeia alifática iniciando do ácido cumálico **5** passando pelos ésteres **2** e **7** mostra uma taxa de inibição crescente, atingindo o valor máximo de inibição no composto **7** de 42%. No entanto, o crescimento da cadeia alifática para a atividade inibitória limita-se até o composto **7**, já que o éster propílico **8** apresenta uma taxa de inibição de cerca de 14%. As moléculas **3**, **4** e **11** apresentam em comum o anel lactâmico, as quais possuem taxas de inibição inferiores aos seus análogos lactônicos **2** e **7**. Os resultados iniciais do potencial

inibitório dessas pequenas moléculas sugerem que a presença do anel lactonico e de um éster de cadeia alifática pequena contribuem para a atividade inibitória.

As amidas **9** e **10** apresentam taxas de inibição muito baixas e semelhantes aos compostos **8**, **3** e **11**. Em relação às outras moléculas testadas, a Azauracil **12** não apresenta nenhuma inibição significativa, já o composto bromado **13** apresenta uma taxa de inibição de aproximadamente 53%, ambos são intermediários da rota de síntese proposta para o LCPVL 898. O fato do composto **13** apresentar uma atividade relevante mesmo sendo um fragmento, mostra que o crescimento da cadeia alifática na posição 6 do anel triazínico é importante para a atividade inibitória.

Para os compostos LCPVL 898 e LCPSP 3027 foram feitos ensaios de IC_{50} frente a LbDHODH. Esses compostos apresentaram valores de IC_{50} de 5,42 ± 0,09 µM e 4,4 ± 0,32 µM, respectivamente (**Figura** 40). Comparando os valores obtidos para LbDHODH com os obtidos para LmDHODH, observamos que esses compostos se mostram um pouco mais ativos contra a enzima de *Leishmania major,* onde apresentam valores de IC_{50} de 1,66 ± 0,03 µM para o LCPSP 3027 e 2,82 ± 0,02 µM, porém ainda são excelentes inibidores da LbDHODH o que, somado aos prévios estudos de atividade leishmanicida e citotoxicidade, apontam esses compostos como candidatos a fármacos para o tratamento da leishmaniose cutânea

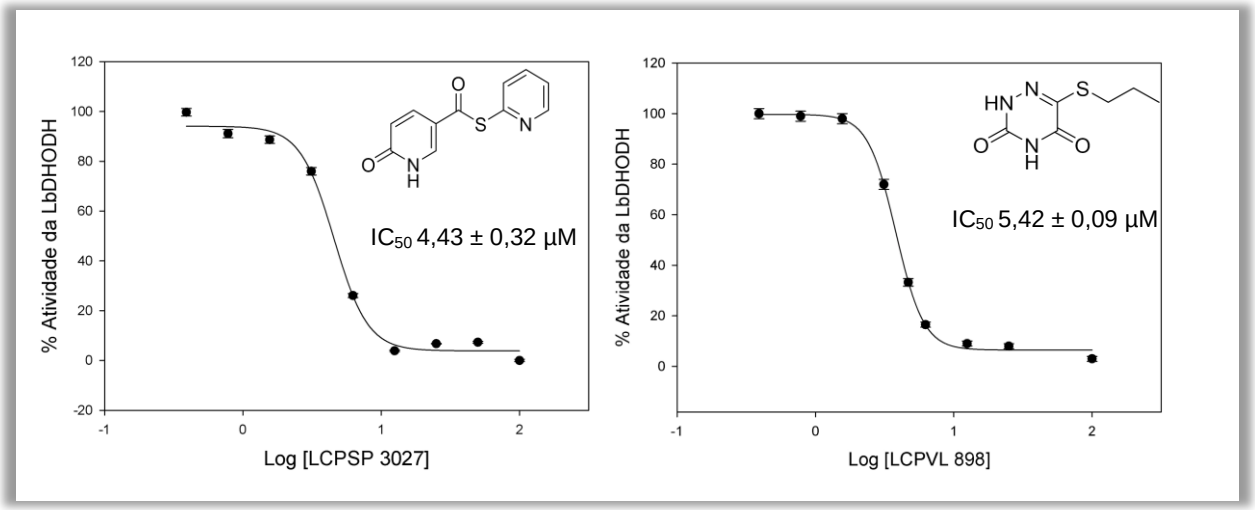


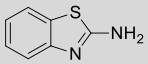
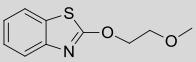
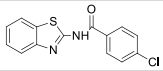
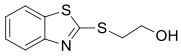
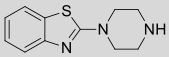
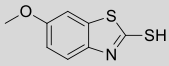
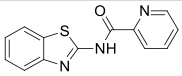
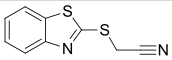
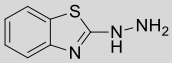
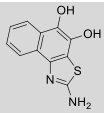
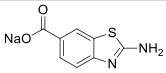
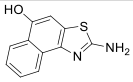
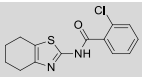
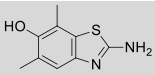
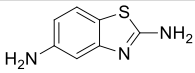
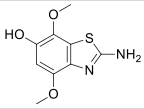
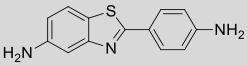
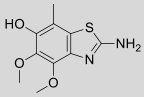
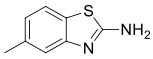
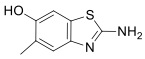
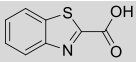
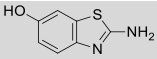
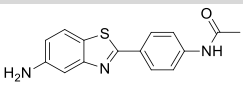
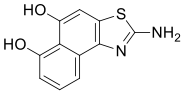
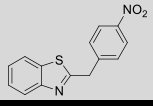
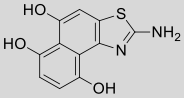
Figura 40. **Gráficos da porcentagem de atividade da enzima LbDHODH em função do logaritmo da concentração de inibidor**. Estes gráficos representam o IC_{50} das moléculas LCPSP 3027 e LCPVL 898, respectivamente.

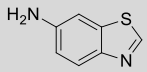
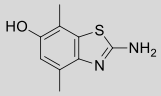
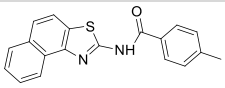
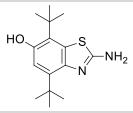
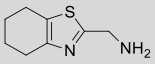
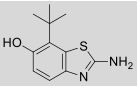
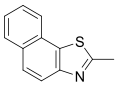
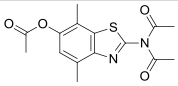
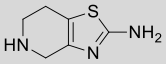
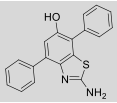
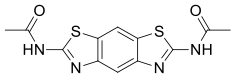
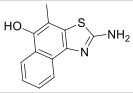
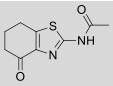
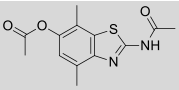
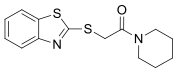
Em relação à enzima humana os valores de inibição do LCPSP 3027 e LCPVL 898 são de 1% e 6 % respectivamente utilizando 100 µM de concentração final, mostrando uma alta seletividade para a enzima do parasita.

4.5.2.4 Avaliação do potencial inibitório enzimático baseado nos fragmentos do núcleo 2-amino benzotiazol

A **Tabela** 5 mostra o potencial inibitório dos fragmentos testados, com grande destaque aos compostos **Tia16**, **Tia18**, **Tia26**, **Tia29**, **Tia30**, **Tia 34 Tia35** e **Tia36** onde na concentração de 100 µM, foram capazes de apresentar uma grande capacidade inibitória frente à enzima.

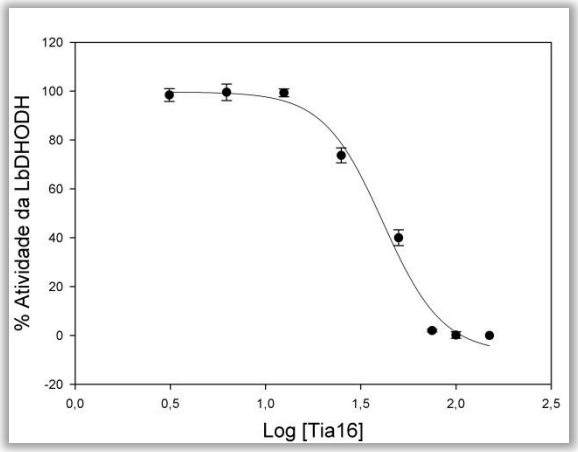
Tabela 5. Valores em porcentagem de inibição dos compostos buscados pela estratégia II por screening de fragmentos.

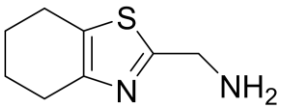
Composto	Estrutura	Inibição(%)	Composto	Estrutura(%)	Inibição(%)
Tia 1		-4	Tia 22		4
Tia 2		-4	Tia 23		2
Tia 3		29	Tia 24		65
Tia 4		1	Tia 25		6
Tia 5		-3	Tia 26		100
Tia 6		5	Tia 27		66
Tia 7		-1	Tia 28		21
Tia 8		-5	Tia 29		100
Tia 9		12	Tia 30		100
Tia 10		-6	Tia 31		100
Tia 11		14	Tia 32		4
Tia 12		10	Tia 33		54
Tia 13		8	Tia 34		78

Composto	Estrutura	Inibição(%)	Composto	Estrutura(%)	Inibição(%)
Tia 14		51	Tia 35		100
Tia 15		9	Tia 36		100
Tia 16		99	Tia 37		6
Tia 17		3	Tia 38		51
Tia 18		84	Tia 39		3
Tia 19		84	Tia 40		4
Tia 20		18	Tia 41		33
Tia 21		19			

Além dos compostos de grande destaque outros fragmentos como o **Tia14**, **Tia24**, **Tia27**, **Tia33** e **Tia38** se destacaram apresentando valores de inibição acima de 50%. No entanto, a obtenção de IC_{50} para estes compostos não foi possível, pois em concentrações mais elevadas estes compostos tendem a precipitar. Isso é uma das limitações do *screening* de fragmentos, pois estes precisam ensaiados em altas concentrações o que induz a precipitação (Scott *et al.*, 2012).

Já em relação aos fragmentos **Tia16**, **Tia18**, **Tia26**, **Tia29**, **Tia30**, **Tia34**, **Tia35** e **Tia 36**, para estes foi possível obter os valores de IC_{50}, os quais estão na representados nas **Figuras** 41 a 48 adiante. Os compostos **Tia16** e **Tia18** da biblioteca de ChemBridge possuem em comum o núcleo tiazol fundido com um anéis diversos: ciclohexano para o **Tia16** e piperidina para o **Tia18**. Ambos possuem valores de IC_{50} semelhantes, porém inferiores aos compostos que apresentam um anel aromático fundido ao 2-aminotiazol, como é o caso dos 2-amino benzotiazois. O 2-amino benzotizol mais simples (**Tia1**), não apresenta atividade inibitória para a LbDHODH, porém alguns derivados hidroxilados presentes na biblioteca do QHetem, possuem taxas de inibição muito interessantes.

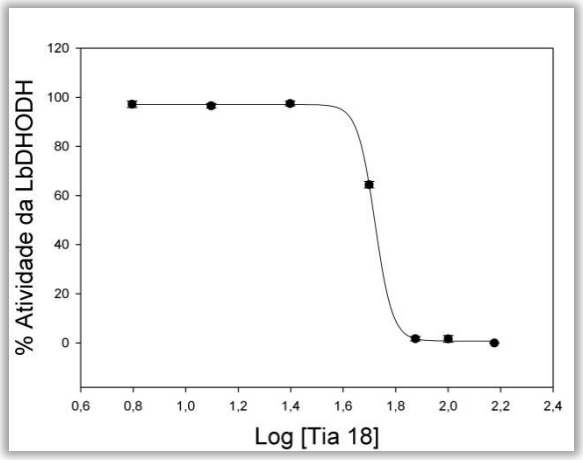


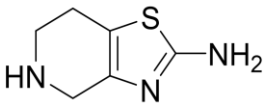


Tia16

IC_{50} 74 ± 3 μM

Figura 41. Gráficos da porcentagem de atividade da enzima LbDHODH em função do logaritmo da concentração do composto Tia16.

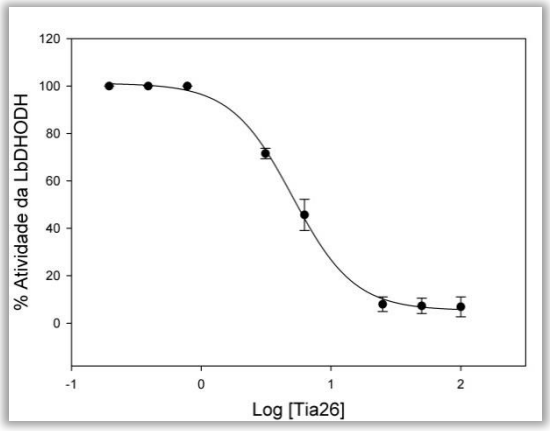


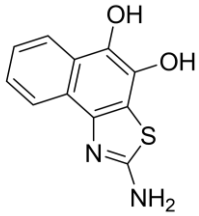


Tia18

IC_{50} 76 ± 2 μM

Figura 42. Gráficos da porcentagem de atividade da enzima LbDHODH em função do logaritmo da concentração do composto Tia18.

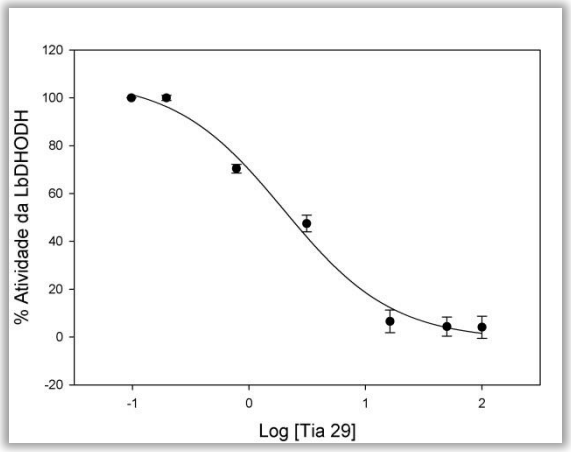


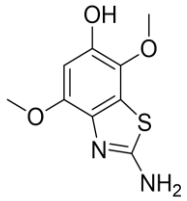


TIA 26

IC_{50} 5,4 ± 0,3 μM

Figura 43. Gráficos da porcentagem de atividade da enzima LbDHODH em função do logaritmo da concentração do composto Tia26.

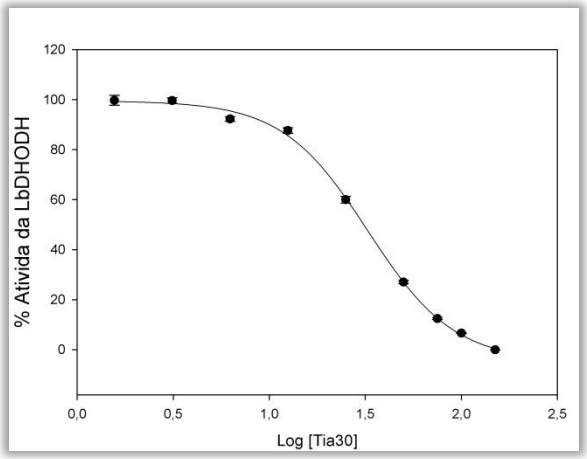


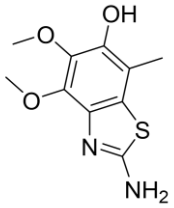


TIA 29

IC_{50} 5,6 ± 0,2 μM

Figura 44. Gráficos da porcentagem de atividade da enzima LbDHODH em função do logaritmo da concentração do composto Tia29.

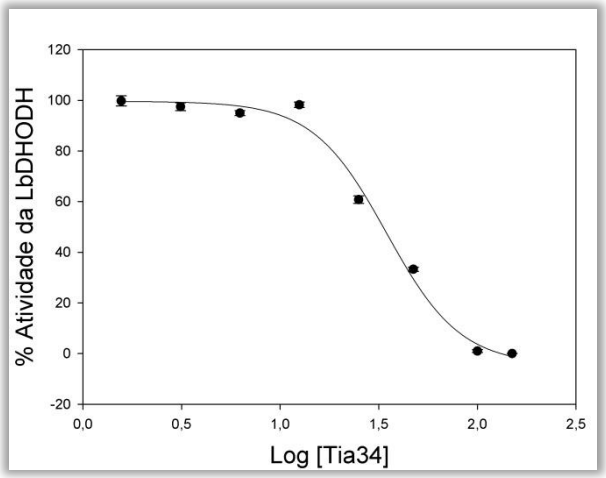


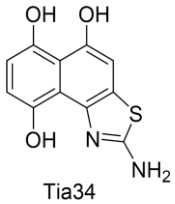


Tia30

IC_{50} 32 ± 2 μM

Figura 45. Gráficos da porcentagem de atividade da enzima LbDHODH em função do logaritmo da concentração do composto Tia30.

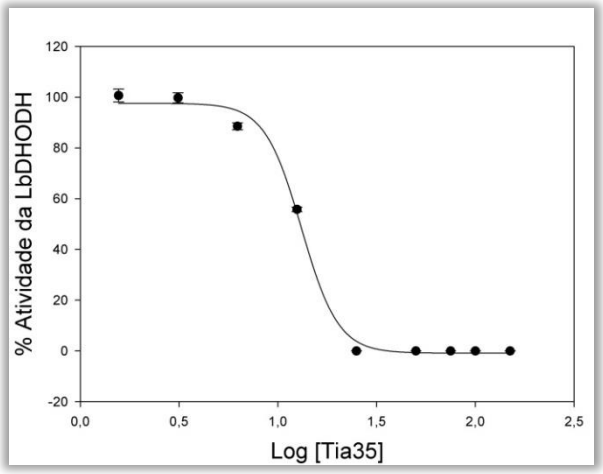


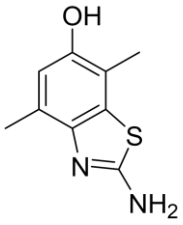


Tia34

IC_{50} 72 ± 4 μM

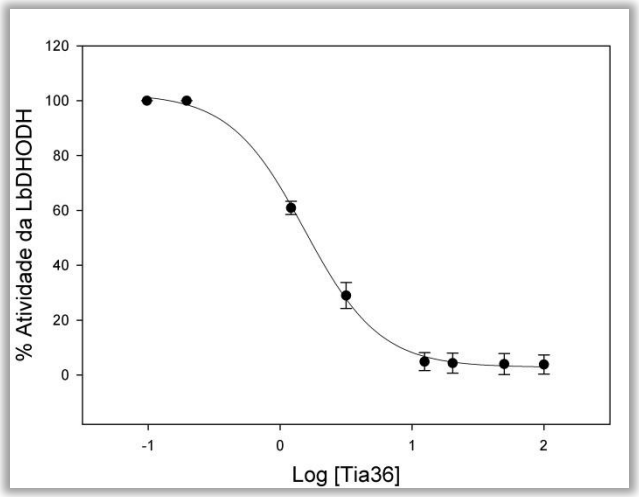
Figura 46. Gráficos da porcentagem de atividade da enzima LbDHODH em função do logaritmo da concentração do composto Tia34.

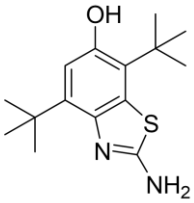




Tia 35
IC_{50} 13 ± 1 μM

Figura 47. Gráficos da porcentagem de atividade da enzima LbDHODH em função do logaritmo da concentração do composto Tia35.





TIA 36
IC_{50} 3,6 ± 0,4 μM

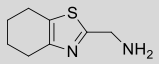
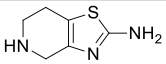
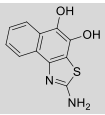
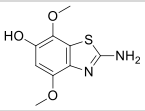
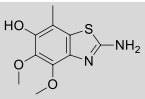
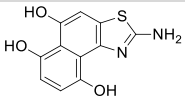
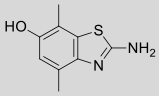
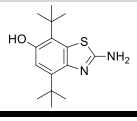
Figura 48. Gráficos da porcentagem de atividade da enzima LbDHODH em função do logaritmo da concentração do composto Tia36.

Os fragmentos **Tia30** e **Tia34** foram os que apresentaram os maiores valores de IC_{50} da biblioteca QHetem, enquanto que os compostos **Tia26**, **Tia29**, **Tia34**,**Tia35** e **Tia36** apresentaram valores de IC_{50} na faixa de 2 a 10 μM próximos aos valores dos compostos LCPSP 3027 e LCPVL 898. A comparação entre os compostos **Tia28** e **Tia35**, indica que o primeiro apresenta o sistema 5,7-dimetila, enquanto o **Tia35** apresenta um sistema do tipo 4,7-dimetila. Como são regioisômeros, esta peculiaridade pode estar relacionada ao fato de um ser mais ativo que o outro, visto que enzimas conseguem distinguir compostos muito semelhantes. Isso explica a mudança drástica na atividade inibitória, como podemos notar na **Tabela** 6. Além disso, as acilações presentes nos composto **Tia38** e **Tia41** acabam por diminuir as taxas de inibição.

Os compostos **Tia36** e **Tia37** apresentam em comum o substituinte tercbutila. Enquanto o fragmento **Tia36** apresenta um sistema 4, 7-ditercbutil, o **Tia37** tem somente um substituinte na posição 7 do núcleo 2- amino benzotiazol. A dissubstituição por sistema tercbutila no composto **Tia36** é de extrema importância para a atividade do fragmento, pois se comparado ao **Tia37,** que possui somente um substituinte tercbutila, a atividade inibitória deste é muito inferior. Esse fato é reforçado pela presença de um sistema 4, 7-dimetil do composto **Tia35**, que possui também uma grande taxa de inibição, além disso, outro fragmento que apresenta atividade inibitória muito interessante, o **Tia29**, possui metoxilas no mesmo sistema que os fragmentos **Tia35** e **Tia36** do núcleo 2-amino benzotiazol. De fato a exploração do sistema 4, 7 substituído para esse tipo de fragmento (2-amino benzotiazol) representa um caminho na busca de compostos líderes.

No entanto, o composto **Tia39** apresenta um sistema 4,7-dibenzila, no qual não é verificado uma taxa de inibição satisfatória, nos levando a crer que esse tipo de substituição é importante para a atividade, como já discutido anteriormente, porém o fato de apresentar dois grupos muito volumosos pode acabar influenciando na diminuição da taxa de inibição. Por fim, os fragmentos mais promissores foram avaliados frente à HsDHODH para avaliar a seletividade para a enzima do parasita. Os dados estão compilados na **Tabela** 6.

Tabela 6. Valores em porcentagem de inibição dos compostos avaliado contra a HsDHODH

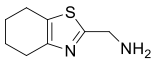
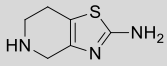
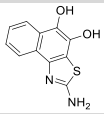
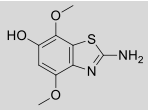
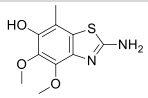
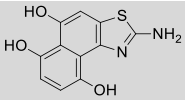
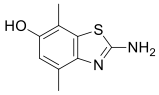
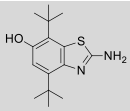
Compostos	Estrutura	Inibição (%)
Tia 16		8
Tia 18		7
Tia 26		1
Tia29		3
Tia 30		9
Tia 34		4
Tia 35		4
Tia 36		2

Apesar de alguns autores classificarem os 2-amino benzotiazois e os aminotiazois como PAINS (*Pan Assay Interference Compounds*) devido sua promiscuidade, pois são compostos que podem interferir em métodos de *screning* utilizados gerando falsos positivos além de apresentarem atividade inibitória perante varias enzimas de diferentes classes. (Devine *et al.*, 2015). Testes com outras enzimas como a HsDHODH e a PfDHODH mostraram que os 2-amino benzotiazois não foram ativos, nos dando segurança aos resultados obtidos contra a LbDHODH.

4.5.2.5 Avaliação da citotoxicidade e do potencial anti-promastigo e anti-amastigota dos fragmentos derivados do núcleo 2-amino benzotiazol.

Os fragmentos ensaiados em células, juntamente com o controle positivo (anfotericina B), tem suas taxas de inibição em promastigotas e amastigotas representados na **Tabela** 7. Os fragmentos selecionados para os testes celulares não demostraram citotoxicidade frente aos fibroblastos.

Tabela 7. **Resultado dos ensaios anti-promastigota e anti-amastigota**. O perfil inibitório foi estimado pela determinação do IC_{50}.

Fragmentos	Estrutura	IC_{50} promastigota (µM)	IC_{50} amastigota (µM)
Anfotericina B	-	4	2
Tia 16		-	48
Tia 18		-	-
Tia 26		12	97
Tia 29		48	68
Tia 30		-	-
Tia 34		-	-
Tia 35		-	-
Tia 36		79	128

Apesar de serem pequenas moléculas, os fragmentos **Tia26**, **Tia29** e **Tia 36** demonstraram um grande potencial inibitório, tanto em relação às promastigotas quanto em relação às amastigotas. Apesar de serem fragmentos mostram uma taxa de inibição grande e que o processo de crescimento dos fragmentos pode não somente aumentar sua taxa de inibição como otimizar suas propriedades físico-químicas. Além disso, o fragmento **Tia 16** apresentou taxa de inibição de 48 µM em relação às asmastigotas, assim como o composto LCPVL 697, buscado *in silico*, apresentou valores de IC_{50} próximos ao encontrado na enzima (74 ± 3 µM).

Essas quatro moléculas, apesarem de serem fragmentos tem uma grande atividade leishmanicida, sendo que além de inibirem seletivamente a enzima LbDHODH, não são citotóxicos e são eficazes nas formas em que o parasito da leishmania se apresentam. Deste modo, a exploração de suas características físico-química bem como o crescimento dos fragmentos pode levar a compostos mais otimizados em relação a sua atividade anti-leishmanicida.

4.5.3 Compostos cedidos por colaboradores

Os compostos de diferentes grupos de pesquisadores foram avaliados em relação à LbDHODH. Os valores de inibição estão representados na **Figura** 49. Os compostos abaixo apresentaram porcentagem de inibição baixa, os quais não foram aproveitados para estudos mais específicos, como co-cristalização e ensaios celulares.

SINTÉTICO

Stuart L.Schreiber (Broad Institute)

Composto	Atividade	Inibição
A01	98 ± 1	2
A02	95 ± 2	5
A03	97 ± 1	3
A04	82 ± 1	18
A05	76 ± 2	24
A06	87 ± 3	13
B01	100 ± 3	-4
B04	80 ± 1	20
B05	90 ± 5	10
B06	86 ± 1	14
C01	92 ± 1	8

Flavio Emery (QHTEM)

Composto	Atividade	Inibição
MSFQ01	105 ± 1	-5
MTG015	95 ± 2	5
MTG024	90 ± 2	10
MTG025	82 ± 2	18
MTG027	80 ± 2	20
QHM61	94 ± 1	6
QHM52	77 ± 3	23
QHM63	71 ± 3	29
QHM71	69 ± 2	31
QXOBENZ	78 ± 3	22
QXONMA	97 ± 4	3
ff175	97 ± 2	3
ff159	96 ± 1	4
140A	100 ± 2	0
140B	85 ± 1	15

Nubia Boechat (Farmanguinhos)

Composto	Atividade	Inibição
PMPL02	78 ± 1	22
PMPL03	108 ± 1	-8
MEFLORQ	86 ± 1	14
CLOROQ	84 ± 2	16

Dr. Mauro Almeida (UFJF)

Composto	Atividade	Inibição
ALB 22	104 ± 2	-4
ALB30	91 ± 1	9
ALB 32	82 ± 3	18
ALB 34	97 ± 1	3
ALB 37	95 ± 3	5
ALB 48	94 ± 3	6
ALB 50	88 ± 2	12
ALB 51	95 ± 2	5
ALB 52	95 ± 4	5
ALB 53	97 ± 1	3
ALB 54	87 ± 3	13
ANG 13	94 ± 2	6
ANG 14	98 ± 4	2
ANG 46	100 ± 2	0
APP 17	92 ± 2	8
BRU06	96 ± 2	4
BRU 10 HI	105 ± 1	-5
BRU 10 DE	92 ± 1	8
BRU 11E	85 ± 1	15
BRU 11D	96 ± 2	4
BRU 31	100 ± 3	0
BRU 32	81 ± 2	19
BRU 45	96 ± 5	4
BRU 44	90 ± 2	10

Thomas J. Schmidt (Universidade de Munster)

Composto	Atividade	Inibição
.ENALIN-ACE	94 ± 1	6
methyfumer	95 ± 1	5
Mexicanin 1	94 ± 2	6

Vanessa Leiria Campos (FCFRP)

Composto	Atividade	Inibição
1	97 ± 1	3
2	93 ± 2	7
3	94 ± 1	6

Giuliano Cesar Clososki (NPPNS)

Composto	Atividade	Inibição
1	86 ± 8	14
2	101 ± 5	-1
3	81 ± 4	19
4	69 ± 3	31
5	95 ± 3	5
6	84 ± 5	16
7	97 ± 5	3
8	99 ± 4	1
9	111 ± 4	-12
10	75 ± 5	26
11	93 ± 2	7
12	88 ± 6	16
13	76 ± 2	24
14	112 ± 3	-12
15	100 ± 2	0
16	100 ± 4	0
17	117 ± 3	-17
18	104 ± 5	-4
20	99 ± 3	1
21	94 ± 3	6
22	111 ± 3	-11
23	107 ± 4	-7
24	100 ± 3	0
25	91 ± 3	9
26	84 ± 3	16
28	83 ± 2	17
29	80 ± 3	20

PRODUTOS NATURAIS

Norberto Peporine Lopes (NPPNS)

Composto	Atividade	Inibição
ALV75_0	98 ± 3	2
Licarina_0	100 ± 3	0
FT-23_0	98 ± 4	2
Grandisina_0	96 ± 2	4
ALY 121_0	72 ± 2	28
ALV 75_10	109 ± 3	-9
Licarina_10	95 ± 4	5
FT-23_10	103 ± 2	-3
Gandisina_10	90 ± 2	10
ALY 121_10	92 ± 1	8

Figura 49. Compostos de origem sintética e natural avaliados contra a LbDHODH

5. CONCLUSÃO

A enzima diidroorotato desidrogenase (DHODH) está presente em diversos organismos como bactérias, protozoários e em humanos e tem papel fundamental na *via de novo* de síntese de nucleotídeos de pirimidina. A DHODH atua no quarto passo dessa via e que tem a função catalisar a conversão do diidroorotato em orotato. A literatura mostra que a inibição específica dessa enzima, é capaz de inibir toda a rota *de novo* de biossíntese de nucleotídeos de pirimidina (**Esquema** 1). Além disso, organismos/células que dependam exclusivamente da via *de novo* ou aquelas em que a via de salvação não é suficiente para suprir a necessidade de produção de pirimidinas, se mostram susceptíveis a inibição específica da enzima DHODH. Dada a relevância dessa via metabólica, a DHODH tem sido explorada como alvo para fármacos para o tratamento de diferentes doenças. Inibidores da DHODH humana já são corriqueiramente utilizados para o tratamento de artrite reumatoide (Prakash e Jarvis, 1999). Além disso, novos inibidores da DHODH humana já encontram-se em fase 3 de testes clínicos para o tratamento do câncer. A enzima DHODH de *Plasmodium falcipurum* foi validada como alvo para o tratamento da malária (Ittarat *et al.*, 1995) e vários compostos que apresentam inibição seletiva estão em fase final de desenvolvimento (Booker *et al.*, 2009).

Dado o grande potencial terapêutico da DHODH em diferentes organismos, nosso laboratório tem devotado grandes esforços na avaliação dessa enzima como alvo para o tratamento de doenças tropicais negligenciadas.

Dentre essas doenças encontram-se as leishmanioses do tipo cutânea e muco-cutânea, um grave problema de saúde pública no Brasil, cujas formas de terapias ainda são limitadas, de baixa eficácia, altamente tóxicas e de baixa adesão por parte dos pacientes. Existe uma grande necessidade em se buscar novas formas de tratamento para a leishmaniose, de forma a combater de forma eficaz os grandes prejuízos pessoais e sociais que a doença provoca.

Neste sentido, esse trabalho teve como proposta a construção de uma plataforma para identificação de ligantes seletivos para a enzima DHODH de *Leishmania (Vianina) braziliensis,* espécie de *Leishmania* causadora da leishmaniose cutânea e muco-cutânea. O trabalho se iniciou com a produção da enzima na forma heteróloga e o desenvolvimento do protocolo de purificação. A proteína LbDHODH é expressa em *Escherichia coli* em fusão com uma cauda de 6

histidinas na região N-terminal, que foi utilizada para desenvolvermos com sucesso o protocolo de purificação através do uso de coluna de afinidade por Ni^{2+}.

Previamente aos estudos inibitórios, a enzima LbDHODH foi caracterizada através de estudos de cinética enzimática e de termoestabilidade. Posteriormente, conseguimos caracterizar a enzima do ponto de vista cinético, crucial para a identificação de identificação de ligantes. Em nossos estudos, os dados cinéticos obtidos foram ajustados em um modelo de cinética enzimática do tipo ping-pong, onde a primeira etapa da reação, etapa redutiva de conversão de diidroorotato em orotato, obedece o modelo cooperativo de catálise. O coeficiente de Hill varia de acordo com a concentração do segundo substrato, fumarato, e atinge o valor de 2 em concentrações saturantes. Esses resultados, somados aos nossos estudos prévios realizados com a enzima LmDHODH (REIS, R.A.G, *et al* 2015) e estudos realizados com a proteína homóloga de *Lactococcus lactis*, sugerem um papel importante na forma dimérica, e na "conversa" entre os monômeros. Estudos mais detalhados acerca do mecanismo das DHODHs de class 1A já se encontram em andamento no laboratório.

Realizamos também a caracterização quanto à estabilidade térmica da proteína utilizando a técnica de termofluor. As diferenças quanto á temperatura de desenovelamento da proteína na forma livre e na presença de ligantes estimadas por diferentes fluoróforos, sypro *Orange* (Cummings, Farnum e Nelen, 2006) e o próprio FMN (Padua *et al.*, 2014), sugere que o mecanismo de exposição do FMN e do sypro são distintos e podem também ser utilizados para avaliar o mecanismo inibitório de ligantes da proteína.

Paralelo à caracterização cinética, procedemos aos ensaios de caracterização estrutural, no qual fomos capazes de elucidar a estrutura da LbDHODH por difração de raios- X a uma resolução de 2.12 Å. Os ensaios de cristalização são reprodutíveis, e a determinação da estrutura cristalográfica da LbDHODH em complexo com orotato a 1.76 Å através do uso de técnicas de co-cristalização nos permite considerar que a determinação da estrutura cristalográfica com diferentes ligantes pode ser também uma estratégia a ser utilizada para a caracterização do mecanismo de inibição dos diferentes ligantes e/ou inibidores identificados.

Os estudos de caracterização cinética e de termoestabilidade nos permitiram propor experimentos para a identificação de ligantes da LbDHODH. A molécula de orotato, inibidor natural da enzima, foi então avaliado frente aos dois ensaios. Através dos ensaios de inibição enzimática na presença dos dois substratos em concentrações saturantes foi possível determinar a potência de inibição através do calculo de IC_{50}. Os ensaios utilizando a técnica de TermoFMN também se mostrou sensível à presença do ligante, permitindo a obtenção de uma curva dose-reposta.

Considerando que a metodologia de identificação de ligantes havia sido desenvolvida com sucesso, passamos para a segunda etapa do projeto que consistia na identificação de inibidores para LbDHODH combinando tanto conhecimentos prévios obtidos no laboratório com relação à inibição da DHODH de tripanossomatídeos, assim como testando novas bibliotecas de compostos cedidas pelos nossos colaboradores.

Nessa busca por ligantes destaca-se o uso de estratégias *in silico* e *in vitro*. Destaca-se também a colaboração do Prof. Flávio Emery que participou do projeto, tanto na orientação do projeto no aspecto que envolveu a síntese de compostos, como também fornecendo sua biblioteca de compostos 2-amino benzotiazol para avaliação. Além disso, vários colaboradores do nosso laboratório tiveram seus compostos avaliados em nossa plataforma.

Para a busca de ligantes iniciamos pela estratégia de utilizar os conhecimentos prévios acerca dos compostos LCPSP 3027 e LCPVL 898, obtidos comercialmente e identificados como potentes inibidores da proteína homóloga LmDHODH e que já haviam demonstrado atividade leishmanicida *in vitro* contra cultura das formas promastigota e amastigota. Em nossos ensaios, ambos os compostos se mostraram potentes inibidores da enzima LbDHODH, com IC_{50} estimados em baixos valores na ordem de µM.

Esses resultados nos estimularam a seguir duas distintas estratégias. Primeiro, a de utilizarmos métodos *in silico*, através do uso de técnicas de docagem contra o modelo cristalográfico previamente obtido para LbDHODH, na busca de moléculas análogas aos compostos LCPSP 3027 e LCPVL 898. Segundo, a de buscarmos uma rota sintética rápida e barata, de forma a possibilitar a realização de estudos de formulação e ensaios em modelo animal.

Na busca *in silico*, análogos à molécula LCPVL 898 foram ensaiados virtualmente, e as 8 moléculas, priorizadas com base no modo de interação com a proteína-alvo, foram adquiridas comercialmente e avaliadas *in vitro*. Nessa busca, foi possível identificar o composto LCPVL 697, que apresentou taxas de inibição semelhante aos compostos aos compostos LCPSP 3027 e LCPVL 898. Ensaios de inibição cruzada contra a enzima humana mostrou que o LCPVL 697 é um inibidor seletivo contra a enzima LbDHODH.

Embora tenhamos dedicado grandes esforços na tentativa da síntese do LCPSP 3027 e LCPVL 898, não conseguimos obtê-los. No entanto, os compostos intermediários das rotas de síntese foram também avaliados, e permitiram a identificação do composto **13**, obtido na rota de síntese do LCPVL 898. Apesar de ser uma pequena molécula mostrou taxas de inibição na ordem de 50% na concentração de100 µM sugerindo que a cadeia alifática da molécula LCPVL 898 é de extrema importância para a inibição da enzima.

Em paralelo foram também testados diferentes bancos de dados de moléculas, oriundos de diferentes laboratórios e varrendo um amplo espectro de diversidade química e estrutural. Nesses ensaios destacou-se a capacidade inibitória de fragmentos baseado no núcleo 2-amino benzotiazol, isto é, moléculas de tamanho da ordem de 200 Da, e que apresentaram atividade inibitória na faixa de baixo µM. No total foram identificados 13 fragmentos com capacidade inibitória e seletiva para a enzima LbDHODH.

Os 9 compostos identificados em nossa plataforma tiveram seu potencial leishmanicida e citotóxico avaliado. Nenhum dos compostos se mostrou citotóxico para os ensaios realizados com cultura de fibroblastos. Com relação a atividade leishmanicida, os compostos **Tia 26**, **Tia 29** e **Tia 36** apresentaram atividade inibitória da faixa de 10 a 80 µM contra cultura de *Leishmania (Vianna) braziliensis* na forma promastigota e os compostos **Tia 26**, **Tia 29**, **Tia 36,Tia 16** e LCPVL 697 apresentaram atividade inibitória na faixa de 50 a 130 µM contra cultura de fibroblastos infectados com a forma amastigota.

Embora ainda sejam resultados preliminares e não temos ainda nenhum resultado que correlacione diretamente a inibição seletiva desses compostos contra a enzima LbDHODH com às atividades leishmanicida identificadas, não podemos

desconsiderar a hipótese de que as diferenças encontradas quanto ao potencial inibitório contra as formas promastigota e amastigota sejam consequência não somente das características estruturais da membrana das diferentes formas de *Leishmania* e do mecanismo de internalização dessas moléculas, como também nas diferenças em níveis de expressão e dependência da rota de biossíntese de pirimidinas para as diferentes formas do parasita.

Os resultados obtidos até o presente momento são extremamente promissores, principalmente por se tratar de fragmentos moleculares que serão utilizados como núcleos para a síntese de diferentes análogos. Estudos de caracterização estrutural se encontram em andamento para a caracterização do mecanismo inibitório desse grupo de inibidores e para fornecer as bases estruturais que permitirão o planejamento racional de ligantes baseado na estrutura da LbDHODH.

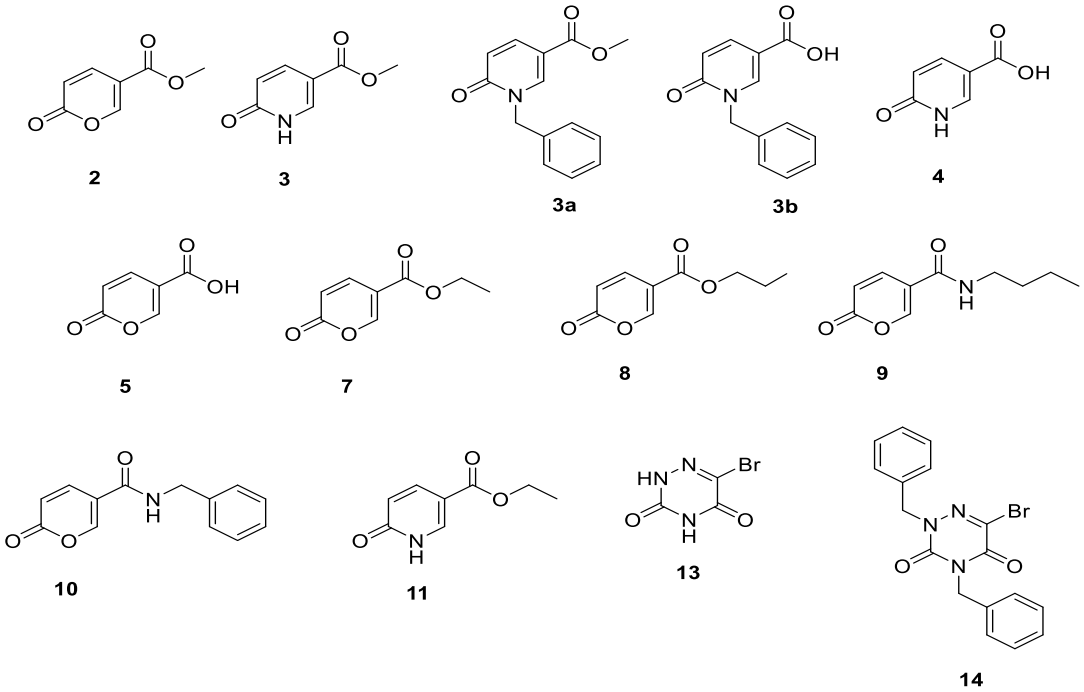
Dada à alta identidade sequencial entre as enzimas DHODH do gênero *Leishmania*, os resultados obtidos através dos nossos estudos poderão também ser exploradas no planejamento de compostos com atividade leishmanicida contra outras espécies de *Leishmania.* Além disso, outras enzimas DHODH de classe 1 A como a de *Trypanossoma cruzi* também pode ser explorada para os compostos identificados.

A plataforma de ensaios para busca de moléculas com atividade leishmanicida baseado na inibição seletiva da enzima diidroorotato desidrogenase de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, implementada durante o desenvolvimento do projeto, se encontra disponível para testar os diferentes bancos de compostos que sejam de interesse da comunidade científica.

6. APÊNDICES

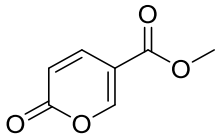
Apêndice A. Compostos sintetizados ao longo do desenvolvimento do projeto

Compostos Síntetizados



Apêndice B. Parte experimental sintética.

Síntese do metil 2-oxo-*2H*-piran-5-carboxilato (2)

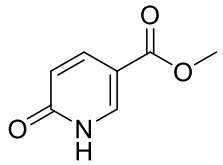


2

5 g de acido málico (37 mmol) foram dissolvidos em 10 mL de acido sulfúrico. A reação ficou sob agitação por 6 horas a 75°C. A solução foi resfriada a temperatura ambiente e em seguida adicionado 25 mL de metanol, a reação novamente foi aquecida a 75°C por 3 horas. Posteriormente a reação foi extraída com diclorometano e lavada 3 vezes com água destilada. A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio, concentrada e purificada em coluna cromatográfica (Hexano:Acetato de etila 30%) obtendo-se um solido amarelo, com rendimento de

65%.^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.29 (s, 1H), 7.77 (dd, *J* = 9.8, 2.6 Hz, 1H) 6,33 (dd, *J* = 9,8, 2,6 Hz, 1H), 3,86 (s, 3H) . ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 163,44, 159,89, 158,16, 144,18, 141,68, 115,30, 11,06, 52,51 **ESI:** $[M+H]^+$ calculado para o $C_7H_7O_4^+$ 155,0339 , encontrado 155,0340. Ponto de Fusão: 70-72°C.

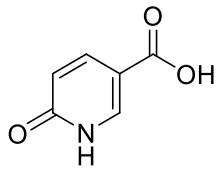
Síntese do metil-6-oxo-1,6-diidropiridina-3-carboxilato (3).



3

200 mg do composto **2** (1,3 mmol) foram dissolvidos em uma solução de hidróxido de amônio a 14%. A reação ficou sob agitação a temperatura ambiente por 15 horas. Em seguida a solução foi neutralizada com HCl e extraída com acetato de etila. A fase orgânica foi lavada 3 vezes com agua destilada, secada com sulfato de magnésio e concentrada. A purificação foi realizada através de coluna, utilizando como fase móvel Hexano/ Acetato de etila 90%. Ao final obtém-se um solido amarelo o qual foi recolhido através de filtração a vácuo, obtendo um sólido amarelo com 11% de rendimento. Ponto de Fusão: 130-131°C. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.26 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.05 (dd, *J* = 9.5, 2.4 Hz, 1H), 6.63 (d, *J* = 9,5 Hz, 1H), 3,87 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 165,33, 164,11, 141,57, 139,72, 119,01, 111,54, 51,83. **ESI:** $[M+H]^+$ calculado para o $C_7H_8NO_3^+$154,0499, encontrado 154,0498.

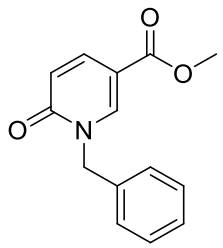
Síntese do 6-oxo-1,6-diidropiridina-3-acido carboxílico (4).



4

60 mg do composto **3** (0,4 mmol) foram dissolvidos em uma solução de 25% de hidróxido de sódio em agua. A reação ficou sob agitação por 45 minutos em refluxo. Posteriormente a solução foi esfriada a temperatura ambiente e neutralizada com acido clorídrico e um precipitado amarelo pardo formou-se. O sólido foi recolhido através de filtração a vácuo com rendimento de 75%. Ponto de Fusão maior que 215°C. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO) δ 12,05 (s, 1H), 7,98 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H), 7,78 (dd, *J* = 9,6, 2,4 Hz, 1H), 6,34 (d, *J* = 9,6 Hz, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO) δ 165,34, 162,43, 140,41, 139,72, 119,61, 109,19.**ESI:** $[M+H]^-$ calculado para o $C_6H_5NO_4^-$ 138.0186, encontrado 138,0189.

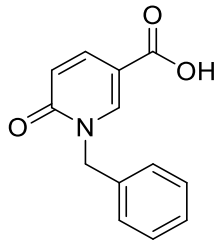
Síntese do metil 1-benzil-6-oxo-1,6-diidropiridina-3-carboxilato (3a).



3a

25 mg do composto **4** (0,18 mmol) foi dissolvido em 5 mL de THF seco e 1,2 equivalentes de tercbutóxido de potássio, a reação é deixada em agitação por 15 minutos a temperatura ambiente, posteriormente 1,1 equivalentes de brometo de benzila foi adicionado, ficando a reação em agitação à temperatura ambiente por 16 horas. Ao final da reação o produto é concentrado e purificado em coluna cromatográfica (Hexano/Acetato de etila 50%), obtendo um líquido amarelo com rendimento de 89%. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,18 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H), 7,83 (dd, *J* = 9,5, 2,5 Hz, 1H), 7,33 (m, 5H), 6,58 (d, *J* = 9,5 Hz, 1H), 5,16 (s, 2H), 3.82 (s, 3H).

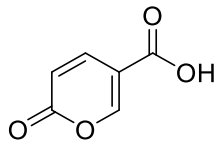
Síntese do 1-benzil-6-oxo-1,6-diidropiridina-3-carboxilato (3b).



3b

45 mg do composto **4a** foram adicionados a uma solução de hidróxido de sódio 25% em agua. Em seguida a solução foi agitada e aquecida até o refluxo deixada por 45 minutos. Ao final a solução foi resfriada a temperatura ambiente e neutralizada com HCl obtendo-se um sólido levemente amarelado com rendimento de 76%. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8,29 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H), 8,01 (dd, *J* = 9,3, 2.4 Hz, 1H), 7,32 (m, 5H), 6,52 (d, *J* = 9,3 Hz, 1H), 5,23 (s, 2H). **ESI:** $[M+H]^-$ calculado para o $C_{13}H_{10}NO_3^-$ 228,0666, encontrado 228.0688. Ponto de Fusão maior que 215°C.

Síntese do 2-oxo-*2H*-piran-5-acido carboxílico (5).



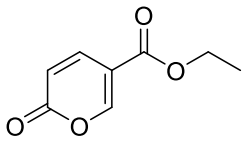
5

2 g de acido málico (15 mmol) foi dissolvido em 5 ml de acido sulfúrico. A reação é submetida à agitação a 75°C por 6 horas. Posteriormente a solução foi resfriada a temperatura ambiente e vertida lentamente em banho de gelo e deixada armazenada a 5°C overnight. O precipitado formado foi recolhido por filtração a vácuo, obtendo um sólido marrom com rendimento de 75%. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 13.38 (s, 1H), 8,53 (s, 1H) , 7,81 (d, *J* =8,3 Hz, 1H), 6,42(d, *J* = 9,4 Hz, 1H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 164,26, 159,92, 158,91, 142,55, 114,48, 112,23. EI calculado para $C_6H_5O_4^+$ 141,0182, encontrado 141. Ponto de Fusão 207-209 °C.

Metodologia geral para a obtenção dos derivados ésteres lactônicos (7 e 8).

1 g de acido málico (7,4 mmol) foi dissolvido em 3 mL de acido sulfúrico. A reação ficou sob agitação por 6 horas a 75°C. A solução foi resfriada a temperatura ambiente e em seguida adicionado 15 mL do álcool correspondente, a reação novamente foi aquecida a 75°C por 3 horas. Posteriormente a reação é extraída com diclorometano e lavada 3 vezes com agua destilada. A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio, concentrada e purificada em coluna cromatográfica (Hexano:Acetato de etila 10%)

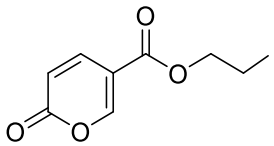
Síntese do etil 2-oxo-*2H*-piran-5-carboxilato (7).



7

Foi obtido um semi-sólido amarelado obtido com rendimento de 72%. ^{1}H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8,44 (dd, *j* = 2,6, 0,7 Hz, 1H) , 7,85 (dd, *j* = 9,6, 2,6, 1H), 6,37 (dd, *j* = 9,6, 0,7 Hz, 1Hz), 4,33 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H) 1.35 (t, *j* = 7,1 Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 164,46, 161,94, 159,84, 143,27, 115,94, 113,61, 62,58, 14,33.

Síntese do propil 2-oxo-*2H*-piran-5-carboxilato (8).



8

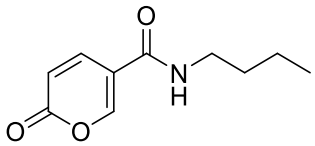
Foi obtido um sólido amarelo claro obtido com 73% de rendimento. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,46 (dd, *j* =2,6, 1,1 Hz, 1H), 7,88 (dd, *J* =9,8, 2,6 Hz, 1H*)*, 6,38 (dd, *J* = 9,8, 1,1 Hz, 1H) 4,24 (t, *j* = 6,6 Hz, 2H), 1,76 (sex, 6,7 Hz, 2H) 1,02 (t, 7,1

Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 164,40, 161,93, 159,76, 143,35, 115,84, 113,69, 68,16, 23,01, 10,66. ESI: $[M+H]^+$ calculado para o $C_9H_{11}O_4^+$ 183,0652, encontrado 183,0653. Ponto de Fusão 80-82°C.

Metodologia geral para a obtenção dos derivados de amidas lactónicas (9 e 10).

100 mg do intermediário **5** (0,65 mmol) foram dissolvidos em acetonitrila seca, em seguida foram adicionados 1,2 equivalentes de DCC (diciclocarbodimida) a reação ficou sob agitação por 15 minutos. Posteriormente 1,2 equivalentes de amina foram adicionados e a reação permaneceu sob agitação overnight. Após o tempo de reação a solução foi filtrada e o filtrado foi concentrado e purificado em coluna cromatográfica (Hexano/Acetato de etila 50%; Acetato de etila 100%).

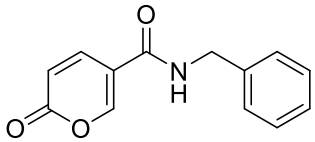
Síntese do *N*-butil-2-oxo-*2H*-piran-5-carboxamida (9).



9

Foi obtido um sólido amarelo, com rendimento de 65%. ^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7,89 (s, 1H) 7,44 (*d, J* =9,2 Hz, 1H) 5,53 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H), 3,48 (t,*j*= 7.1 Hz, 2H),1.65 (qt, 2H), 1,40 (st, 2H), 0.97 (t, j= 7,4 Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 165,86, 165,22, 161,60, 150,49, 101,90, 94,48, 51,01, 33,50, 20,62, 13,93. **ESI:** $[M+H]^+$ calculado para $C_{10}H_{15}N_2O_2^+$ 195,0968, encontrado 196, 0973 Ponto de Fusão 106-109°C.

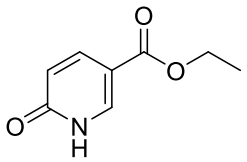
Síntese do *N*-benzil-2-oxo-*2H*-piran-5-carboxamida (10).



10

Foi obtido um sólido amarelo, com 57% de rendimento. ^{1}H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.98 (s, 1H), 7,45 (d, *J* = 9,3Hz, 1H), 7,36 (m, 5H) , 5.57 (d, *J* = 9,3 Hz, 1H) , 4,67 (s, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 165,22, 161.51, 150,41, 137,77, 130,09, 129,32, 128,77, 102,44, 54,52. **ESI:** $[M+H]^+$ calculado para $C_{13}H_{12}NO_3^+$ 230,0812, encontrado 230.0816. Ponto de Fusão 157-159°C.

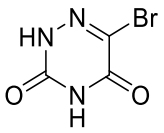
Síntese do etil-6-oxo-1,6-diidropiridina-3-carboxilato (11).



11

200 mg do composto **7** (1,3 mmol) foram dissolvidos em uma solução de hidróxido de amônio a 14%. A reação ficou sob agitação a temperatura ambiente por 15 horas. Em seguida a solução é neutralizada com HCl até a formação de um precipitado amarelo o qual foi recolhido através de filtração a vácuo, obtendo um sólido amarelo com 14 % de rendimento. ^{1}H NMR (300 MHz, MeOD) δ 8.13(dd, *J* = 2.6, 0.7 Hz, 1H), 7.98 (dd, *J* = 9.6, 2.6 Hz, 1H), 6.49 (dd, *J* = 9.6 , 0,7 Hz, 1H*)*, 4,28 (q, *j*= 7,1 Hz 2H) , 1,33 (t, *j*= 7,1 Hz 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, MeOD) δ 165,57, 140,85, 120,10, 111,81, 61,65, 14,34. **EI** calculado para $C_8H_{10}NO_3^+$ 168,0655, encontrado 168. Ponto de Fusão maior que 215°C.

Síntese do 6-bromo-1,2,4-triazina-3,5(*2H,4H)*-diona (13).

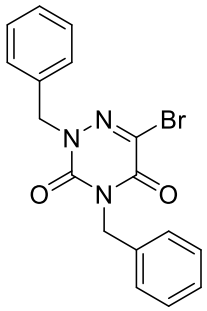


13

500 mg do produto de partida **12** (4,4 mmol) foram dissolvidos em 5 ml de agua destilada e 20 equivalentes de bromo molecular. A reação foi aquecida a 60°C e ficou sob agitação overnight. Em seguida a solução foi neutralizada com uma solução 28% de hidróxido de amônio e extraída com acetato de etila, o qual foi

lavado 3 vezes com agua. A fase orgânica foi secada com sulfato de magnésio e concentrada obtendo um solido amarelo pálido com rendimento de 100%. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.56 (s, 1H), 12.29 (s, 1H) ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 153.76, 149.13, 129.36. **ESI** $[M+H]^-$ calculado para o $C_3H_2BrN_3O_2^-$ 189,9247 encontrado 189,9251. Ponto de Fusão maior que 215°C.

Síntese do 2,4-dibenzil-6-bromo-1,2,4-triazina-3,5(*2H,4H)*-diona (14).

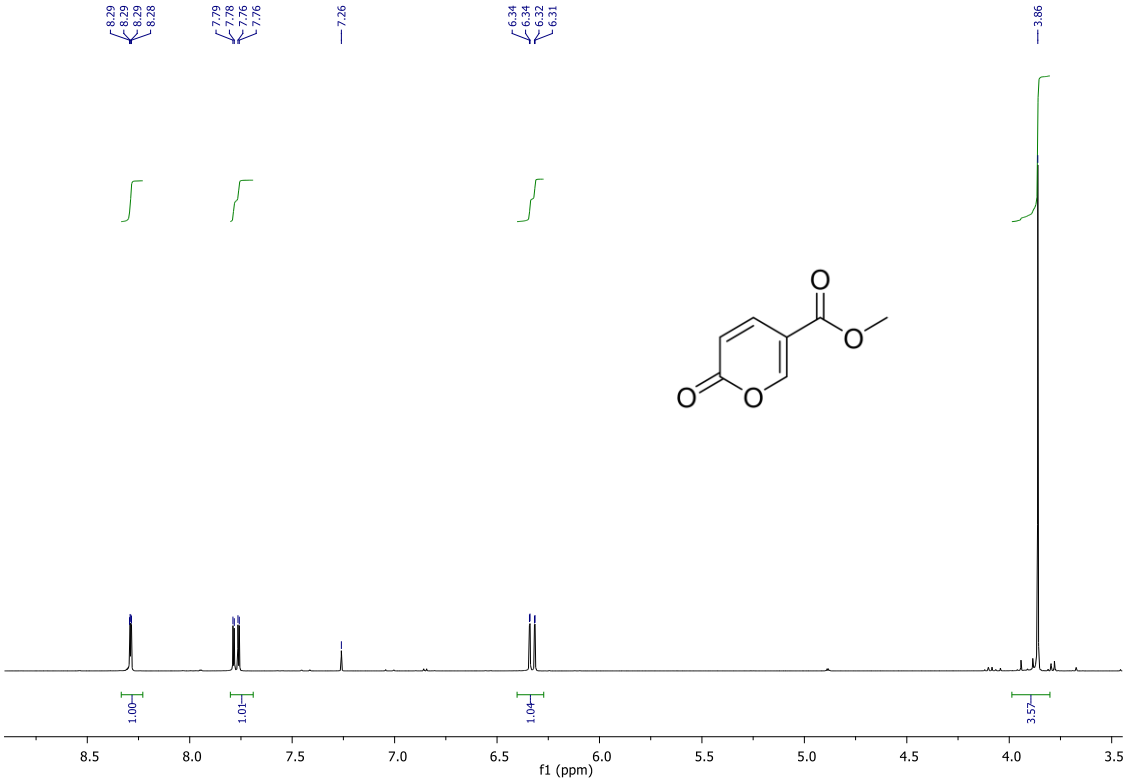


14

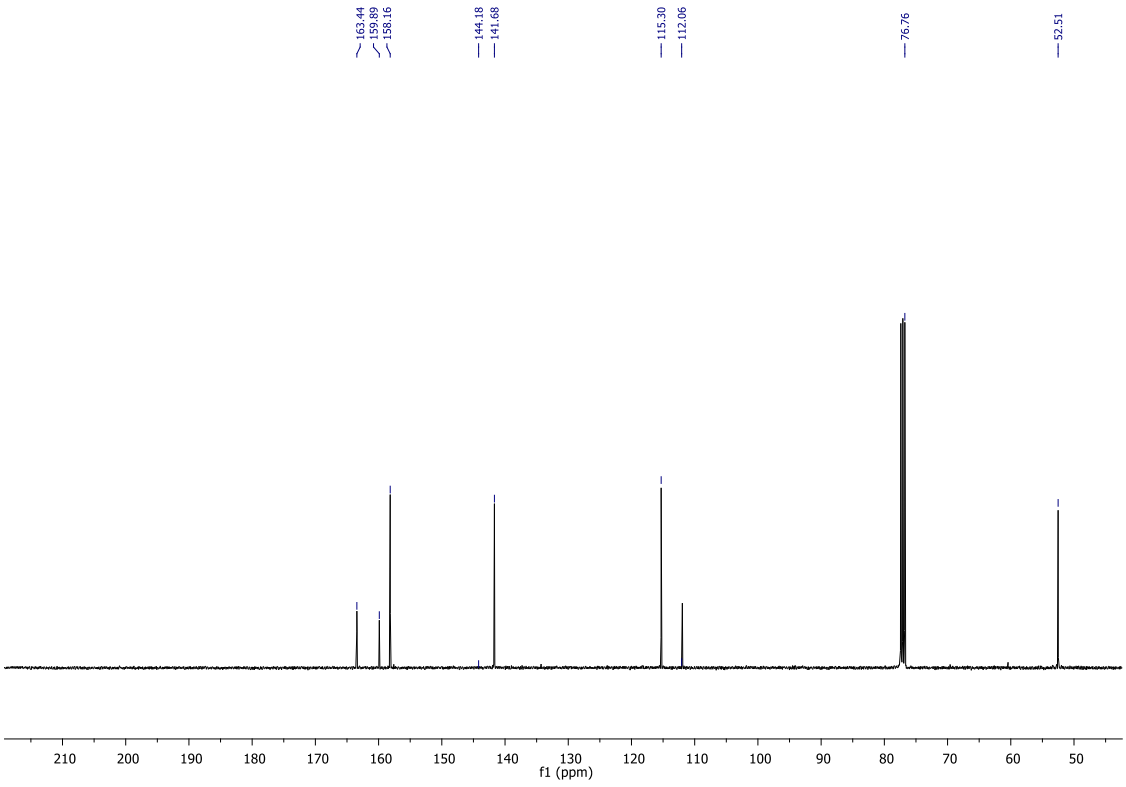
300 mg do composto bromado **12** (1,8 mmol) foram dissolvidos em 10mL de DMF seco, em seguida 8 equivalentes de hidreto de sódio foram adicionados, deste modo à reação ficou sob agitação a temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente 3 equivalentes de brometo de benzila foram gotejados na reação, a qual ficou sob agitação a temperatura ambiente overnight. Ao termino da reação o produto foi concentrado e extraído com diclorometano. A fase orgânica foi lavada três vezes com agua e secada com sulfato de magnésio. Posteriormente a porção orgânica foi concentrada e purificada em coluna (Hexano/Acetato de etila 5%). Ao final obtém-se um liquido incolor com rendimento de 96%. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7,30 (m, 10H), 5.09 (s, 2H), 4.98 (s, 2H). ^{13}C RMN (101 MHz, DMSO) δ 153,20, 148,77, 136,12, 135,67, 128.77, 128,60, 128,39, 128,20, 128,00, 127,77, 54,80, 45,41.

Apêndice C. Espectros analíticos.

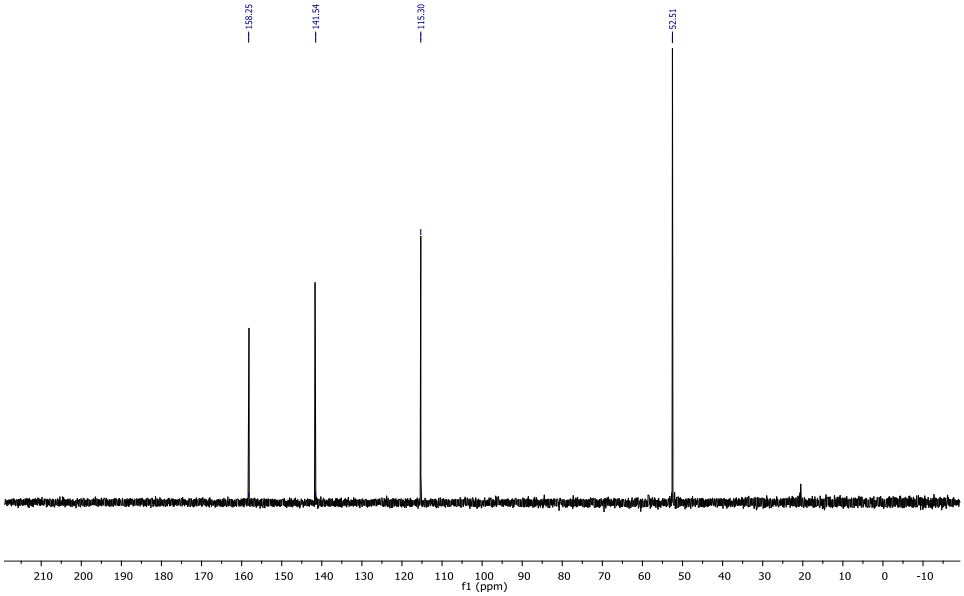
I. Espectro RMN de hidrogênio composto **2**. ^{1}H-RMN ($CDCl_3$)



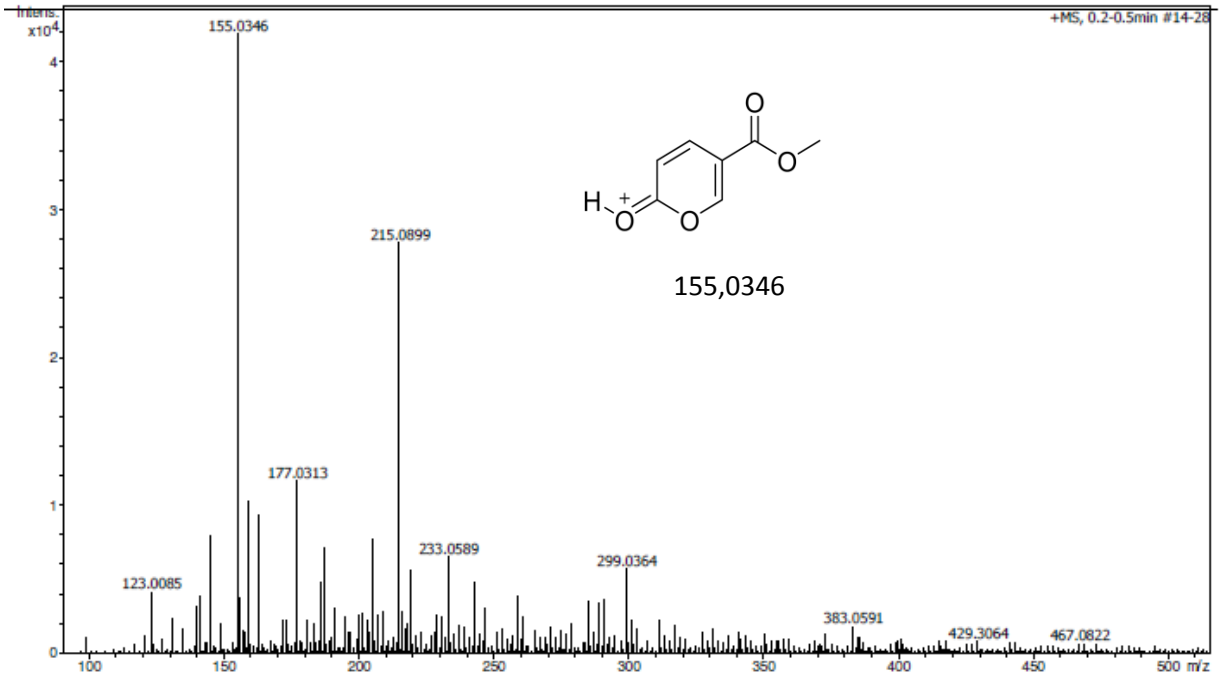
II. Espectro RMN de carbono composto **2**. ^{13}C-RMN ($CDCl_3$)



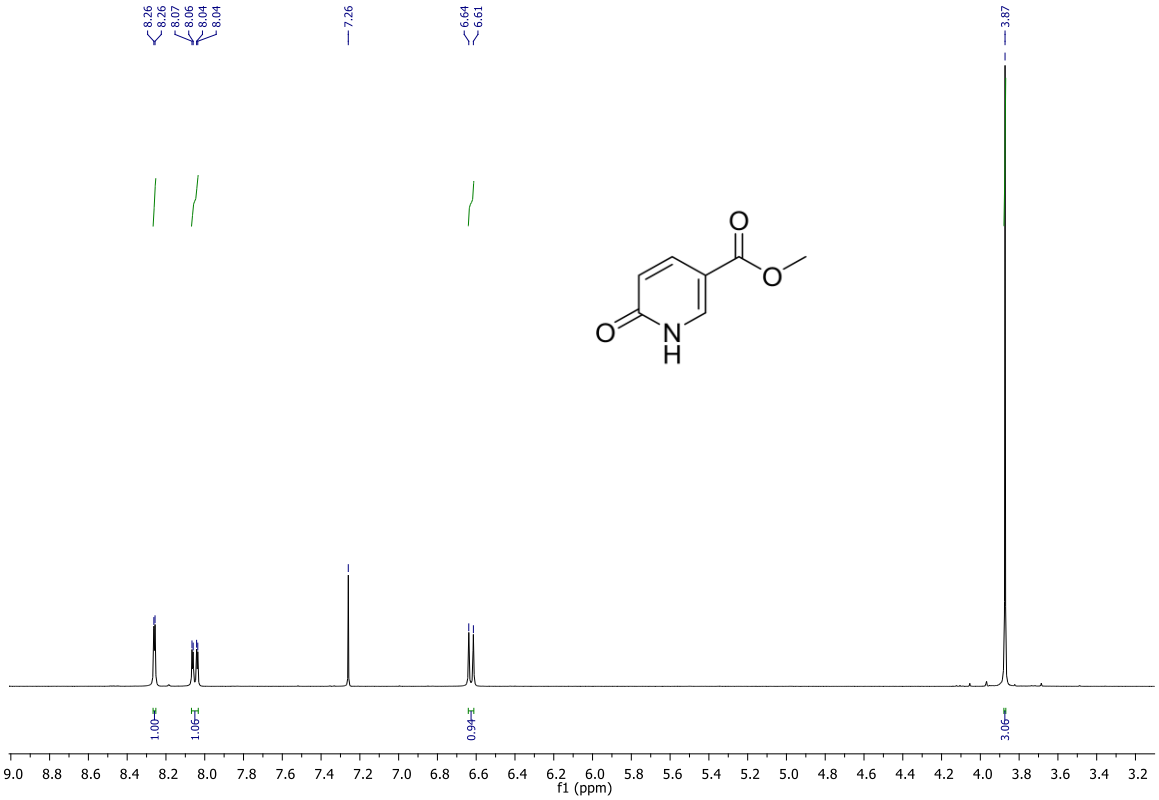
III. Espectro RMN de carbono DEPT-135 do composto **2**. ^{13}C-DEPT-RMN ($CDCl_3$)



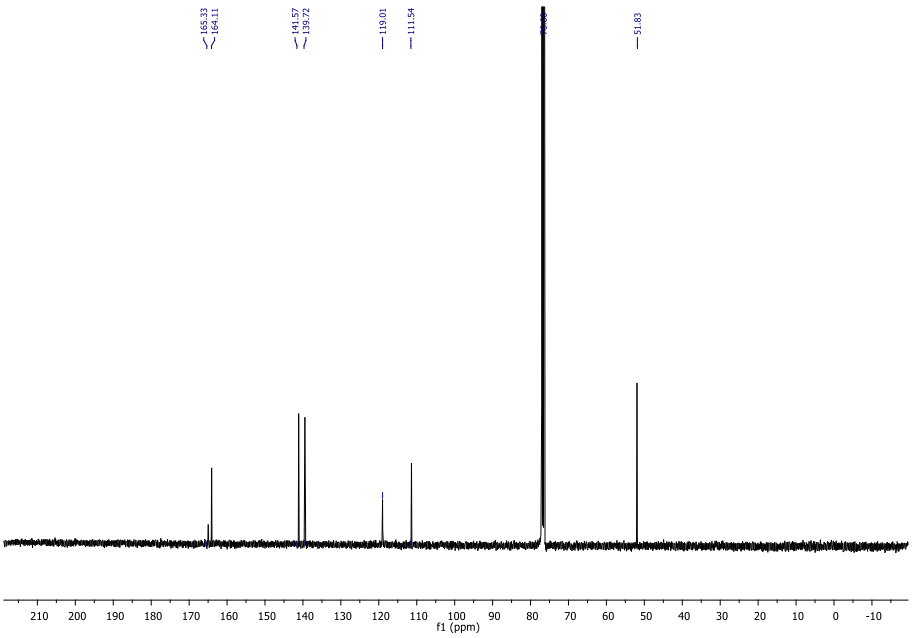
IV. Espectro de massas ESI de alta resolução do composto **2**.



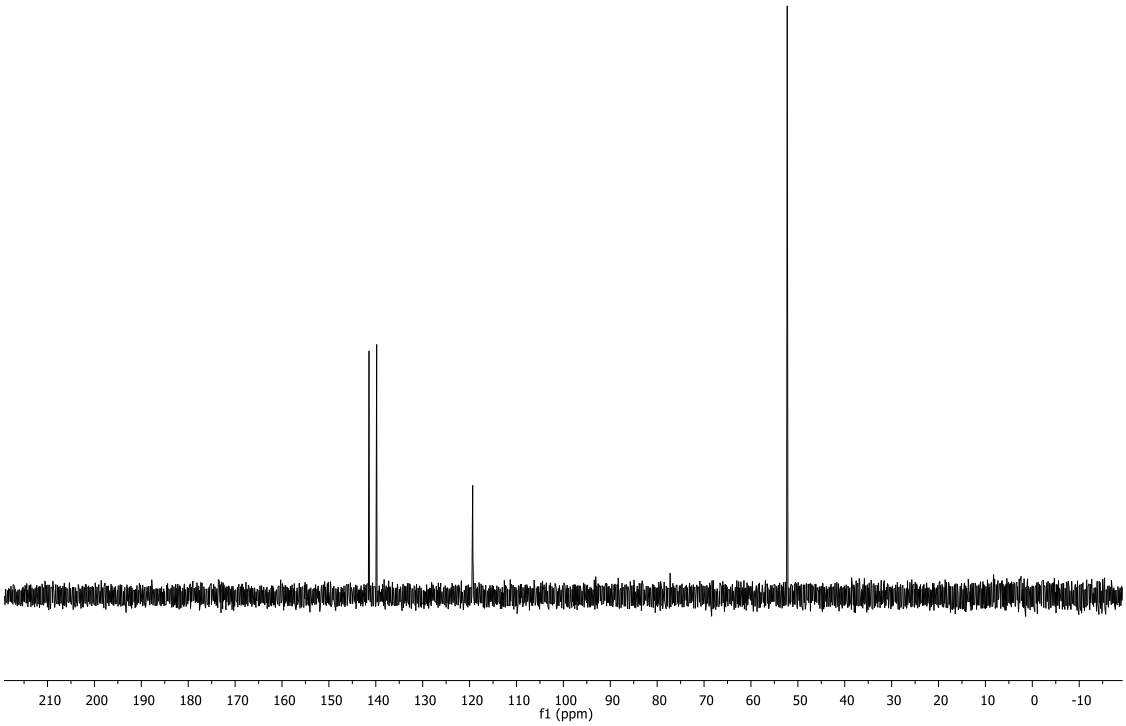
V. Espectro RMN de hidrogênio composto **3**. ^{1}H-RMN ($CDCl_3$)



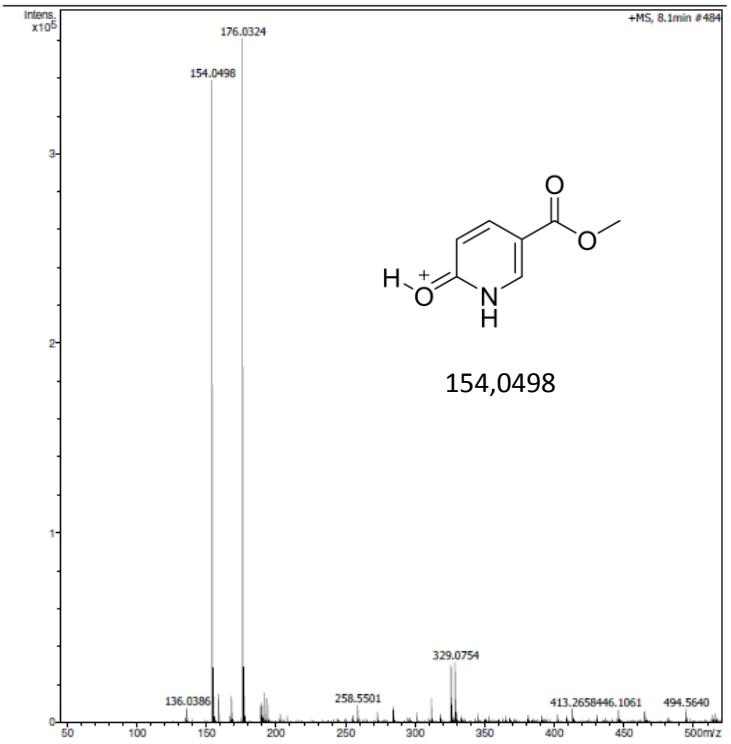
VI. Espectro RMN de carbono composto **3**. ^{13}C-RMN ($CDCl_3$)



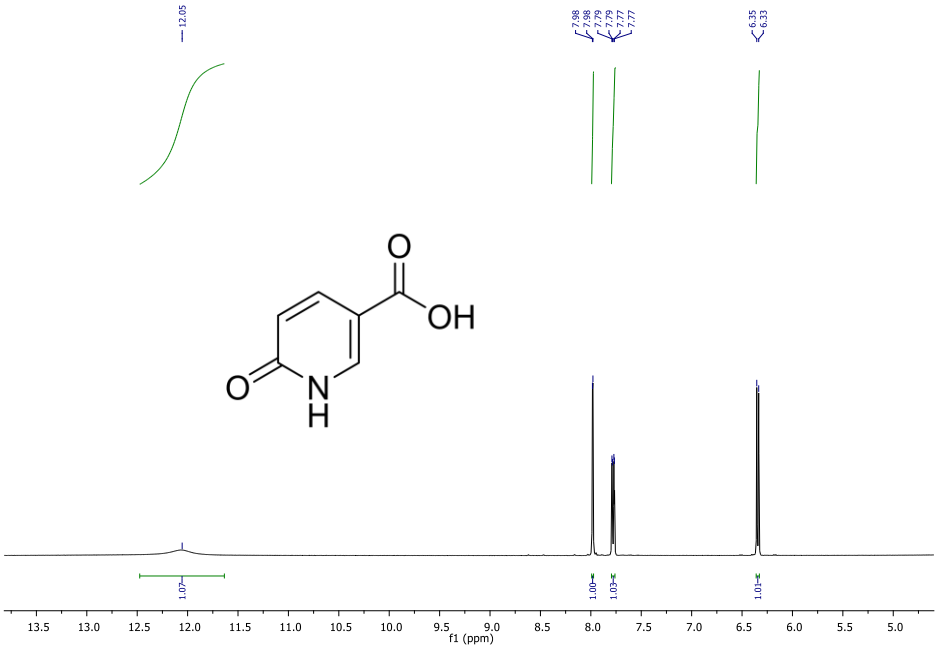
VII. Espectro RMN de carbono DEPT do composto **3**. ^{13}C-DEPT-RMN ($CDCl_3$)



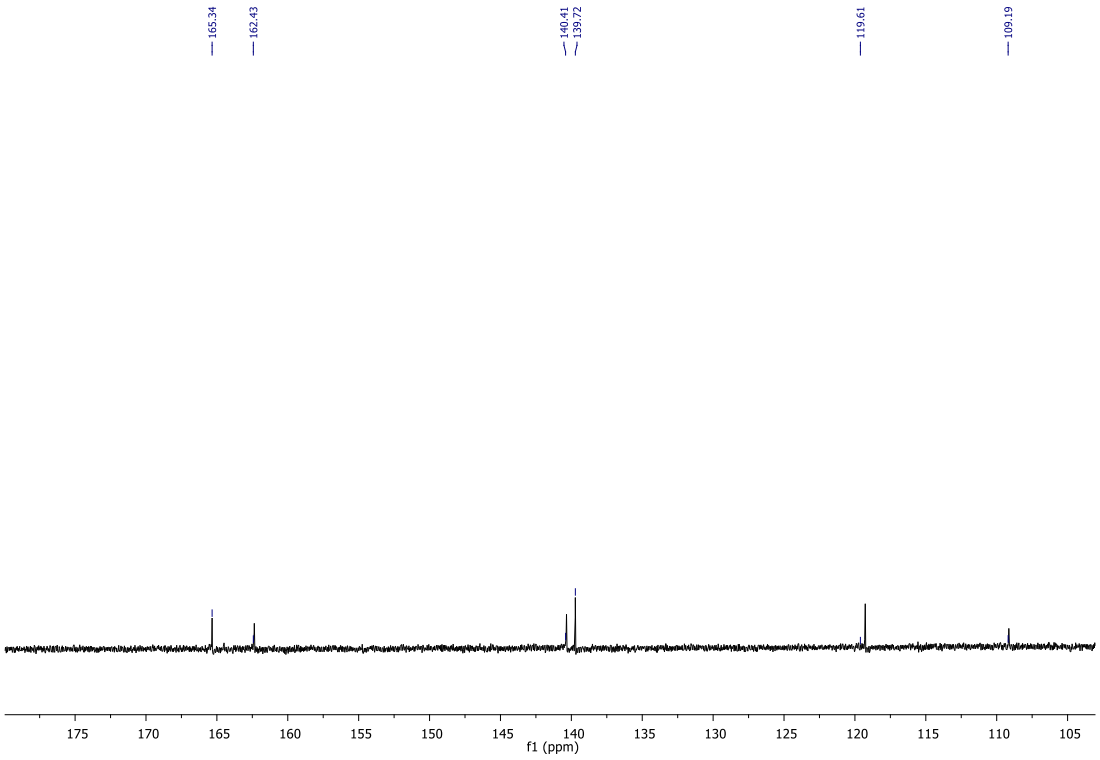
VIII. Espectro de massas ESI de alta resolução do composto **3**.



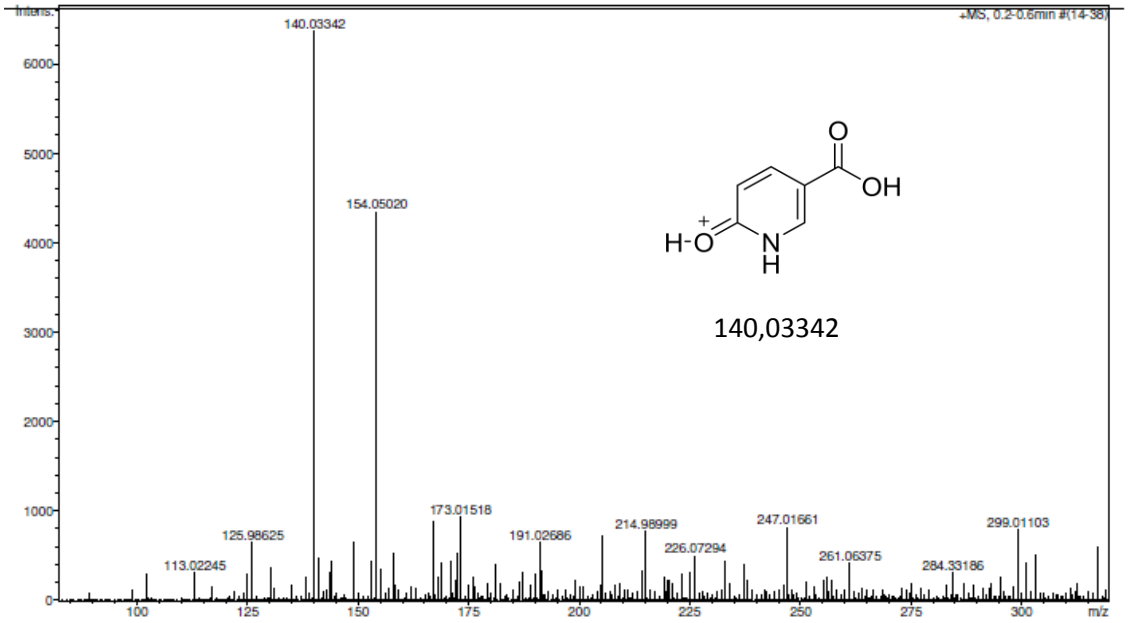
IX Espectro RMN de hidrogênio composto **4**. ^{1}H-RMN ($CDCl_3$)



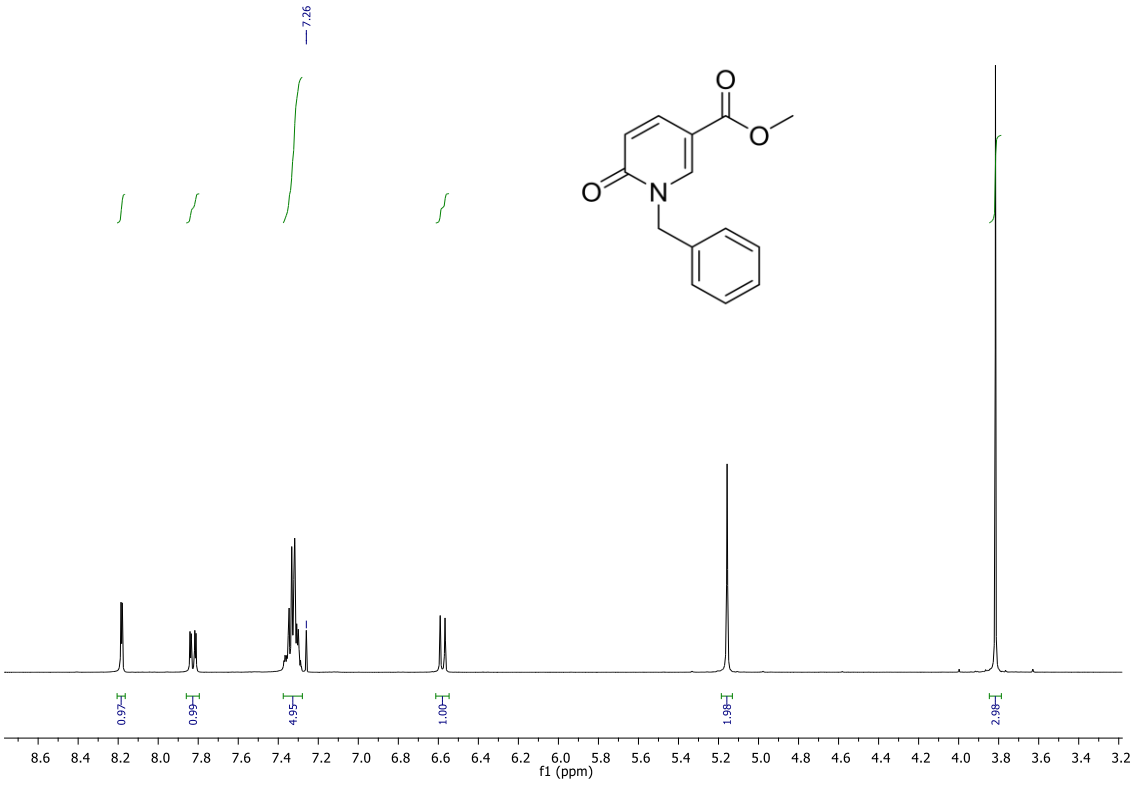
X. . Espectro RMN de carbono composto **4**. ^{13}C-RMN ($CDCl_3$)



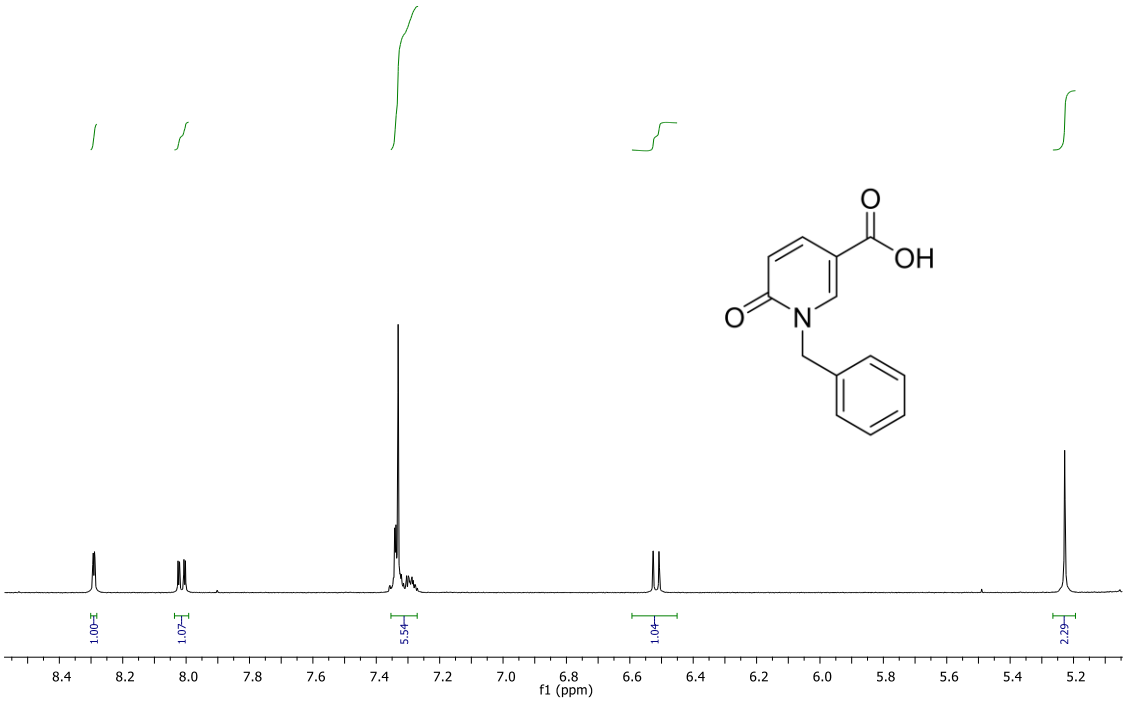
XI. Espectro de massas ESI de alta resolução do composto **4**.



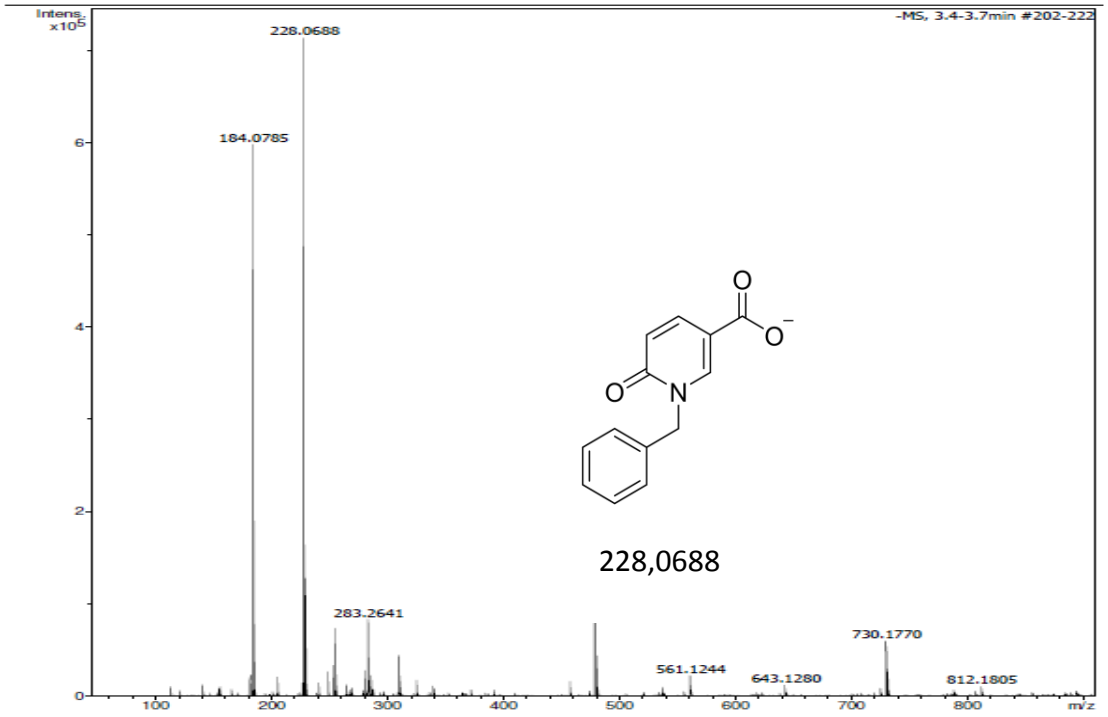
XII. Espectro RMN de hidrogênio composto **4a**. ^{1}H-RMN ($CDCl_3$)



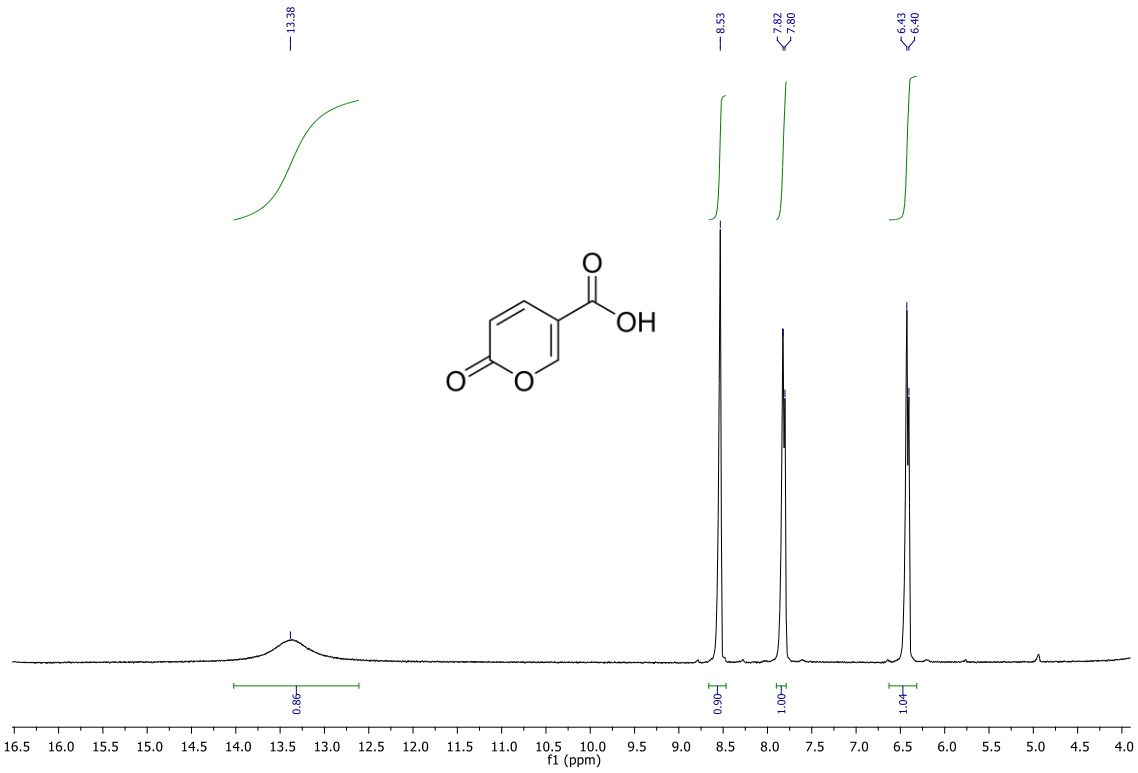
XIII. Espectro RMN de hidrogênio composto **4b**. ^{1}H-RMN ($CDCl_3$)



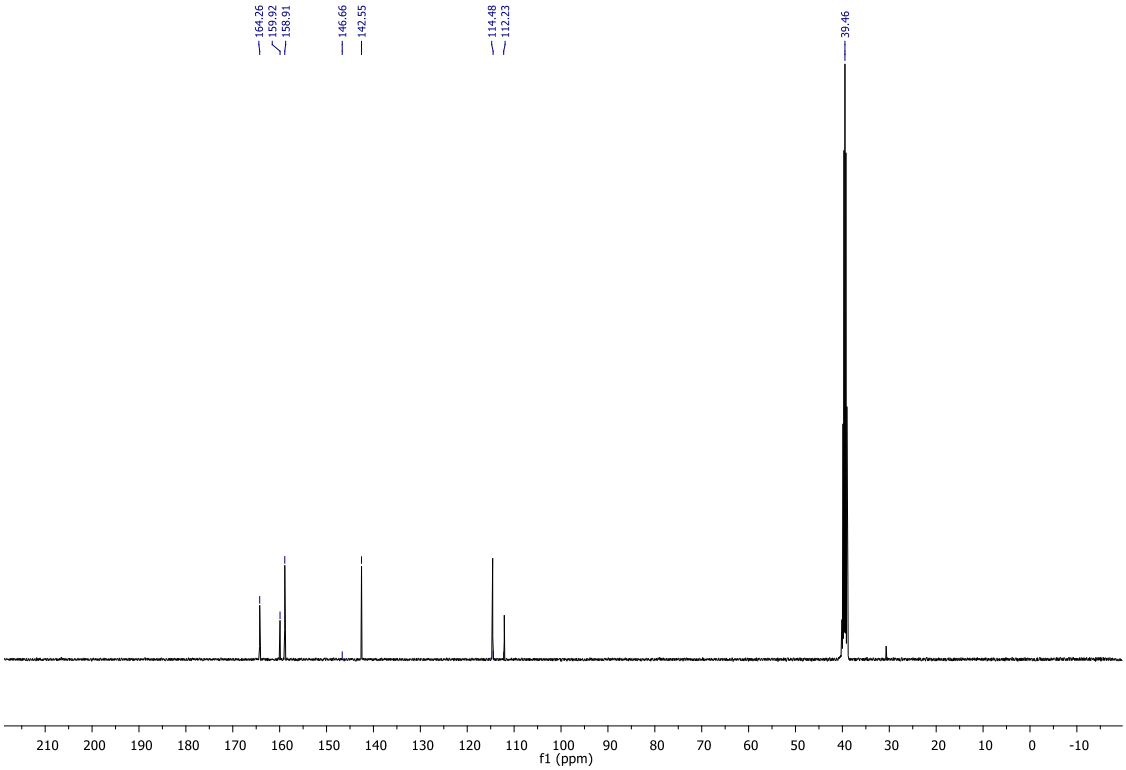
XIV. Espectro de massas ESI de alta resolução do composto **4b**.



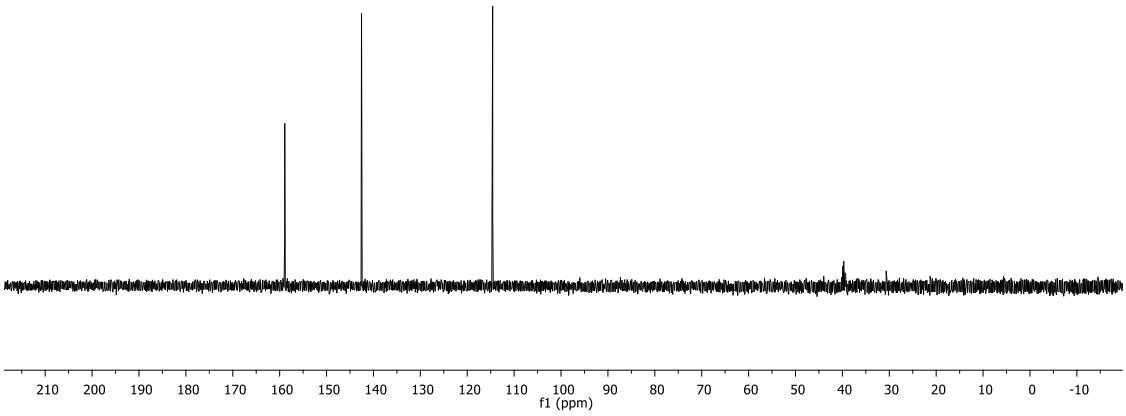
XV. Espectro RMN de hidrogênio composto **5**. ^{1}H-RMN (DMSO).



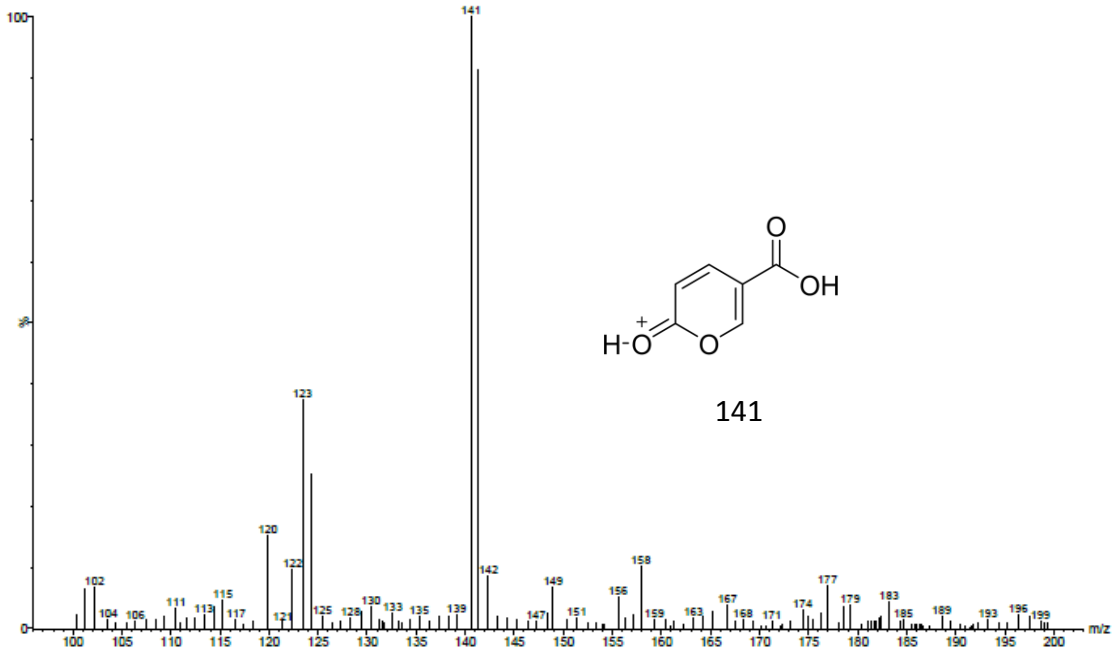
XVI. Espectro RMN de carbono composto **5**. ^{13}C-RMN (DMSO)



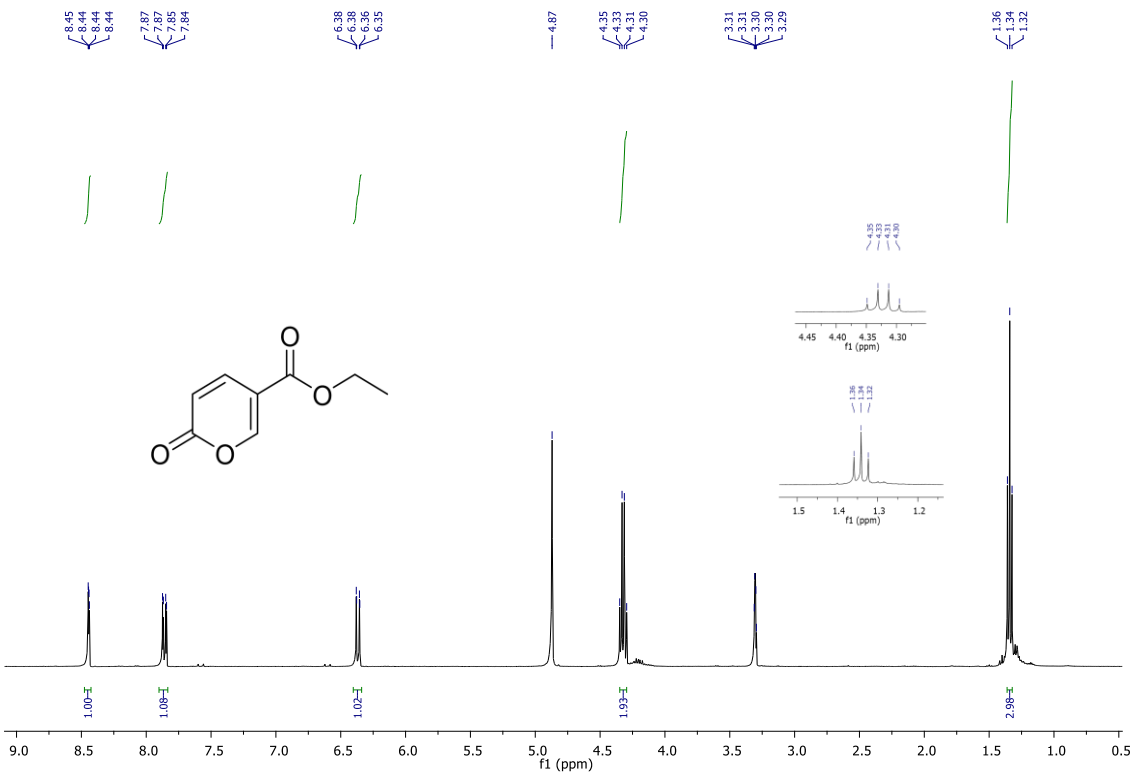
XVII. Espectro RMN de carbono DEPT do composto **5**. ^{13}C-DEPT-RMN (DMSO)



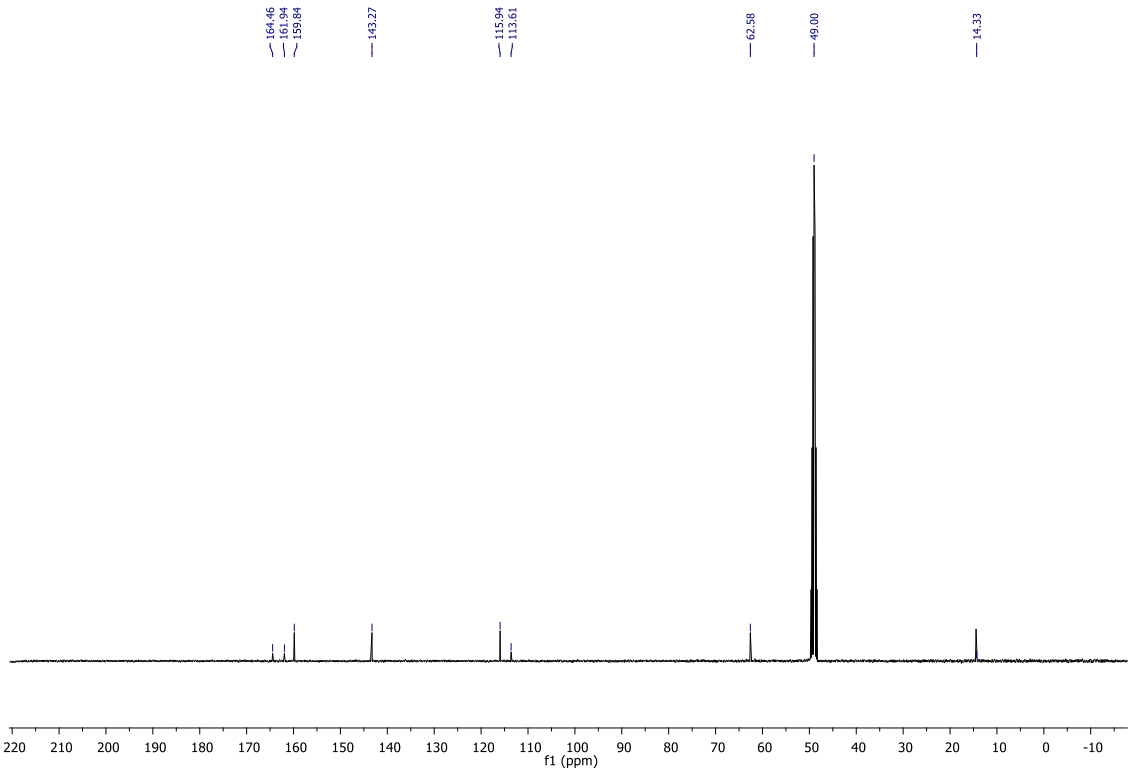
XVIII. Espectro de ESI para o composto **5**.



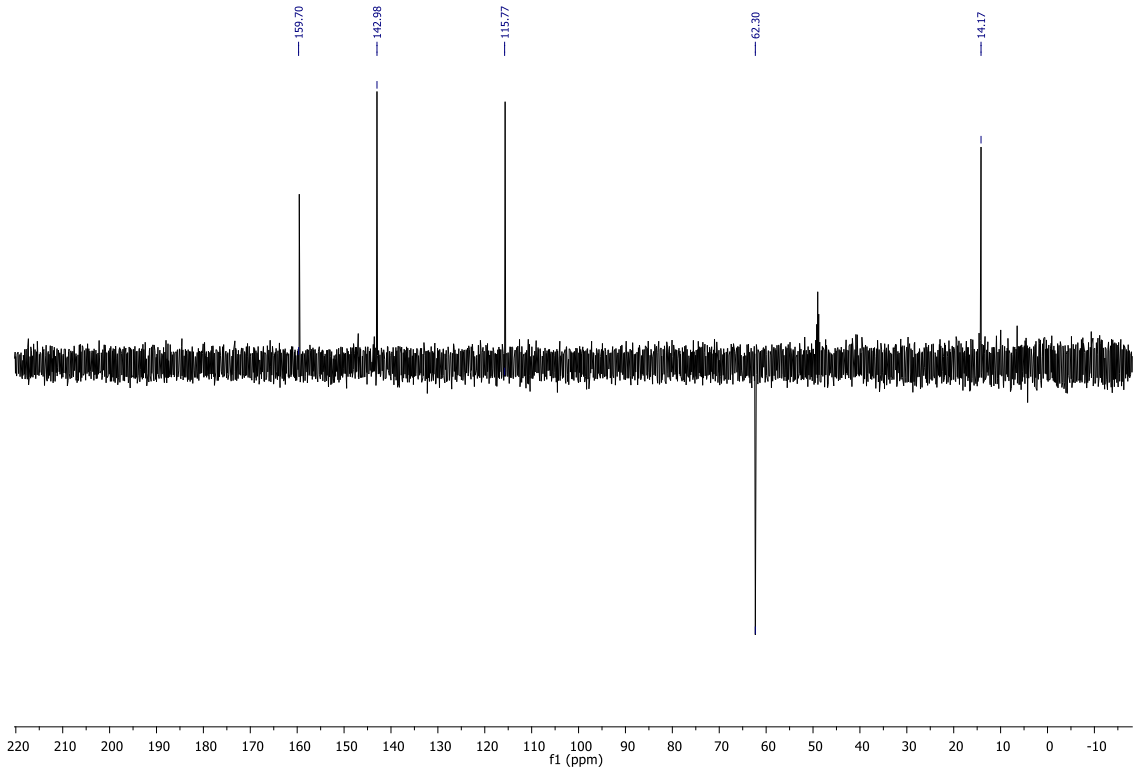
XIX. Espectro RMN de hidrogênio composto **7**. ^{1}H-RMN (MeOD).



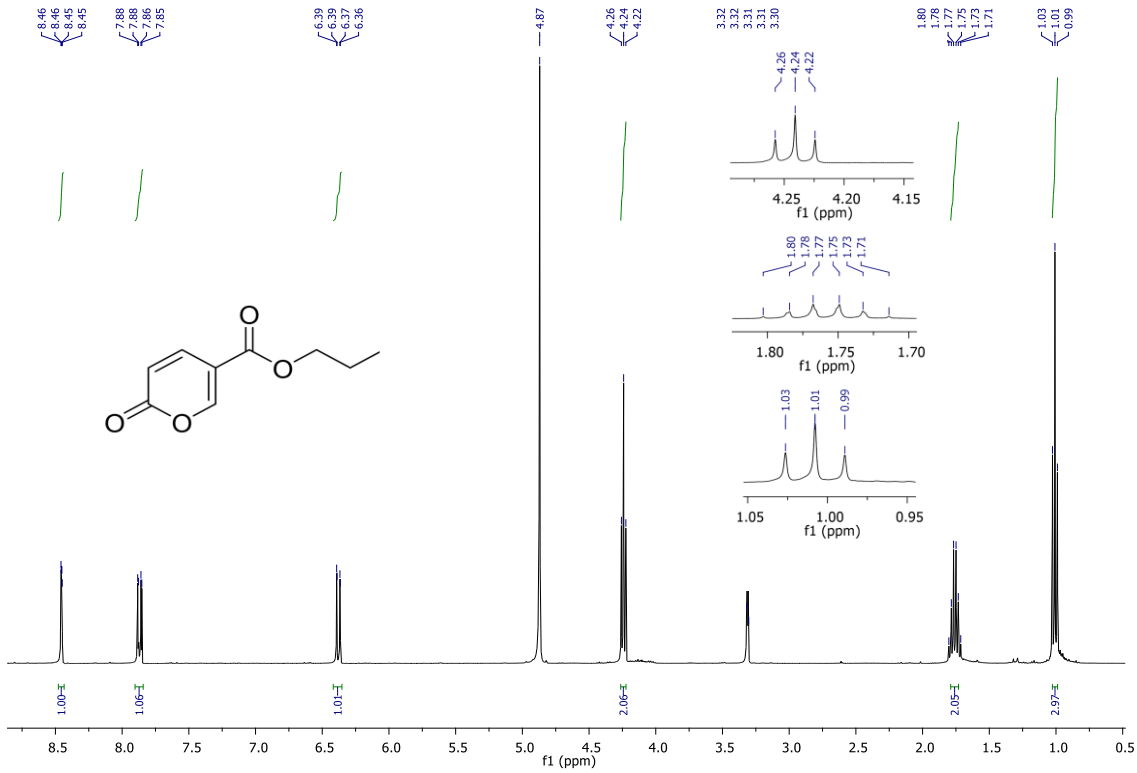
XX. Espectro RMN de carbono composto **7**. ^{13}C-RMN (MeOD).



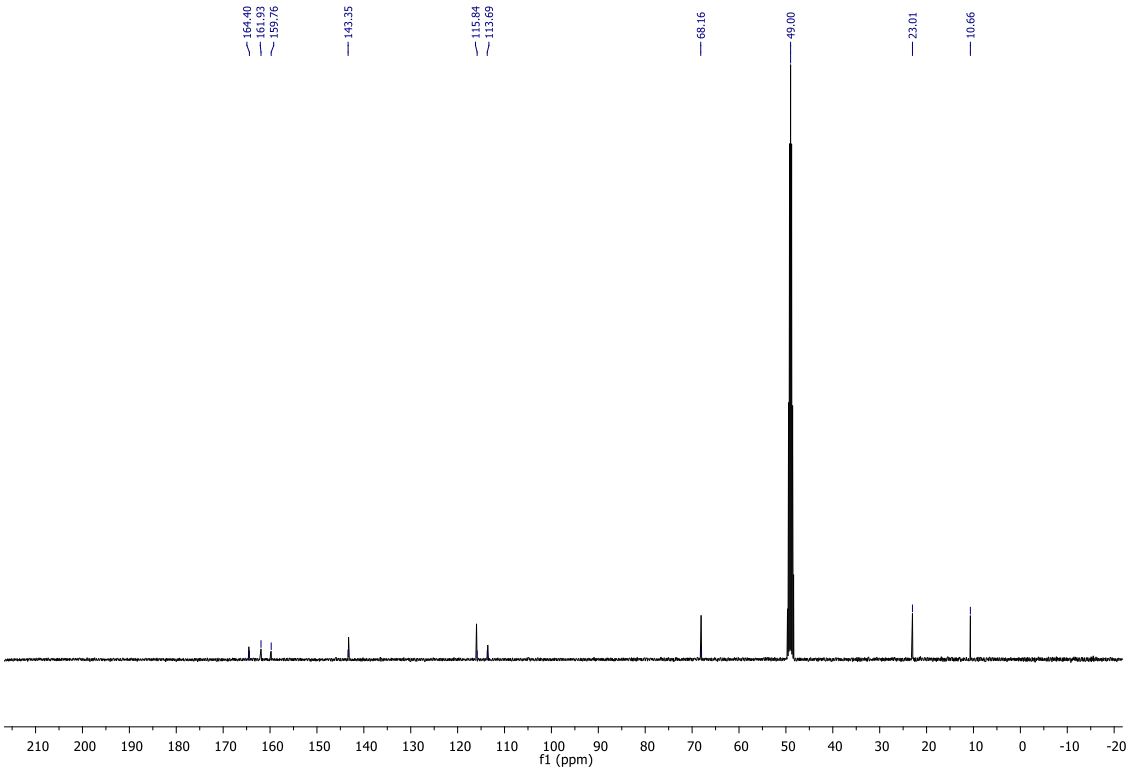
XXI. Espectro RMN de carbono DEPT do composto **7**. ^{13}C-DEPT-RMN (MeOD)



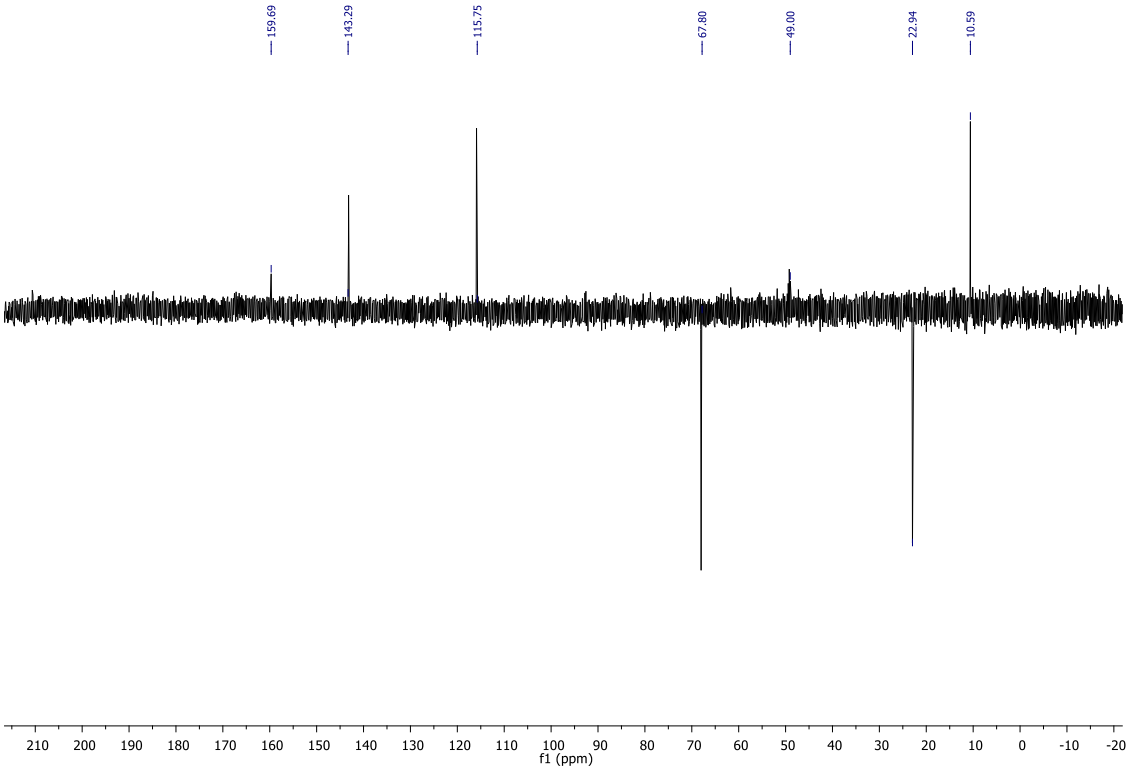
XXII. Espectro RMN de hidrogênio composto **8**. ^{1}H-RMN (MeOD).



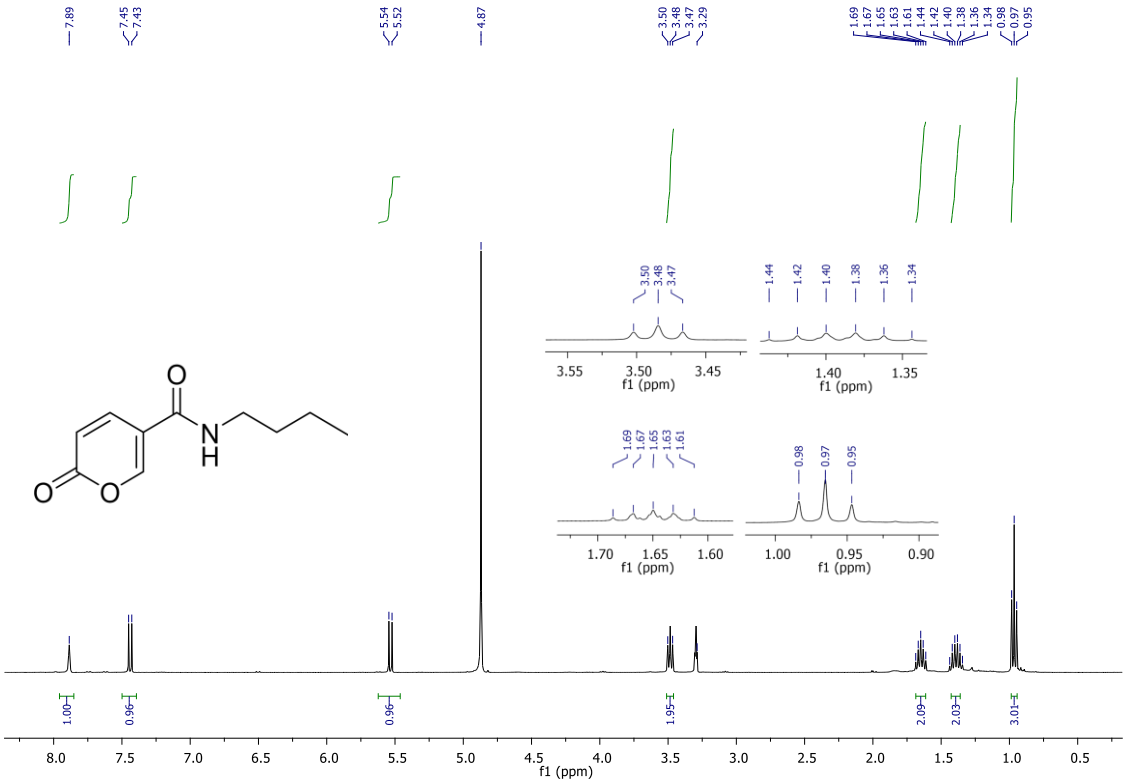
XXIII. Espectro RMN de carbono composto **8**. ^{13}C-RMN (MeOD).



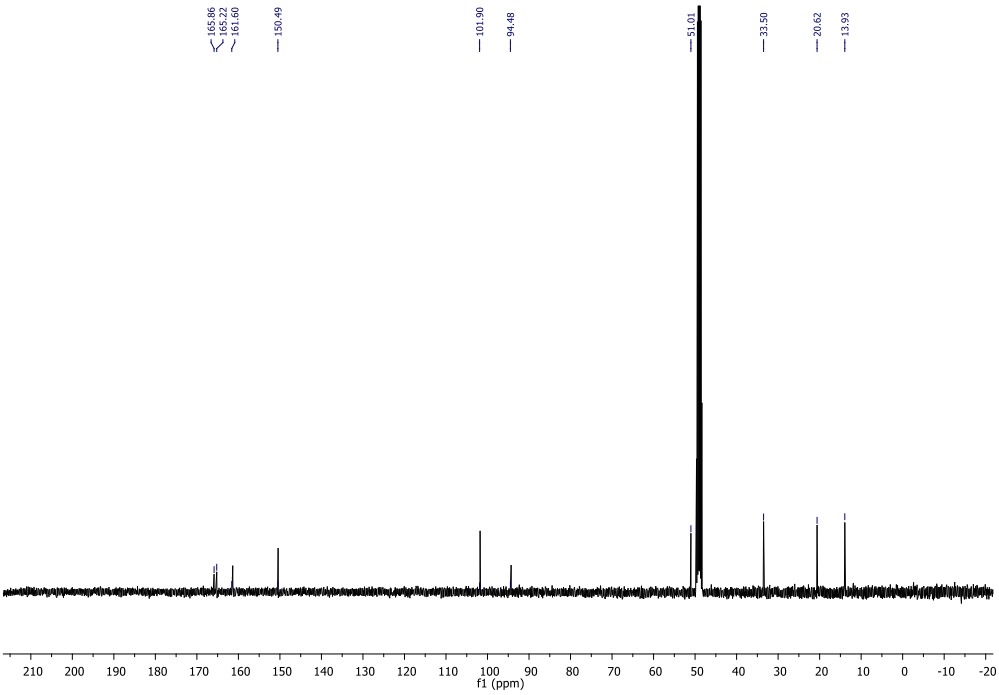
XXIV. Espectro RMN de carbono DEPT do composto **8**. ^{13}C-DEPT-RMN (MeOD)



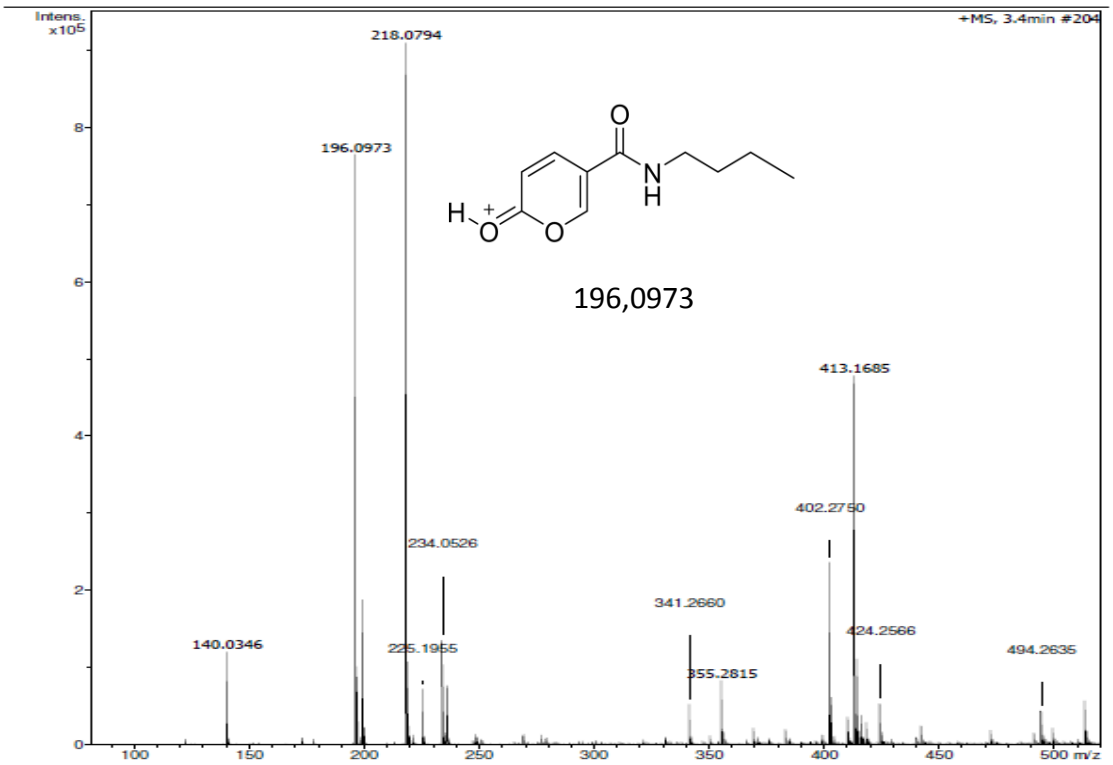
XXV. Espectro RMN de hidrogênio composto **9**. ^{1}H-RMN (MeOD).



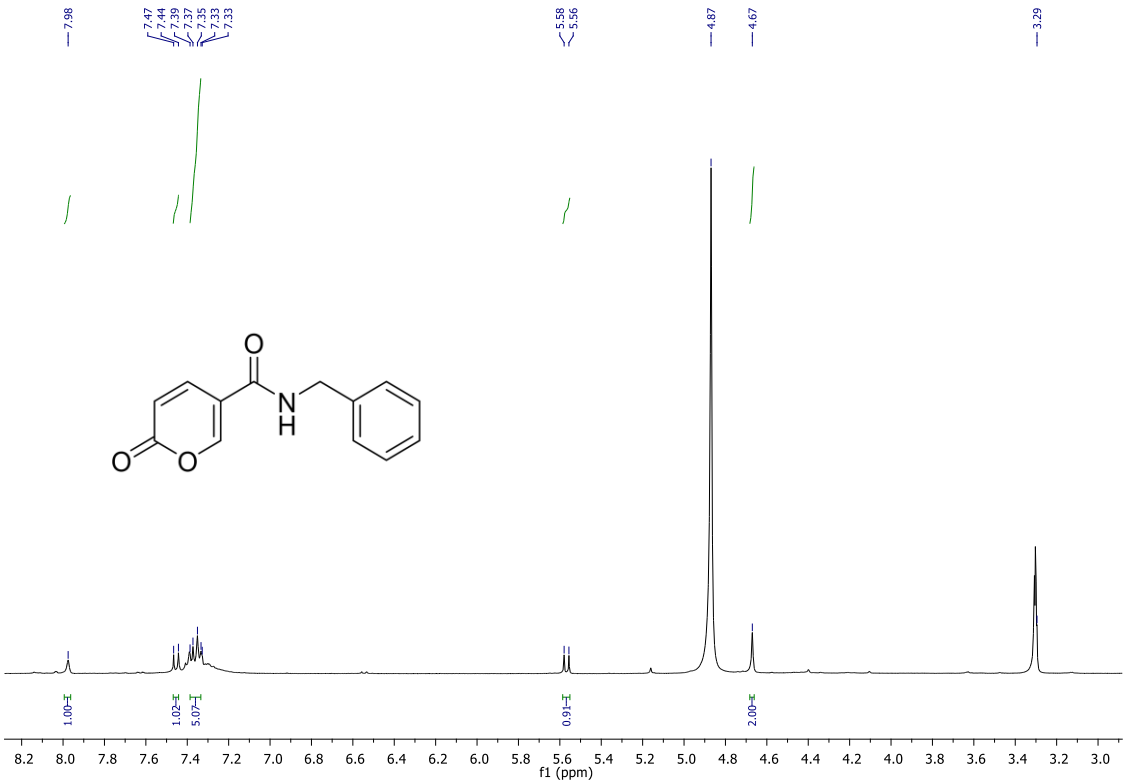
XXVI. Espectro RMN de carbono composto **9**. ^{13}C-RMN (MeOD).



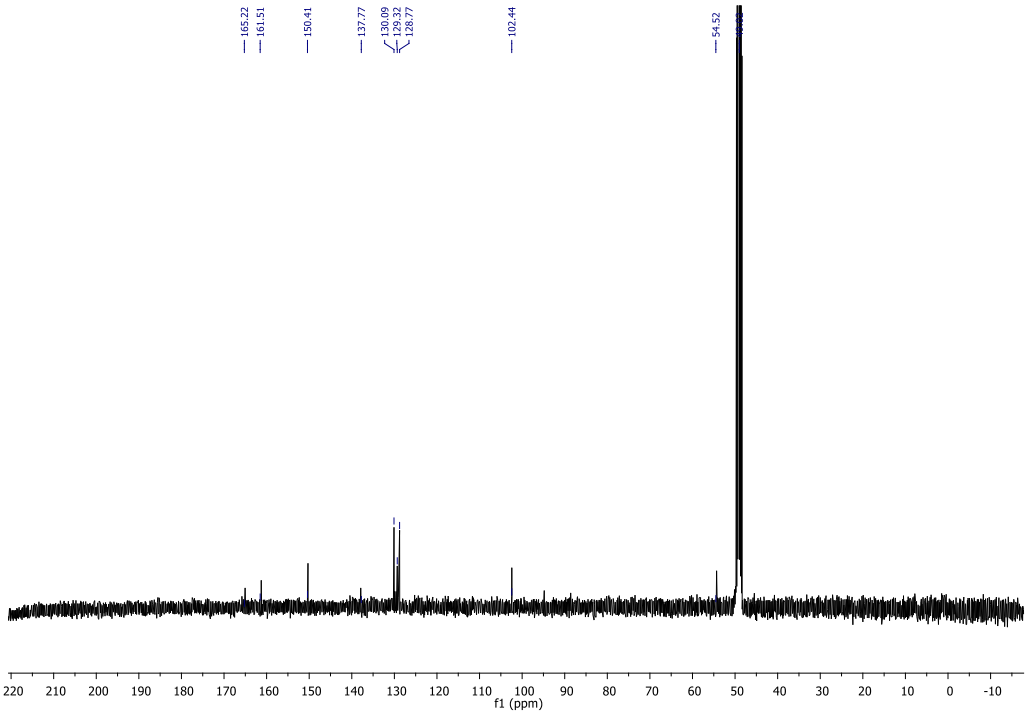
XXVII. ESI de alta resolução do composto **9**



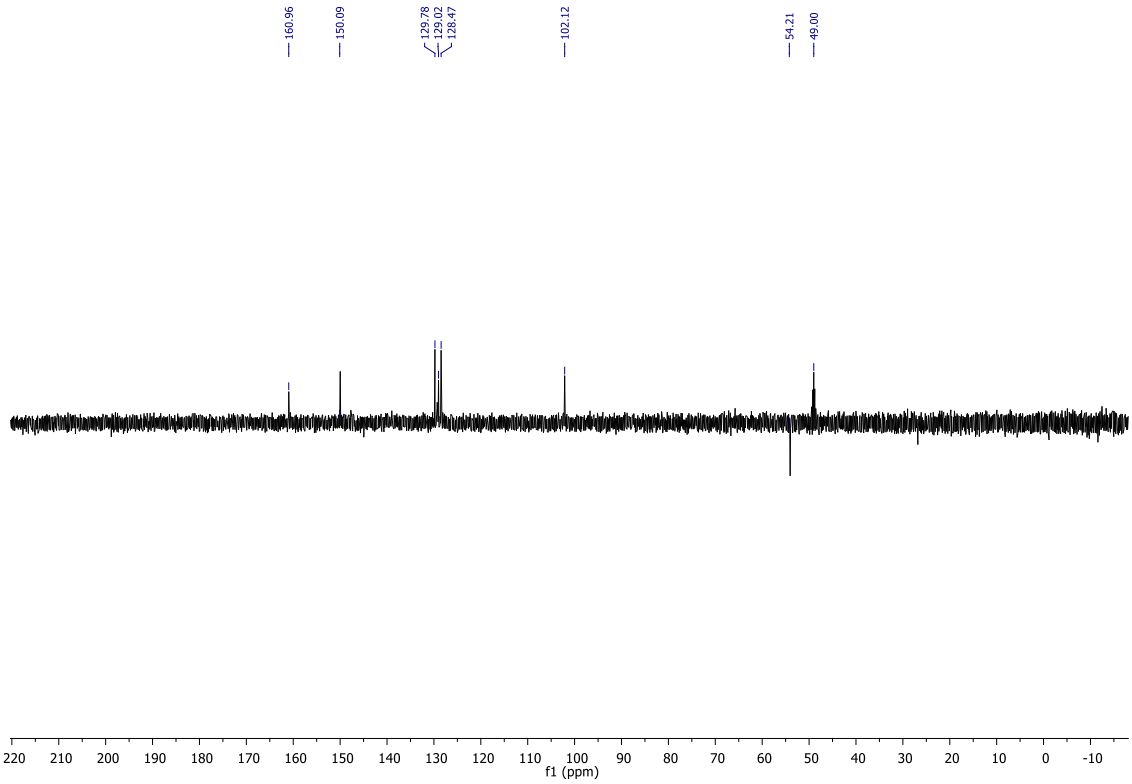
XXVIII. Espectro RMN de hidrogênio composto **10**. ^{1}H-RMN (MeOD).



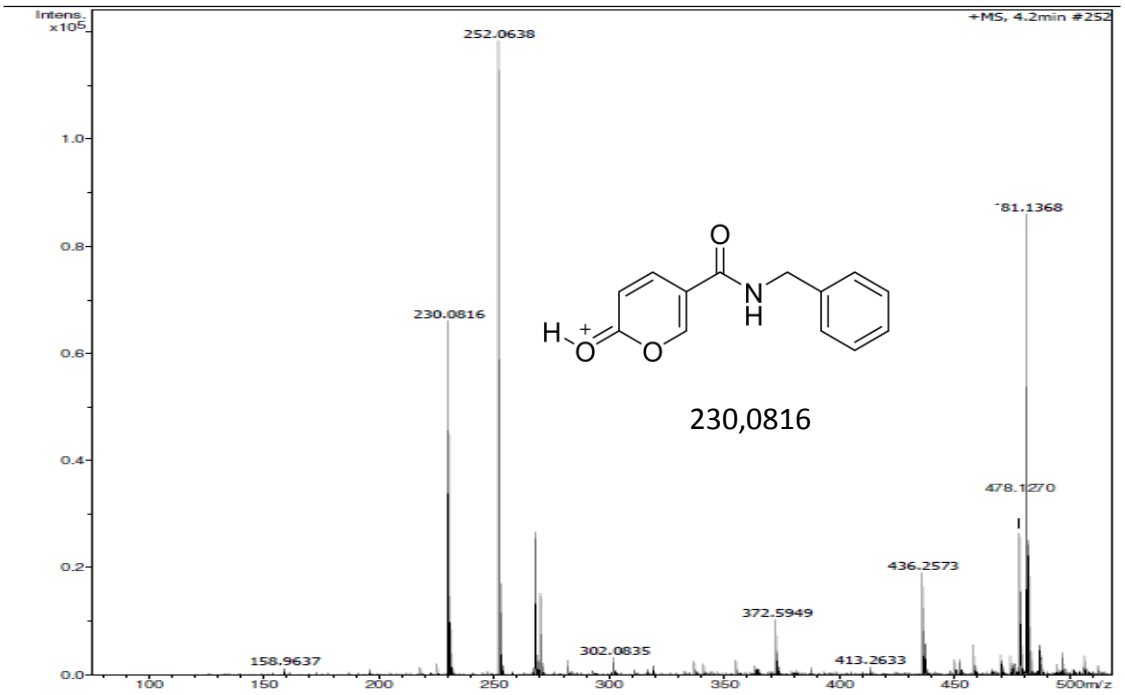
XXIX. Espectro RMN de carbono composto **10**. ^{13}C-RMN (MeOD).



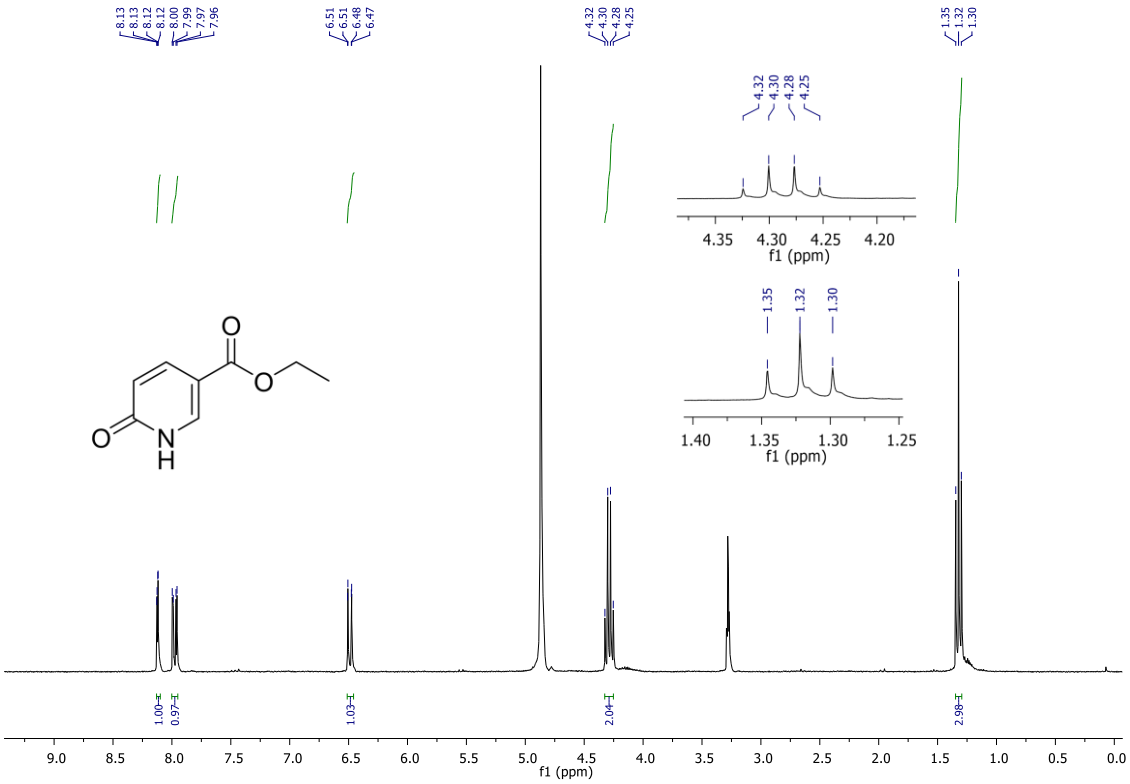
XXX. Espectro RMN de carbono DEPT do composto **10**. ^{13}C-DEPT-RMN (MeOD)



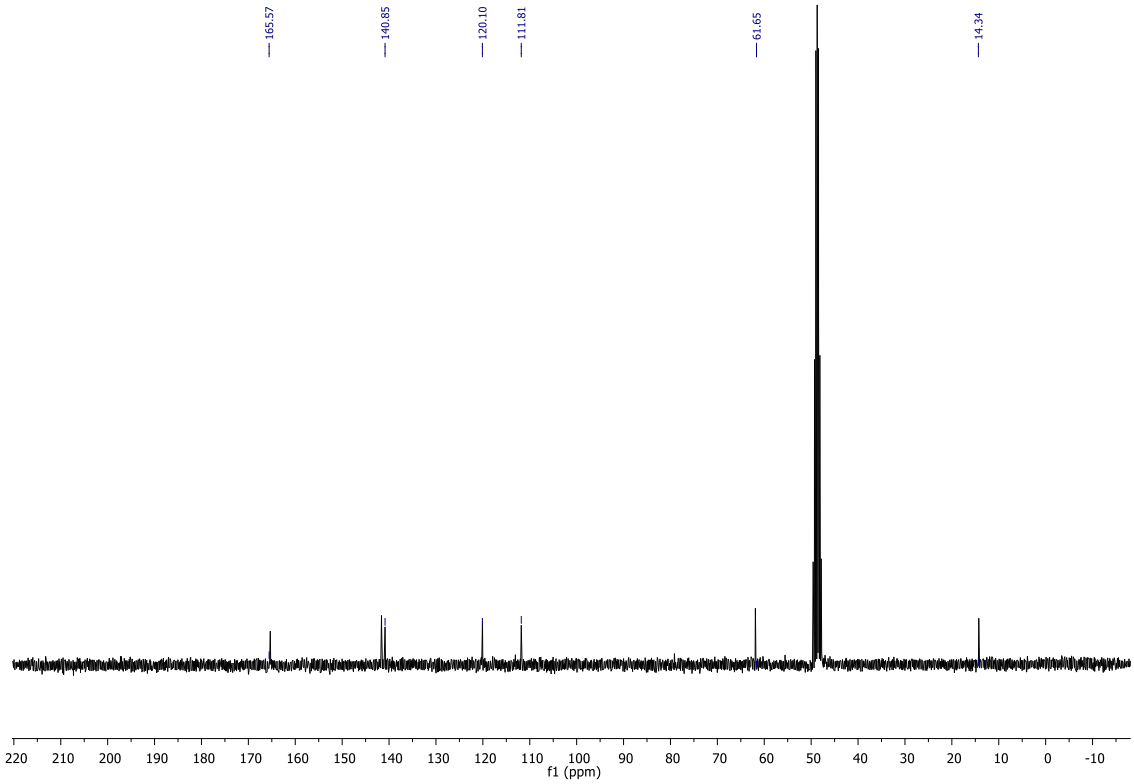
XXXI. ESI de alta resolução para o composto **10**.



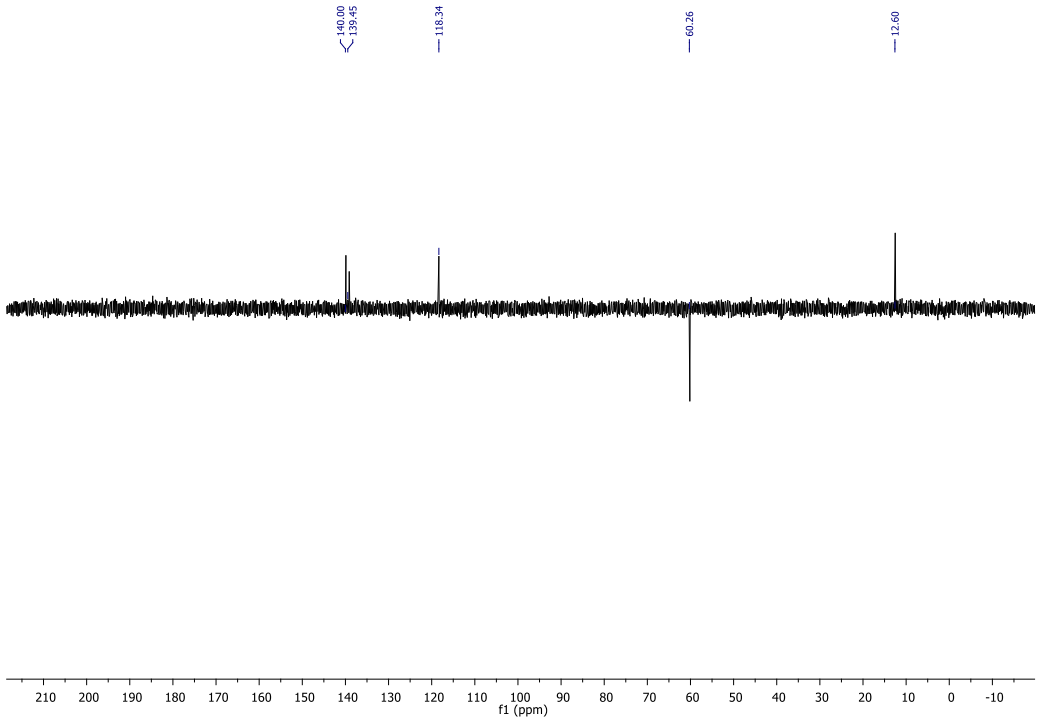
XXXII. Espectro RMN de hidrogênio composto **11**. ^{1}H-RMN (MeOD).



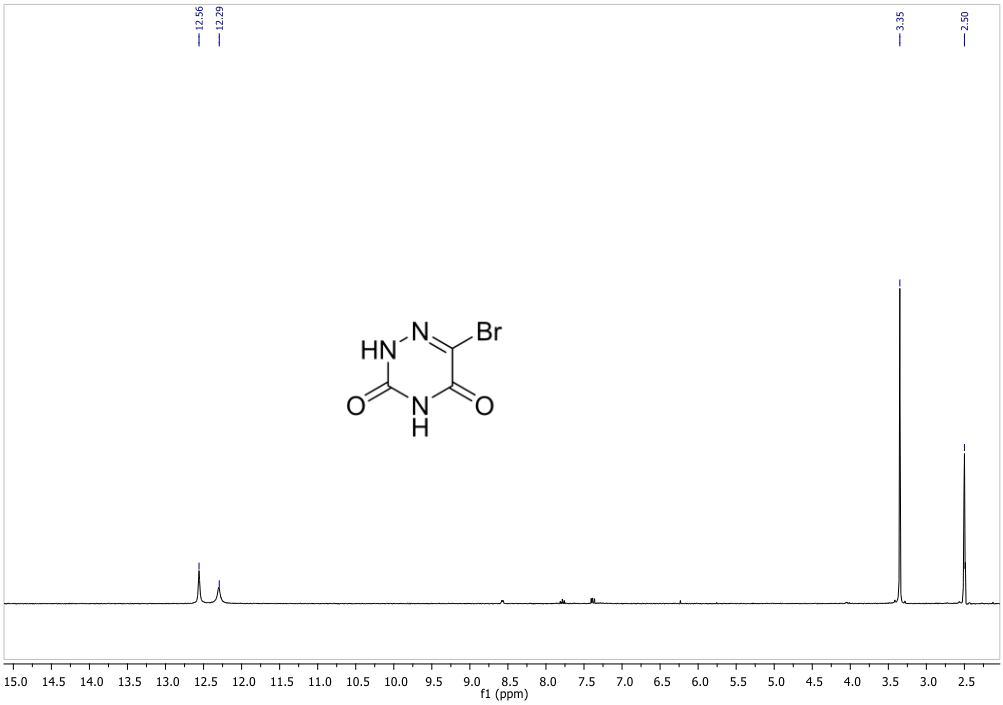
XXXIII. Espectro RMN de carbono composto **11**. ^{13}C-RMN (MeOD).



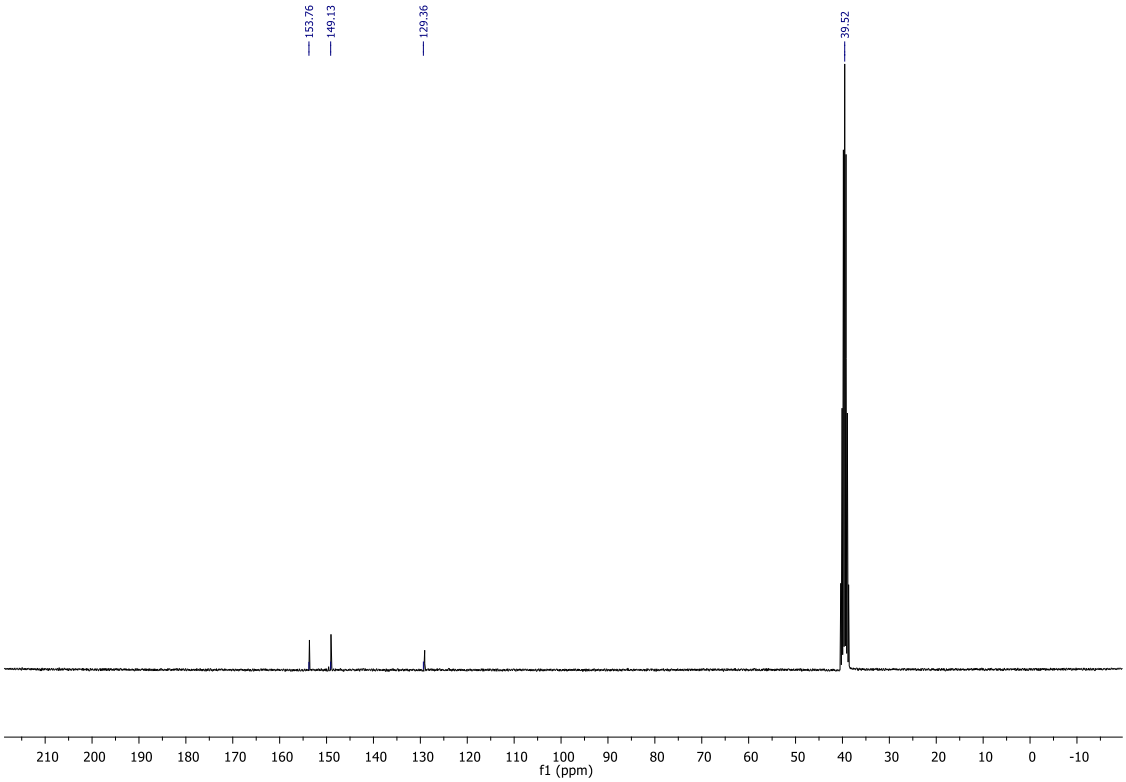
XXXIV. Espectro RMN de carbono DEPT do composto **11**. ^{13}C-DEPT-RMN (MeOD).



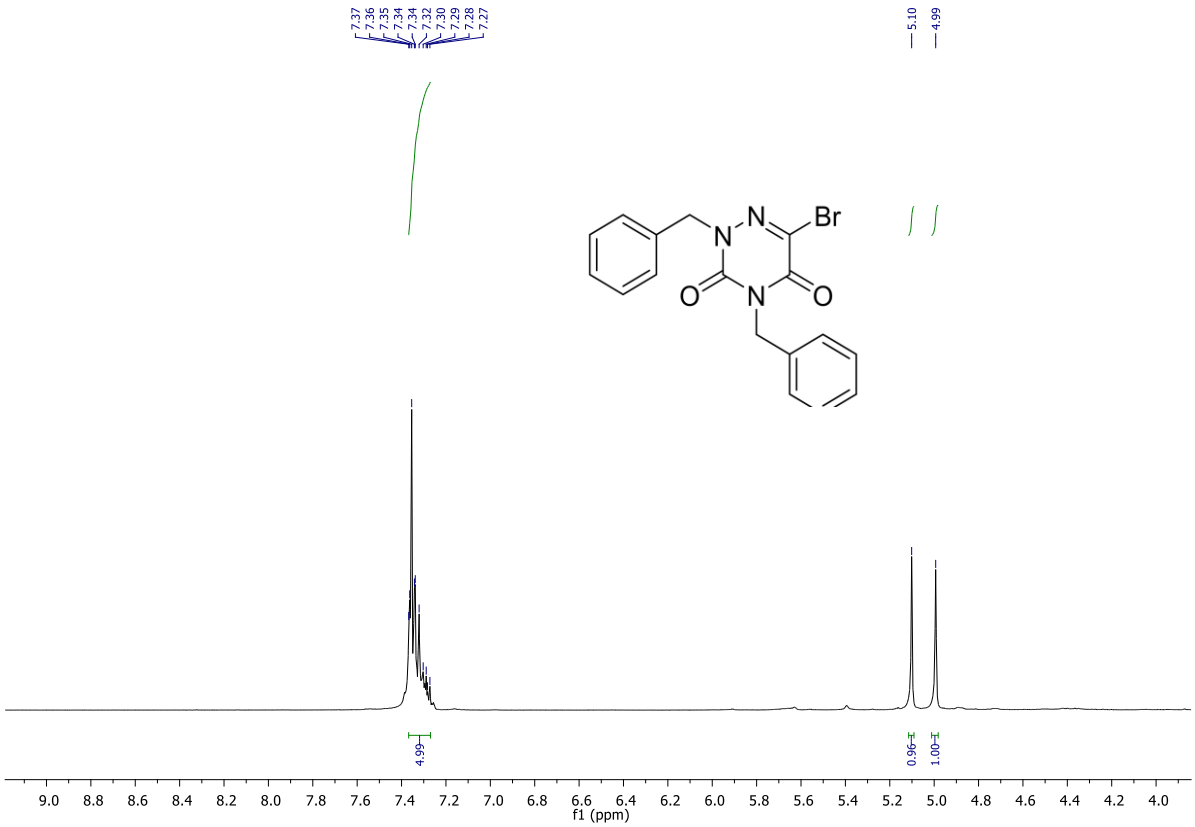
XXXV. Espectro RMN de hidrogênio composto **13**. ^{1}H-RMN (DMSO).



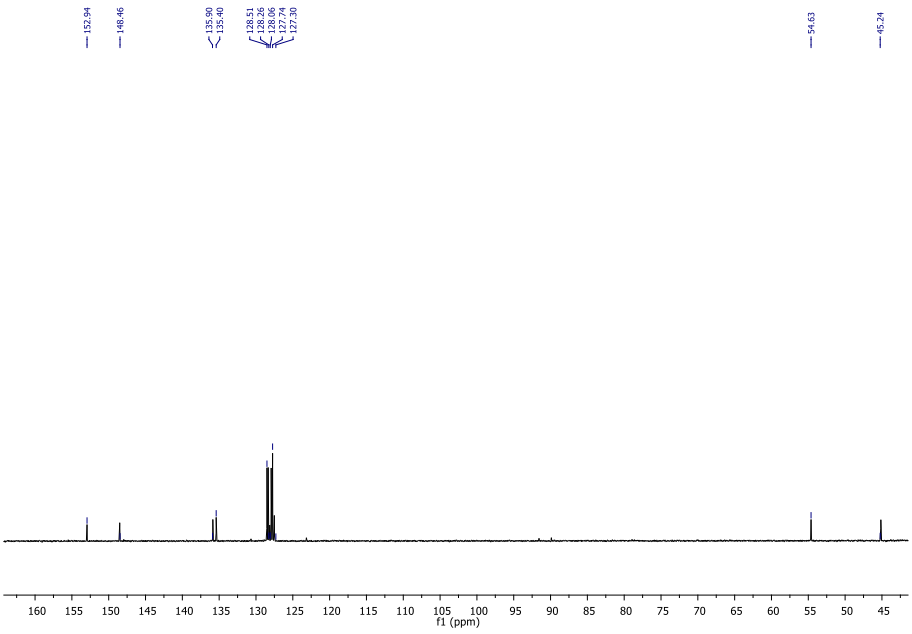
XXXVI. Espectro RMN de carbono composto **13**. ^{13}C-RMN (DMSO).



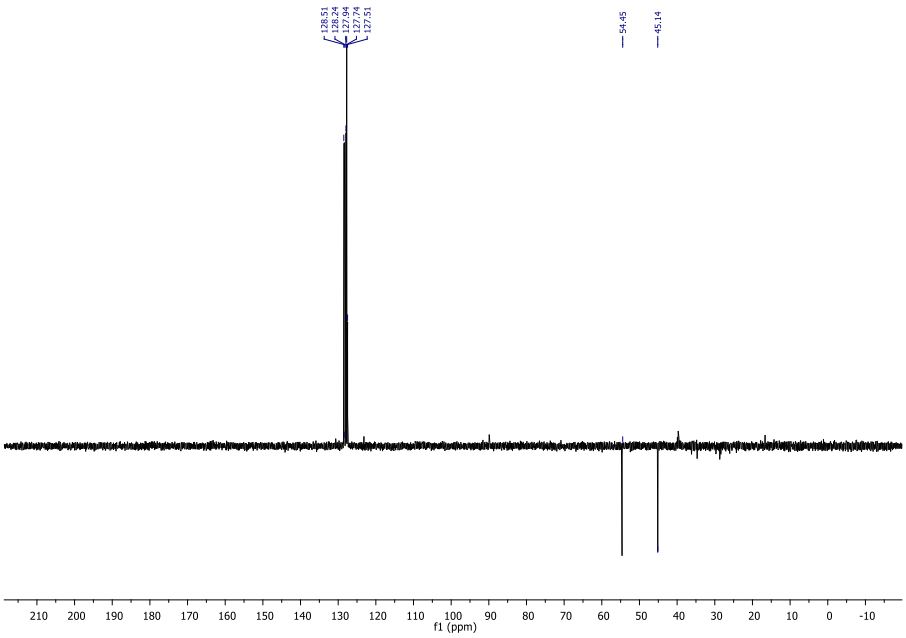
XXXVII. Espectro RMN de hidrogênio composto **14**. ^{1}H-RMN (DMSO).



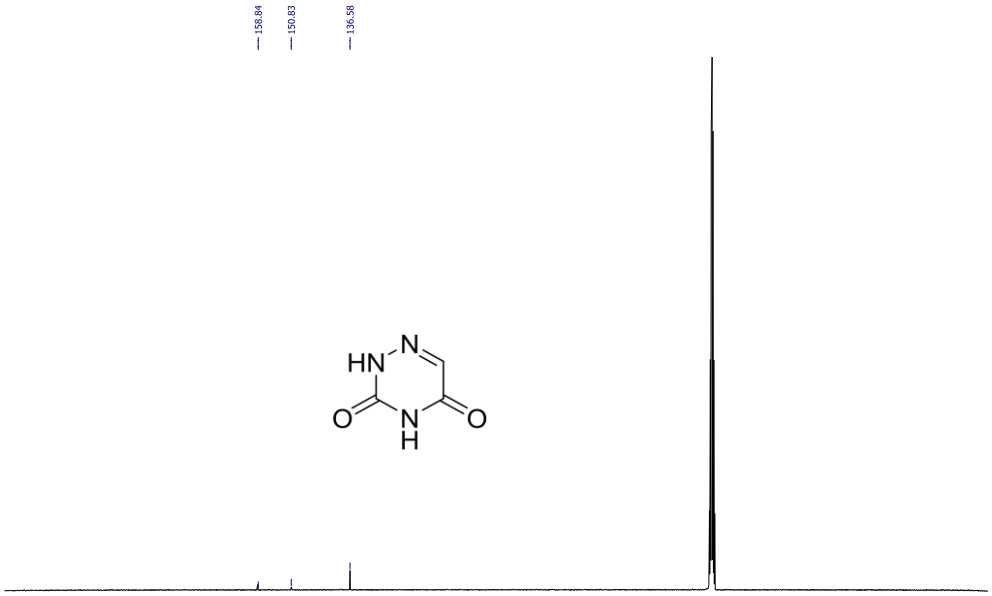
XXXVIII Espectro RMN de hidrogênio composto **14**. ^{1}H-RMN (DMSO)



XXXIX Espectro RMN de hidrogênio composto **14**. ^{1}H-RMN (DMSO)



XL. Espectro RMN de carbono composto **12**. ^{13}C-RMN (MeOD).



7. REFERÊNCIAS

AGUIR, N. E. et al. Visceral leishmaniasis in immunocompetent adults. About six cases. **Pathologie Biologie,** v. 61, n. 2, p. 54-58, Apr 2013.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **Plos One,** v. 7, n. 5, May 31 2012.

ANNOURA, T. et al. The origin of dihydroorotate dehydrogenase genes of kinetoplastids, with special reference to their biological significance and adaptation to anaerobic, parasitic conditions. **Journal of Molecular Evolution,** v. 60, n. 1, p. 113-127, Jan 2005.

ARAKAKI, T. L. et al. Characterization of Trypanosoma brucei dihydroorotate dehydrogenase as a possible drug target; structural, kinetic and RNAi studies. **Molecular Microbiology,** v. 68, n. 1, p. 37-50, Apr 2008.

ASHWORTH, I. W. et al. A new route for manufacture of 3-cyano-1-naphthalenecarboxylic acid. **Organic Process Research & Development,** v. 7, n. 1, p. 74-81, Jan-Feb 2003.

BATT, D. G. Inhibitors of dihydroorotate dehydrogenase. **Expert Opinion on Therapeutic Patents,** v. 9, n. 1, p. 41-54, Jan 1999.

BAUMGARTNER, R. et al. Dual binding mode of a novel series of DHODH inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry,** v. 49, n. 4, p. 1239-1247, Feb 2006.

BEKHIT, A. A.; FAHMY, H. T. Y. Design and synthesis of some substituted 1H-pyrazolyl-oxazolidines or 1H-pyrazolyl-thiazolidines as anti-inflammatory-antimicrobial agents. **Archiv Der Pharmazie,** v. 336, n. 2, p. 111-118, Apr 2003.

CORDEIRO, A. T. et al. Crystal structure of dihydroorotate dehydrogenase from Leishmania major. **Biochimie,** v. 94, n. 8, p. 1739-1748, Aug 2012.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clin Microbiol Rev,** v. 19, n. 1, p. 111-26, Jan 2006.

CUMMINGS, M.; FARNUM, M.; NELEN, M. Universal screening methods and applications of ThermoFluor (R). **Journal of Biomolecular Screening,** v. 11, n. 7, p. 854-863, OCT 2006 .

DAFTARIAN, P. M. et al. A Targeted and Adjuvanted Nanocarrier Lowers the Effective Dose of Liposomal Amphotericin B and Enhances Adaptive Immunity in Murine Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases,** v. 208, n. 11, p. 1914-1922, Dec 2013.

DARU, J.; STIRLING, A. Mechanism of the Pechmann Reaction: A Theoretical Study. **Journal of Organic Chemistry,** v. 76, n. 21, p. 8749-8755, Nov 2011.

DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatologic Therapy,** v. 22, n. 6, p. 491-502, Nov-Dec 2009.

DE OLIVEIRA GUERRA, J. A. et al. Tegumentary leishmaniasis in the State of Amazonas: what have we learned and what do we need? **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical,** v. 48, p. 12-19, Jun 2015.

DE PAULO, L. F. B. et al. Mucocutaneous leishmaniasis: mucosal manifestations in an endemic country. **International Journal of Infectious Diseases,** v. 17, n. 11, p. E1088-E1089, Nov 2013.

DEVINE, S. M. et al. Promiscuous 2-Aminothiazoles (PrATs): A Frequent Hitting Scaffold. **Journal of Medicinal Chemistry,** v. 58, n. 3, p. 1205-1214, Feb 2015. ISSN 0022-2623.

EL-AZAB, A. S.; ABDEL-AZIZ, A. A. M. AN EFFICIENT SYNTHESIS OF THIOESTERS VIA TFA-CATALYZED REACTION OF CARBOXYLIC ACID AND THIOLS: REMARKABLY FACILE C-S BOND FORMATION. **Phosphorus Sulfur and Silicon and the Related Elements,** v. 187, n. 9, p. 1046-1055, 2012.

ERLANSON, D. A. Introduction to Fragment-Based Drug Discovery. In: DAVIES, T. G. e HYVONEN, M. (Ed.). **Fragment-Based Drug Discovery and X-Ray Crystallography**. Berlin: Springer-Verlag Berlin, v.317, 2012. p.1-32. (Topics in Current Chemistry).

FELICIANO, P. R. et al. Cloning, expression, purification, and characterization of Leishmania major dihydroorotate dehydrogenase. **Protein Expression and Purification,** v. 48, n. 1, p. 98-103, Jul 2006.

GARAVITO, M. F.; NARVAEZ-ORTIZ, H. Y.; ZIMMERMANN, B. H. Pyrimidine Metabolism: Dynamic and Versatile Pathways in Pathogens and Cellular Development. **Journal of Genetics and Genomics,** v. 42, n. 5, p. 195-205, May 2015.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. D. L. R. D. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** v. 36, n. 1, p. 71-80, 01 2003.

GREENE, S. et al. INHIBITION OF DIHYDROOROTATE DEHYDROGENASE BY THE IMMUNOSUPPRESSIVE AGENT LEFLUNOMIDE. **Biochemical Pharmacology,** v. 50, n. 6, p. 861-867, Sep 1995.

GUSTAFSON, G. et al. Identification of a new antifungal target site through a dual biochemical and molecular-genetics approach. **Current Genetics,** v. 30, n. 2, p. 159-165, Jul 1996.

HURT, D. E.; SUTTON, A. E.; CLARDY, J. Brequinar derivatives and species-specific drug design for dihydroorotate dehydrogenase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters,** v. 16, n. 6, p. 1610-1615, Mar 2006.

INAOKA, D. K. et al. Structures of Trypanosoma cruzi dihydroorotate dehydrogenase complexed with substrates and products: atomic resolution insights into mechanisms of dihydroorotate oxidation and fumarate reduction. **Biochemistry,** v. 47, n. 41, p. 10881-91, Oct 2008.

IRANPOOR, N. et al. Easily prepared azopyridines as potent and recyclable reagents for facile esterification reactions. An efficient modified mitsunobu reaction. **Journal of Organic Chemistry,** v. 73, n. 13, p. 4882-4887, Jul 2008.

KAMINSKI, T.; KIRSCH, G. Claisen condensation of N-methylpyrrolidinone and alpha-chloronicotinic esters. **Journal of Heterocyclic Chemistry,** v. 45, n. 1, p. 229-234, Jan-Feb 2008.

KAPPAGODA, S.; IOANNIDIS, J. P. A. Prevention and control of neglected tropical diseases; overview of randomized trials, systematic reviews and meta-analyses. **Bulletin of the World Health Organization,** v. 92, n. 5, p. 356-366, May 2014.

LEIFSO, K. et al. Genomic and proteomic expression analysis of Leishmania promastigote and amastigote life stages: the Leishmania genome is constitutively expressed. **Mol Biochem Parasitol,** v. 152, n. 1, p. 35-46, Mar 2007.

LEWNARD, J. A. et al. Forecasting Temporal Dynamics of Cutaneous Leishmaniasis in Northeast Brazil. **Plos Neglected Tropical Diseases,** v. 8, n. 10, p. 11, Oct 2014.

LIMA, M. I. S. et al. Genotoxic effects of the antileishmanial drug glucantime(A (R)). **Archives of Toxicology,** v. 84, n. 3, p. 227-232, Mar 2010.

LIU, S. P. et al. Structures of human dihydroorotate dehydrogenase in complex with antiproliferative agents. **Structure with Folding & Design,** v. 8, n. 1, p. 25-33, Jan 2000.

LIU, Y. et al. Structure of the putative dihydroorotate dehydrogenase from Streptococcus mutans. **Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications,** v. 67, p. 182-187, Feb 2011.

LO, M. et al. Evaluation of fluorescence-based thermal shift assays for hit identification in drug discovery. **Analytical Biochemistry,** v. 332, n. 1, p. 153-159, SEP 1 2004 2004.

MAES, J.; RAUWS, T. R. M.; MAES, B. U. W. Synthesis of C8N9 Annulated Purines by Iron-Catalyzed CH Amination. **Chemistry-a European Journal,** v. 19, n. 28, p. 9137-9141, Jul 2013.

MALTEZOU, H. C. Drug resistance in visceral leishmaniasis. **J Biomed Biotechnol,** v. 2010, p. 617521, 2010.

MANSUETO, P. et al. Leishmaniasis in travelers: A literature review. **Travel Medicine and Infectious Disease,** v. 12, n. 6, p. 563-581, Nov-Dec 2014.

MARCINKEVICIENE, J. et al. Selective inhibition of bacterial dihydroorotate dehydrogenases by thiadiazolidinediones. **Biochemical Pharmacology,** v. 60, n. 3, p. 339-342, Aug 2000.

MCDONALD, C. A.; PALFEY, B. A. Substrate binding and reactivity are not linked: grafting a proton-transfer network into a Class 1A dihydroorotate dehydrogenase. **Biochemistry,** v. 50, n. 14, p. 2714-6, Apr 2011.

MOLYNEUX, D. H. Neglected tropical diseases: now more than just 'other diseases' - the post-2015 agenda. **International Health,** v. 6, n. 3, p. 172-180, Sep 2014.

MORENO-RODRIGUEZ, A. C. et al. Efficacy and toxicity evaluation of new amphotericin B micelle systems for brain fungal infections. **International Journal of Pharmaceutics,** v. 494, n. 1, p. 17-22, Oct 2015.

MORISAWA, Y.; KATAOKA, M.; KITANO, N. STUDIES ON ANTICOCCIDIAL AGENTS .2. SYNTHESIS AND ANTICOCCIDIAL ACTIVITY OF NITROPYRIDINECARBOXAMIDES AND DERIVATIVES. **Journal of Medicinal Chemistry,** v. 20, n. 4, p. 483-487, 1977.

MUNIER-LEHMANN, H. et al. On Dihydroorotate Dehydrogenases and Their Inhibitors and Uses. **Journal of Medicinal Chemistry,** v. 56, n. 8, p. 3148-3167, Apr 2013.

NASCIMENTO, B. W. L. et al. Study of sand flies (Diptera: Psychodidade) in visceral and cutaneous leishmaniasis areas in central western of Minas Gerais state - Brazil. **Acta Tropica,** v. 125, n. 3, p. 262-268, Mar 2013.

NAUJORKS, A. A. D. et al. Novel naphthoquinone derivatives and evaluation of their trypanocidal and leishmanicidal activities. **Organic & Biomolecular Chemistry,** v. 13, n. 2, p. 428-437, 2015.

NAVARRETE-DECHENT, C. et al. Dermatologic manifestations associated with HIV/AIDS. **Revista Chilena De Infectologia,** v. 32, p. S57-S71, Feb 2015.

NELSON, D. L.; LEHNINGER, A. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. New York: W.H. Freeman, 2008.

NEVES, L. O. et al. A randomized clinical trial comparing meglumine antimoniate, pentamidine and amphotericin B for the treatment of cutaneous leishmaniasis by Leishmania guyanensis. **Anais Brasileiros De Dermatologia,** v. 86, n. 6, p. 1092-1101, Nov-Dec 2011.

NGUEWA, P. A. et al. Pentamidine is an antiparasitic and apoptotic drug that selectively modifies ubiquitin. **Chemistry & Biodiversity,** v. 2, n. 10, p. 1387-1400, 2005.

NIELSEN, F. S.; ANDERSEN, P. S.; JENSEN, K. F. The B form of dihydroorotate dehydrogenase from Lactococcus lactis consists of two different subunits, encoded by the pyrDb and pyrK genes, and contains FMN, FAD, and [FeS] redox centers. **Journal of Biological Chemistry,** v. 271, n. 46, p. 29359-29365, Nov 1996.

NORAGER, S. et al. E-coli dihydroorotate dehydrogenase reveals structural and functional distinctions between different classes of dihydroorotate dehydrogenases. **Structure,** v. 10, n. 9, p. 1211-1223, Sep 2002.

PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of Infection,** v. 69, p. S10-S18, Nov 2014.

PADUA, R. A. P. et al. ThermoFMN - A Thermofluor Assay Developed for Ligand-Screening as an Alternative Strategy for Drug Discovery. **Journal of the Brazilian Chemical Society,** v. 25, n. 10, p. 1864-+, Oct 2014.

PAILA, Y. D.; SAHA, B.; CHATTOPADHYAY, A. Amphotericin B inhibits entry of Leishmania donovani into primary macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v. 399, n. 3, p. 429-433, Aug 2010.

PANTOLIANO, M. et al. High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery. **Journal of Biomolecular Screening,** v. 6, n. 6, p. 429-440, DEC 2001 .

PEIXOTO, J. A. et al. Antileishmanial Activity of the Hydroalcoholic Extract of Miconia langsdorffii, Isolated Compounds, and Semi-Synthetic Derivatives. **Molecules,** v. 16, n. 2, p. 1825-1833, Feb 2011.

PIGOTT, D. M. et al. Global Distribution Maps of the Leishmaniases. **Elife,** v. 3, p. 33, Jun 2014.

PINHEIRO, M. P. **Planejamento de inibidores das enzimas diidroorotato desidrogenase de *Trypanossoma cruzi* e *Leishmania major***. 2012. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-SP, Universidade de São Paulo

PINHEIRO, M. P.; EMERY, F. D.; NONATO, M. C. Target Sites for the Design of Anti-trypanosomatid Drugs Based on the Structure of Dihydroorotate Dehydrogenase. **Current Pharmaceutical Design,** v. 19, n. 14, p. 2615-2627, Apr 2013.

PINHEIRO, M. P.; IULEK, J.; NONATO, M. C. Crystal structure of Trypanosoma cruzi dihydroorotate dehydrogenase from Y strain. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v. 369, n. 3, p. 812-817, May 2008.

ROWLAND, P. et al. Structure of dihydroorotate dehydrogenase B: Electron transfer between two flavin groups bridged by an iron-sulphur cluster. **Structure,** v. 8, n. 12, p. 1227-1238, Dec 2000.

ROYER, A. M. et al. Iron Acyl Thiolato Carbonyls: Structural Models for the Active Site of the Fe - Hydrogenase (Hmd). **Journal of the American Chemical Society,** v. 132, n. 47, p. 16997-17003, Dec 2010.

SCOTT, D. E. et al. Fragment-Based Approaches in Drug Discovery and Chemical Biology. **Biochemistry,** v. 51, n. 25, p. 4990-5003, Jun 2012.

STOCKDALE, L.; NEWTON, R. A Review of Preventative Methods against Human Leishmaniasis Infection. **Plos Neglected Tropical Diseases,** v. 7, n. 6, Jun 2013.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. **Expert Opinion on Pharmacotherapy,** v. 14, n. 1, p. 53-63, Jan 2013.

TIPPARAJU, S. K. et al. Design and synthesis of 2-pyridones as novel inhibitors of the Bacillus anthracis enoyl-ACP reductase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters,** v. 18, n. 12, p. 3565-3569, Jun 2008.

TROTT, O.; OLSON, A. J. Software News and Update AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. **Journal of Computational Chemistry,** v. 31, n. 2, p. 455-461, Jan 2010.

VALE, E. C. S. D.; FURTADO, T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia,** v. 80, n. 4, p. 421-428, 2005-08 2005.

WANG, Q. Y. et al. Inhibition of Dengue Virus through Suppression of Host Pyrimidine Biosynthesis. **Journal of Virology,** v. 85, n. 13, p. 6548-6556, Jul 2011.

WHEELER, R. J.; GLUENZ, E.; GULL, K. The Limits on Trypanosomatid Morphological Diversity. **Plos One,** v. 8, n. 11, p. 18, Nov 2013.

WILSON, Z. N. et al. Genetic Dissection of Pyrimidine Biosynthesis and Salvage in Leishmania donovani. **Journal of Biological Chemistry,** v. 287, n. 16, p. 12759-12770, Apr 2012.

WYSS, D. F. et al. Combining NMR and X-ray Crystallography in Fragment-Based Drug Discovery: Discovery of Highly Potent and Selective BACE-1 Inhibitors. In: DAVIES, T. G. e HYVONEN, M. (Ed.). **Fragment-Based Drug Discovery and X-Ray Crystallography**. Berlin: Springer-Verlag Berlin, v.317, 2012. p.83-114. (Topics in Current Chemistry).

YANIK, M. et al. The psychological impact of cutaneous leishmaniasis. **Clinical and Experimental Dermatology,** v. 29, n. 5, p. 464-467, Sep 2004.